

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2012

Heli Aatola

# KVANTITATIIVISEN RT-PCR -MENETELMÄN VALIDOINTI PARECHOVIRUSTEN TUNNISTAMISEKSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Syksy 2012 | Sivumäärä 42

Ohjaajat: Ilari Suominen (FT), Petri Susi (Dosentti, FT) ja Riikka Österback (FM)

Heli Aatola

# KVANTITATIIVISEN RT-PCR -MENETELMÄN VALIDOINTI PARECHOVIRUSTEN TUNNISTAMISEKSI

Parechovirukset ovat sekä ihmisiä että eläimiä infektoivia pieniä RNA-virusia. Vaikka 95 % aikuisista Suomessa kantaa viruksen vasta-aineita, on parechovirusinfektioita tutkittu vasta viime vuosina. HPeV-infektio sairastetaan useimmiten alle yksivuotiaana. Infektio voi olla oireeton, aiheuttaa lieviä suolisto- ja hengitystieoireita tai johtaa vakaviin tulehdustiloihin, kuten aivokalvontulehdukseen.

Parechovirustartunta voidaan tunnistaa uloste-, nenänielu- tai likvor-näytteestä nopeasti ja luotettavasti RT-qPCR –menetelmällä. HPeV-infektion diagnosointiin kehitetty menetelmä on tarkoitus ottaa käyttöön Turun yliopiston UTULab-diagnostiikkalaboratoriossa. Laboratorion akkreditointi edellyttää kuitenkin uusien menetelmien validointia ennen käyttöönottoa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida ja validoida HPeV RT-qPCR –menetelmä, jotta se voidaan ottaa osaksi UTULabin tarjoamaa tutkimusvalikoimaa. RT-qPCR –menetelmille ei ole julkaistu selkeitä validointiohjeita, joten osana työtä oli validointisuunnitelman laatiminen. Validoitaviksi parametreiksi valittiin analyyttinen spesifisyys, herkkyys, toistotarkkuus, oikeellisuus sekä lineaarisuus ja määrittämisalue.

RT-reaktio, qPCR-reaktiossa käytettävä alukepari ja PCR-tuotteen leimausmenetelmä optimoitiin ennen validointia. Validoitavaan menetelmään valittiin testiajojen perusteella Fermentaksen RT-reaktion reagenssit ja K30-alue sekä qPCR-reaktioon julkaisematon forward-alue ja SYBR Green –leima.

Validointiajoilla todettiin, että menetelmä antaa positiivisen tuloksen eri lähteistä eristetyille HPeV-näytteille sekä negatiivisen tuloksen enteropositiivisille näytteille sekä näytematriiseille. Menetelmän herkkyudeksi saatiin  $10^1$ - $10^0$  K/ $\mu$ l ja lineaariseksi alueeksi  $10^1$ - $10^4$  K/ $\mu$ l. Menetelmän toistotarkkuus ja oikeellisuus olivat hyväksyttävissä rajoissa. qPCR-reaktion keskimääräinen tehokkuus oli 87 %. Validointiajojen perusteella RT-qPCR –menetelmä parechovirusten tunnistamiseksi on riittävän luotettava, herkkä sekä toistettava otettavaksi diagnostiseen käyttöön.

ASIASANAT:

polymeraasiketjureaktio, parechovirus, validointi, diagnostiikka

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Autumn 2012 | 42 pages

Instructors: Ilari Suominen (PhD), Petri Susi (Docent, PhD) and Riikka Österback (MSc)

Heli Aatola

## QUANTITATIVE RT-PCR METHOD FOR THE DETECTION OF PARECHOVIRUSES

Parechoviruses are small RNA viruses which can infect both humans and animals. Even though 95 % of adults in Finland carry parechovirus antibodies, HPeV infections have only been studied in recent years. HPeV infections are commonly found in children aged up to one year. The infection can be asymptomatic, cause mild gastrointestinal and respiratory symptoms, or result in a severe inflammation such as meningitis.

With the RT-qPCR method, an HPeV infection can rapidly and reliably be identified from a nasopharyngeal, stool or cerebrospinal fluid sample. The method will be used in the UTULab diagnostic laboratory of Turku University. The accreditation of the diagnostic laboratory requires the validation of new diagnostic methods.

The aim of this thesis was to optimize and validate the HPeV RT-qPCR method in order for it to be offered as one of UTULab's diagnostic services. As general instructions for the validation of RT-qPCR have not been published, the validation instructions were prepared as part of the thesis project. Analytical specificity, sensitivity, precision, accuracy, linearity and range were selected as the parameters for the validation.

Before validation, the RT reaction method, the primer pair to be used in the qPCR reaction, and the labeling method of the PCR product were optimized. The best results were achieved by using RT reagents by Fermentas and reverse primer K30 and an unpublished forward primer in the qPCR reaction with an SYBR Green label.

By validation runs, the method was shown to give positive results to samples with parechovirus from different sample sources and negative results to enterovirus positive samples and template free sample matrices. The sensitivity of the method was determined as between  $10^1$  and  $10^0$  copies/ $\mu$ l and the linearity of the method as  $10^1$ - $10^4$  copies/ $\mu$ l. The precision and accuracy of the method were acceptable. The average efficiency of the qPCR reaction was 87 %. The validation verified that the RT-qPCR method for the detection of parechoviruses is reliable, sensitive and reproducible enough to be used as a diagnostic tool.

### KEYWORDS:

polymerase chain reaction, parechovirus, validation, diagnostics

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 IHMISEN PARECHOVIRUKSET</b>	<b>9</b>
2.1 Rakenne	10
2.2 Diagnostiikka	12
<b>3 MENETELMÄT JA NÄYTTEET</b>	<b>14</b>
3.1 RT-qPCR	14
3.1.1 Käänteiskopiointi	15
3.1.2 Reaaliaikainen, kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio	16
3.1.3 Leimausmenetelmät	18
3.1.4 Alukkeet	20
3.1.5 Laitteisto ja ohjelmisto	21
3.2 Agaroosigeelielektroforeesi	21
3.3 Nukleiinihappoeristys	21
3.4 HPeV-standardit	22
3.5 Tyyppikannat	22
3.6 Kliiniset viljelynäytteet	22
3.7 Näytematriisit	22
<b>4 KVANTITATIIVISEN RT-PCR –MENETELMÄN VALIDOINTI</b>	<b>23</b>
4.1 Validoinnin haasteet	23
4.2 Validoitavat parametrit	24
4.2.1 Analyyttinen spesifisyys	24
4.2.2 Herkkyys	25
4.2.3 Toistotarkkuus	25
4.2.4 Oikeellisuus	26
4.2.5 Vakaus	27
4.2.6 Lineaarisuus ja määrittäminen	27
4.3 Validointisuunnitelma	28
<b>5 TULOKSET</b>	<b>29</b>

<b>6 LOPPUPÄÄTELMÄT</b>	<b>30</b>
-------------------------	-----------

<b>LÄHTEET</b>	<b>32</b>
----------------	-----------

## **LIITTEET**

Liite 1. Alukkeet ja koetin	
Liite 2. Parecho RT-qPCR -työohje	
Liite 3. Vaihtoehtoiset menetelmät	
Liite 4. Parecho RT-qPCR –menetelmän validointisuunnitelma	
Liite 5. Ajojen välinen vaihtelu kolmella HPeV-1 plasmidilaimennossarjalla	

## **KUVAT**

Kuva 1. <i>Picornaviridae</i> -heimoon kuuluvien sukujen taksonominen jaottelu. Kuvassa on esitetty <i>Parechovirus</i> -suvun kaksi lajia, ihmisen parechovirus ja Ljungan virus.	9
Kuva 2. Parechoviruksen genomien rakenne ja proteiinien oletetut tehtävät (Harvala & Simmonds, 2009, kuva muokattu).	10
Kuva 3. Parechoviruksen 20-tahokkaisen kapsidin muodostaa kolme eri rakenneproteiinia ( <a href="http://viralzone.expasy.org">http://viralzone.expasy.org</a> [viitattu 10.8.2012], kuva muokattu).	11
Kuva 4. RT-reaktiossa transkriptaasientsyymi rakentaa yksisäikeisestä RNA:sta komplementaarista DNA:ta. (Bustin yms, 2005, kuva muokattu)	15
Kuva 5. Spesifisen koettimen toimintaperiaate (Bustin yms, 2005, kuva muokattu).	19

## **KUVIOT**

Kuvio 1. Yhdeksän erivahvuisen positiivisen näytteen amplifikaatiokäyrät. Fluoresenssi on ilmoitettu lineaarisella asteikolla.	17
Kuvio 2. Standardisuoran avulla voidaan laskea tuntemattomien näytteiden nukleiinihappopitoisuudet.	18
Kuvio 3. Sulamispistemäärityksen avulla voidaan varmentaa positiivinen amplifikaatiotulos. Parechoviruspositiivisten PCR-tuotteiden sulamispiste menetelmään valituilla alukkeilla on n. 83-85 °C.	20

## KÄYTETYT LYHENTEET

bp	base pair, emäspari
cDNA	complementary DNA, komplementaarinen DNA
C <sub>q</sub>	threshold cycle, kynnyssykli
DNA	deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
dsDNA	double-stranded DNA, kaksijuosteinen DNA
HPeV	human parechovirus, ihmisen parechovirus
ka	keskiarvo
K/μl	kopioluku, kopiota nukleiinihappoa/mikrolitra
PCR	polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
qPCR	quantitative real-time PCR, kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR
RNA	ribonucleic acid, ribonukleiinihappo
RT	reverse transcription, käänteiskopiointi
s	keskihajonta

# 1 JOHDANTO

Ihmisen parechovirusten diagnostinen merkitys on selkiytynyt vasta viime vuosikymmenten aikana. Jo 1950-luvulla löydetyt ensimmäiset parechovirukset tyypitettiin kuuluviksi enterovirusiin (echovirus22 ja -23). Virusdiagnostiikan ja tyypitysmenetelmien kehittymisen myötä em. viruksia on ollut mahdollista tutkia tarkemmin. 1990-luvun loppuun mennessä oli selvää, että echovirus22 ja echovirus23 eroavat sekvensseiltään merkittävästi muista enterovirusista. Tyypitystutkimusten tulokset johtivat uuden *Parechovirus*-suvun muodostamiseen. (Joki-Korpela & Hyypiä, 1998; Harvala & Simmonds, 2009)

Serologisten tutkimusten perusteella lähes jokainen suomalainen on seropositiivinen parechovirus1 vasta-aineille, mikä on merkki sairastetusta parechovirus-infektiosta. Virustartunta saadaan yleensä lapsena, usein alle vuoden ikäisenä. Tutkimusten perusteella infektion saaneilla on todettu olevan riski sairastua vakaviin tulehdustiloihin. Parechovirusinfektion nopea diagnosointi on siten merkittävä apu hoitopäätösten teossa. (Noordhoek ym, 2008; van der Sanden ym, 2008; Harvala & Simmonds, 2009; Bennet ym, 2011)

Opinnäytetyöni tavoitteena oli optimoida ja validoida RT-qPCR –menetelmä ihmisen parechovirusinfektioiden tunnistamiseksi. Uuden menetelmän toimivuuden osoittaminen validoinnilla on välttämätöntä ennen sen käyttöönottoa kliinisten näytteiden diagnosointiin (Rabenau ym, 2007; Storberg, 2011). HPeV RT-qPCR –menetelmän validoinnin lähtökohtana käytettiin julkaistua menetelmää (Benschop ym, 2008).

Työn aikana menetelmälle laadittiin validointisuunnitelma, jonka osa-alueita toteutettiin ajan ja materiaalien sallimissa puitteissa. Lisäksi ennen validointiin siirtymistä menetelmää optimoitiin mm. käytettävien alukkeiden osalta. Työn päätavoite oli validointisuunnitelman tekeminen, sillä RT-qPCR –menetelmälle ei ole olemassa valmista validointiohjeistusta.

Työ toteutettiin yhteistyössä Turun ammattikorkeakoulun ja Turun yliopiston Virusopin kanssa. Parechovirus RT-qPCR -menetelmä on tarkoitus liittää osaksi Turun yliopiston alaisen UTULab -diagnostiikkalaboratorion tarjoamaa tutkimusvalikoimaa. UTULabin asiakkaina on mm. sairaaloita ja terveysasemia ympäri Suomen.



## 2 IHMISEN PARECHOVIRUKSET

*Picornavirales*-viruslahkoon kuuluu laaja *Picornaviridae*-heimo (pikornavirukset), jonka muodostaa kaksitoista eri sukua (Kuva 1). Heimoon kuuluu sekä ihmisiä että eläimiä infektioivia viruksia. *Parechovirus*-sukuun kuuluu kaksi lajia, ihmisen parechovirukset (HPeV) sekä Ljungan virus (LV), joista jälkimmäistä on löydetty ja eristetty metsämyyristä (Niklasson ym, 1999). (Benschop, 2009; [www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com). [viitattu 28.6.2012])

### *Picornaviridae*

- *Aphthovirus*
- *Avihepatovirus*
- *Cardiovirus*
- *Enterovirus*
- *Erbovirus*
- *Hepatovirus*
- *Kobuvirus*
- *Parechovirus*
  - *Human parechovirus*
  - *Ljungan virus*
- *Sapelovirus*
- *Senecavirus*
- *Teschovirus*
- *Tremovirus*

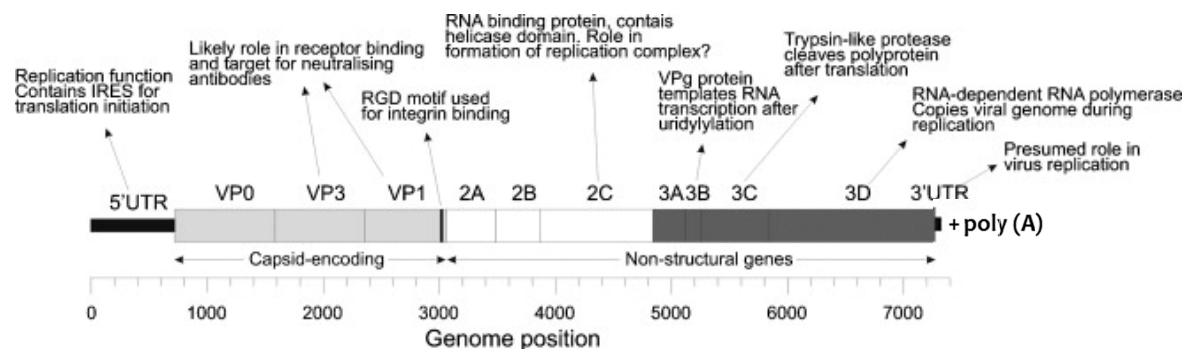
Kuva 1. *Picornaviridae*-heimoon kuuluvien sukujen taksonominen jaottelu. Kuvassa on esitetty *Parechovirus*-suvun kaksi lajia, ihmisen parechovirus ja Ljungan virus.

Parechovirukset ovat esim. enterovirusiin verrattuna uusi pikornaviruslaji. Ensimmäiset, v. 1956 Yhdysvalloista ripuliepidemian yhteydessä eristetyt

ihmisen parechovirukset, määritettiin kuuluvaksi enterovirusiin ja nimettiin echovirus22 ja echovirus23 -tyypeiksi. Myöhemmät tutkimukset kuitenkin osoittavat, että ne eroavat oleellisesti rakenteensa ja replikoitumistapansa perusteella muista pikornaviruksista, jonka johdosta ne luokiteltiin uudelleen v. 2000 kuuluvaksi uuteen *Parechovirus*-sukuun. Löydetyt virukset saivat nimet ihmisen parechovirus 1 (HPeV-1) ja parechovirus 2 (HPeV-2). Uusia virustyyppiä lisätään lajiin jatkuvasti. Tällä hetkellä HPeV-tyyppiä on identifioitu 16 erilaista. (Benschop, 2009; www.picornaviridae.com. [viitattu 28.6.2012])

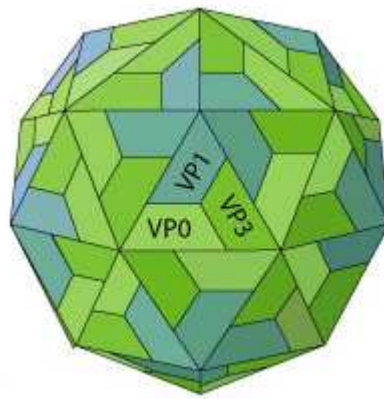
## 2.1 Rakenne

Ihmisen parechovirukset ovat rakenteeltaan samankaltaisia kuin muutkin pikornavirukset; ne ovat kooltaan pieniä, läpimitaltaan n. 30 nm kokoisia, vaipattomia pallomaisia viruksia. Genomi on yksisäikeinen, positiivissäikeinen RNA-juoste, joka toimii isäntäsolun proteiinisynteesissä suoraan aminohappojärjestystä koodaavan lähetti-RNA:n tavoin. Parechoviruksen genomi on kooltaan n. 7300 emästä. Genomin alussa, 5'-päässä, on n. 700 nukleotidin kokoinen proteiineja koodaamaton 5'-UTR -alue, jota seuraa kapsidia koodaavat proteiinit, replikoitumista ohjaavat proteiinit ja 3'-päässä 80 nukleotidin 3'-UTR -alue sekä poly(A)-häntä (Kuva 2). (Benschop, 2009; Harvala & Simmonds, 2009)



Kuva 2. Parechoviruksen genomin rakenne ja proteiinien oletetut tehtävät (Harvala & Simmonds, 2009, kuva muokattu).

Muista pikornaviruksista poiketen HPeV-viruksilla on neljän sijasta vain kolme rakenneproteiinia, VP0, VP1 ja VP3, jotka kolmen eri proteiinin yksiköissä muodostavat viruksen 20-tahokkaisen kapsidirakenteen (Kuvat 2 ja 3). Eri tyypeillä rakenneproteiineja koodaavan alueen, etenkin VP1-alueen, sekvenssit eroavat toisistaan. (Benschop, 2009; Harvala & Simmonds, 2009)



Kuva 3. Parechoviruksen 20-tahokkaisen kapsidin muodostaa kolme eri rakenneproteiinia (<http://viralzone.expasy.org> [viitattu 10.8.2012], kuva muokattu).

Parechoviruksen replikoituessa se vapauttaa yksisäikeisen RNA-genominsa isäntäsolun sisälle. Genomi toimii proteiinisynteesissä lähetti-RNA:na, jolloin syntyy yksi yhtenäinen polyproteiini, jonka viruksen proteaasi pilkkoo erillisiksi proteiineiksi. Nämä proteiinit, mm. RNA-polymeraasi, käynnistävät viruksen replikaation. Muista pikornaviruksista poiketen parechovirus ei sulje isäntäsolunsa proteiinisynteesiä (Coller ym, 1990). (Harvala & Simmonds, 2009)

## 2.2 Diagnostiikka

Suomessa 95 %:lla aikuisista on HPeV-1 -tyypin vasta-aineita (Harvala & Simmonds, 2009). Viruslöydöksiä on tehty hyvin vähän, koska parechovirusta on etsitty potilasnäytteistä vasta viime vuosina. Parechovirus löydetään lähes poikkeuksetta vain pieniltä lapsilta, etenkin alle vuoden ikäisiltä (Noordhoek ym, 2008; van der Sanden ym, 2008; Harvala & Simmonds 2009). Eri serotyyppien infektiolla on havaittu olevan yhteyksiä lasten ikäjakaumaan. HPeV-1 -tyypin infektion saaneet lapset ovat olleet muutamia kuukausia vanhempia kuin HPeV-3 -tyypin tartunnan saaneet (van der Sanden ym, 2008).

Parechovirus on ympäri maailmaa levinnyt virus (Benschop, 2009). HPeV-1 on selkeästi yleisin tyyppi Euroopassa ja HPeV-3 -tyyppiä tavataan toiseksi eniten (Harvala & Simmonds, 2009). Parechovirus näyttää esiintyvän enterovirusten tapaan kesän lopulla heinä-elokuussa ja talvikauden alussa marras-joulukuussa (Harvala ym, 2008; Harvala & Simmonds, 2009). Parechovirustutkimusten yhteydessä on myös havaittu, että HPeV-3 -tartuntoja esiintyy vain parillisina vuosina (Harvala ym, 2008; van der Sanden ym, 2008).

Useimmiten HPeV-infektio on täysin oireeton tai aiheuttaa lieviä hengitystie- ja suolisto-oireita kuten nuhakuumetta ja ripulia. Infektioiden yhteydessä on kuitenkin raportoitu useita vakavampia oireita. Tavattuja oireita ovat mm. aivokuume, aivokalvontulehdus (meningiitti), keskushermostoinfektio, halvausoireet, vastasyntyneiden verenmyrkytys ja yleisinfektio (sepsis) (Harvala ym, 2008; Harvala & Simmonds 2009). Varmuutta ei kuitenkaan ole, että kaikki infektion yhteydessä havaitut oireet olisivat suoraan parechoviruksen aiheuttamia (Harvala & Simmonds 2009). On myös mahdollista, että HPeV-1 aiheuttaisi useammin suolisto-oireita, kun taas HPeV-3 aiheuttaisi mm. kuumetta ja aivokalvontulehdusta (van der Sanden ym, 2008).

Parechovirusinfektion nopea diagnosointi vähentää lasten sairaalassaoloaikaa sekä tarpeettomien antibioottien ja tutkimusten määräämistä (Bennet ym, 2011). Koska kyseessä on pieniä lapsia infektiova virus ja oireet mahdollisesti vakavia, on tarkka ja nopea diagnosointimenetelmä tarpeellinen. Perinteisellä

virusviljelymenetelmällä parechovirusta on tavallisesti kasvatettava vähintään kolmella eri solutyypillä, jonka jälkeen virukset voidaan identifioida neutralisaatiotesteillä käyttämällä eri virustyypeille spesifisiä vasta-aineita (Benschop, 2009). Virusviljely on hidas, työläs ja epätarkka diagnosointimenetelmä. Lisäksi parechovirus on viljeltäessä huonosti replikoituva virus (Harvala ym, 2008).

## 3 MENETELMÄT JA NÄYTTEET

### 3.1 RT-qPCR

PCR-menetelmä koostuu neljästä eri vaiheesta; näytteenkäsittelystä, nukleiinihapon amplifikaatiosta, tulosten kuvantamisesta ja tulosten tulkinnasta. DNA:n monistaminen perustuu entsyymattiseen *in vitro* -tekniikkaan, jossa entsyymien avulla kasvatetaan nopeasti tietyn nukleiinihapposekvenssin määrää (kopiolukua), jotta se on helpommin havaittavissa sekä tutkittavissa. Reaaliaikaisella qPCR-menetelmällä voidaan seurata kohdesekvenssin kopiolukua reaaliaikaisesti koko amplifikaation ajan. Spesifisellä qPCR-menetelmällä saadaan näytteelle sekä kvalitatiivinen että kvantitatiivinen tulos. (FEM, 2009)

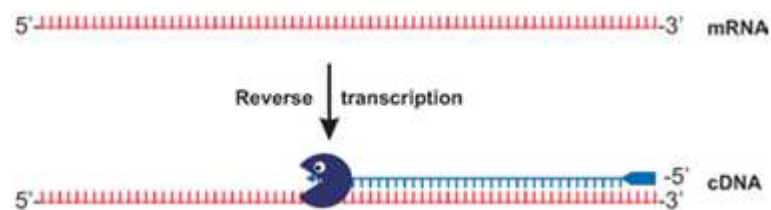
RT-qPCR -menetelmä on diagnostisena työkaluna nopea, herkkä ja varma toistettavuudeltaan verrattuna esim. virusviljelymenetelmään. RT-qPCR -menetelmän käyttö on yksinkertaista ja suoritusteho on korkea. Kvantitatiivisella PCR-menetelmällä voidaan tarkasti määrittää pienetkin näytteiden nukleiinihappopitoisuudet. Menetelmän lineaarinen alue on hyvin laaja, noin yhdestä kopiosta miljardiin kopioon DNA:ta. Diagnostisessa käytössä etuna on, että kohdenukleiinihappoa voidaan eristää lukuisista eri näytteistä. Mahdollista parechovirustartuntaa epäiltäessä potilaalta kerätään oireiden peusteella uloste-, nenänielu- tai likvor-näyte (aivo-selkäydinneste), josta eristetään virus-RNA. (Lovatt ym, 2002; Bustin ym, 2005; Bustin ym, 2009; FEM, 2009)

RT-qPCR -menetelmä on perinteisen ns. end-point PCR -menetelmän tavoin herkkä kontaminaatioille. Reaaliaikaista PCR-menetelmää käytettäessä PCR-tuotteen analysointia ei tarvitse erikseen suorittaa, jolloin yksi kontaminaatioaltis työvaihe poistuu. Jokainen työvaihe, RNA-eristys sekä RT- ja PCR-reaktioiden valmistelu sekä mahdollinen PCR-tuotteen jatkotarkastelu, on tapahduttava omissa työtiloissa ristikontaminaatioiden välttämiseksi. Välineiden ja työtilojen puhtauteen on kiinnitettävä erityistä huomiota. Positiivisen näytekontrollin lisäksi

jokaisesta työvaiheesta on otettava myös negatiivinen kontrolli esim. reagenssien kontaminaation havaitsemiseksi. (Lovatt ym, 2002)

### 3.1.1 Käänteiskopiointi

HPEV on RNA-virus, jonka eristetyistä nukleiinihaposta ei voida suorittaa suoraan PCR-reaktiota. RT-reaktiolla eli käänteiskopioinnilla käännetään viruksen RNA-näytteestä osa sekvenssiä cDNA:ksi käyttäen käänteistä aluketta (eng. reverse primer) sekä käänteistranskriptaasientsyymiä (Kuva 4). Validoitava menetelmä on kaksivaiheinen (eng. two step) RT-qPCR, jossa käänteiskopiointi ja qPCR-reaktio suoritetaan vaiheittain erikseen.



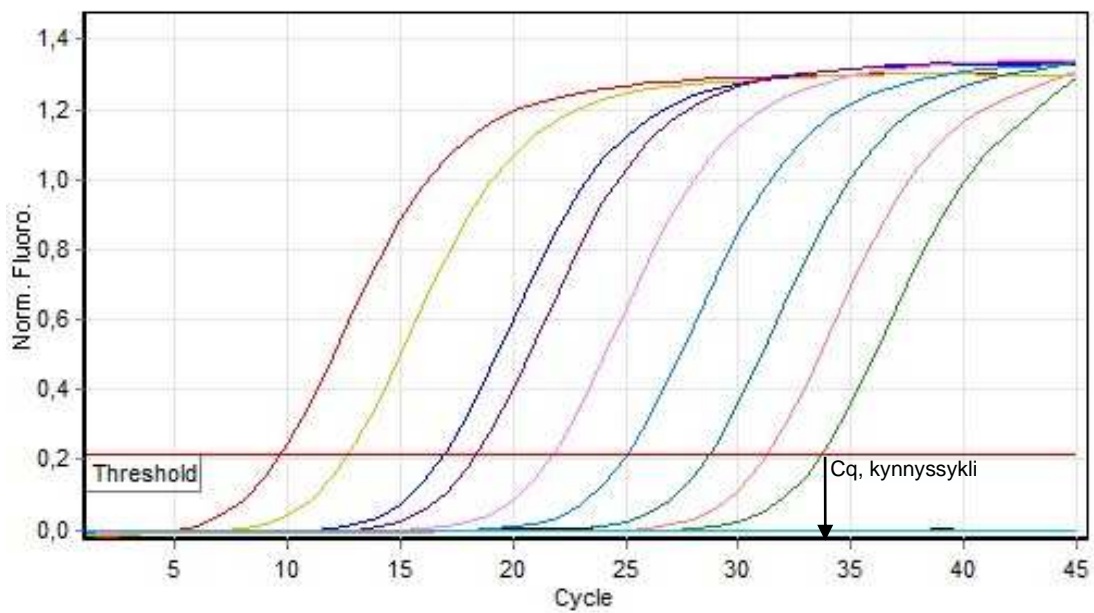
Kuva 4. RT-reaktiossa transkriptaasientsyymi rakentaa yksisäikeisestä RNA:sta komplementaarista DNA:ta. (Bustin yms, 2005, kuva muokattu)

RT-reaktiossa käytettävä käänteinen aluke voi olla spesifinen tietylle sekvenssialueelle kohdeviruksen genomissa tai ns. random-alue, joka käänteiskopioi useaa sekvenssialuetta. Random-alueilla saadaan määrällisesti enemmän cDNA:ta useammista eri virustyypeistä. Tarkalleen kohdesekvenssiin suunniteltu aluke lisää menetelmän analyttistä spesifisyyttä, mutta alukkeet on suunniteltava jokaiselle virustyyppille erikseen. (Bustin ym, 2005)

### 3.1.2 Reaaliaikainen, kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio

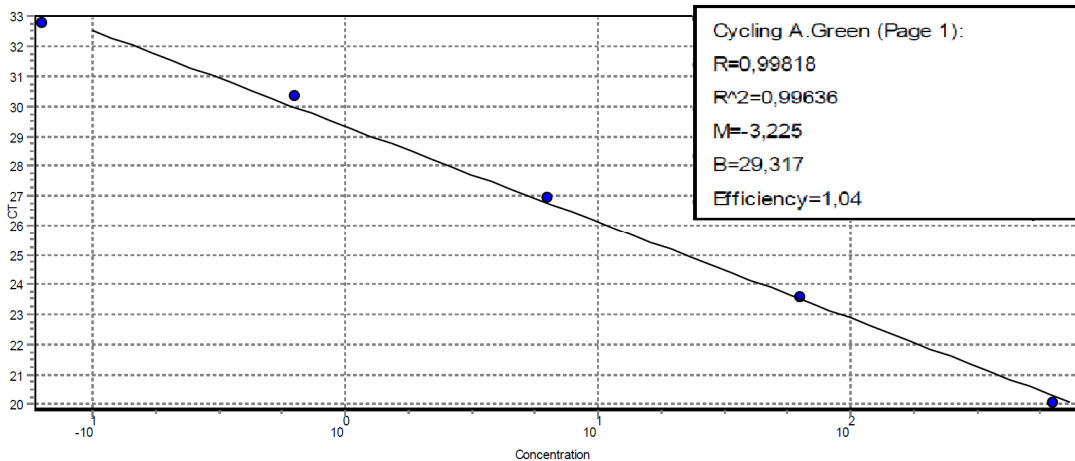
Reaaliaikaisella, kvantitatiivisella PCR-menetelmällä voidaan seurata kohdesekvenssin kopioluvun lisääntymistä kunkin amplifikaatiosyklin jälkeen. Kopiolumun määrittäminen perustuu fluoresoivan merkkisignaalin voimakkuuteen suhteessa taustasignaaliin. Taustasignaali on menetelmälle ja laitteelle ominainen ns. referenssifluoresenssi. DNA-polymerisaatiosta saadaan amplifikaatiokäyrä jokaiselle näytteelle seuraamalla fluoresenssin suhdetta amplifikaation vaiheeseen (Kuvio 1). Amplifikaatiokäyrää voidaan tarkastella joko määrittämällä fluoresenssi lineaarisella tai logaritmisella asteikolla. Polymerisaation edetessä fluoresenssi kasvaa eksponentiaalisesti, kunnes amplifikaatio saavuttaa stationäärisen vaiheen. Alin fluoresenssitaso, jolla voidaan luotettavasti todeta amplifikaatiosta johtuva fluoresenssi, joka erottuu merkittävästi taustasignaalista, asetetaan kynnyksarvoksi (eng. threshold). Kynnyksarvo voidaan määrittää positiivisten standardien avulla, jolloin kynnyksarvon ylittävä, eksponentiaalisesti kasvava fluoresenssi osoittaa kohdetuotteen amplifikaatiota. Kynnyksarvon ja amplifikaatiokäyrän leikkauskohta määrittää kynnyksisyklin C<sub>q</sub> (eng. quantification cycle). Mitä pienempi kynnyksisykli on, sitä enemmän näytteessä on templaattia eli kohdesekvenssiä. (Bustin yms, 2005)





Kuvio 1. Yhdeksän erivahvuisen positiivisen näytteen amplifikaatiokäyrät. Fluoresenssi on ilmoitettu lineaarisella asteikolla.

Ainoastaan Cq-arvoja tarkastelemalla ja vertaamalla ei voida luotettavasti tehdä johtopäätöksiä amplifikaation tuloksesta tai tehokkuudesta. Cq-arvo on ajokohtainen, sillä kynnyisarvo riippuu referenssisignaalista, joka vaihtelee käytetyn menetelmän, laitteen, reagenssien sekä alukkeiden ja koettimen mukaisesti. Standardilaimennossarjalla, jonka jokaisen laimennoksen tarkka kopioluku tunnetaan, määritetään menetelmälle standardisuora, joka on laitekohtainen (Kuvio 2). Kuvaajassa kynnyssykli on y-akselilla ja nukleiinihappopitoisuus logaritmisella x-akselilla.

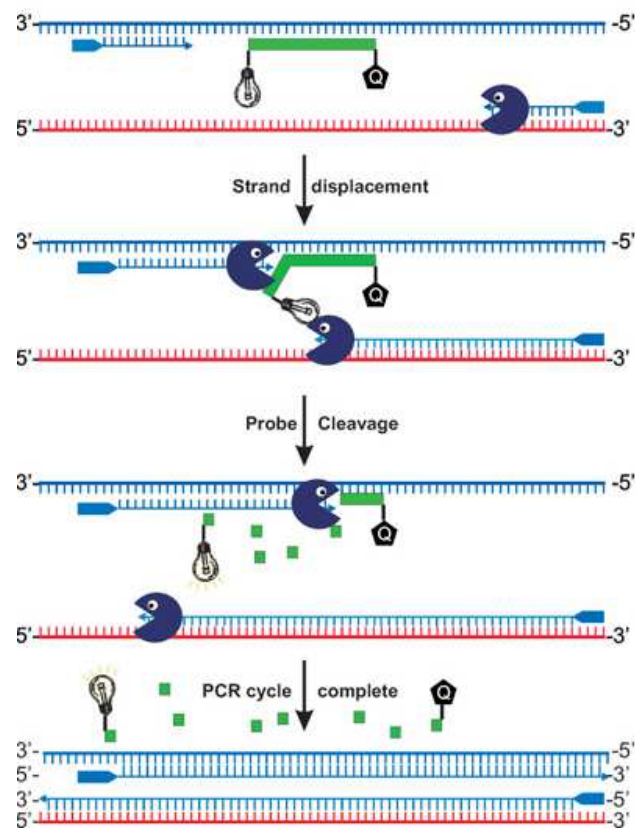


Kuvio 2. Standardisuoran avulla voidaan laskea tuntemattomien näytteiden nukleiinihappopitoisuudet.

Standardisuoran yhtälön perusteella voidaan laskea vertailukelpoiset kopioluvut näytteille. Standardisuoran perusteella voidaan määrittää myös menetelmän lineaarisuus (eng. linearity) sekä kulmakertoimesta laskemalla menetelmän tehokkuus (eng. efficiency). (Bustin yms, 2005; Bustin yms, 2009)

### 3.1.3 Leimausmenetelmät

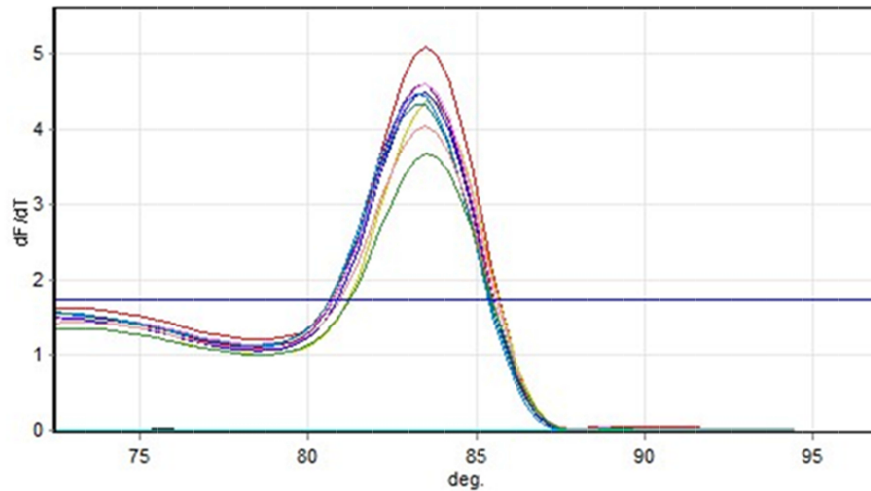
Kohdetuotteen fluoresenssisignaali saadaan aikaiseksi käyttämällä joko spesifistä tai epäspesifistä leimausmenetelmää. Spesifinen signaali saadaan käyttämällä leimattua koetinta (eng. probe), joka kiinnittyy emäspariperiaatteen mukaisesti alukkeiden rajaamalle sekvenssille. Koettimen 5'-päässä on fluoresoiva leima ja 3'-päässä leiman sammuttaja (eng. quencher), joka estää fluoresenssin. Kun koetin hybridisoituu kohdesekvenssille, DNA:ta rakentava DNA-polymeraasientsyymi pilkkoo koettimen, jolloin fluoresoiva leima irtaantuu sammuttajasta ja antaa signaaliin (Kuva 5). Mitä enemmän kohdesekvenssin kopioita on, sitä useampi hybridisoitunut koetin pilkkoutuu ja sitä voimakkaampi fluoresenssi syntyy. (Stratagene, 2004; Bustin yms, 2005)



Kuva 5. Spesifisen koettimen toimintaperiaate (Bustin yms, 2005, kuva muokattu).

Yleisin epäspesifinen leima on fluoresoiva väriaine SYBR Green I. Vapaana liuoksessa SYBR Green I fluoresoi vain heikosti, mutta sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA:han, se fluoresoi yli 1000 kertaa voimakkaammin. Mitä enemmän DNA:ta monistusvaiheessa on, sitä enemmän leimaa sitoutuu ja sitä voimakkaampi signaali syntyy. Epäspesifisenä leimana SYBR sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, joten sitä käytettäessä on varmistettava, että amplifikaatiossa on syntynyt haluttua tuotetta. Jokaisella DNA-sekvensillä on ominainen sulamispiste, joka riippuu pääosin sekvenssin pituudesta. Sulamispiste voidaan määrittää mittaamalla fluoresenssin muutosta suhteessa lämpötilan muutokseen. Kun DNA:ta kuumennetaan, tietyssä lämpötilassa dsDNA:n juosteet irtoavat toisistaan, jolloin SYBR Green I vapautuu ja fluoresenssi pienenee. Kuvaajassa spesifisen sulamispisteen kohdalle X-

akselilla muodostuu piikki (Kuvio 3). Tuote voidaan ajaa myös agarosigeelillä, jolta voidaan silmämääräisesti varmistaa tuotteen kunto ja oikea koko.



Kuvio 3. Sulamispistemäärityksen avulla voidaan varmentaa positiivinen amplifikaatiotulos. Parechoviruspositiivisten PCR-tuotteiden sulamispiste menetelmään valituilla alukkeilla on n. 83-85 °C.

Työn optimointiosuudessa kokeiltiin sekä spesifisen koettimen (Liite 1) että SYBR Green I –leiman toimivuutta. Menetelmiin käytetyt X-reaktiosarjan reaktioseokset sisältävät qPCR-reaktioon tarvittavan DNA-polymeraasientsyymin, nukleotidit, magnesiumkloridin, puskurin ja stabilointiaineet. X-reaktiosarja sisältää lisäksi SYBR Green I –leiman.

#### 3.1.4 Alukkeet

RT-reaktiota optimoitaessa testattiin sekä spesifistä käänteistä aluketta että random-aluketta. Spesifiseksi alukkeeksi oli valittu julkaisussa Benschop ym, 2008 käytetty K30 reverse-aluke sekä random-alukkeeksi Fermentaksen Random Hexamer -aluke (Liite 1 ja 3).

qPCR-reaktiossa käytettiin reverse + forward -alukeparia. Menetelmän toimivuutta vertailtiin kahden eri forward-alukkeen, ParechoF31 (Benschop ym, 2008) ja julkaisemattoman parecho forward-alukkeen välillä (Liite 1).

### 3.1.5 Laitteisto ja ohjelmisto

Reaaliaikainen qPCR-reaktio suoritettiin Qiagenin (ent. Corbett) Rotor-Gene 6000 -laitteella. Laitteessa voidaan käyttää kahta eri roottoria, joista toiseen saa kerrallaan 72 ja toiseen 36 reaktioputkea. Laitteen validoinnista vastaa Qiagen. Validoinnissa on mm. varmennettu, että jokaisessa roottorin näytepaikassa vallitsee samat olosuhteet. Työn aikana käytettiin kahta eri laitetta, Hukka ja Ismo, varaustilanteen mukaan. Tulokset analysoitiin tietokoneella laitteesta riippuen Rotor-Gene Q Series Version 1.7 (Hukka) tai Rotor-Gene 6000 Version 1.7 ohjelmilla (Ismo).

### 3.2 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesia käytettiin varmentamaan tarvittaessa RT-qPCR menetelmällä saatu tulos sekä optimointivaiheessa selvittämään menetelmän toimivuutta. Kokostandardina käytettiin Fermentaxen pUC19-plasmidia. Eri alukepareilla saatiin erikokoista PCR-tuotetta (Liite 1), jonka geelille muodostamaa vyöhykettä verrattiin kokostandardiin. Näin voitiin todeta, oliko mahdollinen tuote haluttua sekvenssiä vai esim. alukkeiden muodostamia dimeerejä (eng. primer dimer). Agarosigeelielektroforeesissa käytettiin fluoresoivana merkkiaineena etidiumbromidia.

### 3.3 Nukleiinihappoeristys

Kliinisten viljelynäytteiden nukleiinihappojen sekä HPeV-1 -plasmidin eristykseen käytettiin automatisoitua NucliSENS® easyMAG® -ekstraktiolaitetta

(bioMérieux). Kliinisiä viljelynäytteitä eristettiin myös E.Z.N.A.® Viral RNA –kitin ohjeen mukaan (OMEGA bio-tek).

### 3.4 HPeV-standardit

Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

### 3.5 Tyyppikannat

Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

### 3.6 Kliiniset viljelynäytteet

Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

### 3.7 Näytematriisit

Menetelmän validoinnissa käytettiin entero-rino RT-qPCR -menetelmällä testattuja negatiivisia kliinisiä näytteitä, jotka edustivat eri näytematriiseja, joista parechovirus RT-qPCR suoritettaisiin rutiinissa diagnostiikassa. Templaattomina näytelaatuina käytettiin likvor-, nenänielu- ja ulostenäytteitä.

## 4 KVANTITATIIVISEN RT-PCR –MENETELMÄN VALIDOINTI

Uusi diagnostiseen käyttötarkoitukseen kehitetty menetelmä on validoitava ennen käyttöönottoa. Validointia edellyttää mm. EU direktiivi IVD (In Vitro Diagnostic ) 98/79/EC sekä kansainvälinen standardi DIN EN ISO 15189 Medical laboratories (Rabenau ym, 2007; Storberg, 2011). Diagnostiikkalaboratorion on esitettävä käyttämiensä menetelmien validointidokumentit akkreditoinnin yhteydessä. Menetelmän validoinnilla varmistetaan, että valittu diagnostinen menetelmä soveltuu suunniteltuun tarkoitukseen ja on riittävän luotettava sekä toistettava (FDA, 2001). Optimoitu ja standardisoitu menetelmä antaa saman tuloksen tietylle näytteelle, kun analyysi toistetaan useaan kertaan eri henkilöiden toimesta eri laboratoriossa (OIE, 2008).

RT-qPCR menetelmän validointi tulisi ulottua näytteen käsittelystä tulosten analysointiin (FEM, 2009). Tässä työssä keskityttiin vain RT- ja qPCR-reaktioiden validointiin. UTULabin rutiinityöskentelyssä kliinisten näytteiden RNA-eristykseen käytettävä menetelmä ja laitteisto on validoitu erikseen.

Menetelmän validointi sisältää myös menetelmän optimoinnin, joka RT-qPCR -menetelmän kohdalla tarkoittaa mm. alukkeiden suunnittelua, ajo-olosuhteiden optimointia ja käytettävien reagenssien pitoisuuksien määrittämistä (Lovatt ym, 2002). Parecho RT-qPCR –menetelmä oli ennen työn aloittamista jo osittain optimoitu.

### 4.1 Validoinnin haasteet

RT-qPCR –menetelmän validoinnin haasteena on yhtenäisen ohjeistuksen puuttuminen. Vaikka qPCR-menetelmä korvaa yhä useammin diagnostiikassa pitkään käytettyjä menetelmiä, sen validoitavia parametreja ja niiden määrittäytapaa tai hyväksymisrajoja ei ole virallisesti ohjeistettu. Optimoinnin ja

validoinnin lisähaasteena parechovirus RT-qPCR –menetelmän kohdalla on, että menetelmä voidaan osoittaa toimivaksi vain saatavilla oleville tyyppikannoille. Eri tyyppikantoja on löydetty toistakymmentä, mutta kaikista kannoista ei ole julkaistu genomia eikä kaikkia kantoja ole saatavilla testaukseen. Myös positiivisia kliinisiä näytteitä sekä validointiin tarvittavia standardeja on vähän tai ne ovat vaikeasti saatavilla. Viruksen genomien muuntuminen vaikeuttaa myös menetelmän optimointia. Vaikka alukkeet on suunniteltu suhteellisen stabiilille 5'-UTR -alueelle, voi viruksen genomi muuntuessaan aiheuttaa liikaa sitoutumattomia kohtia (eng. mismatch), jolloin alukkeet eivät enää sitoudu kohdesekvenssiin. (Rabenau ym, 2007)

## 4.2 Validoitavat parametrit

Menetelmää validoitaessa määritetään ja dokumentoidaan joukko parametreja, jotka rajaavat millainen tulos menetelmällä on luotettava ja minkälaisissa olosuhteissa. Jokaiselle parametrille tulisi määrittää hyväksymisrajat ennen validointia. Validoitavat parametrit parechovirus RT-qPCR -menetelmälle on valittu pääasiassa yhdistelemällä bioanalyttisen menetelmän validointiohjeita (FDA, 2001) ja PCR-menetelmien validointia koskevia julkaisuja. Tarkasteltavia parametreja ovat analyttinen spesifisyys, toistotarkkuus, oikeellisuus, herkkyys, vakaus sekä lineaarisuus ja määrittäminen.

### 4.2.1 Analyttinen spesifisyys

Analyttisen spesifisyyden määrittämisellä todetaan, että RT-qPCR -menetelmä tunnistaa vain kohdesekvenssin muiden nukleinihappojen joukosta. Nukleinihappoamplifikaation spesifisyys riippuu pääosin vain käytettävistä alukkeista, koettimesta ja kohdesekvenssistä. Alukkeet on suunniteltava siten, että ne mahdollisimman spesifisesti sopivat kohdesekvenssille, mutta tunnistavat kaikki mahdolliset serotyypit. Spesifisyyteen vaikuttaa, miten paljon kohdesekvenssin ja alukkeiden välillä on sitoutumattomia kohtia ja kuinka paljon



eri serotyypin välillä on sekvenssimuutoksia kohdealueella. (Lovatt ym, 2002; Bustin ym, 2009)

Menetelmän on tunnistettava kaikki saatavilla olevat tyyppikannat sekä annettava negatiivinen tulos geneettisesti samankaltaisille viruksille. Lisäksi on varmennettava, etteivät käytettävät näytematriisit häiritse spesifisyyttä. Spesifisyyden määrittäminen todentaa, että saatu positiivinen tulos on luotettava. Spesifisyyden vaikuttavia häiriötekijöitä tutkitaan lisää vakausta määritettäessä. (FDA, 2001; Lovatt ym, 2002)

#### 4.2.2 Herkkyys

PCR-menetelmän herkkyys (eng. sensitivity) määritetään selvittämällä menetelmän alin toteamisraja (eng. limit of detection, LOD). Alin toteamisraja tarkoittaa pienintä määrää nukleinihappoa näytteessä, joka menetelmällä voidaan todeta 95 % varmuudella. Kun LOD-pitoisuudella ajetaan useita parechovirus-positiivisia näytteitä, vain viisi prosenttia näytteistä saa antaa negatiivisen tuloksen. LOD-pitoisuus voidaan määrittää esim. ajamalla useita kertoja kohdesekvenssiä sisältävää plasmidi-DNA -laimennossarjaa. LOD tulisi ilmoittaa yksikössä kopiota kohdesekvenssiä / µl eristettyä RNA:ta. (Lovatt ym, 2002; Bustin ym, 2009)

#### 4.2.3 Toistotarkkuus

Toistotarkkuus (eng. precision) ilmaisee erillisten määritysten tulosten lähekkäisyyttä ja kuvastaa menetelmän satunnaisvaihtelua. Toistotarkkuus voidaan jakaa toistettavuuteen sekä uusittavuuteen. Toistotarkkuutta määritettäessä haasteena on kaksivaiheisen RT-qPCR –menetelmän monivaiheisuus, jolloin jokainen eri vaihe voi lisätä tuloksen vaihtelevuutta (FEM, 2009). Vaihtelua tuloksiin tuo mm. pipetointivirheet. (FDA, 2001; Bustin ym, 2009)

Toistettavuus (eng. repeatability) tarkoittaa lyhytaikaista toistotarkkuutta tai ajon sisäistä toistettavuutta, joka kuvastaa menetelmän tulosten vaihtelua ja häiriöherkkyyttä, kun samoja näytteitä analysoidaan toistuvasti samassa ajossa (Bustin ym, 2009). Ajon sisäinen vaihtelu voidaan määrittää suoraan saman näytteen eri C<sub>q</sub>-arvojen välisestä keskihajonnasta. Toistettavuus tulisi määrittää käyttäen vähintään kolmea eri näytepitoisuutta, jotka tulisi valita oletetulta kliinisten näytteiden pitoisuusalueelta. Lisäksi jokaisesta pitoisuudesta tulisi tehdä vähintään viisi rinnakkaista määritystä. (FDA, 2001)

Uusittavuus (eng. reproducibility) kuvastaa pitkäaikaista toistotarkkuutta, joka määrittää menetelmän antamien tulosten vaihtelua eri ajojen välillä. Vaihtelua voidaan määrittää myös laajemmin, kun analyysi tehdään eri päivinä, eri ihmisten suorittamina, useilla laitteilla sekä eri laboratorioissa. Etenkin diagnostista menetelmää validoitaessa eri tekijöiden ja laboratorioiden tuoman vaihtelun määrittäminen on tarpeellista. Uusittavuutta määritettäessä qPCR tulisi suorittaa erillisistä RT-reaktiotuotteista. Eri ajojen välillä C<sub>q</sub>-arvot eivät ole riittävän vertailukelpoisia (vaikka kynnyсарvo asetettaisiin samaksi), joten rinnakkaisten näytteiden välinen vaihtelu on määritettävä kopiолuвиista. Näytepitoisuuksia ja rinnakkaisia näytteitä analysoidaan sama määrä kuin toistettavuutta määritettäessä. (FDA, 2001; Bustin ym, 2009)

#### 4.2.4 Oikeellisuus

Oikeellisuus (eng. accuracy tai trueness) määrittää menetelmällä mitattujen sekä oikeiden näytepitoisuuksien välisen eron. Käytännössä qPCR-menetelmän oikeellisuuden määrittäminen varmistaa, että menetelmä tunnistaa määrällisesti kaiken nukleinihapon ja antaa kvantitatiivisesti luotettavan tuloksen. Oikeellisuuden määrittämiseen käytetään standardinäytteitä, joiden tarkka pitoisuus tunnetaan. Standardista käytetään kolmea eri konsentraatiota, joista jokaisesta tehdään viisi rinnakkaista määritystä. Menetelmällä saatujen kopiолukujen keskiarvoa verrataan todellisiin kopiолukuihin. (FDA, 2001; Bustin ym, 2009)

#### 4.2.5 Vakaus

Vakauden eli häiriöherkkyyden (eng. robustness tai ruggedness) määrittämisellä todetaan, miten mahdolliset häiriötekijät ja pienet muutokset vaikuttavat menetelmän spesifisyyteen ja tarkkuuteen. Menetelmän vakautta voidaan tutkia analysoimalla eri tavoin käsiteltyjä standardinäytteitä kahdella eri konsentraatiolla ja kolmella rinnakkaisella näytteellä. Testattavia häiriö- ja stressitekijöitä ovat esim. lyhyt- ja pitkäaikaiset lämpötilamuutokset eri vaiheissa analyysin suoritusta, reagenssien pitoisuusvaihtelut sekä näytteiden ja reagenssien varastointi. Nämä kuvastavat tilanteita, joissa esim. suurta näytemäärää käsiteltäessä näytteet ovat huoneenlämmössä tavallista kauemmin tai joissa cDNA:ta säilytetään RT-reaktion jälkeen  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa ennen qPCR-reaktion suoritusta. (FEM, 2009; Storberg, 2011)

#### 4.2.6 Lineaarisuus ja määrittämisalue

Standardisuora kuvaa laitteen antaman vasteen ja näytteen nukleiinihappopitoisuuden suhdetta. Menetelmän laitekohtainen standardisuora saadaan analysoimalla toistuvasti kuudesta kahdeksaan eri pitoisuuksista standardinäytettä, joiden kopioluku tunnetaan. Pitoisuudet on oltava oletettujen näytepitoisuuksien alueelta. Lisäksi määrittämisessä on oltava mukana yksi ns. nollanäyte, joka ei sisällä lainkaan templaattia. Saadusta datasta tehdään osiossa 3.1.2 esitetty kuvaaja (Kuvio 2).

Standardisuorasta voidaan määrittää menetelmälle laitekohtainen määrittämisalue, jolla menetelmä toimii spesifisesti ja luotettavasti sekä kvantitointi lineaarisesti. Lineaarisen alueen tulee kattaa vähintään kolme kymmenkertaista pitoisuustasoa ja ulottua  $10^5$ - $10^6$  K/ $\mu\text{l}$  pitoisuuksille. Suoran korrelaatiokertoimen  $R^2$  on oltava mahdollisimman lähellä yhtä. Standardisuoran kulmakertoimesta (k) voidaan laskea menetelmän tehokkuus (E) kaavalla  $E = (10^{-1/k} - 1) \times 100\%$ . Tehokkuuden tulisi olla mahdollisimman lähellä 100 %, mutta ei sen yli. 100 %

tehokkuudella jokaisen amplifikaatiosyklin jälkeen kopioluku tuplaantuu. (FDA, 2001; Bustin ym, 2009; FEM, 2009)

#### 4.3 Validointisuunnitelma

Ennen validointia, on menetelmälle tehtävä validointisuunnitelma. Suunnitelmaan on sisällyttävä mm. mikä menetelmä on kyseessä, menetelmän käyttökohde ja -tarkoitus, validoitavat parametrit ja niiden hyväksymisrajat sekä käytettävät reagenssit ja laitteet (Storberg, 2011). Saatavilla olevien validointiohjeiden perusteella laadittiin osana työtä validointisuunnitelma parechovirus RT-qPCR –menetelmälle (Liite 4). Suunnitelma koskee vain RT- ja qPCR-reaktioiden validointia. Esitetyistä parametreista vakautta ei otettu suunnitelmaan mukaan, sillä RT-qPCR menetelmiä on käytössä useita ja esim. näytteiden säilyvyyttä on tutkittu koskien kaikkia menetelmiä. Lisäksi näytemateriaalia oli käytössä rajallisesti.

Suunnitelman sisältöön vaikutti saatavilla olevan aineiston lisäksi käytössä olevien RT-qPCR –menetelmien validointikriteerit. Validointisuunnitelmasta laadittiin mahdollisimman tarkka, jotta sitä voitaisiin myöhemmin käyttää yleisenä validointiohjeena. Validointisuunnitelmaan liitetään menetelmän työohje (Liite 2), josta selviää mm. käytettävät reagenssit ja laitteet.

## 5 TULOKSET

Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

## 6 LOPPUPÄÄTELMÄT

Jokainen diagnostiikassa käytettävä laite, reagenssi, menetelmä tai palvelu on validoitava ennen asiakkaalle tarjoamista. Laatu järjestelmän hallinta ja standardien noudattaminen on välttämätöntä diagnostiikkalaboratorion toiminnalle. Laboratorion laadukas toiminta varmennetaan vuosittaisilla akkreditoinneilla. Iso osa akkreditointia on käytettävien menetelmien toimivuuden osoittaminen.

RT-qPCR –menetelmän validoinnin toteuttaminen on hankalaa, sillä validointiin ja tulosten analysointiin ei ole olemassa selkeitä toimintatapoja. Yleispätevä ohjeistus on tarpeellinen, koska PCR-menetelmät ovat nykypäivänä yleisiä diagnostisia työkaluja. PCR-menetelmiä käytetään yhä useampien mikrobien tunnistamiseen kliinisistä potilasnäytteistä. Selkeitä toimintaohjeita noudattamalla validointi voidaan suorittaa sekä materiaalien että ajan kannalta tehokkaasti.

Validoinnissa saatujen tulosten analysoinnissa, kuten toistettavuuden määrittämisessä, tuli hyvin esille nukleiinihappoamplifikaation eksponentiaalisuuden tuomat lisähaasteet. Rinnakkaisten näytteiden välistä vaihtelua voidaan tutkia määrittämällä tulosten välinen keskihajonta, mutta sitä ei voida vertailla eri näytepitoisuuksien välillä. Mitä pienempi näytepitoisuus on kyseessä, sitä pienempi on keskihajonta rinnakkaisten näytteiden välillä, mutta suhteellinen keskihajonta usein korkea. Hyvin vahvoilla pitoisuuksilla kopoluvut rinnakkaisten näytteiden välillä voivat vaihdella useita tuhansia, jopa miljoonia. On haasteellista määrittää kuinka suuri hajonta on sallittua erikseen kullekin näytepitoisuudelle. Yleisesti voidaan kuitenkin todeta, että mitä vahvemmassa näytteestä on kysymys, sitä suurempi kvantitatiivinen hajonta on sallittua, sillä vahvan näytteen pitoisuusvaihtelulla ei ole diagnostista merkitystä.

UTULabin käyttöön kehitetylle parechovirus RT-qPCR –menetelmän validoinnille laadittiin validointisuunnitelma saatavilla olevien julkaisujen ja UTULabin käytäntöjen perusteella. Ajan ja näyttemateriaalien rajallisuudesta

johtuen validointi jäi kesken. Tehtyjen määritysten perusteella menetelmä soveltuu parechoviruksen luotettavaan diagnosointiin potilasnäytteistä. Menetelmän herkkyys, toistotarkkuus sekä lineaarisuus täyttävät validoinnin ehdot.

## LÄHTEET

Bennet, S., Harvala, H., Witteveltdt, J., McWilliam Leitch, E.C., McLeish, N., Templeton, K., Gunson, R., Carman, W.F. & Simmonds, P., 2011. Rapid simultaneous detection of enterovirus and parechovirus RNAs in clinical samples by one-step real-time reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 2620–2624.

Benschop, K., Molenkamp, R., van der Ham, A., Wolthers, K. & Beld, M., 2008. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*. **41**: 69–74.

Benschop, K., 2009. Clinical and Molecular Insights into Human Parechovirus Infection.

Bustin, S. & Müller, R., 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*. **109**: 365-379.

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J. & Wittwer C., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**: 4.

Coller, BA, Chapman, N., Beck, M., Pallansch, M., Gauntt, C. & Tracy, S., 1990. Echovirus 22 Is an Atypical Enterovirus. *Journal of Virology*. **64**: 6.

FDA, 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Food and Drug Administration.

FEM, The EPA Forum on Environmental Measurements, 2009. Method Validation U.S. Environmental Protection Agency, Microbiological Methods of Analysis. Appendix C: Guidelines for the Development and Validation of Nucleic Acid Amplification (PCR) Based Microbiological Methods.

Harvala H., Robertson, I., McWilliam Leitch, E.C., Benschop, K., Wolthers, K.C., Templeton, K. & Simmonds, P., 2008. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**: 3446–3453.

Harvala, H. & Simmonds, P., 2009. Human parechoviruses: Biology, epidemiology and clinical significance. *Journal of Clinical Virology*. **45**: 1–9.

Joki-Korpela P. & Hyypiä, T., 1998. Diagnosis and Epidemiology of Echovirus 22 Infections. *Clinical Infectious Diseases*. **26**: 129-136.

Kolehmainen, P., Oikarinen S., Koskiniemi M., Simell, O., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H. & Tauriainen S., 2012. Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *Journal of Clinical Virology*. **54**: 156-161.

Lovatt, A., McMurtie, D., Black, J. & Doherty, I., 2002. Validation of quantitative PCR assays. *Biopharm International*. **3**: 22–32.

McLeish, N., Witteveltdt, J., Clasper, L., McIntyre, C., McWilliam Leitch, E., Hardie, A., Bennet, S., Gunson, R., Carman, W., Feeney, S., Coyle, P., Vipond, B., Muir, P., Benschop, K., Wolthers, K., Waris, M., Österback, R., Johanssen, I., Templeton, K., Harvala, H. & Simmonds, P., 2012. Development and Assay of RNA Transcripts of Enterovirus Species A to D, Rhinovirus Species A to C, and Human Parechovirus: Assesment of Assay Sensitivity and Specificity of Real-Time Screening and Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **50**: 2910-2917.



Nateri, A., Hughes, P. & Stanway, G., 2000. In Vivo and In Vitro Identification of structural and Sequence Elements of the Human Parechovirus 5' Untranslated Region Required for Internal Initiation. *Journal of Virology*. **74**: 6269-6277.

Niklasson, B., Kinnunen, L., Hyypiä, T. & Windberg, G., 1999. A New Picornavirus Isolated from Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology*. **255**: 86–93.

Noordhoek, G.T., Weel, J.F.L, Poelstra, E., Hooghiemstra, M. & Brandenburg, A.H., 2008. Clinical validation of new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *Journal of Clinical Virology*. **41**: 75–80.

Näntö-Salonen, K., Kupila, A., Simell, S., Siljander H., Salonsaari, T., Hekkala A., Korhonen, S., Erkkola R., Sipilä. J., Haavisto, L., Siltala M., Tuominen, J., Hakalax, J., Hyöty, H., Ilonen, J., Veijola, R., Simell, T., Knip, M., Simell, O., 2008. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*. **372**: 1746-1755.

OIE Terrestrial Manual, 2008.1.1.5. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases.

Rabenau, H., Kessler, H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggam, R. & Berger, A., 2007. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of Clinical Virology*. **40**: 93-98.

van der Sanden, S., de Bruin, E., Vennema, H., Swanink, C., Koopmans, M. & van der Avoort, H., 2008. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**: 2884–2889.

Storberg, M., 2011. Laatu lääke- ja diagnostiikkateollisuudessa. Kurssimateriaali, Turun ammattikorkeakoulu.

Stratagene, 2004. Introduction to Quantitative PCR. Methods and Application Guide.

[www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com). Knowles, N.J. Institute for Animal Health, United Kingdom.

<http://viralzone.expasy.org>. SIB, Swiss Institute of Bioinformatics.

### **Alukkeet ja koetin:**

Alukkeiden ja koettimen paikat sekvenssissä on numeroitu HPeV1 Harris - viruslinjan mukaisesti.

reverse-alue K30: 5'-GGTACCTTCTGGGCATCCTTC-3' ; nukleotidit 577-556 (Benschop ym, 2008)

forward-alue ParechoF31: 5'-CTGGGGCCAAAAGCCA-3' ; nukleotidit 441-457 (Benschop ym, 2008)

uusi parecho forward -alue: Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

koetin: (6'FAM)-HPeV-WT-MGB 5'-AAACACTAGTTGTA(A/T)GGCCC-3' (Benschop ym, 2008)

Alukeparien muodostamien sekvenssien koot:

K30 + F31: n. 140 pb (riippuu virustyypin sekvenssistä)

K30 + uusi forward-alue: Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.

**Parecho RT-qPCR -työohje:****cDNA-reaktio**

- reaktio tehdään 0,5 ml Eppendorf-putkessa
- tehdään tarvittava määrä reaktioseosta steriiliin Eppendorf-putkeen
- varaa reaktioseosta myös negatiiviseen kontrollinäytteeseen

**cDNA-mix:**

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl / yksi näyte</b>
Steriili vesi	4,3
5 x RT-reaktiopuskuri (Fermentas)	4,0
dNTP's (40 µl + 360 µl aqua)	4,0
K30 reverse primer (10 µM)	2,5
RNAse inhibiittori (Fermentas)	0,1
RT-entsyymi (Fermentas)	0,1
	yht. 15,0 µl
+ 5,0 µl RNA	kok. 20,0 µl

- jaetaan reaktioseosta 15 µl/reaktioputki sekä 20 µl negatiiviseen cDNA-kontrolliputkeen
- lisätään reaktioputkiin 5 µl RNA
- sentrifugoidaan putket lyhyesti
- inkuboidaan lämpölokissa 42 °C:ssa 60 min (± 15 min)
- jäädytetään jäissä tai pakastetaan (-20°C ) myöhempää käyttöä varten

**PCR-reaktio**

- ajo tehdään 0,2 ml Rotor-Gene -putkissa
- tehdään tarvittava määrä reaktioseosta steriiliin Eppendorf-putkeen
- varaa reaktioseosta myös negatiiviseen kontrollinäytteeseen

**PCR-mix:**

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl / yksi näyte</b>
Steriili vesi	3,0
uusi forward primer (10 µM)	1,0
K30 reverse primer (10 µM)	1,0
Luokiteltu salassa pidettäväksi	10,0
	yht. 15,0 µl
+ 5,0 µl cDNA	kok. 20,0 µl

- jaetaan reaktioseosta 15 µl/reaktioputki sekä 20 µl negatiiviseen PCR-kontrolliputkeen
- lisätään reaktioputkiin 5 µl cDNA
- ajetaan näytteet Qiagen Rotor-Gene 6000 – laiteella

**Ajo-olosuhteet:**

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila</b>	<b>Aika</b>	
Alkulämmitys	95 °C	5 min	
Denaturaatio	95 °C	10 s	} 45 sykliä
Liittäminen	60 °C	30 s	
Pidennys	72 °C	20 s	
Sulamispisteen määrittäminen	72 °C → 95 °C, 1 °C välein		

**Vaihtoehtoiset menetelmät:****cDNA-reaktio, Promega****cDNA-mix:**

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl / yksi näyte</b>
5 x reaktiopuskuri (Promega)	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Promega)	1,0
dNTP's (10 mM)	0,5
RNAse inhibiittori (Fermentas)	0,1
Luokiteltu salassa pidettäväksi	0,1
Random Hexamer Primer (Fermentas)	1,0
	yht. 5,5 µl
+ 4,5 µl RNA	kok. 10,0 µl

Inkuboidaan lämpölokissa 42 °C:ssa 60 min (± 15 min).

**PCR-reaktio, leimattu koetin****PCR-mix:**

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl / yksi näyte</b>
Steriili vesi	1,0
forward primer (10 µM)	1,0
K30 reverse primer (10 µM)	1,0
HPeV-FAM probe (5 µM)	2,0
Luokiteltu salassa pidettäväksi.	10,0
	yht. 15,0 µl
+ 5,0 µl cDNA	kok. 20,0 µl

**Ajo-olosuhteet:**

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila</b>	<b>Aika</b>	
Alkulämmitys	95 °C	5 min	
Denaturaatio	95 °C	10 s	} 40 sykliä
Liittäminen	60 °C	30 s	
Pidennys	72 °C	20 s	

## Parecho RT-qPCR –menetelmän validointisuunnitelma:

Määritykset tehdään laitteella Rotor-Gene Q Series Version 1.7 (Hukka).

### 1. Analyyttisen spesifisyyden määrittäminen

- HPeV-1 -transkripti
  - X kpl rinnakkaista määrittäystä
  - rinnakkaiset määritykset tehtävä erillisistä cDNA-näytteistä
  - kaikista oltava positiivinen tulos
  
- HPeV-tyyppikannat (kuusi kpl)
  - X kpl rinnakkaista määrittäystä
  - rinnakkaiset määritykset tehtävä erillisistä cDNA-näytteistä
  - kaikista oltava positiivinen tulos
  
- HPeV-viljelynäytteet (20 kpl)
  - X kpl rinnakkaista määrittäystä
  - rinnakkaiset määritykset tehtävä erillisistä cDNA-näytteistä
  - kaikista oltava positiivinen tulos
  
- enterotyyppikannat (10 kpl)
  - X kpl rinnakkaista määrittäystä
  - rinnakkaiset määritykset tehtävä erillisistä cDNA-näytteistä
  - X kpl oltava negatiivinen tulos
  
- näytematriisit likvor, uloste ja nenä-nielunäyte (entero-rino -negatiiviset kliiniset näytteet)
  - X kpl rinnakkaista määrittäystä
  - rinnakkaiset määritykset tehtävä erillisistä cDNA-näytteistä
  - X kpl oltava negatiivinen tulos

### 2. Herkkyyden määrittäminen

- määritetään alin toteamisraja LOD
  - X kpl erillistä ajoa
  - HPeV-1 -plasmidilaimennossarja  $10^2$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l, yhteensä kuusi laimennosta
  - alin pitoisuus, joka antaa positiivisen tuloksen 95 % varmuudella
  - LOD-pitoisuuden oltava  $10^1$ - $10^0$  K/ $\mu$ l välillä

### 3. Toistotarkkuuden määrittäminen

- toistettavuus, ajon sisäinen vaihtelu
  - X kpl näytteet ajetaan samassa ajossa
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - X kpl rinnakkaista näytettä jokaisesta pitoisuudesta
  - rinnakkaiset templaatit samasta tai eri cDNA:sta
  
- uusittavuus, ajojen välinen vaihtelu
  - X kpl erillistä ajoa
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - rinnakkaiset templaatit oltava eri cDNA:sta
  
- uusittavuus, laitteiden välinen vaihtelu
  - X kpl erillistä ajoa laitteella Ismo
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - tuloksia verrataan Hukalla tehtyihin vastaaviin määrittäksiin
  
- uusittavuus, laboratorion sisäinen vaihtelu
  - X kpl henkilöä analysoi samat näytteet
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - HPeV-1 -plasmidilaimennossarja  $10^8$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - tuloksia verrataan toisiinsa

### 4. Oikeellisuuden määrittäminen

- kvantitatiivisesti luotettava tulos
  - X kpl erillistä ajoa
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - rinnakkaiset templaatit oltava eri cDNA:sta

### 5. Lineaarisuus ja määrittämisalue

- määritetään menetelmälle standardisuora
  - HPeV-1 -transkriptilaimennossarja  $10^4$ - $10^{-1}$  K/ $\mu$ l
  - X kpl rinnakkaista sarjaa erillisistä ajoista
  - $R^2$  oltava  $>0,98$
  - tehokkuuden oltava 85-100 %
  - lineaarisen alueen katettava vähintään kolme kymmenkertaista pitoisuustasoa
  - määrittämisalueen yläraja oltava  $\geq 10^5$  K/



## **Ajojen välinen vaihtelu kolmella HPeV-1 plasmidilaimennossarjalla**

Tämä osa opinnäytetyötä on luokiteltu salassa pidettäväksi.