

**Pro Gradu -tutkielma**

**IHN- ja VHS-virusten RT-qPCR-testimenetelmän  
käyttöönotto sekä konsentroitimenetelmien ver-  
tailu**

**Janita Nieminen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

27.9.2023

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologian maisteriohjelma

Nieminen, Janita IHN- ja VHS-virusten RT-qPCR-testimenetelmän  
käyttöönotto sekä konsentrintimenetelmien vertailu

Pro gradu -tutkielma: 38 s., 6 liitettä (16 s.)

Työn ohjaajat: Professori Marja Tirola ja FM Krista Norvasuo

Tarkastajat: Professori Lotta-Riina Sundberg ja yliopistotutkija Elina  
Laanto

Syyskuu 2023

---

Hakusanat: diagnostiikka, kalataudit, vesiviljely

Kiertovesiviljely (RAS) on vedenkäytöltään tehokas ja ekologinen kalanviljelymenetelmä, joka mahdollistaa vesiviljelyn myös alueilla, joissa veden saatavuus on rajallista. Kalojen patogeeneit aiheuttavat kuitenkin haasteita vesiviljelyssä, erityisesti virukset, kuten IHNV (tarttuva vertamuodostavan kudoksen kuolio -virus) ja VHSV (virusperäinen verenvuotoseptikemia -virus), joita vastaan ei ole hoitoa tai rokotetta. Kiertovesilaitokseen päätyessään virus voi levitä nopeasti koko laitokseen, jolloin tyhjennettävän ja desinfioitavan laitoksen kokemat tappiot ovat merkittävät. Nykyiset testimenetelmät eivät aina tunnista piilevää infektiota, minkä vuoksi säännöllinen tuontikalorien ja -mädin testaaminen on tärkeää virusten leviämisen estämiseksi. Tässä työssä optimoitiin RT-qPCR-testimenetelmää (kvantitatiivinen käänteiskopiointipolymeraasi- ketjureaktio) IHN- ja VHS-virusten havainnointiin ja vertailtiin virusten konsentrintimenetelmiä. Työssä tarkasteltiin myös positiivisen kontrollin lisäämistä RT-qPCR-reaktioon (*multiplex*-PCR), sillä kliinisessä testauksessa menetelmää käytetään usein varmistamaan testin toimivuus. Työssä testattiin ultrasuodatusta, polyetyleeniglykolisaostusta (PEG-saostus), kylmäkuivausta ja InnuPrep-helmiä, jotka on valmistettu vettä sitovasta polymeeristä. Lisäksi tarkasteltiin IHNV-infektioituneesta RAS-laitoksesta otettuja vesinäytteitä ja kokeiltiin kehitetyn testin toimivuutta näytteillä. RT-qPCR-testistä saatiin tarkka, ja testillä pystyttiin havaitsemaan 400 µl:n näytteestä noin kolme viruspartikkelia. Konsentrintimenetelmistä PEG-saostus ja ultrasuodatus kasvattivat näytteen konsentraatiota hieman, ja ultrasuodatus valittiin menetelmän nopeuden ja yksinkertaisuuden vuoksi RAS-laitokselta saatujen näytteiden käsittelyyn. Kumpikaan menetelmistä ei kuitenkaan kasvattanut näytteen konsentraatiota merkittävästi. Kahdessa RAS-laitokselta saadussa vesinäytteessä havaittiin pieniä määriä IHN-virusta, mutta testituloksen varmistamiseksi PCR-tuote olisi tullut sekvensoida. Loput seitsemän näytettä olivat negatiivisia viruksen suhteen. Ultrasuodatuksen konsentrintitehokkuutta tarkasteltiin kalan RNA:n kautta RAS-näytteistä, jolloin pitoisuutta onnistuttiin kasvattamaan jopa 31-kertaiseksi. Työn tuloksia voidaan mahdollisesti hyödyntää testaamisen nopeuttamisessa kalanviljelylaitoksilla, sillä kehitetty testi kaikkine vaiheineen vaatii vain noin kuusi tuntia. Tämä on huomattavasti tällä hetkellä käytössä olevaa soluviljelytestiä nopeampi, jonka tulosten saamiseen saattaa kulua jopa 14 vuorokautta.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Master's Degree Programme in Cell and Molecular Biology

Nieminen, Janita                      Introducing RT-qPCR test method for viral fish diseases  
IHN and VHS and comparing concentration methods  
MSci Thesis                            38 p., 6 appendixes (16 p.)  
Supervisors:                            Professor Marja Tirola and MSci Krista Norvasuo  
Revisors:                                Professor Lotta-Riina Sundberg and university  
researcher Elina Laanto

September 2023

---

Keywords: aquaculture, diagnostics, fish disease

Recirculating aquaculture system (RAS) is an ecologically sustainable method of fish farming, and it can be used in a variety of environments, even in places that lack water. Aquatic viral pathogens, such as diseases IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus) and VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus), threaten fish farming, because there are no vaccines or treatments against them. Viral pathogens can spread rather fast to the whole facility, in which case the entire facility has to be sanitized. This causes major economic losses to the facility. The way to prevent the spread of fish diseases IHN and VHS is the recurrent testing of fish fry and eggs before they are transported to facilities, but the current test methods are not fast enough for this kind of testing. This work optimized the RT-qPCR (quantitative reverse-transcript polymerase chain reaction) testing method for detecting IHN and VHS viruses and investigated four different virus concentration methods. In the study, the addition of a positive control to the RT-qPCR reaction (*multiplex-PCR*) was also investigated, as in clinical testing, this method is often used to verify the functionality of the test. Ultrafiltration, polyethylene glycol (PEG) precipitation, freeze-drying, and InnuPrep beads, which are made from a water-absorbing polymer, were the concentration methods tested in this work. In addition, water samples were taken from an IHNV-infected RAS facility, and the performance of the developed test was tested on the samples. The RT-qPCR test was accurate and could detect concentrations as little as three viral particles from a 400 µl sample. Among the concentration methods, PEG precipitation and ultrafiltration slightly increased the concentration of the sample, but ultrafiltration was selected for processing samples from the RAS facility due to its speed and simplicity. Neither of these methods had a significant effect on the concentration of the sample. Small amounts of IHN virus were detected in two out of nine water samples from RAS facility, but test results were not confirmed properly with sequencing. Samples from the RAS-facility were ultrafiltered, and the concentration of the fish RNA in the sample was increased up to 31-fold. The results of this work could be used to improve testing at fish farming facilities, as the test developed in the work can be done in six hours, which is significantly less than the currently used testing method, which can take up to 14 days.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Virusperäiset kalataudit.....	3
1.2	RT-qPCR ja TaqMan diagnostiikassa.....	5
1.3	Virusten konsentroiminen vesinäytteestä.....	6
1.4	Tutkimuksen tavoitteet, tutkimuskysymykset ja hypoteesit .....	8
<b>2</b>	<b>AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>9</b>
2.1	Tutkimusaineisto .....	9
2.2	RT-qPCR-diagnostiikkamenetelmän optimointi ja käyttöönotto.....	11
2.2.1	RNA-synteesi IHN- ja VHS-virusten mallinnusta sekä RT-qPCR-standardia varten .....	13
2.2.2	RT-qPCR-menetelmän optimointi .....	14
2.2.3	Ristikontaminaation ehkäiseminen UNG-käsittelyllä.....	15
2.2.4	RT-qPCR-menetelmän standardisuurien määrittäminen .....	16
2.2.5	RT-qPCR-menetelmän <i>annealing</i> -gradientti.....	17
2.2.6	RT-qPCR-menetelmän aluke- ja koetintestit.....	17
2.2.7	Veden suolapitoisuuden vaikutus RT-qPCR-menetelmän toimivuuteen .....	17
2.3	Eri menetelmien vertailu virusten konsentroimiseen vesinäytteestä 18	
2.3.1	Konsentroidi ultrasuodatuksella .....	18
2.3.2	Konsentroidi kylmäkuivauksella .....	19
2.3.3	Konsentroidi PEG-saostuksella.....	19
2.3.4	Konsentroidi InnuPREP-menetelmällä.....	19
2.3.5	Konsentroitujen näytteiden RNA-DNA-eristys .....	20
2.4	Kiertovesiviljelylaitokselta saatujen vesinäytteiden käsittely.....	20
2.4.1	RAS-laitosnäytteiden dsDNase-käsittely RT-qPCR-menetelmän tehokkuuden parantamiseksi .....	20
2.5	RT-qPCR-aineiston käsittely .....	21
<b>3</b>	<b>TULOKSET</b> .....	<b>21</b>
3.1	RT-qPCR-protokollan optimointi.....	21
3.1.1	Standardointi sekä aluke- ja koetinkonsentraatioiden optimointi .....	23
3.2	Konsentroidimenetelmien vertailu ja vaikutus RT-qPCR-menetelmän herkkyuden parantamiseen.....	27
3.3	RAS-laitoksen vesinäytteiden analysointi IHNV-tartunnan varalta RT-qPCR-testillä.....	28
3.3.1	dsDNase-käsittelyn vaikutus RT-qPCR-menetelmän herkkyyteen.....	31
<b>4</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>31</b>
4.1	RT-qPCR-testin optimointi ja käyttöönotto .....	32
4.2	Konsentroidimenetelmien tehokkuuden vertailu vesinäytteiden konsentroidiin .....	34

4.3 RAS-näytteiden viruspitoisuuden tarkastelu .....	36
4.4 Yhteenveto .....	37
<b>KIITOKSET .....</b>	<b>39</b>
<b>KIRJALLISUUSLUETTELO .....</b>	<b>40</b>
<b>LIITE 1. TYÖSSÄ KÄYTETTYJEN KONSTRUKTIEN SEKVENSSIT .....</b>	<b>44</b>
<b>LIITE 2. PÄÄTÖS LUVAN MYÖNTÄMISESTÄ TAUDINAIHEUTTAJAN KÄSITTELYYN, RUOKAVIRASTO .....</b>	<b>45</b>
<b>LIITE 3. AHVENANMAAN MAAKUNTAHALLITUKSEN LUPA NÄYTTEIDEN SIIRTÄMISEEN .....</b>	<b>52</b>
<b>LIITE 4. LABORATORION REKISTERIOTE, RUOKAVIRASTO.....</b>	<b>57</b>
<b>LIITE 5. IHNV-TAUTISUOJAUSJÄRJESTELMÄ.....</b>	<b>58</b>
<b>LIITE 6. PROTOKOLLA VIRUSTEN HAVAINNOINTIIN VESINÄYTTEESTÄ.....</b>	<b>59</b>

## LYHENTEET

<b>IHN</b>	Tarttuva vertamuodostavan kudoksen kuolio (eng. <i>Infectious hematopoietic necrosis</i> )
<b>IHNV</b>	Tarttuva vertamuodostavan kudoksen kuolio -virus (eng. <i>Infectious hematopoietic necrosis virus</i> )
<b>NTC</b>	Templaatiton kontrolli (eng. <i>no template control</i> )
<b>PCR</b>	Polymeraasiketjureaktio (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polyetyleeniglykoli (eng. <i>polyethylene glycol</i> )
<b>RAS</b>	Kiertovesiviljely (eng. <i>recirculating aquatic system</i> )
<b>RT-qPCR</b>	Kvantitatiivinen käänteiskopiointi -PCR (eng. <i>quantitative reverse transcription -PCR</i> )
<b>VHS</b>	Virusperäinen verenvuotoseptikemia (eng. <i>Viral hemorrhagic septicemia</i> )
<b>VHSV</b>	Virusperäinen verenvuotoseptikemia -virus (eng. <i>Viral hemorrhagic septicemia virus</i> )

# 1 JOHDANTO

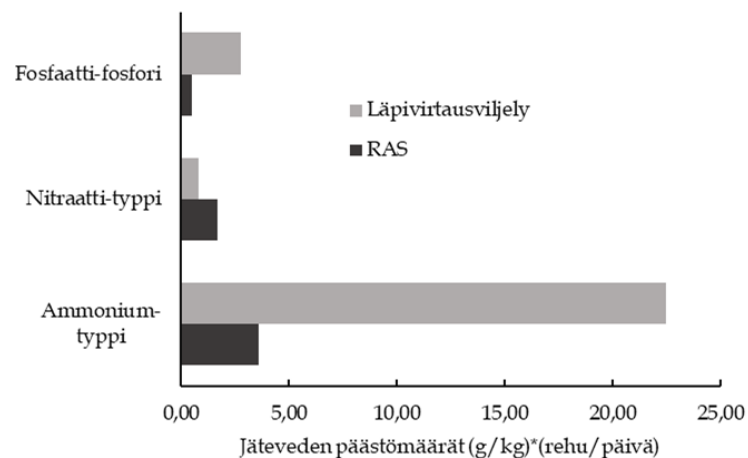
Vesiviljely ja kalastus ovat tärkeitä ruoantuotantomenetelmiä, jotka tuottivat vuonna 2020 yhteensä 178 miljoonaa tonnia vesieläimiä, kuten kaloja ja katkarapuja (FAO 2022). Vesieläinten tuotantoa pidetään mahdollisesti helpottavana tekijänä ravintokriisiin, sillä alalla on paljon kasvumahdollisuuksia useilla maantieteellisillä alueilla. Ongelmia aiheuttavat kuitenkin ylikalastus, vesistöjen saastuminen ja tartuntataudit. FAO:n (*Food and Agriculture Organization*, suom. Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö) raportin (2022) mukaan vesiviljelyllä ja kalastuksella tuotetaan 17 % eläinperäisestä proteiinista. Koska vesiviljelyn tuotantomäärät ovat olleet kasvussa viime vuosien ajan, voidaan myös olettaa kalaperäisen proteiinin tuotannon osuuden kaikesta proteiinintuotannosta kasvavan tulevaisuudessa. Vesiviljely on keskittynyt muutamiin kalalajeihin, ja sisämaan vesiviljelyssä lähes 80 prosenttia kalantuotannosta saadaan 15:stä yleisimmästä lajista, joista suurin osa on karppikaloja. Suolaisessa vedessä yleisimmin kasvatettu kalalaji on lohi (*Salmo salar*), jonka tuotanto on noin 30 prosenttia kaikesta suolaisen veden kalantuotannosta (FAO 2022). Suomessa tuotettiin vuonna 2021 14,4 miljoonaa kiloa kalaa, josta 94 prosenttia oli kirjolohta (*Oncorhynchus mykiss*) (Luonnonvarakeskus 2022).

Tsakiridis ym. (2020) vertailivat eri proteiininlähteitä ja niiden tuotannossa syntyviä hiilidioksidipäästöjä hiilidioksidiekvivalentteina. Hiilidioksidiekvivalentti on käsite, jonka avulla kuvataan tuotantoon liittyviä päästöjä suhteutettuna niiden kykyyn voimistaa kasvihuoneilmiötä siten, että suurempi luku kuvaa suurempaa vaikutusta kasvihuoneilmiön voimistumiseen. Vesiviljelyllä tuotetun proteiinin hiilijalanjälki on vain noin kuudesosa nautaperäisen proteiinin hiilijalanjäljestä, pois lukien maitoproteiini (Tsakiridis ym. 2020). Tutkimuksessa todettiin tonnin nautaperäistä proteiinia tuottavan 63 hiilidioksidiekvivalenttia, kun vesiviljelyllä tuotettu proteiini tuottaa 10 hiilidioksidiekvivalentin verran päästöjä. Tämä on samaa luokkaa sianlihan tuotannon kanssa (10 hiilidioksidiekvivalenttia), mutta korkeampi kuin siipikarjan tuotannolla (4 hiilidioksidiekvivalenttia) (Tsakiridis ym. 2020). Pienen hiilijalanjälkensä vuoksi vesiviljely on ympäristöystävällinen keino eläinproteiinin tuotantoon ja ekologinen vaihtoehto naudanhalle proteiininlähteenä. Merikalastuksen hiilijalanjälki on hieman vesiviljelyä pienempi (Tsakiridis ym. 2020), mutta liikakalastus on aiheuttanut runsaasti pyydystettyjen kalalajien kantojen heikentymisen. Heikentyneet kalakannat palautuvat säännöllisestä pyynnistä huonosti, joten kalastuksen tuotantomääriä ei pystytä kasvattamaan samassa mittakaavassa vesiviljelyn kanssa (FAO 2022).

Yleisimpiä kalojen vesiviljelymenetelmiä ovat verkkoallasviljely, läpivirtausviljely sekä kiertovesiviljely (eng. *recirculating aquatic system*, RAS). Merellä kalanviljelyyn käytetään verkkoallasviljelyä, jossa kaloja kasvatetaan avovedessä (Sievers ym. 2022). Tämän tuotantomäärän suurimpia ongelmia ovat

verkkojen hajoaminen myrskyissä ja tästä johtuvat joukkopaot, sekä olosuhteiden säätelymahdollisuuksien puute (Sievers ym. 2022). Läpivirtausviljelyssä kaloja kasvatetaan altaissa, joihin luonnonvesistä johdettu vesi virtaa altaiden läpi takaisin vesistöön (Snow ym. 2012). Läpivirtausmenetelmässä vedestä pystytään poistamaan kiinteää ainesta sedimentoimalla tai seulomalla, mutta liuenneiden yhdisteiden poistaminen on haasteellisempaa (Snow ym. 2012).

Kiertovesiviljelyssä laitoksen vettä kierrätetään kasvatus-, puhdistus- ja hapetusaltaiden välillä. Kiertovesiviljelyn ekologisuus perustuu veden tehokkaaseen puhdistamiseen mekaanisia ja biologisia filttäreitä hyödyntämällä, jolloin suurin osa vedestä voidaan ohjata hapetuksen kautta takaisin kasvatusaltaisiin (d’Orbcastel ym. 2009). Puhdasta vettä joudutaan tällöin käyttämään huomattavasti pienempiä määriä verrattuna esimerkiksi läpivirtauslaitokseen. Veden mekaaniseen puhdistamiseen käytetään sedimentaatiota tai seulontaa. Biofilttereillä muokataan haitallisia yhdisteitä mikrobien avulla muiksi yhdisteiksi (Mirzoyan ym. 2010), esimerkiksi ammoniumtyppiyhdisteet hapetetaan nitrifikaatiobakteerien avulla nitriiteiksi ja nitraateiksi, jotka ovat ympäristölle ja kaloille vähemmän haitallisia (Mirzoyan ym. 2010). Vertailemalla kiertovesilaitoksen ja läpivirtauslaitoksen poistovesiä, d’Orbcastel ym. (2009) havaitsivat kiertovesilaitoksen poistoveden sisältävän huomattavasti vähemmän ammonium- ja fosforiyhdisteitä (kuva 1).



Kuva 1. Jätevedestä eristettyjen typpe- ja fosforiyhdisteiden määrät kiertovesilaitoksessa (RAS) ja läpivirtausviljelylaitoksessa, kuva on muodostettu d’Orbcastel ym. (2009) julkaisusta. Sekä kaloille että ympäristölle haitallisen ammoniumtypen määrä on huomattavasti matalampi kiertovesilaitoksen jätevedessä, sillä nitrifikaatiobakteerit muokkaavat sitä nitraatti- ja nitriittitypeksi. Myös fosfaattien määrä on kiertovesiviljelyn jätevedessä vähäisempi kuin läpivirtausviljelyssä. Kuvassa x-akselilla on esitetty jäteveden sisältämä aineen määrä, ja y-akselilla eri yhdisteet.

d’Orbcastel ym. (2009) vertailivat tuotannoiltaan samankokoisia kiertovesilaitosta ja läpivirtauslaitosta. Tutkimuksen läpivirtauslaitos sijaitsi Ranskassa, ja kiertovesiviljelylaitoksen data oli hypoteettista perustuen tanskalaiseen kiertovesiviljelylaitokseen, jonka tuotanto oli skaalattu



yhteneväiseksi läpivirtauslaitoksen kanssa. Läpivirtauslaitos kulutti päivittäin jopa 172 800 kuutiometriä vettä, kun taas kiertovesilaitoksen vedenkulutus päivässä oli 8701 kuutiometriä (d'Orbcastel ym. 2009). Huomattavasti vähäisemmän vedenkulutuksen vuoksi kiertovesilaitokset soveltuvat alueille, joissa veden saatavuudessa on haasteita. Kiertovesikasvatuksen haasteita ovat kuitenkin veden pumppaamisesta ja lämpötilan säätelystä johtuva suuri sähkönkulutus, osaavan ja koulutetun huoltohenkilökunnan tarve sekä vedenpuhdistukseen liittyvät ongelmat, kuten laitteistojen toimintahäiriöt (Badiola ym. 2012).

## 1.1 Virusperäiset kalataudit

Virusperäiset kalojen ja muiden vesieläinten taudit aiheuttavat merkittäviä taloudellisia tappioita vuosittain (Oidtmann ym. 2018). Taudit vaikeuttavat myös tuotannon kasvattamista, sillä kasvatetuissa populaatioissa taudit leviävät tehokkaasti, johtuen populaatiotiheydestä sekä stressaavan kasvatusympäristön immuunipuolustusta heikentävästä vaikutuksesta (Ogut ja Reno 2004). Oidtmann ym. (2018) katsausartikkelissa tarkasteltiin useiden vesiviljelyssä tauteja aiheuttavien virusten infektiivisyyttä ja eri tekijöiden vaikutusta virusten inaktivoitumiseen. Esimerkiksi lämpötilojen nousu ja veden sisältämän orgaanisen aineksen pitoisuuden kasvu olivat tekijöitä, jotka nopeuttivat virusten inaktivoitumista. Toisaalta veden lämpötila ja puhtaus vaikuttavat myös kalojen hyvinvointiin, joten orgaanista ainesta tulee poistaa kasvatusaltaista ja lämpötilan on oltava kalalajille suotuisa (Oidtmann ym. 2018). Tautien aiheuttamat taloudelliset tappiot koostuvat sairastuneiden kalojen lopettamisen ja myyntikelvottomuuden lisäksi laitoksen desinfioinnista ja bioturvallisuuden parantamiseen liittyvistä kuluista (Walker ja Winton 2010). Viljelylaitoksen saneeraus on kuukausia kestävä projekti, jonka aikana uutta kalantuotantoa ei voida käynnistää, mikä on tappiollista aikaa laitokselle. Taloudellisten vaikutusten lisäksi viljelylaitoksissa esiintyvät tartuntataudit vaikuttavat ympäristöön. Verkkoallaskasvatuksessa ja läpivirtauskasvatuksessa kasvatusaltaissa virtaava vesi on suoraan yhteydessä ympäröivään vesistöön, jolloin infektoituneesta kasvattamosta saattaa siirtyä patogeenejä myös ympäristöön. Jos tartuntatauti on paikalliselle kalapopulaatiolle uusi eikä esiinny alueella kotoperäisenä, saattaa tauti aiheuttaa jopa paikallisia sukupuuttoja immuunivasteen puuttuessa (Walker ja Winton, 2010). Paikallisen kalakannan merkittävä pienentyminen taas puolestaan vaikeuttaa petoeläinten ravinnonsaantia, mikä voi aiheuttaa paikallisen lajiston köyhtymistä (Walker ja Winton, 2010).

Tarttuva hematopoiettinen nekroosivirus (eng. *infectious hematopoietic necrosis virus*, IHNV) on useita kalalajeja infektoiva virus, joka kuuluu rhabdovirusiin (Dixon ym. 2016). IHNV on vaipallinen virus, jonka genomi on negatiivista, yksijuosteista RNA:ta (ssRNA, eng. *single-strand RNA*), ja kooltaan noin 11 kb. Negatiivinen RNA tulee kopioida solussa vastinjuosteekseen, jotta se olisi käytettävissä lähetti-RNA:na (positiivinen RNA). Viruksen rakenne on

melko yksinkertainen, sillä se koostuu viidestä rakenneproteiinista sekä polymeraasientsyymistä. IHNV infektoi useita lohikaloja, kuten kirjolohta, jotka ovat taloudellisesti merkittäviä saaliskaloja. IHN:n, tarttuvan vertamuodostavan kudoksen kuolion (eng. *infectious hematopoietic necrosis*), tavallisimmat oireet ovat värinmuutokset nahassa, silmien pullistuminen sekä mustelmat, ja oireista haitallisimpia ovat pistemäiset verenvuodot. IHNV voi levitä useita eri reittejä pitkin, erityisesti vesivälitteisesti laitoksen sisällä sekä viljelylaitoksesta toiseen laitokseen siirtyvien kalojen mukana, mikä on tavallinen syy kalanviljelylaitoksessa tapahtuvaan infektiioon (Dixon ym. 2016). Koska tautia vastaan ei ole hoitoa tai rokotetta, ainoa keino tartuntojen ehkäisemiseksi on kalojen ja mädin säännöllinen testaaminen, erityisesti ennen laitosten välillä tapahtuvaa siirtoa (Yong ym. 2019). IHNV:tä on tavattu Suomessa kalanviljelylaitoksilla kolmesti vuosina 2017-2022, mutta tauti ei ole levinnyt viljelylaitosten ulkopuolelle. Euroopassa IHNV:tä on havaittu erityisesti Saksassa ja Tanskassa vuonna 2021 (EURL 2021).

Kalatiheydellä on havaittu olevan vaikutusta IHNV:n leviämiseen viljelylaitoksessa. Ogut ja Reno (2004) totesivat kalatiheyden olevan verrannollinen infektioiden määrään. Tutkimuksessa testattiin seitsemää eri kalatiheyttä, ja jokaiseen kasvatusaltaaseen lisättiin IHNV:llä infektoitu kala. Tartuntoja todettiin tapahtuneen sitä enemmän, mitä suurempi altaan kalatiheys oli. Alle 0,08 kalan litratiheydessä tartuntoja ei tapahtunut lainkaan. Erojen tartuntojen määrässä arveltiin johtuvan infektoituneiden kalojen läheisemmästä kanssakäymisestä terveiden kalojen kanssa suuren tiheyden altaissa. Lisäksi tiheissä populaatioissa kalojen on havaittu olevan stressaantuneempia kuin väljemmissä populaatioissa, mikä osaltaan lisää infektiotaltiutta (Ogut ja Reno 2004). Tutkimuksessa testatut kalatiheydet olivat huomattavasti normaaleja viljelyolosuhteita pienempiä, sillä kasvatusaltaan kalatiheys saattaa olla jopa 30 kalaa vesilitraa kohden (Ogut ja Reno 2004).

Rhabdovirusiin kuuluva virusperäinen verenvuotoseptikemiavirus VHSV (eng. *viral hemorrhagic septicemia virus*) aiheuttaa virusperäistä verenvuotoseptikemiaa (*viral hemorrhagic septicemia*, VHS), jonka pääasiallisia oireita ovat runsas sisäinen ja ulkoinen verenvuoto (Walker ja Winton 2010). VHSV on IHNV:n tapaan vaipallinen RNA-virus, jonka perimä on yksijuosteista, negatiivista RNA:ta. Virus koostuu viidestä rakenneproteiinista ja polymeraasientsyymistä. VHSV leviää IHNV:tä herkemmin, sillä siinä missä IHNV leviää vesivälitteisesti ja sairaiden kalojen välillä, VHSV voi levitä myös kontaminoituneiden välineiden kautta (Ruokavirasto 2023). VHS aiheuttaa vuosittain kalakuolemia erityisesti kalanviljelylaitoksissa, joissa olosuhteet viruksen leviämiseksi ovat otolliset (Walker ja Winton 2010). VHSV:tä esiintyy villeissä kalapopulaatioissa pohjoisella pallonpuoliskolla, ja myös Suomessa havaintoja on tehty kalanviljelylaitoksilla (Raja-Halli ym. 2006). Raja-Halli ym. (2006) tutkivat suomalaisista verkkoallaskasvattamoista eristettyjen virusten patogeenisyyttä sekä genomien samankaltaisuutta keskenään, ja totesivat virusten olevan todennäköisesti samaa alkuperää. Tutkimuksessa arveltiin virusten päätyneen meren rannikolla sijaitseviin verkkoaltaisiin meriveden

mukana, sillä verkkoaltaat ovat avoimia systeemejä veden virtauksen suhteen (Raja-Halli ym. 2006). VHSV:tä havaittiin Suomessa useita kertoja vuosina 2000-2012, jonka jälkeen ei ole havaittu tapauksia (Ruokavirasto 2023). Vuonna 2021 VHS-tautia havaittiin Euroopassa pääosin Saksassa, mutta myös muualla yksittäisiä tapauksia (EURL 2021).

## 1.2 RT-qPCR ja TaqMan diagnostiikassa

Polymeraasiketjureaktio (eng. PCR, *polymerase chain reaction*) on tehokas tapa monistaa DNA:ta ja RNA:ta (Holland ym. 1991). Monistaminen tapahtuu kohde-DNA:lle suunniteltujen alukkeiden ja polymeraasientsyymien avulla sopivassa lämpötilassa. Reaktion aikana lämpötilaa muutetaan vaiheittain, jolloin ensimmäisessä vaiheessa nukleiinihapon kaksoisjuoste avautuu (denaturaatiovaihe, eng. *denaturation*), minkä jälkeen lämpötilaa lasketaan, jotta alukkeet voivat kiinnittyä mallijuosteeseen (eng. *annealing*). Polymeraasientsyymi kiinnittyy alukkeeseen ja luo mallijuosteen emäsjärjestyksen perusteella vastinjuosteen (pidentymisvaihe, eng. *elongation*). Näitä kolmea vaihetta toistetaan haluttu määrä (Holland ym. 1991). PCR-reaktioissa käytetään termofiilistä bakteerista eristettyjä polymeraaseja, kuten *Thermus aquaticus* -bakteerin polymeraasia (Taq-polymeraasi), jotta entsyymi kestäisi korkeita lämpötiloja (Chien ym. 1976).

Reaktioon voidaan lisätä fluoresoivia reagensseja, jolloin reaktion kulkua pystytään seuraamaan reaaliaikaisesti (qPCR, eng. *quantitative PCR*). TaqMan-koettimet (eng. *probe*) ovat lyhyitä oligonukleotideja, joiden 5'-päässä on fluoresoiva merkki, ja 3'-päässä on fluoresointia estävä liitännäinen (eng. *quencher*). Koetin liittyy mallijuosteeseen alukkeen kiinnittymisvaiheessa. Kun mallijuostetta kopioiva Taq-polymeraasi kohtaa juosteeseen kiinnittyneen koettimen, se irrottaa koettimen ja hajottaa tämän pienempiin osiin, jolloin koettimen 5'- ja 3'-päät eivät vuorovaikuta keskenään ja fluoresenssi ilmenee (Holland ym. 1991). TaqMan-koettimien avulla pystytään havaitsemaan haluttu geenisekvenssi reaktiosta, jonka vuoksi menetelmä soveltuu esimerkiksi virusten havaitsemiseen näytteestä. Koettimen ja alukkeiden tulee olla huolellisesti suunniteltu, jotta ne ovat spesifit tutkittavalle virukselle, ja kuitenkin soveltuvat useimpiin viruksen kantoihin. RT-qPCR:ssä eli kvantitatiivisessa käänteiskopiointi-PCR:ssä (eng. *quantitative reverse transcription-PCR*) reaktioon lisätään käänteiskopiojaentsyymi, jonka avulla RNA muutetaan DNA:ksi, ja DNA:ta käytetään templaattina ajon qPCR-vaiheessa (Wang ja Brown 1999). RT-qPCR:ssä reaktion tulokseksi saadaan  $C_q$ -arvo (eng. *quantification cycle*), joka määrittyy templaattiin sitoutuneiden koettimien aiheuttaman fluoresenssin ylittäessä kynnysarvon.  $C_q$ -arvosta voidaan johtaa standardisuoran avulla reaktiossa olevan templaatin alkupitoisuus ( $SQ$ , eng. *starting quantity*) (Wang ja Brown 1999). RT-qPCR-testejä käytetään monien patogeenien testaukseen: esimerkiksi SARS-CoV-2-testauksessa hyödynnetään RT-qPCR-menetelmää (Dutta ym. 2022). Muihin diagnostiikkamenetelmiin verrattuna RT-qPCR-testi oli herkkä sekä tarkka, mutta vaatii muihin testimenetelmiin verrattuna

enemmän koulutettua henkilökuntaa sekä monia erityisiä laboratoriotarvikkeita (Dutta ym. 2022).

IHNV:tä ja VHSV:tä testataan kalanviljelylaitoksilta säännöllisesti, sekä mahdollisen tautitapauksen ilmetessä (Olesen ym. 2021). Suomessa virusten esiintymistä valvoo Ruokavirasto, ja kasvatustiloja tarkastetaan tietyin määräajoin ja tuontikaloiden tutkimista virusten varalta suositellaan (Ruokavirasto 2022). Pääasiallinen testimuoto on soluviljely, jossa sairastuneen kalan kudoksesta valmistetaan homogeeninen liuos, jota käsitellään antibiooteilla bakteeritautien poissulkemiseksi analyysistä. Lisäksi liuosta käsitellään IPNV-vasta-aineella (tarttuva haimakuolio -virus, eng. *infectious pancreatic necrosis virus*) IPNV-tartunnan poissulkemiseksi, ja varmistetaan taudin olevan joko IHNV:n tai VHSV:n aiheuttama. Soluja kasvatetaan seitsemästä kymmeneen vuorokautta, jonka jälkeen solujen kunto tarkastetaan ja jos merkkejä tartunnasta ei ole, jatketaan kasvattamista. Jos soluissa esiintyy kasvatuksen aikana sytopaattista efektiä, eli solujen pyöristymistä ja irtoamista kasvatusmaljan pohjasta, tarkastetaan efektin aiheuttaja ELISA:n (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*), IFAT:n (epäsuora fluoresenssivasta-ainetesti, eng. *indirect fluorescence antibody test*) tai RT-qPCR:n avulla (Olensen ym. 2021). VHSV:n tunnistamiseen käytettävä RT-qPCR-testi kohdistuu VHSV:n nukleoproteiinia koodaavaan geenin (n-geeni) osaan, genomien nukleotideihin 532-608. IHNV:n testi on myös kohdistettu viruksen nukleoproteiinin geeniin, nukleotideihin 796-893. Yksivaiheista RT-qPCR-protokollaa, jossa käänteiskopiointi suoritetaan samassa ajossa PCR-reaktion kanssa, IHNV-testaukseen on kehitetty (Cuenca ym. 2020) aiemmin käytetyn kaksivaiheisen RT-qPCR-protokollan tilalle, ja EU:n kala- ja äyriäistautien vertailulaboratorio (EURL, eng. *European Union Reference Laboratory for Fish and Crustacean diseases*) suosittaa käyttämään kyseisessä tutkimuksessa kehitettyä protokollaa. EURL esittää myös suositellut alukkeet ja koettimet virusten tunnistamiseen. Soluviljelytesti on esimerkiksi Suomessa ainoa virallisena diagnostisena testinä käytetty menetelmä (Ruokavirasto 2022). Soluviljely on kuitenkin hidas menetelmä, ja testituloksen varmistumiseen saattaa kulua jopa kaksi viikkoa, kun taas suoraan näytteestä tehtävän PCR-testin tulokset voivat valmistua alle vuorokaudessa.

### 1.3 Virusten konsentroiminen vesinäytteestä

Virusten havaitseminen vesinäytteestä voi olla haastavaa, sillä tutkittavien näytteiden otoskoko on usein pieni suhteutettuna systeemin kokoon, eikä tällöin välttämättä kuvaa tutkittavaa systeemiä erityisen hyvin. Lisäksi vesinäytteeseen saattaa päätyä vain yksittäisiä kappaleita tiettyä virusta, minkä vuoksi näytteen konsentroiminen on olennaista. Näytteen konsentroimiseksi vesimassaa voidaan suodattaa erilaisilla menetelmillä, kuten ultrasuodatuksella tai suodattamalla elektronegatiivisen tai -positiivisen kalvon läpi, tutkittavasta partikkelista riippuen (Ahmed ym. 2020). Ahmed ym. (2020) suodattivat viruspartikkeleita jätevesistä ultrasuodatuksella, jonka jälkeen viruksia havainnoitiin RT-qPCR:llä.

Tutkimuksessa verrattiin ultrasuodatusta muihin suodatusmenetelmiin, kuten ultrasentrifugointiin, ja havaittiin ultrasuodatuksen tehokkuuden olevan samaa tasoa tehokkaimpien tutkimuksessa käsiteltyjen menetelmien kanssa. Vertailussa tehokkaimpia olivat suodattimet, joissa haluttu partikkeli sitoutuu elektropositiiviseen tai -negatiiviseen kalvoon, josta se eristetään eluoimalla. Tällaisten suodattimien avulla pystyttiin eristämään vedestä noin 65 prosenttia viruspartikkeleista, kun taas ultrasuodatuksella eristettiin 56 prosenttia viruksista (Ahmed ym. 2020). Grant ym. (2011) testasivat ultrasuodatusta IHNV:lle, ja tutkimuksessa viruksista saatiin eristettyä suodatuksen jälkeen keskimäärin 96 prosenttia, ja konsentroidin avulla viruspitoisuus saatiin keskimäärin 23-kertaiseksi (Grant ym. 2011). Kim ym. (2015) konsentroidivat VHSV:tä vedestä ultrasuodatuksella 100–10000-kertaiseksi pitoisuudeksi. Vaikka ultrasuodatuksessa osa viruspartikkeleista saattaa läpäistä suodattimen sopivasta huokoskoosta huolimatta, konsentroidin kasvattaa pitoisuutta niin paljon alkuperäistä suuremmaksi, että suodattaminen on kannattavaa (Kim ym. 2015, Ahmed ym. 2020).

Tehokkaalla ultrasuodatusmenetelmällä on pystytty havaitsemaan viruksia vesinäytteistä, jossa viruksen pitoisuus on ollut vain kolme partikkelia kymmenessä litrassa vettä (Batts ja Winton 1989). Tässä menetelmässä vesinäyte huuhdotaan ontoista kuiduista koostuvan kalvon läpi, jolloin pienimmät partikkelit, kuten suolat, kulkeutuvat kalvon läpi, ja suuremmat partikkelit jäävät kalvoon kiinni. Kalvoille on määritetty molekyylipainoraja-arvo (MWCO, eng. *molecular-weight cut-off*), jota pienemmät partikkelit huuhtoutuvat suodattimen kuitujen läpi suurempien jäädessä kuituihin kiinni. Suodatinta voidaan tämän jälkeen huuhtoa liuottimella, jolloin halutut partikkelit saadaan eluoitua lähtötilavuutta huomattavasti pienempään tilavuuteen (Cashdollar ja Wymer 2013). Ultrasuodatus on verrattain halpa menetelmä, ja soveltuu erityisen hyvin konsentraatioltaan alhaisten näytteiden käsittelyyn, sillä saman suodattimen läpi voidaan huuhtoa jopa useita satoja, jopa tuhansia litroja vettä (Rhodes ym. 2011).

Polyetyleeniglykoli (PEG) on pitkäketjuinen polymeeri, jonka toistuva osa voi olla tuhansia yksikköjä pitkä. PEG-yhdisteillä on monia käyttötarkoituksia, ja niitä voidaan käyttää myös virusten (Lewis & Metcalf 1988) ja nukleiinihappojen (Lis & Schleif 1975) saostamiseen. PEG muodostaa sentrifugoinnin aikana suodattimen omaisen kalvorakenteen, jonka avulla muodostuva pelletti on stabiili ja neste poistuu pelletistä tehokkaasti. Torii ym. (2022) vertailivat tutkimuksessaan inkubaation pituuden vaikutusta PEG-saostuksen tehokkuuteen ja virusten palautumisasteeseen (eng. *recovery rate*). Konsentroidin kannalta tehokkaimmalta käsittelyltä vaikutti suoraan, ilman inkubaatiota tehty saostus, ja virusten palautumisaste oli myös tällä käsittelyllä hyvä verrattuna muihin inkubaatiopituuksiin (Torii ym. 2022). Tutkimuksessa ilman inkubaatiota tehty konsentroidin jopa yli 60-kertaista näytteen pitoisuuden. PEG-saostuksen on todettu olevan toimiva menetelmä esimerkiksi koronavirus SARS-CoV-2:n leviämisen seurannassa (Zheng ym. 2023). Aiemmin mainitussa vertailututkimuksessa (Ahmed ym. 2020) testattiin myös PEG-saostuksen

konsentroititehokkuutta, ja tutkimuksessa todettiin menetelmän olevan konsentroititehokkuudeltaan neljänneksi paras, eluointimenetelmien ja ultrasuodatuksen jälkeen.

Kylmäkuivauksessa näytteestä poistetaan vettä pakastamalla näyte tyhjiössä, jolloin vesi sublimoituu (Hansen ym. 2015; Merivaara ym. 2021). Kaasumainen vesi pumpataan tyhjiöpumpun kautta pois kammiosta, jolloin näytteeseen jää kaikki kiinteät aineet, kuten virukset ja suolat (Hansen ym. 2015). Kylmäkuivausta käytetään muun muassa virusten säilömiseen, sillä kylmäkuivauksen luonteesta johtuen proteiineja ei tarvitse altistaa korkealle lämpötilalle, joka aiheuttaa proteiinien denaturoitumista (Hansen ym. 2015).

Superabsorboivien polymeerien (eng. *superabsorbent polymers, SAPs*) avulla vesipitoisesta näytteestä voidaan nopeasti poistaa suuria määriä vettä (Xie ym. 2016; Chen ym. 2021). Polymeeristä valmistetaan helmiä, joiden huokoiseen rakenteeseen sitoutuu hydrofiilisten vuorovaikutusten ansiosta vettä. Vesi voidaan poistaa materiaalista esimerkiksi kuumentamalla, minkä ansiosta helmet voivat olla uudelleenkäytettävissä (Xie ym. 2016).

#### 1.4 Tutkimuksen tavoitteet, tutkimuskysymykset ja hypoteesit

Tämän tutkimuksen yleisenä tavoitteena oli mahdollistaa nopea ja tehokas virustestaus kalanviljelylaitoksilla infektioista aiheutuvien tappioiden vähentämiseksi. Tätä tavoitetta lähestyttiin neljän konkreettisen tavoitteen kautta: ensisijainen tavoite oli käyttöönottaa RT-qPCR-protokolla eli standardoitu työskentelyn toimintamalli IHN- ja VHS-virusten tunnistamiseksi vesinäytteestä, ja arvioida menetelmän avulla pienin havaittavissa oleva virusmäärä vesinäytteessä. Työn toinen tavoite oli lisätä menetelmän herkkyyttä erilaisten konsentroitimenetelmien avulla. Kolmas tavoite oli tutkia IHNV-tartunnan vuoksi saneerukseen joutuneen kiertovesiviljelylaitoksen vesinäytteiden viruspitoisuudet. Lopuksi tavoitteena oli arvioida testin soveltumista käytännön taudintorjuntaan kalanviljelylaitoksella. Tutkimuksen tuloksia voidaan mahdollisesti hyödyntää tartuntatautien havaitsemisessa ja leviämisen ehkäisyssä kalanviljelylaitoksissa, sillä nopean ja tehokkaan testimenetelmän avulla laitoksille tuotavat poikaskalat ja mäti voitaisiin tarkastaa IHNV:n ja VHSV:n varalta ennen laitokseen siirtämistä. Kuljetuksen aiheuttama stressi lisää kalojen infektiolttiutta, minkä vuoksi lievä infektio, joka ei ole havaittavissa testeillä, voi puhjeta matkan aikana. Tämän takia kalat ja mäti olisi tarpeen testata myös loppusijoituskohteessa alkukasvatuslaitoksen lisäksi.

Työn tutkimuskysymykset olivat seuraavat: "voidaanko IHN- ja VHS-määritykset tehdä yhdessä RT-qPCR-reaktiossa *multiplex*-RT-qPCR-menetelmällä?" ja "pystytäänkö vesinäytteen konsentroinnilla lisäämään menetelmän herkkyyttä kalanviljelylaitoksella piilevän RNA-virustaudin selvittämiseksi?" Tutkimuskysymyksiin pyrittiin vastaamaan RT-qPCR-menetelmän käyttöönoton ja optimoinnin aikana kerättyjen tulosten avulla sekä konsentroitimenetelmien vertailukokeiden avulla. *Multiplex*-RT-qPCR-menetelmää, jossa yhteen PCR-reaktioon lisätään alukkeet ja koettimet

useamman kohteen tunnistamiseksi, käytetään usein kliinisessä diagnostiikassa positiivisen kontrollin yhdistämiseksi testiin, sekä reagenssien ja työn määrän vähentämiseksi, kun testataan usean patogeenin läsnäoloa näytteestä. Testaamalla kehitettyä protokollaa RAS-laitokselta saatuihin vesinäytteisiin, voitiin tarkastella työssä käyttöön otetun protokollan toimivuutta käytännössä.

Aikaisempien tutkimusten perusteella ultrasuodatus on toimiva menetelmä IHNV:n ja VHSV:n konsentroiduimiseen, vaikka viruspitoisuus näytteessä olisi hyvin alhainen (Batts ja Winton 1989, Kim ym. 2015). Myös PEG-saostus vaikutti etukäteen lupaavalta menetelmältä (Torii ym. 2022, Cheng ym. 2023). Työssä hypoteesina oli, että ultrasuodatus tai PEG-saostus olisivat konsentroidintimenetelmistä tehokkaimmat sekä parhaiten käytäntöön soveltuvat. Kalanviljelylaitoksella, josta vesinäytteet saatiin, todettiin IHNV-tartunta kesällä 2022. Virusta oletettiin löytyvän todennäköisimmin vesinäytteistä, jotka otettiin sairaita kaloja sisältäneistä kasvatusaltaista, ja terveitä kaloja sisältäneissä altaissa virustaakaan arveltiin olevan näitä altaita pienempi. Veden puhdistusaltaissa, kuten denitrifikaatioaltaassa, virusmäärän oletettiin myös olevan pieni, sillä näissä orgaanisen aineksen määrä on muita altaita suurempi, minkä vuoksi viruspartikkelit häviävät näytteestä nopeasti (Oidtmann ym. 2018). Laitoksen tuloveden ei uskottu sisältävän virusta, sillä kyseistä virusta ei esiinny alueella kotoperäisenä.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

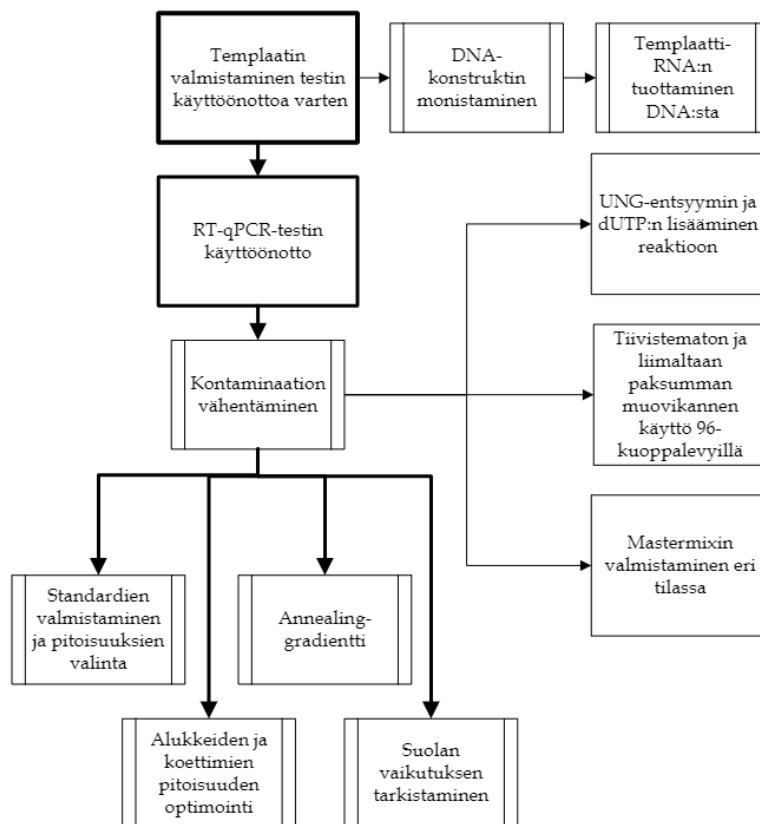
### 2.1 Tutkimusaineisto

Työssä käytettiin kolmenlaista aineistoa: aluksi RT-qPCR-menetelmän optimointiin tuotettiin IHN- ja VHS-virusten RNA:ta tilatuista DNA-konstrukteista, joihin oli liitetty viruksen konservoituneen n-geenin sekvenssi ja sopivat alukesekvenssit (liite 1). Vesinäytteiden konsentroidintimenetelmien vertailuun saatiin puhdasta merivettä Itämerestä IHN-viruksella saastuneen ahvenanmaalaisen RAS-laitoksen läheisyydestä. Tämä näyte (5 l) oli otettu 22.10.2022, ja se lähetettiin Jyväskylään pakasteena. Lisäksi työssä käyttöön otetun RT-qPCR-menetelmän hyödyntämistä IHN-viruksen diagnostiikkaan tutkittiin kyseisestä, Ahvenanmaalla sijaitsevasta RAS-laitoksesta laitoshuoltajan toimesta kerättyjen (9.8.2022) yhdeksän vesinäytteen avulla. Näiden laitospnäytteiden ottopaikat on esitetty taulukossa 1. Kaikki laitospnäytteet otettiin samalla näytteenottimella puhdistamatta sitä välissä. Noin 300 ml:n näytteet säilöttiin 0,33 litran pulloissa -20 °C pakastimessa. Näytteet kuljetettiin Jyväskylään pakastettuina kylmälaukussa, ja ne säilytettiin BSL2-tiloissa (bioturvataso 2, eng. *biosafety level 2*) -20 °C pakastimessa.

Taulukko 1. Vesinäytteet 1–10: kierto-vesiviljelylaitos, Ahvenanmaa, 9.8.2022.

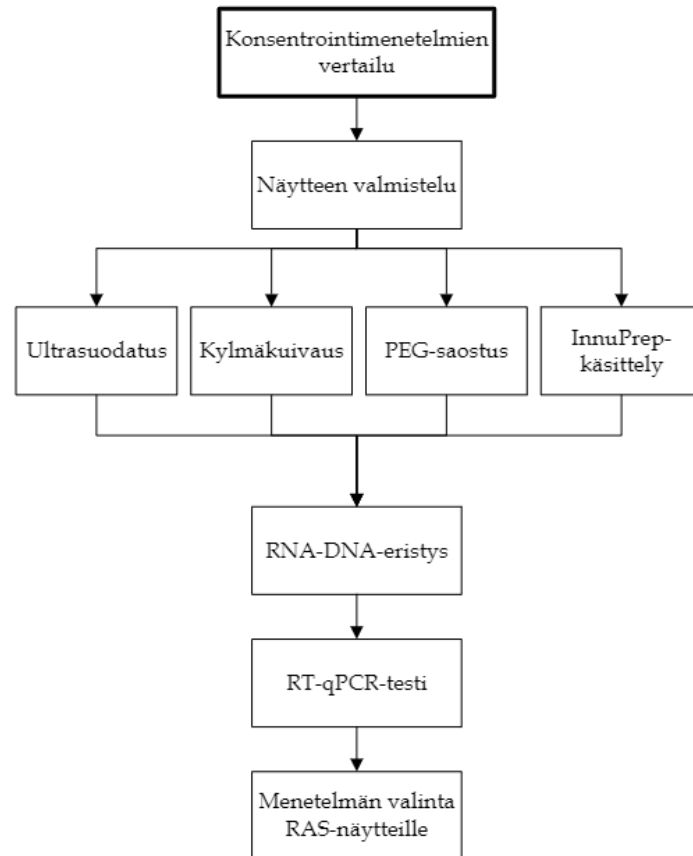
Nro	Näytteenottoaika
1	Kasvatusallas
2	Vedenpuhdistusallas
3	Kasvatusallas
4	Kasvatusallas, josta kalat poistettu aiemmin samana päivänä (hävitysallas)
5	Raikastusallas
6	Raikastusallas
7	Tulovesinäyte
8	Denitrifikaatioallas
9	Denitrifikaatioallas (biofiltteripartikkeli)
10	Flotaatioallas

Virusnäytteiden käsittelyä varten haettiin lupa Ruokavirastolta (liite 2). RAS-laitokselta otettujen vesinäytteiden siirtämiseen Jyväskylään saatiin lupa Ahvenanmaan maakuntahallitukselta (liite 3). Työtä varten työskentelylaboratorio tuli rekisteröidä Ruokavirastoon (liite 4), ja työssä noudatettu tautisuojausjärjestelmä on esitetty liitteessä 5. Työn kokeellisen osuuden vaiheet on esitetty kuvissa 2 ja 3. Kuvassa 2 on esitetty RT-qPCR-testin käyttöönottoon liittyvät työvaiheet, jotka tehtiin oikeanlaisen protokollan varmistamiseksi työssä käytetyille reagensseille. Kuvassa 3 on esitetty konsentrintikokeen vaiheet.



Kuva 2. RT-qPCR-testin käyttöönoton vaiheet, nuolten avulla kuvataan työn etenemisjärjestystä. Kontaminaation vähentämiseen liittyvät vaiheet tuli suorittaa, ennen kuin voitiin jatkaa optimoinnin seuraaviin vaiheisiin.





Kuva 3. Konsentroitimikokeen kulku, nuolten avulla kuvataan työn etenemisjärjestystä.

## 2.2 RT-qPCR-diagnostiikkamenetelmän optimointi ja käyttöönotto

Työssä otettiin käyttöön RT-qPCR-testimenetelmä IHNV:n ja VHSV:n havainnointiin näytteestä. Testin käyttöönottoa varten tuli tehdä kuvassa 2 esitetyt työvaiheet, jotta voitiin varmistua testin olevan toistettava ja luotettava. IHNV:n ja VHSV:n RT-qPCR-diagnostiikkamenetelmän optimointiin käytetyt alukkeet ja koettimet valittiin EURL:n suositteleman ohjeistuksen (Olesen ym. 2021) mukaan, joka nojaa aiempiin tutkimuksiin (Jonstrup ym. 2013, Hoferer ym. 2019, Cuenca ym. 2020). Kalan RNA:n havaitsemiseen käytettiin kalojen  $\beta$ -aktiinin (ns. *housekeeping*-geeni) tunnistavia koettimia ja alukkeita, kohdistettuna geenin nukleotideihin 509–527 (Forward-alue), 552–574 (Reverse-alue) sekä 529–550 (koetin) (NCBI: NM\_001124235). Tämä geenialue on konservoitunut, ja esiintyy soluissa erittäin runsaana. Phi6-faagille käytetyt alukkeet ja koetin tilattiin Gendron ym. (2009) tutkimuksen pohjalta. Kaikkien työssä käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssit on esitetty taulukossa 2. Kaikki alukkeet ja koettimet tilattiin Metabion International AG:ltä (Steinkirchen, Saksa), ja DNA-konstruktit IHNV:lle ja VHSV:lle tilattiin Eurofins Genomics:lta (Ebersberg, Saksa).

Työssä käytettiin koettimissa kolmea eri fluoroforia: IHNV:n koettimessa oli FAM-fluorofori, kalan koettimessa HEX-fluorofori ja VHSV:n ja phi6-faagin

koettimissa käytettiin ROX-fluoroforia. Eri fluoroforeja käyttämällä mahdollistettiin useampien näytteiden diagnosointi samassa RT-qPCR-ajossa (*multiplex*-PCR). Kaikki työn qPCR- ja RT-qPCR-ajot tehtiin C1000 Touch Thermal Cycler -laitteella (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad), ja ajoasetukset säädettiin Bio-Rad CFX Maestro 2.3 -ohjelmistolla (versio 5.3.022. 1030, 2021). Työssä mitattiin DNA:n ja RNA:n konsentraatioita Qubit-laitteella (Qubit 2.0, Life Technologies, Itävalta) laitteen ohjeen mukaisesti, jotta voitiin määrittää templaattina käytettävän liuoksen määrä. PCR:ssä muodostuneen DNA:n konsentraatio ja juosteiden koot tarkastettiin TapeStation-mittauksella (TapeStation 2200, Agilent Technologies) laitteen ohjeen mukaisesti. Tuloksia tarkasteltiin 2200 TapeStation Controller -ohjelmistolla (versio A.02.02(SR1)).

Taulukko 2. Työssä käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssit.

Nimi	Sekvenssi (5' - 3')
IHN Forward -aluke	AGAGCCAAGGCACTGTGCG
IHN Reverse -aluke	TTCTTTGCGGCTTGGTTGA
IHN-koetin	6-FAM-AGCGGGACAGGRATGACAATGGTG-BHQ1
VHS Forward -aluke	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC
VHS Reverse -aluke	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA
VHS-koetin	ROX-TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG-BHQ2
Kala Forward -aluke	CCACCGGTATCGTCATGGA
Kala Reverse -aluke	CGTAGCCCTCGTAGATGGGTACT
Kala-koetin	HEX-TCCGGTGACGGCGTGACCCACA-BHQ1
Phi6 Forward -aluke	TGGCGGCGGTCAAGAGC
Phi6 Reverse -aluke	GGATGATTCTCCAGAAGCTGCTG
Phi6-koetin	ROX-CGGTCGTCGCAGGTCTGACACTCGC-BHQ2
IonA -aluke	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
P1 -aluke	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

RT-qPCR-testin optimoinnissa käytettiin käytännön syistä ja bioturvallisuuden varmistamiseksi virusten sijaan IHN:n ja VHSV:n konservoituneen n-geenin sisältävää RNA:ta, jota tuotettiin tilatusta konstrukti-DNA:sta. Aluksi konstrukti-DNA:ta monistettiin riittävyyden varmistamiseksi käyttäen Maxima SybrGreen Fluorescein qPCR -mastermixiä (K0241, Thermo Scientific, Liettu) taulukossa 3 esitetyllä reaktioseoksella ja taulukossa 4 esitetyillä qPCR-ajoasetuksilla. Monistettu DNA-konstrukti puhdistettiin SparQ-magneettihelmillä (QuantaBio SparQ PureMag) ohjeen mukaan.

Taulukko 3. DNA:n monistaminen Maxima SybrGreen Fluorescein qPCR -mastermixiä käyttäen.

Reagenssi	Konsentraatio reaktiossa
Maxima SybrGreen Fluorescein qPCR (2x)	1x
IonA-aluke (Forward, 10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M
P1-aluke (Reverse, 10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M
Templaatti-DNA (5 ng/ $\mu$ l)	0,2 ng/ $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	10,5 $\mu$ l/reaktio
Reaktion kokonaistilavuus	25 $\mu$ l

Taulukko 4. qPCR-ajoasetukset DNA:n monistuksessa.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Kesto
1. Alkudenaturaatio	95	10 min
Vaiheita 2-5 toistetaan 20 kertaa		
2. Denaturaatio	95	15 s
3. Alukkeiden sitoutuminen	52	30 s
4. Pidentyminen	72	30 s
5. Kuva		

Templaattina käytetyn konstrukti-DNA:n pitoisuus oli ensimmäisessä qPCR:ssä 0,2 ng/ $\mu$ l, mutta odotettua matalamman saannon vuoksi monistettiin DNA:ta uudelleen käyttäen korkeampaa templaattikonsentraatiota (0,5 ng/ $\mu$ l), sekä kunkin alukkeen konsentraationa 0,3  $\mu$ M. Reaktiossa käytettiin samoja ajoasetuksia kuin edellä. Koska parempaa saantoa ei edelleenkään saavutettu, oletettiin että templaatin lisääminen ei paranna saantoa, ja DNA:ta monistettiin uudelleen riittävän DNA-määrän saavuttamiseksi. Reaktiossa templaatin konsentraationa käytettiin 0,12 ng/ $\mu$ l ja alukkeiden konsentraationa oli 0,3  $\mu$ M, jolloin saatiin tuotteeksi templaatin määrään nähden korkeampia pitoisuuksia DNA:ta. Rinnakkaiset reaktiot (4 kpl) yhdistettiin SparQ-puhdistusta varten, jossa käytettiin 1,5 x SparQ-helmiä ja eluointi tehtiin 50  $\mu$ l:aan dH<sub>2</sub>O:ta.

### 2.2.1 RNA-synteesi IHN- ja VHSV-virusten mallinnusta sekä RT-qPCR-standardia varten

Edellisessä kohdassa (kpl 2.2) monistetusta, puhdistetusta DNA-konstruktista tuotettiin IHNV:tä ja VHSV:tä mallintavaa RNA:ta myöhemmin käytettäväksi RT-qPCR-testin optimoinnissa sekä standardisuoran muodostamiseen RT-qPCR-reaktiossa. RNA:ta tuotettiin synteesikitin (E2050S, HiScribe T7 Quick High Yield RNA synthesis Kit, New England Biolabs) avulla kitin ohjeiden mukaisesti. Reagenssit (taulukko 5) sekoitettiin ja inkuboitiin 37 °C:ssa (T100 Thermal Cycler, BioRad) kaksi tuntia. Templaatti-DNA:ta (IHNV tai VHSV) lisättiin reaktioon 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l. Ajon jälkeen tuotetusta RNA:sta poistettiin DNA-jäämät dsDNase-käsittelyllä kitin (dsDNase, #EN0771, Thermo Scientific) ohjeen mukaan (taulukko 6). Liuosta inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa, jonka jälkeen

dsDNase-entsyymi deaktivoitiin 5 minuutin inkubaatiolla 65 °C:ssa. RNA:n pitoisuus liuoksessa mitattiin Qubitilla, jotta työn seuraavissa vaiheissa voitaisiin arvioida RT-qPCR-reaktion kulkua ja tehokkuutta, sekä muodostaa standardit, joiden avulla pystyttäisiin arvioimaan pitoisuudeltaan tuntemattoman näytteen pitoisuutta.

Taulukko 5. RNA-synteesin reagenssit.

Reagenssi	Tilavuus
dH <sub>2</sub> O	6 µl
NTP Buffer Mix (20 mM)	10 µl
Templaatti-DNA (0,5 µg/µl)	2 µl
T7 RNA Polymerase Mix	2 µl
Reaktion kokonaistilavuus	20 µl

Taulukko 6. dsDNase-käsittelyn reagenssit.

Reagenssi	Tilavuus
10x DNase buffer	4 µl
dsDNase	4 µl
RNA	20 µl
dH <sub>2</sub> O	12 µl
Reaktion kokonaistilavuus	40 µl

## 2.2.2 RT-qPCR-menetelmän optimointi

EURL:n protokollasta johdetun, IHNV:n ja VHSV:n havaitsemiseen käytettävän RT-qPCR-menetelmän käyttöönottoa varten protokolla tuli optimoida tässä työssä käytetyn mastermixin ja muiden reagenssien osalta sekä laitteiden toimivuuden varmistamiseksi. Edellisessä vaiheessa tuotettua RNA:ta käytettiin templaattina RT-qPCR-reaktiossa (taulukko 7) käyttäen qScript XLT One-Step RT-qPCR Toughmix:iä (QuantaBio, tilausnro. 95132-02K). RT-qPCR-ajoasetukset on esitetty taulukossa 8. Reaktiossa voitiin käyttää yhden, kahden tai kolmen näytteen alukkeita ja koettimia muuttamalla veden määrää reaktiossa. RNA laimennettiin sopivaan pitoisuuteen ja käytettiin 1–10 µl:aa laimennosta templaattina kokeesta riippuen. Sopiva pitoisuus määritettiin standarditestien pohjalta siten, että kaikilla (IHNV-, VHSV- ja kala-) näytteillä olisi mahdollisimman samankaltainen C<sub>q</sub>-arvo. Standardin ensimmäisen laimennoksen C<sub>q</sub>-arvoksi pyrittiin saamaan noin 20, ja muiden testien templaatin pitoisuus säädettiin olemaan standardien suurimman ja pienimmän pitoisuuden välillä. Tarkalla pitoisuudella ei ole merkitystä, sillä tehtyjen testien tuloksia käsiteltiin kontrolliin verraten.

Reaktioihin lisättiin myös positiiviseksi kontrolliksi kirjoloihen ssRNA:ta (yksijuosteinen RNA) (jatkossa kalan RNA, valmistettu lyysatusta kirjolohesta ennen projektin alkua), jota esiintyisi myös myöhemmin tutkittavissa kalanviljelylaitokselta tehdyissä testeissä, sillä kalanviljelylaitoksella kasvatettiin kirjolohia. Tällöin voitaisiin varmistua reaktion toimivuudesta, vaikka viruksia

ei havaittaisikaan. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa. Myös kahden ja kolmen näytteen kontrollien yhdistämistä samaan reaktioon testattiin, ja todettiin tulosten olevan yksittäin tehtyjä testejä vastaavat, joten jatkettiin yhdistetyillä testeillä (IHNV ja kala, VHSV ja kala tai IHNV, VHSV ja kala samassa reaktiossa). IHNV-templaatin pitoisuus ennen laimentamista oli 3,02 µg/µl, VHSV-templaatin 1,79 µg/µl ja kala-templaatin 2,69 µg/µl, ja näistä varastoliuoksista valmistettiin laimennokset kuhunkin RT-qPCR-testin käyttöönottoon liittyvään testiin sekä standardeihin.

Taulukko 7. RT-qPCR-mastermix. Veden (dH<sub>2</sub>O) ja templaatin määrät vaihtelivat reaktioiden välillä. Reaktion lopputilavuus oli joko 20 tai 50 µl. Alukkeina käytettiin joko IHNV-, VHSV- tai kala-alukkeita, ja vastaavasti koettimina IHNV-, VHSV- tai kala-koettimia (taulukko 2).

Reagenssi	Pitoisuus reaktiossa
qScript (2x)	1x
Forward-aluke (10 µM)	500 nM
Reverse-aluke (10 µM)	500 nM
Koetin (10 µM)	200 nM
dH <sub>2</sub> O	-
Templaatti-RNA	-

Taulukko 8. RT-qPCR-reaktion ajoasetukset.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Kesto
1. RT-reaktio	50	10 min
2. Alkudenaturaatio	95	1 min
Vaiheita 3–5 toistetaan 40 kertaa		
3. Denaturaatio	95	10 s
4. Alukkeiden sitoutuminen ja pidentyminen	60	60 s
5. Kuva		

### 2.2.3 Ristikontaminaation ehkäiseminen UNG-käsittelyllä

Työskentelyn aikana templaattittomien kontrollien (NTC, eng. *no-template control*) havaittiin reagoivan RT-qPCR-reaktion aikana, joten mahdollisia RNA- ja DNA-kontaminaatioiden lähteitä pyrittiin vähentämään valmistamalla RT-qPCR-reaktioiden mastermix:it erillisessä tilassa, josta ei ollut yhteyttä PCR-laitteisiin. Templaattit lisättiin reaktioihin jatkossa vetokaapissa eri tilassa kuin missä mastermix:it valmistettiin. PCR-levyillä käytettiin liimaltaan paksumpia kansia (Thermo Scientific, Adhesive Sealing Sheets, AB-0558), ja käytettiin PCR-ajon aikana tiivistemattoa levyn päällä. RT-qPCR-reaktioon lisättiin urasiili-DNA-glykosylaasi-entsyymiä (UNG, ThermoScientific, REF EN0361, Liettua) sekä urasiilinukleotideja (dNTP/dUTP Mix, R0251, Thermo Scientific, Liettua) (taulukko 9) aiemmista PCR-ajoista aiheutuvan sisäisen kontaminaation vähentämiseksi. UNG hajottaa urasiilia sisältävää DNA:ta (Kleiboeker 2005).

Kun PCR-reaktioihin lisätään dNTP:eiden lisäksi dUTP:tä, joka korvaa PCR-reaktiossa satunnaisesti tyymiinukleotidit, seuraaviin reaktioihin joutuessaan edellisten reaktioiden tuotteet hajoavat entsyymien vaikutuksesta. Näin käsittely vähentää DNA-kontaminaation määrää RT-qPCR:ssä, jossa templaatti on RNA:ta (Kleiboeker 2005). Käsittely ei vaikuta alukkeisiin tai koettimiin, sillä nämä eivät sisällä urasiilia. PCR-ajon alkuun lisättiin UNG-inkubaatio (5 min, 25 °C) käyttäen entsyymien pitoisuudelle ja inkubaatioajalle Agenan SARS-CoV-2-testin protokollaa (REF 13279). Työssä testattiin myös pidempää inkubaatiota korkeammassa lämpötilassa (20 min, 30 °C) (Kleiboeker 2005) verraten lyhyempään inkubaatioon samassa lämpötilassa (5 min, 30 °C), ja tulosten pohjalta valittiin jatkossa käytetty inkubaatiopituus (20 min, 30 °C) (taulukko 10). Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa.

Taulukko 9. Mastermix, jossa UNG ja dUTP mukana. Reaktio voitiin skaalata myös 50 µl:n tilavuuteen.

Tuote	Pitoisuus reaktiossa
qScript (2x)	1x
UNG (5 U/µl)	0,05 U /µl
dUTP (10 mM)	0,5 mM
Forward-aluke (10 µM)	400 nM
Reverse-aluke (10 µM)	400 nM
Koetin (10 µM)	200 nM
Templaatti-RNA	-
dH <sub>2</sub> O	-
Reaktion kokonaistilavuus	20 µl

Taulukko 10. RT-qPCR-reaktion ajoasetukset, lisätty UNG-inkubaatio.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Kesto
1. UNG-inkubaatio	30	20 min
2. RT-reaktio	50	10 min
3. Alkudenaturaatio	95	1 min
Vaiheita 4-7 toistetaan 45 kertaa		
4. Denaturaatio	94	15 s
5. Alukkeiden sitoutuminen	60	40 s
6. Pidentyminen	72	20 s
7. Kuva		

#### 2.2.4 RT-qPCR-menetelmän standardisuurien määrittäminen

RT-qPCR-ajoon muodostettiin standardi, jonka avulla voitaisiin arvioida näytteen sisältämän RNA:n konsentraatiota. Standardit säädettiin siten, että reaktioiden kulku olisi eri näytteillä (IHNV-, VHSV- ja kala-RNA) mahdollisimman samanaikainen käyttäen aluksi templaatin pitoisuutena reaktiossa  $2,50 \times 10^{-1} - 2,50 \times 10^{-6}$  pg/µl. Reaktioiden samanaikaisuuden saavuttamiseksi kokeiltiin näytteille eri konsentraatioita, ja valitut konsentraatiot

on esitetty tuloksissa luvussa 3.1.1. Standardit laimennettiin sarjana veteen laimennettuun PolyA:han ja sen puskuriin (Chemagic Viral DNA/RNA kit, lot 683966), jonka avulla templaatti-RNA:n pitäisi pysyä liuoksessa vapaana laimeissakin pitoisuuksissa tarttumatta muovipintoihin. Testissä käytettiin taulukoissa 9 ja 10 esitettyjä mastermix:iä ja RT-qPCR-asetuksia. Useampien näytteiden (IHNV-, VHSV- ja kala-RNA) alukkeiden ja koettimien käyttöä samassa reaktiossa testattiin (*multiplex*-PCR), sillä haluttiin selvittää, häiritseekö useampien alukkeiden ja koettimien käyttö RT-qPCR-reaktiota. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa.

### 2.2.5 RT-qPCR-menetelmän *annealing*-gradientti

IHNV:lle ja VHSV:lle käytettiin kirjallisuudessa erilaisia lämpötiloja RT-qPCR-ajojen alukkeiden sitoutumisvaiheessa (engl. *annealing*), joten haluttiin tarkastaa, voiko IHNV:n ja VHSV:n RT-qPCR-testien *annealing*-lämpötila olla sama, vai vaikuttaako lämpötila huomattavasti reaktion tehokkuuteen. Tämä oli oleellista erityisesti yhdistetyn RT-qPCR-testin kannalta, sillä jos *annealing*-lämpötilat poikkeaisivat eri näytteillä huomattavasti, reaktioita ei voisi tehdä yhdessä reaktiotehokkuutta heikentämättä. Optimaalisinta alukkeiden sitoutumislämpötilaa testattiin lämpötilagradienttitestillä, jossa PCR-ajossa kaivojen lämpötila vaihteli kaivojen välillä ennalta määrätyllä tavalla. Alukkeiden sitoutumisvaiheen gradientiksi asetettiin 55–65 °C. Testi toistettiin lämpötiloilla 50–60 °C. Testissä käytettiin taulukoissa 9 ja 10 esitettyjä mastermix:iä ja RT-qPCR-asetuksia soveltuvien osin. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa.

### 2.2.6 RT-qPCR-menetelmän aluke- ja koetintestit

Aluke- ja koetinkonsentraatiota muuttamalla pystytään vaikuttamaan reaktion tehokkuuteen. RT-qPCR-testin optimointiin kuului sopivien aluke- ja koetinkonsentraatioiden määrittäminen siten, että reaktion tehokkuus ja kustannukset olisivat optimaaliset. Alukekonsentraation vaikutusta IHNV:n, VHSV:n ja kalan RT-qPCR-reaktioon testattiin seuraavilla konsentraatioilla: 200 nM, 400 nM, 600 nM ja 800 nM. Koettimien optimipitoisuutta testattiin pitoisuuksilla 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM ja 500 nM. Testissä käytettiin taulukoissa 9 ja 10 esitettyjä mastermix:iä ja RT-qPCR-asetuksia, aluke- ja koetinpitoisuutta lukuun ottamatta. Kokeen tulosten pohjalta jatkettiin käyttäen alukkeista 800 nM:n konsentraatiota, ja koettimesta 200 nM:n konsentraatiota. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa molemmissa kokeissa.

### 2.2.7 Veden suolapitoisuuden vaikutus RT-qPCR-menetelmän toimivuuteen

Suolaisen veden vaikutusta reaktioon tarkasteltiin, jotta varmistuttaisiin reaktion toimivan myös suolaa sisältävällä näytteellä. Mikäli PCR-reaktio tehtäisiin vedestä suoraan ilman RNA-eristystä, näytteen suolapitoisuus vastaisi meriveden suolapitoisuutta. RT-qPCR-reaktioon lisättiin suolaa (NaCl, AnalaR

NORMAPUR, VWR chemicals, CAS 7647-14-5) sen RAS-laitoksen, josta työssä käsiteltävät vesinäytteet otettiin, alueen merivettä vastaava pitoisuus (0,7 %). Näytteille tehtiin RT-qPCR-ajo käyttäen kontrollina 0,2 µm sekä suolatonta että asetyyliasetatti-ruiskusuodattimella (0,2 µm, Filtropur, Sarstedt) esisuodatettua näytettä. Testissä käytettiin taulukoissa 9 ja 10 esitettyjä mastermix:iä ja RT-qPCR-asetuksia, muokaten ohjelmia aiempien testien perusteella. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista toistoa.

## 2.3 Eri menetelmien vertailu virusten konsentroiduuteen vesinäytteistä

Yksi työn tavoitteista oli arvioida parasta konsentroiduutimenetelmää vesinäytteen käsittelyyn laitosolosuhteissa, ja tarkastella konsentroiduun vaikutusta RT-qPCR-reaktion herkkyteen. Konsentroiduutimenetelmät valittiin vertailuun ottaen huomioon niiden soveltuvuus mahdolliseen käyttöön kalanviljelylaitoksilla. Lisäksi menetelmien tuli olla melko yksinkertaisia, jottei niiden käyttäminen vaatisi monimutkaisia laitteistoja tai pitkää koulutusta kalanviljelylaitoksen henkilökunnalta. Konsentroiduutikokeisiin käytettävä näyte valmistettiin seuraavasti: sulatettuun meriveteen lisättiin IHNV-RNA:ta  $1 \times 10^{-3}$  pg/µl, VHSV-RNA:ta  $1 \times 10^{-4}$  pg/µl sekä kirjolohen RNA:ta ( $5,51 \times 10^{-2}$  ng/µl). Lisäksi näytteeseen lisättiin kontrolliksi 0,5 ml/l phi6-faagia (Elina Laanto). Faagin konsentraatiosta ei ollut tietoa, eikä sillä ollut merkitystä, koska tuloksia käytettiin suhteellisina. Faagi toimi kokonaisen viruksen mallina, sillä IHNV:stä tai VHSV:stä ei bioturvallisuuden vuoksi voitu käyttää kokonaisia viruksia. Phi6 on vaipallinen faagi, joka infektoi *Pseudomonas*-suvun bakteereja (Aquino de Carvalho ym. 2017). Phi6:n genomi on kaksijuosteista RNA:ta, ja kooltaan noin 13,5 kb (Aquino de Carvalho ym. 2017), ja ominaisuuksiensa puolesta faagi muistuttaa rhabdovirusta niin paljon, että uskottiin faagin sopivan mallintamaan kokonaisen viruksen käyttäytymistä konsentroiduutikokeissa. Edellä valmistettu näyte suodatettiin imusuodattimella (VWR Vacuum Filtration System PES 0,2 µm), ja jaettiin näyte 250 ml:n pulloihin. Näytteet, joita ei jatkokäsitelty heti, pakastettiin (-18 °C).

Näytteille tehtiin seuraavat käsittelyt viruksen (phi6) ja nukleinihappojen (IHNV-, VHSV- ja kala-RNA) konsentroiduutiseksi: ultrasuodatus Amicon-suodattimella, kylmäkuivaus, PEG-saostus sekä InnuPrep-käsittely. Jokaisessa käsittelyssä oli neljä 250 ml:n replikaattia näytteistä, paitsi ultrasuodatuksessa, jossa näytteiden koko oli 15 ml:aa, joka oli ultrasuodattimen täyttökapasiteetti. RT-qPCR-testeissä käytettiin joko IHN- ja VHS-koettimia ja -alukkeita, tai kala- ja phi6-koettimia ja alukkeita. Koska VHS:n ja phi6:n koettimien fluoroforit olivat samat, niitä ei olisi pystytty erottamaan toisistaan yhteisessä RT-qPCR-testissä, eikä näitä kahta koetinta voitu käyttää samassa reaktiossa.

### 2.3.1 Konsentroiduuti ultrasuodatuksella

50 ml:aa suodatettua, pakastettua näytettä sulatettiin ja jaettiin neljään Amicon-ultrasuodattimeen (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Millipore, UFC9010,



10 kDa MWCO) ja sentrifugoitiin 45 minuuttia (4000 g). Suodattimeen jäi noin 200 µl näytettä, joka säilöttiin RNA-DNA-eristystä varten pakastimessa (-18 °C).

### **2.3.2 Konsentroidi kylmäkuivauksella**

Kylmäkuivaus tehtiin Christ LOC-1m -laitteella (B.Braun Biotech International). Näytteinä käytettiin suodatettuja vesinäytteitä (250 ml, 4 kpl). Näytepullojen suut peitettiin parafilmillä, ja näytteitä säilytettiin ennen kuivauksen alkamista -80 °C pakastimessa. Parafilmiin tehtiin muutama reikä ennen kylmäkuivauksen aloittamista. Näytteiden annettiin kuivua noin yhdeksän vuorokauden ajan, jolloin vettä ei vaikuttanut enää olevan jäljellä. Kylmäkuivauksen tuotteena näytepullo sisälsi valkoista kidemäistä ainetta. Näytteisiin lisättiin 15 ml:aa vettä, ja näytteen annettiin liueta välillä sekoitellen. Näytteet suodatettiin ultrasuodattimella (4000 g, 45 min). Suodattimien yläosaan jääneet 200 µl:n näytteet poistettiin ja säilöttiin nukleiinihappoeristystä varten pakastimessa (-18 °C).

### **2.3.3 Konsentroidi PEG-saostuksella**

Ennen PEG-saostusta näytteet (250 ml, 4 kpl) sulatettiin ja suodatettiin imusuodattimilla. PEG-saostus tehtiin PEG-20 000:lla (MERCK-Schuchardt, 8.17018.1000, Lot S35263 210, Saksa). Näytteisiin lisättiin natriumkloridia (1 mol/l) sekä PEG:iä (7 %). Kiinteät aineet liuotettiin magneettisekoituksessa, jonka jälkeen näytteet siirrettiin sentrifugipulloihin ja sentrifugoitiin Sorvall RC 6+-laitteella (30 min, 7300 rpm) käyttäen F12-6X500-roottoria. Supernatantti poistettiin, ja koska pulloihin ei muodostunut havaittavaa pellettiä, oletettiin näytteen sitoutuneen pullon reunaan. Näyte pyrittiin resuspendoimaan yhteen millilitraan vettä pipetoimalla. Pullon reuna käytiin edestakaisin pipetoiden läpi, ja liuos säilöttiin pakastimessa (-18 °C).

Koska pulloihin ei muodostunut näkyvää pellettiä, PEG-koetta toistettiin pidennetyllä sentrifugointiajalla (60 min) ja korkeammalla sentrifugointinopeudella (8400 rpm).

### **2.3.4 Konsentroidi InnuPREP-menetelmällä**

InnuPREP-käsittelyssä käytettiin vettä sitovia InnuPREP-helmiä (InnuPREP TCT Target Concentration Kit Water, IST Innuscreen GmbH, Saksa). Näytteinä käytettiin suodattamatonta näytettä (250 ml, 4 kpl). Näytteisiin lisättiin 5 g InnuPREP-helmiä, inkuboitiin huoneenlämmössä 30 min, lisättiin 2 g helmiä, inkuboitiin 4 tuntia. Siirrettiin vesinäytteet uusiin astioihin ja lisättiin 3 g helmiä, inkuboitiin tunti, lisättiin 2 g helmiä ja inkuboitiin tunti. Lopuksi näyte suodatettiin ruiskusuodattimella, ultrasuodatettiin Amicon Ultra 15 -suodattimilla ja säilöttiin näytteet RNA-DNA-eristystä varten (-18 °C).

### 2.3.5 Konsentroitujen näytteiden RNA-DNA-eristys

Eri menetelmillä, ultrasuodatus (200 µl, 4 kpl), kylmäkuivaus (400 µl, 4 kpl), PEG-saostus (400 µl, 12 kpl) ja InnuPrep-konsentroiduista (400 µl, 4 kpl), konsentroiduista näytteistä eristettiin nukleiinihappoja RNA-DNA-eristyskitillä (Quick-RNA Viral Kit, R1034, Zymo Research) kitin protokollan mukaisesti. Vaikka työssä ei olisi ollut tarvetta eristää DNA:ta, käytetyllä kitillä oli mahdollista eristää suurempia määriä nukleiinihappoja verrattuna vastaavaan, vain RNA:ta eristävään kittiin. Kitin Viral RNA -puskurissa käytettiin ohjeen mukainen määrä 2-merkaptoetanolia (98 %, CAS 60-24-2, Sigma-Aldrich). Eristystuotteille tehtiin RT-qPCR-testi aiemmin muodostetun protokollan (taulukko 9 ja taulukko 10) mukaisesti, käyttäen UNG-inkubaationa 20 minuutin inkubaatiota (30 °C) sekä alukkeiden konsentraatioina 800 nM. Testi tehtiin yhtäaikaaisesti myös konsentroiduilla näytteillä, jotta pystyttäisiin vertamaan konsentroiduista tehokkuutta eri menetelmissä.

## 2.4 Kiertovesiviljelylaitokselta saatujen vesinäytteiden käsittely

RAS-laitokselta saatuja vesinäytteitä 1–8 ja 10 (kts. taulukko 1) konsentroiduista ultrasuodattamalla, eristettiin näytteistä RNA ja DNA sekä tehtiin RT-qPCR-testi seuraavasti: 300 ml:n näytenäytteitä sulatettiin jäällä, kunnes saatiin 30 ml:n näyte sulaa vettä. Loppu näyte pakastettiin uudelleen. Jokainen näyte jaettiin kahteen ultrasuodattimeen ja sentrifugoitiin 45 min (4000g, MEGASTAR 1.6R Centrifuge). Konsentroiduista 200 µl:n näytteistä eristettiin RNA ja tehtiin RT-qPCR-testi käyttäen reaktioissa IHN- ja kala-alukkeita ja -koettimia. Kaikille näytteille RNA-eristys tehtiin myös suoraan konsentroiduista näytteestä. Näytteiden 5 ja 6 havaittiin olevan mahdollisesti positiivisia, mutta signaali oli havaitsemisrajan tuntumassa. Tämän vuoksi näytteiden 5 ja 6 testit uusittiin käyttäen RT-qPCR-reaktiossa vain IHN:n alukkeita ja koetinta, jotta reaktioiden reagenssit kuluisivat ensisijaisesti IHN:n havainnointiin. Näyte 9 ei ollut vesinäyte, joten sitä ei käsitelty työssä.

### 2.4.1 RAS-laitosnäytteiden dsDNase-käsittely RT-qPCR-menetelmän tehokkuuden parantamiseksi

Koska työssä käytetty RNA-DNA-eristyskiti (kts. kpl. 2.3.5) eristi myös DNA:n näytteistä, ja IHN:n perimän tiedettiin olevan RNA:ta, poistettiin eristetty DNA näytteistä 5 ja 6 (raikastusaltat) dsDNase-käsittelyllä. Tällöin näytteeseen jäisi havaittavaksi vain RNA:ta. Käsittelyllä pyrittiin parantamaan RT-qPCR-testin detektioherkkyyttä ja vähentämään kilpailua reagensseista reaktiossa. dsDNase-käsittely tehtiin aiemmalla kitillä (dsDNase, #EN0771, Thermo Scientific) ohjeen mukaan (taulukko 6). Testattiin myös dsDNase:n lisäämistä suoraan RT-qPCR-reaktioliuokseen, jolloin ensisijaisesti oletettiin toimivan yhtäaikaaisesti UNG-entsyymin kanssa samassa inkubaatiossa, eikä näin ollen ollut tarpeen lisätä erillistä inkubaatiota. Koska käytetyt alukkeet ja koettimet olivat yksijuosteista DNA:ta, oletettiin ettei dsDNase-käsittely vaikuttaisi niiden toimintaan.

## 2.5 RT-qPCR-aineiston käsittely

Työn aikana saatu aineisto käsiteltiin Bio-Rad CFX Maestro 2.3 -ohjelmistolla (versio 5.3.022. 1030, 2021). Saatuun dataan asetettiin  $C_q$ -arvon kynnysarvo (engl. *threshold*) mm. NTC-kaivojen perusteella. Kynnysarvoksi asetettiin suurimmalle osalle näytteitä noin 100 RFU, mutta näytteestä riippuen arvoa saatettiin säätää vastaamaan paremmin muita näytteitä. Standardien perusteella muodostettiin standardisuora, jonka yhtälön avulla laskettiin RNA:n alkupitoisuus. RT-qPCR-reaktioiden tehokkuudeksi oletettiin 100 %, sillä standardisuurien mukaan reaktion tehokkuus oli suurempaa kuin 100 % kaikilla näytteillä. Näytteiden vertailuun käytetty  $\Delta SQ$ -arvo laskettiin näytteille kaavan 1 mukaan:

$$\Delta SQ = 2^{(C_{q\text{kontrolli}} - C_{q\text{näyte}})} \times 100 \% \quad (1),$$

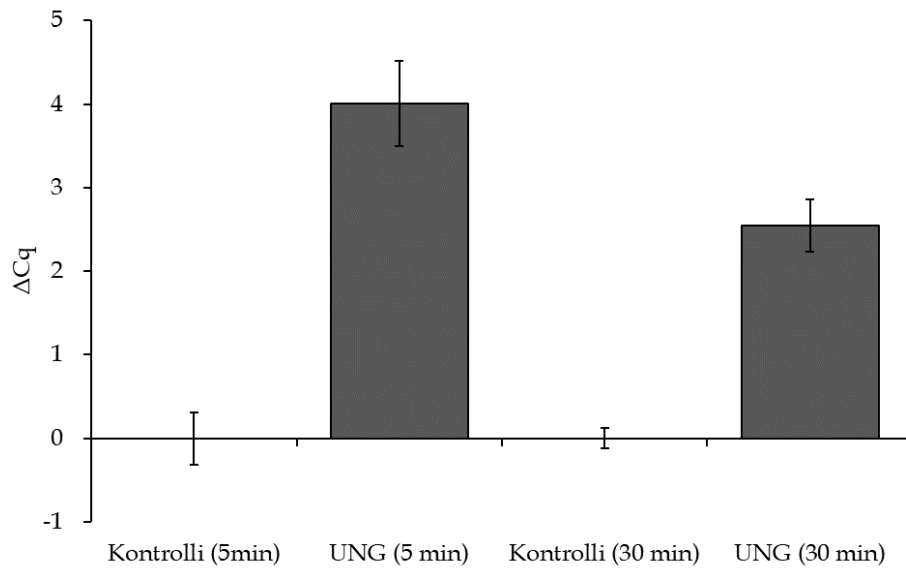
jossa  $\Delta SQ$  kuvaa konsentraation suhteellista muutosta käsittelyjen välillä,  $C_{q\text{kontrolli}}$  on kontrollireaktion  $C_q$ -arvo ja  $C_{q\text{näyte}}$  on käsittelyn  $C_q$ -arvo. Tulosten merkitsevyyttä tarkasteltiin kaksisuuntaisella t-testillä (Excel, versio 2307, 16.0.16626.20170). Tuloksia pidettiin tilastollisesti merkitseväinä, jos p-arvo  $< 0,1$ , ja erittäin merkitseväinä, jos p-arvo  $< 0,05$ .

## 3 TULOKSET

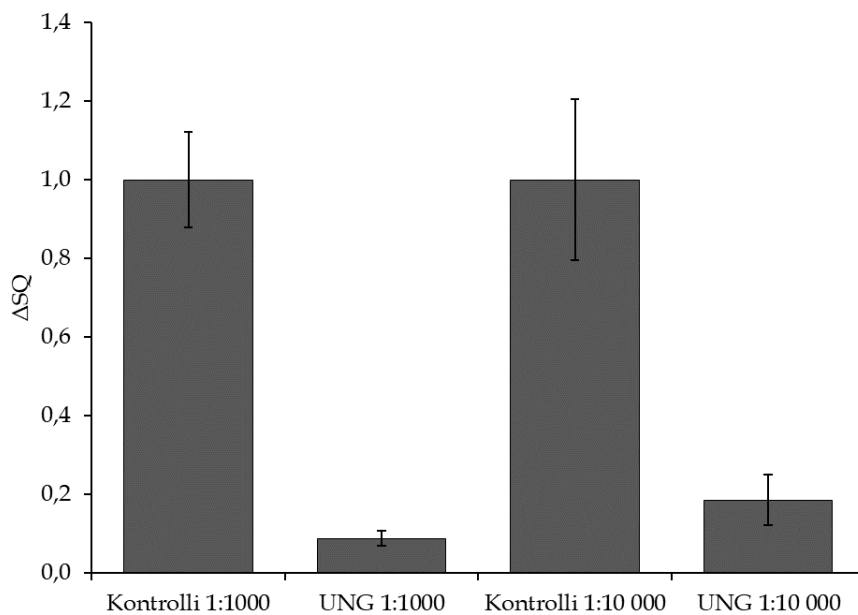
### 3.1 RT-qPCR-protokollan optimointi

RT-qPCR-testin protokollan optimointiin kuului ristikontaminaation vähentäminen UNG-entsyymien avulla ja sopivan inkubaation lisääminen reaktion alkuun, standardien muodostaminen, koettimien ja alukkeiden sopivien pitoisuuksien tarkistaminen sekä alukkeiden sitoutumislämpötilan tarkistaminen.

Sisäistä kontaminaatiota onnistuttiin vähentämään UNG-entsyymien avulla. UNG-entsyymien havaittiin toimivan paremmin 5 minuutin (30 °C) inkubaatioajalla reaktion alussa (kuva 4) kuin 30 minuutin inkubaatiolla, kun molemmat suhteutettiin ilman UNG:tä tehtyihin reaktioihin. Lyhyempi inkubaatio hidasti reaktiota  $4,0 \pm 0,31$  sykliä, kun taas pidempi inkubaatio  $2,6 \pm 0,31$  sykliä. UNG-käsittely vähensi templaatin määrää reaktiossa  $81 \% \pm 6 \%$  (p-arvo = 0,0008), kun dUTP:tä sisältänyt PCR-templaatti oli laimennettu 1:10 000, ja  $91 \% \pm 1,9 \%$ , kun templaatti oli laimennettu 1:1000 (p-arvo = 0,000001) (kuva 5). Molemmilla inkubaatioajoilla reaktio hidastui verrattuna käsittelemättömään näytteeseen, mikä osoittaa käsittelyn vähentävän aiemmista PCR-reaktioista siirtyvän, urasiilia sisältävän DNA:n aiheuttamia reaktioita näytteissä.



Kuva 4. Inkubaatioajan vaikutus UNG-entsyymin toimintaan. Lyhyempi inkubaatio hidasti reaktiota noin 1,5 sykliä enemmän pidempään inkubaatioon verrattuna, kun näyte sisälsi dUTP:tä. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla  $C_q$ -arvon muutos UNG-käsittelyllä verrattuna kontrolliin. Kaikilla näytteillä  $n = 6$ . Pystyviiva kuvaa näytteen keskivirhettä.



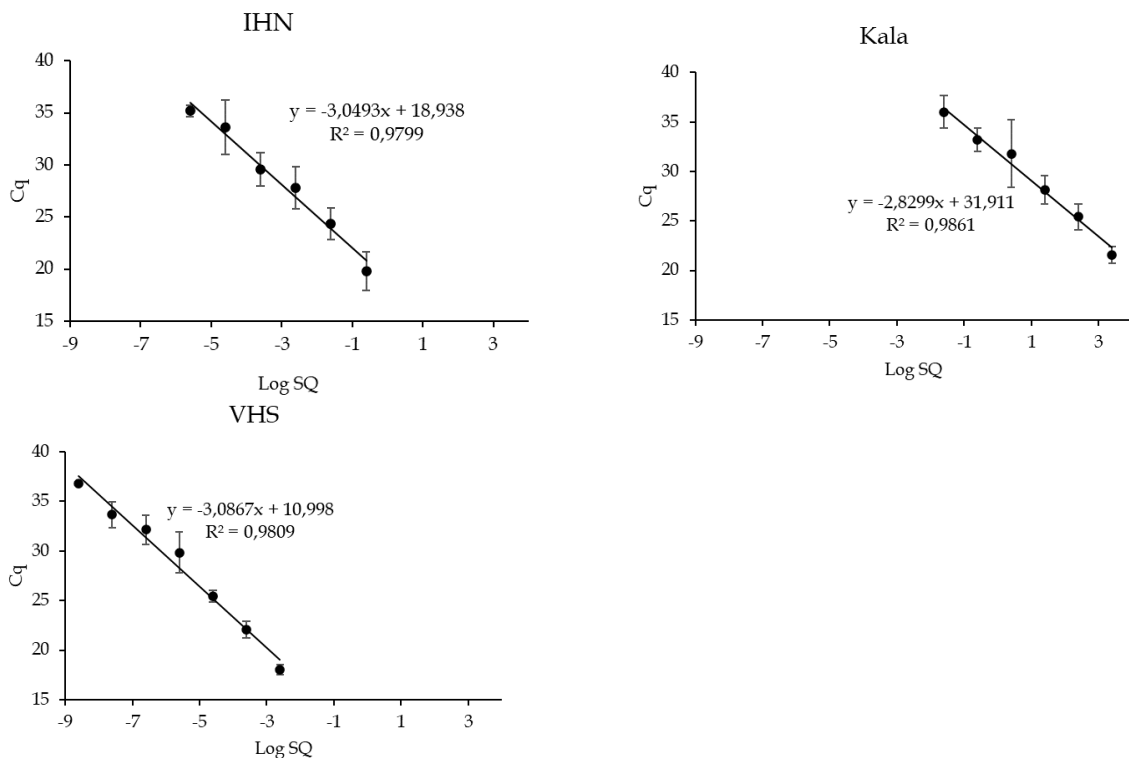
Kuva 5. UNG:n vaikutus laimennettuun PCR-tuotteeseen. Templaatin konsentraatio vaikutti UNG-entsyymin tehokkuuteen reaktiossa, mutta erittäin laimeallakin (1:10 000) näytteellä entsyymi vähensi reaktion tehokkuutta. Kontrollina reaktiossa oli näyte, johon ei lisätty UNG-entsyymiä. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet ja templaatin laimennokset, ja y-akselilla konsentraation suhteellinen muutos. Kaikille näytteille  $n = 9$ . Pystyviiva kuvaa näytteen keskivirhettä.

### 3.1.1 Standardointi sekä aluke- ja koetinkonsentraatioiden optimointi

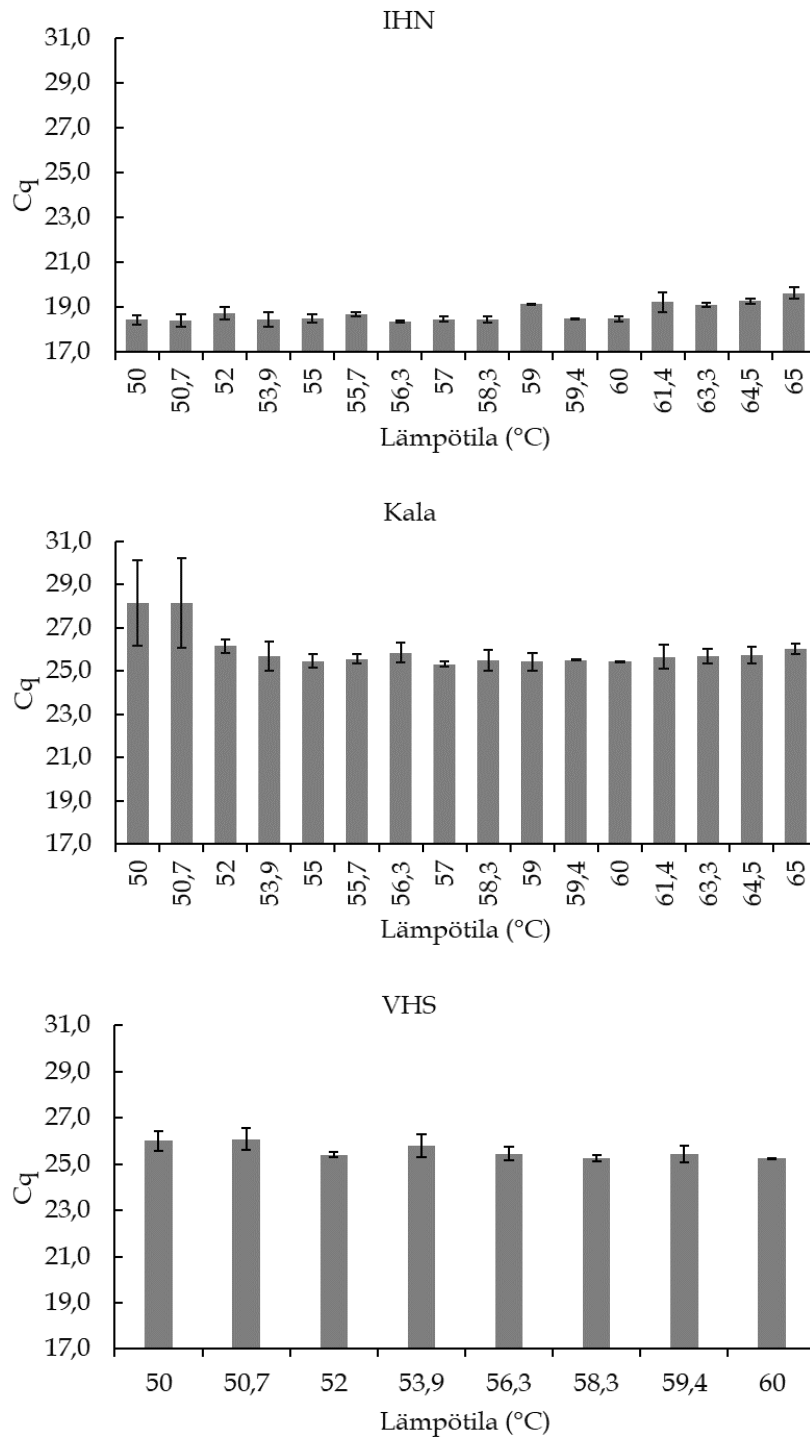
Standardeihin sopiviksi pitoisuuksiksi havaittiin taulukossa 11 esitetyt pitoisuudet, joilla RT-qPCR-reaktiot olivat melko yhdenaikaiset eli  $C_q$ -käyrät leikkasivat *threshold*-tasoa melko yhtäaikaaisesti. Standardien avulla muodostettiin standardisuorat, joiden yhtälöt kullekin fluoroforille on esitetty kuvassa 6. Koska VHS:n ja phi6:n havainnointiin käytettiin samaa fluoroforia, ja phi6-faagin tuloksia käsiteltiin vain suhteellisina osuuksina, phi6:lle ei muodostettu omaa standardisuoraa, vaan konsentraatiomuutoksia tulkittiin VHS:n standardisuoran avulla. Yhdistettyjen testien (*multiplex*-PCR) tulokset eivät poikenneet yksittäin tehtyjen testien tuloksista. Alukkeiden sitoutumislämpötilaksi (kuva 7) valittiin lämpötila 58 °C RT-qPCR-testin tulosten ja aiempien tutkimusten pohjalta (Jonstrup ym. 2013, Hoferer ym. 2019), sillä tuloksissa ei ollut merkitseviä eroja.

Taulukko 11. Standardeihin valitut konsentraatiot. S1 on sarjan ensimmäinen laimennos (standardi 1), ja näytteet laimennettiin sarjana 1:10.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Yksikkö
IHN	$2,50 \times 10^{-1}$	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-6}$	pg/ $\mu$ l
VHS	$2,50 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^{-7}$	pg/ $\mu$ l
Kala	$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^2$	$2,50 \times 10^1$	2,50	$2,50 \times 10^{-1}$	$2,50 \times 10^{-2}$	pg/ $\mu$ l

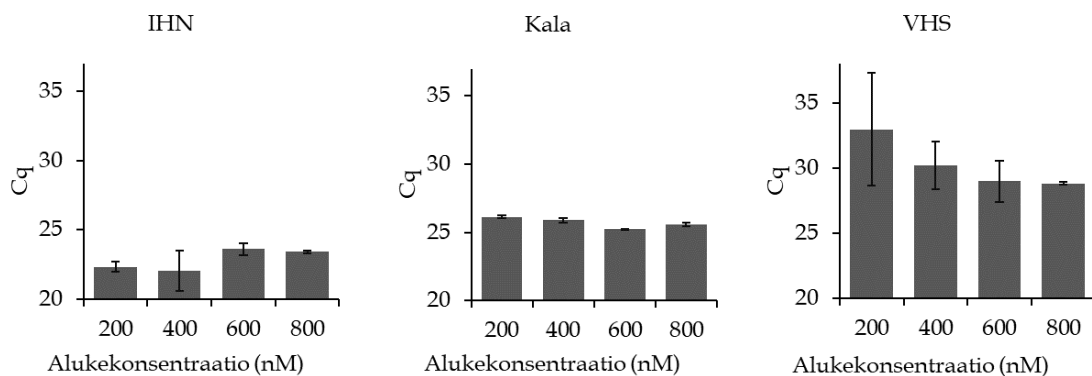


Kuva 6. Standardisuorat kullekin fluoroforille. IHN:n havainnointiin käytettiin FAM-fluoroforia, kalalle HEX-fluoroforia ja VHS:lle sekä phi6:lle ROX-fluoroforia. Standardisuoran yhtälö ja  $R^2$ -arvo on esitetty kunkin kuvaajan rinnalla. Kuvaajassa x-akselilla on näytteen konsentraatio 10-kantaisena logaritmina, ja y-akselilla  $C_q$ -arvo.  $n = 3$ , paitsi IHN S6  $n = 2$  ja VHS S6  $n = 1$ . Pystyviiva kuvaa hajontaa replikaattien välillä.

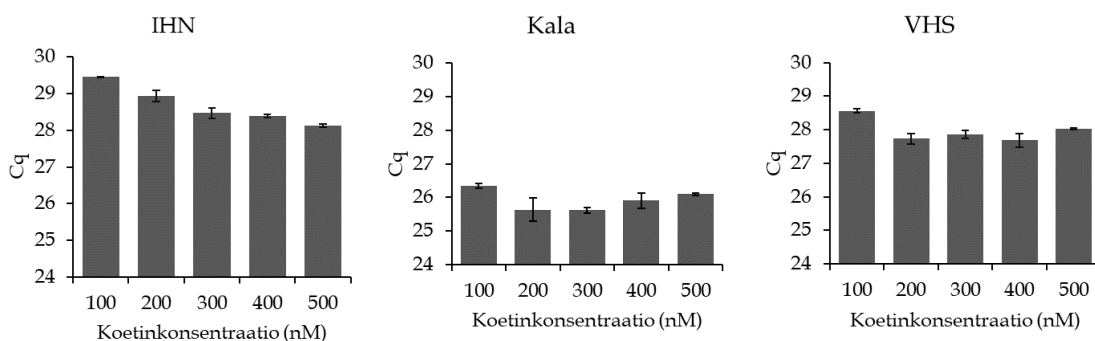


Kuva 7. Annealing-gradienttitesti. Gradientin eri lämpötilojen välillä ei havaittu suurta eroa  $C_q$ -arvoissa millään näytteellä ( $n = 2$ ). IHN:n gradientilla suurimmat lämpötilat hidastivat reaktiota. Kalan gradienttitestissä lämpötilat 50 °C ja 50,7 °C olivat muita lämpötiloja heikommalla reaktion tehokkuuden kannalta. Kuvaajassa x-akselilla on gradientin lämpötila, ja y-akselilla  $C_q$ -arvo. Pystyviiva kuvaa keskihajontaa replikaattien välillä.

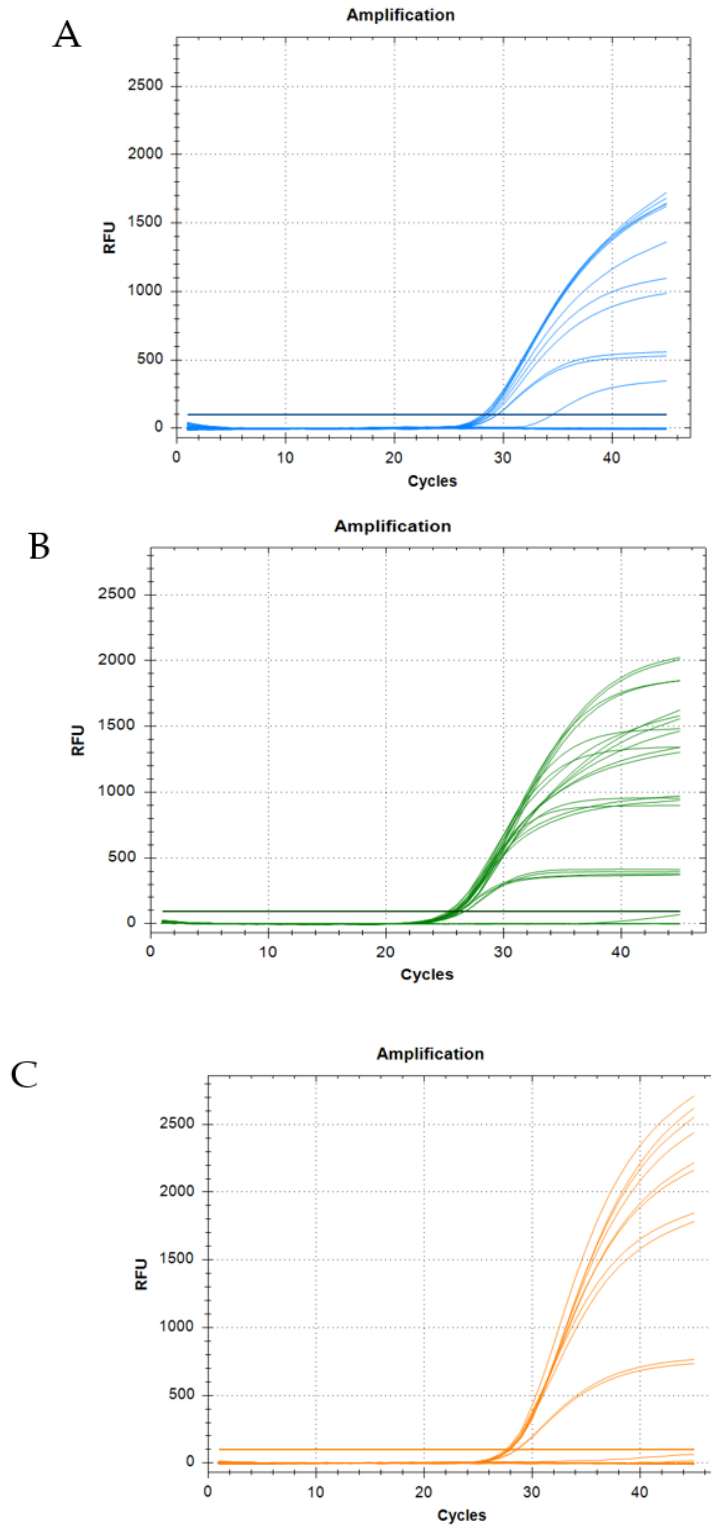
Aluke- (kuva 8) ja koetinkonsentraation (kuva 9 ja kuva 10) vaikutusta RT-qPCR-reaktion tehokkuuteen testattiin, jotta voitaisiin optimoida reagenssien määrä ja reaktion tehokkuus. Alukkeiden konsentraatioksi valittiin kokeen perusteella 800 nM, sillä erityisesti VHS-näytteellä alukekonsentraation nostaminen paransi reaktion tehokkuutta, eli pienensi  $C_q$ -arvoa. Koetinkonsentraation pienentäminen olisi heikentänyt reaktion tehokkuutta, mutta suurempien konsentraatioiden välillä ei havaittu merkittävää eroa, joten jatkettiin lähdeartikkeleissa (Jonstrup ym. 2013, Hoferer ym. 2019) käytetyllä konsentraatiolla (200 nM). Koettimen pitoisuuden muutokset vaikuttivat enemmän reaktion RFU-arvoon (kuva 10), joka ei ollut tämän tutkimuksen kannalta oleellista.



Kuva 8. Alukekonsentraatioiden testaaminen. IHN:n testissä vaihtelu oli suurta, ja pitoisuuden kasvattaminen vaikutti hidastavan reaktiota. Kalan RNA:n testissä 600 nM:n pitoisuudella reaktio oli tehokkain. VHS:n testissä 200 nM:n konsentraatio oli heikoin, mutta suuremmilla pitoisuuksilla tulokset pysyivät keskenään samankaltaisina. Erot eri konsentraatioiden välillä olivat kuitenkin pieniä. Kuvaajassa x-akselilla on alukekonsentraatiot, ja y-akselilla  $C_q$ -arvo. IHN ja VHS:  $n = 2$ . Kala:  $n = 4$ . Pystyviiva kuvaa keskihajontaa replikaattien välillä.



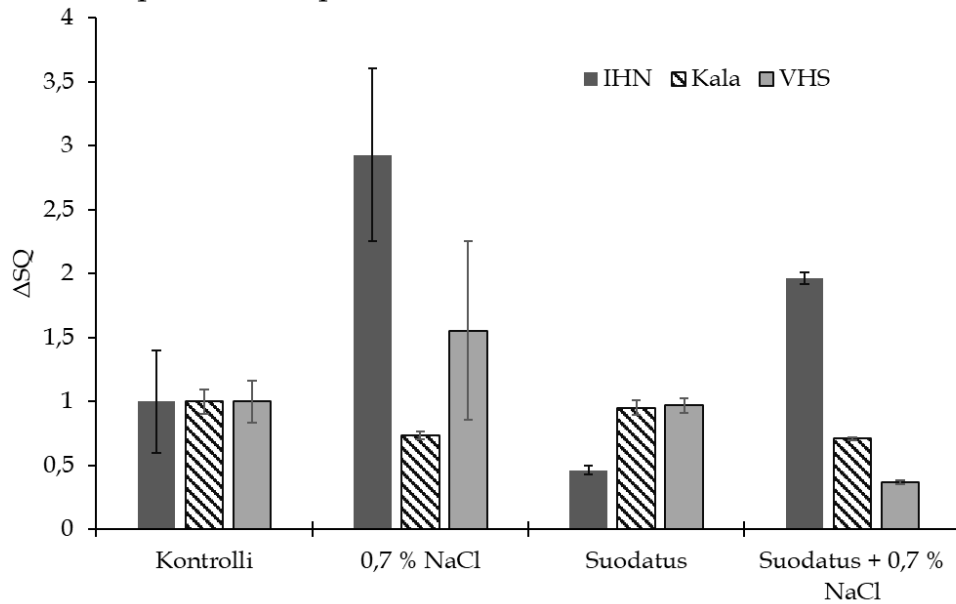
Kuva 9. Koetinkonsentraatioiden testaaminen. Pienempi pitoisuus kuin 200 nM heikensi tuloksia kaikilla näytteillä, eikä konsentraation suurentaminen kasvattanut reaktion tehokkuutta huomattavasti. Kuvaajassa x-akselilla on koetinkonsentraatiot, ja y-akselilla  $C_q$ -arvo. IHN ja VHS:  $n = 2$ . Kala:  $n = 4$ . Pystyviiva kuvaa keskihajontaa replikaattien välillä.



Kuva 10. Koetinkonsentraatioiden testaus - RT-qPCR-aineisto. Koettimen pitoisuus ei juurikaan vaikuttanut  $C_q$ -arvoon, vaan ennemminkin RFU-arvoon: pienemmillä koetinkonsentraatioilla RFU-arvo oli pienempi. Tulokset olivat samanlaiset kaikilla näytteillä. Kuvat A) IHN (n = 2), B) kala (n = 4), C) VHS (n = 2). Kuvaajissa x-akseleilla ovat RFU-arvot, ja y-akseleilla syklien määrät.



Näytteiden suolapitoisuuden muuttamista Itämeren suolapitoisuutta vastaavaksi testattiin, jotta voitaisiin selvittää, vaikuttaako tämä reaktion tehokkuuteen. Suolan lisääminen reaktioon lisäsi vaihtelua näytteiden välillä sekä suodattamattomissa että suodatetuissa näytteissä. IHN-näytteisiin suolalla oli herkkyyttä lisäävä vaikutus, ja templaatin määrä reaktiossa oli jopa kolminkertainen käsittelemättömään näytteeseen verrattuna (kuva 11). Suodatetun, suolaa sisältäneen VHS-näytteen konsentraatiomuutos oli merkitsevä ( $p$ -arvo = 0,02) verrattuna käsittelemättömään näytteeseen, muilla käsittelyillä tai näytteillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta. Suodattaminen pienensi templaatin määrää reaktiossa keskimäärin 20 %.

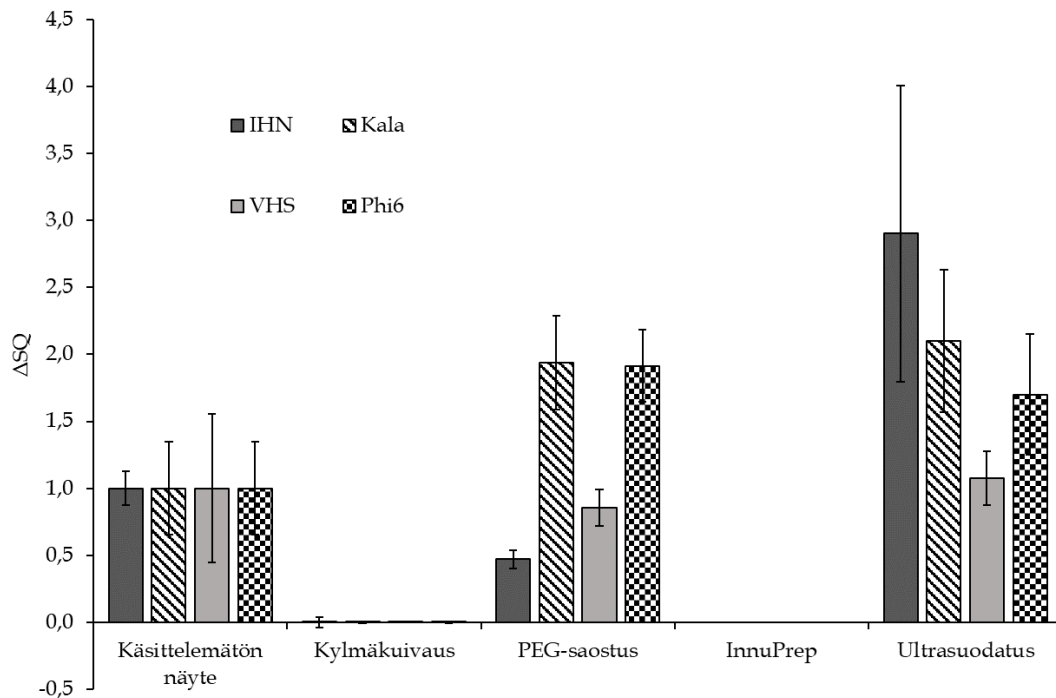


Kuva 11. Suodatuksen ja suolan lisäämisen vaikutus RT-qPCR-reaktioon. Tulokset suhteutettiin käsittelemättömään näytteeseen (kontrolli). Suola reaktiossa lisäsi vaihtelua näytteiden välillä, ja suodattaminen vaikutti hidastavan reaktiota. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla konsentraation suhteellinen muutos. IHN ja VHS:  $n = 2$ . Kala:  $n = 4$ . Pystyviiva kuvaa replikaattien keskivirhettä.

### 3.2 Konsentroidintimenetelmien vertailu ja vaikutus RT-qPCR-menetelmän herkkyuden parantamiseen

Testattiin neljää eri menetelmää virusten ( $\phi$ 6) ja RNA:n (IHNV, VHSV ja kala) konsentroidintiin. Konsentroidinnilla oli kaksi tarkoitusta: tilavuudeltaan suuren vesinäytteen tilavuuden pienentäminen, jotta näytteestä saataisiin mahdollisimman suuri osa RT-qPCR-reaktion templaatiksi, sekä näytteen virus- tai RNA-konsentraation kasvattaminen siten, että näytteestä voitaisiin luotettavasti arvioida RNA:n konsentraatiota. RT-qPCR-testien tulosten perusteella konsentroidintimenetelmistä kylmäkuivaus pienensi konsentraatiota keskimäärin  $100 \% \pm 1,02 \%$  verrattuna käsittelemättömään näytteeseen, InnuPrep-käsittelyn jälkeen näytteestä ei havaittu RNA:ta tai  $\phi$ 6-faagia. PEG-käsittelyn jälkeen näytteen konsentraatio kasvoi kala-näytteellä  $94 \% \pm 35 \%$ , ja  $\phi$ 6-näytteellä  $91 \% \pm 27 \%$ , kun taas IHNV-näytteiden konsentraatio laski  $53 \%$

$\pm 6,6$  % sekä VHSV-näytteiden  $15 \pm 14$  %. Ultrasuodatuksen avulla kaikkien näytteiden konsentraatio kasvoi keskimäärin  $94 \pm 57$  % (kuva 12), ja ultrasuodatus oli menetelmistä ainoa, jolla kaikkien näytteiden konsentraatio kasvoi. Kylmäkuivatut näytteet erosivat merkitsevästi käsittelemättömistä (IHN, kala ja phi6: p-arvo  $< 0,05$ , VHS: p-arvo  $< 0,1$ ), ja lisäksi IHN:n PEG-saostus erosi merkitsevästi (p-arvo =  $0,03$ ) käsittelemättömästä näytteestä. Kaikissa käsittelemättömistä näytteistä tilastollisesti merkitsevästi eronneissa näytteissä konsentraatio pieneni. Pidennetyn PEG-käsittelyn tulokset eivät eronneet lyhyemmän käsittelyn tuloksista, joten käsittelyiden tulokset yhdistettiin.



Kuva 12. Konsentroidintikokeen tulokset.  $C_q$ -arvot suhteutettiin käsittelemättömän näytteen tuloksiin. Kylmäkuivaus hidasti reaktiota kaikilla näytteillä, ja PEG-saostuksella ja ultrasuodatuksella näytteen konsentraatio kasvoi osalla näytteistä. InnuPrep-käsittelyssä näytteistä ei havaittu eristettyä RNA:ta. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla konsentraation suhteellinen muutos. Käsittelemätön näyte:  $n = 3$  (IHN, kala, VHS ja phi6), kylmäkuivaus:  $n = 4$  (IHN),  $n = 3$  (kala ja phi6),  $n = 1$  (VHS), PEG-saostus:  $n = 12$  (IHN, kala, VHS ja phi6), InnuPrep:  $n = 4$  (IHN, kala, VHS ja phi6) ja ultrasuodatus:  $n = 4$  (kala, VHS ja phi6),  $n = 3$  (IHN). Pystyviiva kuvaa replikaattien keskivirhettä.

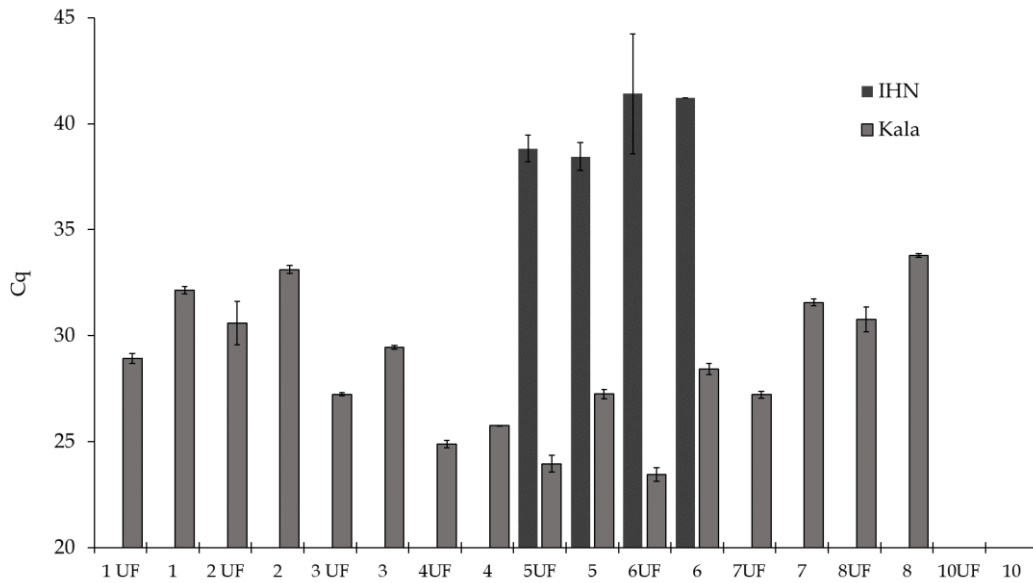
### 3.3 RAS-laitoksen vesinäytteiden analysointi IHNV-tartunnan varalta RT-qPCR-testillä

Työssä optimoidun RT-qPCR-protokollan toimivuutta testattiin IHNV:llä infektoituneelta RAS-laitokselta kerätyille vesinäytteille. RAS-laitokselta saatuja vesinäytteitä 1–8 ja 10 (kts. taulukko 1) konsentroidtiin ultrasuodatuksella, ja havaittiin näytteiden 5 ja 6 (raikastusaltaat) olevan mahdollisesti positiivisia, mutta  $C_q$ -arvo oli yli 35 (kuva 13). Näytteellä 5 konsentroidun näytteen ( $n = 4$ )  $C_q$ -arvo oli  $38,8 \pm 0,6$ , ja näytteellä 6 ( $n = 4$ )  $41,4 \pm 2,8$ . Konsentroidimattomilla

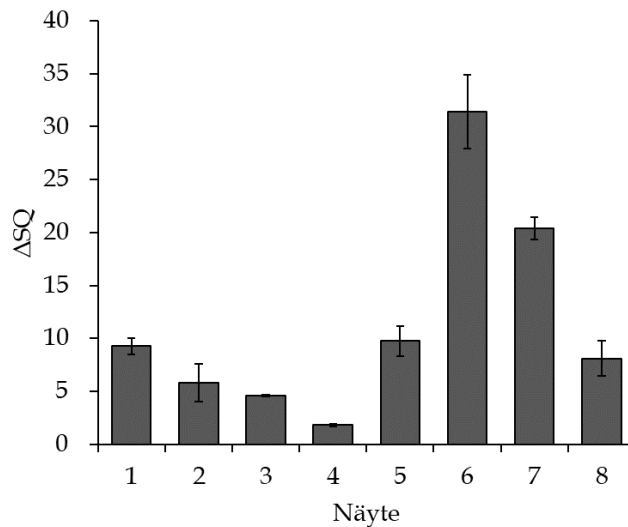
näytteillä näytteen 5 (n = 2) C<sub>q</sub>-arvo oli 38,5 ± 0,6, ja näytteen 6 (n = 1) 41,2. Kyseiset näytteet pysyivät uudelleen testatessa positiivisina, joten kyse ei todennäköisesti ollut kontaminaatiosta. RT-qPCR-testissä, jossa oli vain IHN-alukkeet ja koetin, näytteen 5 (n = 1) C<sub>q</sub>-arvo oli 36,9 ja näytteen 6 (n = 2) C<sub>q</sub>-arvo oli 35,9 ± 0,7, eli poistamalla muut kuin IHNV:n alukkeet ja koetin reaktioseoksesta, reaktion herkkyyttä pystyttiin parantamaan jopa viidellä syklillä.

Näytteistä pystyttiin myös arvioimaan ultrasuodatuksen tehokkuutta kalan RNA:n kautta, ja havaittiin menetelmän konsentroidun näytettä keskimäärin 11-kertaiseksi (± 9,8) (kuva 14). Ultrasuodatus vaikutti toimivalta konsentroidintimenetelmältä, sillä ero ultrasuodatetun ja käsittelemättömän näytteen konsentraatiossa oli erittäin merkitsevä (p-arvo < 0,05) näytteillä 1 ja 3–8. Verrattuna teoreettiseen konsentroitumiseen, jolloin näytteestä ei häviä RNA:ta missään työn vaiheessa, ultrasuodatuksen konsentroidintehokkuus oli tässä kokeessa 49 % ± 17 %. Näytteellä 2 (vedenpuhdistusallas) ero konsentroidun ja konsentroidimattoman näytteen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä, ja näytteestä 10 (flotaatioallas) ei havaittu kalan tai IHN:n RNA:ta.

Yhden RT-qPCR-reaktiossa monistuvan DNA-konstruktista muodostetun IHN-juosteen teoreettinen massa on  $5,33 \times 10^{-8}$  pg. Oletettiin DNA-konstruktista monistuvan juosteen olevan melko samankokoinen kokonaisuudesta viruksesta monistuvan juosteen kanssa. Tämän tiedon ja IHN:n standardisuoran yhtälöllä lasketun konsentraation avulla voitiin arvioida IHN-virusgenomien määrää näytteessä. Näin laskettuna näytteestä 5 havaittiin 11,5 virusgenomia (± 5,9) ja näytteestä 6 3,1 virusgenomia (± 4,1), jossa vaihtelu kahden näytteen välillä oli huomattavan suurta.



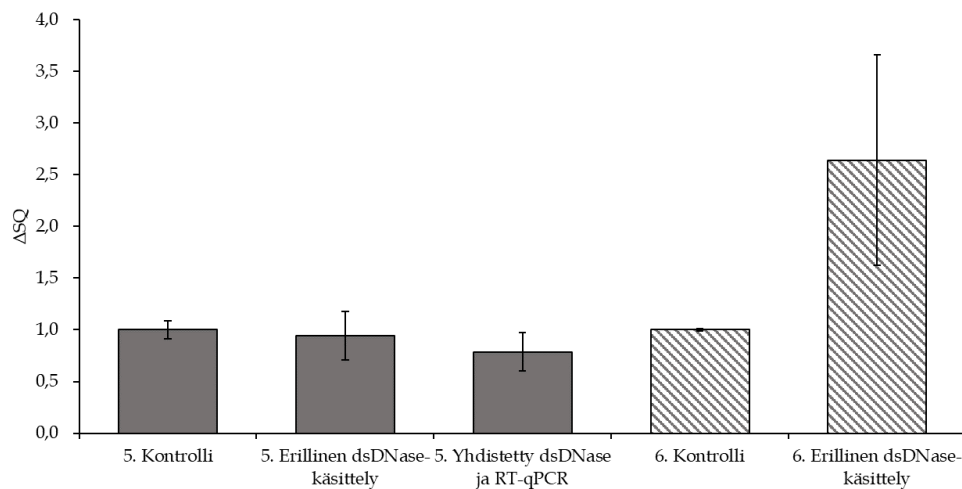
Kuva 13. IHN-viruksen havainnointi infektoituneesta RAS-laitoksesta IHNV- ja kala-RNA:ta mittaavalla yhteistestillä. Näytteissä 5 ja 6 havaittiin virusta, mutta tulos oli havaitsemisrajan tuntumassa ( $C_q = 38-40$ ). Kalan RNA:ta havaittiin näytteissä 1-8. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla  $C_q$ -arvo. Käsittelemättömille näytteille  $n = 2$ , ultrasuodatetuille (UF)  $n = 4$ . Pystyviiva kuvaa replikaattien keskihajontaa.



Kuva 14. Ultrasuodatuksen aiheuttama muutos näytteen konsentraatiossa RAS-näytteillä 1-8 kalan RNA:n perusteella. Vaihtelu näytteiden konsentroitumisessa oli suurta. Eniten konsentroitui näyte 6 (raikastusallas), jonka pitoisuus kasvoi noin 31-kertaiseksi ( $\pm 7,0$ ). Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla konsentraation suhteellinen muutos. Käsittelemättömille näytteille  $n = 2$ , ultrasuodatetuille  $n = 4$ . Pystyviiva kuvaa näytteen keskivirhettä.

### 3.3.1 dsDNase-käsittelyn vaikutus RT-qPCR-menetelmän herkkyYTEEN

Työssä käytettiin sekä DNA:ta että RNA:ta eristävää nukleiinihappoeristyskittiä, mutta koska IHN:n genomi on RNA:ta, näytteistä poistettiin kaksijuosteinen DNA dsDNase-käsittelyllä detektioherkkyyden parantamiseksi. Näytteellä 6 (raikastusallas) dsDNase-käsittely suurensi reaktiossa havaitun IHN-RNA:n määrää 2,6-kertaiseksi ( $\pm 1,02$ ) ( $p = 0,21$ ) (kuva 15), ja molemmilla näytteillä käsiteltyjen näytteiden RFU-arvot olivat suuremmat kuin käsittelemättömien. Näytteellä 5 (raikastusallas) käsittely ei vaikuttanut konsentraatioon merkittävästi: erillinen dsDNase-käsittely pienensi konsentraatiota 0,94-kertaiseksi ( $\pm 0,24$ ) ( $p = 0,91$ ) ja PCR-ajoon yhdistetty käsittely 0,79-kertaiseksi ( $\pm 0,19$ ) ( $p = 0,44$ ).



Kuva 15. Erillään tehty dsDNase-käsittely kasvatti näytteen konsentraatiota 2,6-kertaiseksi näytteellä 6. Näytteessä 5 käsittelyllä ei vaikuttanut olevan merkitystä  $C_q$ -arvoon, ja RT-qPCR-ajoon yhdistetty dsDNase-käsittely hidasti reaktiota noin puoli sykliä. Kontrollina käytettiin näytettä, jolle ei tehty dsDNase-käsittelyä. Kuvaajassa x-akselilla on näytteiden nimet, ja y-akselilla konsentraation suhteellinen muutos. Kaikille näytteille  $n = 2$ , paitsi näytteen 6 kontrolli, jolla  $n = 1$ . Pystyviiva kuvaa näytteen keskivirhettä.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Työssä kehitettiin RT-qPCR-testiä kaloja infektoiville IHN- ja VHS-viruksille, sekä testattiin erilaisten konsentroitimenetelmien toimivuutta RNA:n ja virusten konsentroiintiin vesinäytteestä. Kalanviljelyssä esiintyvät patogeenit aiheuttavat mittavia taloudellisia tappioita vuosittain, minkä vuoksi nopeiden ja yksinkertaisten testimenetelmien kehittäminen on tärkeää. Työn tavoitteista testin käyttöönotto ja optimointi onnistuivat odotetulla tavalla, ja esimerkiksi hyväksi havaitut aluke- ja koetinpitoisuudet vastasivat aiemmissä tutkimuksissa käytettyjä. Testaamisen herkkyttä saatiin parannettua käyttämällä testissä vain yhden viruksen alukkeita ja koetinta. Testimenetelmän herkkyuden

parantamiseen valitut konsentroidintimenetelmät eivät osoittautuneet yhtä tehokkaiksi kuin lähdekirjallisuudessa (ks. esim. Ahmed ym. 2020, Torii ym. 2022), ja erityisesti RNA:n havaittiin olevan huonosti konsentroitavissa näillä menetelmillä. Ultrasuodatuksen todettiin olevan toimiva konsentroidintimenetelmä, ja mahdollisesti helpoiten sovellettavissa kalanviljelylaitoksella tehtävään testaukseen yksinkertaisuutensa vuoksi: ultrasuodatukseseen ei tarvita sentrifuugin ja kertakäyttöisten suodattimien lisäksi muita työvälineitä. IHNV-tartunnan vuoksi saneeraukseen joutuneelta RAS-laitokselta otetuista näytteistä kahdessa havaittiin pieniä määriä IHNV-virusta, ja loput näytteet olivat IHNV-negatiivisia. Työn tuloksia voidaan hyödyntää tulevaisuudessa RT-qPCR-testin sovelluksissa esimerkiksi kiertovesiviljelylaitoksilla.

#### 4.1 RT-qPCR-testin optimointi ja käyttöönotto

Diagnostisen testin käyttöönotto vaatii testiä käyttävältä laboratoriolta kokeita testin luotettavuuden varmistamiseksi, sillä vaikka testi perustuisi aikaisempaan tutkimukseen, reagensseissa, laitteissa tai työskentelytavoissa saattaa olla eroja, jotka vaativat testin optimoimista kuhunkin laboratorioon. Tässä työssä optimoitiin ja otettiin käyttöön EURL:n protokollan (Olesen ym. 2021) mukainen RT-qPCR-testi Jyväskylän yliopiston genetiikkalaboratoriossa (liite 6). Työn tulokset ovat suuntaa-antavia mahdollista kalanviljelylaitoksella tapahtuvaa käyttöönottoa varten.

RT-qPCR on testimenetelmänä sekä herkkä että tarkka. Purcell ym. (2013) vertasivat kolmea testimenetelmää IHNV:n tunnistamiseksi: soluviljelmästä eristetyin viruksen tunnistamista, n-geeniin kohdennettua RT-qPCR-testiä sekä g-geeniin, eli viruksen glykoproteiinin geeniin kohdennettua RT-PCR-testiä. IHNV:n glykoproteiinin geeni on n-geenin tavoin konservoitunut, mutta siinä tapahtuu mutaatioita hieman useammin, jonka vuoksi sitä käytetään erityisesti eri viruskantojen tunnistamiseen (Purcell ym. 2013). RT-PCR-testi poikkeaa RT-qPCR-testistä siten, että RT-PCR-testin avulla voidaan tarkastella samassa ajossa olleiden näytteiden välisiä eroja, ei absoluuttisia RNA-konsentraatioita, kuten RT-qPCR:ssä. Vertailussa (Purcell ym. 2013) havaittiin RT-qPCR-testin olevan muita menetelmiä herkempi, ja menetelmällä voitiin havaita 5–70 geenikopiota yhdestä reaktiosta, mikä on samaa suuruusluokkaa tässä työssä saavutetun alimman havaitsemisrajan (noin 3–12 geenikopiota) kanssa. Standardointia tehdessä *multiplex*-RT-qPCR-reaktion tuloksissa ei havaittu eroa yksittäisen näytteen RT-qPCR-testiin verrattuna, joten oletettiin, että RT-qPCR-testin herkkyys ei kärsinyt *multiplex*-menetelmän vuoksi.

DNA-kontaminaatiota esiintyi erityisesti työn alkuvaiheessa, ja kontaminaation vähentämisessä suurin merkitys tuntui olevan erillisiin tiloihin siirtymisellä. Silti satunnaisesti, noin 15 %:ssa kokeita, NTC-kaivot olivat positiivisia ( $C_q$ -arvo 35+), mikä vaikeutti tulosten tulkintaa ja vähensi tulosten luotettavuutta erityisesti RAS-laitokselta saatujen näytteiden kohdalla. RT-qPCR-testauksessa kontaminaatiota saattaa aiheutua mm. näytteen käsittelyssä,

konsentroidussa, RNA-eristyksessä sekä aiemmissa RT-qPCR-reaktioissa syntyneen tuotteen leviämistä PCR-laitteeseen. UNG-käsittelyn avulla voitiin vähentää aiemmista PCR-reaktioista siirtyvän tuotteen aiheuttaman ristikontaminaation määrää. Virheellisen tulkinnan vuoksi UNG-inkubaationa käytettiin työskennellessä 30 minuutin inkubaatiota, vaikka lyhyempi olisi toiminut työn tulosten perusteella tehokkaammin. Molemmat inkubaatioajat kuitenkin vähensivät ristikontaminaation riskiä.

Standardisuorien  $R^2$ -arvot olivat kaikille fluoroforeille yli 95 %, mistä johtuen standardisuorien voidaan olettaa kuvaavan pitoisuutta luotettavasti. Sitoutumislämpötila-, aluke- ja koetintestien tulokset vastasivat aiempaa tutkimusta (Jonstrup ym. 2013, Hoferer ym. 2019, Cuenca ym. 2020, Olesen ym. 2021), vaikka työssä käytettiin eri RT-qPCR-mastermixiä kuin lähdekirjallisuudessa: esimerkiksi Hoferer ym. (2019) käyttivät SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Saksa) -valmistetta. Aiemmassa tutkimuksessa (Hoferer ym. 2019) käytettiin 2-vaiheista RT-qPCR-mastermixiä, joka on yksivaiheista reaktiota alttiimpi kontaminaatiolle. Standardeja muodostaessa havaittiin, että IHNV:n ja VHSV:n pitoisuudeltaan pienimmät standardit ( $2,50 \times 10^{-6}$  pg/ $\mu$ l IHNV:lle ja  $2,50 \times 10^{-7}$  pg/ $\mu$ l VHSV:lle) sisälsivät niin vähän RT-qPCR-reaktion templaattia, ettei reaktiota havaittu joka kerta. Tämän vuoksi testitulosta ei voida pitää luotettavana  $C_q$ -arvon ollessa suurempaa kuin 35, vaan tulos täytyy tarkastaa tekemällä testi uudelleen, tai jollakin toisella testimenetelmällä. Aiemmassa tutkimuksessa (Cuenca ym. 2020) IHNV:n RT-qPCR-testin herkkyys oli hieman tässä työssä saavutettua havaitsemisrajaa parempi: tutkimuksessa esitetyn testin havaitsemisrajan  $C_q$ -arvo oli 36–38 eli testillä pystyttiin havaitsemaan pienempiä pitoisuuksia virusta näytteestä.

RT-qPCR-protokollan optimointiin kuului myös aluke- ja koetinkonsentraation testaaminen, sekä suolan vaikutuksen tarkastaminen. Vaikka suurempi koetinkonsentraatio olisi saattanut tehostaa reaktiota hieman, ero ei ollut niin suuri, että konsentraatiota olisi kannattanut nostaa, koska se olisi lisännyt reaktion hintaa huomattavasti. Alukkeiden konsentraatiolla oli suurempi merkitys, jonka vuoksi päädyttiin käyttämään korkeampaa alukekonsentraatiota testissä. Suolan lisääminen näytteeseen ei häirinnyt reaktiota merkittävästi, ja saattoi jopa tehostaa reaktiota.

Bakteerien ja muun orgaanisen aineksen poistaminen näytteestä imusuodatuksen avulla saattoi olla hyödyllistä RNA:n ja virusten säilymistä kannalta (Oidtmann ym. 2018), mutta toisaalta suodattimeen saattoi myös tarttua hieman RNA:ta (noin 20 %), mikä voitiin havaita suodatuskokeen tuloksista. Imusuodatusta ei päädytty tekemään RAS-laitokselta saaduille näytteille, koska menetelmän toteuttaminen bioturvallisesti olisi ollut haastavaa, ja ultrasuodatus on menetelmänä niin nopea, että arvioitiin virusten säilyvän näytteessä, vaikka bakteereja ei poistettaisikaan.

Työssä pyrittiin tekemään kustakin näytteestä kolme tai useampi rinnakkaista näytettä eli replikaattia tulosten luotettavuuden parantamiseksi. Suurimassa osassa kokeita replikaatit onnistuivat, mutta osassa kokeista osa

replikaateista ei reagoinut, tai yksittäinen replikaatti poikkesi muista merkittävästi, jolloin tätä ei otettu huomioon tulosten analysoinnissa. Tällaista tapahtui noin 10 % prosentissa kokeita, esimerkiksi konsentroidintimenetelmien vertailussa replikaateista epäonnistui noin 3 % ja jouduttiin tämän vuoksi jättämään pois vertailusta. Pienet otoskoot heikentävät tulosten luotettavuutta, ja tulevaisuudessa kokeen osia voisi toistaa suuremmilla otosko'oilla, ja tehdä kokeista useampia toistoja.

Synteettisen RNA:n käyttö viruksen mallina menetelmäkehityksessä on tavallinen käytäntö. Synteettisen RNA:n tuottaminen on nopeampaa ja edullisempaa kuin kokonaisten virusten tuottaminen, sillä RNA:ta ei tarvitse erikseen eristää, eikä ylläpitää soluviljelmiä virusten tuottamiseksi. Viruksia tuottaessa tapahtuu myös mutaatioita, joita synteettistä RNA:ta käyttäessä ei muodostu. Toisaalta mutaatioiden tapahtuminen on luonnollinen ilmiö, ja tällöin synteettinen RNA ei vastaa luonnollista tilannetta parhaalla mahdollisella tavalla. Toisaalta PCR-testit kohdistetaan yleensä konservoituneisiin geenialueisiin, joissa mutaatioita tapahtuu harvemmin.

## **4.2 Konsentroidintimenetelmien tehokkuuden vertailu vesinäytteiden konsentroidintiin**

Konsentroidintimenetelmät toimivat odotettua huonommin sekä kokonaisen viruksen ( $\phi 6$ ) että RNA:n (IHNV, VHSV ja kala) konsentroidintiin (Kim ym. 2015, Ahmed ym. 2020, Torii ym. 2022). Työhön käytännön kannalta soveltuvin ja parhaiten RNA:ta konsentroidiva menetelmä oli ultrasuodatus. Työssä havaittiin, että nopeammat konsentroidintimenetelmät, joissa näyte pysyi kylmässä (+ 4 °C) (PEG ja ultrasuodatus), toimivat paremmin kuin hitaat (kylmäkuivaus) tai huoneenlämmössä tehtävät (InnuPrep) menetelmät. Tämän arveltiin johtuvan RNA:n herkästä hajoamisesta ja ulkoisten tekijöiden, kuten bakteerien, vaikutuksesta RNA:n säilymiseen. Kylmäkuivaus saattoi olla liian rankka käsittely helposti hajoavalle RNA:lle eikä kokonainenkaan viruspartikkeli kestänyt käsittelyä, vaan näytteen konsentraatio pieneni huomattavasti. Kylmäkuivaus oli myös muita käsittelyitä hitaampi: 250 ml:n näytettä kuivattiin yhdeksän vuorokautta, kun taas muut konsentroidintimenetelmät saatiin suoritettua yhden työpäivän aikana. Kaikissa konsentroidintimenetelmissä eri näytteiden välillä oli hajontaa konsentroidinnin onnistumisessa, eivätkä tulokset olleet johdonmukaisia esimerkiksi siten, että RNA-näytteet olisivat käyttäytyneet keskenään samanlailla kokonaisesta viruksesta ( $\phi 6$ ) poiketen, vaan erityisesti VHSV:n tulokset poikkesivat muista RNA-tuloksista (IHNV ja kala).  $\phi 6$ -faagi ( $\varnothing$  85 nm) on kooltaan hieman rhabdovirusia ( $\varnothing$  75 nm, pituus 180 nm) pienempi, mutta niiden genomit ovat melko samankokoiset (Aquino de Carvalho ym. 2017).  $\phi 6$ -faagia käytetään tutkimuksessa mallintamaan monia vaipallisia viruksia, kuten koronaviruksia (Fedorenko ym. 2020).

PEG-käsittelyllä näytteen konsentraatio pysyi lähes samana kuin käsittelemättömällä näytteellä. Näkyvää pellettiä ei muodostunut, minkä vuoksi pelletin sijaintia tai kokoa oli vaikea arvioida. Tämän vuoksi pelletti saattoi irrota



huomaamatta nesteeseen supernatanttia poistettaessa. Toisaalta, koska PEG-käsittelyn näytteen pitoisuus pysyi lähes samana kuin konsentroimattoman näytteen, vaikutti siltä, ettei pellettiä ollut muodostunut ollenkaan. Käsittelyä voisi kokeilla uudelleen vielä korkeammilla sentrifugoinnin kierrosnopeuksilla, pienemmällä vesimäärällä tai pidemmällä sentrifugoinnilla, jotta pelletti saataisiin muodostumaan. Lisäksi PEG-käsittelyyn liittyi käytännön haasteena bioturvallisuus: RAS-laitokselta saatu vesinäyte olisi pitänyt inaktivoida ja esisuodattaa ennen käsittelyä, eikä kumpaakaan käsittelyä olisi pystytty toteuttamaan järkevästi työn aikataulun puitteissa BSL2-tiloissa. Aiemmassa tutkimuksessa koronavirusta sisältäneet näytteet inaktivoitiin 60 °C:ssa 30 minuutin ajan ennen PEG-käsittelyä bioturvallisuuden vuoksi (Zheng ym. 2023). Tällainen käsittely olisi kuitenkin todennäköisesti tuhonnut kokonaisen IHN-viruksen, jolloin konsentroidin olisi täytynyt toimia myös RNA:lle tehokkaasti, miltä tehdyn työn tulokset eivät vaikuttaneet. Useissa tutkimuksissa virusnäytteitä on kuitenkin konsentroitunut PEG 8000:lla onnistuneesti käyttäen samankaltaista protokollaa kuin tässä tutkielmassa käytetty (mm. Torii ym. 2022, Zheng ym. 2023).

InnuPrep-käsittely ei soveltunut murtovedelle, ja näytteestä olisi tullut poistaa suola, jotta menetelmä olisi toiminut tehokkaammin. Näyte olisi myös tullut suodattaa bakteerien poistamiseksi ennen käsittelyä, sekä inkuboida jääkaapissa, jottei herkästi hajoava RNA olisi tuhoutunut. Tämä olisi tosin saattanut hidastaa InnuPrep-menetelmässä veden imeytymistä helmiin, sillä kitin ohjeen mukaan konsentroidin tuli tehdä huoneenlämmössä.

Konsentroidintikokeessa ultrasuodattimiin jäi noin 200 µl näytettä, jossa kuitenkin RNA-pitoisuus oli sama kuin alkuperäisessä näytteessä. RAS-laitokselta saaduissa näytteissä ultrasuodatus pienensi  $C_q$ -arvoa jopa viidellä syklillä kalan RNA:lla testattuna, mikä vastasi pitoisuuden kasvamista jopa 31-kertaiseksi, konsentraatiotehokkuuden ylittäen teoreettisen maksimin. Vaihtelua tehokkuudessa oli näytteiden välillä hyvinkin paljon, toisaalta kalan RNA-määrät vaihtelivat myös replikaattien välillä. Käsittely vaikutti toimivan paremmin näytteille, joiden lähtökonsentraatio oli suurempi. Keskimäärin reaktio aikaistui ultrasuodatuksen avulla kolme sykliä, mikä vastaa näytteen pitoisuuden kahdeksankertaistumista. Aiemmissa tutkimuksissa saadut tulokset olivat huomattavasti parempia, noin 20-kertaisesta jopa useita kertaluokkia suurempiin pitoisuuksiin (Grant ym. 2011, Kim ym. 2015), mutta konsentroidintehokkuuteen vaikuttaa huomattavasti lähtö- ja lopputilavuuden suhde. Ultrasuodatus oli myös muita menetelmiä nopeampi ja bioturvallisuus oli muita menetelmiä helpompaa varmistaa. Ultrasuodattimen läpi olisi voinut teoriassa laittaa useita 15 ml:n näytteitä, jolloin olisi saatu suurempi näytetilavuus käsiteltyä yhdellä suodattimella, mutta ultrasuodatinta ei haluttu bioturvallisuuden ja kontaminaatorisikin takia avata useita kertoja. Kuitenkin, jos ultrasuodatusta tehtäisiin RAS- tai muulla kalanviljelylaitoksella, putken uudelleentäyttäminen ei aiheuttaisi samalla tavalla kontaminaatorisikiä, jolloin konsentroidin tehokkuutta voitaisiin saada kasvatettua edelleen täyttämällä konsentroidinputki useita kertoja.

RNA on kooltaan kokonaisia viruksia pienempää, ja erityisesti ultrasuodatus menetelmänä perustuu kokoeroteluun. Koska ultrasuodatuksen avulla onnistuttiin konsentroimaan RNA:ta, voidaan olettaa menetelmän konsentroivan myös viruksia jossain määrin, vaikka suhde ei välttämättä ole sama. Työssä malliviruksena käytetty phi6-faagi konsentroitui ultrasuodatuksen avulla tehokkaammin kuin VHS-RNA, ja hieman vähemmän tehokkaasti kuin IHN- tai kala-RNA. Erot olivat kuitenkin pieniä, ja VHS-RNA:n konsentraatio pieneni myös PEG-saostuksella käsiteltäessä. Tämän vuoksi voidaan olettaa, ettei VHS-RNA kestänyt käsittelyitä yhtä hyvin kuin IHN- tai kala-RNA, tai phi6-faagi.

### 4.3 RAS-näytteiden viruspitoisuuden tarkastelu

RAS-laitokselta saaduille vesinäytteille tehtiin aiemmin työssä kehitetyn RT-qPCR-protokollan mukainen testi, ja konsentrintimenetelmänä käytettiin ultrasuodatusta. Kaikista RAS-laitokselta otetuista näytteistä ei havaittu IHNV:tä. Näytteissä 5 ja 6 (raikastusaltaat) todennäköisesti oli virusta, mutta havaittu viruspitoisuus oli hyvin pieni. Yhdistetyssä RT-qPCR-reaktiossa, jossa oli sekä IHN- että kala-alukkeet ja -koettimet, positiivisissa vesinäytteissä 5 ja 6 viruspitoisuus oli hyvin alhainen, ja vastasi kontaminoituneiden NTC-kaivojen pitoisuuksia. Sen sijaan, kun menetelmä jaettiin siten, että IHN-virusta arvioitiin erikseen kalan RNA:sta, tulokset olivat selkeästi positiivisia, ja negatiiviset kontrollit säilyivät negatiivisina. Tämän vuoksi voidaan olettaa IHNV:n reaktion häiriintyneen kalan RNA:n havainnoinnista. Aiemmin todettiin, ettei *multiplex*-menetelmä vaikuttanut testin herkkyyteen, mutta RAS-laitoksen näytteissä kalan DNA:n ja RNA:n pitoisuus oli huomattavasti IHNV:n RNA:n pitoisuutta suurempi, ja RT-qPCR-reaktio saattoi häiriintyä kalan nukleiinihapoista reaktiossa.

Epäspesifin RNA-DNA-eristyksen takia RT-qPCR-reaktio saattoi häiriintyä myös DNA:n suuresta määrästä reaktiossa. Ongelmaa yritettiin korjata käyttämällä eristyksen jälkeen dsDNase-käsittelyä, jolloin vain näytteissä ollut RNA toimi templaattina reaktiossa. Käsittelyyn päädyttiin, koska DNA:n on havaittu inhiboivan RT-reaktiota aiemmissa RT-qPCR-kokeissa (Marja Tirola, suullinen tiedonanto, 2023). Näytteellä 6 käsittely vaikutti hyödylliseltä, ja molemmilla käsittelyn ansiosta RFU-arvot nousivat korkeammalle, mikä saattoi kertoa kilpailun reagensseista vähentyneen reaktiossa. Lisäksi tehtiin PCR-testi ilman kalan alukkeita ja koetinta, jolloin mahdollisimman suuri osa reagensseista oli käytettävissä IHNV:n havainnointiin. Tämä aikaisti molempien näytteiden reaktiota noin kolmella syklillä, ja koska kaikissa kokeissa näytteet pysyivät positiivisina IHNV:n suhteen, todettiin, että näytteiden 5 ja 6 (raikastusaltaat) testitulokset olivat positiiviset IHNV-viruksen osalta. Tulos voitaisiin vahvistaa lisäksi sekvensoimalla RT-qPCR-reaktiossa monistunut tuote ja tarkistamalla sekvensoidun juosteen pituus, sekä sen vastaavuus muihin Euroopassa esiintyneisiin IHNV-kantoihin. Tässä työssä tehdyn RT-qPCR-testin tulosta ei voida pitää diagnostisesti pätevänä, sillä testi ei ole valvontaviranomaistason, eli

Ruokaviraston, hyväksymä, eikä testitulosta tarkastettu oikeaksi sekvensoinnin avulla.

RAS-laitoksen vesikierto oli yhtenäinen siten, että ainoastaan poikastuotantoaltaissa oli oma vesikiertonsa. Kasvatusaltaista vesi kulki puhdistusaltaisiin, ja puhdistusaltaista hapetuksen kautta takaisin kasvatusaltaisiin, joten viruksen leviäminen altaiden välillä oli mahdollista. Kasvatusaltaissa (näytteet 1 ja 3) olleet kalat vaikuttivat terveiltä ja hyväkuntoisilta, jonka vuoksi etukäteen arveltiin myös IHN-testauksen antavan negatiivisen tuloksen. Kasvatusaltaista ei havaittukaan virusta tällä menetelmällä konsentroidusta tai konsentroimattomasta näytteestä. Hävitysaltaan (näyte 4) oletettiin olevan IHNV-positiivinen ennen testaamista, mutta testimenetelmällä ei havaittu virusta näytteestä. Tämä saattoi johtua esimerkiksi siitä, ettei altaassa ollut näytteenottohetkellä eläviä kaloja, ja altaassa oli vain hieman vettä jäljellä. Altaan vesi ei ollut todennäköisesti enää viruksen säilymisen kannalta olosuhteiltaan optimaalinen, sillä vesi sisälsi runsaasti orgaanista ainetta ja lämpötilaa ei säädelty pysymään alle 20 °C:ssa.

Puhdistusaltaiden (näytteet 2, 8 ja 10) oletettiin olevan IHNV-negatiivisia, sillä niissä on biofilttereiden vuoksi paljon bakteereja, joiden on todettu tuhoavan viruksia (Oidtmann ym. 2018). Puhdistusaltaista ei havaittu työssä käyttöönotetulla testillä IHN-virusta, joten oletus osui oikeaan, joskin syytä on mahdotonta tietää. Myös tulovesinäytteen (näyte 7) oletettiin olevan negatiivinen, ja tässäkin kohtaa hypoteesi piti paikkaansa tällä testausmenetelmällä.

Raikastusaltaissa kalojen tiheys oli suuri, eikä kaloja ruokita raikastuksen aikana. Lisäksi kalojen siirtäminen raikastusaltaisiin on laitoshuoltajan mukaan kaloille stressaava prosessi, ja ne usein jopa vahingoittuvat siirron aikana. Tällaiset tekijät altistavat kaloja myös viruksille, ja positiiviseen testitulokseen nojaten voidaankin epäillä raikastusaltaissa olleen IHNV:llä infektoituneita kaloja, ja infektiota on saattanut levitä olosuhteiden ollessa suotuisat.

#### 4.4 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli mahdollistaa nopea ja tehokas virustestaus kalanviljelylaitoksissa, ja työssä käyttöönotettu RT-qPCR-testiprotokolla osoittautui lupaavaksi vaihtoehdoksi tavoitteen saavuttamiseksi. Työn tulosten perusteella IHN- ja VHS-viruksia voidaan määrittää yhteisellä *multiplex*-RT-qPCR-menetelmällä luotettavasti, ja vesinäytteen konsentroinnilla pystyttiin lisäämään RT-qPCR-testimenetelmän herkkyyttä. Konsentroiduista näytteistä ei kuitenkaan ollut yhtä tehokasta kuin odotettiin, ja syyn selvittämiseksi konsentroitumiskokeet tulisi tehdä uudelleen muokaten olosuhteita kontrolloidusti. Työssä käyttöönotetun RT-qPCR-testiprotokollan toimivuutta ja valitun konsentroitumismenetelmän, eli ultrasuodatuksen, tehokkuutta testattiin IHNV:llä infektoituneelta RAS-laitokselta otetuista näytteistä. Laitoksella oli aiemmin todettu IHNV-tartunta, jonka vuoksi laitos oli tyhjennettävä ja puhdistettava perusteellisesti. Näytteiden ottohetkellä ei ollut varmuutta, oliko altaissa, joista

näytteet otettiin, infektoituneita kaloja. Vesinäytteestä tehdyn testin perusteella laitoksen raikastusaltaissa vaikutti kuitenkin olevan IHNV-tartunnan saaneita kaloja.

Työssä diagnostiikkalaboratorioon optimoitu RT-qPCR-testin protokolla on esitetty liitteessä 6. Testi kokonaisuudessaan on suhteellisen nopea: konsentroidussa, RNA-eristyksessä, RT-qPCR-reaktion valmistelussa ja ajossa kului keskimäärin viidestä kuuteen tuntia, riippuen rinnakkaisten näytteiden määrästä. Tämä on huomattavasti soluviljelytestiä nopeampi, ja tulokset on mahdollista saada saman päivän aikana. Lisäksi RT-qPCR-testi on menetelmiltään soluviljelytestiä yksinkertaisempi, sillä soluviljelmien ylläpito vaatii osaavaa henkilökuntaa sekä runsaasti välineistöä, kuten inkubaattoreita. Testiajossa käytettävät standardit kannattaa olla valmiiksi tuotettuna ja laimennettuina sopiviin konsentraatioihin, ja reaktioliuos tulee valmistella PCR-laitteesta erillisessä tilassa kontaminaation välttämiseksi.

Testin kehitystä voitaisiin jatkaa paremman detektioherkkyyden saavuttamiseksi, ja työn tuloksia voitaisiin tarkentaa tekemällä kokeita käyttäen suurempia otoskokoja. Vaihtoehtoisesti RT-qPCR:n sijaan testaamiseen voitaisiin käyttää digitaali-PCR:ää, joka on RT-qPCR:ään verrattuna vähemmän herkkä PCR-inhibitiolle, ja lisäksi digitaali-PCR:llä saadaan mitattua näytteen konsentraatio ilman standardisuoraa (Merino ym. 2022). Menetelmää onkin jo sovellettu IHNV:n havainnointiin, ja ensimmäinen testiprotokolla on julkaistu 2017 (Jia ym. 2017). Kalanviljelylaitoksella tehtävä testi voisi vähentää tartuntoja esimerkiksi siten, että ennen laitokseen siirtämistä tuontikalat siirrettäisiin erilliseen karanteenialtaaseen, jossa ne pidettäisiin testituloksen saamiseen asti. Testituloksen valmistuessa alle vuorokaudessa kuljetuksen aikana mahdollisesti levinnyt infektio havaittaisiin ennen kuin kalat siirrettäisiin karanteenialtaasta laitokseen.

Työn konsentroidintimenetelmien vertailun kanssa vastaavanlaista tutkimusta on tehty viime vuosina runsaasti erityisesti koronapandemian seurannassa (mm. Zheng ym. 2023), joten työn konsentroidintikokeen tuloksia voidaan soveltaa myös muiden kuin kaloja infektoivien virusten seurantaan. Työn konsentroidintikokeen osia voisi tarkastella laajemmin kokonaisilla viruksilla, ja tutkia esimerkiksi, onko menetelmissä eroja vaipallisten ja vaipattomien virusten välillä. Pelkän RNA:n konsentroidimisessa haasteena on RNA:n epästabiili rakenne. Jatkotutkimusideoita ovat muiden muassa uuden sukupolven sekvensointimenetelmien hyödyntäminen kenttäkäytössä sekä tehokkaampien konsentroidintimenetelmien löytäminen. Esimerkiksi Oxford Nanopore -sekvensointilaitteen avulla ympäristönäytteestä voidaan analysoida kaikki DNA- tai RNA-juosteet nopeasti, ja täten saada tietoa mahdollisten patogeenien läsnäolosta näytteessä.

## **KIITOKSET**

Tutkielman rahoitus saatiin Luonnonvarakeskuksen johtamasta Kalatalouden innovaatio-ohjelmasta, jota rahoittaa Euroopan meri- ja kalatalousrahasto (EMKR). Kiitokset ohjaajilleni professori Marja Tiirolalle sekä FM Krista Norvasuolle.

Tampereella 30.9.2023  
Janita Nieminen

## KIRJALLISUUSLUETTELO

- Ahmed W., Bertsch P.M., Bivins A., Bibby K., Farkas K., Gathercole A., Haramoto E., Gyawali P., Korajkic A., McMin B.R., Mueller J.F., Simpson S.L., Smith W.J.M., Symonds E.M., Thomas K.V., Verhagen R. & Kitajima M. 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci.Total. Environ.* 739: 139960.
- Aquino de Carvalho N., Stachler E.N., Cimabue N. & Bibby K. 2017. Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate. *Environ. Sci. Technol.* 51: 8692–8700.
- Badiola M., Mendiola D. & Bostock J. 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquac. Eng.* 51: 26–35.
- Batts W.N. & Winton J.R. 1989. Concentration of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from Water Samples by Tangential Flow Filtration and Polyethylene Glycol Precipitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 964–968.
- Cashdollar J. I. & Wymer L. 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.* 115: 1–11.
- Chen W., Wang T., Dou Z. & Xie X. 2021. Self-Driven Pretreatment and Room-Temperature Storage of Water Samples for Virus Detection Using Enhanced Porous Superabsorbent Polymer Beads. *Environ. Sci. Technol.* 55: 14059–14068.
- Chien A., Edgar D.B. & Trela J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127: 1550–1557.
- Cuenca A., Vendramin N. & Olesen N.J. 2020. Analytical validation of one-step real-time RT-PCR for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 40: 14.
- Dixon P., Paley R., Alegria R. & Oidtmann B. 2016. Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): A review. *Vet. Res.* 47: 63.
- Dutta D., Naiyer S., Mansuri S., Soni N., Singh V., Bhat K.H., Singh N., Arora G. & Mansuri M.S. 2022. COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics* 12: 1503.
- EURL 2021. *Report on survey and diagnosis of fish diseases in Europe 2021*, saatavissa <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/survey-and-diagnosis>
- FAO 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation*. FAO, Rome, Italy.
- Fedorenko A., Grinberg M., Orevi T. & Kashtan N. 2020. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Sci. Rep.* 10: 22419.
- Gendron L., Verreault D., Veillette M., Moineau S. & Duchaine C. 2010. Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols. *Aerosol Sci. Technol.* 44: 893–901.

- Grant A.A.M., Jakob E., Richard J. & Garver K.A. 2011. Concentration of Infectious Aquatic Rhabdoviruses from Freshwater and Seawater Using Ultrafiltration. *J. Aquat. Anim. Health* 23: 218–223.
- Hansen L.J.J., Daoussi R., Vervaet C., Remon J.-P. & De Beer T.R.M. 2015. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine* 33: 5507–5519.
- Hoferer M., Akimkin V., Skrypski J., Schütze H. & Sting R. 2019. Improvement of a diagnostic procedure in surveillance of the listed fish diseases IHN and VHS. *J. Fish Dis.* 42: 559–572.
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. & Gelfand D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 7276–7280.
- Jia P., Purcell M.K., Pan G., Wang J., Kan S., Liu Y., Zheng X., Shi X., He J., Yu L., Hua Q., Lu T., Lan W., Winton J.R., Jin N. & Liu H. 2017. Analytical validation of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for quantitative detection of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol. Methods* 245: 73–80.
- Jonstrup S.P., Kahns S., Skall H.F., Boutrup T.S. & Olesen N.J. 2013. Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.* 36: 9–23.
- Kim S.-J., Kim J.-O., Kim W.-S. & Oh M.-J. 2015. Use of a two-step ultrafiltration procedure to concentrate viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in seawater. *J. Virol. Methods* 224: 30–34.
- Kleiboeker S.B. 2005. Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR. *Virol. J.* 2: 29.
- Lewis G.D. & Metcalf T.G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1983–1988.
- Lis J.T. & Schleif R. 1975. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res.* 2: 383–389.
- Luonnonvarakeskus. 2022. Vesiviljely 2021. *Luonnonvarakeskus*.
- Merino, I., de la Fuente, A., Domínguez-Gil, M. Eiros, J., Tedim, A. & Bermejo-Martín, J. 2022. Digital PCR applications for the diagnosis and management of infection in critical care medicine. *Crit. Care* 26, 63 (2022).
- Merivaara A., Zini J., Koivunotko E., Valkonen S., Korhonen O., Fernandes F.M. & Yliperttula M. 2021. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *J. Control Release* 336: 480–498.
- Mirzoyan N., Tal Y. & Gross A. 2010. Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems: Review. *Aquaculture* 306: 1–6.
- Ogut H. & Reno P.W. 2004. Effects Of Fish Density On Spread Of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) In Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Isr. J. Aquac. - Bamidgeh* 56.

- Oidtman B., Dixon P., Way K., Joiner C. & Bayley A.E. 2018. Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquac.* 10: 641–669.
- Olesen N.J., Cuenca A. & Vendramin N. 2021. *Diagnostic methods and procedures for surveillance and confirmation of infection with VHSV and IHNV*. EU diagnostic manual, saatavissa <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals/ihn>
- Orbcassel E. d', Jean-paul B. & Belaud A. 2009. Water quality and rainbow trout performance in a Danish Model Farm recirculating system: Comparison with a flow through system. *Aquac. Eng.* 40: 135–143.
- Purcell M., Thompson R., Garver K., Hawley L., Batts W., Sprague L., Sampson C. & Winton J. 2013. Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.* 106: 103–115.
- Raja-Halli M., Vehmas T., Rimaila-Pärnänen E., Sainmaa S., Skall H., Olesen N. & Tapiovaara H. 2006. Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Org.* 72: 201–211.
- Rhodes E.R., Hamilton D.W., See M.J. & Wymer L. 2011. Evaluation of hollow-fiber ultrafiltration primary concentration of pathogens and secondary concentration of viruses from water. *J. Virol. Methods* 176: 38–45.
- Ruokavirasto. 2022. IHN. *Ruokavirasto*. <https://www.ruokavirasto.fi/viljelijat/elaintenpito/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/kalat-ja-ravut/ihn/> (luettu 5.5.2023)
- Ruokavirasto 2023. VHS. *Ruokavirasto*. <https://www.ruokavirasto.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/kalat-ja-ravut/vhs/> (luettu 21.8.2023)
- Sievers M., Korsøen Ø., Warren-Myers F., Oppedal F., Macaulay G., Folkedal O. & Dempster T. 2022. Submerged cage aquaculture of marine fish: A review of the biological challenges and opportunities. *Rev. Aquac.* 14: 106–119.
- Snow A., Anderson B. & Wootton, B. 2012. Flow-through land-based aquaculture wastewater and its treatment in subsurface flow constructed wetlands. *Environ. Rev.* 20: 54–69.
- Torii S., Oishi W., Zhu Y., Thakali O., Malla B., Yu Z., Zhao B., Arakawa C., Kitajima M., Hata A., Ihara M., Kyuwa S., Sano D., Haramoto E. & Katayama H. 2022. Comparison of five polyethylene glycol precipitation procedures for the RT-qPCR based recovery of murine hepatitis virus, bacteriophage phi6, and pepper mild mottle virus as a surrogate for SARS-CoV-2 from wastewater. *Sci. Total Environ.* 807: 150722.
- Tsakiridis A., ODonoghue C., Hynes S. & Kilcline K. 2020. A comparison of environmental and economic sustainability across seafood and livestock product value chains. *Mar. Policy* 117: 103968.
- Walker P.J. & Winton J.R. 2010. Emerging Viral Diseases of Fish and Shrimp. *Vet. Res.* 41: 51.



- Wang T. & Brown M.J. 1999. mRNA Quantification by Real Time TaqMan Polymerase Chain Reaction: Validation and Comparison with RNase Protection. *Anal. Biochem.* 269: 198–201.
- Xie X., Bahnemann J., Wang S., Yang Y. & Hoffmann M.R. 2016. “Nanofiltration” Enabled by Super-Absorbent Polymer Beads for Concentrating Microorganisms in Water Samples. *Sci. Rep.* 6: 20516.
- Yong C.Y., Ong H.K., Tang H.C., Yeap S.K., Omar A.R., Ho K.L. & Tan W.S. 2019. Infectious hematopoietic necrosis virus: advances in diagnosis and vaccine development. *Peer.J.* 7: e7151.
- Zheng X., Wang M., Deng Y., Xu X., Lin D., Zhang Y., Li S., Ding J., Shi X., Yau C.I., Poon L.L.M. & Zhang T. 2023. A rapid, high-throughput, and sensitive PEG-precipitation method for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. *Water Res.* 230: 119560.

## LIITE 1. TYÖSSÄ KÄYTETTYJEN KONSTRUKTIEN SEKVENS- SIT

### Konstruktien sekvenssit.

IHNV-konstrukti (5' - 3'):

Selite: IonA, T7 promoter, lac Operator, RBS, NdeI, IHNV, XhoI, Spy tag, stop codon, spacer, T7 terminator, P1

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAATACGACTCACTATAGGGGAAT  
TGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGG  
AGATATCATATGATCGCTGCCAGAGCCAAGGCACGTGTGCGCCATGAGACTGAG  
CGGGACAGGAATGACAATGGTGGGACTGTTCAACCAAGCCGCAAAGAACCCTG  
GGCGCCCTCGAGGCCCATATTGTCATGGTTGATGCATACAAGCCGACCAAATA  
AAAGTGATAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTT  
TTGATCACCGACTGCCCATAGAGAGG

VHSV-konstrukti (5' - 3'):

Selite: IonA, T7 promoter, lac Operator, RBS, NdeI, VHSV, XhoI, Spy tag, stop codon, spacer, T7 terminator, P1

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAATACGACTCACTATAGGGGAAT  
TGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGG  
AGATATCATATGGCCATCAGGAACTCGCAGGGTGTGTGCGTCCCGGGCAGAA  
GATCACCAGGCCCTCTATGCGTTCATCCTGACCGAGATCGCAGACCCACCA  
CCCTCGAGGCCCATATTGTCATGGTTGATGCATACAAGCCGACCAAATAAAG  
TGATAATAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGA  
TCACCGACTGCCCATAGAGAGG

## LIITE 2. PÄÄTÖS LUVAN MYÖNTÄMISESTÄ TAUDINAIHEUTTAJAN KÄSITTELYYN, RUOKAVIRASTO



**RUOKAVIRASTO**  
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Elintarviketurvallisuusosasto  
Mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden yksikkö

Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Survontie 9 C  
40500 JYVÄSKYLÄ

**Päätös**  
Luvan myöntäminen

Pvm/Datum/Date Dnro/Dnr/DNo  
31.10.2022 5273/04.02.02.00/2022

1 (6)

Viite: Laboratorion lupahakemus 31.8.2022

### Päätös luvan myöntämisestä taudinaiheuttajan käsittelyyn

Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitos on 31.8.2022 hakenut Ruokavirastolta eläintautilain (76/2021) 64 §:n mukaista lupaa IHN-tautia aiheuttavan viruksen käsittelyyn tieteellisen tutkimuksen yhteydessä. Ruokaviraston mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden yksikkö on käsitellyt hakemusta ja laboratorion toimittamaa tautisuojauskuvausta yhdessä Ruokaviraston eläinterveystutkimuksen yksikön asiantuntijoiden kanssa. Eläinterveystutkimuksen yksikkö toimii kansallisena eläintautidiagnostiikan vertailulaboratoriona.

### Päätös

Ruokavirasto myöntää Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriolle eläintautilain 64 §:n 1 momentin nojalla luvan kalojen IHN-tautia aiheuttavan viruksen ja sitä sisältävien vesi- ja ympäristönäytteiden käsittelyyn, tutkimiseen sekä säilyttämiseen tieteellisen tutkimuksen yhteydessä.

Luvan myöntämisestä peritään maa- ja metsätalousministeriön (jäljempänä MMM) Ruokaviraston maksullisista suoritteista antaman asetuksen (1193/2021) mukainen maksu 151 eur. Lasku lähetetään erikseen.

Laboratorion tiedot ja toiminta, jota lupa koskee, merkitään Ruokaviraston ylläpitämään eläintautilain 79 §:n 3 momentin mukaiseen rekisteriin (liite).

### Perustelut

Eläintautilain 64 §:n 1 momentin mukaan a–c-luokan taudin ja muun torjuttavan eläintaudin aiheuttajamikrobeja ja -loisia saadaan muuta tarkoitusta kuin virallisten näytteiden tai omavalvontanäytteiden tutkimista varten pitää hallussa, siirtää, tutkia tai muutoin käsitellä vain Ruokavirastossa ja Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksessa tai Ruokaviraston luvalla. Luvan myöntäminen edellyttää, ettei toiminta aiheuta eläintaudin leviämisen vaaraa.

**Ruokavirasto**  
PL 100, 00027 RUOKAVIRASTO  
Puh. 029 530 0400 (vaihde)  
ruokavirasto.fi  
Y-tunnus: 2911686-7

**Livsmedelsverket**  
PB 100, 00027 LIVSMEDELSVERKET  
Tfn 029 530 0400 (växel)  
livsmedelsverket.fi  
FO-nummer: 2911686-7

**Finnish Food Authority**  
P.O. Box 100, FI-00027 FINNISH FOOD AUTHORITY, FINLAND  
Tel. +358 29 530 0400 (switchboard)  
foodauthority.fi  
Business ID: 2911686-7



Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen hakemuksen mukaan taudinaiheuttajan käsittely ja näytteiden tutkiminen suoritetaan BSL2 -tason laboratorioissa. Ruokavirastoon toimitetun tautisuojauskuvauksen perusteella laboratorioissa toteutetaan toimenpiteitä, joilla pyritään estämään taudinaiheuttajien leviäminen laboratorion ulkopuolelle. Näitä ovat mm. henkilökohtaisten suojainten käyttö sekä näytteiden, välineiden ja suojainten dekontaminaatiokäsittelyt.

Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen lupahakemuksen ja tautisuojauskuvauksen perusteella Ruokavirasto katsoo, että laboratorio täyttää eläintautilain 64 §:ssä asetetut vaatimukset ja myöntää luvan IHN-tautia aiheuttavan viruksen ja sitä sisältävien näytteiden käsittelyyn tieteellisen tutkimuksen yhteydessä.

#### Laboratorion velvollisuudet

Taudinaiheuttajia käsittelevien laboratorioiden ja muiden laitosten ja tahojen velvollisuuksista säädetään Euroopan parlamentin ja neuvoston tarttuvista eläintaudeista sekä tiettyjen eläinterveyttä koskevien säädösten muuttamisesta ja kumoamisesta antaman asetuksen (EU 2016/429) 16 artiklassa ja sen nojalla, eläintautilain 20, 65 ja 66 §:ssä sekä MMM:n muista torjuttavista, valvottavista ja muista ilmoitettavista eläintaudeista, eläintautien ilmoittamisesta sekä mikrobikantojen toimittamisesta antaman asetuksen (325/2021) 18 §:ssä.

Laboratorion on toteutettava asianmukaisia bioturvaamiseen, bioturvallisuuteen ja tilojen rakenteelliseen ja tekniseen suojaamiseen liittyviä toimenpiteitä estääkseen taudinaiheuttajien leviämisen laboratorion ulkopuolelle ja joutumisen kosketuksiin eläinten kanssa. Laboratorion tautisuojauskuvauksessa esitettyjen toimenpiteiden lisäksi laboratorion tulisi esimerkiksi varmistaa, että taudinaiheuttajan tai sitä sisältävien näytteiden käsittelyyn osallistuvilla henkilöillä on soveltuva koulutus ja pätevyys sekä perehtyneisyyttä bioturvaamiseen ja turvalliseen työskentelyyn. Pääsy taudinaiheuttajaan ja sitä sisältäviin näytteisiin tulee rajata vain tarvittaville henkilöille.

Ruokavirasto suosittelee, että erityisesti toiminnan jatkuessa tai laajentuessa laboratorio teettäisi bioturvaamismenettelyihin ja niihin liittyvään ohjeistukseen kohdistuvan ulkopuolisen auditoinnin.



Eläintautilain 66 §:n 3 momentin mukaisesti laboratorion epäillessä sille toimitetussa näytteessä esiintyvän sellaista luetteloitua tautia tai muuta torjuttavaa tai valvottavaa eläintautia, jonka käsittelyyn laboratoriolle ei ole lupaa, sen on viipymättä toimitettava näyte tai siitä eristetty mikrobi viralliseen eläinterveyslaboratorioon jatkotutkimuksia varten. Viralliset eläinterveyslaboratoriot löytyvät Ruokaviraston verkkosivuilta.

Laboratorion on eläintautilain 20 §:n mukaisesti salassapitovelvollisuuden estämättä ilmoitettava epäilemistään tai toteamastaan eläimellä olevasta luetteloidusta tai uudesta taudista taikka muusta ilmoitettavasta eläintaudista kunnaneläinlääkärille tai aluehallintovirastolle. Ilmoitus on tehtävä välittömästi, jos se koskee a-luokan tautia, ja heti kun se on käytännössä mahdollista, jos se koskee muuta luetteloitua tautia, uutta tautia tai muuta torjuttavaa tai valvottavaa eläintautia. Ilmoitus on tehtävä riippumatta siitä, onko näyte lähetetty tutkittavaksi kyseessä olevan eläintaudin varalta tehtävää vai muuta tutkimusta varten.

Luvanvaraisessa toiminnassa tapahtuvista olennaisista muutoksista laboratorion on eläintautilain 65 §:n mukaisesti ilmoitettava viipymättä Ruokavirastolle.

#### Laboratorion valvonta

Ruokavirasto valvoo taudinaiheuttajien käsittelyyn liittyvää luvanvaraista toimintaa eläintautilain 67 §:n mukaisesti. Ruokavirasto voi eläintautilain 92 §:n perusteella peruuttaa taudinaiheuttajan käsittelyyn liittyvän luvan, jos luvan myöntämiselle säädetty edellytykset eivät enää täyty tai laboratorio olennaisesti rikkoo eläinterveyttä koskevia säädöksiä tai niiden nojalla tehtyjä päätöksiä. Lupa voidaan peruuttaa myös, jos toiminta keskeytetään muutoin kuin tilapäisesti.

Eläintautilain 94 a §:n mukaan aluehallintovirasto voi määrätä vähintään 300 euron ja enintään 5 000 euron eläintautivalvonnan seuraamusmaksun sille, joka harjoittaa laboratorion hyväksymistä tai lupaa edellyttävää toimintaa ilman vaadittavaa hyväksymistä tai lupaa.

#### Asianosaisen kuuleminen

Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriota ei ole kuultu luvan myöntämistä koskevassa asiassa, koska kuuleminen olisi hallintolain (543/2003) 34 §:n 2 momentin 5) kohdan mukaisesti ilmeisen tarpeetonta siitä



4 (6)  
**RUOKAVIRASTO**  
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Elintarviketurvallisuusosasto

Mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden yksikkö

**Päätös**

Luvan myöntäminen

**Pvm**/Datum/Date Dnro/Dnr/DNo

31.10.2022 5273/04.02.02.00/2022

syystä, että päätöksellä hyväksytään hakijan vaatimus, joka ei koske toista asianosaista.

---

**Ruokavirasto**  
PL 100, 00027 RUOKAVIRASTO  
Puh. 029 530 0400 (valhde)  
ruokavirasto.fi  
Y-tunnus: 2911686-7

**Livsmedelsverket**  
PB 100, 00027 LIVSMEDELSVERKET  
Tfn 029 530 0400 (växel)  
livsmedelsverket.fi  
FO-nummer: 2911686-7

**Finnish Food Authority**  
P.O. Box 100, FI-00027 FINNISH FOOD AUTHORITY, FINLAND  
Tel. +358 29 530 0400 (switchboard)  
foodauthority.fi  
Business ID: 2911686-7



Elintarviketurvallisuusosasto  
Mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden yksikkö

**Pvm**/Datum/Date    **Dnro/Dnr/DNo**  
31.10.2022    5273/04.02.02.00/2022

#### **Päätöksen voimassaolo**

Tämä päätös on voimassa toistaiseksi.

#### **Muutoksenhaku**

Tähän päätökseen saa hakea muutosta valittamalla Hämeenlinnan hallinto-oikeuteen liitteenä olevasta valitusosoituksesta ilmenevällä tavalla.

#### **Päätöksen maksullisuus**

Tästä päätöksestä peritään MMM:n Ruokaviraston maksullisista suoritteista antaman asetuksen (1193/2021) liitteen kohdan 11.2 mukainen maksu 151 euroa. Lasku toimitetaan erikseen. Tämän päätöksen liitteenä toimitetaan maksua koskeva oikaisuohje.

#### **Säädökset, joihin päätös perustuu**

Eläintautilaki (76/2021) 1, 3, 4, 20, 63, 64, 65, 66, 67, 76, 79, 81, 92, 94, 96, 100 §  
Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus tarttuvista eläintaudeista sekä tiettyjen eläinterveyttä koskevien säädösten muuttamisesta ja kumoamisesta (EU 2016/429) 1, 4, 16, 18 artikla  
Maa- ja metsätalousministeriön asetus muista torjuttavista, valvottavista ja muista ilmoitettavista eläintaudeista, eläintautien ilmoittamisesta sekä mikrobikantojen toimittamisesta (325/2021) 1, 18 §  
Hallintolaki (434/2003) 2 ja 34 §  
Maa- ja metsätalousministeriön asetus Ruokaviraston maksullisista suoritteista (1193/2021), liitteen kohta 11.2

Taija Rissanen  
Ylitarkastaja  
Ruokavirasto



6 (6)  
**RUOKAVIRASTO**  
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

**Päätös**  
Luvan myöntäminen

Elintarviketurvallisuusosasto  
Mikrobiologisen elintarviketurvallisuuden yksikkö

**Pvm**/Datum/Date    Dnro/Dnr/DNo  
31.10.2022                    5273/04.02.02.00/2022

- Liite**                    Rekisteriote laboratorion tiedoista ja toiminnasta, johon lupa on myönnetty  
Valitusosoitus  
Maksua koskeva oikaisuohje
- Lisätietoja**            Taija Rissanen, Ruokavirasto, puh. 0505746308, taija.rissanen@ruokavirasto.fi
- Tiedoksi**                Ahvenanmaan maakuntahallitus Maria Borgström ja Laura Ölander  
Ruokavirasto, Eläinten terveyden ja lääkitsemisen yksikkö Hanna Kuukka-Anttila ja  
Hanna Lounela

**Ruokavirasto**  
PL 100, 00027 RUOKAVIRASTO  
Puh. 029 530 0400 (vaihde)  
ruokavirasto.fi  
Y-tunnus: 2911686-7

**Livsmedelsverket**  
PB 100, 00027 LIVSMEDELSVERKET  
Tfn 029 530 0400 (växel)  
livsmedelsverket.fi  
FO-nummer: 2911686-7

**Finnish Food Authority**  
P.O. Box 100, FI-00027 FINNISH FOOD AUTHORITY, FINLAND  
Tel. +358 29 530 0400 (switchboard)  
foodauthority.fi  
Business ID: 2911686-7





**RUOKAVIRASTO**  
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Tämä asiakirja on laadittu ja allekirjoitettu sähköisesti.  
Dokumentet har uppsatts och undertecknats elektroniskt.  
This document has been digitally prepared and signed.

Taija Rissanen  
Hyväksytty 31.10.2022

---

**Ruokavirasto**  
PL 100, 00027 RUOKAVIRASTO  
Puh. 029 530 0400 (vaihde)  
ruokavirasto.fi  
Y-tunnus: 2911686-7

**Livsmedelsverket**  
PB 100, 00027 LIVSMEDELSVERKET  
Tfn 029 530 0400 (växel)  
livsmedelsverket.fi  
FO-nummer: 2911686-7

**Finnish Food Authority**  
P.O. Box 100, FI-00027 FINNISH FOOD AUTHORITY, FINLAND  
Tel. +358 29 530 0400 (switchboard)  
foodauthority.fi  
Business ID: 2911686-7

## LIITE 3. AHVENANMAAN MAAKUNTAHALLITUKSEN LUPA NÄYTTEIDEN SIIRTÄMISEEN



Avdelning  
Social- och miljöavdelningen Miljöbyrån  
Tjänstemannabeslut

Dokumentnamn	Nr	Sidnr
BESLUT	212 S4	1 (3)
Datum	Dnr	
2022-10-19	ÅLR 2022/5468	

Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Survontie 9 C  
40500 JYVÄSKYLÄ

E-post:  
marja.tirola@jyu.fi  
krista.j.m.norvasuo@jyu.fi

beslutande  
Tillfällig veterinär Laura Ölander

### Dispens för att flytta prover för vetenskaplig forskning

#### Ärende

Forskare Krista Norvasuo och professor Marja Tirola från Jyväskylä universitet har 18.10.2022 ansökt om dispens för att flytta prover för vetenskaplig forskning tagna från Fifax ABs anläggning på Eckerö 9.8.2022. Proverna består av nio 300 ml vattenprover i plastflaskor samt en plastflaska med material från denitrifikationsbassängen. Proverna skulle flyttas med posten till Jyväskylä universitets laboratorium som är BSL2-klassat. Jyväskylä universitet har ansökt om tillstånd enligt 64 § i lag (FFS 76/2021) om djursjukdomar av Livsmedelsverket, men tillståndet är i stunden för skrivandet av detta beslut inte ännu beviljat.

#### Beslut

Landskapsregeringen beviljar Jyväskylä universitet dispens att flytta prover tagna för vetenskaplig forskning från Fifax anläggning på Eckerö till laboratoriet vid Jyväskylä universitet. Dispensen gäller endast ifall Livsmedelsverket ger tillstånd enligt 64 § i lag (FFS 76/2021) om djursjukdomar för att behandla vattenproven (virus av kategori C).

Transporten av proverna ska ske på anvisning av djursjukdomsmyndigheten. Transporten ska ske i slutna behållare. Biosäkerhet, det vill säga förhindrande av oavsiktlig exponering för smittämnen eller oavsiktlig spridning till omgivning och miljö, ska säkerställas under och efter transporten.

#### Motivering

Fisksjukdomen infektiös hematopoietisk nekros (IHN) definieras i enlighet med artikel 9.1 i EU:s djurhälsoförordning som en sjukdom i kategori c som ska bekämpas.

Livsmedelsverket har 22.6.2022 inrättat en i lag (FFS 76/2021) om djursjukdomar 27 § avsedd restriktionszon på det område som omgärdar den plats där sjukdomen fisksjukdomen Infektiös hematopoietisk nekros (IHN) förekommer.

Ålands landskapsregering har 22.6.2022 i enlighet med lagen om djursjukdomar 25 § tagit ett beslut om åtgärder för förhindrande av spridning av djursjukdomen Infektiös hematopoietisk nekros (IHN) vid Fifax abs anläggning. Enligt landskapsregeringens beslut är det förbjudet att från anläggningen föra bort biprodukter av vattenlevande djur, ämnen eller redskap som kan sprida sjukdomen.

Enligt 30 § 9 punkten i självstyrelselagen (ÅFS 1991:71) för Åland ska de uppgifter som enligt lagstiftningen om bekämpning av smittsamma sjukdomar hos husdjur ankommer på en riksmyndighet eller på kommunerna i landskapet skötas av landskapsregeringen eller någon annan myndighet som anges i landskapslag.

Ålands landskapsregering får därför i enskilda fall ge dispens från förbud och åtgärder som gäller beslut om åtgärder för förhindrande av spridning av djursjukdomar enligt 29 § lagen om djursjukdomar 29 §.

Enligt 29 § 2 mom. lag om djursjukdomar ska landskapsregeringen i dispensen uppställa sådana villkor som är nödvändiga för att bekämpa djursjukdomen. Landskapsregeringen bedömer det nödvändigt att förena beslutet om dispens med villkor.

Ålands landskapsregering bedömer att risken för att djursjukdomen IHN sprids kan uteslutas genom aktuell hantering och därför motiveras inte ett avslag på begäran om dispens, om hanteringen görs enligt de anvisningar som Ålands landskapsregering anger.

Ålands landskapsregering beviljar Jyväskylä dispens för att flytta prover tagna för vetenskaplig forskning, ifall Livsmedelsverket ger tillstånd för att behandla vattenproven.

#### **Tillämpade lagrum**

Europaparlamentets och rådets förordning (EU) 2016/429  
Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2018/1882  
Lag om djursjukdomar (FFS 76/2021)  
Självstyrelselag för Åland (ÅFS 1991:71)  
Förvaltningslag för landskapet Åland ÅFS 2008/9

#### **Ändringssökande**

Ändring av beslutet kan sökas hos Högsta förvaltningsdomstolen.  
Besvärsanvisning bifogas beslutet.

**För kännedom**

Livsmedelsverket (taudintorjunta@ruokavirasto.fi, hanna.kuukka-  
anttila@ruokavirasto.fi, hanna.lounela@ruokavirasto.fi)  
Näringsavdelningen

**Bilaga**

Besvärсанvisning

### **Närmare information om hur besvärstiden beräknas**

Besvärsskriften ska inlämnas inom 30 dagar från datumet då mottagaren fått del av beslutet. Då besvärstiden beräknas ska den dag då delgivningen sker inte medräknas. Om den sista dagen av besvärstiden är en helgdag, självständighetsdag, första maj, julafton, midsommarafton eller helgfri lördag fortsätter besvärstiden också följande vardag.

Dagen för delgivningen beräknas på följande sätt:

- Offentlig delgivning – Om beslutet har delgivits via offentlig delgivning anses mottagaren ha fått del av beslutet den sjunde dagen efter det att beslutet publicerades på myndighetens elektroniska anslagstavla.
- Vanlig delgivning – Om beslutet har postats som vanligt brev anses mottagaren ha fått del av beslutet den sjunde dagen efter det att brevet avsändes, om inte något annat visas.
- Bevislig delgivning – Om beslutet har sänts per post mot mottagningsbevis, framgår datumet för då mottagaren fått del av beslutet av mottagningsbeviset. Om beslutet har överlämnats till mottagaren eller dennes lagliga företrädare eller ombud framgår dagen då mottagaren fått del av beslutet av det skriftliga bevis som upprättats över delgivningen.
- Mellanhandsdelgivning – Om beslutet inte har lämnats direkt till mottagaren eller dennes lagliga företrädare eller ombud anses mottagaren ha fått del av beslutet den tredje dagen efter den dag som framgår av delgivningsbeviset.
- Vanlig elektronisk delgivning – Om beslutet delgivits som ett elektroniskt meddelande anses mottagaren ha fått del av beslutet den tredje dagen efter att meddelandet sändes, om inte något annat visas.
- Bevislig elektronisk delgivning – Om beslutet har delgivits bevisligen genom ett elektroniskt meddelande anses mottagaren ha fått del av beslutet när det har hämtats från den länk som myndigheten anvisat.

Besvärsskriften ska vara inlämnad till högsta förvaltningsdomstolen senast kl. 16.15 på besvärstidens sista dag. Denna tidsfrist gäller även besvär som skickas via förvaltnings- och specialdomstolarnas e-tjänst eller per e-post.

## **Besvär­anvisning**

### **Besvär­myndighet**

Den som är missnöjd med detta beslut kan söka ändring i det hos högsta förvaltningsdomstolen genom skriftliga besvär. Besvär kan anföras av den som beslutet avser eller vars rätt, skyldighet eller fördel beslutet direkt påverkar.

### **Besvär­tid**

Besvär ska anföras skriftligt inom 30 dagar från att beslutet har delgivits. Närmare information om hur besvärstiden beräknas finns på omstående sida.

### **Besvär­skriftens innehåll**

I besvärsskriften ska uppges:

- ändringssökandens namn och kontaktuppgifter, inklusive uppgifter om hemkommun samt postadress och eventuell annan adress till vilken handlingar som hänför sig till ärendet kan sändas
- det beslut i vilket ändring söks
- redogörelse över till vilka delar ändring söks i beslutet, vilka ändringar som yrkas samt grunderna för yrkandena.

Om ändringssökandens talan förs av dennes lagliga företrädare eller ombud eller om någon annan person har uppgjort besvären, ska i besvärsskriften även uppges namn och hemkommun för denna person. Ändringssökanden, den lagliga företrädaren eller ombudet ska underteckna besvärsskriften.

### **Bilagor till besvär­skriften**

Till besvärsskriften ska fogas:

- det överklagade beslutet, i original eller som kopia,
- intyg över vilken dag beslutet har delgivits eller annan utredning över när besvärstiden har börjat,
- de handlingar som ändringssökanden åberopar till stöd för sina yrkanden, om dessa inte redan tidigare har lämnats till landskapsregeringen och
- fullmakt för eventuellt ombud, om ombudet inte är en advokat eller ett offentligt rättsbiträde.

### **Inlämning av besvär­skriften**

Besvärsskriften ska inom besvärstiden lämnas till högsta förvaltningsdomstolen på adressen Högsta förvaltningsdomstolen, PB 180, 00131 HELSINGFORS, eller elektroniskt på adressen [korkein.hallinto-oikeus@oikeus.fi](mailto:korkein.hallinto-oikeus@oikeus.fi). Besvärsförfarandet kan även i sin helhet skötas elektroniskt via förvaltnings- och specialdomstolarnas e-tjänst, se närmare information om e-tjänsten på adressen [www.regeringen.ax/besvar](http://www.regeringen.ax/besvar)

### **Avgifter**

Rättegångsavgiften till högsta förvaltningsdomstolen är 530 euro. I lagen om domstolsavgifter (FFS 1455/2015) finns bestämmelser om de fall då avgift inte tas ut. Närmare upplysningar om avgifterna lämnas av högsta förvaltningsdomstolen.

## LIITE 4. LABORATORION REKISTERIOTE, RUOKAVIRASTO



**RUOKAVIRASTO**  
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

REKISTERIOTE  
Nimetty tai rekisteröity  
laboratorio

Pvm/Datum/Date

28.10.2022

---

Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Survontie 9 C  
40500 JYVÄSKYLÄ

### RUOKAVIRASTON REKISTERISSÄ OLEVAT TUTKIMUKSET

#### Eläintaudit (c-luokka), käsittelylupa

Tutkimus	Menetelmä	Lisäietoa
IHN-tauti	RT-PCR/EURL protokolla	Taudinaiheuttajan käsittely tieteellisen tutkimuksen yhteydessä

Eläintautilain 64 §:n nojalla taudinaiheuttajien käsittelyyn luvan saaneet laboratoriot ovat Ruokaviraston rekisteröimiä. Rekisteriin merkitään laboratorion tiedot ja luvanvarainen toiminta.

## LIITE 5. IHNV-TAUTISUOJAUSJÄRJESTELMÄ

Jyväskylän yliopisto/Bio- ja ympäristötieteiden laitos/Survontie 9C,  
Jyväskylä/MT31.8.2022

### IHN (Infectious Haematopoietic Necrosis) viruksen tautisuojausjärjestelmä vs. 1.2

#### Tausta

IHN-virustauti on rhabdoviruksen aiheuttama lohikalajien vertamuodostavan kudoksen kuoliotauti. Virukset voivat tarttua myös muihin kalalajeihin. Virukset eivät tartu maaeläimiin, eikä tartunnan saanutta kalaa syöväälle ihmiselle tai muulle tasalämpöiselle eläimelle aiheudu terveysvaaraa. Tauti leviää sairaiden kalojen, oireettomien kantajien ja ympäristötekijöiden välityksellä. IHN on lainsäädännön nojalla vastustettava, C-luokan eläintauteihin luokiteltu tauti. Suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla on todettu kolme IHN-epidemiaa (Tervo/Kaavi/Nurmes 2017, viisi tartuntapaikkaa Ahvenanmaalla 2021 ja Fifaxin kiertovesilaitos Eckerössä 2022). Tautiin ei ole olemassa lääkkeitä eikä toimivaa rokotetta. Jotta IHN-viruksen tartuntareittejä ja ympäristövaarallisuutta voidaan arvioida, JyU:ssa on tarkoitus arvioida IHN-viruksen määrää kalaviljelylaitoksen vesi- ja ympäristönäytteistä RT-qPCR-testillä EURL:n protokollan mukaan <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/-/media/sites/eurl-fish-crustacean/fish/diagnostic-manuals/ihn-and-vhs/vhsv-and-ihn-diagnostic-manual-v2021-2.pdf>

#### Näytteen käsittelyssä huomioitavaa:

- Näyte on mahdollisesti kaloille infektiivinen vesinäyte tai muu ympäristönäyte, joten näytteiden käsittely, säilytys, suodatus ja inaktiivointi tapahtuu Survontie 9C YAB2-siiven BSL2-tilassa. Avoimena oleva materiaali käsitellään bioturvakaapissa. Materiaalit dekontaminoidaan ennen ros kiin tai viemäriin laittamista tai ennen DNA/RNA-näytteen siirtoa eristysautomaatille BSL2-tilan ulkopuolelle. Jos näytteistä epäillään löytyneen muuta kuin tutkittavaa virusta, ilmoitetaan löydöksestä paikalliseen AVLin.

#### Henkilökohtaiset suojaimet:

- suojakäsineet – lyhytvartiset
- hihansuojat
- laboratoriotakki
- laboratorioskengät (desinfioitavat)

Hihansuojat ja suojakäsineet autoklavoidaan ennen kuin ne hävitetään yhdyskuntajätteenä. Laboratoriotakkia, lasia ja kenkiä käytetään vain BSL-2 tilassa. Jos ne poistetaan tilasta, ne dekontaminoidaan kuivakäsittelyllä +37 °C lämpötilassa O/N ennen viemistä laboratorion ulos.

#### Näytepaketin käsittely:

1. Näytteet säilytetään joko avaamattomassa paketissaan kylmätilassa tai BSL2-tilassa. Paketti avataan BSL2-tilassa ja paketin putket avataan bioturvakaapissa. Suljetut näytteet käsitellään BSL2-tilassa ja säilytetään kylmähuoneessa tai pakasteessa suljettavissa muovilaatikoissa BSL2-tilassa.
2. Kuljetuslaatikot dekontaminoidaan sisä- ja ulkopuolelta ennen BSL2-tilasta ulos ottamista.
3. Ylimääräinen näyte, poistettavat putket ja suodatusjäännökset dekontaminoidaan joko 0.2 M NaOH:lla, Virkonilla tai lämpökäsittelyllä ennen roskikseen laittamista tai viemäriin laskemista.

#### Dekontaminaatiomuodot:

- 70 % EtOH (pinnat)
- 0.2 M NaOH-liuoksessa vuorokausi (nesteet)
- 2.9 M guanidiini-tiosyanaattiliuos, lämmitys 56°C 15 min (DNA/RNA-näytteet)
- 30 min 1% Virkon-liuoksessa (nesteet, valmistus 1 tabletti + 500 ml hanavettä/näytevettä,)
- autoklavointi 121 °C (kiinteät materiaalit, pipetinkärjet)
- lämpökäsittely +70 °C tunnin ajan (kuivat tavarat, kuten tyhjä lasipullot)
- kuivakäsittely +37 °C yli 12 h (pipetit ym. kuivat tavaroille, jotka eivät ole suorassa kontaktissa)

#### Tuhottavat vesinäytteet:

- Kaadetaan kanisteriin, jossa pohjalla 1:10 tilavuudesta 2 M NaOH:ta.  
Täytetty kanisteri säilytetään lopuksi ainakin 1 vrk ennen kuin kaadetaan viemäriin.

#### Tuhottavat ympäristönäytteet:

- Nestemäiset näytteet dekontaminoidaan 0.2 M NaOH:lla vesinäytteiden kanssa.
- Kiinteät näytteet autoklavoidaan tai lämpökäsitellään +70 °C tunnin ajan.



## LIITE 6. PROTOKOLLA VIRUSTEN HAVAINNOINTIIN VESINÄYTTEESTÄ

Työskennellessä tulee noudattaa tarkkaavaisuutta ja oikeaoppisia työskentelytapoja. Näytteet kannattaa valmistella erillisessä tilassa PCR-laitteesta DNA-kontaminaation välttämiseksi. Protokolla on optimoitu käyttäen suolapitoisuudeltaan 0,7 %:sta vesinäytettä. RT-qPCR-testi voidaan tehdä yhtäaikaaisesti kahdelle virukselle, ja tässä työssä testi optimoitiin IHN:n ja VHSV:n detektointiin. Testiin on suositeltavaa lisätä myös sisäinen kontrolli käyttämällä ajossa kalan RNA:ta havaitsemiseen tarkoitettuja alukkeita ja koetinta, jolloin voidaan varmistua testin toimivuudesta tapauksissa, joissa virusten testitulokset on negatiivinen. Lisäksi testiin lisätään negatiivinen kontrolli kontaminaation havaitsemiseksi. Alukkeiden ja koettimien sekvenssit on esitetty seuraavassa taulukossa:

Nimi	Sekvenssi (5' - 3')
IHN Forward -aluke	AGAGCCAAGGCACTGTGCG
IHN Reverse -aluke	TTCTTTGCGGCTTGGTTGA
IHN-koetin	6-FAM-AGCGGGACAGGRATGACAATGGTG-BHQ1
VHS Forward -aluke	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC
VHS Reverse -aluke	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA
VHS-koetin	ROX-TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG-BHQ2
Kala Forward -aluke	CCACCGGTATCGTCATGGA
Kala Reverse -aluke	CGTAGCCCTCGTAGATGGGTACT
Kala-koetin	HEX-TCCGGTGACGGCGTGACCCACA-BHQ1

- Vesinäyte (15 ml) ultrasuodatetaan Amicon-ultrasuodattimella (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Millipore, UFC9010, 10 kDa MWCO) (4000 g, 45 min). Suodattimen voi täyttää useamman kerran, jos uudelleentäyttö ja nesteen poistaminen ultrasuodatusputkesta voidaan suorittaa bioturvallisesti.
- Ultrasuodattimen yläosaan jäänyt näyte (200 - 400 µl) poistetaan suodattimesta, ja näytteelle tehdään RNA-eristys sopivalla kitillä (esim. Quick-RNA Viral Kit, R1034, Zymo Research).
- Jos kittinä käytetään myös DNA:ta eristävää kittiä, tulee näytteelle tehdä dsDNase-käsittely kaksijuosteisen DNA:n poistamiseksi (esim. dsDNase, #EN0771, Thermo Scientific). Tämä vaihe vähentää DNA:n aiheuttamaa häiriötä RT-qPCR-reaktion RT-vaiheelle.

- Mastermix kahden viruksen RT-qPCR-testiä varten valmistetaan seuraavan taulukon mukaisesti, ilman templaattia:

Tuote	Pitoisuus reaktiossa
qScript (2x)	1x
UNG (5 U/ $\mu$ l)	0,05 U / $\mu$ l
dUTP (10 mM)	0,5 mM
Forward-aluke A (20 $\mu$ M)	800 nM
Reverse-aluke A (20 $\mu$ M)	800 nM
Koetin A (10 $\mu$ M)	200 nM
Forward-aluke B (20 $\mu$ M)	800 nM
Reverse-aluke B (20 $\mu$ M)	800 nM
Koetin B (10 $\mu$ M)	200 nM
Templaatti-RNA	-
dH <sub>2</sub> O	-
Reaktion kokonaistilavuus	50 $\mu$ l

- Mastermixin voi valmistella myös vain yhden kohteen havaitsemiseksi, jolloin joko näytteen tai veden määrää kasvatetaan alukkeiden ja koettimen tilavuuden verran.
- Mastermix jaetaan qPCR-stripille tai -levylle, ja templaatti lisätään kuoppiin. Lisätään kansi ja 96-kuoppalevyä käyttäessä tiivistematto, ja suoritetaan RT-qPCR-ajo seuraavilla asetuksilla:

Vaihe	Lämpötila (°C)	Kesto
1. UNG-inkubaatio	30	5 min
2. RT-reaktio	50	10 min
3. Alkudenaturaatio	95	1 min
Vaiheita 4-7 toistetaan 45 kertaa		
4. Denaturaatio	94	15 s
5. Alukkeiden sitoutuminen	60	40 s
6. Pidentyminen	72	20 s
7. Kuva		

- Testitulosta voidaan pitää positiivisena, jos testin kohteen C<sub>q</sub>-arvo on pienempää kuin 35, eikä ole syytä epäillä kontaminaatiota. Koska EURL:n ohjeistuksessa, jota myös Ruokavirasto noudattaa, protokollana käytetään soluviljelytestiä, vesinäytteestä tehtävän RT-qPCR-testin tulokset ovat vain suuntaa-antavia, ja virallinen testitulos tulee olla soluviljelymenetelmällä tehdyn testin tulos.