

**PUUGILIHKIDEST *IXODES RICINUS* JA *IXODES PERSULCATUS*  
HAIGUSTEKITAJATE *BORRELIA BURGDOFFERI S.L* JA  
PUUKENTSEFALIITVIIRUSE TUVASTAMINE**

## **1 TÖÖPÕHIMÕTE / MEETODI LÜHIKIRJELDUS**

Haigustekitajate tuvastamise materjaliks on puukidest eraldatud nukleiinhapped (NA). Eraldatud nukleiinhapped on eelduseks *Borrelia burgdorferi s.l* (BBSL) ning puukentsefaliitviiruse (ingl. *Tick-Borne Encephalitis Virus*, TBEV) tuvastamiseks. Tuvastuskitiks on VIASURE Tick Borne Diseases Real Time PCR Detection Kit. PCR analüüs viiakse läbi termotsükleris Bio-Rad CFX96 Dx Real-Time System.

## **2 TÖÖKÄIK**

### **2.1 Sissejuhatus**

Meetodi raames kasuta PCR kitti VIASURE Tick Borne Diseases Kit, mis sisaldab kolme erineva sihtmärkanalüüsi strippe: 1) puukentsefaliitviiruse tuvastamistest – TBEV; 2) *Borrelia*, *Anaplasma* ja *Coxiella* tuvastamistest – BAC; 3) *Rickettsia*, *Babesia* ja *Ehrlichia* tuvastamistest – RBE. Antud meetodi tuvastusetapi läbiviimiseks on vajalikud ainult TBEV ja BAC.

Antud meetodi raames kasuta sihtmärkanalüüs TBEV strippe puukentsefaliitviiruse tuvastamiseks eraldatud nukleiinhapetest. Sihtmärkanalüüs BAC strippe kasuta *Borrelia burgdorferi s.l* tuvastamiseks eraldatud nukleiinhapetest. Seega, vali vastavalt näitajatele ja laborispetsialisti poolt edastatud suunistele õiged sihtmärkanalüüsi stripid.

Tuvastusetapp jaguneb omakorda kaheks: tuvastusetapp üksikproovidega (pt 2.3) ja tuvastusetapp koondproovidega (pt 2.4). Kui üksikproovide korral eraldatud nukleiinhappeid ei segata kokku, siis tuvastusetapp koondproovidega protsessi aluseks on eraldatud nukleiinhapetest 5 kaupa koondproovide moodustamine. Äärmiselt oluline on säilitada esialgsed eraldatud nukleiinhapete proovid.

*Borrelia burgdorferi s.l* esinemissagedus on kõrge, mille tõttu vii läbi tuvastusetapp üksikproovidega (BAC strippidega) antud näitaja suhtes (pt 2.3). Kuna TBEV esinemissagedus on vastupidiselt väga madal, on puukentsefaliitviiruse tuvastamise protsess järgmine: 1) tuvastusetapp koondproovidega (pt 2.4), kasutades TBEV strippe; 2) positiivse PCR tulemuse korral vastava koondproovi moodustava nukleiinhapete analüüsimine üksikproovidenä (pt 2.3).

**NB!** Järgi järgmiseid aspekte:

- a) tee valik sihtmärkanalüüside osas vastavalt laborispetsialistilt saadud sisendi alusel;
- b) *Borrelia burgdorferi s.l* tuvastamiseks juhindu üksikproovide meetodist;
- c) puukentsefaliitviiruse tuvastamiseks juhindu esmalt koondproovide meetodist ja positiivsete tulemuste korral vastavate proovide korral üksikproovide meetodist;
- d) ettevalmistusetapp peab eelnema nii üksikproovidega kui ka koondproovidega tuvastusetapile;
- e) konsulteerij vajadusel laborispetsialistiga.

## 2.2 Ettevalmistusetapp

1. Kontrolli POS reagenti olemasolu ja vajadusel valmista antud reagent.
2. Valmistamiseks pipeteeri POS viaalile 300 µl WATER reagenti.
3. Sega POS viaali vorteksil 15 sek ja jaga vajadusel alikvootideks. Kasutades sügavkülmas hoiustatud POS alikvooti, las sel enne kasutamist toatemperatuuril üles sulada. Sega 5 sekundit vorteksil ja tsentrifuugi reagent põhja 5 sekundit, 2800 rpm.
4. Koheseks kasutamiseks mõeldud POS reagent jääb laminaari alla.

## 2.3 Tuvastusetapp üksikproovidega

Eraldusetapis proovidele ja eralduskontrollile lisatava IC amplifikatsiooni signaal on nähtav ainult BAC strippidest, mille tõttu tuleb TBEV sihtmärkanalüüsi puhul sisemisekontrolli tuvastamiseks kasutada TBEV strippidele lisaks BAC strippe! Kui nukleiinhappe proovist on vajadus tuvastada ainult puukentsefaliitviirust, siis pole vaja arvestada BAC strippidel tuube positiivse ja negatiivse kontrolli jaoks, kuid kindlasti on vajalik arvestada BAC stripil proovide ja eralduskontrolli jaoks tuubid.

1. Tee vastavalt eraldatud nukleiinhapete proovide ja lisatavate kontrollide arvule kindlaks strip-tuubide arv.
2. Tsentrifuugi (2000 rpm, 15 sekundit) strippides sisalduv lüofiliseeritud pulber tuubi põhja.

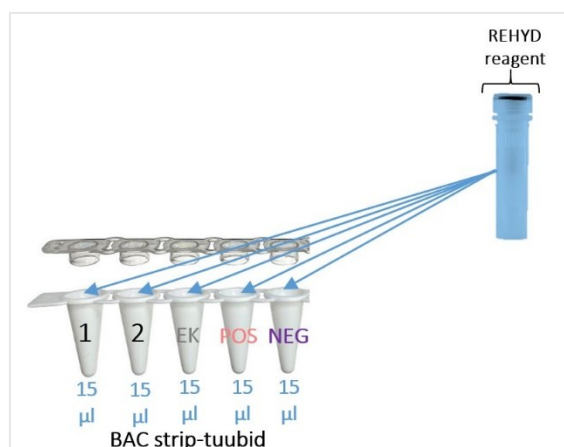
### 2.3.1 Tegevus puhtas ruumis

3. Sega REHYD reagenti vorteksil 5 sekundit ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
4. Resuspendeeri 15 µl REHYD reagenti proovidele ja vajaminevatele kontrollidele mõeldud kas BAC või BAC ja TBEV tuubides (Tabel 2, Joonised 3-5).

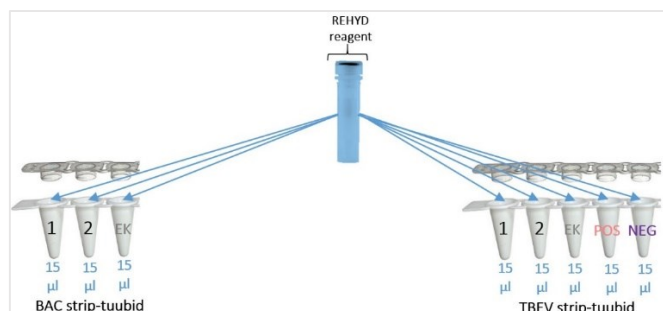
**Tabel 1.** Valmis arvutatud REHYD reagenti kogused vastavalt proovide ja kontrollide arvule.

BAC sihtmärkanalüüs (Joonis 3)				
NA proovide arv	Kontrollide arv	Kasutatavate tuubide arv kokku	REHYD reagenti maht (15µl/tuub)	Reagenti kogumahu arvutamise valem
1	3	4	60 µl	$REHYD = 15 \mu l * (x + POS + NEG + EK)$ , kus x on NA proovidele kuluv tuubide arv ja POS, NEG ning EK märgistavad kõik ühte tuubi kontrolli jaoks.
2	3	5	75 µl	
5	3	8	120 µl	
10	3	13	195 µl	
15	3	18	270 µl	
20	3	23	345 µl	
25	3	28	420 µl	
TBEV (BAC stripi kasutamine vajalik EK ja proovide osas) sihtmärkanalüüs (Joonis 4)				
NA proovide arv	Kontrollide arv	Kasutatavate tuubide arv kokku	REHYD reagenti maht (15µl/tuub)	Reagenti kogumahu arvutamise valem
1	4	6	90 µl	$REHYD = 15 \mu l * (2x + POS + NEG + 2EK)$ , kus NA proovidele kuluvate tuubide ja EK üks tuub on kahekordistatud.
2	4	8	120 µl	
5	4	14	210 µl	
10	4	24	360 µl	
15	4	34	510 µl	
20	4	44	660 µl	
25	4	54	810 µl	

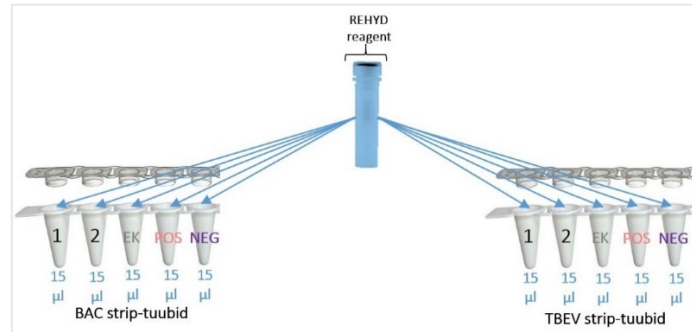
TBEV ja BAC sihtmärkanalüüsid (Joonis 5)				
NA proovide arv	Kontrollide arv	Kasutatavate tuubide arv kokku	REHYD reagenti maht (15µl/tuub)	Reagenti kogumahu arvutamise valem
1	6	8	<b>120 µl</b>	$REHYD = 15 \mu l * 2(x + POS + NEG + EK)$ , kus NA proovidele kuluvate ja kõigi kontrollide tuubide arv on kahekordistatud.
2	6	10	<b>150 µl</b>	
5	6	16	<b>240 µl</b>	
10	6	26	<b>390 µl</b>	
15	6	36	<b>540 µl</b>	
20	6	46	<b>690 µl</b>	
25	6	56	<b>840 µl</b>	



**Joonis 1.** Illustratsioon REHYD reagenti lisamisest BAC sihtmärkanalüüsi tarbeks BAC strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähised joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleaasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.



**Joonis 2.** Illustratsioon REHYD reagenti lisamisest TBEV sihtmärkanalüüsi tarbeks nii TBEV kui ka BAC strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähised joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleaasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.



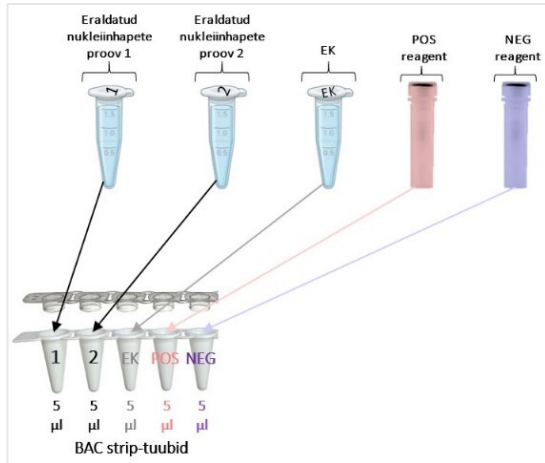
**Joonis 3.** Illustratsioon REHYD reagenti lisamisest BAC ja TBEV sihtmärkanalüüsi tarbeks BAC ning TBEV strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähised joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.

5. Sega **NEG** reagenti vorteksil 5 sekundit ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
6. Lisa 5 µl **NEG** reagenti vastava(te)sse BAC või BAC ja TBEV negatiivse kontrolli jaoks mõeldud tuubi(desse).
7. Kaaneta (CAP) kõik tuubid, et vältida ruumide vahel liikudes ristsaastet.

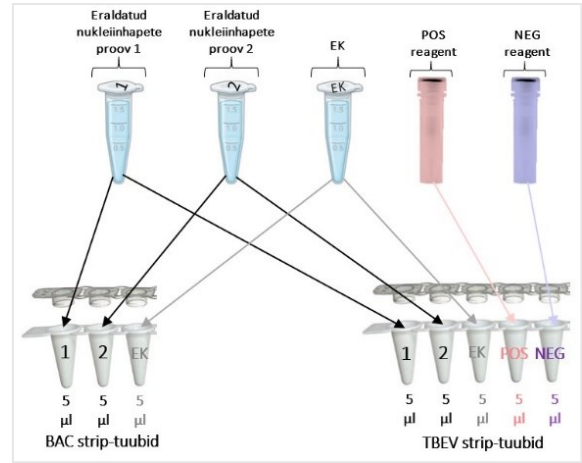
#### 2.3.1.1 Tegevus kokkusegamisruumis

8. Kokkusegamisruumis ava laminaari all eelnevalt kaanetatud sihtmärkanalüüsi(-de) proovimaterjali jaoks mõeldud strip-tuubid. **NEG** tuubid jäta kaanetatuks!
9. Lisa strip-tuubidesse 5 µl eraldatud nukleiinhappe proovimaterjali vastavalt eelnevalt arvestatud infole.
10. Lisa **EK** strip-tuubi 5 µl **EK** reagenti vastavalt arvestatud infole. Iga sihtmärkanalüüsi korra kohta peab lisama ühe **EK** kontrolli!
11. Kaaneta proovimaterjale ja **EK** reagenti sisaldavad strip-tuubid.
12. Sega **POS** reagenti 5 sekundit vorteksil ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
13. Lisa eelnevalt resuspendeeritud **POS** reagenti 5 µl selleks ettenähtud tuubi(-desse).
14. Kaaneta ettevaatlikult **POS** tuub(-id).

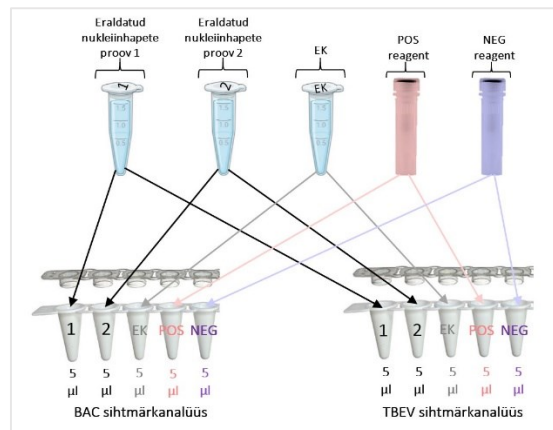
15. Joonised 6-8 illustreerivad proovide ja reagentide lisamise süsteemi vastavalt valitud sihtmärkanalüüsile.



**Joonis 5.** Illustratsioon NA proovide ja NEG, POS ning EK lisamisest BAC sihtmärkanalüüsi tarbeks BAC strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähisted joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.



**Joonis 4.** Illustratsioon NA proovide ja NEG, POS ning EK lisamisest TBEV sihtmärkanalüüsi tarbeks nii TBEV kui ka BAC strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähisted joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.



**Joonis 6.** Illustratsioon NA proovide ja NEG, POS ning EK lisamisest BAC ja TBEV sihtmärkanalüüsi tarbeks nii BAC kui ka TBEV strip-tuubidesse, kui proove on 2. Tähisted joonisel tähendavad järgmist: 1 – tuub NA proovile tähisega 1; 2 – tuub NA proovile tähisega 2; EK – nukleasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.

16. Kontrolli, et kõik strip-tuubid on korralikult kaanetatud ja suundu nendega seadmeruumi.

### 2.3.1.2 Tegevus seadmeruumis

17. Tsentrifuugi reaktsioonisegu strip-tuubides põhja (2000 rpm, 15 sekundit).

18. Ava Bio-Rad CFX 96 termotsükleri kaas, vajuta seadme esipaneelil olevale nupule → aseta proovid analüsaatorisse → vajuta uuesti esipaneelil olevale nupule (kaas sulgub).

19. Kliki arvuti desktopil ikoonile Bio-Rad CFX 96 → avaneb Startup Wizard → vali User-Defined
20. Avaneb Run Setup aken → vali Express Load ja sealt sobiv protokoll (VIASURE Tick Borne Diseases) → Next.
21. Vali sobiv Plate (VIASURE Tick Borne Diseases Plate) → Next → kontrolli, et kõik vastab vajalikele tingimustele (programm on näidatud Tabel 3) ja vajuta Start Run → salvesta fail arvuti töölaual olevasse vastava uuringu kausta.

**Tabel 2.** Puukentsefaliitviiruse ja *Borrelia burgdorferi s.l* tuvastamiseks kasutatav PCR programm VIASURE Tick Borne Diseases Bio-Rad CFX termotsükleri(te)s.

Samm	Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
1	Pöörd-transkriptsioon	45 °C	15 min	1
2	Eeldenaturatsioon	95 °C	2 min	1
3	Denaturatsioon	95 °C	10 s	45
	Annealing (praimerite sulandumine)	60 °C	50 s	
	Elongatsioon			

22. Kui analüsaatoril on programm käivitunud, siis vali sama akna rippmenüüst Real-Time Status → vali Plate Setup → View/Edit Plate → eemalda mittevajalikud positsioonid (*Clear Wells*) → märgi plaadil proovid, EK, POS ja NEG kontrollid.
23. Termotsükleri töö lõppedes tühjenda seade strippidest ja salvesta analüüsifail.
24. Jätka tööd pt 2.5 alusel, mis kirjeldab tulemuste interpretatsiooni.

## 2.4 Tuvastusetapp koondproovidega

Protsess vii läbi VIASURE Tick Borne Diseases Kit kiti sihtmärkanalüüsi TBEV strippidega, mille puhul BAC strippe on vaja kasutada ainult IC signaali tuvastamiseks.

Kui nukleiinhapete proove, millest tehakse koondproovid, on vaja analüüsida ka *Borrelia burgdorferi s.l* osas, siis esmalt lisada üksikute nukleiinhapete proovid BAC stripis vastavatesse tuubidesse (pt 2.3). Seejärel tegutseda pt 2.4 juhiste järgi.

### 2.4.1 Tegevus puhtas ruumis

1. Juhindu sellest, et ühe koondproovi moodustavad 5 üksikut eraldatud nukleiinhapete proovi (Tabel 4).
2. Kui üksikute eraldatud nukleiinhapete proovide koguarv ei jagune täpselt viiega, tuleb koondproovi moodustamisel võtta aluseks ( $5 \pm 4$ ) eraldatud nukleiinhapete proovi (s.t moodustada minimaalselt 1 ja maksimaalselt 9 eraldatud nukleiinhaptega koondproov).
3. Tsentrifuugi (2000 rpm, 15 sekundit) strippides sisalduv lüofiliseeritud pulber tuubi põhja.

**Tabel 3.** Näited üksikute proovide ja koondproovide seotusest ning koondproovide moodustamise süsteemist.

Analüüsi teostamise kuupäev	Proovi ID	Koondproovi ID	Koondproovi moodustavate proovide ID
11.08.2024	1	k1	k1 koondproov moodustub proovide 1, 2, 3, 4 ja 5 nukleiinhapetest.
	2		
	3		
	4		
	5		
	EK	k_EK	Kõik kontrollid tuleb eraldi analüüsi juurde lisada.
	POS	k_POS	
	NEG	k_NEG	
31.09.2024	6	k2	k2 koondproov moodustub proovide 6, 7, 8, 9 ja 10 nukleiinhapetest.
	7		
	8		
	9		
	10		
	EK	k_EK	Kõik kontrollid tuleb eraldi analüüsi juurde lisada.
	POS	k_POS	
	NEG	k_NEG	
30.12.2024	110	kN	kN koondproov moodustub proovide 110, 111 ja 112 nukleiinhapetest.
	111		
	112		
	EK	k_EK	Kõik kontrollid tuleb eraldi analüüsi juurde lisada.
	POS	k_POS	
	NEG	k_NEG	

**NB!** Koondproovi moodustamiseks ei tohi kasutada kontrolle (NEG, POS ja EK). Kontrollid tuleb lisada üksikult strip-tuubidesse koondproovide analüüsimisel. Ühe koondproovi kohta arvesta üks tuub sihtmärkanalüüsi stripist.

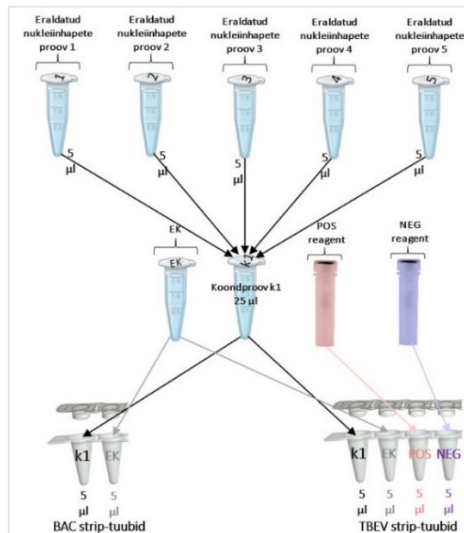
4. Sega **REHYD** reagenti vorteksil 5 sekundit ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
5. Resuspendeeri 15 µl **REHYD** reagenti proovidele ja kontrollidele mõeldud tuubides.
6. Sega **NEG** reagenti vorteksil 5 sekundit ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
7. Lisa 5 µl **NEG** reagenti antud kontrolli tuubi.
8. Kaaneta (CAP) kõik tuubid, et vältida ruumide vahel liikudes ristsaastet.

#### 2.4.2 Tegevus kokkusegamisruumis

9. Valmista koondproovid järgmiselt: pipeteeri viiest järjestikuste proovinumbritega üksikproovist 5 µl eraldatud nukleiinhapete proovi steriilsesse mikrotuubi (1,5 ml). Ühe koondproovi maht on seega standardolukorras 25 µl.
10. Nukleiinhapete segamiseks mikrotuubis resuspendeeri pipetiga aeglaselt proovimaterjali. Välti vahu tekitamist!
11. Kaaneta mikrotuubid kindlalt ja korrektselt.



12. Ava laminaari all eelnevalt kaanetatud sihtmärkanalüüsi koondproovimaterjali jaoks mõeldud strip-tuubid. **NEG** tuubid jäta kaanetatuks!
13. Lisa strip-tuubidesse 5 µl koondproovimaterjali vastavalt koondfaili infole. S.t TBEV sihtmärkanalüüsi stripist vastab üks tuub ühele koondproovile.
14. Lisa **EK** jaoks mõeldud strip-tuubi 5 µl **EK** vastavalt koondfaili infole.
15. Kaaneta proovimaterjale ja **EK** reagenti sisaldavad strip-tuubid.
16. Sega **POS** reagenti 5 sekundit vorteksil ja tsentrifuugi vedelik tuubi põhja 5 sekundit, 2800 rpm kasutades mini tsentrifuug/vorteksit.
17. Lisa eelnevalt resuspendeeritud **POS** reagenti 5 µl selleks ettenähtud tuubi(-desse).
18. Kaaneta ettevaatlikult **POS** tuub(-id).
19. Joonis 9 illustreerib koondproovide moodustamise ning proovide ja reagentide lisamise süsteemi.



**Joonis 7.** Illustratsioon koondproovidega teostatavast TBEV sihtmärkanalüüsist, kui koondproovi moodustavaid NA proove on viis. Tähisted joonisel tähendavad järgmist: 1-5 – tuubid NA proovidele tähisega 1-5; k1 – viiest NA proovist moodustatud koondproov tähisega k1; EK – nukleaasivaba vee ehk eralduskontrolli tuub; POS – positiivse kontrolli tuub; NEG – negatiivse kontrolli reagenti tuub.

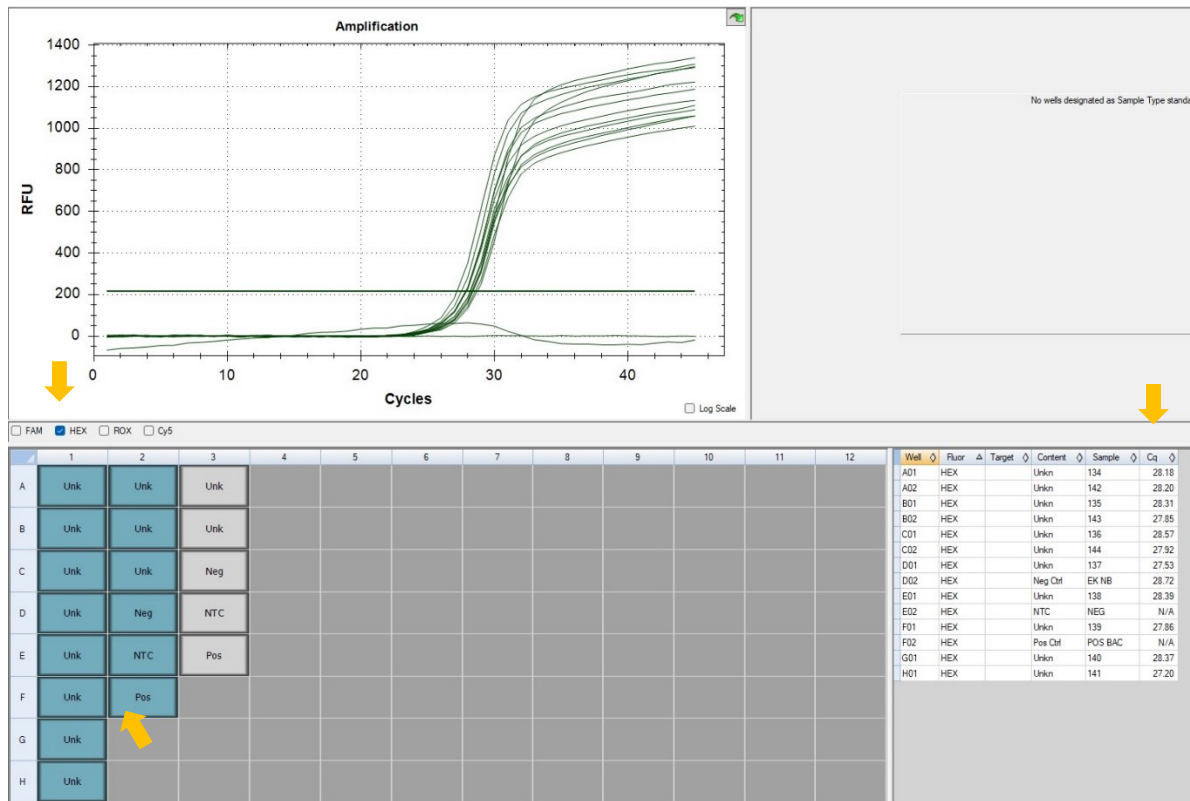
20. Kontrolli, et kõik strip-tuubid on korralikult kaanetatud ja suundu nendega seadmeruumi, jätkates protsessi pt 2.3.1.2 alusel.

## 2.5 Tulemuste interpretatsioon

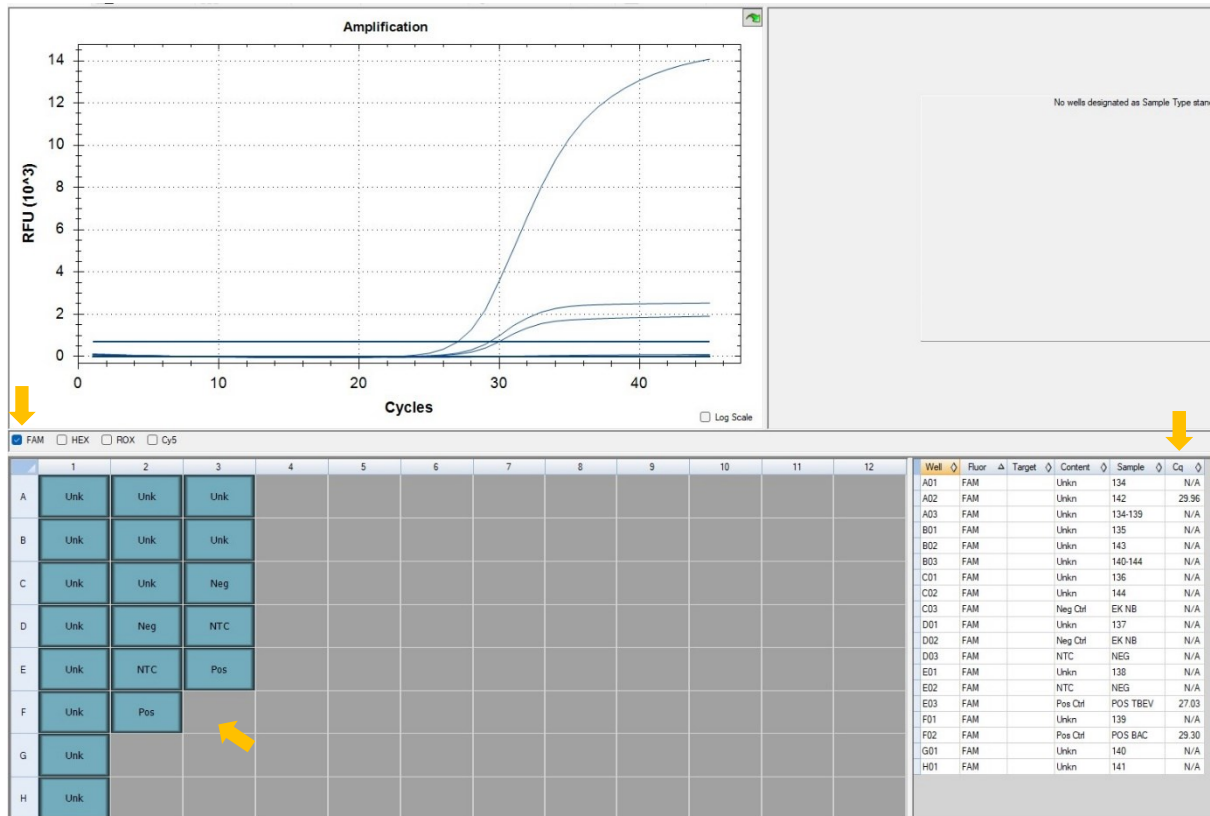
1. Sisemisekontrolli (IC) amplifikatsioonisignaali asub HEX kanalis ning on nähtav ainult BAC stripi-tuubidest.
2. Nii BAC kui ka TBEV sihtmärkanalüüsides proovide ja positiivse, negatiivse ning eralduskontrolli signaalid asuvad FAM kanalis, nähtavad vastavalt BAC stripi-tuubidest ja TBEV stripi-tuubidest.
3. Esmalt tuleb vaadata kontrollide amplifikatsioonisignaalide tulemusi ja Ct väärtuseid:
  - a. IC kontrollimiseks vaja muuta aktiivseks väljaks BAC stripi-tuubid ja kanal HEX. Ct väärtus peab olema <40 (Joonis 10).



- b. BAC ja TBEV sihtmärkanalüüside positiivse, negatiivse ja eralduskontrolli signaalid on nähtavad kanalis FAM ja juhul kui antud kontrollide väljad on aktiivseks tehtud. POS puhul peab Ct väärtus olema <40 ja EK ning NEG puhul peab Ct väärtus puuduma (N/A) (Joonis 11).



**Joonis 8.** Illustratsioon IC kontrollimisest, kus valitud on HEX kanal (linnukene HEX kanali kastis) ja aktiivseks on muudetud BAC stripi-tuubid (sinaka värvusega on aktiivsed väljad ja halli värvusega inaktiivsed väljad). Ct väärtused on nähtavad parempoolses tabelis veerus pealkirjaga Cq.



**Joonis 9.** Illustratsioon POS, NEG ja EK kontrollimisest, kus valitud on FAM kanal (linnukene FAM kanali kastis) ja aktiivseks on muudetud nii BAC kui ka TBEV stripi-tuubid (sinaka värvusega on aktiivsed väljad). Ct väärtused on nähtavad parempoolses tabelis veerus pealkirjaga Cq.

4. Kui kontrollide tulemused on usaldusväärsed, siis saab hinnata proovide amplifikatsiooni tulemusi:
  - a. Proov on *Borrelia burgdorferi s.l* osas positiivne, kui BAC stripi-tuubis on proovil amplifikatsioonikõver, Ct väärtus on väiksem kui 40 ja kontrollide tulemused on korras (IC signaal on olemas, positiivse kontrolli signaal on olemas, negatiivse kontrolli signaal puudub).
  - b. Proov on *Borrelia burgdorferi s.l* osas negatiivne, kui BAC stripi-tuubis ei ole proovil amplifikatsioonikõverat või Ct väärtus on üle 40 ja kontrollide tulemused on korras (IC signaal on olemas, positiivse kontrolli signaal on olemas, negatiivse kontrolli signaal puudub).
  - c. Proov on puukentsefaliitviiruse osas positiivne, kui TBEV stripi-tuubis on proovil amplifikatsioonikõver, Ct väärtus on väiksem kui 40 ja kontrollide tulemused on korras.
  - d. Proov on puukentsefaliitviiruse osas negatiivne, kui TBEV stripi-tuubis ei ole proovil amplifikatsioonikõverat või Ct väärtus on üle 40 ja kontrollide tulemused on korras (IC signaal BAC stripis on olemas, positiivse kontrolli signaal on TBEV stripis olemas, negatiivse kontrolli signaal puudub).
  - e. PCR tulemus on läbikukkunud ja vajab kordamist, kui 1) negatiivsel kontrollil on amplifikatsioonikõver ja/või 2) positiivsel kontrollil ei ole amplifikatsioonikõverat.