

Uudet menetelmät työkaluna norovirusten epidemiaselvityksessä

Haider Al-Hello
Erikoistutkija, INFO/INVI



TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS



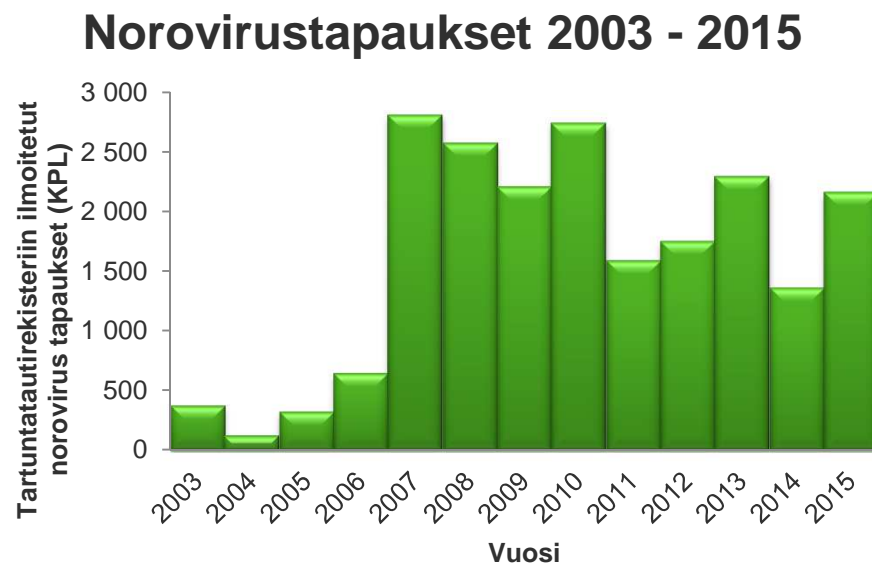
8.2.2016

Uudet menetelmät työkaluna norovirusten epidemiaselvityksessä/ Haider al-Hello

1

Ripulitauteja aiheuttavat virukset

- Norovirukset
- Rotavirukset
- Adenovirukset (serotyypit 40 ja 41)
- Sapovirukset
- Astrovirukset



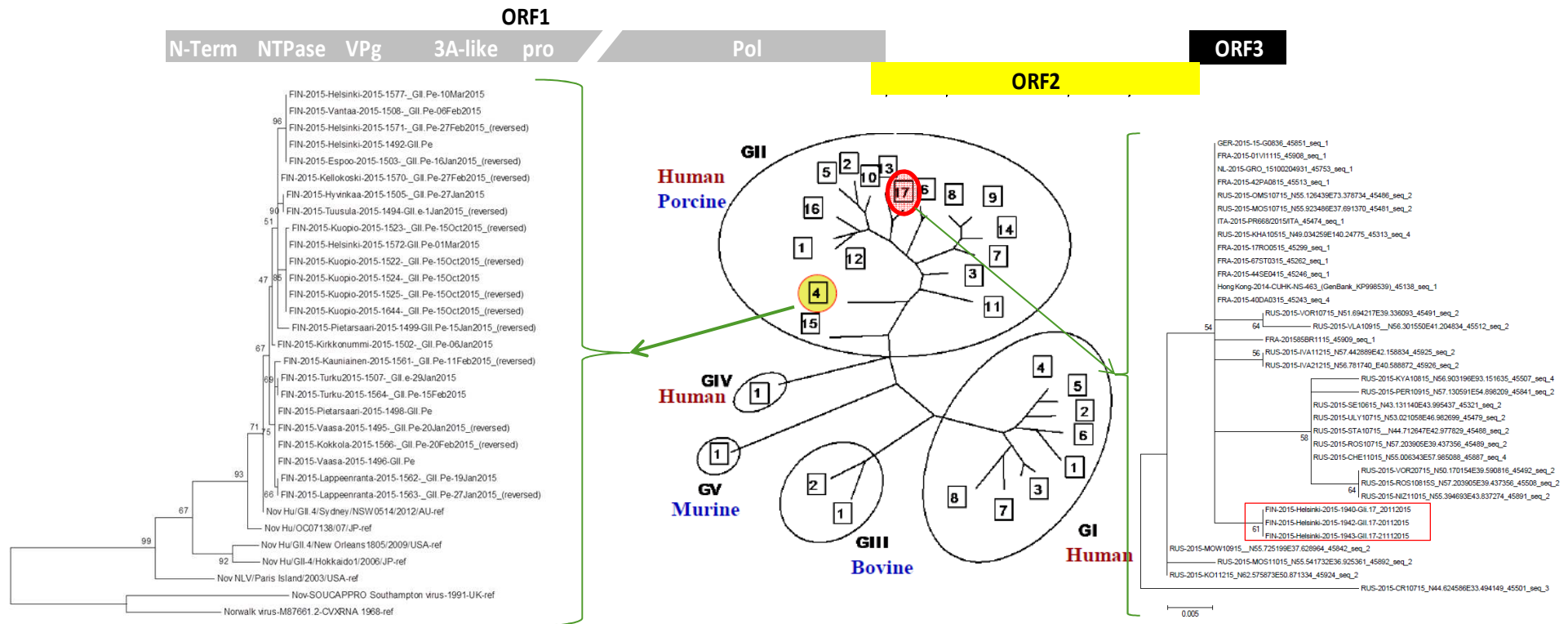
Akuuttien gastroenteriittien aiheuttamien epidemioiden lukumäärä on lisääntynyt maailmanlaajuisesti



Norovirus

- Akuutin suolistotulehduksen yleisin aiheuttaja.
- Voi aiheuttaa sairauden lähes jokaisessa
 - Lapsista vanhuksiin.
 - Virus ei tuota pitkäaikaista immuniteettia.
- Oireina akuutti ripuli, oksentelu, vatsan kouristelu, kuume ja väsymys
- Infektiivisyys 10-100 viruspartikkelia
- Infektoituneiden potilaiden ulosteessa virusta $10^{10-12}/g$.

Norovirukset → Caliciviridae



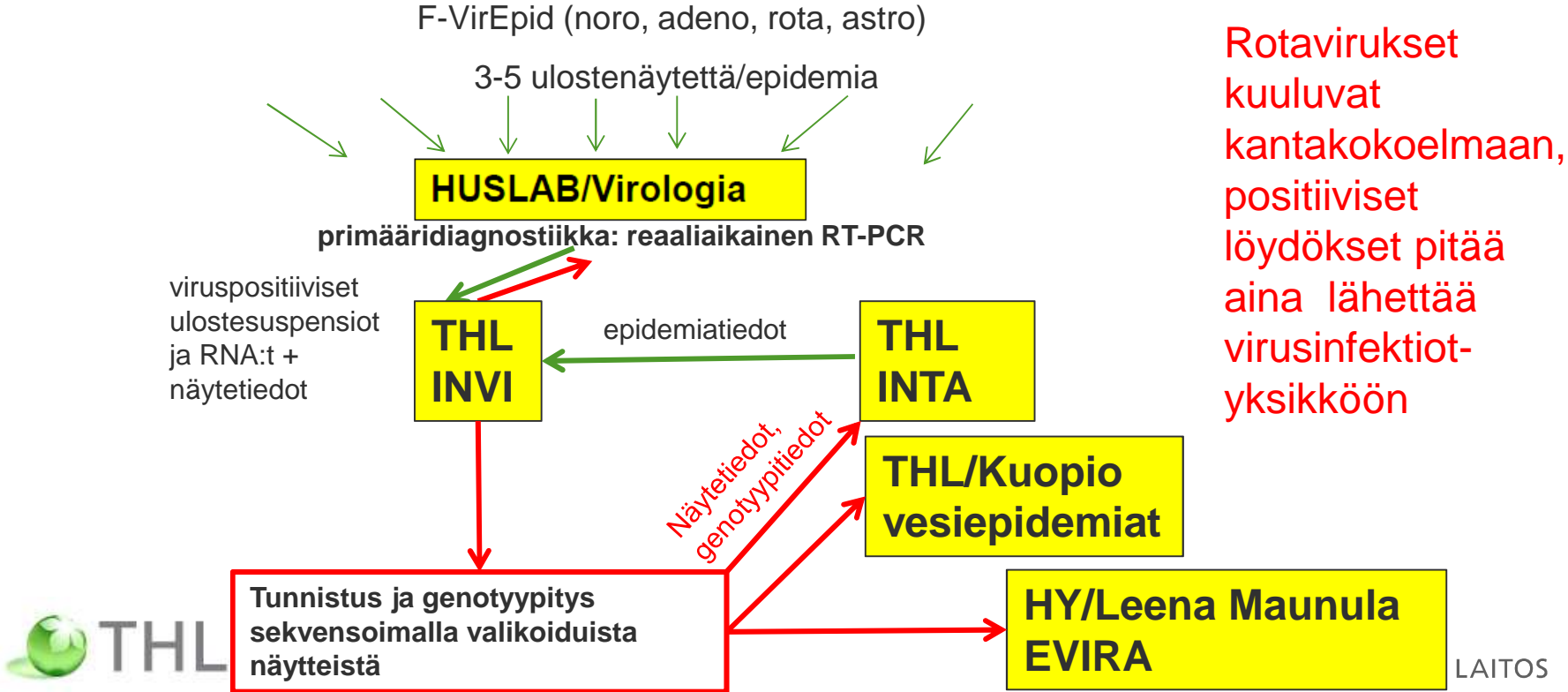
TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS

8.2.2016

Uudet menetelmät työkaluna norovirusten epidemiaselvityksessä/ Haider al-Hello

4

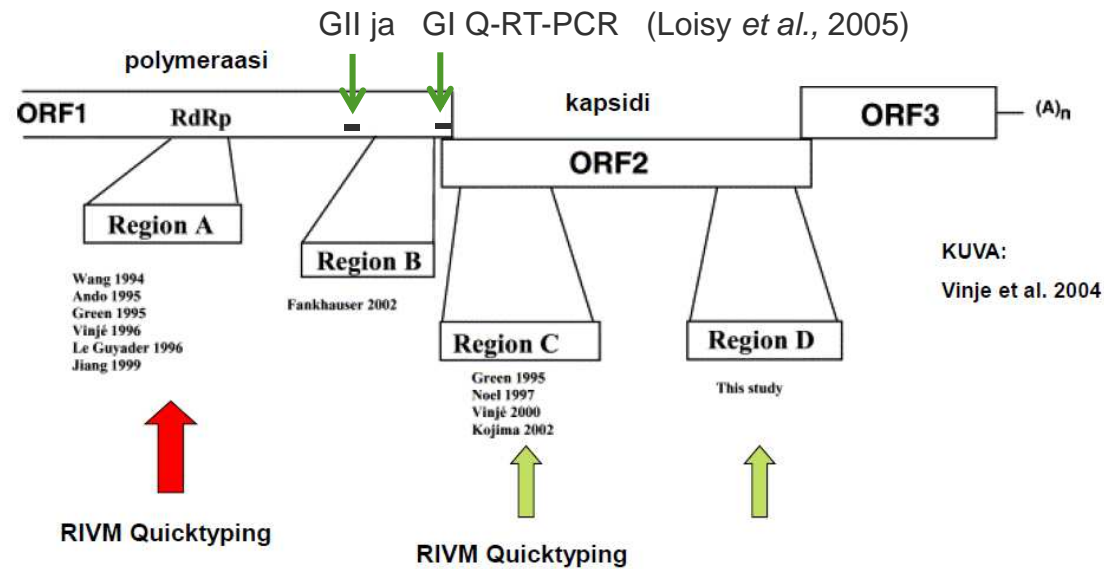
Ruoka- ja vesivälitteisten epidemioiden selvittäminen – potilasnäytteiden mikrobiologiset tutkimukset



NOROVIRUSDIAGNOSTIIKKA

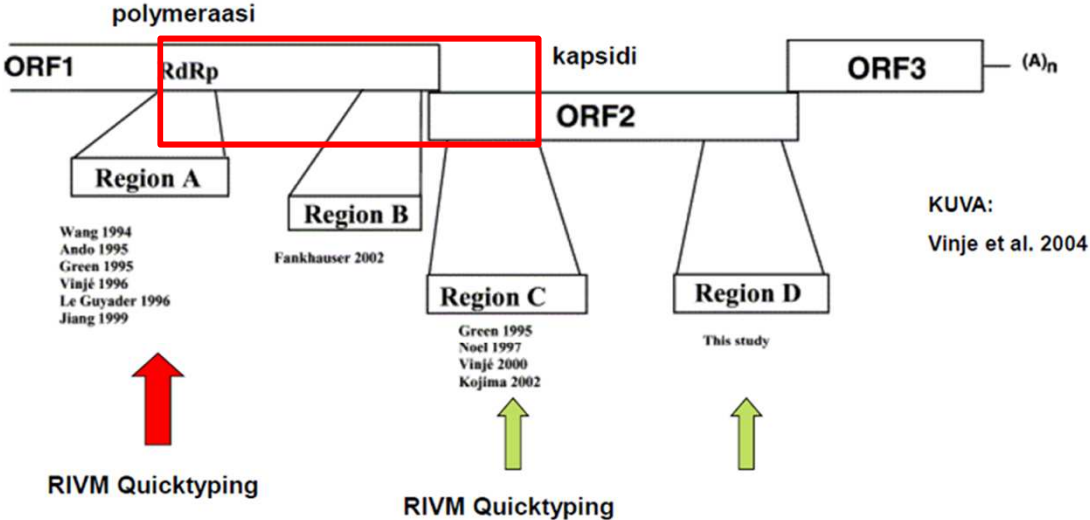
- **VIRUKSEN OSOITUS:**
 - ELEKTRONIMIKROSKOPIA
- **ANTIGEENIN OSOITUS:**
 - ELISA
- **PERIMÄN OSOITUS:**
 - Q-RT-PCR: GI, GII-TUNNISTUKSET (diagnostiikka)
 - RT-PCR: Polymeraasi / kapsidialueen tyypitykset
 - Sekvensointi: genotyyppitys (epidemian tunnistus ja jäljitys)

Tyypitys- ja tunnistusalueet



Rekombinaatio yleistä norovirusilla; cross-over site useimmiten ORF1-ORF2-junction

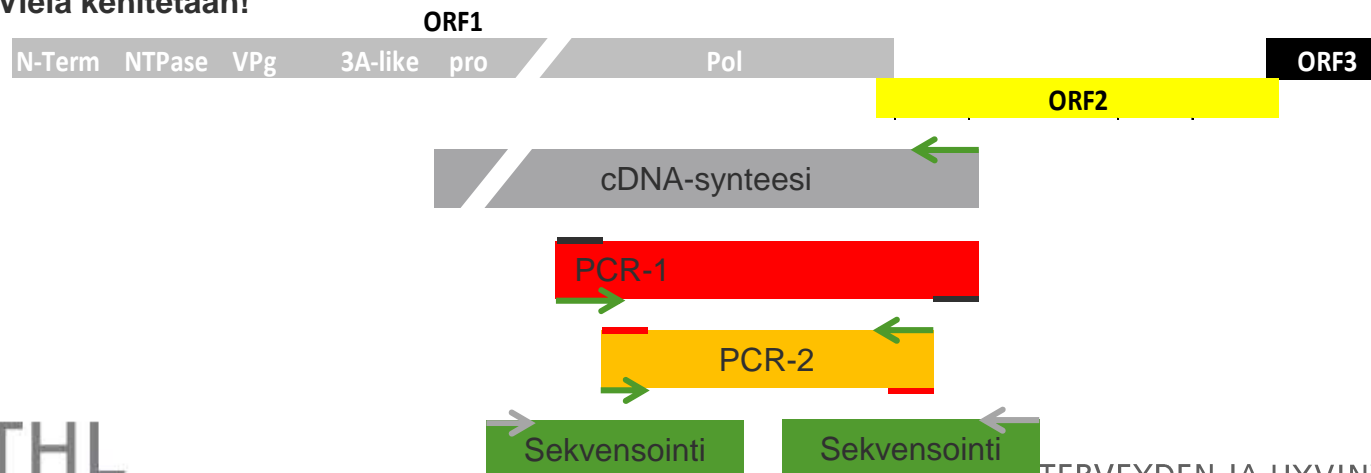
Norovirus nested- PCR



Rekombinaatio yleistä norovirusilla; cross-over site useimmiten ORF1-ORF2-junction



- Kolmivaiheinen PCR
 1. cDNA synteesi. Yksi aluke molemmille genoryhmille.
 2. PCR1. Genoryhmä-spesifiset alukeet.
 3. PCR2. PCR1 sisäpuolella myös genoryhmä-spesifiset alukkeet.
- 1kb sekvenssi verrattuna A-alueen sekvenssiin 0,3 kb.
- Tietomäärä on huomattavasti parempi.
- Rekombinanttikannat löytyvät yhdellä sekvensointi- menetelmällä.
- Menetelmä on hinnaltaan 5 euroa kalliimpi kuin alueen A tyypitysmenetelmä.
- Vielä kehitetään!



Norovirus NGS

Näyte-numero	lähettäjä
2014-923	Nordlab (Oulu)
2014-924	Nordlab (Oulu)
2014-925	Nordlab (Oulu)
2014-926	Nordlab (Oulu)
2014-927	HUSLAB (Tampere)
2014-928	HUSLAB (Tampere)
2014-929	HUSLAB (Tampere)
2014-930	HUSLAB (Tampere)
2014-931	HUSLAB (Tampere)
2014-972	HUSLAB (Tampere)
2014-972	HUSLAB (Tampere)
2014-974	HUSLAB (Tampere)
2014-975	HUSLAB (Tampere)
2014-976	HUSLAB (Tampere)
2014-977	HUSLAB (Tampere)
2014-978	HUSLAB (Tampere)
2014-979	HUSLAB (Tampere)
2014-980	HUSLAB (Tampere)
2014-981	HUSLAB (Tampere)
2014-982	HUSLAB (Tampere)

Uimavesi-epidemia

Uimavesiepidemiaan kuuluvia näytteitä.
Tullut THL:n Virusinfektiot-yksikköön 8.8.2014



Uimavesi- epidemia

näyttenumero	lähettäjä	tulos PVM	Tulos	Huomioitavaa
2014-868	HUSLAB	14.8.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-923	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	-	Huonoa sekvenssiä
2014-924	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-925	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-926	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-927	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GII.2	
2014-928	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-929	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-930	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	-	Huonoa sekvenssiä
2014-931	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.4	
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Unassigned
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-974	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Unassigned
2014-975	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-976	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	
2014-977	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-978	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-979	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Bakteeri sekvensi
2014-980	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-981	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-982	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	Näytteessä oli 2 eri genoryhmään kuuluvia viruksia siksi sekvensoitiin kapsidi (ei fylogeneettisessa puussa)



Uimavesi- epidemia

näyttenumero	lähettäjä	tulos PVM	Tulos	Huomioitavaa
2014-858	HUSLAB	14.8.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-923	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	-	Huonoa sekvenssiä
2014-924	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-925	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-926	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-927	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GII.2	
2014-928	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-929	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-930	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	-	Huonoa sekvenssiä
2014-931	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.4	
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Unassigned
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-974	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Unassigned
2014-975	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-976	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	
2014-977	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-978	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-979	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Bakteeri sekvensi
2014-980	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		Huonoa sekvenssiä
2014-981	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-982	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	Näytteessä oli 2 eri genoryhmään kuuluvia viruksia siksi sekvensoitiin kapsidi (ei fylogeneettisessa puussa)



Näytteiden käsittely Versio 1.0

Näyte

suspensio

RNA-eristys

sscDNA-synteesi random hexamereilla

Primereiden puhdistus CleanUp kitillä

DNA-sekvensointi ja genomiikkalaboratorio, Biotekniikan instituutti

- ss cDNA → ds cDNA → sekvensointikirjaston valmistaminen
- Paired-end sekvensointi Illuminan MiSeq-laitteella
- Sekvenssien analyysi
 - Sekvenssien trimmaus ja laatutarkistus
 - Assembly = Sekvenssien kokoaminen päällekkäin menevistä sekvenssijaksoista
 - Tuloksena contigeja = päällekkäisistä sekvensseistä yhdistelemällä muodostettu yhtenäinen sekvenssi
 - Contigien blastaus (=’vertailu’) geenipankin sekvenssejä vastaan

näyttenumero	lähettäjä	tulos PVM	Tulos	1. NGS
2014-868	HUSLAB	14.8.2014		GII.2
2014-923	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	-	GI.2
2014-924	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-925	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-926	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2	
2014-927	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GII.2	
2014-928	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-929	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2	
2014-930	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	-	
2014-931	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.4	
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		No blast hit
2014-974	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		
2014-975	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		
2014-976	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	
2014-977	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	GI.2
2014-978	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-979	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		
2014-980	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		
2014-981	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	
2014-982	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4	

Tulos

Fylogeneettinen puu



Näytteiden käsittelyä muokattiin Versio 2.0

Näyte

suspensio

Spin-X filteri putket 0,22µm

DNAasi/RNAasi käsittely + lopuksi inhibiittorit

RNA-eristys

sscDNA-synteesi random hexamereilla

Random hexamerien puhdistus
CleanUp kitillä

DNA-sekvensointi ja genomiikkalaboratorio, Biotekniikan instituutti

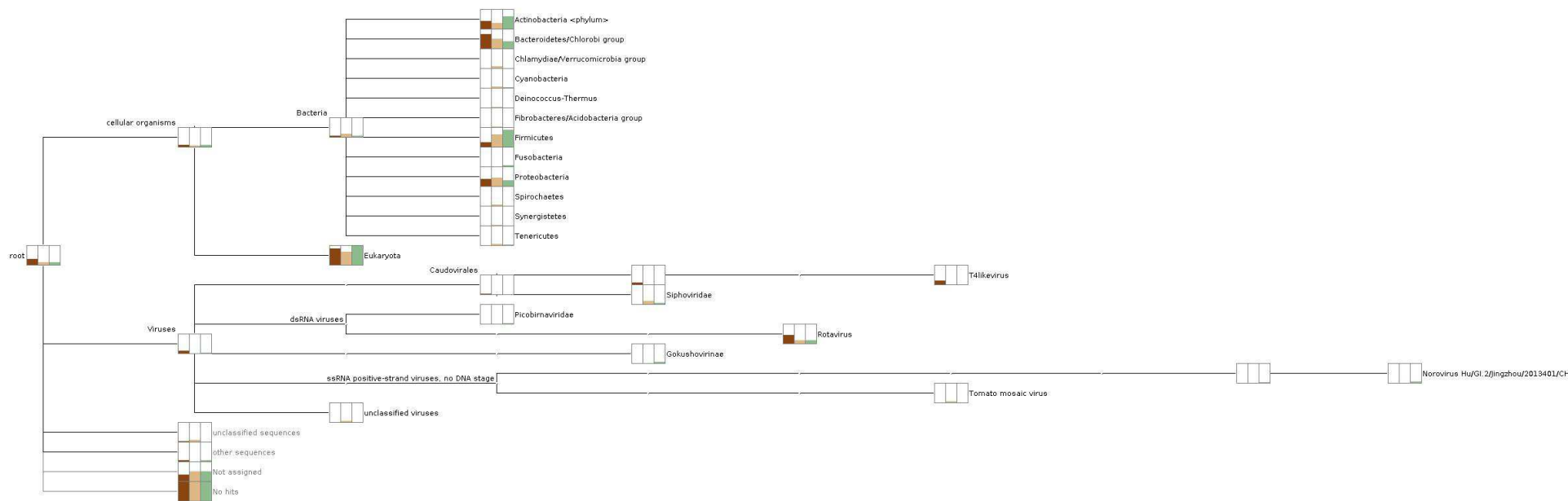
- ss cDNA → ds cDNA → sekvensointikirjaston valmistaminen
- Paired-end sekvensointi Illuminan MiSeq-laitteella
- Sekvenssien analyysi
 - Sekvenssien trimmaus ja laatu tarkistus
 - Assembly = Sekvenssien kokoaminen päällekkäin menevistä sekvenssijaksoista
 - Tuloksena contigeja = päällekkäisistä sekvensseistä yhdistelemällä muodostettu yhtenäinen sekvenssi
 - Contigien blastaus (=’vertailu’) geenipankin sekvenssejä vastaan
 - Lisäksi työn alla: Assembloimattomien readien alkuperän selvitys

Tulokset – toinen kokeilu

- Edelleen suurinosa sekvensseistä ulosteelle tyypillisiä bakteereja
- Enemmän virussekvenssiä kuin ensimmäisessä kokeilussa
- Viruslöydökset
 - Rotavirus
 - Norovirus
 - Lisäksi muita viruksia (nämä vaativat lisätarkastelua)
- Viruslöydöksissä selkeitä sekvenssi-kattavuuseroja näytteiden sisältämän viruksen määrässä



Tulokset – toinen kokeilu

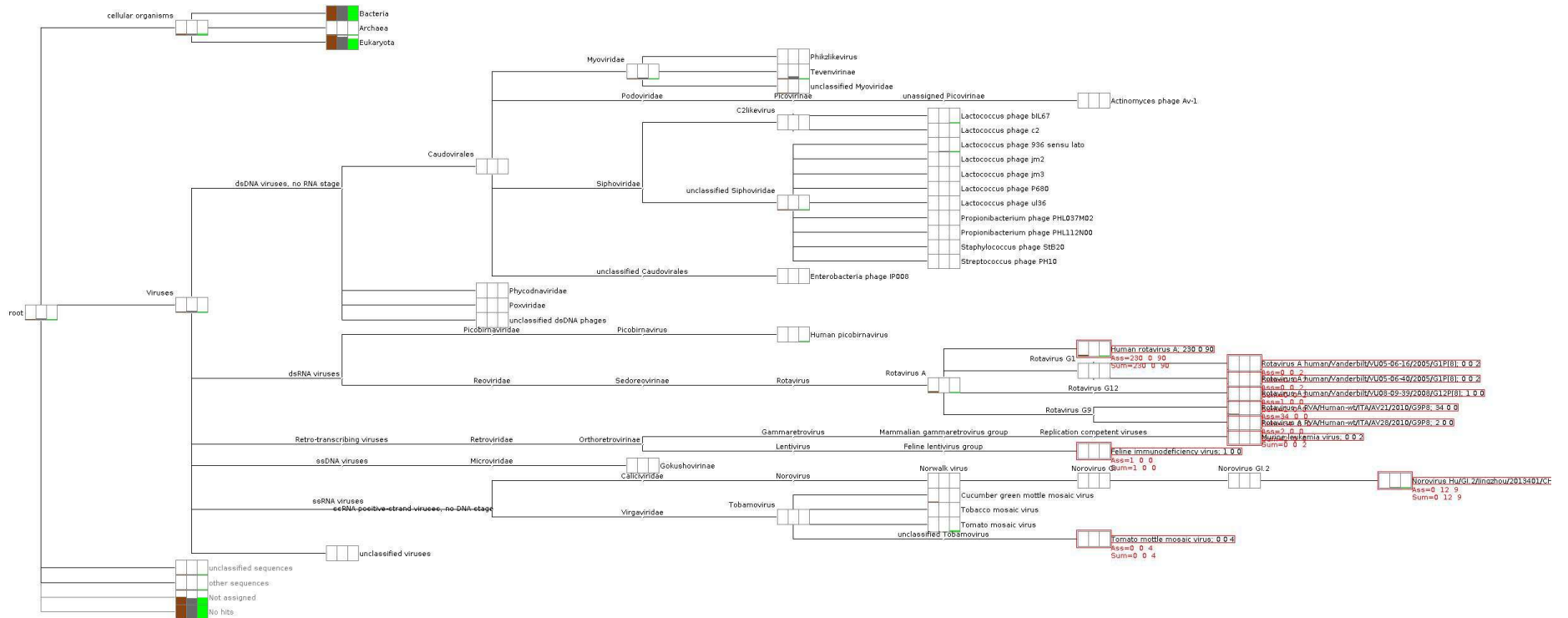


Legend:

972.19102105.blastn 974.19102015.blastn 924.19102015.blastn



TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS



Legend:

924.nonassembled-1 972.nonassembled.reads.fasta 974.nonassembled.reads.fasta



näytteenumero	lähettäjä	tulos PVM	Tulos	1. NGS	2. NGS
2014-868	HUSLAB	14.8.2014		GII.2	
2014-923	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	-	GI.2	
2014-924	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2		GI.2/Rotavirus
2014-925	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2		
2014-926	Nordlab (Oulu)	14.8.2014	GI.2		
2014-927	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GII.2		
2014-928	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2		
2014-929	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.2		
2014-930	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	-		
2014-931	HUSLAB (Tampere)	14.8.2014	GI.4		
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014			
2014-972	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014		No blast hit	GI.2/Rotavirus
2014-974	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014			GI.2/Rotavirus
2014-975	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014			
2014-976	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4		
2014-977	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2	GI.2	
2014-978	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2		
2014-979	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014			
2014-980	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014			
2014-981	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.2		
2014-982	HUSLAB (Tampere)	4.9.2014	GI.4		

Kiitos

- THL

Carita Savolainen-Kopra

Soile Blomqvist

Haider al-Hello

Svetlana Kaijalainen

Alena Kaijalainen

Päivi Hirttiö

- DNA-sekvensointi ja genomiikka laboratorio Biotekniikan instituutti

Petri Auvinen

Lars Paulin

Päivi Laamanen

Pia Laine

- RIVM

Harry Vennema

