

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Mikrobiologia

2015

Nina Wentus

HINKUYSKÄN DIAGNOSOINTI: KAHDEN SEROLOGISEN LABORATORIOMENETELMÄN VERTAILU



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Nina Wentus

HINKUYSKÄN DIAGNOSOINTI: KAHDEN SEROLOGISEN LABORATORIOMENETELMÄN VERTAILU

Hinkuyskä on pitkäkestoinen hengitystieinfektio, joka on *Bordetella pertussis* bakteerin aiheuttama. Rokotusten avulla hinkuyskätapaukset on saatu laskuun eri puolilla maata, mutta koska rokote tai infektio ei anna pitkäaikaista immuniteettia, esiintyy uusia hinkuyskätapauksia vuosittain. Taudin diagnoosi Suomessa perustuu sekä oireisiin, että taudin vahvistukseen laboratoriomenetelmillä. Jotkut näistä menetelmistä ovat serologisia, eli ne mittaavat joko *B. Pertussis* bakteerin komponentteja tai ainoastaan sen toksiniin kohtaan reagoivien vasta-aineiden määrää.

Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorio on käyttänyt hinkuyskädiagnostiikassa rinnakkain omaa ”In-House” -menetelmää ja ECDC:n (European Centre for Disease Prevention and Control) suosittelemaa menetelmää. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla näiden kahden menetelmän tuloksia keskenään, ja koittaa saada selville, onko toinen menetelmä kenties toista tarkempi. Tavoitteena oli selvittää, miten mikrobiologian osaston tulisi menetelmiä käyttää jatkossa.

Tavoite pyrittiin saavuttamaan selvittämällä vastaavatko ”In-House” -menetelmän *Bordetella pertussis* IgA- ja IgM-vasteet ECDC:n suositteleman menetelmän pertussis toksini IgG-vasteita (PT-IgG). Tämän lisäksi selvitettiin, voiko IgA- tai IgM-vasteita käyttää infektion ja rokotteen aiheuttamien reaktioiden erottamisessa toisistaan, sekä onko sukupuolella vaikutusta tuloksiin. Vertailut suoritettiin analysoimalla biostatistikon laatimia taulukoita ja kuvioita. Tuloksista ilmeni, että IgA- ja IgM-vasteet eivät anna selkeästi samanlaisia tuloksia kuin PT-IgG. Rokotusten vaikutus ei näy selkeästi tuloksista, eikä sukupuolten välisiä eroja ole. Pelkästään näiden kahden menetelmän vertailulla ei saavuteta tavoitetta, vaan Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen täytyy tehdä menetelmistä jatkotutkimuksia.

ASIASANAT:

Hinkuyskä, *Bordetella pertussis*, Serologia

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory scientist Degree programme | Microbiology

Autum 2015 | 31 + 3

Instructors: Seija Kirkko-Jaakkola, Jukka Hytönen and Alex-Mikael Barkoff

Nina Wentus

COMPARING TWO SEROLOGICAL ASSAYS USED FOR THE DIAGNOSIS OF WHOOPING COUGH

Whooping cough is a highly contagious respiratory infection, which is caused by *Bordetella pertussis*. Vaccinations have decreased the amount of whooping cough cases in different parts of the world. Neither vaccinations nor infections give a long-term immunity against the disease, which is why new whooping cough cases are diagnosed every year. In Finland, the diagnosis is based on symptoms and laboratory confirmation. The confirmation can be done using e.g. serological assays, which are designed to measure the amount of antibodies against *B. pertussis* components, or solely against its toxin in the blood.

The microbiology and genetics laboratory at the public utility Tyks-Sapa has used their "In-House" -method concurrently with the method recommended by ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) for the diagnosis of whooping cough. The purpose of this study was to compare the results of these two methods with each other, and try to find out whether one method is potentially more accurate than the other. The objective was to find out how the microbiology department should use the methods in the future.

To achieve the objective, the results gathered by a biostatistician were analyzed to find out if IgA and IgM responses correspond with the pertussistoxin IgG (PT-IgG) response, and whether IgA or IgM responses could be used to distinguish between infection and vaccination. In addition, the results were analyzed to see whether gender had an influence on the responses. The results showed that the IgA and IgM responses are not clearly similar with the PT-IgG response, the effect of vaccinations is not evident, and gender differences do not exist. The microbiology and genetics laboratory at the public utility Tyks-Sapa needs to conduct further research, because a comparison of these two methods alone cannot achieve the objective.

KEYWORDS:

Whooping cough, *Bordetella pertussis*, Serology

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 HINKUYSKÄN SEROLOGINEN DIAGNOSTIIKKA	7
2.1 Hinkuyskä	7
2.1.1 Hinkuyskän epidemiologia	8
2.1.2 Hinkuyskän laboratoriodiagnostiikka	9
2.2 Serologia	10
2.3 Vasta-aine	11
2.4 Antigeeni	13
2.5 ELISA	13
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	15
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	16
4.1 Näytteet ja niiden analysointi	16
4.2 Tulosten kirjaaminen	17
4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	17
4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	18
5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	19
6 POHDINTA	26
LÄHTEET	29

LIITTEET

Liite 1. IgA:n/IgM:n ja PT-IgG:n välinen vaikutus.

KUVAT

Kuva 1. Hinkuyskätapaukset Suomessa vuosina 2003–2014, lasten ja nuorten aikuisten ikäryhmissä, lkm (Jaakola ym. 2015).	9
Kuva 2. Pinta ja irralliset vasta-aineet (Male ym. 2006, mukailtu).	11
Kuva 3. Elävää ja tapettua virusta sisältävän poliorokotteen vasta-ainevaste (Male ym. 2006, mukailtu).	12

KUVIOT

Kuvio 1. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu.	21
Kuvio 2. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu logaritmiasteikolla.	21
Kuvio 3. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu.	22
Kuvio 4. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu logaritmiasteikolla.	22
Kuvio 5. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu eri ikäryhmissä, regressiosuoralla.	23
Kuvio 6. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu eri ikäryhmissä, regressiosuoralla.	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Vertailussa käytetyt ikäryhmät.	19
Taulukko 2. <i>Bordetella pertussis</i> IgA- ja IgM-vasta-aine-vastemääritystulosten tulkinta, "In-House" -menetelmä.	20
Taulukko 3. <i>Bordetella pertussis</i> toksiini (PT) IgG-vasta-ainemääritystulosten tulkinta, ECDC:n suosittama menetelmä.	20

1 JOHDANTO

Hinkuuskän määrää eri maissa on vaikea verrata eri tunnistusmenetelmien vuoksi, mutta selvää on, että vuodesta 2011 hinkuuskätapausten määrä on ollut nousussa (ECDC 2012.). Hinkuuskä on *Bordetella pertussiksen* aiheuttama hengityselin tauti, joka tarttuu pisaratartuntana (Mattoo & Cherry 2005). Tautien ehkäisyn ja valvonnan eurooppalainen keskus (ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control) aloitti vuonna 2011 projektin nimeltä "Coordination of activities for laboratory surveillance of whooping cough in Member States and European Economic Area (EEA) countries". Projektilla haluttiin muun muassa luoda yhteinen ohje ihmisseerumin pertussis toksini IgG-luokan vasta-aineiden (PT-IgG) määrittämiseen. Ohjeistus julkaistiin syyskuussa 2012. (ECDC 2012.)

Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueella on oma, itse kehitetty "In-House" -menetelmä, jota on käytetty hinkuuskädiagnostiikassa. Syyskuusta 2014 lähtien osastolla on käytetty rinnakkain sekä omaa "In-House" -menetelmää että ECDC:n suosituksen mukaista menetelmää.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on verrata "In-House" -menetelmällä saatuja tuloksia ECDC:n suosittlemalla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Vertailulla halutaan saada selville, onko toinen menetelmä toista tarkempi sekä selvittää, vaikuttaako lapsena ja nuorena saadut rokotteet tuloksiin. Tavoitteena oli selvittää kumpaa menetelmää mikrobiologian osaston tulisi jatkossa käyttää, vai onko parempi jatkaa molempien menetelmien käyttöä potilaan iästä riippuen. Samalla kliinisen mikrobiologian osaston tulosten luotettavuus paranisi.

2 HINKUYSKÄN SEROLOGINEN DIAGNOSTIIKKA

2.1 Hinkuyskä

Hinkuyskä on pienen gramnegatiivisen sauvabakteerin *Bordetella pertussiksen* aiheuttama pitkäkestoinen hengitystieinfektio. Tauti on yleisempi lapsilla kuin aikuisilla. (Peltola 2010, Mertsola & He 2010.) *B. Pertussis* aiheuttaa infektion kiinnittymällä hengitysteiden epiteelisoluihin ja sen jälkeen vapauttamalla pertussis toksiinia, joka aiheuttaa paikallisia ja systemaattisia vaurioita (Hendrikk ym. 2011). Hinkuyskä saa nimensä yskän aiheuttamasta kimeä-äänisestä sisäänhengitysvaikeudesta, joka johtuu kurkunpään kouristuksista yskänpuuskan lopussa. Yskänkohtaukset voivat olla niin vakavia, että potilas tukehtuu, mikä on mahdollista varsinkin alle puolivuotiailla. (Peltola 2010, Mertsola & He 2010.) Syytä tunnusomaiseen yskään ei tarkkaan tiedetä, mutta todennäköisin syy on bakteereiden aiheuttama limakalvovaurio ja sitkeä lima (Mertsola & He 2010).

Klassinen hinkuyskä alkaa noin seitsemän vuorokauden itämisaian jälkeen. Itämisaika voi vaihdella kuudesta vuorokaudesta 20 vuorokauteen. Tauti alkaa lapsilla lievällä yskällä, nuhalla ja lievällä lämpöilyllä. Noin 1–2 viikon kuluessa muuttuu yskä voimakkaammaksi ja puuskaiseksi. Kouluikäisillä ja sitä vanhemmillä tauti on vaikeampi diagnosoida, koska heillä ei yleensä esiinny klassista hinkua. Kyseiselle ryhmälle tyypillistä ovat kuitenkin puuskaiset yskänkohtaukset, jotka voivat vaivata kolmesta kuuteen kuukauteen. (Mertsola & He 2010.)

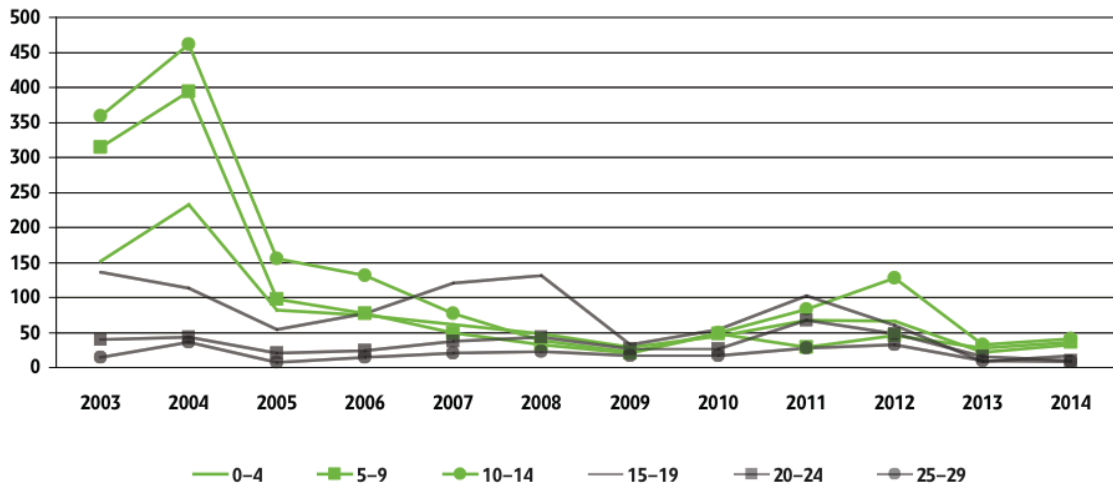
B. pertussiksella on monia ominaisuuksia, jotka vaikuttavat sen taudinaiheuttamiskykyyn. Bakteerin virulenssitekijöitä ovat muun muassa filamenttihemagglutiiniini, pertussis toksiiini, pertaktiini ja fimbriat. (Barkoff ym. 2012, Mertsola & He 2010.) Näiden avulla bakteeri tarttuu esimerkiksi värekarvallisiin lieriöepiteeleihin paremmin. Säästääkseen energiaa voi *B. pertussis* lopettaa tärkeimpien virulenssitekijöiden tuotannon. (Mertsola & He 2010.)

2.1.1 Hinkuuskän epidemiologia

Vuonna 2014 ilmoitettiin Suomessa 205 hinkuuskätapausta, mikä on samaa tasoa kuin vuonna 2013. Näistä yksi johti kuolemaan. Kyseinen potilas oli alle kolmen kuukauden ikäinen rokottamaton lapsi. Suomen hinkuuskätapausten määrät vuoden 2003 ja 2014 välillä, näkyvät kuvassa 1. Vuoden 2014 hinkuuskätapausten aiheuttajina oli 12 eri *B. pertussis* kantaa, jotka kaikki tuottivat pertaktiinia. Pertaktiini on yksi komponentti Suomessa käytetyssä hinkuuskärokotteessa. Vuoden 2014 hinkuuskätapauksista yksi oli *B. parapertussis* aiheuttama, joka on *B. pertussis* lähisukulainen. (Jaakola ym. 2015.)

Suomessa ei toistaiseksi ole esiintynyt laajoja hinkuuskäepidemoita, kuten USA:ssa ja Englannissa. Vuonna 2012 todettiin USA:ssa yli 40 000 tapausta ja Englannissa melkein 10 000 tapausta. Molemmissa maissa saatiin pienten lasten hinkuuskätapaukset merkittävästi alenemaan, kun aloitettiin raskaana olevien naisten hinkuuskärokotuskampanja. Suomessa hinkuuskätilanne on myös parempi kuin Ruotsissa. Vuoden 2014 aikana Ruotsin hinkuuskätapausten määrä on melkein kolminkertaistunut. (Jaakola ym. 2015.)

Hinkuuskärokote kuuluu Suomen kansalliseen rokotusohjelmaan. Hinkuuskärokote on osa solutonta DTaP-rokotetta, johon kuuluu myös kurkkumätä ja jäykkäkouristus. Tällä hetkellä annokset annetaan kolmen kuukauden, viiden kuukauden, 12 kuukauden, neljän vuoden ja 14–15 vuoden iässä. (Rokote.fi 2015.) Hinkuuskärokote lisättiin myös puolustusvoimien rokotusohjelmaan kesällä 2012 (Jaakola ym. 2015). Rokote tai infektio ei johda pitkään immunitettiin (Le ym. 2004), minkä vuoksi neljän ja 14–15 vuoden iässä saatavat tehosteannokset ovat tarpeellisia. Vanhemmat lapset, nuoret aikuiset ja aikuiset ovat suurin tartunnan lähde pienille lapsille, joille infektio on hengenvaarallinen (Barkoff ym. 2012).



Kuva 1. Hinkuyskätapaukset Suomessa vuosina 2003–2014, lasten ja nuorten aikuisten ikäryhmissä, lkm (Jaakola ym. 2015).

Niin kuin USA:ssa ja Englannissa on myös Suomessa ollut rokotuksista apua hinkuyskätapausten vähenemiseen, mikä on nähtävissä kuvasta 1. Vuonna 2003 lisättiin Suomen kansalliseen rokotusohjelmaan kuusivuotiaille tehosteannos, jonka vaikutus näkyy tapausmäärien merkittävänä laskuna 5–9- ja 10–14-vuotiaiden ikäryhmissä vuoteen 2005 mennessä. Vuonna 2009 tuli suositus, että nuorisoiikäiset rokotettaisiin vasta 14–15 vuoden iässä, mikä johti siirtymävaiheeseen vuosina 2009–2011, jolloin rokotuksia annettiin erittäin vähän. Tämä huomattiin pieneenä nousuna hinkuyskätapauksissa 10–14- ja 15–19-vuotiaiden keskuudessa vuosina 2011 ja 2012. (Jaakola ym. 2015.)

2.1.2 Hinkuyskän laboratoriodiagnostiikka

Hinkuyskän diagnoosi perustuu oireisiin, jotka monessa maassa vahvistetaan laboratoriomenetelmiä käyttäen (Guiso ym. 2011). Pienet lapset tuodaan yleensä hoitoon jo taudin alkuvaiheessa. Tämä onkin syy, miksi Suomessa yli 80 % pienten lasten hinkuyskistä diagnosoidaan viljelyn ja PCR-menetelmän avulla. Jos tullaan hoitoon silloin kun tauti on kestänyt yli kolme viikkoa, ei diagnostiikkaan kannata käyttää viljelyä tai PCR-menetelmää vaan serologiaa. Suomalai-

silla koululaisilla ja aikuisilla hinkuuskän diagnosointi tapahtuukin serologian avulla 80 %:ssa tapauksista. (Mertsola & He 2010.)

van der Zee, Schellekens ja Mooi (2015) tarkasteli käytössä olevia menetelmiä hinkuuskän diagnosoinnissa. He tarkastelivat DFA:n (direct fluorescent-antibody assay), viljelyn, erilaisten PCR:en ja erilaisten serologisten menetelmien rajoituksia ja vahvuuksia. Heidän mukaan optimaalisin menetelmä, jota pitäisi käyttää diagnoosin teossa vaihtelee sairauden asteesta, potilaan iästä ja potilaan rokotteen tilasta riippuen.

André ym. (2008) vertasivat hinkuuskän diagnoosissa yleisesti käytössä olevien menetelmien herkkyyttä ja spesifisyyttä. Nämä olivat IS481 ja ptxA-Pr real-time PCR -menetelmät sekä yksittäisen ja rinnakkaisten näytteiden serologinen menetelmä. Näistä IS481 PCR ja yksittäisen seerumin serologia näyttäytyivät tehokkaimmiksi diagnostisiksi menetelmiksi hinkuuskän määrittämiseen seitsemän vuotiailla ja sitä nuoremmilla lapsilla.

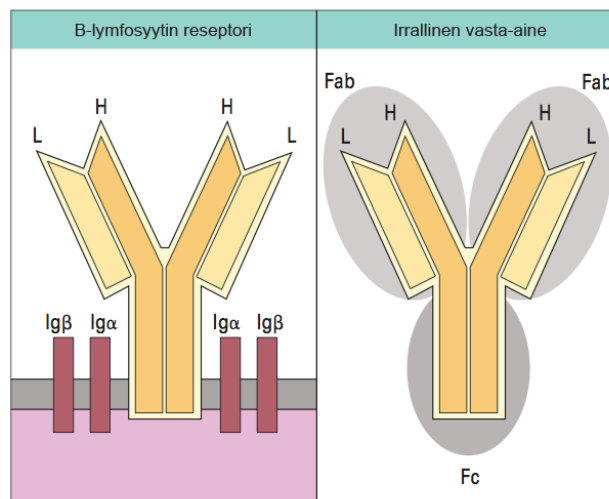
2.2 Serologia

Serologiaa voi myös kutsua seerumiopiksi. Serologisiin menetelmiin kuuluu muun muassa menetelmät, jotka tutkivat seerumin vasta-aineita infektion diagnosointia varten ja menetelmät, jotka tyypittävät mikrobeja vasta-aineiden avulla. (Terveyskirjasto 2015.) Useimmat serologiset menetelmät ovat validoitu analysoidaan seerumia, mutta jotkut ovat myös validoitu analysoidaan heparinisoitua plasmaa tai etyleenidiamiinitetrahappo (EDTA)-plasmaa. Kapillaariverinäytettä voi käyttää, jos tarpeeksi suurta verinäytettä ei muuten saada. (Guiso ym. 2011.)

Kaikki diagnostiikassa käytetyt serologiset menetelmät, jotka havaitsevat vasta-aineita perustuvat siihen, että potilaan seerumia lisätään tunnetun antigeenin päälle. Jos antigenille spesifisiä vasta-aineita löytyy seerumista, syntyy antigeeni-vasta-aine-kompleksi, jonka voi havaita indikaattorilla. Yleisimmin käytetty serologinen menetelmä diagnostisissa laboratorioissa on entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys. (Kudesia & Wreghitt 2009.)

2.3 Vasta-aine

Vasta-aine tai immunoglobuliini (Ig) on B-lymfosyytien tuottama Y-muotoinen proteiini elimistölle vierasta organismia tai molekyyliä kohtaan. Jokainen vasta-aine tunnistaa tietyn antigeenin, johon se sitoutuu ja auttaa täten kehoa hävittämään elimistölle vieraan patogeenin. Nisäkkäillä on viisi eri luokasta vasta-ainetta, IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. (Alberts ym. 2008, Male, Brostoff, Roth, & Roitt 2006.) Vasta-aineet voivat esiintyä joko reseptoreina B-lymfosyytien kalvolla tai plasmasolun erittäminä, irrallisina molekyyleinä (kuva 2). Plasmasolu on erilaistunut B-lymfosyytti. (Male ym. 2006.) B-lymfosyytti tuottaa aina ensin IgM-luokan vasta-aineita ja siirtyä sitten tuottamaan muita luokkia, kun antigeeni stimuloi sitä (Alberts ym. 2008).



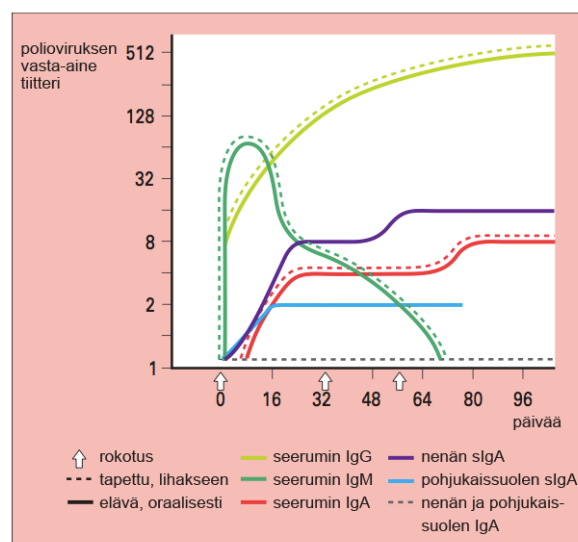
Kuva 2. Pinta ja irralliset vasta-aineet (Male ym. 2006, mukailtu).

Kuvassa 2 nähdään B-lymfosyytin pintareseptori ja plasmasolun erittämä irrallinen vasta-aine. B-lymfosyytin antigeenireseptori (kuvassa vasemmalla) koostuu kahdesta identtisestä kevytketjusta (L) ja raskasketjusta (H). Igα:n ja Igβ:n luullaan yhdistävän vasta-aineen solunsisäisiin signaaleihin. Irralliset vasta-aineet (kuvassa oikealla) ovat rakenteellisesti identtisiä B-lymfosyytin reseptorin kanssa, paitsi että niiltä puuttuu transmembraaninen osa, eli osa, joka on kiinni kal-

vossa. Sen sijaan irrallisilta vasta-aineilta löytyy Fc-osa, jonka avulla vasta-aine sitoutuu reseptoreihin. Fab-osat sitoutuvat antigeeneihin. (Male ym. 2006)

Kaikki paitsi IgD-vasta-ainetyypit ovat bifunktionaalisia eli ne tunnistavat ja sitoutuvat ensin antigeeniin ja edistävät sitten sen tappamista ja/tai poistamista elimistöstä. Vasta-aineet koostuvat kahdesta osasta (kuva 2). Yksi osa määrittää vasta-aineen antigeenispesifisyyden (Fab-osa) ja toinen osa, mitkä efektori-toiminnot aktivoituvat (Fc/transmembraaninen osa). Näihin toimintoihin kuuluu vasta-aineen sitoutuminen reseptoriin esimerkiksi fagosyytin pinnalla, jotta se aktivoituu. Efektoritoimintoihin voi myös kuulua adapterina toimiminen antigeenin ja immuunijärjestelmän toisten osien välillä. (Male ym. 2006.)

Infektion kannalta tärkeimmät vasta-aineet ovat IgM-, IgG- ja IgA-luokan vasta-aineet, joita on havaittavissa myös rokotteiden yhteydessä (kuva 3). IgM on ensimmäinen vasta-aine, jota primaarinen immuunivaste muodostaa, kun taas IgG hallitsee sekundaarista immuunivastetta. IgA-vasta-aineet ovat myös ominaisia sekundaarisessa immuunivasteessa. Vastasyntyneillä ei ole kunnollista immuunivastetta. Heidän vasta-aineensa koostuvat IgG-vasta-aineista, jotka ovat siirtyneet äidiltä istukan kautta. (Male ym. 2006.)



Kuva 3. Elävää ja tapettua virusta sisältävän poliorokotteen vasta-ainevaste (Male ym. 2006, mukailtu).

Kuvasta 3 näkyy, miten IgG-, IgM- ja IgA-vasta-ainevasteet nousevat rokotuksen yhteydessä, esimerkkinä poliorokote. Kuvassa suun kautta annetun heikennetyn elävän poliorokotteen vasta-ainevasteet esiintyvät kiinteinä viivoina ja lihaksensisäisesti annostellun, tapettua virusta sisältävän poliorokotteen vasta-ainevasteet katkoviivoina. Elävää virusta sisältävä rokote indusoi eritetyt IgA:n (sIgA) sekä seerumivasta-aineiden tuottoa. Tapettua virusta sisältävä rokote puolestaan ei lisää sIgA-tasoa nenässä tai pohjukaissuolessa. Koska sIgA on limakalvojen immunestijärjestelmän vasta-aine, luo elävää virusta sisältävä rokote suojan viruksen sisäänpääsyalueelle, ruoansulatuskanavan limakalvoille. (Male ym. 2006.)

2.4 Antigeeni

Mitä tahansa ainetta, joka voi aiheuttaa vasteen kehon immuunipuolustuksessa kutsutaan antigeeniksi. Antigeenin aiheuttama vaste voi olla joko B-lymfosyyttien vasta-ainevaste tai T-lymfosyytivälitteinen vaste. T-lymfosyytti voi tunnistaa jopa mikrobin, joka piileksii isäntäsolun sisällä ja tappaa sitten infektoituneen solun tai auttaa infektoitunutta solua eliminoimaan mikrobin. Toisinaan T-lymfosyytti voi tuottaa signaalimolekyylejä, jotka aktivoivat makrofageja fagozytoimaan ("syömään") mikrobin tai aktivoivat B-lymfosyyttejä tuottamaan vastaaineita. (Alberts ym. 2008, Male ym. 2006.)

Immuunijärjestelmä on kehittynyt tunnistamaan antigeenejä, tuhoamaan niitä ja eliminoimaan niiden tuottajan, patogeenin. Kun antigeenejä ei enää ole, sammuu immuunijärjestelmän vaste. Patogeenien pinnoilla on useimmiten useampi antigeeni, jotka puolestaan voivat koostua useammasta epitoopista (antigeenideterminantista). Immuunijärjestelmän vasta-aineiden spesifisyys kohdistuu juurikin epitooppeja kohtaan eikä koko antigeenia kohtaan. Eli vasta-aineiden Fab-osa (kuva 2) sitoutuu antigeenin epitooppiin. (Male ym. 2006.)

2.5 ELISA

ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (englanniksi enzyme-linked immunosorbent assay) on biokemiallinen menetelmä, jota usein käy-

tään immunologisissa määryksissä. Vasta-aineiden spesifisyys antigeenejä kohtaan tekee niistä hyviä työkaluja immunologiassa, mitä muun muassa ELISA:ssa hyödynnetään. (Alberts ym. 2008, Halonen 2004.) Menetelmän suorittamiselle löytyy useita variaatioita (Kudesia & Wreghitt 2009), alla on selitetty yksi tapa.

ELISA perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan. Kiinteään faasin, esimerkiksi kuoppalevyn kuopan pintaan kiinnitetään yhtä reaktioon osallistuvista komponenteista. Kun mitataan vasta-ainetta, tämä komponentti on antigeeni, johon haluttu vasta-aine sitoutuu. Kuoppalevyn kuopan alueet, johon antigeenia ei ole sitoutunut, blokataan. Kuoppalevyn annostellaan näytettä, ja mitattava vasta-aine sitoutuu kiinteään faasin antigeeniin. Kuoppalevy pestään, jotta näytteestä jää jäljelle vain ne vasta-aineet, joita halutaan mitata. Seuraavaksi lisätään kuoppalevyn entsyymileimattua kaksoisvasta-ainetta, joka on spesifinen mitattavalle vasta-aineelle. Entsyymileimattu kaksoisvasta-aine ja kiinteään faasiin sitoutunut vasta-aine muodostaa kaksoisvasta-ainekompleksin. Ylimääräinen sitoutumaton leimattu vasta-aine pestään pois ja kuoppaan lisätään substraatti, joka entsyymien katalysoimana muuttuu mitattavaksi reaktiotuotteeksi. Tämän reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevan mitattavan vasta-aineen kanssa. (Halonen 2004.)

Riffelmann, Thiel, Schmetz & Wirsing von Koenig (2010) vertasivat *Bordetella pertussis* antigeenien määrittämiseen tarkoitettuja, kaupallisesti saatavilla olevia ELISA-kittejä. Testeistä yksitoista mittasivat IgG-vasta-aineita ja yhdeksän mittasivat IgA-vasta-aineita. Referenssimenetelmänä toimi yksi ”In-House” ELISA-menetelmä. Tutkimustuloksista ilmeni, että ELISA:n pitäisi käyttää puhdistettua pertussis toksiinia, ja että menetelmä tulisi standardisoida kansainvälisellä referenssinäytteellä.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen ”In-House” -menetelmää sekä ECDC:n suosittelemaa menetelmää. Vertailulla haluttiin saada selville, onko toinen menetelmä toista tarkempi sekä selvittää, sisältyykö menetelmien käyttöön rokotteen aiheuttamia rajoitteita. Tavoitteena oli selvittää, kumpaa menetelmää mikrobiologian osaston tulisi jatkossa käyttää ja samalla parantaa kliinisen mikrobiologian osaston tulosten luotettavuutta.

Tavoite pyrittiin saavuttamaan selvittämällä seuraavat tutkimustehtävät:

1. Vastaavatko ”In-House” -menetelmän IgA- ja IgM-vasta-ainevasteet ECDC:n suositteleman menetelmän PT-IgG-vasteita?
2. Voiko IgA- tai IgM-vasteita käyttää infektion ja rokotteen erottamisessa?
3. Miten sukupuoli vaikuttaa tuloksiin?

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Tämän opinnäytetyön tekemisen vuoksi tehtiin toimeksiantosopimus Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen kanssa, josta opinnäytetyön aihe saatiin. Näytteiden analysointi tapahtui syksyllä 2014 ja keväällä 2015 Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorion toimesta. Keväällä ja kesällä 2015 kerättiin kirjallista materiaalia opinnäytetyötä varten ja samaan aikaan analysoitiin tulokset biostatistikko Tommi Kaukon avulla. Lopullinen opinnäytetyö julkaistiin joulukuussa 2015.

4.1 Näytteet ja niiden analysointi

Vertailussa käytetyt näytteet (n=1024) olivat potilailta, joiden epäiltiin sairastavan hinkuyskää. Potilaat koostuivat sekä naisista että miehistä, joiden ikä vaihteli 1kk ja 97 vuoden välillä. Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorio analysoi kaikki näytteet ”In-House” -menetelmällään sekä ECDC:n suosittelmalla menetelmällä. Opinnäytetyöntekijä kävi seuraamassa molemmat menetelmät käytännössä toukokuussa 2015.

Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen ”In-House” -menetelmän tarkoitus on mitata IgM- ja igA-luokan pertussisvasta-ainetasoja, käyttämällä *B. pertussis* kokobakteerin sonikaattia antigeenina. Sonikaatti valmistetaan itse sonikaattorilla (ultraäänihajottajalla), joka hajottaa bakteerit korkean taajuuden ääniaalloilla (Thermo Fisher scientific 2015). ECDC:n suosittelmassa menetelmässä käytetään antigeenina pertussis toksiniä. Sen avulla mitataan näytteen pertussis toksini IgG-vasta-aineita (PT-IgG, Siemensin diagnostinen kitti).

4.2 Tulosten kirjaaminen

Tulokset kirjattiin Microsoft Excel -ohjelmalla huolellisesti taulukkoon, josta ilmeni IgA-, IgM- ja PT-IgG-vasta-ainevasteiden lisäksi näytenumero, potilaan syntymäpäivä, näytteenottoaika, potilaan ikä näytteenoton aikana ja sukupuoli. Suuren osan tiedoista kirjasi Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorion työntekijä, ja opinnäytetyöntekijä täydensi tiedot taulukkoon. Taulukko lähetettiin biostatistikko Tommi Kaukolle, joka laati kaaviot tuloksista opinnäytetyötä varten.

4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa eli määrällisessä tutkimuksessa keskeisiä asioita ovat aiempien tutkimusten johtopäätökset ja teoriat, käsitteiden määrittäminen ja hypoteesien esittäminen. Olennaista on, että kerättävä aineisto soveltuu numeeriseen mittaamiseen ja että aineistoa käsitellään kokonaisuutena eikä yksittäisinä tapauksina. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa täytyy aineisto myös pystyä saattamaan tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Päätelmät tehdään tilastolliseen analysointiin perustuen. (Hirsijärvi, Remes & Sajavaara 2014.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa täytyy tuntea, mitkä tekijät vaikuttavat tutkittavaan ilmiöön. Tämä on tärkeää, koska kvantitatiivisessa tutkimuksessa mitataan eri muuttujia ja tarkastellaan niiden välistä vuorovaikutusta. (Kananen 2011, Heikkilä 2014.) Tarkastelun avulla pyritään yleistämään tuloksia laajempaan joukkoon. Tutkimusaineiston voi joko hankkia muiden tekemistä tietokannoista tai tilastoista, tai sen voi kerätä itse. Aineiston tulee olla riittävän suuri ja edustava. (Heikkilä 2014.)

Tämä opinnäytetyö suoritettiin kvantitatiivista tutkimusta käyttäen. Opinnäytetyön tutkimusaineistona oli laaja potilasnäytemäärä, joka sopi määrälliseen eli numeeriseen mittaamiseen. Numeerinen tutkimusaineisto voitiin analysoida käyttämällä tilastollisia menetelmiä ja havainnollistaa hyödyntämällä kuvioita ja taulukoita.

4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Hyviin tieteellisiin käytäntöihin kuuluu rehellisyys, tarkkuus ja huolellisuus tutkimuksen kaikissa vaiheissa. Muiden tutkijoiden työt täytyy ottaa huomioon niin, että heidän julkaisuihinsa viitataan asianmukaisella tavalla. Samalla heidän tekemäänsä työtä kunnioitetaan ja vältytään plagioinnilta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012, Clarkeburn & Mustajoki 2007.) Mahdollisia potilastuloksia täytyy käsitellä potilaan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen (Suomen Bioanalyttikko ry 2006). Tulokset täytyy kirjata totuudenmukaisesti ja vääristelemättä, sillä tutkija ei saa toimia puolueellisesti, vääristellä tietoa eikä osallistua petokseen (Clarkeburn & Mustajoki 2007, Kuula 2011).

Tätä opinnäytetyötä varten saatiin toimeksianto Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueelta. Opinnäytetyötä tehdessä noudatettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä prosessin kaikissa vaiheissa, ja tulokset kirjattiin totuudenmukaisesti sekä niitä tarkasteltiin puolueettomasti. Plagioinnilta vältyttiin viittaamalla muiden tutkijoiden julkaisuihin asianmukaisella tavalla. Tässä opinnäytetyössä käytettyjä potilastuloksia käsiteltiin potilaan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen siten, että potilaan henkilötietoja ei merkitty näkyviin.

Opinnäytetyöntekijä oli vain hetkellisesti tekemisissä potilastietojen kanssa, kun hän henkilötunnuksesta kirjasi syntymäpäivän taulukkoon. Potilaiden nimiä opinnäytetyöntekijä ei missään vaiheessa nähnyt. Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorion työntekijä oli tulostanut potilastietokannasta vain tarvittavat tiedot taulukkoa varten, eikä tuloste poistunut laboratorion tiloista missään vaiheessa. Muuten opinnäytetyöntekijä ei ollut potilastietojen tai potilastietokantojen kanssa tekemisissä opinnäytetyöprosessin aikana. Opinnäytetyöntekijän salassapitovelvollisuutta painotettiin siitä huolimatta, että hän oli vain vähän tekemisissä potilastietojen kanssa.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Vertailussa käytetyt näytteet (n=1024) olivat sekä naisilta (n=615) että miehiltä (n=409), joiden epäiltiin sairastavan hinkuyskää. Potilaiden ikähaarukka oli 1 kuukaudesta 97 ikävuoteen asti. Näytteistä määritettiin IgA-, IgM- ja PT-IgG-vasta-aineasteet. Vertailun helpottamiseksi jaettiin potilaat yhdeksään ikäryhmään, jotka näkyvät taulukosta 1.

Taulukko 1. Vertailussa käytetyt ikäryhmät.

Ikäryhmä	Perustelu	Määrä
0 – <2 v	saanut primäärirokotteen	60
2 – <4 v	ei ollut vastikään saanut rokotetta	89
4 – <6 v	saanut ensimmäinen tehosteannoksen	86
6 – <14 v	ei ollut vastikään saanut rokotetta	228
14 – <16 v	saanut toisen tehosteannoksen	48
16 – <20 v	ei ollut vastikään saanut rokotetta / saanut armeijan tehosteannoksen	32
20 – <40 v	lisääntyvä sukupolvi	131
40 – <60 v	keski-ikäiset	200
60+ v	vanhukset	150

Menetelmästä riippuen tulkitaan tuloksia vähän eri tavalla. Tulosten tulkinnat protokollien mukaan näkyvät taulukoista 2 ja 3.

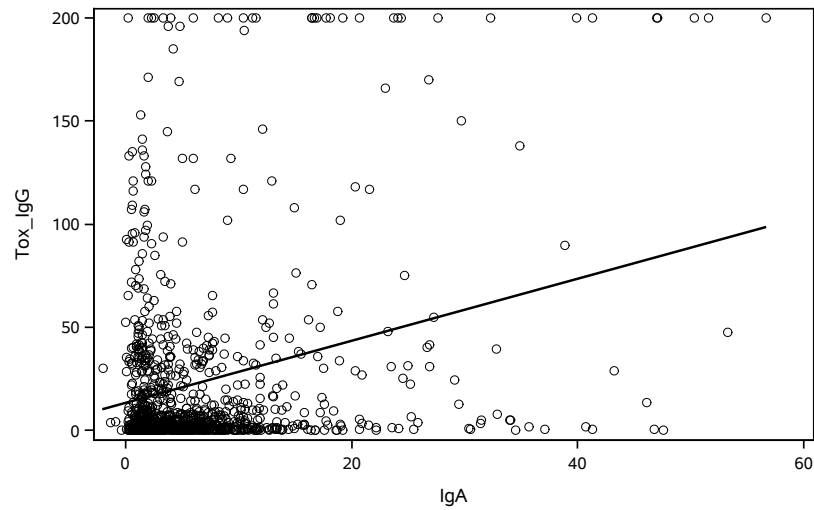
Taulukko 2. *Bordetella pertussis* IgA- ja IgM-vasta-aine-vastemääritystulosten tulkinta, "In-House" -menetelmä.

IgA / IgM	Tulkinta
< 30 EIU	Ei infektiota
30–40 EIU	+ (raja-arvo, pyydetään pariseeruminäyte)
40–60 EIU	++
> 60 EIU	+++

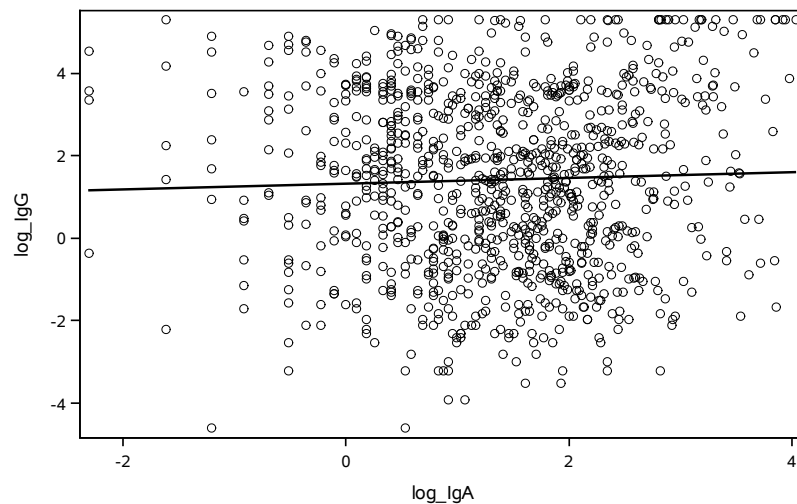
Taulukko 3. *Bordetella pertussis* toksiini (PT) IgG-vasta-ainemääritystulosten tulkinta, ECDC:n suosittama menetelmä.

IgG anti-PT	Tulkinta
< 40 IU/ml	Ei viittaa tuoreeseen infektiin
≥ 40 < 100 IU/ml	Suosittelaa uusintanäytettä 7–10 päivän kuluttua
≥ 100 IU/ml	Viittaa tuoreeseen infektiin

IgM-tuloksia, jotka olivat yli 40 EIU, oli 77. Yli 40 EIU:n IgA-tuloksia oli 13. PT-IgG-tuloksia, jotka olivat ≥ 100 IU/ml, oli 39. Eri vasta-ainevasteiden tuloksia verrattiin kokonaisuudessaan keskenään (kuvio 1, 2, 3 ja 4), eri ikäryhmissä (kuvio 5 ja 6) sekä sukupuolten välillä. Jotta saatiin selvempiä kuvioita, muutettiin joidenkin kuvioiden kohdalla asteikkoa tekemällä tuloksille logaritminuunnos.



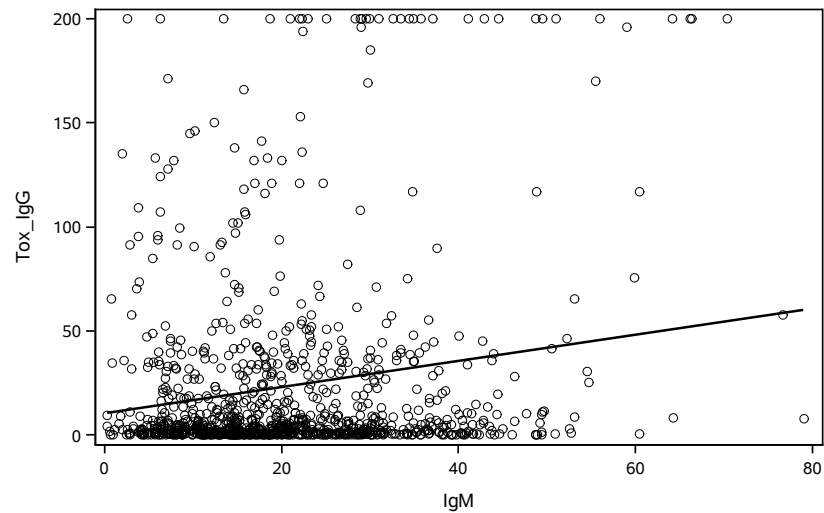
Kuvio 1. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu.



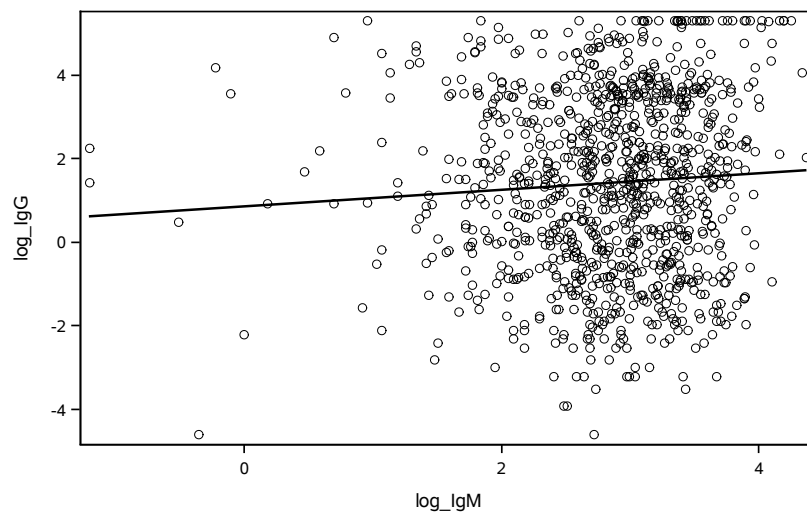
Kuvio 2. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu logaritmiasteikolla.

IgA:n ja PT-IgG:n välisen yhteyden estimaatti logaritmiasteikolla oli vain 0.071, eli yhden yksikön muutos logaritmiasteikolla IgA:ssa kasvatti PT-IgG:tä logaritmiasteikolla vain 0.071 yksikköä ($p = 0.2611$). Kun otettiin kaikki tulokset huomioon yhdessä, ei IgA:n ja PT-IgG:n välillä ollut merkitsevää yhteyttä. Toisin sanoen IgA ja IgG eivät antaneet positiivista tulosta samoille potilaille.

P-arvo ($p = \text{probability, todennäköisyys}$) kertoo, millä todennäköisyydellä sama tulos saadaan aikaan sattumalta. Mitä pienempi p -arvo on sitä luotettavampi tulos on. 0.05 on arvo, jota pidetään tilastollisesti luotettavan tuloksen rajana, eli jos p -arvo on alle 0.05, on se merkitsevä. (Salonen 2012.)

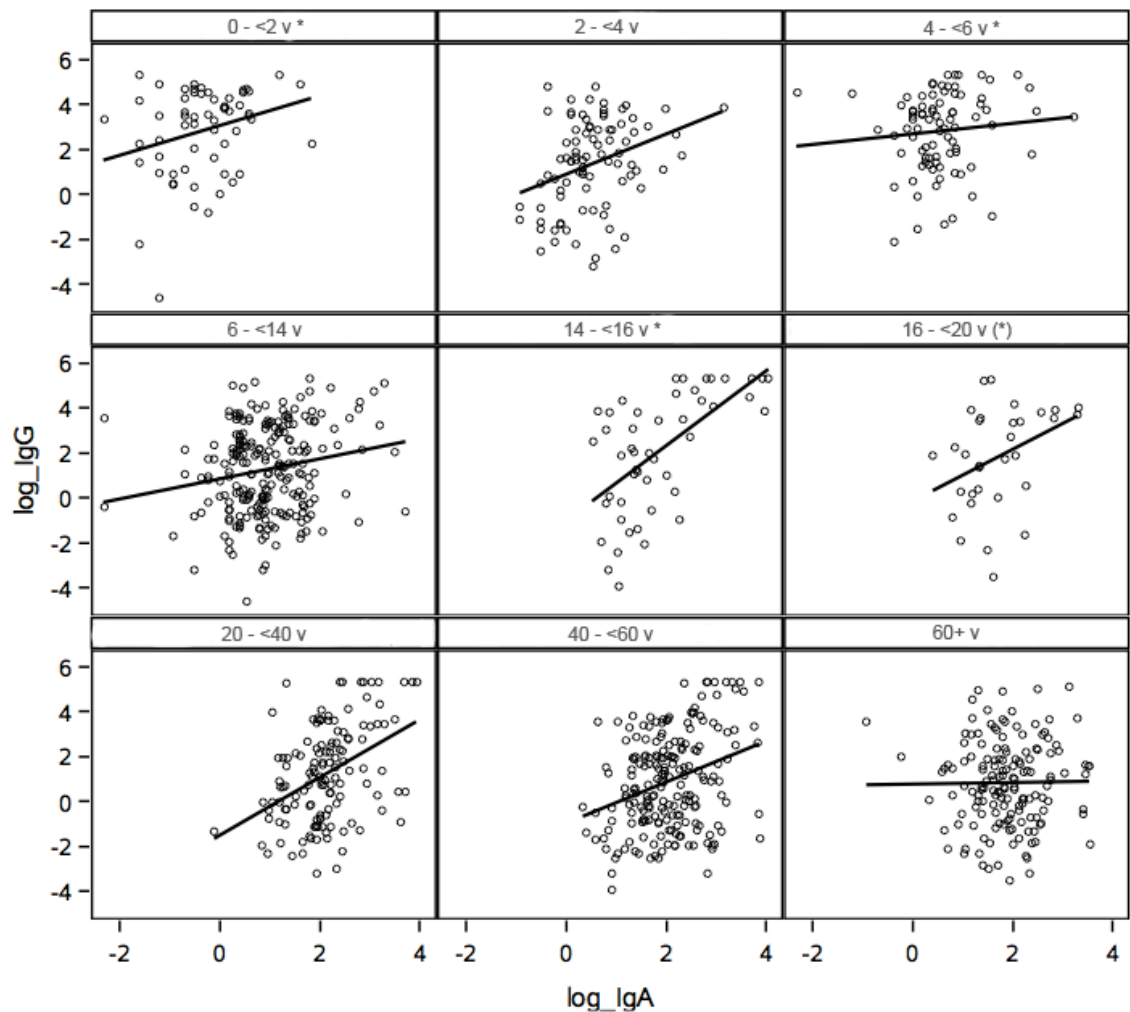


Kuvio 3. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu.



Kuvio 4. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu logaritmiasteikolla.

Vastaava estimaatti IgM:n ja PT-IgG:n välillä oli 0.1950 ($p = 0.0406$), joka oli hieman merkitsevä. Yksi kysymyksistä, johon haluttiin saada vastaus analyysin avulla oli, vastaavatko IgA- ja IgM-vasta-ainevasteet PT-IgG-vasteita. Tähän saatiin vastaus vertailemalla IgA:n ja IgM:n tuloksia PT-IgG:n tuloksiin. IgA- ja IgM-tulokset eivät näyttäneet antavan selkeästi samanlaisia tuloksia kuin PT-IgG.



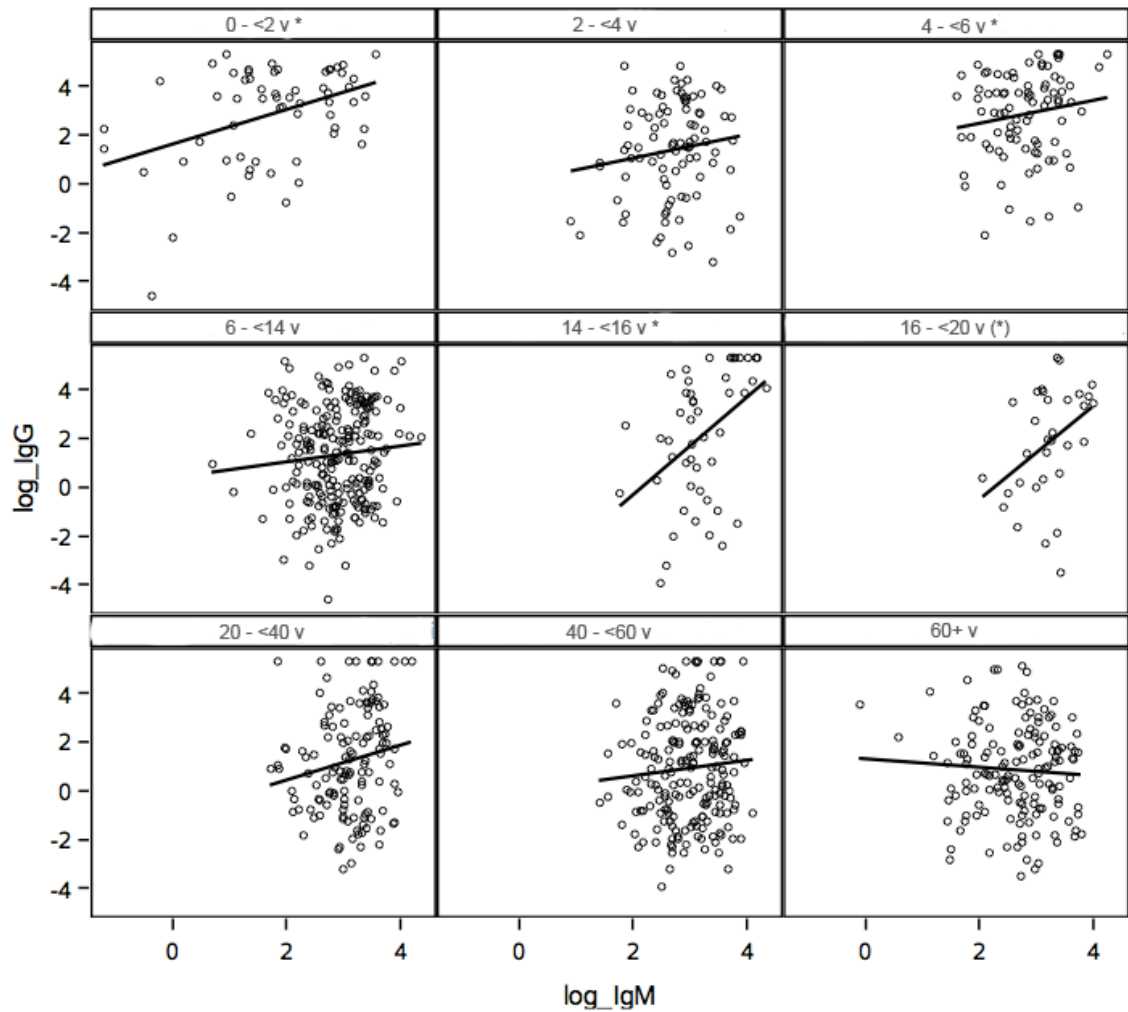
Kuvio 5. PT-IgG- ja IgA-vasta-ainevasteiden vertailu eri ikäryhmissä, regressiosuoralla.

Vertailemalla vasta-aineita keskenään eri ikäryhmissä haluttiin nähdä, vaikuttaako rokotteista johtuva ero tuloksiin, ja voiko IgA- tai IgM-vasteita käyttää infektion ja rokotteen erottamisessa. Kuviosta 5 nähdään IgA:n ja PT-IgG:n yhteys eri ikäryhmissä. Ikäryhmät, joiden otsikoissa on tähti (*) ovat vastikään mahdollisesti saaneet rokotteen. Mitään selvää vaikutusta rokotteella ei näyttäisi olevan, kun katsoo kuviota 5.

Kun taas katsoo sukupuolivakioituja tuloksia liitteestä 1, näyttäisi IgA:lla ja PT-IgG:llä olevan tilastollisesti merkitsevä yhteys. IgA:n ja PT-IgG:n tuloksien yhteys on merkitsevää eri ikäryhmien välillä, 4–6 v ja 14–16 v, 6–14 v ja 14–16 v, sekä 14–16 v ja 16–20 v ikäryhmien välillä. Nämä näkyvät myös kuviosta 5. Esimerkiksi 4–6 v ikäryhmän regressiokulma on melkein vaakasuora, kun taas 14–16 v ikäryhmän regressiosuora on melkein 45 asteen kulmassa. Vastaava kulmakertoimen ero regressiosuorassa näkyy muiden ikäryhmäparien välillä. Erojen p-arvot näkyvät liitteestä 1 (Adj P sarakkeessa).

Liitteestä 1 näkyy myös IgA:n ja PT-IgG:n tulosten tilastollinen merkitys ikäryhmissä 2–4 v, 14–16 v, 20–40 v ja 40–60 v (Exponentiated Estimate sarakkeessa). Näissä ikäryhmissä muuttuu PT-IgG 2.51, 5.73, 3.65 ja 2.65 yksikköä logaritmiasteikolla aina kun IgA muuttuu yhden yksikön. Tämä näyttäisi osoittavan, että PT-IgG on herkempi muuttuja. Tosin täytyy huomioida että vasteet mitataan eri asteikoilla.

Kuviosta 6 nähdään IgM:n ja PT-IgG:n yhteys eri ikäryhmissä. Rokotteesta huolimatta regressio eri ryhmillä on voimakas tai lievä, minkä takia kuviosta on vaikea tehdä johtopäätöksiä. Sukupuolivakioiduista tuloksista (liite 1) ilmenee, että IgM:n ja PT-IgG:n tulosten yhteys on merkitsevä ikäryhmien 6–14 v ja 14–16 v sekä 14–16 v ja 16–20 v välillä. IgM:n ja PT-IgG:n tuloksilla on tilastollinen merkitys vain ikäryhmissä 0–2 v (2.06 yksikköä) ja 14–16 v (9.41 yksikköä), jotka näkyvät myös liitteestä 1.



Kuvio 6. PT-IgG- ja IgM-vasta-ainevasteiden vertailu eri ikäryhmissä, regressiosuoralla.

Viimeinen kysymys, johon haluttiin saada selvyys oli, miten sukupuoli vaikuttaa tuloksiin. Kun IgA- ja IgM-vasta-ainevasteita vertailtiin PT-IgG-vasta-ainevasteihin, oli p-arvo IgA:n kohdalla 0.3060 ja IgM:n kohdalla 0.7775 (liite 1), jotka eivät ole merkitseviä. Sukupuolten välisiä eroja ei siis näyttäisi olevan.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön aiheena oli ”Hinkuuskän diagnostiikka: kahden serologisen menetelmän vertailu”. Tarkoituksena oli vertailla kahta serologista laboratoriomenetelmää, joita Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualue oli käyttänyt rinnakkain. Vertailussa ilmeni, että IgA- ja IgM-vasteet eivät anna selkeästi samanlaisia tuloksia kuin PT-IgG. Rokotukset eivät myöskään selkeästi näy tuloksissa, eikä sukupuolten välisiä eroja ole.

Opinnäytetyön ainoa virhelähde, joka myös vaikuttaa tulosten luotettavuuteen, on inhimillinen. Kun tiedot kirjattiin taulukkoon, on voinut sattua inhimillinen kirjoitusvirhe. Käsin kirjattu taulukko on myös opinnäytetyön heikoin kohta. Luotettavuutta puolestaan parantaa otoksen suuri koko ja monipuolisuus. Opinnäytetyön eettisyys toteutui hyvin. Kaikkien käytettyjen julkaisujen tekijät huomioitiin asianmukaisella tavalla niin viitteinä tekstissä kuin lähdeluettelossa. Opinnäytetyön kaikissa vaiheissa oltiin huolellisia ja rehellisiä sekä noudatettiin salassapitovelvollisuutta.

Eettisistä syistä olisi potilailta pitänyt kysyä lupaa käyttää heidän näytettään opinnäytetyön tekemiseen. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista, koska kun opinnäytetyön aihe annettiin opinnäytetyöntekijälle, oli jo kaikki näytteet otettu ja analysoitu. Tätä eettistä ongelmaa ei kuitenkaan pidetty esteenä opinnäytetyön tekemiselle, koska opinnäytetyöntekijä oli niin vähän tekemisissä potilastietojen kanssa, eikä opinnäytetyön teko vaikuttanut potilaiden hoitoon.

Tulos ei ollut sitä mitä oltiin toivottu, ja vertailemalla pelkästään näitä kahta menetelmää ei saatu vastausta siihen, miten Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen tulisi menetelmiä käyttää tulevaisuudessa. Tämän opinnäytetyön aikana saatu tulos tulee kuitenkin olemaan hyödyllistä jatkotutkimusten aikana. Suurimman vaikeuden vertailuun toi se, että käytössä ei ollut tietoa siitä, ketkä potilaista oikeasti sairastivat hinkuuskää, minkä vuoksi ei voi varmuudella sanoa, kumpi menetelmä olisi tarkempi. Tämä myös vaikeutti tulosten vertaamista aikaisempien tutkimuksien kanssa.

Opinnäytetyössä käytetyt aikaisemmat tutkimukset vertailivat ja tarkastelivat myös hinkuyskän diagnosoinnissa käytettyjä menetelmiä. Kukaan ei ole aikaisemmin käyttänyt Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen ”In-House” -menetelmää tai ECDC:n suosittamaa menetelmää vertailuissa, mutta muita serologisia menetelmiä, jotka määrittävät samoja vasta-aineita, on käytetty.

Riffelmannin ym. (2010) tulokset viittasivat siihen, että IgA-vasta-aineiden määrittämisellä voi olla rajallinen diagnostinen arvo, koska herkkyys oli alhainen IgA:ta määrittelemisissä menetelmissä, joita he vertailivat. Riffelmann ym. kertovat myös, että tämä tulos vahvistaa yhden Eurooppalaisen tutkimuksen tulosta. Tämä Eurooppalainen tutkimus ehdottaa käyttämään IgA-vasta-ainemääritystä lisämenetelmänä vain näytteille, joiden pertussis toksiiini IgG-vasta-ainevasteet ovat epäselvät, ja joista toista näytettä ei ole saatavana. van der Zee, Schellekens ja Mooi (2015) vertailu viittaa vähän samaan tulokseen.

van der Zee, Schellekens ja Mooi (2015) ovat sitä mieltä, että rokotusten tehosteannosten lisääntyminen alentaa *Bordetella pertussis* toksiiini IgG-vasta-ainemääritysten tarkkuutta, jolloin pitäisi määrittää näytteen IgA-vasta-aineet. Tämä käy myös ilmi ECDC:n julkaisemasta opastuksesta heidän suosittamalleen menetelmälle. Opastuksessa sanotaan myös, että serologiset tutkimukset, jotka suoritetaan vuoden sisällä rokotuksesta, täytyy tulkita hyvin varovaisesti, koska rokotteen aiheuttamat vasta-aineet voivat myös ilmetä määrittäyksissä. André ym. (2008) puolestaan kirjoittavat, että soluttoman rokotteen tehosteannoksen jälkeen täytyy odottaa 2–3 vuotta ennen kuin voidaan tehdä diagnoosi serologiaan perustuen.

van der Zee, Schellekens ja Mooi (2015) kertovat myös, että tutkimuksissa, joissa määritettiin IgM-, IgA- ja IgG-vasta-aineita potilailta, joilla oli hyvin dokumentoitu hinkuyskä, vaihteleva ikä ja rokotushistoria oli yleinen löydös se, että IgG on herkin parametri. Myös tutkimuksissa, joissa määritettiin vain IgA- ja IgG-vasta-aineet, näyttäytyi IgG herkemmäksi, mikä myös näkyy tämän opinnäytetyön tuloksia tarkasteltaessa.

Jatkotutkimuksia tehdessä on siis paljon tekijöitä, joita pitäisi ottaa huomioon. Tämän opinnäytetyön jatkotutkimusaihe onkin analysoida samat näytteet vielä kolmannella tai jopa useammalla menetelmällä ja verrata niitä tuloksia niihin tuloksiin, joita on käytetty tämän opinnäytetyön tekemiseen. Tätä Tyks-Sapa liikelaitoksen mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen laboratorio on jo ryhtynyt tekemään.

LÄHTEET

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter P. 2008. Molecular biology of the cell, 5th edition. New York: Garland Science.

André, P.; Caro, V.; Njamkepo, E.; Wendelboe, A. M.; Van Rie, A. & Guiso, N. 2008. Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose Bordetella pertussis infection in 2007. J Clin Microbiol. Vol. 46, No 5, 1672–1677.

Barkoff, A-M.; Gröndahl-Yli-Hannuksela, K.; Vuononvirta, J.; Mertsola, J. & Kallonen, T. 2012. Differences in avidity of IgG antibodies to pertussis toxin after acellular pertussis booster vaccination and natural infection. Vaccine. Vol 30, No 48, 6897-6902.

Clarkeburn H. & Mustajoki A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.

ECDC. 2012. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with Bordetella pertussis.

Guiso, N.; Berbers, G.; Fry, N. K.; He, Q.; Riffelmann, M. & Wirsing von König, C. H. 2011. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Vol 30, No 3, 307-312.

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9., uudistettu painos. Porvoo: Edita Publishing Oy.

Hendrikx, L.H.; Öztürk, K.; de Rond, L. G. H.; de Greeff, S. C.; Sanders, E. A. M.; Berbers, G. A. M. & Buisman, A-M. 2011. Serum IgA responses against pertussis proteins in infected and Dutch xP ora P vaccinated children: an additional role in pertussis diagnostics. PLoS One. Vol 6, No 11, e27681.

Hirsijärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2014. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.

Jaakola, S.; Lyytikäinen, O.; Huusko, S.; Salmenlinna, S.; Pirhonen, J.; Savolainen-Kopra, C.; Liitsola, K.; Jalava, J.; Toropainen, M.; Nohynek, H.; Virtanen, M.; Löflund, J.-E.; Kuusi, M. & Salminen, M. (toim.). 2015. Tartuntataudit Suomessa 2014, raportti 11/2015. THL. Viitattu 3.11.2015 http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/126263/URN_ISBN_978-952-302-481-6.pdf?sequence=1

- Kananen J. 2011. Kvantti: kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.
- Kudesia, G. & Wreghitt, T. 2009. Clinical and diagnostic virology. Cambridge University press.
- Kuula Arja 2011. Tutkimusetiikka (Elektroninen aineisto): Aineistojen hankinta, käyttö ja säilytys. PAINOS 2 uudempi painos. Tampere: Vastapaino.
- Rokote.fi. 2015. Lasten rokotusohjelma. Viitattu 3.11.2015 <http://www.rokote.fi/lasten-rokoteopas/lasten-rokotusohjelma/>
- Le, T.; Cherry, J. D.; Chang, S-J.; Knoll, M. D.; Lee, M. L.; Barenkamp, S.; Bernstein, D.; Edelman, R.; Edwards, K. M.; Greenberg, D.; Keitel, W.; Treanor, J. & Ward, J. I. 2004. Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with acellular pertussis vaccine: the APERT study. J Infect Dis. Vol 190, No 3, 535-544.
- Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B. & Roitt, I. 2006. Immunology, 7th edition. Kanada: Elsevier.
- Mattoo, S. & Cherry, J. D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clinical microbiology reviews. Vol. 18, No 2, 326-382.
- Mertsola, J. & He, Q. 2010. *Bordetella pertussis* ja muuta bordetellat. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Mikrobiologia (Elektroninen aineisto). Kustannus Oy Duodecim.
- Peltola, H. 2010. Hinkkuyskä, pertussis, whooping cough. Teoksessa Hedman, K.; Heikkinen T.; Huovinen P.; Järvinen, A.; Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Immunologia (Elektroninen aineisto). Kustannus Oy Duodecim.
- Riffelmann, M.; Thiel, K.; Schmetz, J. & Wirsing von Koenig, C. H. 2010. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol. Vol. 48, No 12, 4459-4463.
- Salonen, J. 2012. Mikä on p-arvo ja miten sitä mitataan. Viitattu 11.11.2015 <http://blite.iki.fi/artikkelit/p-arvo/>
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006. Bioanalytiikan, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Viitattu 27.5.2015. [http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+\(1\).pdf](http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+(1).pdf)
- Thermo Fisher scientific. 2015. Traditional methods of cell lysis. Viitattu 13.11.2015 <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html>

Terveyskirjasto. 2015. Lääketieteen sanasto: serologia. Viitattu 18.11.2015
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt03090

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Viitattu 23.4.2015.
http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

van der Zee, A.; Schellekens, J. F. P. & Mooi, F. R. 2015. Laboratory diagnosis of pertussis. Clinical microbiology reviews. Vol. 28, No 4, 1005-1026.

IgA:n/IgM:n ja PT-IgG:n välinen vaikutus

<i>Label</i>	<i>Pr > Itl</i>	<i>Adj P</i>	<i>Exponentiated Estimate</i>	<i>Exponentiated Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Upper Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Upper Confidence Limit</i>
log(IgA) +1 unit, miehet	<.0001	.	2.0994	1.6661	2.6455	.	.
log(IgA) +1 unit, naiset	<.0001	.	2.5004	1.8929	3.3027	.	.
log(IgA), miehet vs naiset	0.3060	.	0.8397	0.6007	1.1736	.	.
log(IgA) +1 unit, 0-2v	0.0249	0.2007	2.0388	1.0941	3.7994	0.8493	4.8942
log(IgA) +1 unit, 2-4v	0.0020	0.0191	2.5137	1.4017	4.5079	1.1053	5.7169
log(IgA) +1 unit, 4-6v	0.3922	0.9890	1.2663	0.7370	2.1759	0.5913	2.7118
log(IgA) +1 unit, 6-14v	0.0080	0.0685	1.5234	1.1161	2.0792	0.9835	2.3597
log(IgA) +1 unit, 14-16v	<.0001	<.0001	5.7278	3.1716	10.3441	2.4938	13.1557
log(IgA) +1 unit, 16-20v	0.0106	0.0913	3.4788	1.3380	9.0452	0.9071	13.3419
log(IgA) +1 unit, 20-40v	<.0001	<.0001	3.6544	2.2438	5.9520	1.8399	7.2583
log(IgA) +1 unit, 40-60v	<.0001	<.0001	2.6462	1.8075	3.8741	1.5479	4.5239
log(IgA) +1 unit, >60v	0.6879	0.9999	0.9132	0.5862	1.4226	0.4895	1.7037
log(IgA), 0-2v vs 2-4v	0.6304	0.9998	0.8111	0.3454	1.9047	0.2149	3.0617
log(IgA), 0-2v vs 4-6v	0.2577	0.9657	1.6101	0.7054	3.6749	0.4458	5.8143
log(IgA), 0-2v vs 6-14v	0.4122	0.9952	1.3384	0.6665	2.6874	0.4524	3.9596
log(IgA), 0-2v vs 14-16v	0.0179	0.2757	0.3560	0.1514	0.8368	0.09415	1.3457
log(IgA), 0-2v vs 16-20v	0.3572	0.9898	0.5861	0.1878	1.8293	0.09973	3.4443
log(IgA), 0-2v vs 20-40v	0.1469	0.8651	0.5579	0.2535	1.2277	0.1635	1.9034
log(IgA), 0-2v vs 40-60v	0.4818	0.9986	0.7705	0.3724	1.5942	0.2485	2.3884
log(IgA), 0-2v vs >60v	0.0394	0.4727	2.2326	1.0397	4.7942	0.6798	7.3321
log(IgA), 2-4v vs 4-6v	0.0914	0.7345	1.9851	0.8953	4.4015	0.5750	6.8525
log(IgA), 2-4v vs 6-14v	0.1377	0.8485	1.6501	0.8515	3.1975	0.5895	4.6187
log(IgA), 2-4v vs 14-16v	0.0522	0.5572	0.4389	0.1911	1.0081	0.1203	1.6005
log(IgA), 2-4v vs 16-20v	0.5694	0.9998	0.7226	0.2357	2.2152	0.1264	4.1293
log(IgA), 2-4v vs 20-40v	0.3350	0.9862	0.6879	0.3213	1.4728	0.2104	2.2488
log(IgA), 2-4v vs 40-60v	0.8852	1.0000	0.9499	0.4727	1.9089	0.3207	2.8138
log(IgA), 2-4v vs >60v	0.0068	0.1263	2.7526	1.3222	5.7302	0.8796	8.6138
log(IgA), 4-6v vs 6-14v	0.5611	0.9997	0.8313	0.4455	1.5510	0.3150	2.1939
log(IgA), 4-6v vs 14-16v	0.0002	0.0071	0.2211	0.09904	0.4935	0.06337	0.7713
log(IgA), 4-6v vs 16-20v	0.0715	0.6576	0.3640	0.1213	1.0926	0.06583	2.0128
log(IgA), 4-6v vs 20-40v	0.0045	0.0874	0.3465	0.1671	0.7187	0.1114	1.0782
log(IgA), 4-6v vs 40-60v	0.0295	0.3910	0.4785	0.2465	0.9289	0.1705	1.3431
log(IgA), 4-6v vs >60v	0.3594	0.9900	1.3867	0.6889	2.7913	0.4669	4.1182
log(IgA), 6-14v vs 14-16v	0.0001	0.0045	0.2660	0.1356	0.5217	0.09323	0.7587
log(IgA), 6-14v vs 16-20v	0.1082	0.7833	0.4379	0.1598	1.1998	0.09126	2.1012
log(IgA), 6-14v vs 20-40v	0.0033	0.0665	0.4169	0.2329	0.7461	0.1685	1.0311
log(IgA), 6-14v vs 40-60v	0.0295	0.3913	0.5757	0.3502	0.9463	0.2657	1.2475
log(IgA), 6-14v vs >60v	0.0639	0.6213	1.6681	0.9708	2.8665	0.7185	3.8732
log(IgA), 14-16v vs 16-20v	0.0001	0.0045	0.2660	0.1356	0.5217	0.09323	0.7587
log(IgA), 14-16v vs 20-40v	0.1082	0.7833	0.4379	0.1598	1.1998	0.09126	2.1012
log(IgA), 14-16v vs 40-60v	0.0033	0.0665	0.4169	0.2329	0.7461	0.1685	1.0311
log(IgA), 14-16v vs >60v	0.0295	0.3913	0.5757	0.3502	0.9463	0.2657	1.2475
log(IgA), 16-20v vs 20-40v	0.3799	0.9927	1.6465	0.5405	5.0157	0.2910	9.3170

<i>Label</i>	<i>Pr > Itl</i>	<i>Adj P</i>	<i>Exponentiated Estimate</i>	<i>Exponentiated Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Upper Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Upper Confidence Limit</i>
log(IgA), 16-20v vs 40-60v	0.2443	0.9591	1.5674	0.7353	3.3410	0.4827	5.0888
log(IgA), 16-20v vs >60v	0.0285	0.3831	2.1645	1.0849	4.3183	0.7390	6.3396
log(IgA), 20-40v vs 40-60v	0.9279	1.0000	0.9519	0.3273	2.7685	0.1808	5.0119
log(IgA), 20-40v vs >60v	0.5995	0.9998	1.3146	0.4731	3.6532	0.2680	6.4480
log(IgA), 40-60v vs >60v	0.3005	0.9779	1.3810	0.7492	2.5456	0.5333	3.5763
log(IgM) +1 unit, miehet	<.0001	.	2.1030	1.5170	2.9154	.	.
log(IgM) +1 unit, naiset	<.0001	.	2.2347	1.5326	3.2585	.	.
log(IgM), miehet vs naiset	0.7775	.	0.9411	0.6172	1.4348	.	.
log(IgM) +1 unit, 0-2v	0.0019	0.0185	2.0565	1.3046	3.2418	1.0830	3.9050
log(IgM) +1 unit, 2-4v	0.1743	0.8242	1.7238	0.7855	3.7825	0.5696	5.2163
log(IgM) +1 unit, 4-6v	0.2000	0.8690	1.6246	0.7731	3.4136	0.5707	4.6249
log(IgM) +1 unit, 6-14v	0.0881	0.5710	1.5109	0.9402	2.4279	0.7745	2.9477
log(IgM) +1 unit, 14-16v	<.0001	0.0002	9.4139	3.3364	26.5619	2.1829	40.5972
log(IgM) +1 unit, 16-20v	0.1041	0.6322	3.9311	0.7541	20.4931	0.3838	40.2601
log(IgM) +1 unit, 20-40v	0.0152	0.1285	2.3168	1.1758	4.5650	0.8910	6.0244
log(IgM) +1 unit, 40-60v	0.1008	0.6205	1.5679	0.9162	2.6833	0.7355	3.3427
log(IgM) +1 unit, >60v	0.6731	0.9999	0.9041	0.5657	1.4449	0.4670	1.7503
log(IgM), 0-2v vs 2-4v	0.7040	1.0000	1.1930	0.4795	2.9681	0.2888	4.9285
log(IgM), 0-2v vs 4-6v	0.5950	0.9998	1.2659	0.5303	3.0215	0.3268	4.9028
log(IgM), 0-2v vs 6-14v	0.3578	0.9898	1.3611	0.7052	2.6271	0.4891	3.7877
log(IgM), 0-2v vs 14-16v	0.0082	0.1431	0.2185	0.07079	0.6741	0.03782	1.2618
log(IgM), 0-2v vs 16-20v	0.4577	0.9983	0.5231	0.09447	2.8969	0.03645	7.5080
log(IgM), 0-2v vs 20-40v	0.7726	1.0000	0.8877	0.3953	1.9935	0.2520	3.1268
log(IgM), 0-2v vs 40-60v	0.4446	0.9974	1.3116	0.6540	2.6305	0.4440	3.8745
log(IgM), 0-2v vs >60v	0.0133	0.2124	2.2747	1.1869	4.3594	0.8265	6.2606
log(IgM), 2-4v vs 4-6v	0.9144	1.0000	1.0611	0.3597	3.1299	0.1970	5.7136
log(IgM), 2-4v vs 6-14v	0.7782	1.0000	1.1409	0.4556	2.8565	0.2734	4.7602
log(IgM), 2-4v vs 14-16v	0.0108	0.1792	0.1831	0.04965	0.6753	0.02402	1.3958
log(IgM), 2-4v vs 16-20v	0.3767	0.9921	0.4385	0.07038	2.7319	0.02543	7.5600
log(IgM), 2-4v vs 20-40v	0.5779	0.9998	0.7440	0.2624	2.1101	0.1469	3.7686
log(IgM), 2-4v vs 40-60v	0.8459	1.0000	1.0994	0.4225	2.8605	0.2482	4.8698
log(IgM), 2-4v vs >60v	0.1674	0.8922	1.9066	0.7624	4.7682	0.4578	7.9404
log(IgM), 4-6v vs 6-14v	0.8717	1.0000	1.0752	0.4455	2.5952	0.2728	4.2373
log(IgM), 4-6v vs 14-16v	0.0070	0.1265	0.1726	0.04824	0.6174	0.02373	1.2547
log(IgM), 4-6v vs 16-20v	0.3383	0.9864	0.4133	0.06762	2.5258	0.02470	6.9153
log(IgM), 4-6v vs 20-40v	0.4882	0.9990	0.7012	0.2568	1.9146	0.1469	3.3481
log(IgM), 4-6v vs 40-60v	0.9394	1.0000	1.0361	0.4149	2.5878	0.2493	4.3063
log(IgM), 4-6v vs >60v	0.1904	0.9189	1.7969	0.7470	4.3225	0.4584	7.0443
log(IgM), 6-14v vs 14-16v	0.0017	0.0372	0.1605	0.05129	0.5022	0.02719	0.9475
log(IgM), 6-14v vs 16-20v	0.2750	0.9705	0.3843	0.06896	2.1421	0.02651	5.5714
log(IgM), 6-14v vs 20-40v	0.3112	0.9808	0.6522	0.2850	1.4925	0.1798	2.3658
log(IgM), 6-14v vs 40-60v	0.9193	1.0000	0.9636	0.4705	1.9738	0.3157	2.9413
log(IgM), 6-14v vs >60v	0.1312	0.8321	1.6712	0.8577	3.2564	0.5918	4.7198
log(IgM), 14-16v vs 16-20v	0.0017	0.0372	0.1605	0.05129	0.5022	0.02719	0.9475
log(IgM), 14-16v vs 20-40v	0.2750	0.9705	0.3843	0.06896	2.1421	0.02651	5.5714
log(IgM), 14-16v vs 40-60v	0.3112	0.9808	0.6522	0.2850	1.4925	0.1798	2.3658
log(IgM), 14-16v vs >60v	0.9193	1.0000	0.9636	0.4705	1.9738	0.3157	2.9413
log(IgM), 16-20v vs 20-40v	0.3793	0.9921	2.3947	0.3413	16.8034	0.1154	49.6804

<i>Label</i>	<i>Pr > t </i>	<i>Adj P</i>	<i>Exponentiated Estimate</i>	<i>Exponentiated Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Upper Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Lower Confidence Limit</i>	<i>Exponentiated Adjusted Upper Confidence Limit</i>
log(IgM), 16-20v vs 40-60v	0.0257	0.3463	4.0634	1.1863	13.9182	0.5980	27.6110
log(IgM), 16-20v vs >60v	0.0025	0.0536	6.0040	1.8816	19.1581	0.9867	36.5362
log(IgM), 20-40v vs 40-60v	0.5608	0.9997	1.6968	0.2852	10.0957	0.1057	27.2312
log(IgM), 20-40v vs >60v	0.2987	0.9778	2.5072	0.4424	14.2105	0.1685	37.3083
log(IgM), 40-60v vs >60v	0.3706	0.9911	1.4776	0.6283	3.4752	0.3904	5.5928