

S T a D I a

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Epstein-Barrin-virus -IgG-aviditeetti

Menetelmän pystytys ja evaluointi

Sosiaali- ja terveysalan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
13.11.2006

Saija Oravainen



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma		Mikrobiologia	
Tekijä/Tekijät			
Saija Oravainen			
Työn nimi			
Epstein-Barrin-Virus -IgG-aviditeetti			
Menetelmän pystytys ja evaluointi			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syky 2006	32 + 2 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Epstein-Barr-virus (EBV) on hyvin yleinen ihmispatogeeni. Primaarin EBV-infektion erottaminen viruksen reaktivaatiosta sekä oireiltaan samankaltaisista taudeista on tärkeää. EBV-IgG-aviditeettitutkimusta käytetään infektioajankohdan määrittämiseen. Työ tehtiin Helsingin yliopiston virustutkimusryhmässä. Työn tarkoitus oli tutkia, soveltuuko Diasorinin IgG-VCA tuotepaketti aviditeettitutkimukseen sekä selvittää antaako EPR-menetelmä vai index-menetelmä luotettavimmat tulokset.</p> <p>Määritin Diasorinin aviditeettimenetelmällä yhteensä 101 seeruminäytettä. Näytteistä 35 oli vanhan immunitetin näytettä ja loput akuutin infektion näytteitä. Referenssimenetelmänä toimi HUSLABin Dade Behringin menetelmä. Suurimmalle osalle näytteistä oli aviditeettitulos määritettynä myös referenssimenetelmällä. Aviditeettimenetelmän periaate on ELISA-menetelmän muunnos, jossa osaa vasta-aineproteiineista denaturoidaan urealiuoksella. Näin saadaan selville, onko vasta-aine tiukasti vai löyhästi kiinnittynyt antigeeniinsa. Matala aviditeetti viittaa akuuttiin infektiin ja taas korkea aviditeetti vanhaan immunitettiin.</p> <p>Tulosten perusteella Diasorinin IgG-VCA tuotepakkaus soveltuu melko hyvin aviditeettitutkimukseen. Verrattessani saatuja tuloksia referenssimenetelmän tuloksiin oli menetelmien välinen korrelaatio hyvä. Diasorinin 4-pisteen EPR-menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys olivat laskutavasta riippuen kummatkin noin 90 %, mikä on kohtalaisen hyvä. Verrattaessa eri tulostenlaskentatapoja keskenään antoi 4-pisteen EPR-menetelmä luotettavimmat tulokset. Index-menetelmän heikkous oli huono sensitiivisyys, joka jäi vain 77 %:iin.</p> <p>Saatujen tuloksien perusteella voidaan todeta, että Diasorinin tuotepakkaus soveltuu aviditeettitutkimukseen. Aviditeettitutkimuksesta on usein hyötyä lisätutkimuksena tavallisten EBV-vasta-ainetutkimusten rinnalla. Todennäköisesti suuremmalla otoskoolla olisi menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys olleet vielä paremmat.</p>			
Avainsanat			
Epstein-Barr-virus, IgG, Aviditeetti, EPR-menetelmä, Index-menetelmä			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care and Social Services	
Author/Authors			
Saija Oravainen			
Title			
Epstein-Barr-Virus -IgG-Avidity Evaluation of the method			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2006	32 + 2 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Epstein-Barr-virus (EBV) is a very common human patogene. EBV-IgG-avidity-test is used to determine the time of infection. I did my final project in the University of Helsinki in the Department of Virology. The purpose of this study was to find out if the Diasorin IgG-VCA kit can be used in the avidity testing, and to find out whether the EPR-method or the Index-method will give more reliable results.</p> <p>I analyzed a total of 101 serum samples. 35 of the samples were past immunity samples and the rest were acute infection samples. I compared my results to a reference method. The avidity method is a modification of the ELISA-method. Low avidity indicates an acute infection, whereas high avidity signals past immunity.</p> <p>When I compared my results to the reference results I found out that the correlation between the two methods was good. The sensitivity and the specificity of the Diasorin method was around 90 % both, which is still quite good. When comparing the different Diasorin methods, I found out that the 4-point ERP-method gave the most reliable results.</p> <p>I found out that the Diasorin IgG-VCA kit can be used in the avidity testing also. The avidity test is often useful as a compulsory test when defining other EBV antibodies.</p>			
Keywords			
Epstein-Barr-Virus, IgG, Avidity, EPR-method, Index-method			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 EPSTEIN-BARRIN-VIRUS (EBV)	2
2.1 EBV:n ominaisuudet ja patogeneesi	2
2.2 EBV-infektion kliininen kuva ja epidemiologia	4
2.3 EBV ja syöpä	4
2.4 EBV:n diagnoosimenetelmät	5
3 IgG-VASTA-AINEIDEN AVIDITEETTI	7
3.1. Aviditeettimäärityksen periaate	7
3.1.1 Index-menetelmä	7
3.1.2 End-point-ratio (EPR) –menetelmä	8
3.1.3 Aviditeettitulosten tulkinta	8
3.2. Aviditeettitutkimus EBV:n diagnostiikassa	9
3.3 DiaSorinin VCA-IgG-aviditeettimenetelmän periaate	9
4 TUTKIMUSASETELMA	10
4.1 Aiemmat tutkimukset	10
4.2 Tutkimusongelmat	11
5 TYÖN SUORITTAMINEN	12
5.1 Näytteiden valinta tutkimusta varten	12
5.2 Ureakonsentraation määrittäminen	13
5.3 Menetelmän työvaiheet	15
5.4 Ongelmatilanteet	17
6 TULOKSET	17
6.1 Menetelmien välinen korrelaatio	18
6.2 Tulosten laskentatapojen vertailu	20
6.3 DiaSorinin menetelmän toistettavuus	25
7 TYÖN JA TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	26
8 POHDINTA	28
LÄHTEET	31
LIITTEET	

1 JOHDANTO

Epstein-Barrin virus (EBV) on hyvin yleinen ihmispatogeeni. Se aiheuttaa infektioiden mononukleosin, joka sairastetaan useimmiten nuoruusvuosien aikana. EBV:tä tutkitaan aktiivisesti, koska sen aiheuttamat infektiot ovat hyvin yleisiä. Lisäksi jatkuvasti löydetään uusia tautitiloja, joiden synnyssä EBV on osallisena.

EBV:n diagnostiikka keskittyy pääasiassa IgM- ja IgG-luokan vasta-ainemäärityksiin ELISA-menetelmän (Enzyme-linked immunosorbent assay) avulla. Vasta-aineita voidaan määrittää sekä seerumista että likvorista. Nämä eivät kuitenkaan yksistään aina riitä. Tällaisia tapauksia ovat esimerkiksi viruksen reaktivaatiot sekä potilaat, joiden immuunipuolustus on heikentynyt. EBV:n diagnosointi on melko hankalaa pelkillä vasta-ainemäärityksillä tilanteissa, joissa näytteessä on sekä IgM- että IgG-luokan vasta-aineita. Tällöin on vaikea osoittaa ovatko vasta-aineet peräisin tuoreesta infektiosta vai viruksen reaktivaatiosta. Erityisesti näissä tapauksissa on EBV:n IgG-aviditeettitutkimuksesta hyötyä. Aviditeettitutkimusta käytetään infektioajankohdan määrittämiseen.

Antigeenin ja vasta-aineen muodostaessa keskenään sidoksen painuvat niiden pinnat vastakkain ja ne muodostavat kompleksin. Yhdistävien voimien summaa nimitetään aviditeetiksi. Yksittäisen sitoutumiskohdan aviditeettiä kutsutaan affiniteetiksi. Jos anti-geeni- ja vasta-ainemolekyylin välille syntyy useita sidoksia, aviditeetti on korkeampi kuin affiniteetti. Hedmanin ja Seppälän (1988) kehittämän menetelmän avulla voidaan primaari- ja sekundaari-infektiot erottaa toisistaan niiden erilaisten aviditeettien perusteella. Aviditeettimenetelmää on tutkittu ympäri maailmaa melko paljon, ja sen on havaittu toimivan hyvin usean eri analyysin määrittämisessä. Työni kannalta mielenkiintoisimman tutkimuksen on tehnyt Weissbrich (1998), jossa hän vertaa peptidiantigeenin ja VCA-antigeenin eroja aviditeettitutkimuksessa. Hänen käyttämänsä peptidiantigeeni on sama kuin tässä työssä käytetty antigeeni.

Opinnäytetyöni on kokeellinen tutkimus, joka tehtiin Helsingin yliopiston virologian osastolla touko-lokakuussa 2006. Tutkimuksen aihe on työelämälähtöinen; sen esitti minulle professori Klaus Hedman. Hän on tehnyt yhteistyötä Italialaisen yhtiön DiaSorinin kanssa. Heidän toivomuksenaan oli tutkia, toimiiko DiaSorinin ETI-VCA tuotepakkaus, jossa antigeeninä on synteettinen VCA p18-peptidiantigeeni, IgG-

aviditeettitutkimuksessa. Työ on osa isompaa tutkimusta, jossa halutaan selvittää antaako aviditeettitutkimus ratkaisevaa lisätietoa tavallisten vasta-ainemääritysten lisätutkimuksena varsinkin ongelmallisissa tapauksissa. HUSLABissa on käytössä EBV-aviditeettitutkimus. Klaus Hedman vastaa HUSLABin täsmäserologian tutkimuksista ja haluaa edelleen kehittää EBV-aviditeettimenetelmän diagnostista suorituskykyä.

2 EPSTEIN-BARRIN-VIRUS (EBV)

EBV luokitellaan gammaherpesvirusten sukuun *Lymphocryptovirus*. Se on vaipallinen DNA-virus, joka infektoi B-lymfosyyttejä ja jää piilemään niihin latentissa muodossa. EBV on hyvin yleinen virus. Tunnetuin sen aiheuttamista taudeista on infektiioosi mononukleosi. Virus on myös osallisena monissa muissa ihmisen sairauksissa esimerkiksi lymfoomissa ja nenänielun karsinomoissa. (Hukkanen ym. 2005: 479-485.)

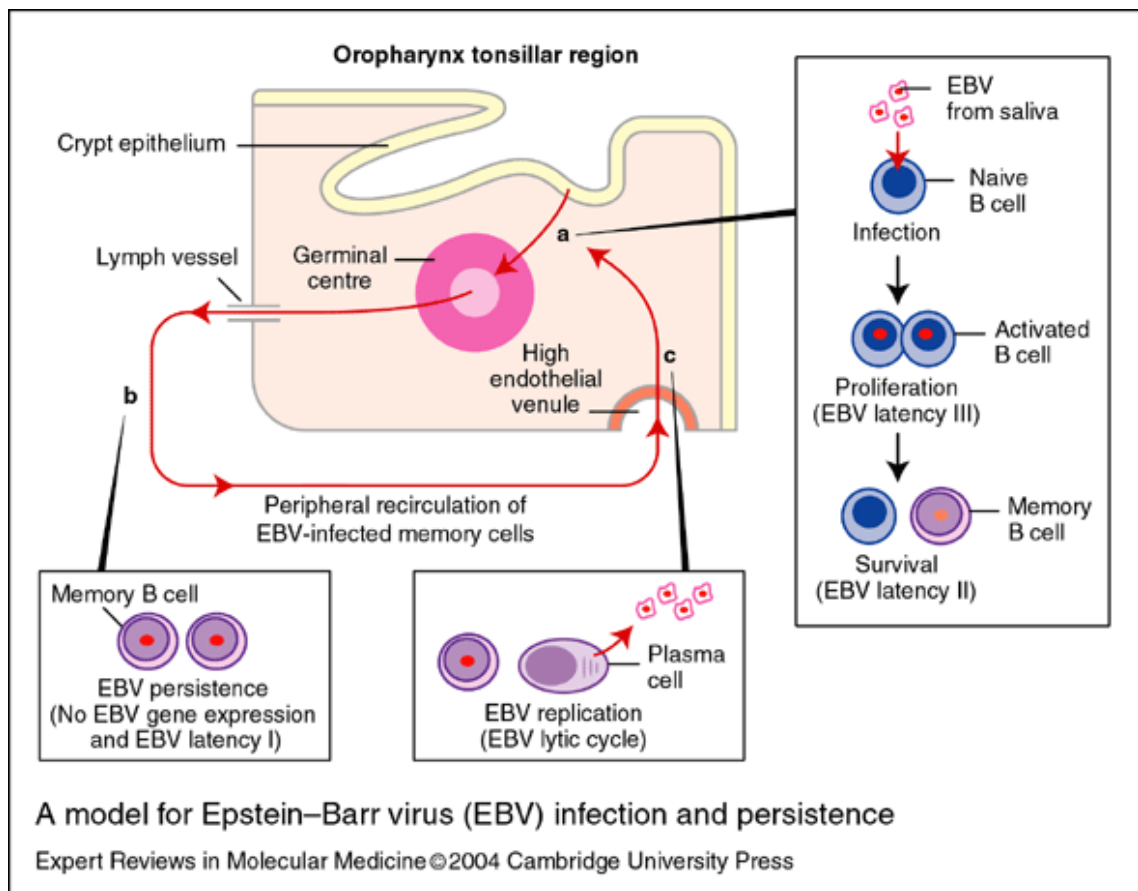
2.1 EBV:n ominaisuudet ja patogeneesi

EBV:llä on samanlainen rakenne kuin muillakin herpesviruksilla. Viruksen kapsidia ympäröi tegumentti-materiaali ja tätä vaippa. Kapsidin sisältämä DNA on lineaarinen. DNA on kooltaan noin 172 000 emäsparia, ja siinä on EBV:lle ominaisia toistojaksoja. EBV-reseptorina toimii B-solujen pinnalla CD21 (CR2). Viruksen glykoproteiini gp350/220 on CD21-molekyylisiin tarttuva ligandi. (Hukkanen ym. 2005: 479-482.)

EBV infektoi primaari-infektiossa ensin suun ja nielun epiteelisoluja. Epiteelistä käsin EBV infektoi imukudoksessa olevia B-soluja, joihin se jää latentiksi. Virus pystyy muuttamaan B-solut kuolemattomiksi ja ne tuottavat suuria määriä itselleen tyypillisiä vasta-aineita. Vasta myöhemmin aktivoituu T-soluvälitteinen immunitetti ja aktivoituneet sytotoksiset T-solut lysoivat B-solut. Tartunnan jälkeen virusta erittyy sylkeen kuukausia, ajoittain ehkä jopa lopun elämää. (Hukkanen ym. 2005: 480-482.)

Virus replikoituu sylkirauhastiehyiden soluissa ja nielun epiteelisoluissa. Infektoituneessa solussa seuraa joko lyyttinen tai latentti infektio (kuvio 1), ehkä solun transkriptiotekijöiden saatavuudesta riippuvasti. Lyyttisen infektion vaiheet tapahtuvat samantapaisena ajallisesti säätyneenä ja järjestyksessä kaskadireaktiona kuin Herpes simplex

viruksellakin. DNA-synteesi ja kapsidien muodostuminen tapahtuvat tumassa. Vaipan glykoproteiineista gp350/220 on runsaslukuisin sekä infektoituneen solun ulkokalvolla että virionin pinnalla. Siihen kohdistuvat sekä T-soluvaste että neutraloivat vasta-aineet. EBV:n infektoimien B-solujen latentti infektio on varsin dynaaminen tila, jossa virus ilmentää latenssigeenejään mRNA:ksi ja useimpia myös proteiineiksi. DNA esiintyy latenssissa rengasmaisena molekyylinä. Latenssigeenit koodittavat kuutta tumaproteiinia, kolmea membraaniproteiinia ja kahta pientä RNA:ta. Luuydin on merkittävä latentin EBV:n sijaintipaikka perifeerisen veren lymfosyyttien lisäksi. (Hukkanen ym. 2005: 480-482.)



KUVIO 1. EBV:n kulku infektiossa ja latenssin muodostuminen (Cambridge University press 2004).

EBV:llä on kaksi serotyyppiä, EBV-1 ja EBV-2, joilla on antigeenistä eroa EBNA-2- ja -3-proteiineissa. Nämä eroavat myös transformaatiokyvyssä: EBV-1-virusten transformoimat solut kasvavat nopeammin. EBV-1 on yleisempi kuin EBV-2 Euroopassa ja Yhdysvalloissa. (Hukkanen ym. 2005: 482.)

2.2 EBV-infektion kliininen kuva ja epidemiologia

Mononucleosis infectiosa on tunnetuin EBV:n aiheuttamista taudinkuvista. Sitä esiintyy tyypillisesti 15-25-vuotiailla. Lasten EBV-infektiot voivat olla oireettomia tai oireiltaan epämääräisiä. Taudin itämisaika on 30-50 vuorokautta. Mononukleosissa esiintyy korkeaa kuumetta, katteisia nielutulehduksia ja imusolmukkeet turpoavat. Taudin alkuvaiheessa todetaan ominainen peitteinen tonsilliitti. Taudin yhteydessä esiintyy hepatiittia ja splenomegaliaa. Tauti voi myös olla vakava, jos se sairastetaan vanhemmalla iällä. Mononukleosipotilailla todetaan perifeerisessä veressä lymfosytoosi. Atyypisiä lymfosyyttejä on yli 10 % imusoluista. EBV-infektio johtaa mononukleosissa polyklonaaliseen B-solujen aktivaatioon. Taudille tyypillistä on autovasta-aineiden esiintyminen. Autovasta-aineet ovat tavallisesti IgM-luokkaa. (Hukkanen ym. 2005: 482-483.)

EBV-infektioon ei ole parantavaa hoitoa. Viruslääkkeistä asikloviiri estää EBV:n replikaatiota, mutta latenttia virusta se ei poista elimistöstä. Mononukleosiin asikloviiri ei juuri tehoa. EBV-rokotetta ei ole saatavilla. EBV:tä esiintyy yleisesti koko maapallolla. Aikuisista yli 90 % on vasta-ainepositiivisia. EBV:n tarttuvuus ihmisestä toiseen on vähäinen. Pääasiallinen tartuntatie on sylki. (Hukkanen ym. 2005: 482-485.)

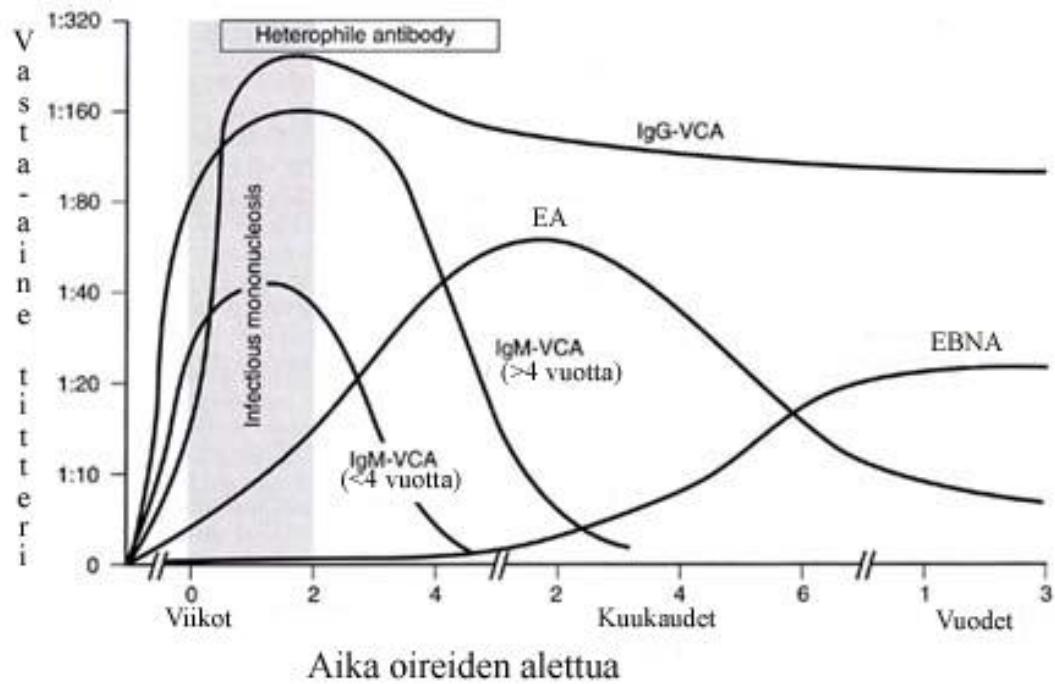
2.3 EBV ja syöpä

EBV:n nukleiinihappoja on löydetty syöpäkudoksista, etenkin lymfoomista, mutta näin yleisen viruksen kohdalla yhteys syövän syntyyn on yleensä jäänyt epäselväksi. Vahva yhteys EBV:llä on vain tiettyihin syöpiin, nimittäin Burkittin lymfoomaan, nenänielun karsinomaan, mahasyöpään ja immuunipuutteisten potilaiden polyklonaalisiin B-solulymfoomiin. (Hukkanen ym. 2005: 484-485.) Suomalaiset tutkijat ovat myös osoittaneet, että äidin EBV-infektion raskaudenaikainen reaktivoituminen kolminkertaistaa lapsen riskin sairastua akuuttiin lymfoblastileukemiaan (Lehtinen – Lehtinen – Koskela – Bloigu 2003).

2.4 EBV:n diagnoosimenetelmät

EBV:n serologinen diagnostiikka perustuu heterofiilisten vasta-aineiden osoitukseen tai spesifisten EBV-vasta-aineiden diagnosointiin. Heterofiilisten vasta-aineiden osoitus, jonka ensimmäisen kerran kuvasivat Paul ja Bunnell vuonna 1932, perustuu hevosen punasolujen agglutinaatioon, joista on saatavilla useita erilaisia kaupallisia tuotepakkauksia. (Robertson ym. 2003: 617-618.) Evansin ym. (1975: 546-554) mukaan heterofiilisiä vasta-aineita esiintyy 90 %:lla aikuisista jossakin vaiheessa mononukleoosin aikana. Vasta-aineet ovat kuitenkin usein infektion alkuvaiheessa negatiivisia ja voivat pysyä positiivisina jopa vuoden infektion jälkeen, mikä vaikeuttaa diagnosointia. EIA-menetelmän (Enzyme immunoassay) kehittyminen helpotti spesifisten EBV-vasta-aineiden diagnosointia ja mahdollisti automaation kehittymisen (Robertson ym. 2003: 618.)

EBV-infektion virologinen diagnostiikka on parhaimmillaan yksinkertaista. Yleensä riittää IgM- ja IgG-luokan vasta-aineiden määrittäminen EBV:lle. IgM-luokan vasta-aineita alkaa muodostua jo aivan taudin alkuvaiheessa ja ne pysyvät mitattavalla tasolla 1-3 kuukautta. EBV:n, sytomegaloviruksen (CMV), hepatiitti A:n ja HI-viruksen välillä tavataan toisinaan ristireaktiivisuutta IgM-vasteissa. Tämä pyritään kontrolloimaan reumafaktorin testauksella. IgG-luokan EBV-vasta-aineita määritetään tutkittaessa EBV-immuniteettia, mutta IgG-vasta-ainetason selvä (yli 4-kertainen) nousu on myös hyvä osoitus akuutista EBV-infektiosta. EBV-IgG-vasta-aineiden antigeenispesifiteetti kohdistuu mm. viruksen kapsidin p150- ja gp125-proteiiniin (VCA, viruksen kapsidian-tigeeni). Testeillä voidaan määrittää myös vasta-aineita EBNA-proteiineille ja viruksen varhaisille proteiineille (EA). PCR ja suora nukleiinihappohybridisaatio ovat tutkimuksen hyviä apuvälineitä. Virusviljely ei tule EBV-diagnostiikassa kysymykseen, koska EBV voidaan viljellä vain kokultivaatiolla käyttäen napaveren lymfosyyttejä. (Hukkanen ym. 2005: 484; HUSLAB 2006.) Kuviossa 2 käy ilmi kaavamaisesti esitettynä eri vasta-ainetasojen pitoisuudet.



KUVIO 2. Vasta-ainetasojen nousu useita EBV:n antigeeneja kohtaan infektiiosin mononukleosisin aikana. (Muunneltu kuva: Department of Pediatrics, Chiang Mai University)

Taulukosta 1 on nähtävissä eri vasta-aineiden käyttäytyminen infektion eri vaiheissa vielä taulukkomuodossa. Taulukkoon on eritelty IgM- ja IgG-luokan EBNA-vasta-aineet.

TAULUKKO 1. Vasta-ainepitoisuuksien kulku EBV-infektion eri vaiheissa. (muokattu taulukko, Panbio 2004)

Vasta-aine	Infektion vaihe			
	Akuutti (Varhainen)	Akuutti (myöhäinen)	Siirtävä	Tervehtynyt
VCA IgM	nousee	laskee		
VCA IgG	nousee	nousee	nousee	positiivinen
EBNA IgM	nousee	laskee		<EBNA IgG
EBNA IgG	negatiivinen	<EBNA IgM	kuin EBNA IgM	>EBNA IgM
EA IgG	negatiivinen	saattaa nousta	kuin EBNA IgG	laskee

Näyte EBV:n serologisia tutkimuksia varten tulee ottaa käyttäen hyvän tavan mukaisia laboratoriotekniikoita. Näytteestä eroteltu seerumi lähetetään tutkittavaksi kierrekorkillisessa puhtaassa muoviputkessa. Koska immunoglobuliinit ovat stabiileja, näytteenot-

toon, näytteen käsittelyyn tai säilytykseen ei liity erikoisvaatimuksia. Näytteet voidaan säilöä viikon ajan 2-8 °C ja -20 °C pitkiä aikoja. Tutkimusta ei voida tehdä vahvasti lipeemiselle tai hemolysoituneelle näytteelle. Kontaminoituja näytteitä ei saa käyttää. (HUSLAB 2006; DiaSorin 2004)

3 IgG-VASTA-AINEIDEN AVIDITEETTI

3.1. Aviditeettimäärityksen periaate

IgG-aviditeetti (AVI) tarkoittaa antigeenin ja vasta-aineen välistä sidosvoimaa. Infektion alussa vasta-aineen ja antigeenin välinen sidos on heikko, mutta ajan kuluessa se voimistuu, eli aviditeetti kasvaa. Aviditeettimenetelmässä annetaan potilasvasta-aineen ensin sitoutua koeputkessa mikrobiantigeeniinsa, minkä jälkeen valkuaisaineiden välisen sidoksen "kimppuun käydään" proteiinia denaturoivalla reagenssilla. Proteiininidaturaation seurauksena irtoavat löyhästi kiinnittyneet vasta-aineet antigeenistään, mutta voimakkaasti sitoutuneet pysyvät kiinni. Mittaustulos kertoo voimakkaiden IgG-vasta-aineiden osuuden. Tämä sitoutumisvoimaa (aviditeetti) luonnehtiva luku kertoo, kuinka pitkä aika infektiotilasta näytteenottoon on kulunut, toisin sanoen se erottaa infektion akuutti- tai toipilasvaiheen (heikko aviditeetti) vanhasta immuniteetista (vahva aviditeetti). Jos IgG-vasta-aineita ei taudin varhaisvaiheessa vielä ole, ei aviditeettia voida mitata, vaan potilaasta on otettava seurantanäyte. (Seppälä – Söderlund – Lappalainen – Hedman 1994: 178-184.)

Aviditeettitutkimuksen etuna on, että sillä päästään primaari-infektion pikadiagnoosiin tai poissulkuun vain yhtä seeruminäytettä käyttämällä. Pariseerumi tarvitaan vain, jos I-näyte on otettu niin varhain, ettei IgG-luokan vasta-aineita herkälläkään tekniikalla vielä löydy. (Seppälä ym. 1994: 180-181)

3.1.1 Index-menetelmä

Index-menetelmässä aviditeetti-indeksi määritetään yhdestä ainoasta näytelaimennoksesta: (vahvat sidokset)/(vahvat + heikot sidokset). Menetelmän edut EPR-menetelmään verrattuna ovat suorituksen yksinkertaisuus, sillä analyysien lukumäärä yksittäistä näy-

tettä kohti on pienempi. Näin ollen myös antigeeninkulutus on pienempää, jolloin kustannuksetkin jäävät pienemmiksi. Menetelmän luotettavuus edellyttää kuitenkin vahvojen ja heikkojen sidostyyppien tilastollisesti merkittävää eroa toisistaan. Aviditeettitulos lasketaan kaavalla: $(A_{\text{urea}}/A_{\text{PBST}}) \times 100 = \text{aviditeetti-\%}$. (Hedman - Seppälä 1988: 214-221.)

3.1.2 End-point-ratio (EPR) –menetelmä

EPR-menetelmässä tehdään laimennossarja kustakin potilasnäytteestä, josta määritetään tittereiden suhde (EPR). Menetelmä on työläämpi ja kalliimpi kuin index-menetelmä, mutta sen avulla saadaan paremmin eliminoitua vasta-aineen konsentraation vaikutus aviditeettiarvoon. Aviditeettitulos lasketaan PBST- (Tween-detergenttiä fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa) ja ureapestyjen näytteiden antamien absorbanssikäyrien etäisyytenä toisistaan cut-off-arvon kohdalla. Menetelmässä mitataan vain vasta-aineiden aviditeettia, koska vasta-ainepitoisuus vertailukohdassa (cut-off-arvo) on sama. Tulokset voidaan laskea joko 2- tai 4-pisteen EPR-menetelmää käyttäen. 2-pisteen menetelmä vaatii vain kaksi näytelaimennosta sekä PBST että ureapuolella, kun taas 4-pisteen menetelmä vaatii kummallakin puolella 4 näytelaimennosta. 2-pisteen menetelmä on siis halvempi toteuttaa kuin 4-pisteen menetelmä, muttei välttämättä yhtä luotettava. (Hedman – Lappainen – Seppälä – Mäkelä 1989: 736-740; Hedman 2006.)

3.1.3 Aviditeettitulosten tulkinta

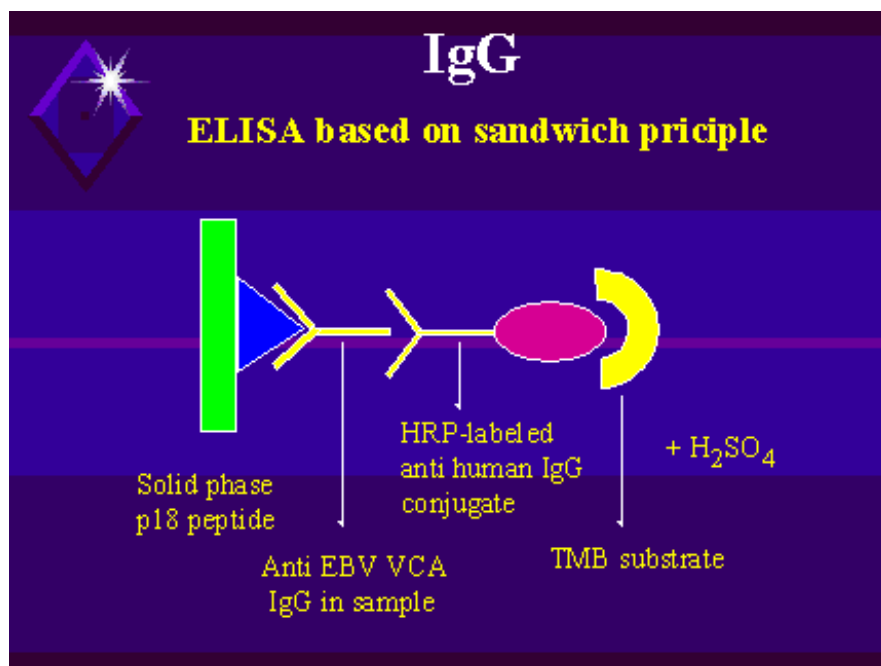
Immuunivasteen kypsyessä muodostuvien vasta-aineiden laatu paranee ja aviditeetti eli voima, jolla vasta-aineet tarttuvat antigeeniinsa, kasvaa. Akuutti-infektiossa IgG-aviditeetti pysyy matalana muutaman kuukauden ajan. Reaktivaatiossa IgG-aviditeetti on korkea. Aviditeetti on, mikrobista ja menetelmästä riippuen, heikko eli matala 1-6 (-12) kuukautta primaari-infektion jälkeen. Vahva eli korkea aviditeetti säilyy muuttumattomana myös uusintainfektiossa, päinvastoin kuin IgG-titteri, joka tällöin usein nousee. (HUSLAB 2006.)

3.2. Aviditeettitutkimus EBV:n diagnostiikassa

Rutiinidiagnostiikassa EBV-aviditeettiä tutkitaan niistä näytteistä, joiden IgG- ja IgM-arvot ovat kumpikin positiivisia. Tarkoituksena on varmistaa primaari-infektio. IgG-aviditeettiä voidaan tutkia myös sellaisista IgG-positiivisista näytteistä, joiden IgM-tulos on negatiivinen. Näytteeksi tarvitaan 1-2 ml seerumia tai likvoria. Likvorin rinnalla tulee aina tutkia myös samanaikaisesti otettu seeruminäyte. EBV:n vasta-ainetutkimuksen indikaatioita ovat muun muassa mononukleosisiepäily, lymfadenopatia, tonsilliitti, pitkä kuumeilu ja hepatiitti. (HUSLAB 2006.)

3.3 DiaSorin VCA-IgG-aviditeettimenetelmän periaate

Aviditeettimenetelmä perustuu ELISA-menetelmään. ELISA-menetelmässä seerumin vasta-aineet sitoutuvat VCA p18 synteettisen peptidin kanssa, joka on kiinnitetty kuoppalevyn kaivojen pohjalle. Ylimääräinen, sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja lisätään HRP-konjugoitu (piparjuuriperoksidaasi-entsyymi) anti-IgG-vasta-aine. Tämän jälkeen pestään ylimääräinen konjugaatti pois ja lisätään väritön TMB-substraatti (tetrametyylilibentsidiini). Substraatti hydrolysoituu entsyymin vaikutuksesta ja saa aikaan värireaktion. Reaktio pysäytetään rikkihapolla, jolloin TMB muuttuu keltaiseksi. (DiaSorin 2004.) Menetelmän periaate on nähtävissä kuviossa 3.



KUVIO 3. ELISA:n menetelmäperiaate (Epstein Barr virus 2005).

Värin intensiteetti mitataan fotometrillä 450 nm aallonpituudella. Värin syntyminen indikoi EBV-vasta-aineiden läsnäoloa tutkittavassa näytteessä. Aviditeettimenetelmässä osa kuoppalevyn kaivoista käsitellään urealla, jolloin alhaisen aviditeetin vasta-aineet irtoavat voimakkaiden pysyessä antigeeniin sitoutuneina. Mittausmenetelmästä riippuen verrataan saman seerumin antamia tuloksia ilman ureakäsittelyä ja ureakäsittelyn kanssa. (DiaSorin 2004.)

4 TUTKIMUSASETELMA

4.1 Aiemmat tutkimukset

Aiemmissä tutkimuksissa on osoitettu aviditeettitutkimuksen tärkeys EBV:n diagnosoinnin yhteydessä. Robertson ym. (2003: 617-623) julkaisivat raportin Journal of Medical Virologyssä, jossa he osoittivat aviditeettitutkimuksen merkityksen EBV:n kohdalla. He tutkivat kahta erilaista joukkoa potilaita. Ensimmäiseen joukkoon oli valittu 28 akuuttia EBV:tä sairastavaa nuorta potilasta. Toinen joukko koostui seeruminäytteistä, joista oli saatu vääriä positiivisia IgM-tuloksia. Potilailla tiedettiin olleen joko CMV, HIV tai hepatiitti A-virus. Tutkimuksen mukaan tutkittaessa EBV:n VCA IgM-vasta-aineita pelkästään jäi sensitiivisyys 93 %:iin, mutta jos tutkimukseen lisättiin IgG-aviditeetin mittausta, nousi sensitiivisyys 100 %:iin. Tutkimuksessa spesifisyyttä tarkasteltiin 35 potilaan väärin positiivisten avulla. Tutkimuksessa spesifisyys jäi vain 45 %:iin, kun näytteistä tutkittiin pelkkä VCA IgM-vasta-aine, mutta nousi 97 %, kun mukaan otettiin IgG-aviditeettitutkimus. Kaikki 35 näytettä antoivat korkean aviditeetin tuloksen, vaikka VCA IgM-vasta-aineet olivat olleetkin virheellisesti positiivisia.

Työni kannalta mielenkiintoisin tutkimus on Weissbrichin (1998) tutkimus, joka on julkaistu Journal of Medical Virologyssä. Siinä on verrattu synteettistä VCA p18-peptidiantigeenia VCA-antigeenisekoitukseen. Weissbrichin tutkima peptidiantigeeni on sama, kuin tutkimani antigeeni. Tutkimukseen kuului 92 akuutin infektion näytettä sekä 53 vanhan immunitetin näytettä. Hän käytti tutkimuksessaan index-menetelmää. Hän määritteli menetelmille optimaalisen ureakonsentraation, joka oli hänen mukaansa peptidiantigeenille 5.0 M urea. Hänen tutkimuksensa mukaan VCA-antigeenisekoitus toimi menetelmässä paremmin. Tällä antigeenilla hän sai lähes 100 % sensitiivisyyden

ja spesifisyyden. Peptidiantigeeni toimi taas huonommin. Sen sensitiivisyys oli 97 % ja spesifisyys vain 87 %. Peptidiantigeenilla hankaluuksia tuotti etenkin, että noin 30 %:lla näytteistä oli liian korkea IgG-arvo, ja ne jouduttiin määrittämään uudelleen laimennettuina. Myös 15 akuuttia näytettä jäi IgG-negatiiviseksi, jolloin aviditeettimääritystä ei voitu tehdä. Weissbrichin mukaan antigeenivalinnalla on aviditeettimenetelmän kannalta suuri merkitys, eikä peptidiantigeeni ollut tämän tutkimuksen valossa suositeltava vaihtoehto.

Mitchell ym. (2002) vertailivat tutkimuksessaan EBV-IgG-vasta-aineiden diagnosointia kapsidiantigeenilla gp125 ja p18-peptidiantigeenilla. Tässäkin tutkimuksessa tutkittiin samaa p18-peptidiantigeenia. Hän ei tutkinut antigeenia kuitenkaan aviditeettimenetelmällä vaan pelkällä IgG-mittauksella. VCA p18-peptidiantigeeni on hyvin immunogeeninen ihmisillä, ja vasta-aineita sille on havaittu terveillä seroposiitivisilla ihmisillä ympäri maailmaa, joten siksi se soveltuu hyvin EBV:n vasta-ainediagnosointiin. Tutkijoiden mukaan testit, joissa on käytetty VCA p18-peptidiantigeenia saavuttavat yli 95 % herkkyuden IgG:n diagnosoinnissa. VCA p18-peptidiantigeenia liittyviä etuja ovat myös, ettei se ristiinreagoi helposti muiden herpesvirusten kanssa. IgG-vasta-aineet VCA p18-peptidiantigeenia kohtaan eivät myöskään häviä immunosuppression aikana. Mitchell ym. (2002) tutkivat 143 näytettä kummallakin antigeenillä. Tutkimuksen mukaan p18-peptidiantigeenilla oli parempi kyky erottaa positiiviset ja negatiiviset näytteet kuin vertailuantigeenilla gp125. Tutkimuksen mukaan menetelmän herkkyys on 95 % ja spesifisyys 96 % (Panbio 2004). Tutkijoiden mukaan kuitenkin muutama akuutti näyte jäi testissä negatiiviseksi. Tämä voi johtua siitä, että vaikka p18-peptidiantigeeni on osa VCA:ta, joillakin vasta-aineen muodostus antigeenia kohtaan voi olla hidasta.

4.2 Tutkimusongelmat

Tutkimuksen tarkoituksena on kartoittaa DiaSorinin tuotepakkauksen soveltuvuutta IgG-aviditeettitutkimukseen. Tämän selvittämiseksi pyrin löytämään vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

- Miten DiaSorinin IgG-VCA-tuotepakkaus toimii aviditeettitutkimuksessa?
- Toimiiko mahdollisesti DiaSorinin tuotepakkaus HUSLABissa käytössä olevaa tuotepakkausta paremmin?

- Antaako EPR-menetelmän (4-pisteen, 2-pisteen) vai index-menetelmä luotettavimmat tulokset?

Työllä pyritään selvittämään soveltuuko DiaSorinin p18-peptidiantigeeni ylipäättään aviditeettitutkimukseen. Työ on osa isompaa tutkimusta, jossa halutaan selvittää antaako EBV-aviditeettitutkimus ratkaisevaa lisätietoa tavallisten EBV-vasta-ainemääritysten lisätutkimuksena, käytettäessä ko. menetelmää. Tämä on tärkeää varsinkin ristiriitaisia vasta-ainetuloksia antaneiden näytteiden kohdalla.

5 TYÖN SUORITTAMINEN

5.1 Näytteiden valinta tutkimusta varten

Aloitin laboraatiot toukokuussa 2006 Helsingin yliopiston virologian osaston tiloissa. Tutkimusta varten haettiin tutkimuslupa. Näytteiksi valitsin vanhoja potilasnäytteitä sekä henkilökunnan näytteitä pakastettuina. Työ ei aiheuta eettisiä ongelmia, koska näytteet ja niiden taustatiedot kulkevat työssäni näytenumeroilla.

Näytteet, jotka tutkimukseen valitsin yhdessä ohjaajieni kanssa, on määritetty aiemmin joko DiaSorin-laitteella tai HUSLABissa käytössä olevalla menetelmällä tai molemmilla. Tutkimuksen referenssimenetelmänä toimii HUSLABissa parhaillaan käytössä oleva menetelmä (Dade Behring). Referenssimenetelmän tulokset on laskettu käyttäen EPR-2-pisteen menetelmää. Näytteistä on aikaisemmin määritetty vaihtelevasti IgG, IgM, EBNA sekä aviditeetti. Näiden tulosten perusteella oletin näytteen olevan matalan tai korkean aviditeetin näyte.

Määrittämieni näytteiden kokonaismäärä oli 101 kappaletta. Akuutteja näytteitä (matala aviditeetti) määritin yhteensä 59. Kuitenkin näytteitä, joista on saatavilla aviditeettitulos sekä DiaSorin- että referenssimenetelmällä, oli vain 36. Tämän lisäksi 59 näytteestä 19 oli jommallakummalla tai kummallakin menetelmistä negatiivisia. Negatiivisista näytteistä ei aviditeettia pystytä määrittämään. Akuutit näytteet olivat muutaman vuoden takaa rutiinista kerättyjä näytteitä. Näytteet sisälsivät myös serokonversio näytteitä 11 kappaletta, jolloin samalta henkilöltä on saatu useampi näyte eri ajankohtana ja näytteis-

sä voidaan havaita IgM-arvon muuttuvan positiiviseksi, jolloin voidaan olla lähes varmoja tuoreesta infektiosta.

Vanhan immunitietin näytteitä oli yhteensä 35. Vanhan immunitietin (korkea aviditeetti) näytteet oli kerätty osittain henkilökunnasta ja osittain HUSLABin virologian osastolta. Henkilökunnan näytteet (21 kpl) oli määritetty useiden eri tutkimusten yhteydessä IgM-negatiivisiksi ja IgG-positiivisiksi. Näytteistä oli myös saatavilla aviditeettitulokset. Henkilökunnan näytteiden kaikkia aviditeettituloksia ei oltu kuitenkaan määritetty Dade Behringin menetelmällä vaan tulokset oli määritetty useiden eri valmistajien menetelmillä. Tämä ei kuitenkaan vaikuta tulosten analysointiin, koska nämä näytteet oli määritetty useampaan kertaan eri tutkimusten yhteydessä, joten voidaan olla lähes varmoja vanhasta immunitietistä. HUSLABin virologian osastolta kerättyjen näytteiden (14 kpl) valintaperusteet olivat IgM-negatiivinen ja IgG-positiivinen. Näiden määritysten perusteella oletimme, että näytteet ovat vanhaa immunitietia. HUSLABin näytteistä ei ole saatavilla aviditeettitulosta.

Lisäksi tutkin pienen seitsemän näytteen ryhmän, jotka olivat antaneet referenssimenetelmällä ristiriitaisia tuloksia. Näytteet olivat IgM-positiivisia, mutta aviditeettitulokset oli korkea viitaten vanhaan immunitietiin.

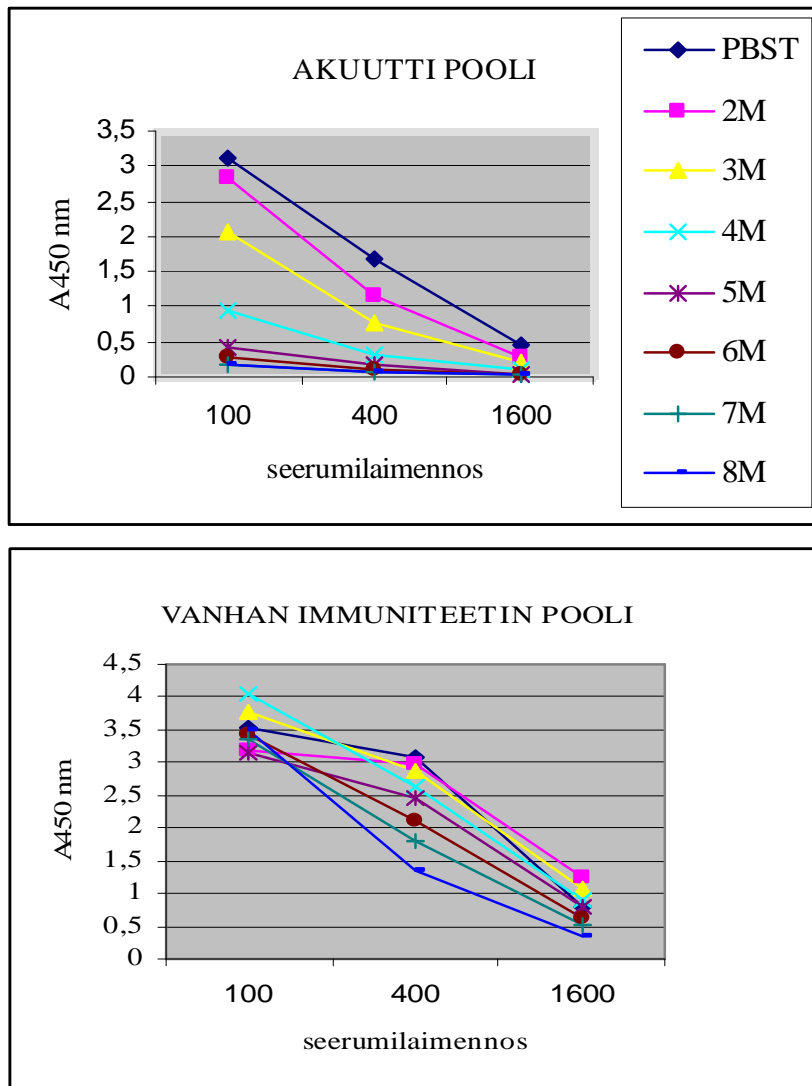
5.2 Ureakonsentraation määrittäminen

Aviditeettimenetelmän pystytys aloitettiin tutkimalla eri ureakonsentraatioiden vaikutusta aviditeettimenetelmässä. Tämä tuli tehdä ennen varsinaista tutkimusta, jotta tiedämme, millä ureakonsentraatiolla tulen tutkimuksen suorittamaan. Testattaviksi ureapitoisuuksiksi valittiin 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M ja 8M urealiuokset aikaisempien tutkimusten perusteella (Hedman 2006). 50 ml 8M urealiuosta valmistettiin liuottamalla 24,024g ureaa PBST:iin. Liukenemista nopeutettiin magneettisekoittajan ja lämpölevyn avulla. Näin saadusta liuoksesta valmistettiin loput liuokset laimentamalla (4M urea = 1:1 PBST + 8M urea, 6M urea = 1:1 4M urea + 8M urea, 2M urea = 1:1 4M urea + PBST, 7M urea = 1:1 8M urea + 6M urea, 5M urea = 1:1 6M urea + 4M urea, 3M urea = 1:1 4M urea + 2M urea).

Näytteinä käytin viiden näytteen pooleja. Poolit tehtiin viidestä akuutista ja viidestä vanhan immunitietin näytteestä. Kaikki ureapitoisuudet testattiin sekä akuutin että van-

han immuniteetin poolilla. Näytteet laimennettiin tuotepakkauksen näytelaimennosliuokseen siten, että näytteet, jotka pestiin PBST:llä laimennettiin 1:100, 1:400, 1:1600 ja 1:6400 ja näytteet, jotka pestiin urealla laimennettiin 1:25, 1:100, 1:400 ja 1:1600.

Kuviosta 4 käy ilmi kuinka ureakonsentraation kasvu vaikuttaa saatuihin absorbanssiarvoihin 450 nm:ssä. Akuutin poolin näytteiden kohdalla käyrät laskevat vielä tasaisemmin kuin vanhan immuniteetin poolin kohdalla, jossa keskimmaisessa laimennoksessa on osa arvoista hyvin lähellä toisiaan ja menevät osittain hieman ristiinkin. Kuitenkin myös vanhan immuniteetin absorbanssiarvot laskevat tasaisesti, ja vahvin ureakonstenttaatio (8M) denaturoi vasta-ainemolekyylejä selvästi eniten, jolloin myös absorbanssiarvot ovat matalimmat. Taulukosta 2 käyvät samat tulokset ilmi aviditeettiprosentteina. Aviditeettitulokset laskee tasaisesti siirryttäessä vahvempaan ureakonsentraatioon niin kuin pitääkin.



KUVIO 4. Ureakonsentraation vaikutus akuutin ja vanhan immuniteetin poolien absorbansseihin.

Aviditeettituloksia tarkasteltaessa päädyin Klaus Hedmanin ohjauksella siihen, että 6M urealiuos olisi menetelmässä tämän tutkimuksen ja aiempien tutkimusten valossa paras (taulukko 2). Myös 5M urealiuos olisi todennäköisesti toiminut hyvin. Päätimme kuitenkin valita 6M urean, koska se erotti vielä paremmin akuutin ja vanhan immunitetin näytteet toisistaan. Aviditeettitulosten käyttäytymistä tarkastelimme myöhemminkin, kun olin analysoinut enemmän näytteitä. 6M ureakonsentraatio näytti toimivan hyvin.

TAULUKKO 2. Ureakonsentraation vaikutus aviditeettituloksiin (4-pisteen EPR)

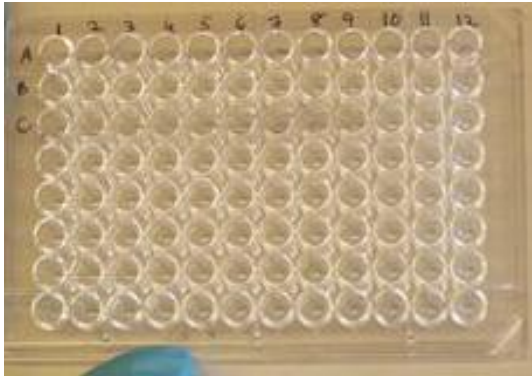
AKUUTTI POOLI	AVI %	VANHA POOLI	AVI %
2M Urea	71,2	2M Urea	95,8
3M Urea	38,5	3M Urea	101
4M Urea	29,6	4M Urea	89,6
5M Urea	6,9	5M Urea	71,1
6M Urea	4,9	6M Urea	70,4
7M Urea	2,7	7M Urea	47,6
8M Urea	1,6	8M Urea	36,2

5.3 Menetelmän työvaiheet

Työvaiheet tehtiin pääosin valmistajan ohjeen mukaan. Ohje tosin on tehty IgG-määrytyksiä varten ja sitä sovellettiin aviditeettimäärytyksen vaatimalla tavalla. Ohjeista poikettiin siten, että pesujen kohdalla käytettiin PBS-tweeniä reagenssipakkauksen pesunesteen sijasta. Näytteet, kontrollit ja reagenssit otettiin huoneenlämpöön 30 minuuttia ennen työn aloitusta. Kontrolleina käytettiin akuutin ja vanhan immunitetin näytepooleja. Lisäksi jokaiseen määrytykseen tuli ottaa mukaan reagenssipakkauksen kalibraattorit, joita oli neljä kappaletta. Niiden mukaan muun muassa määritetään negatiivisen arvon raja ja vakiokuvaaja IgG-arvoja varten. Ohjeen mukaan kalibraattori kahden IgG-absorbanssi 450 nm:ssä toimi negatiivisen raja-arvona.

Näytteet laimennettiin tuotepakkauksen näytelaimennosliuokseen. Laimennokset tehtiin yksikanavaisella pipetillä. Kustakin näytteestä tehtiin laimennossarja (1:25, 1:100, 1:400, 1:1600 ja 1:6400) (ks. liite 1). Jokainen näyte vaati yhden kuopparivin 4-pisteen EPR-menetelmässä. Index-menetelmässä tulos voitaisiin saada jopa vain kahdesta kuopasta. Laimennoksia pipetoitiin ELISA-kuoppalevyille (kuvio 5) 100 µl kuoppaa kohden. Kuoppalevyn neljään ylimpään kuoppaan (A-D) pipetoitiin neljä suurinta laimennosta (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400) ja alakuoppiin (E-H) neljä pienintä laimennosta

(1:25, 1:100, 1:400, 1:1600). Näytelevy peitettiin muovikalvolla näytteen haihtumisen estämiseksi ja näytteitä inkuboitiin 60 minuuttia +37 °C. Inkuboinnit +37 °C tehtiin Labsystems® iEMSinkubator/shaker laitteella.



KUVIO 5. ELISA-menetelmässä käytetty 96 kaivon kuoppalevy (Wikipedia).

EPR-menetelmässä neljä ylintä kuoppaa pestään PBST:llä ja neljä alinta kuoppaa urealiuoksella. 18.01 g ureaa liuotettiin 50 ml PBST:ä inkubaation aikana, jolloin urealiuoksen konsentraatio on 6M. Kuopat pestiin kolme kertaa viisi minuuttia monikanavapipettiä käyttäen. Ureapesuissa ajan tulee olla tarkka. PBST:ä ja urealiuosta käytettiin 150 µl kuoppaa kohden. Pesuliuoksen poisto kuoppalevyiltä tehtiin manuaalisella monikanavaisella imulaitteella, jonka jälkeen vielä levyjä taputeltiin imupaperiin.

Pesujen jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 100 µl HRP-konjugaattia. Konjugaattiliuos tuli laimentaa konjugaattilaimennusliuoksella 1 + 50 reagenssiohjeen mukaan. Näytelevy peitettiin muovikalvolla ja näytteitä inkuboitiin 60 minuuttia +37 °C. Inkuboinnin päätteeksi kuopat pestiin PBST:llä neljä kertaa viisi minuuttia. PBST:ä käytettiin 200 µl kuoppaa kohden.

Pesujen jälkeen pipetoitiin valmista TMB-substraattiliuosta 100 µl kuoppaa kohden sekä näytelevyille että erilliselle tyhjälle kuoppalevyriville, jota käytettiin mittalaitteen nollaukseen ja taustan tarkistamiseen. Näytelevy peitettiin muovikalvolla ja sitä inkuboitiin valolta suojattuna huoneenlämmössä 30 minuuttia. Entsyymireaktio pysäytettiin lisäämällä pysäytysliuosta (0,4 N rikkihappo) 100 µl kuoppaa kohden.

Näytteiden absorbanssit tulee mitata fotometrillä tunnin kuluttua pysäytysliuoksen lisäämisestä. Mittaukset tehtiin Labsystems® Original Multiscan- laitteella aallonpituudella 450 nm. Ennen näytteiden mittaamista fotometrillä tuli mitata tyhjä kuoppale-

vyrivi. Mittaukset suoritettiin Avidity 1.2-ohjelmalla, jolla saa halutessaan laskettua EPR-menetelmällä aviditeettiprosentit sekä 2- että 4 pisteen menetelmällä.

5.4 Ongelmatilanteet

Akuuttien näytteiden ongelman muodostaa testien erilainen negatiivisen arvon raja, jolloin osa näytteistä jäi negatiivisiksi ja aviditeettia ei voitu määrittää. Tulosten tulkintaa vaikeuttaa osittain puutteelliset näytetiedot. Näytteistä ei ole esimerkiksi saatavilla tietoa, milloin näyte on otettu suhteessa oireiden alkuun.

Muutamassa näytteessä sarjalaimennuksesta huolimatta oli korkeat absorbanssit. Tein nämä näytteet uudelleen suuremmilla laimennoksilla. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut ratkaisevasti aviditeettituloksiin, joten jätin laimennetut näytteet kokonaan tulosten käsittelystä pois.

6 TULOKSET

Kokonaisnäytemäärä, josta on tulos myös referenssimenetelmällä (Dade Behring) määritettynä on 57 näytettä jakautuen niin, että näytteistä 36 on akuuttia näytettä ja 21 vanhan immunitetin näytettä. Käsittelin tulokset SPSS-tilasto-ohjelmalla ja siirsin taulukot ja kuviot havainnollisemmiksi muunneltuina tekstinkäsittelyohjelmaan.

Liitteeksi 1 olen taulukoinut kaikkien tutkimieni näytteiden tulokset (101 kpl) sekä mahdolliset muut määriytykset, joita näytteistä on tehty. Taulukossa esitetyt DiaSorinin aviditeettitulokset ovat tämän tutkimuksen tuloksia, mutta muut DiaSorinin vastaainetulokset ovat peräisin yliopiston tekemästä aiemmasta tutkimuksesta. Dade Behringin tulokset taas ovat peräisin HUSLABin virologian osaston tietokannasta. Käytin alkuperäistä näytenumerointia, jotta mahdolliset ongelmatapaukset olisi myöhemmin helpompi selvittää.

Taulukosta 3 nähdään EBV-aviditeettitulosten diagnostiset raja-alueet. Nämä raja-arvot ovat referenssimenetelmän käytössä olevat diagnostiikan rajat. Tässä työssäni oletan, että samat raja-arvot voisivat olla käyttökelpoisia myös DiaSorinin menetelmässä.

TAULUKKO 3. EBV-aviditeettitulosten diagnostiset rajat.

EBV-AVIDITEETTITULOKSET	
0-25 %	matala eli heikko aviditeetti, sopii tuoreeseen primaari EBV-infektioon
26-40 %	raja-arvoalue
41-100 %	korkea eli vahva aviditeetti, sopii vanhaan immunitettiin

Laskin saamani aviditeettitulokset viidellä eri tavalla. Aviditeettiohjelmalla, joka on liitettyä fotometriin, sain laskettua 4-pisteen sekä 2-pisteen aviditeettitulokset. 2-pisteen tulokset on vielä kahdella eri tavalla laskettu: käyttäen laimennoksia PBST 1:100 ja 1:6400 sekä urea 1:25 ja 1:1600 (2-pisteen step 64) tai laimennoksia PBST 1:400 ja 1:6400 sekä urea 1:100 ja 1:1600 (2-pisteen step 16). Index-menetelmän tuloksetkin laskin kahdella eri tavalla: käyttäen 1:100 laimennosta (Index D 100) tai käyttäen 1:400 laimennosta (Index D 400). Tulosten laskentatavalla voi olla suurikin merkitys aviditeettituloksiin. Tämä on myös kustannussyistä mielenkiintoinen tutkimusongelma.

6.1 Menetelmien välinen korrelaatio

Koska tulokset ovat suhdeasteikollisia muuttujia, olen käyttänyt niiden keskinäisen korrelaation vertailuun Pearsonin korrelaatiokerrointa. Taulukossa 4 esitetään eri menetelmien väliset korrelaatiokertoimet. Tuloksista käy ilmi että DiaSorin 4-pisteen EPR-menetelmä antoi luotettavimmat tulokset tarkastellessamme korrelaatiokertoimien tuloksia. DiaSorinin 4-pisteen menetelmän ja Dade Behringin menetelmän välinen korrelaatiokerroin oli 0,808, jota voidaan pitää tilastollisesti merkitsevänä ja se osoittaa menetelmien välillä olevan selvää positiivista riippuvuutta. Merkitsevyys- eli significance-arvo, toisin sanoen p-arvo, oli 0,000 kaksisuuntaisena eli tämä osoittaa korrelaation olevan tilastollisesti erittäin merkitsevä 0,1 % riskitasolla. (Heikkilä 2002: 203-210.)

Verratessamme taulukon 4 muita korrelaatiokertoimia huomaamme, että DiaSorinin 2-pisteen step 16 korreloi paremmin sekä DiaSorinin 4-pisteen (0,944) että Dade Behringin (0,786) aviditeettitulosten kanssa verrattuna DiaSorinin 2-pisteen step 64 -menetelmään. Verratessamme samalla tavoin index-menetelmiä keskenään ero ei ollut kovin suuri, mutta DiaSorin Index D 400 korreloi hieman paremmin (DiaSorin 4-pisteen kanssa 0,938 ja Dade Behringin kanssa 0,737). Korrelaatiokertoimen ollessa yli 0,7 on kahden muuttujan välillä selvä positiivinen riippuvuus (Heikkilä 2002: 203-204).

Jatkossa analysoidessani tuloksia tarkemmin jätin DiaSorin 2-pisteen step 64 ja DiaSorin Index D 100 pois vertailusta, koska korrelaatiokertoimien valossa edellä mainittu tulosten laskentatapa antoi hieman paremmat tulokset.

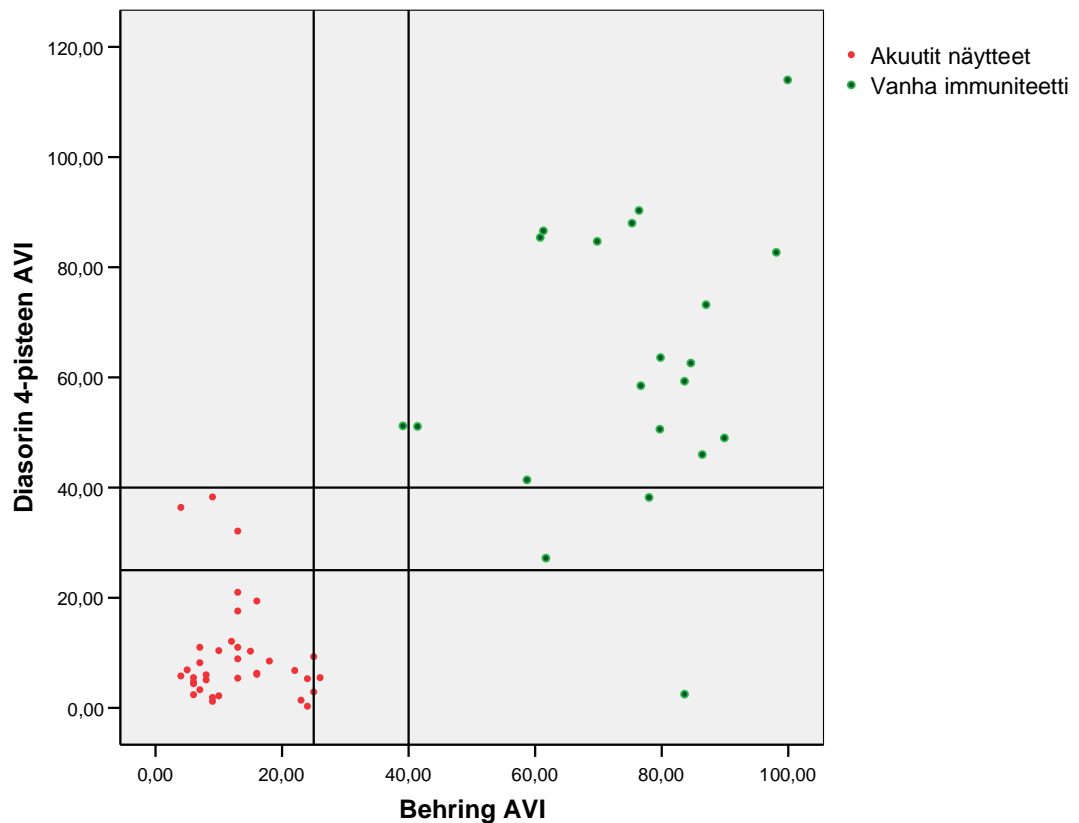
TAULUKKO 4. Menetelmien välinen korrelaatio. (** = korrelaatio on tilastollisesti erittäin merkitsevä 0,1 % riskitasolla.)

		DiaSorin, 4-pisteen AVI	DiaSorin, 2-pisteen step 16	DiaSorin, 2-pisteen step 64	DiaSorin, Index D 100	DiaSorin, Index D 400	Dade Behring AVI
DiaSorin, 4-pisteen AVI	Pearsonin kor- relaatiokerroin	1	,944(**)	,836(**)	,902(**)	,938(**)	,808(**)
	Sig-arvo (2- tailed)		,000	,000	,000	,000	,000
	N	71	71	71	71	71	57
DiaSorin, 2-pisteen step 16	Pearsonin kor- relaatiokerroin	,944(**)	1	,837(**)	,870(**)	,929(**)	,786(**)
	Sig-arvo (2- tailed)	,000		,000	,000	,000	,000
	N	71	71	71	71	71	57
DiaSorin, 2-pisteen step 64	Pearsonin kor- relaatiokerroin	,836(**)	,837(**)	1	,821(**)	,858(**)	,687(**)
	Sig-arvo (2- tailed)	,000	,000		,000	,000	,000
	N	71	71	71	71	71	57
DiaSorin, Index D 100	Pearsonin kor- relaatiokerroin	,902(**)	,870(**)	,821(**)	1	,915(**)	,732(**)
	Sig-arvo (2- tailed)	,000	,000	,000		,000	,000
	N	71	71	71	71	71	57
DiaSorin, Index D 400	Pearsonin kor- relaatiokerroin	,938(**)	,929(**)	,858(**)	,915(**)	1	,737(**)
	Sig-arvo (2- tailed)	,000	,000	,000	,000		,000
	N	71	71	71	71	71	57
Dade Behring AVI	Pearsonin kor- relaatiokerroin	,808(**)	,786(**)	,687(**)	,732(**)	,737(**)	1
	Sig-arvo (2- tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	
	N	57	57	57	57	57	57

6.2 Tulosten laskentatapojen vertailu

Tarkastelin menetelmien välistä ja eri laskentatapojen välistä riippuvuutta hajontakuvioiden avulla. Mustina viivoina kuvioissa 6-8 näkyvät molempien menetelmien diagnostiset raja-alueet. Kummassakin menetelmässä matalan aviditeetin raja on 0-25 %, raja-arvoisen aviditeetin 25-40 % ja korkean aviditeetin 45-100 %.

Kuvio 6 kertoo silmämääräisesti, että DiaSorinin 4-pisteen EPR ja Dade Behringin menetelmien välinen riippuvuus oli kohtuullisen hyvä. Kaksi referenssimenetelmällä vanhan immunitetin näytettä sai DiaSorinilla raja-arvoisen tuloksen ja yksi todella matalan tuloksen. Tarkastellessamme akuuttien näytteiden ryhmää sai kolme näytettä hieman korkean raja-arvoisen tuloksen DiaSorinin menetelmällä. Muutama akuutti näyte oli referenssimenetelmällä lähellä raja-arvoa, mutta sijoittui DiaSorinin menetelmässä selvästi akuuttien näytteiden puolelle.



KUVIO 6. Tulosten hajonta DiaSorin 4-pisteen EPR ja referenssimenetelmällä.

Tarkasteltaessa samoja tuloksia ristiintaulukoinnin (taulukko 4) avulla saamme selville kuinka näytteet jakautuivat eri aviditeettiluokkiin. Ristiintaulukoinnin tarkoituksena on

selvittää kahden muuttujan välistä yhteyttä (Heikkilä 2002: 210-212). Dade Behringin menetelmällä akuuteista näytteistä kolme olikin saanut DiaSorinilla selvästi raja-arvoisen aviditeettituloksen. Kaksi näytettä oli Dade Behringillä raja-arvoista, mutta sai Diasorilla toivotunlaiset tulokset (muut tulokset huomioon ottaen liite 2). Vanhan immuniteetin näytteistä kaksi antoi poikkeuksellisen tuloksen. Toinen oli DiaSorinin menetelmällä raja-arvoinen ja toinen selvästi matala-avidinen. Tämän näytteen, joka antoi matalan aviditeetin tuloksen, testasin kolmeen kertaan, eikä aviditeetissa ollut eroja.

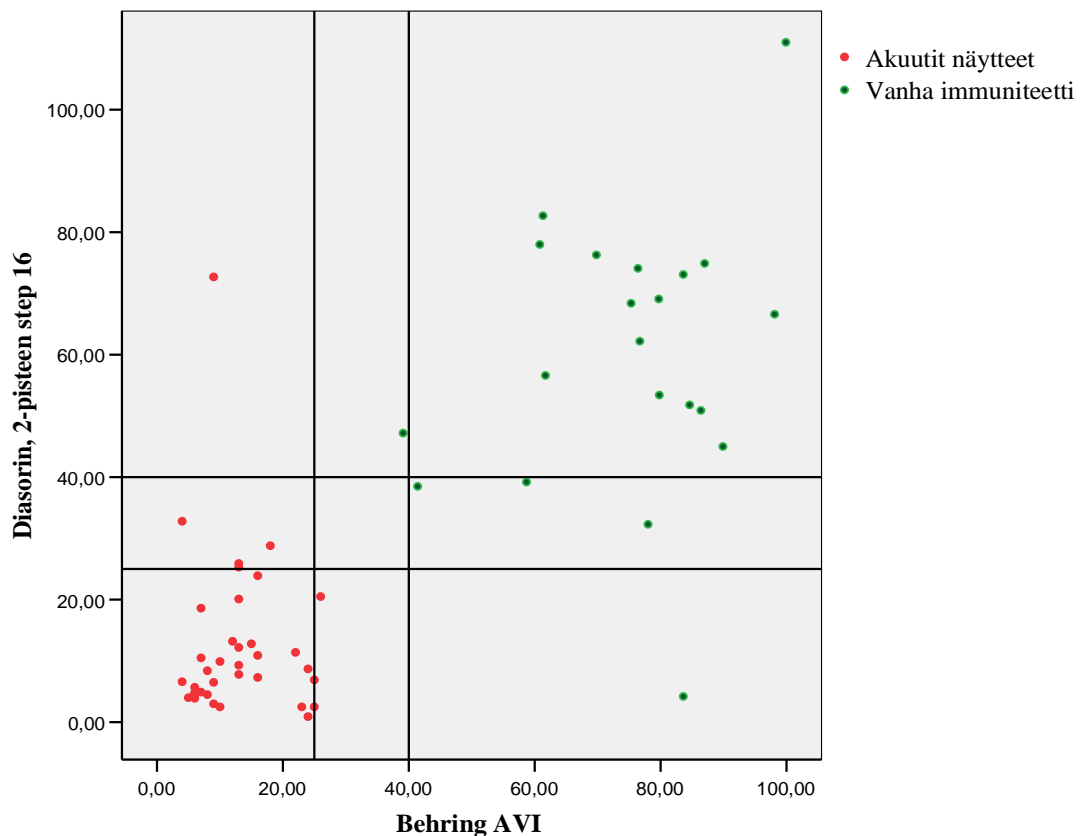
Taulukon 5 tulosten perusteella voimme todeta, että Dade Behringin menetelmällä aiemmin akuuteiksi näytteiksi todetuista näytteistä 91,6 % oli myös DiaSorinin menetelmällä akuutteja. Näin ollen DiaSorinin 4-pisteen EPR-menetelmän sensitiivisyyttä eli herkkyyttä, toisin sanoen kykyä löytää sairaat henkilöt, voidaan pitää kohtalaisen hyvänä. DiaSorinin menetelmän spesifisyys eli tarkkuus jäi 85,7 %:iin. Menetelmä on sitä spesifisempi, mitä vähemmän vääriä positiivisia tuloksia se antaa oikeasti negatiivisista näytteistä (Hedman 2006). Raja-arvoiset näytteet laskettiin mukaan prosentiosuuksiin DiaSorinin tulosten valossa.

Edellisissä tulosten vertailuissa oli mukana vain 21 vanhan immuniteetin näytettä. Näytteitä oli kuitenkin yhteensä 35. Näytteistä vain 21:lle oli tulos käytettävissä myös referenssimenetelmällä. Kaikki 14 näytettä, jotka eivät olleet mukana edellisissä taulukoissa (5-7) ja kuvioissa (6-8), sijoituivat kuitenkin selvästi vanhan immuniteetin puolella (liite 2). Valitsin nämä näytteet HUSLABin virologian osastolta. Ne olivat IgG-positiivisia ja IgM-negatiivisia. Näiden tulosten mukanaolo olisi nostanut otoskokoa ja 4-pisteen EPR-menetelmän spesifisyyden 91 %:ksi.

TAULUKKO 5. DiaSorin 4-pisteen EPR ja referenssimenetelmän aviditeettitulosten yhteneväisyys.

		Dade Behringin aviditeetti			Yht.
		Akuutit näytteet	Raja- arvoalue	Vanha immuniteetti	
DiaSorin 4-pisteen aviditeetti	Akuutit näytteet	32 91,4 %	1 50,0 %	1 5,0 %	34
	Raja-arvoalue	3 8,6 %	0 ,0%	2 10,0 %	5
	Vanha immuniteetti	0 ,0%	1 50,0 %	17 85,0 %	18
YHTEENSÄ		35 100,0 %	2 100,0 %	20 100,0 %	57

Seuraavassa kuviossa 7 on verrattu DiaSorin 2-pisteen step 16 tuloksia Dade Behringin referenssimenetelmän tuloksiin verrattuna hajontakuvion avulla. DiaSorinin 2-pisteen laskentatavalla tulokset olivat lähes yhtä luotettavia kuin 4-pisteen laskentatapaa käyttäen. Yksi Dade Behringillä selvästi akuutti näyte antoi tällä laskentatavalla todella korkean aviditeettituloksen. Näyte on sama, joka antoi 4-pisteen laskentatapaa käyttäen raja-arvoisen tuloksen. Vanhan immuniteetin näytteistä niin ikään yksi antoi todella matalan tuloksen; sama näyte kuin 4-pisteen tuloksissa.



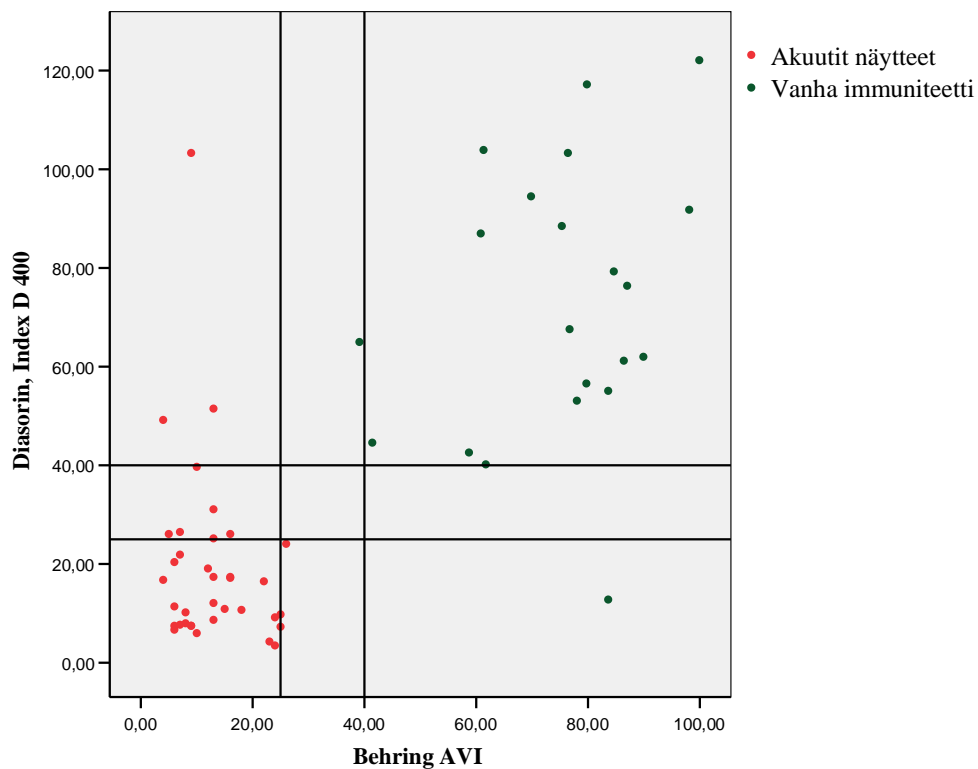
KUVIO 7. Tulosten hajonta DiaSorin 2-pisteen step 16 ja referenssimenetelmällä.

Taulukosta 6 käy ilmi DiaSorin 2-pisteen step 16 laskentatapaa käyttäen ristiintaulukoidut tulokset Dade Behringin aviditeettitulosten kanssa. Kun laskemme raja-arvoiset näytteet DiaSorinin tulosten mukaan, menetelmän sensitiivisyys oli 86,1 % ($31/36 \times 100$ %) ja spesifisyys 80,9 % ($17/21 \times 100$ %). Nämä tulokset olivat vain hieman huonommat kuin 4-pisteen laskentatapaa käyttäen. Tämänkin menetelmän spesifisyys nousisi 88,6 %:iin ($31/35 \times 100$ %), jos mukana olisi kaikki määrittämäni vanhan immuniteetin näytteet.

TAULUKKO 6. DiaSorin 2-pisteen step 16 ja referenssimenetelmän aviditeettitulosten yhteneväisyys.

		Dade Behringin aviditeetti			Yhteensä
		Akuutit	Raja-arvo	Vanha immuniteetti	
DiaSorin, 2-pisteen step 16	Akuutit näytteet	30 85,7 %	1 50,0 %	1 5,0 %	32
	Raja-arvoalue	4 11,4 %	0 0,0 %	3 15,0 %	7
	Vanha immuniteetti	1 2,9 %	1 50,0 %	16 80,0 %	18
YHTEENSÄ		35 100,0 %	2 100,0 %	20 100,0 %	57 100,0 %

Kuviossa 8 on verrattu DiaSorin Index D 400 tuloksia Dade Behringin referenssimenetelmän tuloksiin hajontakuvion avulla. DiaSorin Index D 400 laskentatapaa käyttäen tulokset eivät ole yhtä luotettavia kuin 4-pisteen tai edes 2-pisteen laskentatapaa käyttäen. Useampi Dade Behringillä selvästi akuutti tulos antoi Index D 400 laskentatavalla raja-arvoisen tai korkean aviditeettituloksen. Kuitenkin vanhan immuniteetin puolella tulokset olivat taas paremmin toisistaan riippuvaisia kuin muilla laskentatavoilla.



KUVIO 8. Tulosten hajonta DiaSorin Index D 400 ja referenssimenetelmällä.

Taulukosta 7 käy ilmi DiaSorin Index D 400 laskentatapaa käyttäen ristiintaulukoidut tulokset Dade Behringin aviditeettitulosten kanssa. Näin laskettuna menetelmän spesifisyys oli 95,2 %, mutta sensitiivisyys vain 77,1 %. Menetelmän sensitiivisyyden jäädessä noin matalaksi ei tätä tulosten laskentatapaa voi suositella käytettäväksi DiaSorinin aviditeettimenetelmässä.

TAULUKKO 7. DiaSorin Index D 400 ja referenssimenetelmän aviditeettitulosten yhteneväisyys.

		Dade Behringin Aviditeetti			Yhteensä
		Akuutit	Raja-arvo	Vanha immuniteetti	
DiaSorin, Index D 400	Akuutit näytteet	26 74,3 %	1 50,0 %	1 5,0 %	28
	Raja-arvoalue	6 17,1 %	0 ,0%	0 ,0%	6
	Vanha immuniteetti	3 8,6 %	1 50,0 %	19 95,0 %	23
YHTEENSÄ		35 100,0 %	2 100,0 %	20 100,0 %	57 100,0 %

Liitteenä 2 olevassa tulostaulukossa punaisella merkatut näytenumerot ovat serokonversio näytteitä. Näytteitä oli yhteensä viideltä henkilöltä. Yhdeltä henkilöltä oli saatu kolme näytettä, muilta on vain kaksi. Näytteiden analysointia häiritsi, ettei kaikista näistä näytteistä ollut saatavilla näytteenottopäivää. Kaksi ns. ykkösnäytettä jäi kummallakin menetelmällä negatiiviseksi. Kaksi muuta ykkösnäytettä sen sijaan olivat DiaSorinin menetelmällä positiivisia, vaikka ne olivat Dade Behringillä negatiivisia. Kaikki serokonversio näytteiden aviditeettitulokset olivat suhteellisen hyvin matala-avidisia. Vain näyte 02EB 0599 antoi selvästi liian korkean aviditeettituloksen. Kahdella serokonversio näytteistä oli aviditeettitulo myös Dade Behringin referenssimenetelmällä, ja ne olivatkin mukana vertailukuvioissa (6-8) ja taulukoissa (5-7).

Näytteistä, jotka olivat Dade Behringin menetelmällä negatiivisia, testasin ensin pelkän IgG-arvon. Jos tämä oli positiivinen, tein niistä myös aviditeettimäärityksen. Viisi näytettä jäi kummallakin menetelmällä negatiiviseksi. DiaSorinin menetelmällä pystyin määrittämään yhdeksälle näytteelle aviditeetti arvon, jotka olivat jääneet Dade Behringin menetelmällä negatiiviseksi. Kuitenkin viisi näytettä jäi taas DiaSorinin menetelmällä negatiiviseksi, vaikka olivat Dade Behringin menetelmällä olleet positiivisia. Mielen-

kiintoista näissä näytteissä oli se, että kolme niistä on ollut myös DiaSorinilla aiemmassa tutkimuksessa positiivisia (liite 2). Näiden tulosten valossa DiaSorinin p18-peptidiantigeeni pärjasi hyvin löytäen myös heikosti positiiviset näytteet.

Mielenkiintoisimpia tuloksia antoi seitsemän näytteen ryhmä (taulukko 8). Nämä tulokset olivat ristiriitaisia. Näytteet olivat IgM-positiivisia, mutta aviditeettitulos oli korkea viitaten vanhaan immunitettiin. DiaSorinin 4-pisteen EPR-menetelmällä aviditeettitulokset olivat kuitenkin selvästi matalampia kuin Dade Behringin menetelmällä. Vain kahden näytteen aviditeettitulos oli korkea viitaten vanhaan immunitettiin. Loput viisi näytettä antoi matala-avidiset tulokset viitaten tuoreeseen infekioon. Yhden näytteen tulos tosin oli lähellä raja-arvoista (24,7 %). Nämä aviditeettitulokset ovat melko ristiriitaisia myös menetelmien välillä. Joko näytteissä on IgM virheellisesti positiivinen ristireagoinnin myötä tai muista syistä, tai sitten DiaSorinin menetelmän aviditeettitulokset on tuntemattomista syistä virheellisiä. Nämä näytteet tulisi tutkia vielä muilla menetelmillä, kuten muiden tuottajien tuotepakkauksilla, heterofiilisiä vasta-aineita käyttäen tai määrittämällä näytteistä mahdollisia muita virusvasta-aineita. Tämän jälkeen voitaisiin saada varmuus oikeista tuloksista.

TAULUKKO 8. Ristiriitaisia tuloksia antaneiden näytteiden tulokset.

DIASORIN		DADE BEHRING		
	4-pisteen Aviditeetti	EBV IgG	EBV IgM	Aviditeetti
		<25	<0.100	<25
		25-50	0.1-0.2	25-40
		>50	>0,200	>40
06 EB 1156	3,8	33	pos	31
06 EB 1052	10,7	210	pos	108
06 EB 1034	44,5	120	pos	74
06 EB 1000	12,2	38	pos	45
06 EB 910	24,7	150	pos	86
06 EB 765	40,1	1000	pos	72
06 EB 704	12,2	180	pos	190

6.3 DiaSorinin menetelmän toistettavuus

Halusin saada käsityksen myös DiaSorinin 4-pisteen EPR-menetelmän toistettavuudesta. Toistettavuutta tutkin sarjojen välillä. Tämä oli helppo tutkia, koska käytin kontrollipooleja jokaisessa tekemässäni sarjassa. Määritin molemmat poolit yhteensä kymme-

nessä sarjassa. Taulukon 9 tuloksista voidaan huomata, että sarjojen välinen toistettavuus oli melko hyvä. Sarjojen välisessä toistettavuudessa oli kuitenkin pieniä eroja. Tämä voi johtua siitä, että menetelmä on täysin käsityötä. Erot eivät olleet kuitenkaan ratkaisevan suuria, sillä kaikki akuutin poolin näytteet sijoittuivat selvästi alle raja-arvon (25,0) ja vanhan immuniteetin poolin tulokset yli raja-arvon (40,0). Variaatiokerroin lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon suhteena ja ilmoitetaan usein prosentteina. Se suhteuttaa keskihajonnan aineiston keskiarvoon. (Heikkilä 2002: 87-88.) Tosiasiasahan vanhan immuniteetin tulosten vaihteluväli on akuutin poolia suurempi, mutta lukujen suuruudesta johtuen variaatioprosentti on pienempi.

TAULUKKO 9. Tulosten toistettavuus akuutin ja vanhan immuniteetin pooleilla Dia-Sorin 4-pisteen menetelmällä.

	N	minimi	maksimi	keskiarvo	keskihajonta	CV%
Akuutti pooli	10	4,5	11,7	7,29	2,66	36,50 %
Vanhan immunit. pooli	10	43,7	70,4	56,46	7,27	12,90 %

7 TYÖN JA TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Tutkimuksen luotettavuutta arvioidaan reliabiliteetin ja validiteetin perusteella. Validiteetilla eli pätevyydellä tarkoitetaan sitä, että tutkimuksen tulee mitata sitä, mitä oli tarkoituskin selvittää. Mitattavien käsitteiden ja muuttujien tulee olla tarkoin määriteltyjä, jotta mittaustuloksetkin ovat valideja. Reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoitetaan tutkimustulosten tarkkuutta. Tutkimuksen tulokset eivät saa siis olla sattumanvaraisia. Luotettavan tutkimuksen tulee olla toistettava, otoskoon on oltava tarpeeksi suuri ja sen tulee edustaa koko tutkittavaa perusjoukkoa. (Heikkilä 2002: 29-30, 186-187.)

Noudatin työskennellessäni reagenssivalmistajan ja yliopiston työohjeita virhetekijöiden minimoimiseksi ja työn luotettavuuden parantamiseksi. Suoritin jokaisen määrityksen samalla ohjeiden mukaisella tavalla. Pidin jokaisen päivän työvaiheista päiväkirjaa ja tallensin kaikki tulosliuskat liitteeksi. Käsittelin ja laimensin näytteet aina samalla tavalla. Riittävän sulatuksen jälkeen sekoitin näytteet vortexilla ja tämän jälkeen tein sarjalaimennokset. Pipetoinnin suoritin aina epäsuoralla tekniikalla. Saatuihin tuloksiin voi

vaikuttaa myös moni työntekijästä riippumaton asia, kuten reagenssien laatu ja esimerkiksi se, kuinka tasaisena lämpökaapin lämpötila pysyy.

Tuotepakkauksessa olleet standardit käsittelin valmistajan ohjeiden mukaan. Kontrollina käytetyt akuuttivaiheen ja vanhan immuniteetin poolit käsittelin kuten potilasnäyttekin. Kontrollit ja standardit olivat mukana jokaisessa tekemässäni sarjassa. Ennen näytteiden tulosten analysointia varmistin, että standardit ja kontrollit olivat hyväksytyissä rajoissa (DiaSorin 2004). Säilytin reagenssipakkaukset ohjeiden mukaisesti viileässä ja otin ne lämpiämään huoneenlämpöön 30 minuuttia ennen määritysten aloittamista ohjeiden mukaisesti. Kuoppalevyrivejä, jotka oli päällystetty peptidiantigeenillä, tuli ottaa vain kyseistä määritystä varten tarvittava määrä, jotteivät loput ole turhaan huoneenlämmössä.

Menetelmä on täysin käsityötä, joten siihen liittyy vahvasti inhimilliset virhetekijät. Työn suorittamista luotettavalla tavalla helpottivat selkeät työohjeet sekä aina samalla tavalla toistettavat työvaiheet. Olin myös harjoitellut aviditeettimääritysten tekoa ennen varsinaisen tutkimuksen aloittamista, jottei harjaantumattomuus vaikuttaisi tutkimustulosten luotettavuuteen. Jos aviditeettitulokset ei ollut odotetunlainen aiempien tulosten valossa, tein määrittymisen aina uudelleen. Tulokset kuitenkin pysyivät lähes samoina. Menetelmän luotettavuus lisääntyisi, jos edes osan työvaiheista voisi tehdä analysaattorin avulla. Myös tulosten kirjaamiseen liittyy inhimillisen virheen mahdollisuus. Tarkistin kuitenkin kaikki kirjaamani ja taulukoimani tulokset kahteen kertaan. Tulosten luotettavuutta lisää, että niitä voitiin verrata referenssimenetelmään, joka on ollut jo pidempään käytössä HUSLABissa.

Tutkimuksessa käytetyt näytteet oli säilytetty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa useita vuosia, henkilökunnan näytteitä jopa vuosikymmeniä. Säilytyksen aikana mahdollisesti tapahtuneen näytteen kylmäkuivumisen vaikutuksista vasta-aineiden ominaisuuksiin ei ole riittävästi tietoa. Työskentelyjen aikana tapahtuva näytteiden uudelleen sulattaminen ja jäädyttäminen ei kuitenkaan merkittävästi vaikuta vasta-aineiden affiniteettiin. (Hedman 2006.)

Tutkimuksessani käytetty kokonaisnäytemäärä oli 101 kappaletta. Tämä on riittävä satumanvaraisuuksien poistamiseksi, mutta isompi otoskoko olisi lisännyt vielä työn luotettavuutta. Otoskoon valinnassa tehtiin kompromissi kustannusten ja käytettävissä olevan ajan välillä. Tutkimukseni otanta toteutettiin etsimällä näytteitä sekä matalan että

korkean aviditeetin luokkaan, ilman että potilaita jaoteltiin muilla kriteereillä, lukuun ottamatta seitsemän näytteen ryhmää, jossa valintakriteerit olivat IgM-positiivisuus ja samanaikaisesti korkea aviditeettiarvo. Valitsemalla näytteet näin saatiin tutkimukseen mukaan näytteitä riittävän laajalta tulosalueelta. Näyteaineisto ei kuitenkaan vastannut täysin normaalia potilasnäyteaineistoa, koska suuri osa näytteistä oli akuutin infektion näytteitä. Todellisuudessa tuoreita infektioita diagnosoidaan vain muutama prosentti kokonaisnäytemäärästä.

Tutkimus on erittäin vertailukelpoinen aiempien tutkimusten kanssa. Nyt saadut tulokset ovat niidenkin perusteella luotettavia. Weissbrichin tutkimuksessa hänen saamansa tulokset oli samansuuntaisia kuin tässä työssä saadut. Weissbrichin ja Mitchellin tutkimukset taas ovat keskenään hieman ristiriitaisia, koska Weissbrichin mukaan peptidiantigeeni ei toiminut yhtä hyvin kuin VCA-antigeenisekoitus, kun taas Mitchellin mukaan p18-peptidiantigeeni toimi hyvin. Mitchell sai myös antigeenille paremman herkkyyden ja spesifisyyden kuin Weissbrich tai minä tässä työssä.

8 POHDINTA

Tutkittavia näytteitä oli yhteensä 101 kappaletta. Näytteitä, joista oli saatavilla tulos myös ulkoisella referenssimenetelmällä, oli 57 kappaletta. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää soveltuuko DiaSorinin IgG-VCA tuotepakkaus aviditeetin määrittämiseen sekä mikä tulostenlaskentatavoista antaa kaikkein luotettavimmat tulokset.

Vertailtaessa DiaSorinin 4-pisteen ja Dade Behringin aviditeettimenetelmää keskenään sain tulokseksi tilastollisesti merkittävän korrelaation (0,808). Näiden tulosten valossa DiaSorinin IgG-VCA-tuotepakkaus toimii suhteellisen hyvin aviditeettitutkimuksessa. Menetelmän sensitiivisyys oli 91,6 % ja spesifisyys 85,7 %. Sensitiivisyyttä voidaan pitää kohtalaisena. Menetelmän spesifisyyskin nousi 91 %:iin, kun tuloksiin otettiin mukaan kaikki tutkimani vanhan immunitetin näytteet. Kuitenkin nämä tulokset tarkoittavat karkeasti sitä, että yksi kymmenestä näytteestä antaa virheellisen tuloksen.

Saamani tutkimustulokset ovat samansuuntaisia muiden aiempien tutkimusten kanssa. Tutkimuksestani selvisi, että aviditeettitutkimuksesta on hyötyä lisätutkimuksena. DiaSorinin p18-antigeenilla saamani sensitiivisyys ja spesifisyys ovat kahden ulkomaisen

tutkimuksen välistä, sillä Weissbrichin tutkimuksessa sensitiivisyys oli 97 % ja spesifisyys vain 87 % kun taas Mitchellin tutkimuksessa sensitiivisyys oli 95 % ja spesifisyys 96 %. He saivat kuitenkin hieman paremmat sensitiivisyydet, kuin mitä itse sain tässä työssä. He ovat tutkineet menetelmää kuitenkin eri valmistajien tuotepakkauksilla, vaikka heillä on kummallakin ollut sama p18-peptidiantigeeni käytössä. Heillä on ollut tutkimuksissaan isommat otoskoot, kuin mikä oli tässä työssä mahdollista. Suurempi otoskoko olisi saattanut nostaa myös omien tulosteni sensitiivisyyttä.

Tämän tutkimuksen mukaan tällä hetkellä HUSLABissa käytössä oleva Dade Behringin menetelmä toimii paremmin kuin DiaSorinin menetelmä. Tosin, jos mietitään ristiriitaisia tuloksia antaneiden seitsemän näytteen ryhmää, saattoi DiaSorin löytää paremmin akuutin infektion näytteet. Tästä ei kuitenkaan ole varmuutta, ennen kuin näytteet analysoidaan muilla menetelmillä. Toisaalta taas DiaSorinin menetelmällä yhdeksän sellaista näytettä, jotka jäivät Dade Behringin menetelmällä negatiivisiksi, oli positiivisia ja näin ollen niille pystyttiin määrittämään aviditeettiarvo tarvitsematta odottaa kakkosnäytettä. Tämä on melko suuri ero analysoitaessa näinkin pientä akuuttien näytteiden joukkoa. Näiden tutkimusten perusteella emme voi olla kuitenkaan täysin varmoja olivatko näytteet oikeasti positiivisia. Täytyy kuitenkin muistaa, että myös viisi näytettä jäi DiaSorinilla negatiivisiksi, vaikka olivat Dade Behringin menetelmällä positiivisia. Potilaan kannalta on erityisen tärkeää, että pärjättäisiin vain yhdellä näytteellä, jolloin vastaus saadaan nopeammin.

Mielenkiintoinen tutkimusongelma oli myös tulostenlaskentatapojen keskinäinen vertailu. Tämä kiinnostaa erityisesti kustannuksellisista syistä, koska luotettavimpana pidetty 4-pisteen EPR-menetelmä kuluttaa kaksin verroin antigeenikuoppia sekä reagensseja. Vertailtaessa korrelaatiokertoimia 4-pisteen EPR-menetelmällä oli paras korrelaatio referenssimenetelmään verrattuna. Kuitenkin DiaSorinin 2-pisteen step 16 laskentatapa ylsi lähes yhtä hyvään korrelaatioon. Muut laskentatavat jäivät korrelaatiokertoimissa vähän alemmaksi. Myös molemmat Index-menetelmät ylsivät yli 0,7 korrelaation, mitä pidetään vielä vahvana korrelaationa. Jos eri laskentatapojen antamia tuloksia verrataan ristiintaulukoinnin ja hajontakuvioiden avulla, antaa 4-pisteen EPR-menetelmä myös luotettavimmat tulokset. Seuraavaksi parhaiten pärjäsi 2-pisteen step 16 EPR-menetelmä. Kuitenkin menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys oli 80 % luokkaa, mikä on kuitenkin melko alhainen. Index-menetelmän heikkous oli sen huono sensitiivisyys,

vain 77 %. Näiden tulosten perusteella luotettavin tulostenlaskentatapa on 4-pisteen menetelmä, tosin 2-pisteen menetelmä ei ole merkittävästi heikompi.

Työntekijän kannalta DiaSorin ja Dade Behringin -menetelmien välillä ei ole suurta eroa. Kummassakin menetelmässä työn tekeminen kestää yhtä pitkään. Jos luotettavat tulokset saataisiin käyttäen 2-pisteen EPR-menetelmää, säästettäisiin sekä reagenssikuluttannuksia että työhön kuluvaan aikaan. Näytteitä ei tarvitsisi laimentaa niin montaa kuin 4-pisteen EPR-menetelmässä ja yhden näytteen pipetoimiseen kuluva aika lyhenisi.

Tuloksia hyödyntävät itseni ja Stadian lisäksi professori Klaus Hedman sekä DiaSorin. Klaus Hedman pohtii tuloksien perusteella, olisiko DiaSorinin tuotepakkausta tarpeen testata vielä lisää, ja tämän jälkeen mahdollisesti miettiä HUSLABissa käytettävää menetelmää. DiaSorin halusi selvittää, toimiiko heidän antigeneensa aviditeettitutkimuksessa sekä antaako aviditeettitutkimus lisäinformaatiota tavallisten serologisten tutkimusten rinnalla.

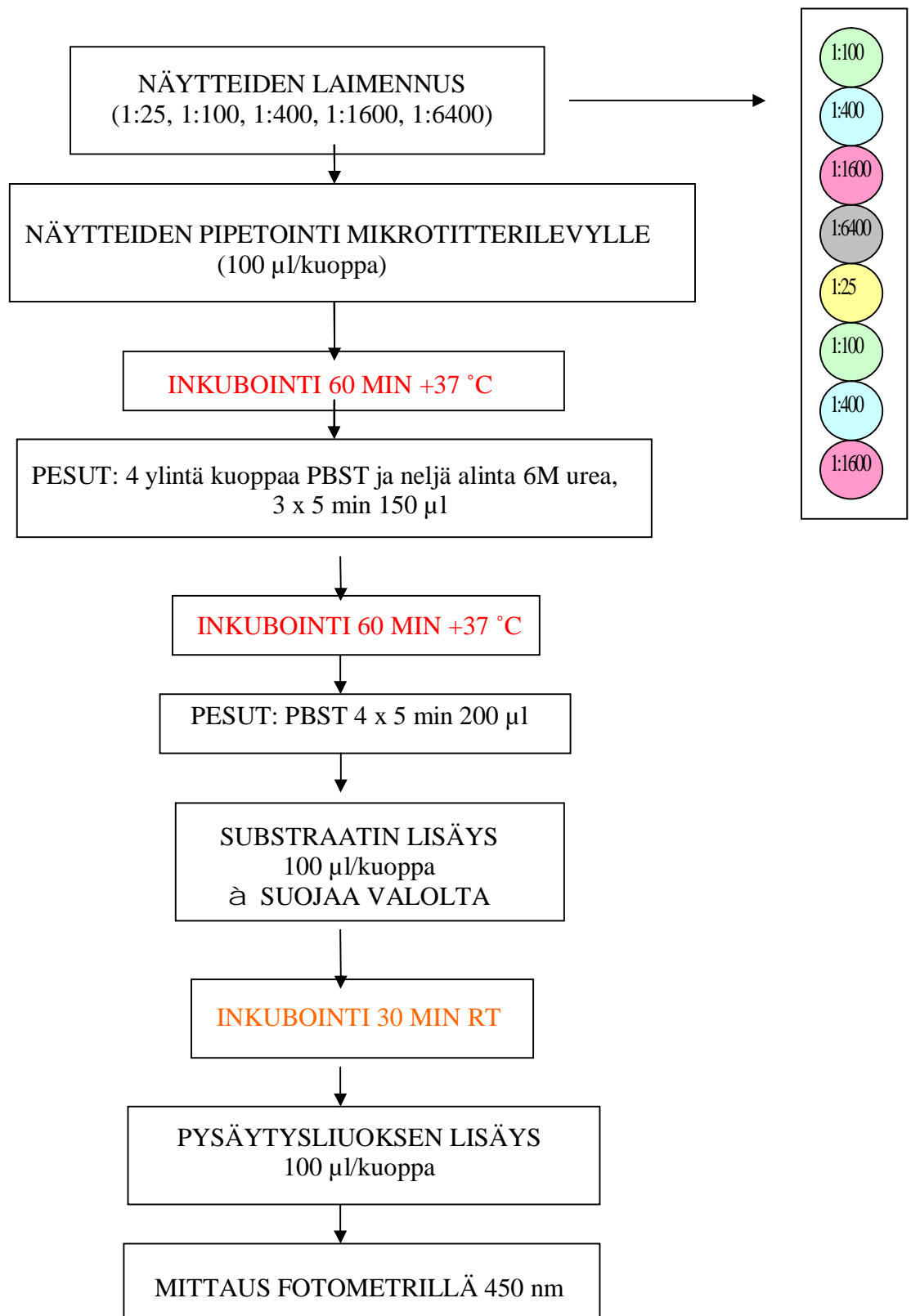
Mahdollisilla lisätutkimuksilla voisi saada tärkeää tietoa, riittäisikö 2-pisteen EPR-menetelmä luotettavaan lopputulokseen DiaSorinin menetelmässä. Mielenkiintoisin jatkotutkimus kohdistuisi mielestäni juuri ristiriitaisia tuloksia antaneisiin näytteisiin. Näin saataisiin myös lisätietoa tutkimieni menetelmien paremmuudesta.

LÄHTEET

- Cambridge University Press 2001. Expert Reviews in Molecular Medicine. Verkkodokumentti. <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/nfig001lyb.gif>> Luettu 15.9.2006.
- Department of Pediatrics, Chiang Mai University: Infectious mononucleosis. Verkkodokumentti. <www.med.cmu.ac.th/.../IM_serology_figure2.1.jpg> Luettu 3.11.2006.
- DiaSorin 2004. ETI-VCA-G. Menetelmäohjeet.
- Epstein Barr virus 2005. Faculty of medicine Bangkok. Verkkodokumentti. <<http://www.virusrama.org/Serology/EBV.files/EBV1.gif>> Luettu 16.10.2006
- Evans AS, Niederman JC, Cenabre LC, West B, Richards VA. 1975. A prospective evaluation of heterophile and Epstein Barr virus specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis—specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *The journal of infectious diseases* 132:546–554.
- Evolution sérologique d'une infection à EBV 2004. Laboratoires réunis. Verkkodokumentti. <www.labo.lu/pictures/analyses/graph/EBV.jpg> Luettu 16.10.2006.
- Hedman, Klaus 2006. Professori. Helsinki. Suullinen tiedonanto 17.3.2006 ja 29.5.2006.
- Hedman, Klaus – Lappalainen, Maija – Seppälä, Ilkka – Mäkelä, O 1989: Recent primary toxoplasma infection indicated by low avidity of specific IgG. *The journal of infectious diseases*. 1989; 4: 736-740.
- Hedman, Klaus – Seppälä, Ilkka 1988: Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *Journal of clinical immunology*. 1988; 8: 214-221.
- Heikkilä, Tarja 2002: Tilastollinen tutkimus. 4. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Liikanen, Pirkko – Sajavaara, Paula 1995: Tutkimus ja sen raportointi. 4.-6. painos. Jyväskylä: Kirjayhtymä Oy.
- Hukkanen, Veijo – Lautenschlager, Irmeli – Linnavuori, Kimmo – Suni, Jukka 2005: Herpesvirusten ryhmä. Teoksessa: Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 463-496.
- HUSLAB 2006: Tutkimusohjekirja. Verkkodokumentti. <http://80.83.0.164/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1335&terms=ebv> Luettu 27.8.2006. Päivitetty 22.8.2006.

- Lehtinen, Matti – Lehtinen, Tuula – Koskela, Pentti – Bloigu, Aini 2003: Raskaudenai-
kainen infektio lasten leukemian syynä. Verkkodokumentti.
<[http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2003/
8_2003/raskaudenaikainen_infektio_lasten_leukemian_syyna/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2003/8_2003/raskaudenaikainen_infektio_lasten_leukemian_syyna/)> Luettu
30.8.2006.
- Lehtinen, Tuula – Lumio, Jukka – Lehtinen, Matti 1993: Epstein-Barrin virus ja syöpä.
Duodecim 109(10) 825.
- Lehtonen, Anne – Ojala Päivi 2006: Herpesvirukset ja immuunijärjestelmä - virusperäi-
sen syövän alkulähteillä. Duodecim 122(14) 1759-66.
- Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter – Tirri,
Rauno 2001: Biologian sanakirja. Helsinki: Otava.
- Mitchell, J – Enriquez, R – Whybin, R – Cannone, A – Gould, S – Robertson, P 2002:
Comparison of commercially available Epstein-Barr virus IgG ELISAs
utilising viral capsid antigen (VCA) gp125 and p18. Verkkodokumentti.
<[http://www.panbio.com/download/BREBV8%20gp125vp18%20paper.p
df](http://www.panbio.com/download/BREBV8%20gp125vp18%20paper.pdf)> Luettu 6.11.2006.
- Panbio 2004: Epstein Barr virus. Verkkodokumentti.
<<http://www.panbio.com/download/EBV%20Clinical%20Sheet.pdf>> Lu-
ettu 6.11.2006.
- Robertson, Peter – Beynon, Sandy – Whybin, Ross – Brennan, Catherine – Vollmer-
Conna, Uté – Hickie, Ian – Lloyd, Andrew 2003: Measurement of EBV-
IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary
EBV infection. Journal of Medical Virology 70: 617-623.
- Seppälä, Ilkka – Söderlund, Maria – Lappalainen, Maija – Hedman, Klaus 1994: Vasta-
aineen aviditeetti immuunivasteessa ja infektioautien diagnostiikassa.
Duodecim 110(2). 178-184.
- Weissbrich, Benedikt 1998: The Use of Semi-Automated EBV IgG Avidity Deter-
mination for the Diagnosis of Infectious Mononucleosis. Journal of Medi-
cal Virology 54: 145-153.
- Wikipedia, elektroninen tietosanakirja: ELISA. Verkkodokumentti.
<<http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>> Luettu 6.11.2006.

AVIDITEETTIMÄÄRITYKSEN TYÖVAIHEET



			DIASORIN					DIASORIN (aiemmat tutkimukset)			DADE BEHRING			
	Näytenumero		4-pisteen	2-pisteen	2-pisteen	INDEX	INDEX	EBNA	EBV IgM	VCA IgG	neg. raja-arvo pos.	EBV IgG	EBV IgM	Avidity
			AVI	step 16	step 64	D 100	D 400	IU/mL	IU/mL	IU/mL		U/ml		
			<25	<25	<25	<25	<25	<5	<20	<20		<25	<0.100	<25
			25-40	25-40	25-40	25-40	25-40	5-20	20-40			25-50	0.1-0.2	25-40
			>40	>40	>40	>40	>20	>40	>20		>50	>0,200	>40	
1	03 EB	1921	negative					<3	110	<10		<25	pos	
2	3 EB	2109	negative					4.9	>160	<10		<25	pos	
3	3 EB	2466	negative					5.2	23.7	<10		<25	pos	
1	3 EB	1947	5,8	5,8	2,7	8,5	14,4	4.9	29.4	<10		<25	pos	
2	3 EB	1950	6,2	4,3	2,8	10,8	23,7	7.9	>160	22.1		<25	pos	
3	03 EB	1876	6,3	5,1	3,3	18,3	29,9	4.7	>160	14.2		<25	pos	
4	3 EB	2557	9,4	11,3	7,1	15,5	22,8	4.2	>160	13.3		<25	pos	
5	4EB	0221	4,9	7,1	7,1	67,0	27,1	4.2	>160	32.2		<25	pos	
6	4 EB	0308	4,9	6,8	8,8	66,3	27,7	5.4	150	39		<25	pos	
1	3 EB	1104	negative					<3	61.4	69.3		75	pos	9
2	3 EB	1470	negative					7.7	>160	16		42	pos	13
3	3 EB	1150	negative					15.3	>160	56.7		61	pos	4
4	3 3B	2179	negative					>3	>160	17.3		28	pos	24
5	3 EB	1614	negative					5.8	112	34.4		56	pos	6
1	3 EB	1048	0,3	0,9	0,5	10	3,5	4.9	>160	35.4		29	pos	24
2	3 EB	1270	10,4	9,9	3,4	26	39,7	8.2	34.9	21.8		34	pos	10
3	3 EB	1310	11	18,6	4,5	14,4	21,9	4.1	74.7	44.6		98	pos	7
4	3 EB	1380	5,8	6,6	3,4	10	16,8	7	>160	31.4		120	pos	4
5	3 EB	1386	3,3	4,9	5,8	10,6	7,7	4.5	>160	33.6		43	pos	7
6	3 EB	1408	6,9	4	15,9	8,6	26,1	3.3	>160	19		33	pos	5
7	3 EB	1410	6,1	10,9	4,8	8,6	17,4	3.6	>160	72		40	pos	16
8	3 EB	1487	1,4	2,5	3,5	10,7	4,3	4.3	>160	85.4		25	pos	23
9	3 EB	1490	5,3	8,7	5,5	5,9	9,2	4	>160	156		76	pos	24
10	3 EB	1503	38,3	72,7	34	100,6	103,3	9.3	>160	59.1		52	pos	9
11	3 EB	1587	1,9	3	3	19,2	7,5	10.1	>160	59.1		41	pos	9
12	3 EB	1619	12,1	13,2	13,4	24,6	19,1	5.9	>160	198		180	pos	12
13	3 EB	1842	2,4	3,9	2,8	6,3	6,7	16.4	>160	69.5		100	pos	6
14	3 EB	1862	6	8,4	12,1	30,6	10,2	13.8	>160	43.2		57	pos	8
15	3 EB	1873	17,6	25,9	26,8	50,5	25,2	8.1	>160	61.3		26	pos	13
16	3 EB	1877	21	20,1	22,3	59,5	31,1	5.6	>160	90.9		30	pos	13
17	3 EB	1925	6,3	7,3	9,8	15,3	17,2	4.8	>160	48.6		62	pos	16
18	3 EB	1997	32,1	25,3	24,1	43,6	51,5	8.0	>160	54.5		36	pos	13
19	3 EB	2042	8,9	12,2	8,2	17,9	12,1	4.6	>160	103		63	pos	13
20	3 EB	2050	2,2	2,5	3,2	5,9	6,0	4.6	66	249		73	pos	10
21	3 EB	2074	36,4	32,8	37,9	84,8	49,2	7.7	>160	599		160	pos	4
22	3 EB	2291	1,2	6,5	6,9	11,9	7,5	5.6	>160	47.3		75	pos	9
23	3 EB	2561	8,2	10,5	6,1	17,8	26,5	5.1	>160	35.4		61	pos	7

LIITE 2
1(3)

	Näyttenumero		4-pisteen	2-pisteen	2-pisteen	INDEX	INDEX	EBNA	EBV IgM	VCA IgG	neg. raja-arvo pos.	EBV IgG	EBV IgM	Avidity
			AVI	step 16	step 64	D 100	D 400	IU/mL	IU/mL	IU/mL		U/ml		
			<25	<25	<25	<25	<25	<5	<20	<20		<25	<0.100	<25
			25-40	25-40	25-40	25-40	25-40	5-20	20-40			25-50	0.1-0.2	25-40
>40	>40	>40	>40	>40	>20	>40	>20		>50	>0,200	>40			
24	3 EB	2602	5,4	7,8	8,7	14,5	8,7	6.0	>160	128		56	pos	13
25	4 EB	0006	11	9,3	8,4	10,4	17,4	4	>160	36.8		29	pos	13
26	4 EB	0021	4,4	5,7	6,5	29,9	11,4	4	>160	247		42	pos	6
27	4 EB	0035	4,7	4,8	4,1	6,1	7,5	4.1	>160	43.0		46	pos	6
28	4 EB	0055	5,1	4,5	4	6,4	8,0	4.7	>160	42.7		48	pos	8
29	4 EB	0134	8,5	28,8	16,9	7,4	10,7	14.8	>160	28.8		45	pos	18
30	4 EB	0135	2,9	2,5	2	4,6	7,3	6.4	139	28.4		68	pos	25
31	4 EB	0275	19,4	23,9	24,9	44,7	26,1	4.4	>160	22		28	pos	16
32	4 EB	0279	5,5	4,6	3,5	15,2	20,4	3.2	>160	25.7		38	pos	6
33	4 EB	0284	10,3	12,8	13,7	24,9	10,9	3.1	>160	51.5		30	pos	15
34	4 EB	0311	9,3	6,9	6,5	14,3	9,8	9.2	38.8	22.4		26	pos	25
1	2 EB	0327	negative					8.2	37.6	<10		<25	pos	
2	2 EB	0599	42	48,5	44,9	55,2	42,5	5.5	52.1	48.9		63	pos	
1	2 EB	1215	24,8	23,6	16,1	33,8	63,6	11.8	>160	<10		<25	pos	
2	2 EB	1334	15	11,4	12,9	16,4	17,3	12.9	>160	66.0		130	pos	
1	2EB	1303	negative					9.5	<10	<10		<25	pos	
2	2 EB	1385	2	3,2	3,5	14,9	7,2	26	>160	121		120	pos	
1	3 EB	2016	10	18,4	7,8	7,3	39,8	5.7	>160	103		<25	pos	
2	3 EB	2167	6,8	11,4	4,6	10,8	16,5	5.4	101	99.3		33	pos	22
3	3 EB	2190	11,3	8,6	4,4	9,0	39,0	7.4	122	124		61	pos	
1	3 EB	2380	6,7	5,5	2,4	13,2	22,1	7.3	>160	17.6		<25	pos	
2	3 EB	2501	5,5	20,5	1,2	10,1	24,1	8.2	46.4	21.3		28	pos	26
1	06 EB	1156	3,8	10,4	8,7	7,3	9,2					33	pos	31
2	06 EB	1052	10,7	13	15,1	22,5	14,2					210	pos	108
3	06 EB	1034	44,5	44,1	35,6	77,0	48,0					120	pos	74
4	06 EB	1000	12,2	38,5	24,5	18,4	43,3					38	pos	45
5	06 EB	910	24,7	38,3	41,7	64,3	38,9					150	pos	86
6	06 EB	765	40,1	42,1	53,7	110,0	50,5					1000	pos	72
7	06 EB	704	12,2	16,1	22,9	58,0	19,6					180	pos	190

LIITE 2
2(3)

	Näyttenumero	4-pisteen	2-pisteen	2-pisteen	INDEX	INDEX	EBNA	EBV IgM	VCA IgG	neg. raja-arvo pos.	EBV IgG	EBV IgM	Avidity
		AVI	step 16	step 64	D 100	D 400	IU/mL	IU/mL	IU/mL		U/ml		
		<25	<25	<25	<25	<25	<5	<20	<20		<25	<0.100	<25
		25-40	25-40	25-40	25-40	25-40	5-20	20-40			25-50	0.1-0.2	25-40
>40	>40	>40	>40	>40	>20	>40	>20		>50	>0,200	>40		
1	A.E: 11.5.88	51,2	47,2	51,3	95,7	65							39,1
2	A.H: 27.10.88	51,1	38,5	33,4	42,6	44,6							41,4
3	B.P: 5.8.87	46	50,9	55,5	68,1	61,2							86,4
4	C.S: 26.9.86	59,3	73,1	55,8	67,7	55,1							83,6
5	H.K: 15.4.88	84,7	76,3	79,7	107,3	94,5							69,8
6	J.R: 9.2.93	82,7	66,6	51,3	97,3	91,8							98,1
7	K.L: 14.2.91	114	111	61	88,2	122,1							99,9
8	K.P: 25.11.87	88	68,4	66,6	104,1	88,5							75,3
9	K.K: 25.11.87	50,6	69,1	61,1	86,0	56,6							79,7
10	L.P: 11.5.88	63,6	53,4	95,8	101,4	117,2							79,8
11	R.T: 15.1.90	58,5	62,2	53,2	67,5	67,6							76,7
12	K.T: 2.10.86	49	45	41,2	63,3	62,0							89,9
13	L.I: 11.5.88	41,4	39,2	32,2	60,3	42,6							58,7
14	M.H: 25.11.87	62,6	51,8	62	99,3	79,3							84,6
15	P.A: 11.5.88	86,6	82,7	177	105,5	103,9							61,3
16	S.K: 27.10.88	27,2	56,6	49,2	29,5	40,2							61,7
17	S.E: 3.2.87	73,2	74,9	57,4	72,4	76,4							87
18	S.H: 25.11.87	85,4	78	51	94,2	87,0							60,8
19	T-S: 25.11.87	38,2	32,3	28,2	96,7	53,1							78
20	K.P: 25.11.87	90,3	74,1	80,5	96,7	103,3							76,4
21	Kos.L: 11.5.88	2,5	4,2	7,4	37,1	12,8							83,6
1	06 EB 1166	78,3	58,6	62	103,8	81,2							
2	06 EB 1167	52,5	54,4	49,6	60,3	65,8							
3	06 EB 1168	42,1	66,9	39,3	47,9	54,4							
4	06 EB 1169	64,5	57,2	49,4	97,5	67,1							
5	06 EB 1170	63,3	60,8	62	106,0	68,5							
6	06 EB 1172	86,6	79,7	51,9	96,7	84,8							
7	06 EB 1173	59,4	56,5	46,8	84,3	59,9							
8	06 EB 1174	54,2	92,9	88,7	98,5	85,2							
9	06 EB 1175	57,9	76,8	68,3	74,6	100,7							
10	06 EB 1176	88,2	84,5	62,7	94,7	87,3							
11	06 EB 1177	93	87,4	66,7	79,0	83,7							
12	06 EB 1178	88,1	83,9	150	102,2	107,9							
13	06 EB 1179	57,3	52,1	40,4	72,5	55,5							
14	06 EB 1184	74,7	77,2	59,1	79,5	74,7							

YHT 101 näytettä