

STADIA

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Automaattisen nukleiinihappoeristyslaitteen ja
reaaliaikaisen PCR-menetelmän soveltuvuus
herpes simplex -virusten
keskushermostoinfektiodiagnostiikkaan

Bioanalytiikan koulutusohjelma
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
16.4.2007

Riina-Mari Holopainen
Paula Väre



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Riina-Mari Holopainen ja Paula Väre			
Työn nimi			
Automaattisen nukleiinihappoeristyslaitteen ja reaaliaikaisen PCR-menetelmän soveltuvuus herpes simplex -virusten keskushermostoinfektiodiagnostiikkaan			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Kevät 2007	31 + 13 liitettä	
TIIVISTELMÄ			
<p>Keskushermosto- ja neonataali-infektiot ovat herpes simplex -virusten aiheuttamista taudeista vakavimpia. Niihin on olemassa lääkitys, joka on tehokkain, kun se aloitetaan aivan sairauden alkuvaiheessa. Näiden infektioiden diagnostiikassa PCR-menetelmä on herkin. Tämä menetelmä on kuitenkin työläs ja aikaa vievä, joten uudet nopeammat menetelmät ovat tervetulleita.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin HUSLABin virologian osastolle. Työssä testattiin QIAGENIN artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkausta, joka on tehty käytettäväksi Roche diagnosticsin reaaliaikaisella PCR-laitteella LightCyclerillä. Lisäksi työssä testattiin automaattista bioMérieuxin NucliSens easyMAG-nukleiinihappoeristyslaitetta. Referenssinä käytettiin HUSLABin virologian osastolla testaushetkellä käytössä olevia menetelmiä.</p> <p>Reaaliaikaisen PCR-menetelmän herkkyyttä testattiin positiivisilla HSV-1 ja HSV-2 kontrollilaimennussarjoilla. Menetelmän oikeellisuutta testattiin määrittämällä laaduntarkkailu- ja potilasnäytteitä, jotka olivat likvorია. Tuloksia verrattiin QCMD:n antamiin ja perinteisellä ”in house”-PCR-menetelmällä saatuihin referenssituloksiin. Spesifisyyttä testattiin muiden ihmisten herpesvirusten positiivisilla kontroleilla. Automaattisen nukleiinihappoeristysmenetelmän toimivuutta testattiin HSV-positiivisilla ja -negatiivisilla likvornäytteillä, jotka oli aikaisemmin eristetty fenoli-kloroformiuutolla.</p> <p>Tulokset QIAGENIN artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkauksesta olivat hyviä. Kontrollilaimennussarjan määrittämisessä reaaliaikainen PCR-menetelmä osoittautui perinteistä ”in house”-PCR-menetelmää herkemmäksi. Potilasnäytteiden määrittämisessä tulokset olivat yhtenevät. EasyMAG-nukleiinihappoeristysmenetelmällä eristettyjen potilasnäytteiden määrittämisestä saadut tulokset olivat myös hyviä. Kun tuloksia verrattiin fenoli-kloroformiuutolla saatuihin tuloksiin, olivat tulokset yhtä näytettä lukuun ottamatta yhtenevät.</p> <p>Molemmat testattavat menetelmät ovat nopeita ja virhelähteiden mahdollisuus on vähäisempi kuin perinteisessä ”in house”-PCR menetelmässä ja fenoli-kloroformiuutolla nukleiinihappoa eristettäessä. Tutkimusten tulokset osoittivat molempien menetelmien soveltuvan hyvin HSV:n eristykseen ja määrittämiseen likvornäytteistä.</p>			
Avainsanat			
Herpes simplex virus, reaaliaikainen PCR, nukleiinihappoeristys, likvor .			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Riina-Mari Holopainen and Paula Väre			
Title			
The Applicability of Automatic Nucleic Acid Isolation Device and Real Time PCR Method			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Spring 2007	31 + 13 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>This final project was made for HUSLAB´s Department of Virology. The purpose of this study was to test real time PCR method and automatic nucleic acid isolation device for the detection of herpes simplex virus type 1 and 2 from cerebrospinal fluid samples. We tested QIAGEN´s artus HSV-1/2 LC PCR reagent kit and Nuclisens easyMAG device.</p> <p>The sensitivity of the real time PCR method was tested with HSV-1 and HSV-2 positive control dilution samples. The correctness of the method was tested with quality control samples and patient samples. The results were compared with the results given by QCMD and with the results from the traditional “in house” PCR method. The specificity of the real time PCR method was tested with other positive human herpes virus controls. The automatic nucleic acid isolation method was tested with HSV positive and HSV negative patient samples which were earlier isolated with a phenol chloroform method.</p> <p>The results from the QIAGEN´s artus HSV-1/2 LC PCR reagent kit were good. With the control dilution samples the real time PCR method showed to be more sensitive than the traditional “in house” PCR method. The results from patient samples were the same with the both PCR methods. The patient sample results of the easyMAG nucleic acid isolation method were good. The results were the same with all the other samples except one sample when they were compared with the results of the phenol chloroform isolation method.</p> <p>Both tested methods are fast and the possibilities for mistakes are smaller with these methods than with the traditional “in house” PCR method and the phenol chloroform nucleic acid isolation method. The results of the study showed that both tested methods can be suited for HSV isolation and detection of cerebrospinal fluid samples.</p>			
Keywords			
herpes simplex virus, real time PCR, nucleic acid isolation, cerebrospinal fluid			

1 JOHDANTO

Keskushermostoinfektiot ovat herpesvirusten vakavin tautimuoto. Sen hoidossa on tärkeää, että tauti diagnosoidaan mahdollisimman aikaisessa vaiheessa, koska useimpiin herpesvirusten aiheuttamiin keskushermostoinfektioihin on olemassa lääkitys, joka on tehokkaimmillaan, kun se aloitetaan aivan sairauden alkuvaiheessa. Polymeerasiketjureaktio- (PCR-) menetelmällä saadaan parhaita tuloksia herpesenkefaliitin ja neonataaliherpeksen diagnostiikassa, koska sillä pysytään osoittamaan pienetkin viruspitoisuudet likvornäytteestä (ai-voselkäydinnestestä). (Koskiniemi – Linnavuori 2001a; Vesanen – Piiparinen – Kallio – Vaari 1996: 1-11 ; Huovinen – Meri – Peltola – Vaara – Vaari – Valtonen 2005: 470.)

Opinnäytetyö tehdään HUSLABin mikrobiologian vastuualueelle virologian osastolle. Em-piirinen työvaihe tehdään geenimonistustyöpisteessä. Aiheena on automaattisen nukleiini-happoeristuksen ja kaupallisen reaaliaikaisen PCR-menetelmän soveltuvuus herpes simplex-virus tyyppin 1 ja 2 keskushermostodiagnostiikkaan. Työssä testataan toimivatko ja sopi-vatko nämä menetelmät laboratorion käyttöön. Työn ohjaajina toimivat mikrobiologi Laura Mannonen ja laboratoriohoitaja Anu Kaitonen.

Tällä hetkellä HUSLABin virologian osastolla on käytössä manuaalinen nukleiinihapon eristysmenetelmä, joka sisältää paljon käsityötä ja on aikaa vievä. Monistusmenetelmänä on ”in house”-PCR- menetelmä ja PCR-tuotteen visualisointimenetelmänä nukleiinihappohybridisatio mikrotitterilevyllä. Näillä menetelmillä analyysi kestää lähes kaksi vuorokautta. Jos uusi nukleiinihappoeristysautomaatti ja reaaliaikainen PCR-menetelmä toimisivat hy- vin, saataisiin vähennettyä analyysiin kuluva työaika ja työvoimaa. Vastaus saataisiin 3 - 4 tunnissa. Mikäli tämä analyysipari olisi toimiva, voitaisiin se mahdollisesti ottaa tulevai- suudessa päivystystestien valikoimaan.

Tutkimuksessa testataan Qiagenin artus® HSV-1/2 LC PCR- reagenssipakettia Roche Diagnosticsin reaaliaikaiselle PCR-laitteelle, LightCyclerille. Lisäksi tutkimuksessa testa-taan easyMAG-nukleiinihappoeristysautomaattia, joka on bioMérieux’n valmistama. Tes- timateriaalina on likvor ja työssä määritetään laaduntarkkailu- ja potilasnäytteitä, jotka on

tutkittu jo aiemmin HUSLABin virologian osastolla. Lisäksi käytetään positiivisia kontrollilaimennoksia.

Kontrollilaimennoksia ja laaduntarkkailunäytteitä käytetään verrattaessa PCR-menetelmien herkkyyttä ja spesifisyyttä sekä testattaessa Qiagenin artus® HSV-1/2 LC PCR- reagenssipaketin toimivuutta. Potilasnäytteitä käytetään verrattaessa eristysmenetelmiä sekä PCR-menetelmiä.

Saatujen tulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä siitä, kuinka hyvin easyMAG-eristysautomaatti ja LightCyclerille kehitetty Qiagenin artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipaketti sopisivat herpes simplex -virusten eristämiseen ja määrittämiseen likvornäytteistä.

2 HERPESVIRUKSET

Herpesviruksia tunnetaan yli sata erilaista. Ihmisellä esiintyviä herpesviruksia (human herpesvirus, HHV) on löydetty kahdeksan erilaista, mutta uusia viruksia saattaa löytyä vielä tulevaisuudessa. Herpesviruksiin luetaan herpes simplex -virus tyyppi 1 (HSV-1, HHV-1) ja herpes simplex -virus tyyppi 2 (HSV-2, HHV-2), varicella-zostervirus (VZV, HHV-3), epstein-Barrin virus (EBV, HHV-4), sytomegalovirus (CMV, HHV-5), ihmisen herpesvirus 6 (HHV-6), ihmisen herpesvirus 7 (HHV-7) ja kaposin sarkooman herpesvirus (KSHV, HHV-8). (Huovinen ym. 2005: 463.)

Herpesvirukset ovat isoja, vaipallisia kaksisäikeisiä DNA-viruksia, jotka muistuttavat rakenteellisesti toisiaan. Niiden proteiinikapsidi koostuu 162 kapsomeerista ja kapsidin ja lipidi-proteiinivaipan välissä on tegumentti. Tegumentissa on muun muassa proteiineja, joita tarvitaan produktiivisessa infektiossa. (Huovinen ym. 2005: 463 - 464.)

Tyypillistä herpesviruksille on latenssi. Primaari-infektion jälkeen virus pystyy jäämään elimistöön piilevänä. Herpesvirus voi jäädä latenssiin esimerkiksi sensorisiin hermosoluihin, josta se aika ajoin voi aktivoitua uudelleen. Tällä tavalla herpesvirukset pystyvät pysymään immuunijärjestelmän ulottumattomissa. (Huovinen ym. 2005: 463.)

2.1 Herpes simplex -virus

Herpes simplex -virus tyyppi 1 ja 2 muistuttavat rakenteellisesti läheisesti toisiaan, mutta eroavat ekologiaaltaan ja antigeeneiltään. Herpes simplex -virukset kuuluvat DNA-viruksien perheeseen. Niiden DNA on kaksisäikeistä ja sisältää yli 80 geeniä, joista osa esiintyy kahden kertaan. (Huovinen ym. 2005: 464 - 467; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Geeniensä avulla herpes simplex -virus muun muassa lisääntyy. Virus pystyy piiloutumaan immuunijärjestelmältä häiritsemällä puolustusmekanismeja. Herpes simplex -virus pystyy vaikuttamaan isäntäsoluun monin tavoin käyttämällä omia säätelyproteiinejaan, helpottaen näin omaa toimintaansa. Esimerkiksi neurovirulenssigeeni hidastaa hermosolujen tuhoutumista, jolloin HSV:lle jää enemmän aikaa replikoitua. (Huovinen ym. 2005: 464 - 467.)

2.1.1 Lisääntyminen

HSV tarttuu solujen reseptoreihin glykoproteiiniensa avulla. Reseptoreita on useita ja niitä on kaikissa elimistön soluissa. HSV:n vaippa sulautuu solukalvoon ja kapsidi kulkeutuu tumakalvolle. Tumakalvon reiästä viruksen DNA kulkeutuu tumaan. Tumassa tapahtuu transkriptio, replikaatio ja viruksen kokoaminen. Transkriptiossa virus käyttää hyväkseen isäntäsolun RNA-polymeraasia. Alfageenit transkriptoituvat ensimmäiseksi. Ne ilmentyvät alfaproteiineiksi, jotka taas indusoivat beetageenien ekspression. Beetaproteiinit vastaavat viruksen nukleiinihappometaboliasta ja DNA-replikaatiosta, joka taas saa aikaan gammageenien ekspression. Gammageenituotteita ovat viruksen eri rakenneproteiinit. Viruksen kapsidi muodostuu tumassa. Kapsidin työntyessä ulos tumasta tumakalvon läpi, se saa itselleen vaipan. Virionit purkautuvat ulos solusta ja samalla solu tuhoutuu. (Huovinen ym. 2005: 464 - 465; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

2.1.2 Latenssi

HSV asettuu primääri-infektion jälkeen elimistöön piileväksi jopa vuosikymmeniksi ja pysyy reaktivoitumaan erilaisten ärsykkeiden vaikutuksesta. Esimerkiksi HSV-1:n aiheuttamissa infektiossa virus replikoituu epiteelisoluissa ja kulkeutuu sitten latenssiin sensoristen neuronien tumiin, jotka hermottavat kyseistä aluetta. HSV-1:n tyypillinen latenssipaiikka on kolmoishermon ganglio ja HSV-2:n ristiluun alueen hermosolmut. (Huovinen ym. 2005: 466; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Tumissa HSV on DNA-molekyylin muodossa irrallaan isäntäsolun genomista ja vain viruksen latenssi-RNA:ta muodostuu jatkuvasti. Ärsykkeet voivat saada viruksen reaktivoitumaan, jolloin nukleiinihapposynteesi kiihtyy, tuotetaan uusia rakenneproteiineja ja syntyy uusia viruksia, jotka kulkeutuvat hermosolua pitkin epiteelille ja aiheuttavat uuden infektion. Reaktivaatioärsykejä ovat muun muassa UV-valo, stressi, hormonaaliset tekijät ja muut infektiot. (Huovinen ym. 2005: 466; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

2.1.3 Herpes simplex -virus tyyppi 1 ja 2

HSV-1 aiheuttaa tavallisesti suutulehdusta ja yskänrokkoa eli huuliherpestä ja HSV-2 genitaalierpestä. Kumpikin virus voi aiheuttaa myös infektiota silmässä, keskushermostossa sekä yleistyneitä infektiota vastasyntyneissä sekä immuunisuppressiopotilaissa. Aiemmin HSV:n kantajia on ollut 75 - 85 % aikuisista, mutta nykyisin infektio saadaan yhä myöhemmin ja yhä useammin ensi-infektion aiheuttaa HSV-2. Perinteisesti HSV-1 ensi-infektio on saatu alle 5-vuotiaana, nimenomaan suutulehduksena. HSV-1 voi esiintyä myös genitaalialueella ja HSV-2 suun alueella. (Huovinen ym. 2005: 467.)

Suun ja nielun alueen HSV-infektion inkubaatioaika on noin 2 - 12 vuorokautta. Primaari-infektiot voivat olla hyvin vaihtelevia, mutta useimmiten ne ovat oireettomia. (Koskiniemi – Linnavuori 2001a.) Pienillä lapsilla esiintyy rakkulaista suutulehdusta, gingivostomatiittia, johon liittyy korkea kuume. HSV-1:n primaaritartunta voi suutulehduksen ja yskänrokon lisäksi ilmetä muun muassa kynsivallin tulehduksena ja painijoilla esiintyvänä herpes gladiatorumina. Primaaritartunnassa muodostuu vasta-aineita ja IgG-vasta-aineet ovat sen

jälkeen yleensä määritettävällä tasolla, mutta ne eivät suojaa uusintainfektioilta. Reaktivoiduessaan HSV-1 aiheuttaa huuliherpestä. Tällöin ei IgM-luokan vasta-aineita välttämättä kehity. HSV-1 tarttuu kosketustartuntana sekä myös hengitysteitse. Se voi tarttua sekä ensi-että uusintainfektion aikana. (Huovinen ym. 2005: 467 - 468.)

HSV-2 tarttuu pääasiassa sukupuolilyhteydessä. Naisilla taudinkuva on vulvovaginiitti, johon liittyy dysuria, kuume ja kovat kivut sekä joskus myös meningiitin oireita. Naisilla oireet ovat yleensä vaikeampia kuin miehillä. Miehillä esiintyy rakkuloita terskassa ja siittimessä. Viruksen latenssipaiikka on ristiluun alueen hermosolut, josta se aktivoituu vaihtelevin väliajoin. Virusta voi erittyä ilman, että se aiheuttaa mitään oireita. (Huovinen ym. 2005: 467 - 468; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Immunologiseen vasteeseen HSV:sta vastaan vaikuttavat monet tekijät. Tiedetään, että aikaisempi kontakti virukseen vaikuttaa seuraavan infektion laatuun. Aikaisempi HSV-1 tartunta vaikuttaa HSV-2 tartuntaan niin, että HSV-2:n aiheuttamat oireet ovat tavallista lievempiä. Se ei voi kuitenkaan estää tartuntaa. (Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

2.2 Neonataaliherpes

Raskauden aikainen HSV infektio voi aiheuttaa syntyvälle lapselle vakavan tartunnan. Useimmiten tartunnan aiheuttaa HSV-2. Yleensä lapsi saa infektion synnytyskanavasta, harvemmin istukan kautta. (Huovinen ym. 2005: 467 - 469.) Arvioidaan, että HSV:ta esiintyy 1:2000–1:5000 synnytystä kohti (Koskiniemi – Linnavuori 2001a). Tartunta voi aiheuttaa lapselle suun, silmien ja ihon infektion, enkefaliitin tai yleistyneen infektion (herpes neonatorum). Herpes neonatorumissa lapsella voi olla aivotulehdus sekä vaurioita useissa elimissä. Lääkityksestä huolimatta taudissa on suuri kuolleisuus ja jälkitautien osuus on suuri. Äidin vasta-aineet lieventävät taudin kuvaa. Lapsen saadessa tartunnan äidin primaari-infektion aikana, on tauti vakavampi, koska äidin vasta-aineet eivät ole vielä kehittyneet riittävästi. (Huovinen ym. 2005: 467 - 469.) Synnytyksen aikainen primaari-infektio siirtyy lapseen noin 30 %:ssa tapauksista, kun taas vanha infektio noin 3 %:ssa tapauksista (Koskiniemi – Linnavuori 2001a). Usein kun lapsi on saanut tartunnan, ei äidin ole tiedetty sairastavan genitaalierpestä. Niinpä neonataaliherpestä onkin hyvin vaikea ennakoida. (Huovinen ym. 2005: 467.)

2.3 Keskushermostoinfektiot

Keskushermostoinfektioita aiheuttavat monet muutkin virukset herpes simplex -viruksen lisäksi, mutta herpesenkefaliitti on yleisin kuolemaan johtava enkefaliitti (Koskiniemi 2001b). Vakava herpesenkefaliitti, jossa herpes infektoi kovakalvot ja aivoainetta, on kaikkein vammauttavin HSV:n muoto. Erityisesti sitä aiheuttaa HSV-1. Oireina esiintyy muun muassa kuumetta, tajunnan heikkenemistä ja fokaalisia neurologisia oireita, kuten kouristuksia, puhehäiriöitä sekä sekavuutta ja hallusinaatioita. (Huovinen ym. 2005: 467 - 469; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Suomessa vaikeaa verenvuotoja aiheuttavaa enkefaliittia esiintyy noin 20 - 30 tapausta vuodessa, lievempiä tapauksia on enemmän. Lapsista tautia esiintyy alle 1-vuotiailla. Keski-ikäisillä vaikean enkefaliitin osuus nousee ja myös vanhuksilla sitä esiintyy jonkin verran. Nuorilla aikuisilla infektiot ovat yleensä HSV-2:n aiheuttamia meningiittejä. (Huovinen ym. 2005: 467 - 469; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Keskushermostoinfektioista noin 30 % on primaari-infektioita ja loput uusintainfektioita (Huovinen ym. 2005: 467 - 469). Virus saattaa latenssipaikastaan kulkeutua hermoa pitkin sentripetaalisesti eli aivoihin päin, vaikka yleensä suunta onkin toisin päin eli iholle ja limakalvoille päin. Jos tautia ei hoideta, on kuolleisuus noin 50–70 %:n luokkaa. Antiviraalinen hoito auttaa, mutta taudista voi jäädä jälkiseuraamuksia. (Koskiniemi – Linnavuori 2001a.) Lääkitys on tehokkaimmillaan, kun se aloitetaan aivan sairauden alkuvaiheessa (Vesänen – Piiparinen – Kallio – Vaheri 1996).

2.4 Herpes simplex -virusinfektion lääkehoito

Tärkeimpiä HSV:n hoitoindikaatioita ovat vastasyntyneen yleistynyt herpes, keskushermostoinfektiot, vaikeat genitaalisherpeksset ja keratiitit sekä immuunisuppressiotilaiden herpesinfektiot. Koska HSV koodittaa itse monia nukleiinihappometaboliensa entsyymejä ja nämä entsyymit eroavat solun omista entsyymeistä, on ollut mahdollista kehittää HSV-lääkkeitä, joka estävät viruksen nukleiinihapposynteesiä, mutta eivät ole isäntäelimistölle toksisia. Viruslääkekehittely onkin kaikkein pisimmällä HSV:n kohdalla. (Huovinen ym. 2005: 465; Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

Tärkeimmät lääkkeet ovat asikloviiri, valasikloviiri ja famsikloviiri. Lääkkeitä on saatavana tablettimuodossa, paikallisvoiteena, silmävoiteena sekä mikstuurana ja iv-infuusioina. (Koskiniemi – Linnavuori 2001a.)

3 HERPES SIMPLEX -VIRUSTEN MÄÄRITTÄMINEN PCR-MENETELMÄLLÄ

Neonataali- ja keskushermostoinfektioiden diagnostiikassa PCR-menetelmä on herkin. Ennen PCR-vaihetta, täytyy nukleiinihapot eristää ja puhdistaa. PCR-vaiheessa nukleiinihapot monistuvat. PCR-tuotteen määrittäminen voi tapahtua erikseen PCR-vaiheen jälkeen tai yhtä aikaa PCR-vaiheen kanssa kuten reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä. (Huovinen ym. 2005: 471; Suominen – Ollikka 1999: 61; Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036.)

3.1 Neonataaliherpeksen ja keskushermostoinfektioiden diagnostiikka

Keskushermostoinfektioissa voidaan määrittää seerumin ja likvorin vasta-aineiden suhdetta. Keskushermostoperäisessä vasta-aineiden tuotossa likvorin vasta-ainetasot ovat kohonneet ja seerumin ja likvorin vasta-aineiden suhde pienentynyt. PCR-menetelmällä saadaan parhaita tuloksia herpeskefaliitin ja neonataaliherpeksen diagnostiikassa. Sillä voidaan osoittaa pienetkin viruksen DNA-pitoisuudet likvorista, vaikka muut testit näyttäisivät negatiivista. Osoittamalla viruksen nukleiinihappo likvorista, päästään varmaan diagnoosiin. (Huovinen ym. 2005: 470; Koskiniemi 2001b.)

PCR-menetelmän herkkyyden vuoksi on myös näytteenotossa otettava kontaminaatiovaara huomioon. Lumbaalipunktiossa annetaan likvorin tippua punktioneulasta suoraan puhtaan näyteputkeen ja putki suljetaan kierrekorkilla. Näytteeksi tarvitaan 1ml likvoria ilman, että lisätään säilöntä- tai muita aineita. Näyte säilytetään jääkaappilämpötilassa. Yli kolmen vuorokauden säilytys onnistuu pakastettuna. Näyte lähetetään laboratorioon tavallisena postikuljetuksena. Pakastettu näyte lähetetään pakastettuna. (Suvisaari 2007: 496.) Näyte tulisi ottaa ennen lääkehoidon aloittamista (Piiparinen – Koskiniemi – Vaheri 1995: 129).

3.2 PCR-työskentelystä

PCR-menetelmä on herkkä kontaminaatioille. Pienikin määrä nukleiinihappoa, joka ei ole peräisin monistettavasta näytteestä, voi antaa virheellisen tuloksen. HUSLABin virologian osastolla tämä on otettu huomioon jo työtiloja suunniteltaessa. Nukleiinihapon eristys, PCR-seosten valmistus, itse PCR-reaktio ja PCR-tuotteen määrittäminen tapahtuvat kukin erillisessä huoneessa. Nukleiinihapon eristys tehdään vetokaapissa fenolista ja kloroformista syntyvien haitallisten höyryjen minimoimiseksi. PCR-seoksen valmistus tehdään laminaarivirtauskaapissa. Työskentelyn jälkeen kaappeihin laitetaan UV-valo, joka tekee nukleiinihapon monistuskelvottomaksi. Pipetoinnissa käytetään suodattimellisia pipetinkärkiä, jotta vältetään ristikontaminaatioilta. Pipetin kärki vaihdetaan jokaisen pipetoinnin välillä. Työskentelytapojen tulee olla rauhallisia ja hallittuja. Suojavaatetus vaihdetaan päälle aina laboratorioon tullessa. Suojakäsineet on vaihdettava usein ja tarvittaessa käytetään kertakäyttöistä hius- ja kenkäsuojaa. Negatiivisia kontrolleja on hyvä olla useampia, jotta saadaan helpommin jäljitettyä mahdollisen kontaminaation lähde. (Suominen – Ollikka 1999: 107 - 109; Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036.)

3.3 DNA:n eristys ja puhdistus

Ennen kuin DNA voidaan monistaa PCR-menetelmällä, täytyy se eristää ja puhdistaa reaktiota häiritseviltä epäpuhtauksilta. Menetelmiä on muun muassa fenoli-kloroformiuutto ja magneettipartikkeleihin perustuva automaattinen eristys- ja puhdistusmenetelmä. (HUSLAB 2004; BioMérieux 2007; Suominen – Ollikka 1999: 64.)

3.3.1 DNA:n eristys fenoli-kloroformiuutolla

Ensin näytteet käsitellään proteiineja pilkkovalla proteinaasiK-entsyymillä, joka hajottaa näytteen mahdollisesti sisältämät solut. Käsitely tapahtuu EDTA:n ja SDS:n läsnä ollessa. EDTA tekee solumembraanista läpäisevämmän ja SDS hajottaa soluja, joten ne edesauttavat näytteessä mahdollisesti olevien solujen hajoamista. Näytteet inkuboidaan +37 °C:ssa. Solut hajoavat ja viruksen nukleiinihappo vapautuu viruksen proteiiniakuoren sisältä. Fenoli-kloroformiuutolla poistetaan proteiineja. Fenoli denaturoi proteiineja ja kloroformi käsitely poistaa faasiin jääneen fenolin. Fenolin poistaminen vesifaasista on tärkeää, koska se

inhiboi polymeraasientsyymiä. (HUSLAB 2004; Sambrook – Russell 2001: 8.26; Suominen – Ollikka 1999: 64.)

DNA kerätään talteen saostamalla etanolilla $-20 - -70$ ° C:ssa. Nukleiinihapot saostuvat yhdenarvoisten kationien läsnä ollessa suolana, kun liuokseen lisätään etanolia. Saostuminen on tehokkainta kylmässä. Sakka sentrifugoidaan putken pohjalle ja pelletti liuotetaan haluttuun tilavuuteen veteen tai puskuriin. (HUSLAB 2004; Sambrook - Russell 2001: 8.26; Suominen – Ollikka 1999:64.)

3.3.2 DNA:n eristys easyMAG-laitteella

NucliSens easyMAG on bioMérieux'n kehittämä nukleiinihapon eristyslaite, jossa eristys tapahtuu lähes kokonaan automatisoidusti. Laitteella voidaan eristää DNA ja RNA erilaisista näytemateriaaleista. Valmistaja on validoinut eristyksen plasmasta, seerumista, verestä, likvorista, ysköksestä ja ulosteesta. Näytteen tilavuus voi vaihdella 10 µl:sta 1000 µl:aan. Eristettyä tuotetta saadaan 25 -110 µl. Yhteen eristyskertaan laitteelle mahtuu 24 näytettä ja tällä näytemäärällä eristys kestää 40 minuuttia. (BioMérieux 2007.)

Menetelmä perustuu silikapäällystettyihin magneettipartikkeleihin, joilla on kyky sitoa pintaansa nukleiinihappoja. Ensin näytteen solut hajotetaan puskurilla (lysis buffer), jolloin nukleiinihapot vapautuvat soluista. Laite voi joko tehdä tämän itse tai sitten näytteet voidaan käsitellä laitteen ulkopuolella hajotuspuskurilla. (BioMérieux 2007.)

Jos näyte käsitellään laitteen ulkopuolella, näyte hajotuspuskureineen siirretään käsittelyn jälkeen laitteen näyteastiaan ja lisätään silikapäällystetyt magneettipartikkelit. Nukleiinihapot sitoutuvat partikkelien pintaan suolan läsnä ollessa. NucliSens easyMAGin magneetti vetää magneettiset silikapartikkelit nukleiinihappoineen kiinni näyteastian seinämään ja nukleiinihapot puhdistetaan proteiineista laitteen eristyspuskureilla (extraction buffer 1-3). Proteiinit pystytään poistamaan pesemällä, sillä ne eivät sitoudu silikamagneettipartikkeleihin. Nukleiinihapot irroitetaan silikan pinnalta kuumentamalla. Viimeisessä vaiheessa magneettiset silikapartikkelit erotetaan eluaatista magneetin avulla. (BioMérieux 2007.)

3.4 Polymeraasiketjureaktio

PCR on menetelmä, jolla voidaan monistaa nukleinihappoja, joko DNA:ta tai RNA:sta käännettyä cDNA:ta. PCR-reaktiot tapahtuvat putkissa, kuoppalevyn kuopissa tai kapillaareissa. PCR-reaktiot asetetaan PCR-laitteeseen ja lämpötilaa muuntelemalla saadaan DNA monistetuksi. (Glick – Pasternak 2003: 110; Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036.)

PCR-reaktioon tarvitaan templaatti, joka on eristettyä ja puhdistettua nukleinihappojuostetta, ja sitä käytetään vastinnauhan synteessin vasteena. Lisäksi tarvitaan alukkeet, joita on vähintään kaksi kappaletta ja ne on oltava komplementaarisia toinen toiselle ja toinen toiselle juosteelle. Aluke on DNA-jakso ja se toimii aloitusjaksona nukleinihapposynteesissä, sillä polymeraasientsyymi ei osaa aloittaa toimintaansa ellei sillä ole alukkeita. (Glick – Pasternak 2003: 110 - 117; Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036.)

PCR-reaktion monistusvaiheet ovat denaturaatio (94 °C -100 °C), jonka aikana kaksoisjuosteet avautuvat. Sen jälkeen lämpötilaa lasketaan, jotta alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin. Tätä vaihetta kutsutaan annealing-reaktioksi. Kolmas vaihe on pidennysreaktio, joka tapahtuu lämpötilaa nostamalla (n. 72 °C:een), jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotidejä templaatin mukaan alukkeen 3' päästä alkaen. Templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastinnauha, ja kun synteesi on valmis, nostetaan taas lämpötilaa (n. 95 °C:een), jolloin kaikki nauhat irtoavat toisistaan. Denaturointi-annealing-pidennys-sarjaa kutsutaan sykliksi. Yhdessä sykliissä syntyy kahdesta DNA-nauhasta neljä nauhaa ja seuraavassa sykliissä neljästä nauhasta kahdeksan nauhaa jne. Kun syklejä toistetaan useita peräkkäin (n. 40 sykliä), saadaan pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua suuri määrä tiettyjä DNA-jaksoja. Käytännössä vaiheet, denaturointi-annealing-pidennys, tapahtuvat osittain myös yhtä aikaa. Alukkeiden 5'päät määrittävät monistettavan DNA-jakson. Monistuminen tapahtuu käytännössä niin kauan, kunnes joku reaktion komponenteista alkaa rajoittaa monistumista. (Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036; Suominen – Ollikka 1999: 107 - 109.)

HUSLABin virologian osastolla PCR-monistuksessa käytetään kahta synteettistä aluketta. Alukkeet ovat spesifejä tunnistamaan sekä HSV-1:n että HSV-2:n. HSV-1 ja HSV-2 eroa-

vat alukkeiden välisellä sekvenssialueellaan niin, että ne voidaan erottaa hybridisaatiossa spesifisillä koettimilla. Alukkeet on biotinyloitua 5'-päästä. (HUSLAB 2004.)

3.5 PCR-tuotteen määrittäminen nukleinihappohybridisaatiolla mikrotitterilevyllä

PCR-tuotteen määrittämiseen on erilaisia menetelmiä. HUSLABin virologian osastolla käytetään ”in house”-PCR-tuotteen määrittämiseen nukleinihappohybridisaatiota mikrotitterilevyllä, jossa PCR-tuote sidotaan streptavidiinilla päällystetyn kuopan pohjalle. (HUSLAB 2004.)

Streptavidiinilla päällystettyihin mikrolevyn kuoppiin pipetoidaan kiinnittymistä auttavaa puskuria (binding buffer) ja PCR-tuotetta. PCR-tuote kiinnittyy alukkeen 5'-päässä olevan biotiinin avulla mikrolevyn kuoppien streptavidiinisiin inkuboinnin aikana. Tämän jälkeen PCR-tuote denaturoidaan alkaalisella eluointipuskurilla. Denaturoinnin aikana nukleinihappujuosteiden kaksoiskierteet avautuvat ja juosteen toinen puoli irtoaa. Ylimääräiset juosteet pestään pois pesuria käyttäen. Pesun jälkeen levyt kopistellaan kuiviksi. Kuoppiin lisätään digoksigeniinillä (DIG) leimattua koetinta sisältävä seos ja levy laitetaan inkuboitumaan. Inkuboinnin aikana koetin sitoutuu PCR-tuotteeseen. (Vesänen – Piiparinen yms. 1996: 1 - 11; HUSLAB 2004.)

Sitoutumaton koetin pestään pois. Levy koputellaan kuivaksi ja kuoppiin lisätään valmis anti-digoksigeniinikonjugaatti, joka sitoutuu inkubaation aikana digoksigeniinillä leimattuun koettimeen. Sitoutumaton konjugaatti pestään pois ja levyt kopistellaan kuiviksi. Anti-digoksigeniinikonjugaatti on vasta-aine, joka on leimattu alkaalisella fosfataasilla, joka reagoi kuoppiin lisättävään LumiPhos Plus- substraatin kanssa inkuboinnin aikana. Lopputuotteen muodostamaa valosignaalia mitataan luminometrillä. (Vesänen – Piiparinen yms. 1996: 1 - 11; HUSLAB 2004.)

3.6 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikainen PCR tapahtuu automatisoidulla laitteella, jossa on PCR-laitteen lisäksi fluorometri. Kohdesekvenssin monistuminen ja määrittäminen tapahtuvat samanaikaisesti, mikä tekee menetelmästä nopean. Suljettu menetelmä pienentää myös kontaminaatoriskiä. Mitä

enemmän monistuvaa tuotetta reaktiossa on, sitä aikaisemmin muodostunut spesifi fluoresenssi havaitaan. Reaaliaikaiset PCR-laitteet mittaavat fluoresenssia useammalla eri aallonpituudella. Tämä mahdollistaa muun muassa sisäisen kontrollin käytön, kun koettimet leimataan erilaisilla fluoresoivilla leimoilla. Mitattavan fluoresenssisignaalin aikaansaamiseksi on erilaisia tapoja, esimerkiksi epäspesifisti kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuva SYBR green-koetin tai spesifisesti kohdesekvenssiin sitoutuva hybridisaatiokoetin. (Sambrook – Russell 2001: 8.94 - 8.95; Piiparinen – Lappalainen 1999: 1031 - 1036.)

3.6.1 LightCycler 2.0

LightCycler 2.0 on Roche Diagnosticsin kehittämä reaaliaikainen PCR-laite, jossa PCR-reaktio tapahtuu lasikapillaareissa. PCR-reaktioseokset lämmitetään ja jäädytetään ilman kierron avulla, joka mahdollistaa nopean lämmönsiirtonopeuden. Lämmönsiirtonopeus 20 °C sekunnissa mahdollistaa PCR-monistuksen 40 sykliä 20 - 40 minuutissa. (Roche Diagnostics 2005.)

Laitteen kapillaareja on kahta tilavuutta, 100µl ja 20µl. Kapillaarit asetetaan laitteen karuselliin ja sentrifugoidaan LightCyclerin kanssa yhteensopivalla sentrifugilla, LC Carousel Centrifuge 2.0:lla. Sentrifugoinnin jälkeen näytekaruselli siirretään LightCycler 2.0:een monistettavaksi ja määritettäväksi. (Roche Diagnostics 2005.)

LightCycler käyttää fluoresenssin havaitsemiseen sinistä LED-lamppua, joka emittoi valoa aallonpituudella 470 nm. Laite mittaa fluoresenssin pääasiassa lasikapillaarin päästä. LightCycler 2.0:n kuusikanavainen fluorometri havaitsee fluoresenssin aallonpituuksilta 530nm, 560nm, 610nm, 640nm, 670nm ja 705 nm. (Roche Diagnostics 2005.)

3.6.2 Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus ja hybridisaatiokoetin

Reaaliaikaiselle PCR-laitteelle, LightCyclerille, on kehitetty QIAGENin artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus. Reagenssipakkaus sisältää valmiin PCR-seoksen, HSV LC

Masterin, joka sisältää tarvittavat reagenssit, mukaan lukien entsyymit, alukkeet sekä koettimet. Monistuva tuote on 148 bp:n kokoinen osa HSV:n genomia. (Qiagen 2006: 7 - 8.)

PCR-tuotteen määrittäminen tapahtuu koettimien avulla. HSV LC Master sisältää hybridisaatio-koettimet, joiden toiminta perustuu fluoresenssiresonanssienergian siirtoon (FRET). FRET-koettimia on kaksi spesifistä fluoresoivalla aineella leimattua hybridisaatio-koetinta, luovuttaja- (donor) ja vastaanottajakoetin (acceptor). Luovuttajakoetin on leimattu 3'-päästä fluoresenssivärillä ja se säteilee vihreää valoa, kun se on kiinni templaattissa. Vastaanottajakoetin on leimattu 5'-päästä LightCycler® punaisella. Mitattava fluoresenssi tulee esiin annealing-reaktion aikana, kun koettimet kiinnittyvät templaattiin. Kun koettimet tulevat lähellä toisiaan, luovuttajakoetin siirtää energian vastaanottajakoettimelle, joka signaalin saadessaan alkaa säteillä mitattavaa punaista fluoresoivaa valoa aallonpituudella 640 nm tai 705 nm. Punainen fluoresenssi mitataan jokaisen annealing-vaiheen lopussa. Annealing-vaiheen jälkeen lämpötilaa nostetaan, jolloin hybridisaatio-koettimet irtoavat. Taustasäteily näillä aallonpituuksilla on alhaista, koska lähtevää säteilyä esiintyy ainoastaan, kun molemmat koettimet ovat kiinnittyneet templaattiin. (Roche Diagnostics 2005; Qiagen 2006: 7 - 8; Walker – Rapley 2005: 334.)

Fluoresenssia mitataan aallonpituudelta 640 nm ja se ilmoittaa onko spesifistä monistumista tapahtunut, eli onko näytteessä HSV-1:sta tai HSV-2:sta. Aallonpituudella 530 nm mitataan taustasäteilyä. (Qiagen 2006: 7 - 8.)

PCR-reaktion jälkeen LightCycler-laite tekee sulamislämpötila-analyysin (melting curve-analyysi), jonka avulla voidaan erottaa HSV-1 ja HSV-2 toisistaan. Melting curve-analyysi perustuu kaksijuosteisen DNA:n sulamislämpötilaan (melting temperature, T_m). T_m on lämpötila, jolloin 50 % DNA:sta on avautunut yksijuosteiseksi. DNA:n yksilölliseen sulamislämpötilaan vaikuttavat muun muassa DNA:n pituus. Analyysissä käytetään hyväksi koettimien spesifisiä sulamislämpötiloja, joissa koettimet kiinnittyvät templaattiin. Sulamislämpötila HSV-1:lle on 71 °C ja HSV-2:lle 67 °C. (Qiagen 2006: 7 - 8; Roche Diagnostics 2005.)

HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus sisältää myös sisäisen kontrollin (internal control, IC), jonka avulla nähdään onko PCR-reaktion inhibiitori tapahtunut. Sisäinen kontrolli mitataan

aallonpituudella 705nm. Sisäinen kontrolli lisätään PCR-seokseen ennen kuin seos pipetoidaan kapillaareihin, jolloin jokaiseen reaktioon tulee mukaan sisäistä kontrollia. Mikäli sisäinen kontrolli ei toimi jossain reaktiossa, on näytteeseen todennäköisesti jäänyt PCR-reaktiota inhiboivaa tekijää. Reagenssipakkaus sisältää myös positiivisten kontrollien sarjan sekä HSV-1:lle että HSV-2:lle. Näiden avulla olisi mahdollista määrittää viruksen määrä näytteessä, jos haluttaisiin kvantitatiivinen tulos. (Qiagen 2006: 7 - 8.)

Valmistaja on testannut reagenssipakkauksen herkkyyden standardilaimennoksilla ja saanut analyttiseksi määritysrajaksi HSV-1:lle ja HSV-2:lle 1 kopion/ μ l 95 %:n todennäköisyydellä. Reagenssipakkauksen spesifisyyttä on varmistettu alukkeiden ja koettimien sekä reaktio-olosuhteiden valinnalla. Valmistaja on myös tutkinut ristiinreaktiivisuutta muiden herpesvirusten kanssa, eivätkä muut herpesvirukset ole olleet reaktiivisia testissä. Spesifisyys on validoitu 30:llä HSV negatiivisella likvorinäytteellä ja ne eivät reagoineet testissä. (Qiagen 2006: 27 - 29.)

4 TUTKIMUSASETELMA

Reaaliaikaista LightCycler-PCR-laitetta koskevia tutkimuksia on tehty useita. Myös easyMAG-eristysautomaattia koskeva tutkimus on tehty. Aikaisempia tutkimuksia, joissa olisi verrattu reaaliaikaista artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssia HUSLABin virologian osaston ”in house”-PCR-menetelmään, ei ole tehty. Myöskään easyMAG-eristysautomaattia ja fenoli-kloroformiuuttoeristystä vertailevia tutkimuksia ei löytynyt.

Tässä opinnäytteessä verrataan reaaliaikaista PCR-menetelmää HUSLABin virologian osaston ”in house”-PCR-menetelmään. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä käytetään artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkausta ja LightCycler-laitetta. Lisäksi tutkimuksessa verrataan easyMAG-eristysautomaattia sekä fenoli-kloroformiuuttoeristystä. Näyttemateriaalina tutkimuksessa on likvori, josta määritetään HSV-1:sta ja HSV-2:sta.

4.1 Aikaisemmat tutkimukset

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän etuja verrattuna perinteiseen PCR-menetelmään on tutkittu muun muassa bioanalyttikko-opiskelijoiden Tuula Nummiahon ja Maaret Sepän vuonna 2006 tekemässä opinnäytetyössä. Tutkimuksessa testattiin kahden eri reaaliaikaisen PCR-menetelmän toimivuutta HHV-6:n kvantitointiin 29 kokoveritemplaatista. Testattavat menetelmät olivat Amplimedical spa:n Q-HHV6 reagenssipakkaus, jossa monistusreaktio ja määrittäminen tapahtuivat mikrotitterilevyllä ABI Prism 7000-sarjan PCR-laitteessa. Toinen testattava reaaliaikainen PCR-menetelmä oli HUSLABin virologian osaston mikrobiologi Laura Mannosen kehittämä ”in house”-PCR-menetelmä. Tuloksia verrattiin myös kvalitatiivisen PCR-menetelmän tuloksiin, joka on käytössä HUSLABin virologian osastolla rutii-nidiagnostiikassa. Tutkimuksen kvantitatiivisten menetelmien tuloksissa oli suurta vaihtelua. Molempien reaaliaikaisen PCR-menetelmän spesifisyys osoittautui tutkimuksessa hyväksi. Sensitiivisyydessä oli eroja. ”In house”-PCR-menetelmä osoittautui sensitiivisemmäksi. Molempien menetelmien tuloksissa oli eroja, kun niitä verrattiin kvalitatiivisella PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Opinnäytetyöstä saaduissa tuloksissa on suurta vaihtelua, joten tulokset eivät ole riittävän luotettavia kummallakaan reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. (Nummiaho - Seppä: 2006: 1 - 33.)

Roche Applied Science Saksassa ja Mayo Clinic U.S.A.:ssa on tehnyt vuonna 2002 tutkimuksen, jossa HSV-1:stä ja HSV-2:sta määritettiin reaaliaikaisella PCR-laitteella, Light-Cyclerillä, käyttäen Rochen HSV ½ Detection -reagenssipakkausta. Eristys oli tehty MagnaPure LC Instrument -automaatilla käyttäen Rochen MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation -reagenssia. Näytteenä käytettiin HSV-negatiivisia näytteitä, joihin oli lisätty määritettyä, puhdistettua virusmateriaalia, sekä genitaali- ja iho-tikkunäytteitä, joiden epäiltiin olevan HSV-positiivisia. Menetelmässä käytettiin lisäksi sisäistä kontrollia, jolla voitiin kontrolloida eristystä sekä monistusta. Tulosten mukaan HSV ½ Detection -reagenssipakkaus on nopea ja luotettava menetelmä HSV-1:n ja -2:n määrittämiseen ja erottamiseen toisistaan. Sisäisen kontrollin avulla voidaan heti todeta väärät negatiiviset tulokset. Lisäksi monistuminen ja määrittäminen tapahtuvat samassa suljetussa putkessa, jolloin PCR-reaktion jälkeistä analytiikkaa ei tarvita ja voidaan ehkäistä mahdollisia kontaminaatioita. (Roche 2002: 5 - 7.)

Vuonna 2006 Zürichin yliopiston lääketieteellisen virologian instituutissa on tutkittu easyMAG eristysautomaattia vertaamalla sitä manuaaliseen Qiagen QIAamp eristysmenetelmään. Tutkimuksessa vertailtavat näytteet olivat verta, plasmaa, ulostetta, likvoria ja nielu-näytteitä. Eristetyt tuotteet monistettiin PCR-menetelmällä samassa ajossa. Tulokset osoittivat, että easyMAG-laite on erinomaisen tehokas DNA:n ja RNA:n eristyksessä kaikilla testatuilla näyttemateriaaleilla. Mitään ongelmia eristyksessä ei havaittu eikä näytteestä toiseen tapahtuvaa kontaminaatiota havaittu. Tutkimuksen mukaan likvorin kohdalla näyttäisi siltä, että eluaatiopuskurin volyyymi kannattaisi pitää pienenä, jotta nukleiinihapot konsentroituisivat tarpeeksi. (Bossart – Burkhardt: 2006: 49.)

Vuonna 2001 ilmestyneessä tutkimuksessa, joka oli tehty Skotlannissa, Edinburghissa, kliinisen virologian laboratoriossa, vertailtiin tavallista ja reaaliaikaista PCR-menetelmää HSV-1:lle ja -2:lle, sytomegalovirukselle ja varicella zoster -virukselle. Tutkimus koostui monesta osasta, mutta yhdessä niistä käytettiin likvornäytteitä potilailta, joiden epäiltiin sairastavan meningoencefaliittia. Näytteet eristettiin kaupallisella Qiagenin pylväsmenetelmällä ja monistettiin molemmilla PCR-menetelmillä. Reaaliaikaisena PCR-laitteena oli LightCycler ja reagenssina Roche'n reagenssi. Reaaliaikaisen PCR-menetelmän herkkyys HSV-1:lle, HSV-2:lle ja VZV:lle oli samanlainen kuin tavallisen PCR-menetelmän, mutta CMV:lle alhaisempi. HSV-1 ja HSV-2 pystyttiin määrittämään likvornäytteestä molemmilla menetelmillä, kun viruksen alkupitoisuus oli 10 - 100 kopiota/ml. (Nicoll yms: 2001: 25 - 31.)

4.2 Tutkimusongelmat

Tutkimuksen empiirinen laboratoriotyö sisältää herpes simplex -virus tyyppin 1 ja 2 DNA:n eristys- ja PCR-menetelmien vertailun. Työssä käytetään kontrolli- sekä laaduntarkkailunäytteitä sekä positiivisia ja negatiivisia likvornäytteitä, jotka ovat jo aikaisemmin analysoitu HUSLABin virologian osastolla.

HUSLABin virologian osastolla on nykyisin käytössä HSV-1:n ja -2:n nukleiinihappojen eristämiseen fenoli-kloroformiuuttomenetelmä. Se on aikaa vievä ja koostuu monista käsin tehtävistä työvaiheista, jotka lisäävät virhetekijöiden määrää. Uuden easyMAG-

eristysautomaatin osoittautuessa toimivaksi, säästyisi paljon työaikaa ja vastaukset saataisiin nopeammin.

HUSLABin virologian osastolla on käytössä paikan päällä kehitetty ”in house”-PCR-menetelmä, jossa etenkin PCR-tuotteen määrittäminen on aikaa vievä. Jos reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen tarkoitettu artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssi olisi toimiva, nopeuttaisi se myös diagnoosin tekoa.

Tutkimuskysymyksiä PCR-menetelmien vertailussa ovat;

A. Kuinka yhdenmukaisia ”in house”-PCR-menetelmän ja reaaliaikaisen PCR-menetelmän tulokset ovat keskenään?

B. Millainen on artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin herkkyys ja spesifisyys verrattuna ”in house”-PCR-menetelmään?

Tutkimuskysymys eristysmenetelmien vertailussa on;

Kuinka yhdenmukaisia automaattilla eristettyjen näytteiden ja aiemmin käsin eristettyjen ”in house”-PCR-tulokset ovat keskenään?

5 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Tutkimuksen työvaiheet on kuvattu liitteessä 1. Tutkimuksessa on käytetty HUSLABin työohjeita, easyMAG-eristysautomaatin ohjeita sekä artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkauksen mukana tulleita ohjeita.

Tutkimuksen empiirinen osuus toteutettiin HUSLABin kliinisen mikrobiologian vastualueella virologian osastolla geenimonistustyöpisteessä. Tutkimuslupa anottiin HUSLABilta. Tutkimukseen ei tarvittu eettisen toimikunnan lupaa, koska potilasnäytteet koodattiin ja käsiteltiin juoksevilla numeroilla ja näytteistä oli aikaisemmin määritetty samaa asiaa kuin tässä tutkimuksessa eli HSV-1:ta ja HSV-2:ta.

Näytteet olivat pakastettuja ja aikaisemmin HUSLABin virologian osastolla ”in house”-PCR-menetelmällä analysoituja laaduntarkkailu- ja potilasnäytteitä. Laaduntarkkailunäytteitä oli 11 kappaletta ja potilasnäytteitä 38 kappaletta. Pakastuslämpötilana oli – 20 °C. Näytevolyymin tuli olla vähintään 200 µl. Pakastetuista potilasnäytteistä valittiin mukana ne, joiden arvioitiin silmämääräisesti sisältävän tarvittava näytemäärä. Tutkimuksessa käytettiin sekä negatiivisia että positiivisia potilasnäytteitä. Likvornäyteputket sisältävät useimmiten hyvin vähän näytettä ja positiivisia likvornäyteputkia on hyvin vähän, joten näytteet ovat erittäin arvokkaita laboratoriolle. Tämän takia tutkimuksen otosmäärä täytyi pitää melko pienenä, koska positiivisia näytteitä ei saanut käyttää loppuun.

Positiivisista HSV-1 ja HSV-2 kontrollitemplaateista tehtiin laimennussarja, jossa oli seitsemän eri vahvuista kontrollia molemmille HSV:lle. Laimennuksen suhde oli 1:10 alkaen DNA-kopiomäärästä $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-3}$. (Kontrollilaimennosten teko-ohje liite 2.)

Reaaliaikainen PCR-laite LightCycler ohjelmoitiin QIAGENIN artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkauksen mukana tulleen ohjekirjan mukaan. (LightCycler-laitteen ohjelmointi liite 3.)

Kaupallisen QIAGENIN artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkauksen toimivuutta ja herkkyyttä testattiin määrittämällä kontrollilaimennussarjat Roche Diagnosticin reaaliaikaisella PCR-laitteella LightCyclerillä. Määritykseen otettiin seuraavat laimennokset HSV-1:stä ja – 2:sta: $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$, $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-5}$, $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-6}$, $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-7}$, $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-8}$, $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-9}$ ja $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-10}$. Kontrollilaimennossarjat määritettiin myös ”in house”-PCR-menetelmällä. (Näyteluettelo ja työohjeet liite 4-7.)

Reagenssipakkauksen oikeellisuutta ja spesifisyyttä testattiin laaduntarkkailupaneelinäytteillä, jotka eristettiin fenoli-kloroformiuutolla. (Eristysohje liite 8.) Näytteet olivat vuodelta 2004 ja niiden valmistaja oli The Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD). Laaduntarkkailupaneelinäytteistä 3 oli negatiivisia ja 8 positiivisia, joista 6 oli HSV-1 ja 2 HSV-2 positiivisia. Näytteet määritettiin reaaliaikaisella ja ”in house”-PCR-menetelmällä. (Näyteluettelo ja työohjeet liite 5-7, 9.)

BioMérieuxin NucliSens easyMAG-nukleiinihappoeristyslaitetta testattiin eristämällä 38 potilasnäytettä. Potilasnäytteistä 23 oli negatiivisia ja 15 positiivisia, joista 4 oli HSV-1 ja 11 HSV-2 positiivisia. Näytteet eristettiin kahdella eristyskerralla, kummallakin kerralla 19 potilasnäytettä. Automaattieristuksen tulokset määritettiin ”in house”-PCR-menetelmällä ja verrattiin aikaisempiin fenoli-kloroformiuutolla eristettyihin ja ”in house”-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Automaatilla eristetyt näytteet määritettiin myös reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja kahden eri PCR-menetelmän tuloksia verrattiin keskenään. Ensimmäisestä eristysajasta jäi yksi näyte analysoimatta LightCyclerillä, koska näytekapillaari rikkoutui. (Näyteluettelot ja työohjeet liite 5-7 ja 10-12.)

Fenoli-kloroformiuutolla eristettiin 3 potilasnäytettä, joista oli aikaisemmin saatu poikkeavia tuloksia. Näytettä nro. 25 ja 26 eristettiin 200 µl. Näyte nro. 25 fenoloitiin kaksi kertaa ja sen templaatista tehtiin myös laimennos 1:10. Näytettä nro. 39 eristettiin 100 µl. Eristetyt ja laimennetut näytteet määritettiin reaaliaikaisella ja ”in house”-PCR-menetelmällä, paitsi näyte nro. 39 määritettiin vain ”in house”-PCR-menetelmällä vähäisen näytemäärän takia. (Näyteluettelo ja työohjeet liite 4-8.)

Ristiinreagoinnin poissulkemiseksi muut human herpesvirukset määritettiin viruskontroleilla: varicella-zostervirus (VZV), sytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 A ja 6 B (HHV-6) ja human herpesvirus 7 (HHV-7). Human herpesvirus 8:aa (HHV-8) ei määritetty, koska positiivista kontrollia ei ollut saatavana. Epstein-Barrin virusta (EBV) ei myöskään saatu määritettyä, koska näytemateriaali osoittautui vääräksi. DNA-määrät muiden herpesvirusten kontroleissa olivat: VZV 1500 DNA-kopiota/µl, CMV $1,1 \times 10^4$ DNA-kopiota/µl, HHV-6 A $1,5 \times 10^4$ DNA-kopiota/µl, HHV-6 B 50 ng/µl ja HHV-7 50 ng/µl. (Näyteluettelo ja työohjeet liite 4-7.)

Kaikissa nukleiinihappoeristyssarjoissa oli mukana vähintään yksi vesikontrolli lopussa. Isommissa eristyssarjoissa vesikontrolleja oli myös eristettävien näytteiden välillä. Vesikontrollissa näytteen sijasta eristettiin apteekkipuhdasta vettä ja sillä kontrolloitiin eristyssarjan puhtautta, ja ettei eristysvaiheessa ollut tapahtunut kontaminaatiota. PCR-määrityksissä oli mukana aina reagenssikontrolli ja positiiviset kontrollilaimennokset $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$ ja $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-6}$. Reagenssikontrollimäärityksessä oli templaatin sijasta ap-

teekkipuhdasta vettä ja sillä kontrolloitiin PCR-seoksen puhtautta. Positiivisilla kontrolleilla varmistettiin määrityksen toimivuus.

6 TULOKSET

Koska eri menetelmien tulokset ovat eri yksiköissä ja siten eivät vertailukelpoisia, työssä verrataan vain kvalitatiivisia tuloksia, jotka ovat joko negatiivisia tai positiivisia. Myös itse diagnostiikassa herpes simplex -virusten PCR-tulokset vastataan kvalitatiivisessa muodossa. PCR-tuloksia ”in house”- ja reaaliaikaisella PCR-menetelmällä verrattiin toisiinsa määrittämällä kontrolli-, laaduntarkkailu- ja potilasnäytteitä. Eristysmenetelmien vertailussa käytettiin potilasnäytteitä. Liitteessä 13 on lueteltu erikseen kunkin näytteen tulokset

6.1 Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin herkkyys kontrollilaimennossarjalla määritettynä

HSV-1:lle ja HSV-2:lle molemmille käytettiin seitsemää eri vahvuista positiivista kontrollia. Ensimmäisessä kontrollilaimennossarjan määrityksessä oli tapahtunut joitakin virheitä pipetointivaiheessa, joten kontrollilaimennokset tehtiin ja määritettiin uudelleen. Tässä esitetään tulokset toisen kontrollilaimennussarjan määrityksistä.

Seitsemästä positiivisesta kontrollilaimennoksesta molemmille herpes simplex-viruksille tuli positiiviseksi ”in house”-PCR-menetelmällä 5 ja reaaliaikaisella LightCyclerillä 6 kontrollilaimennosta. Seuraavissa taulukoissa 1 ja 2 on vertailtu kontrollilaimennoksista saatuja tuloksia eri PCR-menetelmillä.

TAULUKKO 1. HSV-1 positiiviset kontrollit ”in house”-PCR-menetelmällä verrattuna reaaliaikaiseen PCR-menetelmään.

+ = Positiivinen - = Negatiivinen

Kontrollin vahvuus	”In house”-PCR-tulokset	Reaaliaikaiset PCR-tulokset
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-5}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-6}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-7}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-8}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-9}$	-	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-10}$	-	-

TAULUKKO 2. HSV-2 positiiviset kontrollit ”in house”-PCR-menetelmällä verrattuna reaaliaikaiseen PCR-menetelmään. + = Positiivinen - = Negatiivinen

Kontrollin vahvuus	”In house”-PCR-tulokset	Reaaliaikaiset PCR-tulokset
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-5}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-6}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-7}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-8}$	+	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-9}$	-	+
$0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-10}$	-	-

Tuloksista nähdään, että artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssi toimii, koska suurin osa kontroleista tulee positiiviseksi.

Taulukoista 1 ja 2 nähdään, että molemmilla herpes simplex -viruskontrolleilla tuli reaaliaikaisella PCR-menetelmällä 6 näytettä positiiviseksi, kun taas ”in house”-PCR-menetelmällä positiiviseksi tuli 5 näytettä. Kontrollit, jotka reaaliaikaisella PCR-menetelmällä tulivat positiiviseksi, mutta ”in house”-PCR-menetelmällä eivät, olivat molemmat kontrollilaimennosta $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-9}$. Laimennos $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-10}$ ei tullut enää kummallakaan menetelmällä positiiviseksi. Näin voidaan alustavasti päätellä, että reaaliaikainen menetelmä saattaisi olla herkempi.

6.2 PCR-menetelmien yhdenmukaisuus laaduntarkkailu- ja potilasnäytteillä määritettynä

Laaduntarkkailunäytteitä oli 11 kappaletta, joista 8 oli positiivisia ja 3 negatiivisia. Tulosten vertailussa käytettiin alkuperäisiä QCMD:n ilmoittamia tuloksia. 8 positiivisesta näytteestä 6 näytettä oli HSV-1 ja 2 HSV-2 positiivisia. Molemmilla PCR-menetelmillä saatiin samanlaiset, alkuperäisiä tuloksia vastaavat tulokset. Näiden laaduntarkkailunäytteiden tulosten perusteella eri PCR-menetelmien tulokset ovat yhdenmukaisia ja artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin oikeellisuus vastaa ”in house”-PCR-menetelmän oikeellisuutta. Kooste näkyy taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Laaduntarkkailunäytteiden alkuperäiset, ”in house”-PCR- ja reaaliaikaiset PCR-tulokset .

Laaduntarkkailunäytteet	Alkuperäiset tulokset	”In house”-PCR-tulokset	Reaaliaikaiset PCR-tulokset
HSV positiiviset	8	8	8
HSV negatiiviset	3	3	3
Yhteensä	11	11	11

EasyMAG-eristysautomaatilla eristettiin yhteensä 38 likvornäytettä. Näistä 15 oli alun perin todettu positiiviseksi; 4 oli HSV-1 ja 11 HSV-2 positiivisia. Loput 23 näytettä oli todettu negatiiviseksi HSV-1:lle ja HSV-2:lle. Eristys tapahtui kahdessa osassa. Kerralla automaattilla eristettiin 19 potilasnäytettä. Tulokset ovat taulukossa 4.

Ensimmäisestä eristysajosta jäi yksi näyte analysoimatta LightCyclerillä, koska näytekappilaari rikkoutui. Siinä oleva näyte nro. 22 oli entuudestaan todettu negatiiviseksi. Tämä näyte analysoitiin vain ”in house”-PCR-menetelmällä, jonka vuoksi reaaliaikaisella PCR-menetelmällä analysoitiin 37 näytettä ja ”in house”-menetelmällä 38 näytettä. ”In house”-PCR-menetelmällä näytteen tulokseksi saatiin HSV negatiivinen.

Ensimmäisestä eristysajosta kummallakin PCR-menetelmällä analysoitujen näytteiden tulokset vastasivat toisiaan, lukuun ottamatta yhtä näytettä, näytenumero 26, josta ”in house”-PCR-menetelmällä saatiin negatiivinen, mutta reaaliaikaisella PCR-menetelmällä HSV-2 positiivinen. Alun perin saatu tulos oli HSV-2 positiivinen. Tämä näyte uusittiin myöhemmin. (Katso kappale 6.5 Poikkeavat tulokset). Toisesta eristysajosta kahden PCR-menetelmän tulokset vastasivat toisiaan.

TAULUKKO 4. Likvornäytteet eristettynä easyMAG-eristysautomaatilla ja määritettynä ”in house”- ja reaaliaikaisella PCR-menetelmällä verrattuna alkuperäisiin fenoli-kloroformiuutolla eristettyjen näytteiden ”in house”-PCR-tuloksiin.

Potilasnäytetulokset	easyMAG-eristys + ”in house”-PCR	easyMAG-eristys + reaaliaikainen PCR	Fenoli-kloroformiuuttoeristys + ”in house”-PCR
HSV-1 positiiviset tulokset	3	3	4
HSV-2 positiiviset tulokset	11	12	11
Negatiiviset tulokset	24	22	23
Yhteensä	38	37	38

Näiden tulosten perusteella reaaliaikaisen ja ”in house”-PCR-menetelmän tulokset olivat lähes yhdenmukaisia. Vain yhden näytteen tuloksissa (näytenumero 26) oli eroja eri PCR-menetelmillä.

6.3 Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin spesifisyys

Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin spesifisyyttä testattiin muihin herpesviruksiin kuuluvista viruksista tehtyjen kontrollien avulla. Ristiinreagoivuutta ei saisi tapahtua, jotta menetelmä olisi spesifi vain herpes simplex -virus tyyppille 1 ja 2. Kontrolleina käytettiin varicella-zostervirus-, sytomegalovirus-, HHV-6 A- ja HHV-6 B-kontrollia sekä HHV-7-kontrollia. Mikään kontrolleista ei tullut positiiviseksi kummallakaan PCR-menetelmällä. EBV:n tulosta ei saatu väärän näyttemateriaalin vuoksi.

Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin spesifisyyttä testattiin myös negatiivisilla näytteillä. Reagenssi osoittautui spesifiseksi, koska vääriä positiivisia tuloksia ei tullut. Aikaisemmin negatiiviseksi tunnetuista näytteistä vain yksi tuli molemmilla PCR-menetelmillä positiiviseksi, mutta tämä johtui ilmeisesti siitä, että näytteelle oli aikaisemmin saatu väärä tulos näytteessä olevien inhiboivien tekijöiden vuoksi. (Katso kappale 6.5 Poikkeavat tulokset.)

6.4 Eristysmenetelmien vertailu

Eristysmenetelmien vertailussa käytettiin likvornäytteitä, jotka oli HUSLABin virologian osastolla aiemmin eristetty käsin fenoli-kloroformiuutolla ja analysoitu ”in house”-PCR-menetelmällä. Tutkimuksessa nämä samat näytteet eristettiin uudelleen easyMAG-eristysautomaatilla ja analysoitiin ”in house”-PCR-menetelmällä. Kahdella eri menetelmällä eristettyjen näytteiden ”in house”-PCR-tuloksia verrattiin keskenään. Tulokset ovat taulukossa 4.

Ensimmäisestä eristysajosta analysoitujen näytteiden ”in house”-PCR-tulokset vastasivat alkuperäisiä käsin eristettyjen näytteiden tuloksia, lukuun ottamatta kahta näytettä, näytenumerot 26 ja 25. Näytteen 26 alkuperäinen tulos oli HSV-2 positiivinen, mutta automaattilla eristetyn näytteen ”in house”-PCR-tulos oli negatiivinen. Näytteen 25 alkuperäinen tulos oli negatiivinen, mutta tutkimuksessa ”in house”-PCR-menetelmällä saatiin HSV-2 positiivinen tulos. Molemmat näytteet uusittiin myöhemmin. (Katso kappale 6.5 Poikkeavat tulokset.)

Toisesta eristysajasta analysoitujen näytteiden ”in house”-PCR-tulokset vastasivat alkuperäisiä käsin eristettyjen näytteiden tuloksia, lukuun ottamatta yhtä näytettä, näytenumero 39. Alkuperäinen käsin eristetty ”in house”-PCR-tulos oli HSV-1 positiivinen, mutta automaattilla eristetty ”in house”-PCR-tulos negatiivinen. Tämä näyte uusittiin myös. (Katso kappale 6.5 Poikkeavat tulokset.)

Eri eristysmenetelmillä eristettyjen ”in house”-PCR tulokset olivat lähes yhdenmukaisia. Tuloksissa oli eroja kolmen näytteen osalta. Näihin eroihin ei todennäköisesti ole syy eri eristysmenetelmissä, vaan eroja aiheuttavat muun muassa pakastuksen vaikutus viruksen DNA:han ja aikaisemmin saatu mahdollinen väärä tulos.

6.5 Poikkeavat tulokset

EasyMAG-eristysautomaatilla eristettyjen ja ”in house”-PCR-menetelmällä sekä reaaliaikaisella PCR-menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin alkuperäisiin käsin eristettyihin ja ”in house”-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Kolmen näytteen kohdalla tuloksissa oli poikkeavuuksia. Katso taulukko 5.

TAULUKKO 5. Poikkeavat tulokset. Automaatilla eristettyjen näytteiden ”in house”- ja reaaliaikaiset PCR-tulokset verrattuna aiempiin käsin eristettyjen näytteiden ”in house”-PCR-tuloksiin.

Näyte	Aiemmat tulokset (käsin eristys + ”in house”-PCR)	”In house”-PCR-tulokset (automaatilla eristetty)	Reaaliaikaiset PCR-tulokset (automaatilla eristetty)
26	HSV-2 positiivinen	Negatiivinen	HSV-2 positiivinen
25	Negatiivinen	HSV-2 positiivinen	HSV-2 positiivinen
39	HSV-1 positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen

Näytteen 26 ja 39 kohdalla saattaa olla kyse siitä, että pakastus olisi tuhonnut viruksen DNA:ta. Kumpikin näyte oli ollut aiemmin positiivinen, mutta uudelleen tutkittaessa vain

näytteen 26 reaaliaikainen PCR-tulos tuli positiiviseksi. Näytteen 25 kohdalla taas molemmat uudet PCR-tulokset olivat HSV-2 positiivisia, mutta alkuperäinen tulos negatiivinen. Reaaliaikaisessa PCR:ssä LightCyclerin sisäinen kontrolli ei toiminut tämän näytteen kohdalla, eli näyte sisälsi jotain PCR-reaktiota inhiboivaa tekijää. Tästäkin huolimatta se tuli molemmilla PCR-menetelmillä positiiviseksi. Nämä kolme näytettä uusittiin. Katso taulukko 6.

TAULUKKO 6. Poikkeavien tulosten uusitut tulokset. Näytteet eristettiin käsin ja analysoitiin ”in house”- ja reaaliaikaisella PCR:llä.

Näyte	”In house”-PCR-tulokset	Reaaliaikaiset PCR-tulokset
26	Negatiivinen	Negatiivinen
25	Negatiivinen	HSV-2 positiivinen
25, 1:10 laimennos	Negatiivinen	Negatiivinen
39	Negatiivinen	-

Uusinnoissa näytteestä nro 26 saatiin molemmilla PCR-menetelmillä negatiivinen tulos. Ensimmäisessä ajossa tästä näytteestä saatiin ”in house”-PCR-menetelmällä negatiivinen ja reaaliaikaisella PCR-menetelmällä HSV-2 positiivinen tulos. Tämä voi johtua siitä, että näyte on alun perin ollut niin heikosti positiivinen, että tulokset olivat negatiivisen ja positiivisen rajalla. Lisäksi pakastus on saattanut tuhota viruksen DNA:ta, jolloin menetelmien herkkyydet eivät enää riitä.

Näyte nro. 25 on todennäköisesti ollut alun perin HSV-2 positiivinen. Uusinnoissa kahden fenolointikerran jälkeen siitä saatiin vain reaaliaikaisella menetelmällä HSV-2 positiivinen. Fenolointi hävittää DNA:ta ja näyte tuli positiiviseksi reaaliaikaisella menetelmällä, joten se on mahdollisesti herkempi menetelmä. Kun näytteestä tehtiin 1:10 laimennos, se ei tullut enää kummallakaan menetelmällä positiiviseksi. Näyte oli samea ja se sisälsi todennäköisesti jotain PCR-reaktiota inhiboivaa tekijää. Kahden fenolointikerran jälkeen reaaliaikaisen PCR-menetelmän sisäinen kontrolli toimi, joten inhiboivat tekijät oli saatu pois.

Näytteestä 39, joka oli alun perin ollut HSV-1 positiivinen, saatiin uusintakerrallakin negatiivinen tulos. Myös tässä tapauksessa on pakastus saattanut tuhota viruksen DNA:ta, jolloin näytteen tulos jäi uusissa määrytyksissä negatiiviseksi. Tämä näyte uusittiin vain ”in house”-PCR-menetelmällä, koska näytettä oli niin vähän.

6.6 Tulosten yhteenveto

Tuloksista kävi ilmi, että artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssi toimii hyvin. Tulokset olivat yhteneviä ”in house”-PCR:n tulosten kanssa, vain yhden näytteen kohdalla eri PCR-menetelmällä saatiin erilaisia tuloksia. Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin herkkyys oli kontrollilaimennossarjan mukaan hieman parempi kuin ”in house”-PCR-menetelmän. Reagenssi oli spesifi vain herpes simplex tyyppin 1 ja 2 viruksille eikä vääriä positiivisia tuloksia saatu.

EasyMAG-eristysautomaatilla eristettyjen näytteiden ”in house”-PCR-tulokset vastasivat hyvin käsin eristettyjen näytteiden ”in house”-PCR-tuloksia. Kolmen näytteen kohdalla oli poikkeuksia, jotka eivät johtuneet eristysmenetelmistä. Näin ollen easyMAG-eristysautomaattia voidaan pitää luotettavana menetelmänä.

7 LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Työssä käytetty bioMérieuxin NucliSens easyMAG-nukleiinihappoeristyslaite oli jo bioMérieuxin toimesta validoitu ja QIAGENIN artus®HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus Qiagenin toimesta validoitu. Myös Roche diagnosticsin reaaliaikainen PCR-laite LightCycler oli validoitu Rochen toimesta. Referenssimenetelmänä käytettiin HUSLABin virologian osastolla validoitua ja rutiinidiagnostiikassa käytettävää ”in house”-PCR-menetelmää.

Tutkimuksen luotettavuuden ensimmäinen edellytys on, että tutkimus on tehty tieteelliselle tutkimukselle asetettujen kriteerien mukaan. Tutkimuksen kokonaisluotettavuutta kuvataan kahdella käsitteellä: validiteetti ja reliabiliteetti. Validiteetilla eli pätevyydellä tarkoitetaan, että tutkimuksessa mitataan sitä, mitä oli alun perinkin tarkoitus selvittää. Validius tarkoittaa myös systemaattisen virheen puuttumista. Reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoite-

taan tulosten tarkkuutta. Sillä voidaan myös tarkoittaa kykyä tuottaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Sisäinen reliabiliteetti voidaan todeta mittaamalla sama asia useamman kerran. Ulkoisessa reliabiliteetissa mittaukset ovat toistettavissa myös muissa tilanteissa ja tutkimuksissa. (Heikkilä 2004; 29 - 30, 185 - 187.)

Tässä opinnäytteessä pätevyyden ja ulkoisen reliabiliteetin määritykset täyttyvät, sillä menetelmät ovat jo aikaisemmin eri tilanteissa ja tutkimuksissa validoituja. Sisäistä reliabiliteettiä ei tässä työssä voida toteuttaa vähäisestä positiivisesta näytevolyymista johtuen. Sattumanvaraisten tulosten poissulkemiseksi määritettiin tulokset referenssimenetelmällä ja reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Lisäksi näitä tuloksia verrattiin aiemmin perinteisellä PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin.

Näytteiden vähäisyydestä johtuen työssä ei tehdä reagenssipakkaukselle tai eristyslaitteelle validointia. Tutkimuksen luotettavuuden arvioinnissa käytetään kuitenkin mikrobiologisten menetelmien validoinnissa käytettäviä suureita, kuten herkkyys, spesifisyys ja oikeellisuus. Herkkyydellä tarkoitetaan, että menetelmä havaitsee mahdollisimman pienet mikrobipitoisuudet. Spesifisyydellä haetaan menetelmän tarkkuutta, sitä ettei saa tulla vääriä positiivisia tuloksia. Oikeellisuuden käsite kuvaa virhepositiivisuutta ja -negatiivisuutta ja niillä tarkoitetaan uuden menetelmän antamien tulosten vastaavuutta verrattuna referenssimenetelmään. (Elintarvikevirasto 1997: 6 - 9.)

Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin herkkyyttä mitattiin kontrollilaimennussarjoilla. Pipetointivirheen vuoksi se määritettiin kahteen kertaan. Spesifisyys todettiin määrittämällä muita ihmisten herpesvirus kontrolleja sekä negatiivisia näytteitä. Menetelmän oikeellisuus testattiin vertaamalla laaduntarkkailunäytteiden tuloksia QCMD:n antamiin tuloksiin ja potilasnäytteiden määrityksistä saatuja tuloksia referenssimenetelmänä käytetyn ”in house”-PCR-menetelmän tuloksiin. EasyMAG-nukleiinihappoeristyslaitteen oikeellisuus testattiin vertaamalla automaatilla ja fenoli-kloroformiuutolla eristettyjen potilasnäytteiden ”in house”-PCR-menetelmän tuloksia keskenään.

PCR-määritykset sisältävät monia mahdollisia epävarmuustekijöitä kuten pipetointivirheet, inhibiittorit ja näytteiden kontaminaatio. Reaktioiden toimivuutta voidaan varmistaa erilaisilla kontrolleilla. PCR-määrityksessä on hyvä olla aina mukana reagenssikontrolli, jossa

on alukkeet ilman templaattia. Sen avulla selviää esimerkiksi, jos jokin reagenssi on kontaminoitunut. Positiivisen kontrollin avulla varmistetaan reaktion toimivuus. (Suominen – Ollikka 1999: 109-110.)

Eristysmenetelmien mahdollista kontaminaatiota kontrolloitiin eristämällä nukleiinihappoeristyssarjoissa vähintään yksi vesikontrolli sarjan lopussa. Isommissa eristyssarjoissa vesikontrolleja eristettiin myös näytteiden välillä. Vesikontrollissa näytteen sijasta eristettiin apteekkipuhdasta vettä. PCR-määrittämissä oli aina mukana eristetty vesikontrolli, reagenssikontrolli ja HSV-1 ja -2 positiiviset kontrollilaimennokset -4 ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$) ja -6 ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-6}$). Reagenssikontrollin määrittämissä oli templaatin sijasta apteekkipuhdasta vettä.

Jokainen määrittäminen suoritettiin samalla ohjeiden mukaisella tavalla. Määrittämissä tehdessä noudatettiin laite- ja reagenssivalmistajan ohjeita ja HUSLABin virologian osaston työohjeita.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää soveltuuko Roche Diagnosticin reaaliaikaiselle LightCycler-PCR-laitteelle kehitetty Qiagenin artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus herpes simplex -virus tyyppin 1 ja 2 määrittämiseen. Lisäksi oli tarkoitus selvittää soveltuuko bioMérieuxin valmistama easyMAG- nukleiinihappoeristysautomaatti herpes simplex -virus tyyppin 1 ja 2 eristämiseen likvornäytteistä.

Reaaliaikaisen PCR-reagenssipakkauksen herkkyyttä testattiin määrittämällä HSV-1 ja HSV-2 kontrollilaimennussarja LightCycler-laitteella. Referenssimenetelmänä oli HUSLABin virologian osastolla käytössä oleva perinteinen ”in house”-PCR-menetelmä. Menetelmien oikeellisuutta ja spesifisyyttä testattiin fenoli-kloroformiuutolla eristetyillä HSV-1 ja HSV-2 positiivisilla ja negatiivisilla laaduntarkkailunäytteillä ja easyMAG-eristysautomaatilla eristetyillä potilasnäytteillä, joista osa oli HSV-1 ja HSV-2 positiivisia. Laaduntarkkailunäytteiden tuloksia verrattiin QCMD:n antamiin tuloksiin ja potilasnäytteiden tuloksia verrattiin perinteisellä ”in house”-PCR-menetelmällä saatuihin tuloksiin, jotka

olivat fenoli-kloroformiuutolla eristettyjä. Samalla kun testattiin reaaliaikaisen PCR-menetelmän oikeellisuutta ja spesifisyyttä potilasnäytteistä, testattiin myös easyMAG-nukleiinihappoeristysautomaatin soveltuvuutta likvornäytteille.

LightCycler-laitteella tehtävä reaaliaikainen PCR-menetelmä osoittautui herkemmäksi kuin ”in house”-PCR-menetelmä, kun määritettiin kontrollilaimennussarja. Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä alhaisin löydetty virusmäärä oli molemmilla viruksilla (HSV-1 ja HSV-2) $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-9}$. ”In house” PCR-menetelmällä alhaisin löydetty virus määrä oli $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10^{-8}$. Laaduntarkkailunäytteiden tulokset olivat täysin yhtenevät molemmilla menetelmillä. EasyMAG eristysautomaatilla eristettyjen potilasnäytteiden tulokset olivat molemmilla PCR-menetelmillä 36 näytteen kohdalla yhteneviä ja 1 näytteen kohdalla poikkeavia. Poikkeavuudet johtuivat näytteessä olevasta inhiboivasta tekijästä, joka esti sisäisen kontrollin toiminnan.

EasyMAG-eristysautomaatilla eristettyjen näytteiden tuloksista 35 oli yhteneviä fenoli-kloroformiuutolla eristettyihin PCR-tuloksiin verrattuna. Kolme näytettä antoi poikkeavan tuloksen. Nämä näytteet eristettiin ja määritettiin uudelleen. Kuten edellä todettiin, yhden näytteen poikkeavat tulokset johtuivat näytteessä olevasta inhiboivasta tekijästä. Kahden muun näytteen kohdalla poikkeavuudet johtuivat todennäköisesti pakastuksen ja sulatuksen vaikutuksesta viruksen DNA:han.

LightCyclerillä tehty reaaliaikainen PCR-määritys on nopea, sillä tuotteen monistaminen ja määrittäminen tapahtuvat samanaikaisesti ilman perinteiseen PCR-määritykseen kuuluvia pipetointi- ja inkubaatioaikoja. Artus® HSV-1/2 LC PCR- reagenssipaketin sisältämä PCR-määritykseen tarvittava PCR-seos on yhdessä putkessa ja sisäinen kontrolli toisessa. Näin ollen pipetointien määrä PCR-seosta tehdessä on huomattavasti vähäisempää kuin perinteisessä PCR-menetelmässä. Kun huomioidaan lisäksi, että reaaliaikainen PCR-menetelmä on suljettu menetelmä, ovat mahdolliset virhelähteet ja kontaminaatoriskit huomattavasti pienempiä kuin perinteisellä PCR-menetelmällä tehdyssä määrityksessä. Huomioitavaa on myös, että perinteinen PCR-menetelmä ei sisällä sisäistä kontrollia, joten näytteessä mahdollisesti oleva inhiboiva tekijä jää huomaamatta. Lisäksi perinteisen PCR-menetelmän reagenssit tilataan eri toimittajilta, joten mahdollisen ongelman lähdettä on vaikeampi jäljit-

tää. Qiagenin artus® HSV-1/2 LC PCR- reagenssipaketin sisältämä sisäinen kontrolli lisää tulosten luotettavuutta ja valmistaja vastaa reagenssin puhtaudesta.

Nukleiinihappoeristysmenetelmänä automaattinen easyMAG-eristyslaite on nopea. Automaattinen eristysmenetelmä sisältää vähemmän työvaiheita ja pipetointia, joten mahdollisten virhelähteiden määrä samoin kuin kontaminaatoriskit ovat pienemmät kuin fenoli-kloroformiuuttoeristyksessä. Fenoli-kloroformiuutolla tehtävästä nukleiinihappoeristyksestä työlään tekevät aikaa vievät pipetoinnit, sentrifugoinnit ja haasteelliset fenolin ja kloroformin poistot. EasyMAG-eristyslaitteen käyttöjärjestelmä ja laitteen käyttö olivat helposti omaksuttavia.

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että automaattinen easyMAG-nukleiinihappoeristyslaite ja Qiagenin artus® HSV1/2 LC PCR-reagenssipakkaus soveltuvat hyvin likvorista tehtäviin HSV-1 ja HSV-2 määrityksiin. Positiivisten HSV-1 ja HSV-2 näytteiden vähäisyydestä johtuen, jäi tutkimuksen otosmäärä pieneksi. Molemmat menetelmät osoittautuivat tutkimuksessa hyvin toimiviksi. Tämän tutkimuksen pohjalta voidaan suositella jatkotutkimuksia, jossa näytemäärä olisi suurempi tai jos menetelmistä jompikumpi otettaisiin rutiinidiagnostiikkaan, olisi hyvä aluksi käyttää rinnakkain sekä käytössä olevaa että uutta menetelmää.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	HERPESVIRUKSET	2
2.1	Herpes simplex -virus	3
2.1.1	Lisääntyminen	3
2.1.2	Latenssi	4
2.1.3	Herpes simplex -virus tyyppi 1 ja 2	4
2.2	Neonataaliherpes	5
2.3	Keskushermostoinfektiot	6
2.4	Herpes simplex -virusinfektion lääkehoito	6
3	HERPES SIMPLEX -VIRUSTEN MÄÄRITTÄMINEN PCR-MENETELMÄLLÄ	7
3.1	Neonataaliherpeksen ja keskushermostoinfektioiden diagnostiikka	7
3.2	PCR-työskentelystä	8
3.3	DNA:n eristys ja puhdistus	8
3.3.1	DNA:n eristys fenoli-kloroformiuutolla	8
3.3.2	DNA:n eristys easyMAG-laitteella	9
3.4	Polymeraasiketjureaktio	10
3.5	PCR-tuotteen määrittäminen nukleinihappohybridisaatiolla mikrotitterilevyllä	11
3.6	Reaaliaikainen PCR	11
3.6.1	LightCycler 2.0	12
3.6.2	Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssipakkaus ja hybridisaatiokoetin	12
4	TUTKIMUSASETELMA	14
4.1	Aikaisemmat tutkimukset	15
4.2	Tutkimusongelmat	16
5	TUTKIMUKSEN SUORITUS	17
6	TULOKSET	20
6.1	Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin herkkyys kontrollilaimennossarjalla määritettynä	20
6.2	PCR-menetelmien yhdenmukaisuus laaduntarkkailu- ja potilasnäytteillä määritettynä	22
6.3	Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssin spesifisyys	24
6.4	Eristysmenetelmien vertailu	24
6.5	Poikkeavat tulokset	25
6.6	Tulosten yhteenveto	27
7	LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	27
8	POHDINTA	29

LÄHTEET

LIITTEET 1-13

LÄHTEET

BioMérieux 2006: Quick reference card for easyMAG off board lysis.

BioMérieux 2007: NucliSENS easyMAG. Verkkodokumentti. Päivitetty 31.1.2007.
<www.biomerieux.com>Luettu 31.1.2007.

BioMérieux: Worksheet easyMAG "off board" option.

Bossart, W. – Burkhardt, F. 2006: Evaluation of the new NucliSens easyMAG nucleic acid extraction system. Institute of Medical Virology. University of Zürich, Switzerland. Journal of Clinical Virology. 36(3). S25.

Elintarvikevirasto 1997: Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Helsinki.

Glick, Bernard R. – Pasternak, Jack J. 2003: Molecular Biotechnology. 3.painos. Washington D.C.: ASM PRESS.

Heikkilä, Tarja 2001: Tilastollinen tutkimus. 3. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.

Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

HUSLAB 2004: Geenimonistus. Herpes simplex-virus (HSV) 1 ja 2 DNA-osoitus. Työohje. Helsinki: Kliininen mikrobiologia. Virologian osasto.

Koskiniemi, Marjaleena 2001b: Keskushermostoinfektiot. Haartman-instituutti. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.10.2001. <
<http://www.hi.helsinki.fi/virus/keskushermosto.html>>. Luettu 21.12.2006.

Koskiniemi, Marjaleena – Linnavuori, Kimmo 2001a: Herpes simplex virukset (HSV). Haartman- instituutti. Helsingin yliopisto. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.10.2001< <http://www.hi.helsinki.fi/virus/>>. Luettu 4.12.2006.

Nicoll, S. – Brass, A. – Cubie, H.A. 2001: Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. Regional Clinical Virology Laboratory. City Hospital. Edinburgh. Scotland. Journal of Virological Methods. (96). 25-31.

Nummiaho, Tuula – Seppä, Maaret 2006: Ihmisen herpesvirus 6:n määrittäminen reaaliaikaisilla Amplimedical spa:n Q-HHV6- ja "in house"-PCR-testeillä sekä perinteisellä PCR-menetelmällä. Opinnäytetyö.

Piiparinen, Heli – Koskiniemi, Marjaleena – Vaheri, Antti 1995: Likvorista tehtävä hsv-polymeraasiketjureaktiotesti keskushermostoinfektioiden pikadiagnostiikassa. Duodecim 111(2).129.

Piiparinen, Heli – Lappalainen, Maija 1999: Geenimonistusmenetelmät virusdiagnostiikassa. Duodecim 115 (91).1031-1036.

Qiagen 2006: artus® HSV 1/2 LC PCR Kit. Handbook.

Roche 2002: Rapid Detection and Differentiation of Herpes Simplex Virus (HSV) Types 1 and 2 in Research Samples with the PCR Workflow System. Roche Applied Science – Mayo Clinic. Biochemica. (4.) 5-7. Verkkodokumentti. <www.roche-applied-science.com>.Luettu 18.1.2007.

Roche Diagnostics 2005: Verkkodokumentti. Päivitetty 22.8.2005<www.rochediagnostics.se>.Luettu 4.1.2007.

Sambrook, Joseph – Russell, David W. 2001: Molecular Cloning 2. 3. painos. A Laboratory Manual. New York.

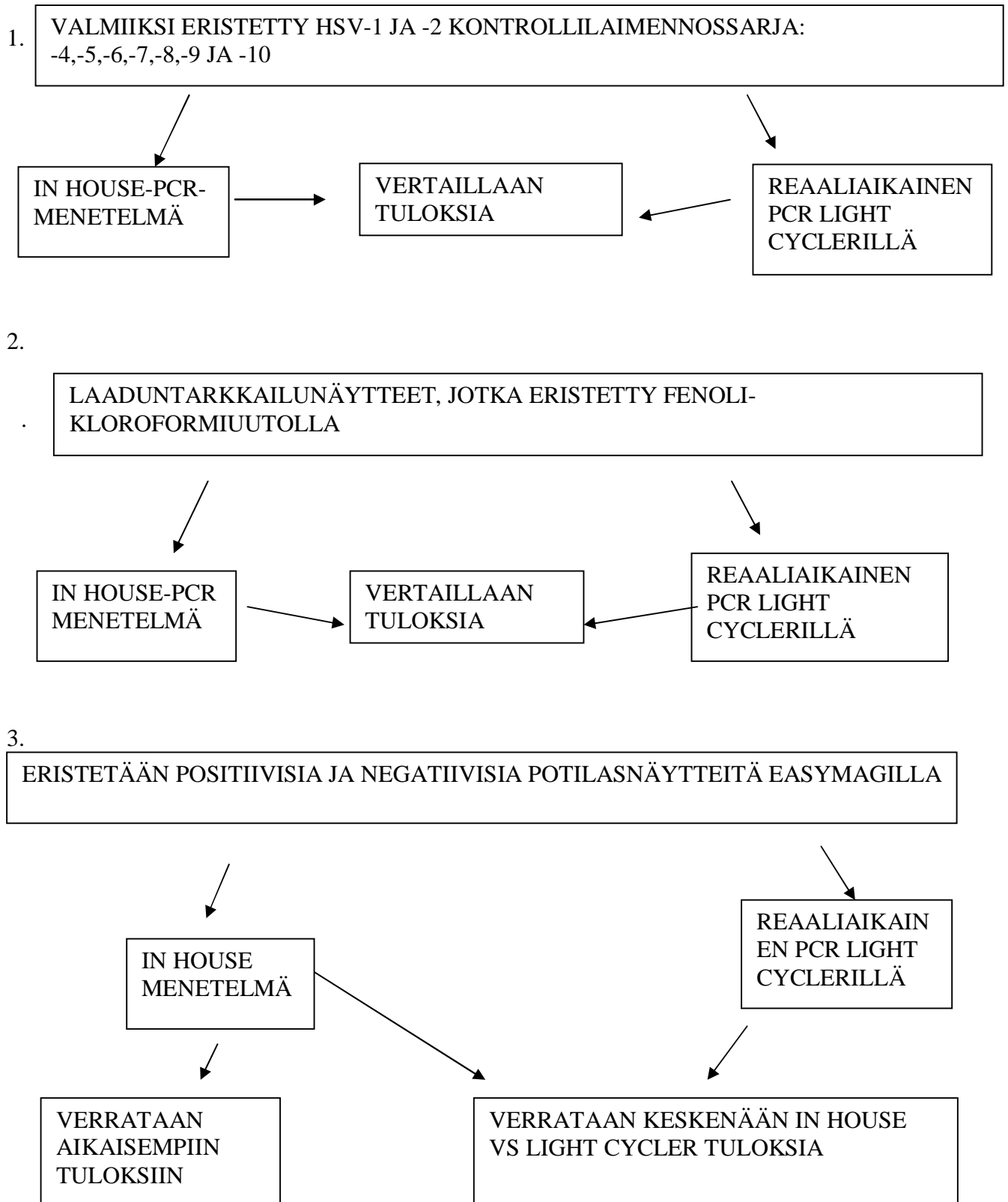
Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 1999: Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3.painos.Helsinki: Opetushallitus.

Suvisaari, Janne (toim.) 2007: Ohjekirja. Huslab. Helsinki: Edita Prima Oy.

Walker, John M. – Rapley, Ralph 2005: Medical Biomethods Handbook.

Vesänen, Mika – Piiparinen, Heli – Kallio, Arja – Vaheri, Antti 1996: Detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid samples using the polymerase chain reaction and microplate hybridization. Journal of Virological Methods 59.1-11.

TYÖN SUORITUS



KONTROLLILAIMENNOSTEN TEKO-OHJEET

Kontrollilaimennossarja

Toinen kontrollilaimennossarja tehtiin jo aiemmin laimennetuista HSV-1 ja HSV-2 -3-kontrollilaimennoksista, joiden pitoisuus oli $50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10^{-3}$. Laimennossuhde oli 1:10. Sarja tehtiin -4:sta -10-laimennokseen eli kontrollivahvuudet olivat $50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10^{-4}$ - $50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10^{-10}$. Kontrollilaimennoksia HSV-1:lle ja HSV-2:lle tehtiin molemmille 7 kappaletta.

Steriilit eppendorf-putket nimettiin -4, -5, -6, -7, -8, -9 ja -10 erikseen HSV-1:lle ja HSV-2:lle. Putkiin pipetoitiin apteekin vettä $90 \mu\text{l}$.

-3-kontrollilaimennosta pipetoitiin $10 \mu\text{l}$ -4-eppendorfputkeen. Sekoitettiin vortex-sekoittimella ja sentrifugoitiin lyhyesti tai sekoitettiin pipetin avulla.

-4-kontrollilaimennosta pipetoitiin $10 \mu\text{l}$ -5-eppendorfputkeen. Sekoitettiin vortex-sekoittimella ja sentrifugoitiin lyhyesti tai sekoitettiin pipetin avulla. Jatkettiin kuten edellä -10 asti.

Kun laimennossarja oli tehty, jokaisen laimennosputken sisältö jaettiin kahteen putkeen, alikvaatteihin.

HSV-1 JA HSV-2 2. KONTROLLILAIMENNOSSARJAN, MUIDEN
HERPESVIRUSKONTROLLIEN JA RISTIRIITAISTEN NÄYTTEIDEN
UUELLEENMÄÄRITYS LIGHTCYCLERILLÄ JA ”IN HOUSE”-PCR-
MENETELMÄLLÄ

Näytelistä:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 1. Reagenssikontrolli | 14. HSV-1 -7 kontrolli |
| 2. Varicella-zosterviruskontrolli | 15. HSV-1 -8 kontrolli |
| 3. 25 | 16. HSV-1 -9 kontrolli |
| 4. Epstein-Barrin viruskontrolli | 17. HSV-1 -10 kontrolli |
| 5. Sytomegaloviruskontrolli | 18. Vesikontrolli |
| 6. 25 1:10 laimennos | 19. HSV-2 -4 kontrolli |
| 7. HHV-6 A kontrolli | 20. HSV-2 -5 kontrolli |
| 8. HHV-6 B kontrolli | 21. HSV-2 -6 kontrolli |
| 9. 26 | 22. HSV-2 -7 kontrolli |
| 10. HHV-7 kontrolli | 23. HSV-2 -8 kontrolli |
| 11. HSV-1 -4 kontrolli | 24. HSV-2 -9 kontrolli |
| 12. HSV-1 -5 kontrolli | 25. HSV-2 -10 kontrolli |
| 13. HSV-1 -6 kontrolli | 26. Vesikontrolli |

- Näytteitä oli yhteensä 26 kappaletta. Kun tähän lisättiin yksi pipetointivara, tarvittiin PCR-reagenssia 27-kertainen määrä.

- ”In house”-PCR-menetelmässä yhden vesikontrollin tilalla oli näyttenumero 39.

PCR-VAIHE

PCR-seoksen teko:

-PCR-seoksessa käytettävät alukkeet ovat HSV1: 5' AAG GAG GCG CCC AAG CGT CCG 3' ja HSV2: 5' TGG GGT ACA GGC TGG CAA AGT 3'.

-PCR-seos tehtiin puhtaassa huoneessa. Näytemäärään (N) lisättiin yksi pipetointivara, joten PCR-seos tehtiin N+1-kertaisena.

-Pipetoitiin 5 ml:n eppendorf-putkeen:

Reagenssi	1 X	19 X	27 X	30 X
Apteekin vesi	69,5 µl	1320,5 µl	1876,5 µl	2085 µl
10 x PCR- puskuri (sis.MgCl)	10,0 µl	190,0 µl	270 µl	300 µl
dNTP 2.5 mM (final 0,2 mM)	8,0 µl	152,0 µl	216 µl	240 µl
HSV-1 aluke 60 µM (final 0,6 µM)	1 µl	19 µl	27 µl	30 µl
HSV-2 aluke 60 µM (final 0,6 µM)	1 µl	19 µl	27 µl	30 µl
Ampli Taq Gold entsyymi 5U/ µl (final 0,025 U/µl)	0,5 µl	9,5 µl	13,5 µl	15 µl
Yhteensä	90,0 µl	1710 µl	2430 µl	2700 µl

LIITE 5.
2(2)

- PCR-seosta pipetoitiin puhtaassa huoneessa 0,2 ml:n eppendorf-putkiin 90 µl.

-PCR-putket siirrettiin styroksilevyille ja tuotiin näytteenkäsittelyhuoneeseen, jossa putkiin lisättiin tempaattia 10 µl.

-PCR-putket laitettiin laitehuoneen PTC-225 koneeseen ja valittiin ohjelma HVGOLD.

1. 95°C	10 min
2. 96°C	15 s
3. 55°C	30 s
4. 72°C	30 s
5. takaisin vaiheeseen 2.	39 X
6. 72°C	5 min
7. 10°C	for ever
8. End	

(HUSLAB 2004.)

MIKROTITTERILEVYHYBRIDISAATIO-MÄÄRITYS

Merkittiin streptavidiinilla päällystettyihin mikrotitterilevyihin näytteiden numerot. HSV-1:lle ja 2:lle merkittiin molemmille kaksi kuoppaa. Yhdelle näytteelle tuli yhteensä neljä kuoppaa.

Pipetoitiin kuoppiin 40µl binding-puskuria ja näytettä 10µl/kuoppa. Levyjä inkuboitiin inkubaattorissa 30min. +20°C ravistuksen kanssa 650rpm.

Lisättiin jokaiseen kuoppaan 50µl huoneenlämpöistä eluointipuskuria ja sekoitettiin levyjä inkubaattorin sekoittimella 1 min.

Pestiin levyt pesurilla käyttäen ohjelmaa HSV1 (pesu x 3, pesupuskurilla 1). Levyjä hakattiin voimakkaasti käsipyyhepaperia vasten, jotta saatiin kuopista pois kaikki pesupuskuri.

Lisättiin 50µl koetinseosta/kuoppa. HSV-1:lle ja HSV-2:lle on molemmille omat koettimet. HSV-1 koetinseosta pipetoitiin HSV-1-kuoppiin 50µl ja HSV-2 koetinseosta pipetoitiin HSV-2-kuoppiin 50µl.

Levyjä inkuboitiin 30min. +42°C, ravistuksella 650 rpm.

Molemmille HSV-1:lle ja HSV-2:lle tehtiin oma koetinseos seuraavasti: Otettiin pakkasesta HSV-1 ja -2 dig-leimatut koettimet (10pmol/µl), molemmat koettimet laimennettiin 1:10 (1pmol/µl). 1pmol/µl vahvuiset koettimet pipetoitiin hybridisaatioliuokseen suhteella: 7,5µl koetinta ja 1ml hybridisaatioliuosta. Käytettävät oligokoettimet ovat HSV-1 MP: 5' CCC TCC TCG CGT TCG TCC TCG 3' ja HSV-2 MP: 5' TCC TCG TCG TCG TCC TTA TCC 3'.

Pestiin levyt pesurilla ohjelmalla HSV2 (pesu x 6, pesupuskurilla 2). Levyt hakattiin kuiviksi.

Lisättiin konjugaattiseosta 50µl/kuoppa. Levyjä inkuboitiin 30min. +22°C, ravistuksella 650 rpm.

Konjugaattiseos valmistettiin lisäämällä anti-digoksigeniinikonjugaattia huoneenlämpöiseen puskuriin loppukonsentraatioissa 5mU/50 μ l (1 μ l/7.5ml).

Pestiin levyt pesurilla ohjelmalla HSV3 (pesu x 6, pesupuskurilla 1). Levyt hakattiin kuivaksi.

Lisättiin 50 μ l/kuoppa valoherkkää LumiPhos Plus substraattia. Levyt laitettiin inkuboitumaan 40min pimeään huoneenlämpöön.

Ohjelmoitiin luminometri ja mitattiin levyt 40min kuluttua substraatin lisäämisestä.

(HUSLAB 2004.)

LIGHTCYCLER-TYÖOHJE

- Artus® HSV-1/2 LC PCR-reagenssia tarvittiin kutakin näytettä varten 15 µl. Lisäksi reagenssimäärään laskettiin yksi pipetointivara. Puhtaassa huoneessa pipetoitiin eppendorf-putkeen tarvittava määrä reagenssia.
- Näytteenkäsittelylaboratoriossa reagenssiin lisättiin LightCyclerin sisäinen kontrolli. Sisäistä kontrollia tarvittiin 0,5 µl/näyte, joten sen määrä laskettiin aina erikseen näytemäärästä riippuen ja pipetoitiin PCR-reagenssiin Sekoitettiin vortex-sekoittimella.
- LightCyclerin sentrifugiadapteri (The LightCycler® Centrifuge Adapter), joka sisältää jäähdytysblokin, otettiin jääkaapista ja siihen siirrettiin tarvittava määrä kapillaareja. Työssä käytettiin 20 µl:n kapillaareja.
- Jokaiseen kapillaariin pipetoitiin 15 µl reagenssiseosta. Lisättiin 5 µl näytettä ja kapillaari suljettiin korkilla käyttäen LightCyclerin korkitusapuvälinettä (LightCycler® Capping Tool).
- Kapillaarit siirrettiin näytekaruselliin (The LightCycler® Sample Carousel) ja näytteet sentrifugoitiin LightCyclerin sentrifugissa.
- Sentrifugoidut näytteet siirrettiin LightCycler-laitteeseen. Ensin laitteelle tehtiin ”self-test”-ohjelma, jolloin laite tarkistaa oman toimintansa. Valittiin oikea ohjelma, nimettiin näytteet ja valittiin mitattavat kanavat (aallonpituudet 530, 640 ja 705). Aloitettiin määrittäminen.

(Qiagen 2006.)

LIKVORNÄYTTEIDEN ERISTYS FENOLI-KLOROFORMIUUTOLLA

- Likvornäytettä pipetoitiin 1,5 ml:n eppendorfputkeen 200 µl.
- Lisättiin 200 µl proteinaasiK-3-puskuria ja 16 µl proteinaasiK:ta (20 mg/ml).
- Putkia inkuboitiin + 37°C:ssa vähintään 30 minuuttia. Putket sentrifugoitiin lyhyesti inkuboinnin jälkeen.
- Vetokaapissa: fenolia lisättiin näytteisiin 1:1 eli 400 µl.
- Putket sekoitettiin vortex-sekoittimella 1-2 minuutin ajan ja sentrifugoitiin 13 000 rpm, 2 minuuttia, + 4°C:ssa.
- Uusiin puhtaisiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin lisättiin kloroformia 1:1 eli 400 µl ja edellisten putkien yläfaasi siirrettiin näihin putkiin.
- Putket sekoitettiin vortex-sekoittimella 1-2 minuutin ajan ja sentrifugoitiin 13 000 rpm, 2 minuuttia, + 4°C:ssa.
- Uusiin puhtaisiin putkiin lisättiin 3 M NaAc (ph 5.3) suhteessa 1:10. Arvioitiin jäljellä oleva näytemäärä. Esimerkiksi kun jäljellä oleva näytemäärä oli 350 µl, NaAc:ia pipetoitiin putkiin 35 µl.
- Pipetoitiin näihin putkiin yläfaasi edellisistä putkista.
- Absoluuttista ETOH:ia lisättiin putkiin 2-3-kertainen määrä eli n. 1000 µl. Sekoitettiin käänтелеvellä putkia n. 10 kertaa.
- Näytteitä presipitoitiin – 70°C:ssa vähintään 30 minuuttia tai - 20°C:ssa vähintään 2 tuntia tai yön yli.

- Näytteet sentrifugoitiin 13 000 rpm, 30 minuuttia, + 4°C:ssa.

- Supernatantti kaadettiin pois.

- Putkiin lisättiin 500 µl 75 %:sta ETOH:ia.

- Sentrifugoitiin 13 000 rpm, 20 minuuttia, + 4°C:ssa.

- Supernatantti kaadettiin pois.

- Putket kuivattiin ylösalaisin korkit auki noin 20-30 minuuttia.

- Pelletti liuotettiin 22 µl:aan steriiliä vettä.

(HUSLAB 2004.)

LAADUNTARKKALUNÄYTTEIDEN MÄÄRITYS ”IN HOUSE”-PCR-
MENETELMÄLLÄ JA REAALIAIKAISILLA LIGHTCYCLERILLÄ

Näytelistä :

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 1. Reagenssikontrolli | 14. Vesikontrolli |
| 2. 1. | 15. HSV-1 -4 kontrolli |
| 3. 2. | 16. HSV-1 -6 kontrolli |
| 4. 3. | 17. HSV-2 -4 kontrolli |
| 5. 4. | 18. HSV-2 -6 kontrolli |
| 6. 5. | |
| 7. 6. | |
| 8. Vesikontrolli | |
| 9. 7. | |
| 10. 8. | |
| 11. 9. | |
| 12. 10. | |
| 13. 11. | |

- Näytteitä oli yhteensä 18 kappaletta. Kun tähän lisätään yksi pipetointivara, tarvittiin PCR-reagenssia 19-kertainen määrä.

EASYMAG-ERISTYSAUTOMAATILLA ERISTETYT NÄYTTEET
1.AJO

LIGHTCYCLER- NÄYTELISTA

1. Reagenssikontrolli
2. 12.
3. 13.
4. 14.
5. 15.
6. 16.
7. 17.
8. 18.
9. 19.
10. 20.
11. Vesikontrolli 2.
12. 21.
13. 22. huom! kapillaari särkyi
14. 23.
15. 24.
16. 25.
17. 26.
18. 27.
19. 28.
20. 29.
21. 30.
22. Vesikontrolli 4.
23. HSV-1 -4 kontrolli
24. HSV-1 -6 kontrolli
25. HSV-2 -4 kontrolli
26. HSV-2 -6 kontrolli

”IN HOUSE”-PCR NÄYTELISTA

1. Reagenssikontrolli
2. 12.
3. 13.
4. 14.
5. 15.
6. Vesikontrolli 1.
7. 16.
8. 17.
9. 18.
10. 19.
11. 20.
12. Vesikontrolli 2.
13. 21.
14. 22.
15. 23.
16. 24.
17. Vesikontrolli 3.
18. 25.
19. 26.
20. 27.
21. Vesikontrolli 4.
22. 28.
23. 29.
24. 30.
25. Vesikontrolli 5.
26. HSV-1 -4 kontrolli
27. HSV-1 -6 kontrolli
28. HSV-2 -4 kontrolli
29. HSV-2 -6 kontrolli

-PCR-seos LightCycleriä varten tehtiin 27-kertaisena ja ”in house”-PCR-menetelmää varten 30-kertaisena.

LIKVORNÄYTTEIDEN ERISTYS EASYMAG-ERISTYSAUTOMAATILLA

BioMérieux toimitti eristyslaitteen mukana Biohitin automaattisen multipipetin, johon oli valmiiksi ohjelmoitu tarvittavat pipetointiohjelmat (P1, P2 ja P3).

EasyMAG-eristyslaite laitettiin päälle ja eristysajo laitettiin valmiiksi laitteen ohjeiden mukaan.

Huoneenlämpöiset lyysausputket sentrifugoitiin 10min/1,500g.

Putkiin lisättiin 200µl näytettä ja sekoitettiin vortex-sekoittimella huolellisesti.

Putkia seisotettiin huoneenlämmössä 10-15 min.

Siirrettiin pasteurpipetillä lyysausputkien sisältö easyMAG:n näyteastioihin.

Valmistettiin silikaseos Biohit:n pipettiä käyttäen. Laitettiin pipettiin yksi kärki ja pipetoitiin ohjelmalla P1 550µl silikaa ja 550µl bioMérieuxin toimittamaa vettä eppendorf-putkeen. Putki sekoitettiin huolellisesti vortex-sekoittimella. Yhdestä putkesta riittää kahdeksaan näytteeseen, joten 24 näytteelle tehtiin kolme eppendorf-putkellista silikaseosta.

Valmis silikaseos siirrettiin kuoppalevylle yhtä pipetinkärkeä käyttäen, ohjelmalla P2 125µl/kuoppa.

Kuoppalevyltä seos siirrettiin näyteastiaan käyttäen kahdeksaa pipetinkärkeä ja ohjelmaa P3.

Yhteen näyteastiaan menee kahdeksan näytettä, joten työssä käytettiin kolmea näyteastiaa. Siirrettiin näytteet eristysautomaattilaitteeseen ja laitettiin eristysajo päälle.

(BioMérieux: Worksheet easyMAG "off board" option;

BioMérieux 2006: Quick reference card for easyMAG off board lysis.)

EASYMAG-ERISTYSAUTOMAATILLA ERISTETYT NÄYTTEET
2.AJO

LIGHTCYCLER-NÄYTELISTA

1. Reagenssikontrolli
2. 31.
3. 32.
4. 33.
5. 34.
6. 35.
7. 36.
8. 37.
9. 38.
10. 39.
11. 40.
12. 41.
13. 42.
14. 43.
15. 44.
16. 45.
17. 46.
18. 47.
19. 48.
20. 49.
21. Vesikontrolli
22. HSV-1 -4 kontrolli
23. HSV-1 -6 kontrolli
24. HSV-2 -4 kontrolli
25. HSV-2 -6 kontrolli

”IN HOUSE”-PCR-
NÄYTELISTA

1. Reagenssikontrolli
2. 31.
3. 32.
4. 33.
5. 34.
6. Vesikontrolli 1.
7. 35.
8. 36.
9. 37.
10. 38.
11. Vesikontrolli 2.
12. 39.
13. 40.
14. 41.
15. 42.
16. Vesikontrolli 3.
17. 43.
18. 44.
19. 45.
20. 46.
21. Vesikontrolli 4.
22. 47.
23. 48.
24. 49.
25. Vesikontrolli 5.
26. HSV-1 -4 kontrolli
27. HSV-1 -6 kontrolli
28. HSV-2 -4 kontrolli
29. HSV-2 -6 kontrolli

- PCR-seos LightCycleria varten tehtiin 26-kertaisena ja ”in house”-PCR-menetelmää varten 30-kertaisena.

TULOKSET

Kontrollilaimennossarja:

NÄYTE	“IN HOUSE”-PCR TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
HSV-1 -4 kontrolli	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -5 kontrolli	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -6 kontrolli	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -7 kontrolli	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -8 kontrolli	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -9 kontrolli	Negatiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -10 kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen
HSV-2 -4 kontrolli	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -5 kontrolli	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -6 kontrolli	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -7 kontrolli	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -8 kontrolli	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -9 kontrolli	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -10 kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen

Vesi- ja reagenssikontrollit olivat negatiivisia.

Muut herpesviruskontrollit:

KONTROLLIKANTA	"IN HOUSE"-PCR-TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
Varisella zostervirus kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen
Sytomegalovirus kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen
HHV-6 A kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen
HHV-6 B kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen
HHV-7 kontrolli	Negatiivinen	Negatiivinen

Laaduntarkkailunäytteet:

NÄYTE	ALKUPERÄISET TULOKSET (QCMD)	"IN HOUSE"-PCR-TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
Reagenssi-kontrolli	-	Negatiivinen.	Negatiivinen
1.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
2.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
3.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
4.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
5.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
6.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli	-	Negatiivinen	Negatiivinen
7.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
8.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
9.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
10.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
11.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen

Vesikontrolli	-	Negatiivinen	Negatiivinen
HSV 1 -4 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV 1 -6 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV 2 -4 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV 2 -6 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen

Potilasnäytteet (likvori):

1. easyMAG-eristys

NÄYTTEET	AIEMMAT TULOKSET	"IN HOUSE"-PCR TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
Reagenssi-kontrolli	-	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli 1.	-	Negatiivinen	-
Vesikontrolli 2.	-	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli 3.	-	Negatiivinen	-
Vesikontrolli 4.	-	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli 5.	-	Negatiivinen	-
HSV-1 -4 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -6 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-2 -4 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -6 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
14.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
17.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
20.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
26.	HSV-2 Positiivinen	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen
29.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen

12.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
13.	Negatiivinen.	Negatiivinen	Negatiivinen
15.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
16.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
18.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
19.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
21.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
22.	Negatiivinen	Negatiivinen	-
23.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
24.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
25.	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
27.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
28.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
30.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen

2. easyMAG-eristys

NÄYTTEET	AIEMMAT TULOKSET	"IN HOUSE"- PCR-TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
Reagenssikontrolli	-	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli 1.	-	Negatiivinen	Negatiivinen
Vesikontrolli 2.	-	Negatiivinen	-
Vesikontrolli 3.	-	Negatiivinen	-
Vesikontrolli 4.	-	Negatiivinen	-
Vesikontrolli 5.	-	Negatiivinen	-
HSV-1 -4 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-1 -6 kontrolli	-	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
HSV-2 -4 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
HSV-2 -6 kontrolli	-	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
31.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
34.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
36.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
38.	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen	HSV-1 Positiivinen
39.	HSV-1 Positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
41.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
44.	HSV-2	HSV-2	HSV-2 Positiivinen

	Positiivinen	Positiivinen	
46.	HSV-2 Positiivinen.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
47.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
49.	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
32.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
33.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
35.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
37.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
40.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
42.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
43.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
45.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen
48.	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen

Poikkeavat tulokset:

NÄYTE	AIEMMAT TULOKSET	"IN HOUSE"- PCR- TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
26.	HSV-2 Positiivinen	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen
25.	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen	HSV-2 Positiivinen
39.	HSV-1 Positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen

Poikkeavien tulosten uusinnat:

NÄYTE	"IN HOUSE"- PCR-TULOKSET	REAALIAIKAISET PCR-TULOKSET
26.	HSV-2 Positiivinen	Negatiivinen
25.	Negatiivinen	HSV-2 Positiivinen
25. 1:10 LAIMENNOS	Negatiivinen	Negatiivinen
39.	Negatiivinen	ei määritetty