

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikka

Mira Meriluoto

Parvorokkovirusinfektion yleisyys raskauden aikana

Insinööriyö 6.5.2009

Ohjaaja: dosentti Maria Söderlund-Venermo
Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vahe

Tekijä Otsikko	Mira Meriluoto Parvorokkivirusinfektion yleisyys raskauden aikana
Sivumäärä Aika	74 sivua 6.5.2009
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja Ohjaava opettaja	dosentti Maria Söderlund-Venermo yliopettaja Marja Vaheri
<p>Parvovirusiin kuuluva parvorokkivirus eli ihmisen parvovirus B19 on yleinen ihmispato-geeni. Se on löydetty vuonna 1975, ja se aiheuttaa mm. nivel tulehduksia, anemiaa sekä parvorokkoa, joka on yleinen lastensairaus. Parvorokkivirus tarttuu henkilöstä toiseen pisaratartuntana hengitysteitse. Virus voi kulkeutua infektoituneelta äidiltä sikiölle. Raskaudenaikainen B19-infektio on yhdistetty useisiin sikiön ongelmiin kuten sikiöpöhöön, spontaaniin abortoitumiseen, kohdunsisäiseen sikiökuolemaan sekä sikiön anemiaan.</p> <p>Parvovirus B19 esiintyy maailmanlaajuisesti. Immunitetti kestää tavallisesti koko eliniän. Raskaana olevista naisista noin 35-45 % on alttiita parvovirus B19 -infektioille. B19-infektion yleisyys on tavallisesti raskauden aikana suunnilleen 1-2 %, epidemia-aikana jopa 10 %. Raskaana olevan äidin infektoituessa sikiöistä infektoituu noin 30 %.</p> <p>Insinööriyön tarkoituksena oli selvittää parvorokkivirusinfektion yleisyyttä raskaana olevien naisten keskuudessa Suomessa suuren parvorokkivirusepidemian aikana, vuosina 1992-1993. Työssä selvitettiin raskaana olevien naisten seroprevalenssin lisäksi serokonversion yleisyyttä äidin alkuraskauden seeruminäytteen ja vastasyntyneen napaverinäytteen välillä. Myös infektoituneiden sikiöiden määrä pyrittiin selvittämään. Parvorokkivirusinfektion raskaudenaikaisista yleisyyttä Suomessa on tutkittu toistaiseksi vähän.</p> <p>Tutkimuksen näyteaineisto kattoi 4 237 alkuraskauden näytettä sekä 1 022 napaverinäytettä. Tutkimus suoritettiin entsyymi-immunologisella menetelmällä käyttäen neljään eri tekniikkaan perustuvaa vasta-ainetestiä, IgM-, IgG- ja epitooppityyppispesifistä IgG-ELISA-testiä sekä IgG-aviditeetti-ELISA-testiä.</p> <p>Raskaudenaikaisen seroprevalenssin havaittiin olevan 56,8 %, joten alttiita parvorokkiviruselle oli 43,2 % raskaana olevista naisista. Seronegatiivisten äitien raskaudenaikaiseksi serokonversioprosentiksi epidemia-aikana saatiin oli 4,6 %. Todennäköinen raskaudenaikainen infektio havaittiin 2,6 %:ssa raskauksista.</p> <p>Tutkimustuloksista saatiin lisää tietoa parvorokkiviruksen esiintymisestä raskauden aikana. Tuloksia voidaan mahdollisesti hyödyntää raskaana olevia työntekijöitä koskevassa lainsäädännössä.</p>	
Hakusanat	parvorokkivirus, serokonversio, raskaudenaikainen virusinfektio, vasta-ainetesti

Author Title	Mira Meriluoto The prevalence of parvovirus B19 during pregnancy
Number of Pages Date	74 6 May 2009
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor Supervisor	Maria Söderlund-Venermo, Docent Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>Parvovirus B19 is a member of the family <i>Parvoviridae</i>. It was discovered in 1975. Human parvovirus B19 is a widespread and common infectious pathogen in humans. The virus causes a wide variety of illnesses like fifth disease, arthritis and aplastic crises. Transmission of infection occurs via the respiratory route. The virus can also be transmitted from a mother to the fetus. In pregnancy the acute B19 infection is an important cause of hydrops fetalis, fetal anaemia and fetal mortality.</p> <p>The prevalence of IgG antibodies directed against parvovirus B19 varies from 50 % in young adults to 85 % in the geriatric population. The immunity lasts for a lifetime. 35-45 % of women in childbearing age are susceptible to B19 infection. The incidence of B19 infection during pregnancy is about 1-2 % in endemic periods but can rise to 10 % during epidemic periods.</p> <p>The aim of the study was to investigate the prevalence of parvovirus B19 infection in Finland during the epidemic in 1992-1993. In addition, the goal of this study was to clarify the seroconversion rate between serum samples from the pregnant mothers and umbilical cord blood samples from the newborns. The proportion of infected fetuses was also investigated.</p> <p>There were 4237 serum samples from the pregnant women and 1022 cord blood samples from the newborns involved in this study. The study was carried out by enzyme-linked immunosorbent assays using four different techniques, IgM-, IgG-, epitope-type-specific-, and avidity-ELISA.</p> <p>The seroprevalence among women in childbearing age was 56.8 %. The seroconversion rate among the susceptible women was 4.6 %. Maternal infection was detected in 2.6 % of the pregnancies.</p> <p>The results of this study gave new information on the prevalence of parvovirus B19 during pregnancy in Finland. These results may be advantageous to the legislation related to pregnant employees in Finland.</p>	
Keywords	Parvovirus B19, seroconversion, prenatal infection, enzyme-linked immunosorbent assay

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

1	Johdanto	7
	KIRJALLINEN OSUUS	8
2	Parvovirukset	8
3	Ihmisen parvovirus B19 eli parvorokkovirus	9
	3.1 Fysikaalinen rakenne	9
	3.2 Replikaatio ja P-antigeeni	10
	3.3 Patogeneesi	11
	3.4 Esiintyvyys	12
4	Virusinfektiot raskauden aikana	13
5	Raskaudenaikainen B19-infektio	14
6	Sikiön B19-infektio	15
7	Parvovirus B19-infektion taudinmääritys	16
	7.1 Vasta-aineiden muodostuminen	17
	7.2 Vastasyntyneen B19-infektion havaitseminen	19
8	B19V:n havaitsemiseen käytetyt serologiset testit	20
	8.1 μ -kaappaus-IgM-ELISA	20
	8.2 IgG-ELISA	21
	8.3 Epitooppityyppispesifinen IgG-ELISA (ETS-ELISA)	23
	8.4 IgG-aviditeetti-ELISA	25
	KOKEELLINEN OSUUS	29
9	Työn tavoitteet ja kulku	29
	9.1 Työn tausta ja tavoitteet	29
	9.2 Työn kulku	31

10	Materiaalit ja menetelmät	33
10.1	Näyttemateriaali	33
10.2	μ -kaappaus-IgM-ELISA	33
10.3	IgG-ELISA	36
10.4	Epitooppityyppispesifinen IgG-ELISA (ETS-ELISA)	37
10.5	IgG-aviditeetti-ELISA	39
10.6	Biotrin IgM-ELISA	41
10.7	IgG-ELISA, antigeenina B19 rakenneproteiini VP1 yhdistettynä β -galaktosidaasiin (β VP1-IgG-ELISA)	42
11	Tulokset	44
11.1	Menetelmien optimointi	44
11.1.1	Absorbanssitason vaihtelu IgM-ELISA-testissä Nunc polysorp-kuoppalevyllä	44
11.1.2	IgM-ELISAn optimointi Costar-kuoppalevyllä	45
11.1.3	Biotinyloidun VP2-antigeenierän optimointi IgM- ja IgG-ELISA-testiin	47
11.1.4	ETS-ELISAssa käytettyjen antigeenien vertailu	48
11.1.5	IgG-aviditeetti-ELISAssa käytettyjen antigeenien vertailu	50
11.1.6	IgM-, IgG- ja ETS-ELISA-testien antamien absorbanssien hajonta	51
11.2	Alkuraskauden näytteiden tutkiminen IgM-, IgG- ja ETS-ELISA-testeillä	52
11.3	Napaverinäytteiden tutkiminen	53
11.3.1	Napaverinäytteiden tutkiminen IgG-ELISA-testillä	53
11.3.2	B19V-IgG-positiivisten napaverinäytteiden tutkiminen rinnan alkuraskauden näytteen kanssa	54
11.4	Akuuttiin infekioon viitanneet näytteet	55
11.4.1	Akuuttiin infekioon viitanneiden näytteiden tutkiminen	55
11.4.2	Akuutit alkuraskauden näytteet	56
11.4.3	Sikiön infektio	58

12	Tulosten tarkastelu	59
12.1	Raskaudenaikainen seroprevalenssi	59
12.2	Akuutit alkuraskauden näytteet	60
12.3	Raskaudenaikainen serokonversioprosentti	61
12.4	Todennäköinen raskaudenaikainen infektiio	61
12.5	Sikiön infektiio	62
12.6	Tulosten luotettavuuden arviointi	63
13	Yhteenveto	65
	Lähteet	67
	Liitteet	
	Liite 1: IgM-ELISAn optimointi Costar-kuoppalevyille	73
	Liite 2: ELISA-testien absorbanssien hajonta	74

1 Johdanto

Insinööriö suoritettiin Helsingin yliopiston kliinisteoreettisen laitoksen virologian osastolla Klaus Hedmanin ja Maria Söderlund-Venermon tutkimusryhmässä, yhteistyössä Työterveyslaitoksen ja Oulun Kansanterveyslaitoksen kanssa.

Insinööriö oli osa laajempaa tutkimusta, jonka tarkoituksena oli tutkia useamman viruksen vaikutusta raskauteen ja tuottaa lisää tietoa käytännön työsuojelua varten. Tutkittavia viruksia olivat parvorokkovirus (ihmisen parvovirus B19), AAV (adeno-associated virus), TTV (torque teno virus) ja HBoV (ihmisen bocavirus). Näiden virusten vaikutuksesta lisääntymisterveyteen on vähän tietoa. Tarkoituksena oli selvittää kyseisten virusten mahdollisia haittavaikutuksia raskauteen ja sikiönkehitykseen kiinnittämällä erityistä huomiota raskaana oleviin naisiin, jotka työskentelevät alle kouluikäisten lasten kanssa. Tutkimustuloksilla saattaa olla vaikutusta raskaana olevia työntekijöitä koskevaan lainsäädäntöön. Erityisesti perusteellisempi selvitys parvorokkoviruksen merkityksestä raskaudelle on tarpeen työsuojelun sekä erityisäitiysraha- ja erityisäitiysvapaa-lainsäädännön kehittämiseksi.

Insinööriön tarkoituksena oli selvittää parvovirus B19 -infektion esiintyvyyksiä raskaana olevien naisten keskuudessa suuren parvorokkovirusepidemian aikana, vuosina 1992-1993. Työssä selvitettiin raskaudenaikaisten B19-infektioiden yleisyyttä tutkimalla B19-vasta-aineiden ilmentymistä (eli serokonversiota) äidin ja vastasyntyneen seeruminäytteiden välillä entsyymi-immunologisella menetelmällä. Työssä oli lisäksi tarkoitus verrata parvovirus B19 esiintyvyyttä riskiryhmän ja vertailuryhmän välillä. Parvovirus B19 -infektion riskiryhmään kuuluvat raskaana olevat naiset, jotka työskentelevät alle kouluikäisten lasten kanssa. Tämä johtuu siitä, että B19-infektio on erittäin yleinen 5-7-vuotiaiden lasten keskuudessa. Tutkimuksessa vertailuryhmään valittiin raskaana olevia naisia, jotka eivät työskennelleet pienten lasten parissa raskautensa aikana, mutta joiden koulutus ja työnkuva vastasivat riskiryhmään kuuluvia naisia.

KIRJALLINEN OSUUS

2 Parvovirukset

Parvovirukset kuuluvat pienimpiin tunnettuihin nisäkkäitä infektoiviin, DNA:ta sisältäviin viruksiin. Parvovirusten halkaisija on 18-26 nm ja molekyylipaino $5,5-6,2 \times 10^6$ Da. Lineaarisen, yksijuosteisen DNA:n pituus on 4 000-6 000 emästä. Vaipattoman ja yksinkertaisen rakenteensa takia parvovirukset kestävät hyvin fysikaalisia käsittelyjä. Virukset ovat stabiileja pH:ssa 3-9 sekä kestävät 56 °C lämpötilaa tunnin ajan. (Söderlund 1996.)

Omintakeisena piirteenä parvoviruksille on niiden DNA:n muodostama hiusneularakenne, joka toimii DNA-replikaation alukkeena ja helpottaa näin virusten monistumista. Parvovirukset replikoituvat nopeasti uusiutuviissa kudoksissa kuten luuytimessä ja siikikudoksessa. Koska parvovirusten DNA on hyvin lyhyt, hyödyntävät ne isäntäsolun replikaatiosysteemejä kuten polymeraasientsyymiä ja säätelytekijöitä. (Söderlund 1996.)

Parvovirukset kuuluvat *Parvoviridae*-heimoon ja ovat yleisiä eläinten ja hyönteisten patogeenejä. *Parvoviridae*-heimo jakautuu *Parvovirinae*- ja *Densovirinae*-alaheimoihin sen mukaan, infektoivatko virukset selkärangaisia vai selkärangattomia. Selkärangaisia infektoiva *Parvovirinae*-alaheimo jakautuu viiteen sukuun: *Parvovirusiin*, auttaja-viruksen tarvitseviin *Dependovirusiin*, punasolujen esiasteissa replikoituviin *Erythrovirusiin*, *Amdovirusiin* ja *Bocavirusiin*. (ICTVdB 2006.) Ihmisen parvovirus B19 eli parvorokkovirus kuuluu *Erythrovirus*-sukuun, koska se replikoituu vain erytrosyyttien esiasteissa (Heegaard & Brown 2002).

On luultu pitkään, että B19 olisi heimonsa ainoa ihmisiä infektoiva patogeeni. Hiljattain on kuitenkin löytynyt kolme uutta ihmistä infektoivaa parvovirusta, ihmisen bocavirus 1 ja 2 (HBoV) (Allander ym. 2005; Kapoor ym. 2009) ja ihmisen parvovirus PARV4 (Jones ym. 2005). HBoV 1:n on todettu aiheuttavan ylä- ja alahengitystieinfektioita varsinkin pienillä lapsilla. PARV4-virusta on löydetty toistaiseksi vain huumeidenkäyttäjien ja HIV-positiivisten seerumeista.

3 Ihmisen parvovirus B19 eli parvorokkivirus

Ihmisen parvovirus B19 (Human parvovirus B19, B19V) löydettiin vuonna 1975 tutkittaessa hepatiitti-B-antigeeniä terveiltä verenluovuttajilta. Virus löydettiin paneelin B näytteestä numero 19, minkä mukaan virus nimettiin. Tuolloin virusta ei vielä osattu yhdistää mihinkään tiettyyn sairauteen. (Cossart ym. 1975.) Vuonna 1981 todettiin parvorokkoviruksen aiheuttavan aplastisen kriisin (Pattison ym. 1981) ja 1984 parvorokon eli ns. viidennen taudin (erythema infectiosum) (Anderson ym. 1984). Samana vuonna havaittiin sen liittyvän myös sikiöpöhöön ja sikiökuolemiin (Brown ym. 1984). Vuotta myöhemmin kahdessa tutkimusryhmässä puolestaan havaittiin viruksen aiheuttavan niveltulehduksia (White ym. 1985; Reid ym. 1985).

3.1 Fysikaalinen rakenne

Parvovirus B19 koostuu 5 596 nukleotidin pituisesta lineaarisesta yksijuosteisesta DNA:sta, jota ympäröi kahdesta rakenneproteiinista muodostunut ikosahedraalinen kapsidi. VP1-rakenneproteiini (80-86 kDa) muodostaa alle 10 % kapsidista, kun taas VP2-rakenneproteiini (58-75 kDa) on vallitseva rakenneos. Rakenneproteiinien aminohapposekvenssit ovat muuten samanlaiset, mutta VP1-proteiinilla on lisäksi kapsidirakenteesta ulostyöntyvä lisäosa, jota kutsutaan VP1-uniikkialueeksi (VP1u). (Söderlund ym. 1995b; Söderlund 1996:19,21.) Rakenneproteiinien lisäksi B19-viruksella on ei-rakenteellinen proteiini, NS1 (77 kDa) (de Jong ym. 2006).

B19-viruspartikkelien koko on 22-24 nm. Infektion aikana muodostuvista viruskapsideista noin puolet on tyhjiä, eli ne eivät sisällä lainkaan DNA:ta. Nämä kapsidit ovat kuitenkin morfologisesti samanlaisia kuin infektiiviset viruspartikkelit. (Söderlund 1996:14.)

B19V:lta on löydetty kolme genotyyppiä. Ne ovat kuitenkin serologisesti samanlaisia, joten niitä ei voi erottaa vasta-ainetesteillä. (Hokynar ym. 2007.)

3.2 Replikaatio ja P-antigeeni

Parvorokkovirus replikoituu punasolujen esiasteiden tumassa luuytimessä ja sikiön maksassa. B19V:n DNA on melko lyhyt, joten se joutuu turvautumaan isäntäsolun replikaatiomekanismiin. Replikaatiota helpottaa parvoviruksille omintakeinen DNA:n hiusneularakenne, jossa genomien palindromiset sekvenssit muodostavat alukkeet polymeeraasille. (Hokynar 2007: 16.)

B19V:n replikaatio punasoluissa pystyy lamauttamaan punasolutuotannon ja voi aiheuttaa tämän takia vakavaa anemiaa. Varsinkin kehittyvälle sikiölle B19V:n replikaatio erytroidisissa kantasoluissa voi olla kohtalokasta. Sikiön oma immuunijärjestelmä on vielä niin kehittymätön, että se ei pysty vastaamaan virusinfektioon. Useamman päivän punasolutuotannon lamaantuminen aiheuttaa sikiölle anemiaa vaikuttaen sikiön kehitykseen. Pahimmassa tapauksessa se johtaa sikiökuolemaan. (de Jong ym. 2006.)

B19V katoaa verestä kahden kuukauden sisällä infektion jälkeen, mutta sen on todettu tämän jälkeen persistoivan kudoksissa ihmisen eliniän ajan. Virusta on löydetty oireilevien potilaiden lisäksi täysin terveiden ihmisten nivelistä, ihosta, aivoista, maksasta ja sydäimestä usean vuoden jälkeen infektiosta. B19V:n persistoinnista ei ole todettu olevan haittaa raskaana oleville naisille. Toistaiseksi ei tiedetä, voiko persistoiva B19V reaktivoitua. (Söderlund-Venermo ym. 2002; Hokynar ym. 2007.)

Parvovirus B19 reseptoreja ovat P-antigeenit, joita esiintyy varsinkin punasolujen pinnoilla. P-antigeenia on löydetty muidenkin solulajien pinnoilta mm. nivelistä, istukasta, sikiön sydänlihaksesta ja endoteelisolukosta. (Brown ym. 1993, Brown ym. 1994, de Jong ym. 2006.) P-antigeenin määrän on havaittu laskevan istukassa raskauden edetessä. Tämä saattaa selittää, miksi sikiökuolleisuus ja –sairastavuus vähenevät raskauden loppua kohden. (Jordan & DeLoia 1999.) P-antigeeni puuttuu vain yhdeltä kahdestasadastatuhannesta. Nämä henkilöt ovat luontaisesti suojassa B19-infektioilta. (Brown ym. 1993; Brown ym. 1994.)

3.3 Patogeneesi

Parvorokkovirus tarttuu tavallisesti pisaratartuntana hengitysteitse. Se voi tarttua myös veriteitse mm. verituotteiden välityksellä. B19V voi kulkeutua raskaana olevalta äidiltä sikiölle istukan kautta. (Heegaard & Brown 2002.) Viidesosa B19-infektion saaneista on täysin oireettomia. Äidin raskaudenaikainen infektio on myös usein oireeton.

Ihmisen parvovirus B19 eli parvorokkovirus aiheuttaa mm. parvorokkoa, ns. viidettä tautia (erythema infectiosum). Parvorokko on yleinen lastensairaus. Oireet alkavat yleensä kuumeena, lihaskipuna ja päänsärkynä. Muutama päivä ensioireiden jälkeen havaitaan tavallisesti rokkomaista ihottumaa ympäri vartaloa. Varsinkin posket saattavat olla punaisen ihottuman peitossa suun ja silmien alueen ollessa kalpeita. Ihottuma saattaa kadota välillä ja ilmestyä taas uudestaan. Uusiutumista voi ilmetä jopa kuukausia akuutin infektion jälkeen. (Enders ym. 2006; Söderlund 1996;26.)

Aikuisilla niveltulehdus on usein ainoa havaittava oire B19-infektion yhteydessä. Lapsilla havaittavat niveltulehdukset ovat harvinaisempia, niitä ilmenee vain noin 10 %:lla tapauksista (Heedgaard & Brown 2002). Niveltulehdus voi olla hetkellinen kestäen vain muutamia viikkoja tai vakava, jolloin tarvitaan lääkärinhoitoa (Söderlund 1996; 27).

B19V voi aiheuttaa aplastisen kriisin potilaille, jotka sairastavat hemolyyttistä anemiaa kuten sirppisoluanemiaa, koska B19V:n replikoituminen erytroidisissa kantasoluissa estää punasolutuotannon. Lyhyestä punasolujen tuotannon lamaantumisesta ei kuitenkaan ole haittaa terveille ihmisille. Aplastinen kriisi paranee yleensä 2–3 viikon kuluessa, tosin punasolujen siirtoa saatetaan tarvita. (Söderlund 1996; 27.)

Parvorokkovirus voi kulkeutua äidiltä sikiölle. Raskaudenaikainen B19-tartunta on yhdistetty useisiin sikiön ongelmiin kuten sikiön turvotukseen eli pöhöön (non-immune hydrops fetalis, NIHF), spontaaniin abortoitumiseen, kohdunsisäiseen sikiökuolemaan, sikiön anemiaan ja oireettomaan sikiön infektiin. (Enders ym. 2006.) Sikiö on melko suojaaton virushyökkäystä vastaan, johtuen vielä kehittymättömästä immuunijärjestelmästä. B19V infektoi herkästi sikiöitä, koska se replikoituu vain nopeasti jakautuvissa solupopulaatioissa. (Söderlund 1996: 18, 29.)

3.4 Esiintyvyys

Parvovirus B19 esiintyy maailmanlaajuisesti. Infektiot ajoittuvat pääosin loppupalvelle ja keväälle. Epidemioita ilmenee noin neljän vuoden välein. Koska parvorokko on yleinen lastensairaus, nuorista aikuisista noin 50 % on seroposiitivisia eli heillä on vasta-aineita parvorokkovirusta kohtaan. Seroprevalenssi eli vasta-aineposiitivisten osuus kasvaa iän myötä ja vanhuksista jopa 85 %:lla on vasta-aineita B19-virusta vastaan. (Kaikkonen ym. 2001; Heegaard & Brown 2002.) Reinfektioita voi tapahtua (Anderson ym. 1985). Toistaiseksi ei ole tutkimustuloksia niiden haittavaikutuksista raskauteen.

On havaittu, että B19V-vasta-aineposiitivisuus on sitä todennäköisempää, mitä enemmän henkilöllä on sisaruksia. Muutaman vuoden ikäero sisaruksiin kasvattaa vasta-aineposiitivisuuden todennäköisyyttä verrattuna suurempaan ikäeroon. Lisäksi on havaittu, että seroposiitivisten osuus kasvaa omien lasten lukumäärän kasvaessa. Varsinkin 5–7-vuotiaat lapset ovat suuri riskitekijä. (Valeur-Jensen ym. 1999.)

Raskaana olevista naisista noin 35-45 %:lla ei ole vasta-aineita parvovirus B19:ää vastaan. B19-infektion yleisyys on tavallisesti raskauden aikana suunnilleen 1-2 %, mutta epidemia-aikana esiintymistiheys voi nousta jopa yli 10 %:iin. Raskaana olevan äidin infektoituessa sikiöistä infektoituu noin 30 %. (de Jong ym. 2006.)

Parvorokkovirusinfektion esiintyvyyttä on tutkittu rinnakkain viidessä Euroopan maassa. Mossong (ym. 2008) havaitsivat huomattavan eron raskauden aikaisessa B19V-infektioyleisyydessä eri maiden välillä. Tutkimuksen mukaan Suomessa ja Puolassa raskaudenaikainen infektoitumisriski oli merkittävästi suurempi kuin Belgiassa, Italiassa sekä Englannissa ja Walesissa. Erojen on arveltu johtuvan pääosin käyttäytymis- ja kulttuurieroista tai näytteenoton aikana mahdollisesti esiintyneistä epidemioista. Tutkimuksessa arvioitu B19V-vasta-aineettoman äidin infektoitumisriski raskauden aikana Suomessa on 1,24 %, kun taas Belgiassa se on vain 0,61 %. (Mossong ym. 2008.)

4 Virusinfektiot raskauden aikana

Raskauksista noin 5-15 %:ssa esiintyy komplikaatioita, jotka johtuvat äidin virusinfektiosta (Meltomaa & Ekblad 1996). Raskaudenaikaisessa virusinfektiossa virus saattaa siirtyä äidistä sikiöön tai vastasyntyneeseen. Kohdunsisäiset sikiön virusinfektiot saattavat aiheuttaa mm. sikiön varhaisen kasvun hidastumista, keskushermostoon liittyviä rakennepoikkeavuuksia, sikiön turvotusta eli hydropsia tai vammautumista. Ne voivat johtaa myös keskenmenoon tai ennenaikaiseen synnytykseen, mutta sikiö voi myös sairastaa virusinfektion ja parantua siitä. (Alanen 2002; Meltomaa & Ekblad 1996.)

Sikiölle vaarallisimpia ovat teratogeeniset virukset, jotka pystyvät infektoimaan sikiön kohdussa äidin viremian seurauksena ja aiheuttamaan epämuodostumia. Parvorokkivirus ei ole teratogeeninen, mutta B19 infektiota voi silti johtaa sikiön kuolemaan aiheuttamalla sikiölle vakavan anemian. Virukset voivat infektoida vastasyntyneen myös synnytyksen yhteydessä kontaktista emättimen eritteisiin tai äidin vereen. Osa viruksista voi infektoida vastasyntyneen myös imetettäessä äidinmaidon kautta. (Alanen 2002.)

Raskauden aikana tapahtuvat immunologiset muutokset altistavat raskaana olevia naisia virusinfektioille. Raskauden aikana sairastettaessa osa virusinfektioista on oireiltaan rajumpia kuin muulloin. (Price 2008.)

Ihmisen parvovirus B19 lisäksi raskauskomplikaatioita voivat aiheuttaa mm. rubellavirus eli vihurirokkovirus, herpesryhmän viruksista etenkin sytomegalovirus ja varicellazoster-virus eli vesirokon aiheuttaja. Myös hepatiitti B- ja C-virukset sekä HI-virus voivat aiheuttaa ongelmia sikiölle. Primääri-infektio on sikiölle vaarallisempi kuin reaktivaatio tai reinfektio. Tosin joidenkin virusten tapauksessa reaktivaatio voi olla myös kliinisesti merkittävä. (Alanen 2002; Price 2008.)

5 Raskaudenaikainen B19-infektio

Parvorokkoviruksesta ei ole vaaraa raskauden aikana, jos raskaana olevalla naisella on immuniteetti virusta vastaan. Immunitetin puuttuessa suurin riski saada virusinfektio on raskauden ensimmäisen ja toisen kolmanneksen aikana, jolloin virus voi aiheuttaa raskausongelmia. Raskauden loppupuolella sikiön immuunijärjestelmä on jo kehittynyt paremmaksi ja sikiö on muutenkin vahvempi voittamaan infektion. Immunitetti kestää tavallisesti koko eliniän.

Raskaina olevista naisista 35-45 % on alttiita parvovirus B19 -infektioille. Raskauden aikana äidin B19-infektion yleisyys on tavallisesti noin 1-2 %, mutta epidemia-aikana esiintymistiheys voi olla jopa yli 10 %. (de Jong ym. 2006.) Ihmisen parvovirus B19 voi kulkeutua raskauden aikana infektoituneelta äidiltä sikiölle. Tämä tapahtuu noin 30 %:ssa raskausajan infektiosta. Infektio on kohtalokas noin 5 %:lle infektion saaneista sikiöistä. Sikiökuoleman riski äidin infektoituessa raskauden alkupuoliskolla on arviolta 10 %, mutta raskauden loppupuolella riski on hyvin vähäinen. Mahdolliset sikiön oireet alkavat tavallisesti 3-5 viikon päästä äidin infektiosta. (Price 2008.)

Pienet lapset ovat B19-infektion suurin riskitekijä raskauden aikana. Varsinkin raskaana olevan naisen omat lapset saattavat usein tartuttaa infektion, mutta myös työympäristössä, esim. päiväkodissa tai koulussa, riehuva parvorokkoepidemia voi olla kohtalokas. B19-infektion saanut henkilö on yleensä infektiokykyinen ihottumaoireiden alkamiseen asti. Näin ollen äidin on turha välttää oireilevia lapsiaan infektiota pelätessään. (De Jong ym. 2006; Valeur-Jensen ym. 1999.)

Työympäristöllä on havaittu olevan suuri merkitys raskauden aikaisen B19-infektion kannalta. Cartterin ym. (1991) mukaan ala-asteen opettajilla oli huomattavasti suurempi riski saada B19-infektio raskauden aikana kuin muissa ammateissa työskentelevillä. Suuri riski havaittiin myös päivähoitotyöntekijöillä sekä kotona työskentelevillä henkilöillä. Selvästi pienin infektio-riski oli henkilöillä, jotka eivät työskennelleet lasten

kanssa. Syynä tähän on B19-infektion erittäin suuri yleisyys 5–7-vuotiaiden lasten keskuudessa. (Cartter ym. 1991.)

Raskaana olevan äidin infektoituessa viremia saavuttaa huippunsa noin viikon päästä infektiosta. Oireet alkavat 10–14 päivän kuluttua infektiosta noin 50 %:lla naisista. Jos tyypillisiä oireita havaitaan, on äidin infektiosta varmistuttava tutkimalla IgG- ja IgM-vasta-aineet. Infektion varmistuessa suositellaan sikiön tarkkailua ultraäänitutkimuksilla viikon välein 12 viikon ajan mahdollisen hydropsin varalta. (De Jong ym. 2006.)

6 Sikiön B19-infektio

Äidin akuutti B19-infektio varsinkin raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana on yhdistetty suurentuneeseen sikiön turvotusriskiin sekä sikiökuolemariskiin. (Enders ym. 2004; Enders ym. 2007.) Sikiölle voi aiheutua lisäksi neurologisia häiriöitä, tai sikiön infektio voi olla oireeton (De Jong ym. 2006). Yli 95 % sikiön komplikaatioista ilmenee 12 viikon kuluessa äidin akuutin B19-infektion jälkeen. Tästä syystä viikoittaista ultraäänitutkimusta suositellaan akuutin B19-infektion saaneille raskaana oleville naisille 12 viikon ajan. (Enders ym. 2006.) Sikiön B19-infektio voidaan havaita myös PCR-tunnistuksella lapsivedestä tai sikiön napanuoran verinäytteestä. Toistaiseksi ainoa hoitokeino infektoituneelle sikiölle on kohdunsisäinen punasolujensiirto, joka pienentää sikiökuoleman riskiä. (De Jong ym. 2006.)

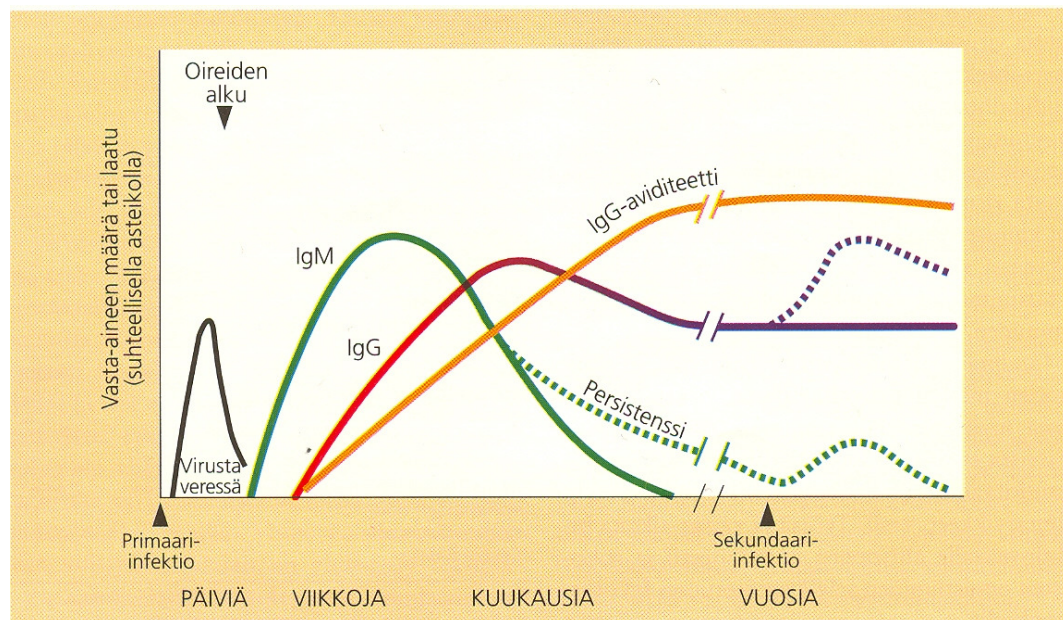
7 Parvovirus B19-infektion taudinmääritys

B19-infektion diagnoosi toteutetaan yleisesti serologisilla menetelmillä eli käyttäen vasta-ainetestejä. Akuutti tai viimeaikainen B19-infektio voidaan todeta mittaamalla seerumista B19-spesifisiä immunoglobuliini M (IgM) –pitoisuuksia, B19-spesifisten IgG-vasta-aineiden serokonversio (vasta-ainenegatiivisen muuttuminen vasta-ainepositiiviseksi) tai IgG-vasta-ainepitoisuuden nelinkertaistuminen edelliseen näytteen verrattuna. (Enders ym. 2006; Enders ym. 2007.)

B19-infektioajankohdan määrittämiseen on kehitetty IgM- ja IgG-ELISA-testien lisäksi kaksi spesifistä serologista testiä, epitooppityyppispesifinen IgG-ELISA (Söderlund ym. 1995b; Kaikkonen ym. 1999) ja IgG-aviditeetti-ELISA (Söderlund ym. 1995a). Näillä testeillä voidaan selvittää infektioajankohta vain yhtä seeruminäytettä tutkien. Lisätestit perustuvat eri asioihin kuin IgM- ja IgG-ELISAt, joten niiden avulla voidaan vahvistaa tulosten luotettavuutta. Varsinkin raskaudenaikaisia näytteitä tutkittaessa lisätestien tuoma hyöty on havaittu arvokkaaksi (Enders ym. 2008). IgM-vasta-aineet voivat olla raskauden aikana havaitsemattomissa riippumatta akuutista infektiosta. Koska epitooppityyppispesifisyys ja aviditeetti maturoituvat hieman eri kinetiikalla kuin IgM, pienentävät lisätestit mm. väärin negatiivisten testitulosten osuutta (Enders ym. 2008). Epitooppityyppispesifisyys- ja IgG-aviditeetti-ELISAlla voidaan täsmentää ja tarkentaa infektioajankohtaa.

7.1 Vasta-aineiden muodostuminen

Kuvassa 1 on havainnollistettu yleistä virusinfektion kulkua. Virusta esiintyy veressä muutamien päivien ajan infektion jälkeen. Oireet alkavat yleensä vasta, kun virusta ei enää erity, eikä oireiden alettua potilas ole enää infektiokykyinen. Parvovirus B19 –infektiossa viremia saavuttaa huippunsa noin viikon päästä infektiosta. IgM-vasta-aineet nousevat havaittavalle tasolle kahden viikon päästä ja IgG-vasta-aineet kahdesta kolmeen viikon päästä infektiosta. (Anderson ym. 1985.)



Kuva 1. Vasta-aineiden esiintyvyys infektion edetessä. (Vainionpää ym. 2000.)

Havaitessaan viruksen ensimmäistä kertaa, elimistön puolustusjärjestelmä alkaa tuottaa ensin IgM-vasta-aineita. Parvovirusinfektiossa IgM ilmestyy ensimmäisellä rokoviikolla (Vainionpää ym. 2000). IgM-vasta-aineet säilyvät yleensä kolmesta kuuteen kuukauteen, ja niiden havaitseminen on siis merkki akuutista tai viimeaikaisesta infektiosta. Matalien IgM-vasta-aineiden kohollaolemisajanjakso vaihtelee huomattavasti yksilöistä riippuen. Tämän takia B19-spesifisten IgM-vasta-aineiden havaitseminen raskauden alkupuolella voi johtua myös primaari-infektiosta ennen hedelmöitystä. Toistaiseksi ei ole tiedossa, aiheuttaako juuri ennen hedelmöitystä saatu infektio komplikaatioita sikiölle. (Enders ym. 2006.) IgM-vasta-aineet saattavat persistoida eli jäädä koholle pidemmäksi aikaa. Tästä voi aiheutua tulosten vääränlaista tulkintaa.

IgG-vasta-aineiden tuotanto B19V:tä vastaan alkaa viimeistään toisella rokkoviikolla, hieman myöhemmin kuin IgM-vasta-aineiden tuotanto (Vainionpää ym. 2000). IgG-vasta-ainepitoisuus säilyy havaittavana yleensä koko eliniän. B-solujen kehittyessä lähi-kuukausien aikana primääri-infektiosta IgG:n funktionaalinen affiniteetti eli aviditeetti nousee ja säilyy korkeana yleensä koko eliniän. Korkea IgG-vasta-ainepitoisuus samoin kuin korkea IgG-aviditeetti viittaavat vanhaan immuniteettiin.

Raskauden aikana infektoituneilla naisilla vasta-aineet ilmestyvät yleensä ennen raskauskomplikaatioiden ilmentymistä. (Seppälä ym. 1994.) Raskauden aikana äidin vasta-ainetasot saattavat heitellä, ja esimerkiksi osalla raskaana olevista naisista IgM-vasta-aineet eivät kohoa havaittavaksi akuutin infektion yhteydessä. (Enders ym. 2006; Enders ym. 2007.)

7.2 Vastasyntyneen B19-infektion havaitseminen

B19-spesifisten IgM-vasta-aineiden havaitseminen vastasyntyneen seerumista viittaa vahvasti synnynnäiseen infektiin (Vainionpää ym. 2000). Tämä johtuu siitä, että äidin IgM-vasta-aineet eivät pysty kulkeutumaan istukan läpi sikiön verenkiertoon suuren kokonsa takia. Poikkeuksia on kuitenkin havaittu. Ne ovat johtuneet mm. revenneestä istukasta.

Napaverinäytteen vasta-ainepitoisuudet kuvastavat mahdollisten sikiön IgG-vasta-ainepitoisuuksien lisäksi äidin IgG:n pitoisuutta raskauden lopussa, sillä äidillä ja sikiöllä on osittain yhteinen verenkierto. IgG-vasta-aineet läpäisevät istukan ja näin ollen imeväisen verenkierrossa esiintyy ensimmäisten elinkuukausien aikana äidin IgG-vasta-aineita. Näiden maternaalisten vasta-aineiden aviditeetti kuvastaa äidin aviditeettia juuri ennen synnytystä. Ensimmäisten elinkuukausien aikana vastasyntyneen seerumista mitattu aviditeettitulos ei ole luotettava, sillä siihen vaikuttaa monia eri tekijöitä. Maternaalisten vasta-aineiden pitoisuus pienenee noin viiden viikon puoliintumisajalla. Mahdollisesti infektoituneen imeväisen IgG-pitoisuus puolestaan kasvaa. (Vainionpää ym. 2000.)

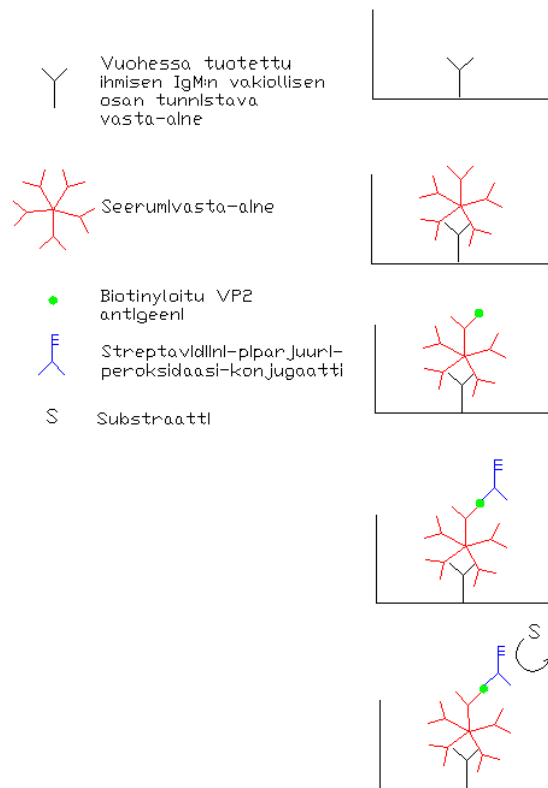
Herkin keino synnynnäisen virusinfektion osoittamiseksi on IgG-pitoisuuden seuranta yhden vuoden ikään asti. IgG-aviditeetin kasvu imeväisen seurantanäytteissä ensimmäisen elinvuoden aikana kertoo nimenomaan lapsen infektiosta. IgM-vasta-aineen havaitseminen napaverinäytteestä erottaa prenataalisen infektion postnataalisesta infektiosta. (Vainionpää ym. 2000.)

8 B19V:n havaitsemiseen käytetyt serologiset testit

8.1 μ -kaappaus-IgM-ELISA

Tutkimuksessa käytetty μ -kaappaus-IgM-ELISA (IgM-ELISA) on pystytetty Haartman-instituutin virologian osastolla vuoden 2008 alussa. Testi perustuu kerros-ELISA-tekniikkaan, ja sen periaate on esitetty kuvassa 2. Kuvassa on havainnollistettu yhden kuoppalevyn kuopan tapahtumia vasta-ainetestiä suoritettaessa. Levyt päällystetään vuoheissa tuotetulla polyklonaalisella vasta-aineella, joka tunnistaa vain ihmisen IgM-vasta-aineita. Seeruminäytteen mahdollisesti sisältämät B19-spesifiset IgM-vasta-aineet kiinnittyvät päällystysvasta-aineisiin. Biotinyloidut VP2-antigeenit sitoutuvat spesifisesti seerumivasta-aineisiin, ja seuraavaksi lisättävä streptavidiiniparjuuriperoksidaasi puolestaan kiinnittyy tiukasti biotiiniin. 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-substraatin lisäys saa aikaan värireaktion, jos seeruminäyte on sisältänyt B19-spesifisiä IgM-vasta-aineita.

Antigeeninä käytettiin B19V:n rakenneproteiini-VP2:sta muodostettuja kapsideja. Käytetyt antigeenit on tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla hyödyntäen baculoviruksen ekspressiosysteemiä ja *Spodoptera frugiperda* -soluja (sf-9-soluja).



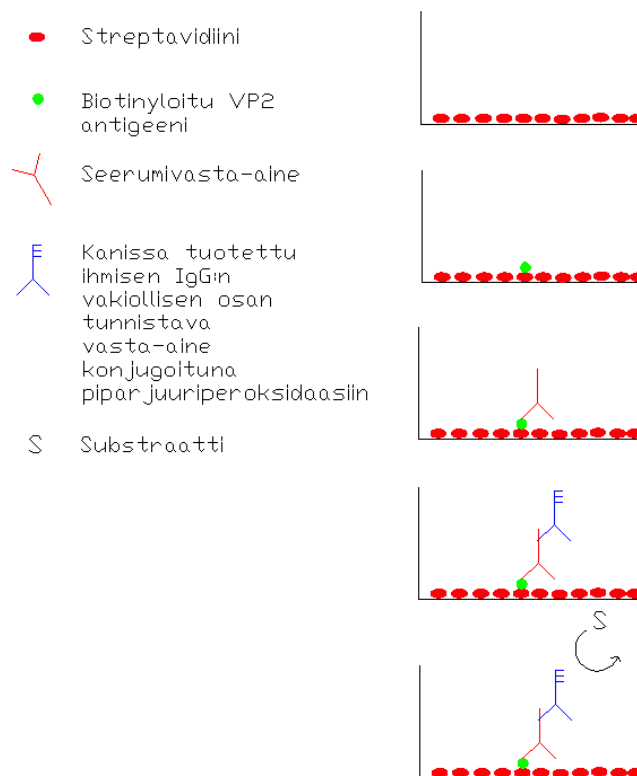
Kuva 2. μ -kaappaus-IgM-vasta-ainetestin toimintaperiaate.

8.2 IgG-ELISA

Tutkimuksessa käytetty IgG-ELISA on pystytetty vuonna 1999 Haartman-instituutin virologian osastolla. Positiivisen ja negatiivisen tuloksen erottava kynnysarvo määritettiin tuolloin tutkimalla 46 seronegatiivisen henkilön IgG-vasta-ainepitoisuuksia kyseisellä IgG-ELISAlla. Tuloksista laskettiin absorbanssien keskiarvo ja siihen lisättiin kolme standardipoikkeamaa. Kynnysarvo oli 0,198. IgG-ELISA-testille ei ole määritelty erillistä raja-arvoaluetta. IgG-ELISAn herkkyys on 97,8 %. (Kaikkonen ym. 1999.)

Antigeeninä IgG-ELISA-testissä käytettiin hyönteissoluissa tuotetusta parvorokkoviruksen rakenneproteiini-VP2:sta muodostettuja kapsideja. VP2-kapsidien synteesissä on käytetty baculoviruksen ekspressiosysteemiä ja *Spodoptera frugiperda* -soluja (sf-9-soluja) (Kaikkonen ym. 1999). Käytetyt antigeenit on tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla.

IgG-ELISA-testin periaate on esitetty kuvassa 3. Kuoppalevyt on aluksi päällystettävä streptavidiinilla, johon biotinyloitu VP2-kapsidi tarttuu tiukasti. Päällystys on tehtävä, sillä Söderlund ym. (1995b) havaitsivat, että yksin VP2-rakenneproteiineista muodostettu kapsidi denaturoituu sidottaessa suoraan polystyreenilevyille ja että vanhan immunitetin vasta-aineet eivät tunnista denaturoitua VP2-antigeenia (Söderlund ym. 1995b). Seeruminäytteessä mahdollisesti esiintyvät B19-IgG-vasta-aineet tunnistavat konformaationaalisen VP2-antigeenin spesifisesti. Seerumivasta-aineiden tarttuminen antigeeniin voidaan detektoida kanissa tuotetulla, ihmisen IgG:n vakiollisen osan tunnistavalla sekundaarivasta-aineella, johon on liitetty piparjuuriperoksidaasientsyymi. 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-substraatin lisäys saa aikaan värireaktion, jos seerumi on sisältänyt B19-spesifisiä IgG-vasta-aineita.



Kuva 3. IgG-ELISA-testin toimintaperiaate.

8.3 Epitooppityyppispesifinen IgG-ELISA (ETS-ELISA)

ETS-ELISA on pystytetty Haartman-instituutin virologian osastolla vuonna 1995 (Söderlund ym. 1995b) ja muutettu peptidipohjaiseksi vuonna 1999 (Kaikkonen ym. 1999). Akuutin infektion vanhasta immuniteetista erottava kynnysarvo määritettiin tutkimalla seeruminäytteitä, jotka oli otettu kolmen kuukauden sisällä akuutin infektion jälkeen (n=105). Näytteiden ETS-suhteiden keskiarvo laskettiin ja tulokseen lisättiin kolme standardipoikkeamaa. ETS-ELISAn kynnysarvo oli 10. (Kaikkonen ym. 1999.) ETS-ELISAn herkkyudeksi lineaarista KYVTGIN-peptidiä käyttäen on havaittu 98 % ja spesifisyydeksi 94 % (Kaikkonen ym. 2001).

Epitooppityyppispesifisellä (Epitope Type-Specific, ETS) IgG-ELISAlla voidaan määrittää potilaan primääri-infektion ajankohtaa vain yhtä seeruminäytettä tutkimalla. ETS-ELISA on epäsuora ELISA, joka perustuu parvorokkovirusinfektion aikana muodostuviin epitooppityyppispesifisiin IgG-luokan vasta-aineisiin. Vasta-aineet lineaarisia eli denaturoituja B19-VP2-rakenneproteiinin epitooppeja kohtaan katoavat kuuden kuukauden sisällä infektiosta. Sen sijaan vasta-aineet konformationaalisia eli luonnollisen rakenteen omaavia VP2-proteiinin epitooppeja vastaan säilyvät. (Söderlund ym. 1995b.)

Infektion akuuttivaiheessa syntyy vasta-aineita denaturoidun VP2-proteiinin lineaarista KYVTGIN-peptidiä kohtaan. Parvorokkovirusinfektion akuutin vaiheen spesifinen, lineaarinen KYVTGIN-peptidi (VP2 aminohapot 344-350) löydettiin kartoittamalla koko B19V:n kapsidiproteiinin sekvenssi peptidiskannauksella (Kaikkonen ym. 1999). Heptapeptidi on nimetty aminohappojensa Lys-Tyr-Val-Thr-Gly-Ile-Asn mukaan.

ETS-ELISA-testeissä käytetään rinnakkain sekä lineaarisia että konformationaalisia VP2-epitooppeja ja verrataan niiden antamia tuloksia keskenään. Tulosten analysoinnin helpottamiseksi lasketaan ns. ETS-suhde. ETS-suhde lasketaan jakamalla konformationalisen epitoopin ELISA-absorbanssitulos lineaarisen epitoopin absorbanssilla. ETS-suhteen perusteella voidaan arvioida infektioajankohtaa. Akuutin infektion ETS-suhde on alle kymmenen. ETS-suhteen ollessa yli kymmenen on kyse vanhasta immuniteetistä. (Kaikkonen ym. 1999.)

ETS-ELISAn toteutus on verrattavissa IgG-ELISAn toteutukseen (kuva 3). ETS-ELISAssa konformationaalisenä epitooppina käytettiin biotinyloitua B19V:n rakenneproteiini-VP2-kapsideja (Kaikkonen ym. 1999), jotka on tuotettu hyönteissoluissa Haartman-instituutin virologian osastolla. Linearisena epitooppina puolestaan käytettiin kaupallisesti valmistettua B19V:n VP2-pintaproteiinin 24 aminohapon (VP2 aminohapot 335-359) lineaarista peptidiä, joka sisältää rakenteessaan KYVTGIN-sekvenssin (ETS1) sekä nelihaaraista peptidiä, joka sisältää KYVTGIN-sekvenssin neljässä eri kohdassa (ETS4). Peptidien rakenteet on esitetty kuvassa 4.

A.

PYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTY

B.

PYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTY
 PYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTY
 PYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTY
 PYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTY



Kuva 4. A. Lineaarinen KYVTGIN-peptidi (ETS1). B. Nelihaarainen KYVTGIN-peptidi (ETS4). Peptidihaarat on sidottu yhteen kysteini- ja lysini-aminohapoilla. (Mäkelä 2003)

8.4 IgG-aviditeetti-ELISA

Aviditeetti eli funktionaalinen affiniteetti tarkoittaa vasta-aineen ja antigeenin välistä kokonaisvetovoimaa eli kaikkien sitoutumiskohtien ja erilaisten sitoutumisvoimien yhteisvoimaa. Immuunivasteen on havaittu kehittyvän niin, että aviditeetti on ensimmäisten viikkojen ja kuukausien aikana heikko, mutta maturoituu vahvaksi vanhaan immunitettiin.

IgG-aviditeetti-ELISA pystytettiin B19V:lle vuonna 1994 (Söderlund ym. 1995a). IgG-aviditeetti-ELISA mittaa IgG-luokan vasta-aineiden sitoutumisvoimaa B19-virusproteiineihin, ja sillä voidaan erottaa B19-primaari-infektio vanhasta immunitetista vain yhtä seeruminäytettä tutkimalla (Seppälä ym. 1994). Lisäksi tällä ELISA-testillä voidaan havaita sekundaari-infektiot, jotka ovat endogeeninen reaktivaatio eli elimistössä persistoivan viruksen uudelleen aktivoituminen sekä eksogeeninen reinfektio eli elimistön ulkopuolelta uudelleen saatu infektio (Söderlund ym. 1995a). Antigeenina aviditeetti-ELISAssa käytettiin prokaryoottisolussa tuotettua B19V:n rakenneproteiini-VP1-polypeptidiä, joka oli yhdistetty β -galaktosidaasiin (β VP1) (Söderlund ym. 1992).

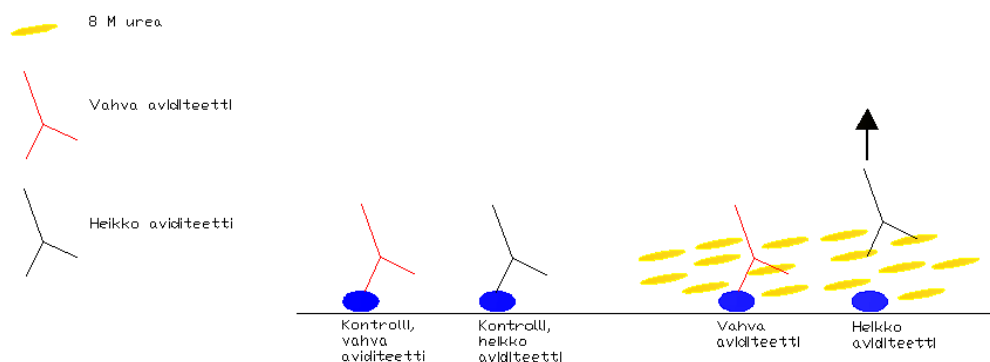
Aviditeetti-indeksi ilmaisee voimakkaasti sitoutuneiden IgG-vasta-aineiden osuuden. Aviditeetti-indeksin ollessa alle 15 on kyse lähiviikkojen primaari-infektiosta. Aviditeetti-indeksi 16-25 kuvaa raja-arvoaluetta, ja sen tulkinta on, että lähiviikkojen tai kuukausien parvorokkovirusinfektio on mahdollinen. Arvon 25 ylittävä indeksi merkitsee vanhaa immunitettia. β VP1-IgG-aviditeetti-ELISAn herkkyuden todettiin olevan 99 % (Söderlund ym. 1995a). Tutkittaessa uudestaan eri aineistolla testin herkkyudeksi havaittiin 100 % ja spesifisyydeksi 89 % (Kaikkonen ym. 2001).

Elimistöllä ei ole valmiina vasta-aineita aiemmin tuntemattomia antigeenejä kohtaan. Kun elimistö kohtaa vieraan antigeenin, alkavat pre-B-solut tuottaa lukuisia erilaisia vasta-aineita. Pre-B-solut valitsevat immunoglobuliinigeeneistään sopivia geenejä ja yhdistelevät niistä luettujen immunoglobuliinimolekyylien polypeptidiketjuja kevyiden ja raskaiden ketjujen pareiksi. Näin saadaan aikaan kokonaisia vasta-aineita, joiden

vaihtelevat osat ovat erilaisia. Nämä infektion alkuvaiheen vasta-aineet tarttuvat anti-geeniin melko heikosti ja niillä on siten heikko aviditeetti. (Seppälä ym.1994.)

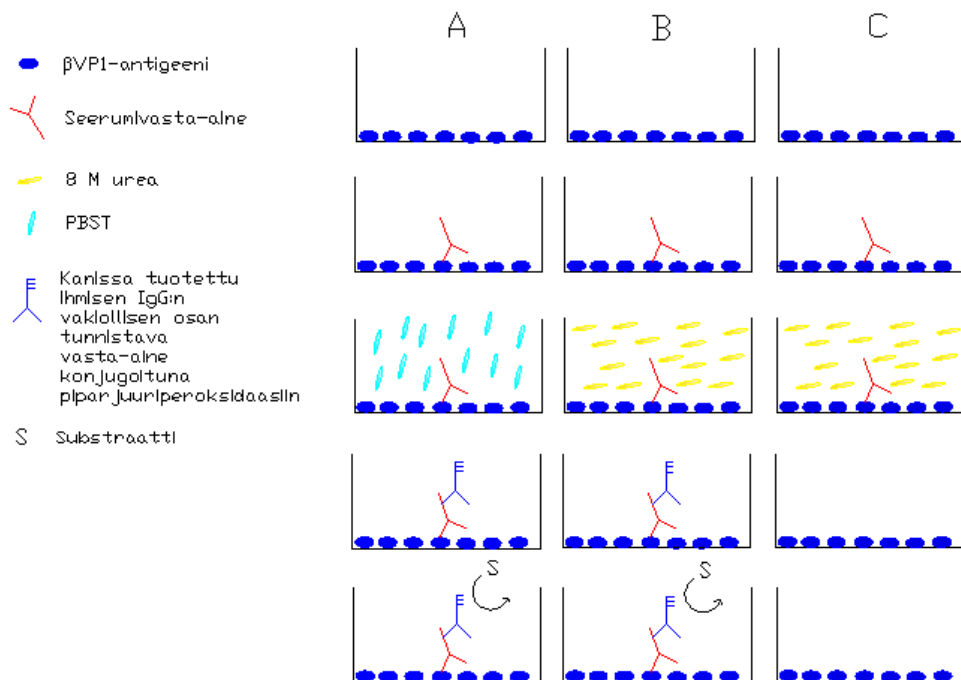
Immunoglobuliinigeeneissä tapahtuu kuitenkin runsaasti mutaatioita, joten uusia immunoglobuliinivariantteja syntyy jatkuvasti. Elimistö pyrkii valitsemaan parhaiten antigeeniin sitoutuvia vasta-aineita tuottaneet B-solut ja antaa niille jonkinlaisen eloonjäämis-signaalin. Ilman signaalia jääneet B-solut ajautuvat apoptoosiin. Näin parhaimman sitoutumiskyvyn omaavat immunoglobuliinit säilyvät ja muut katoavat pikku hiljaa. Vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiskyky paranee ajan myötä johtaen vahvaan aviditeettitulokseen muutaman kuukauden päästä infektiosta. Tapahtumaa kutsutaan aviditeetin maturaatioksi. (Seppälä ym.1994.)

IgG-aviditeetti-ELISA perustuu proteiinia denaturoivaan reagenssiin, tässä tapauksessa ureaan. Proteiinia denaturoiva reagenssi pystyy irrottamaan infektion akuutti- tai toipilasvaiheessa muodostuvat heikon aviditeetin omaavat vasta-aineet antigeeneistään. Vanhan immunitetin vasta-aineet (vahva aviditeetti) sitoutuvat antigeeneihinsä niin lujasti, että proteiinin denaturointikäsittely ei erota niitä toisistaan. (Söderlund ym. 1995a.) Tämä on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Aviditeetti. Heikon aviditeetin omaavat vasta-aineet denaturoituvat 8 M urea-käsittelyllä. Vahvan aviditeetin omaavat vasta-aineet pysyvät kiinni antigeenissa.

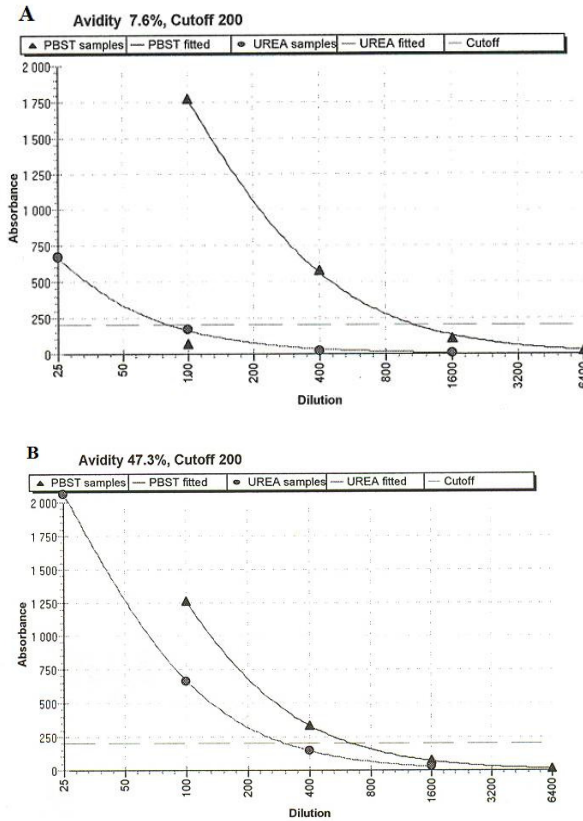
IgG-aviditeetti-ELISA on epäsuora-ELISA (kuva 6). Kuoppalevyt on aluksi päällystetty betagalaktosidaasiin yhdistetyllä B19V:n rakenneproteiini-VP1-polyeptidi-antigeenilla (β VP1). B19V:n rakenneproteiini-VP2:sta poiketen, VP1 kestää immobilisoinnin suoraan kuoppalevyille (Söderlund ym. 1995b). Potilasvasta-aineen annetaan aluksi sitoutua kuoppalevyille kiinnitettyyn antigeeniin. On tärkeää, että vasta sitoutumisen jälkeen tehdään hallittu proteiinidenaturointikäsittely, jolloin akuutin infektion vasta-aineet denaturoituvat ja irtoavat antigeenista (kuva 6 C). Vanhan immuniteetin vasta-aineet kestävät käsittelyn ja pysyvät sitoutuneena antigeeniin (kuva 6 B). (Seppälä ym. 1994.)



Kuva 6. IgG-aviditeetti-ELISA. A) PBST-käsittely. B) Ureakäsittely vanhan immuniteetin vasta-aineille. C) Ureakäsittely akuutin infektion vasta-aineille.

Neljän pisteen aviditeetti-ELISAssa 8 M denaturointikäsittelyn rinnalla tehdään pesut käyttäen fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, johon on lisätty Tween 20:tä (PBST). PBST-käsittely poistaa epäspesifistä taustaa, mutta ei vaikuta spesifisiin antigeeni-vasta-ainesidoksiin (kuva 6 A). Vertaamalla PBST- ja ureakäsittelyjen vaikutusta absorbanssitulokseen voidaan havaita, onko kyse akuutista infektiosta vai vanhasta immuniteetista (kuva 7). Kuvassa 7 kohdassa A on esitetty akuutin kontrollinäytteen antamat urea- ja PBST-käyrät neljästä havaintopisteestä. Käyrien väliin jäävän vaakasuoran kynnyсар-

voiviivan pituuden perusteella lasketaan aviditeetti-indeksi tietokoneavusteisesti. Akuutin infektion seeruminäytteellä käyrien väliin jäävä viiva on pidempi kuin vanhan immuniteetin seeruminäytteellä (kuva 7, A ja B).



Kuva 7. A. Akuutin kontrollinäytteen aviditeetti-ELISAn urea- ja PBST-käyrät. B. Vanhan immuniteetin kontrollinäytteen aviditeetti-ELISAn urea- ja PBST-käyrät. Kolmiolla merkityt pisteet vastaavat PBST:llä pestyjä kuoppalevyn kuoppia ja pallolla merkityt urealla pestyjä kuoppia.

KOKEELLINEN OSUUS

9 Työn tavoitteet ja kulku

9.1 Työn tausta ja tavoitteet

Insinöörityö oli osa laajempaa tutkimusta, jonka tavoitteena oli tutkia parvorokkoviruksen (ihmisen parvovirus B19), AAV:n (adeno-associated virus), TTV:n (torque teno virus) ja HBV:n (ihmisen bocavirus) vaikutusta raskauteen ja sikiönkehitykseen. Näiden virusten vaikutusta lisääntymisterveyteen on tutkittu vasta vähän, joten tutkimus tuottaa tietoa raskaudenaikaisista virusinfektioista ja niiden riskeistä. Niinpä tutkimustuloksilla saattaa olla vaikutusta myös raskaana olevia työntekijöitä koskevaan lainsäädäntöön, lähinnä erityisäitiysraha- ja erityisäitiysvapaalainsäädännön kehittämiseksi.

Tutkimuksen yksi osa on jo suoritettu. Riipinen ym. (2008) tutkivat parvovirus B19 -infektion yleisyyttä keskenmenoissa ja kohdunsisäisissä sikiökuolemissa PCR-tekniikalla sikiöistä. Aiemmin tehdyissä ruotsalaistutkimuksissa (Skjöldebrand-Sparre ym. 2000, Tolfvenstam ym. 2001, Norbeck ym. 2002) oli havaittu korkea prevalenssi raskauden loppupuoliskon kuolleiden sikiöiden keskuudessa. Riipisen ym. (2008) tutkimustulokset olivat yhteneviä ruotsalaistutkimusten kanssa hydrooppisten sikiöiden osalta. Sen sijaan Riipisen ym. tulokset olivat huomattavasti matalampia loppuraskauden ei-hydrooppisten sikiöiden sikiökuolemien osalta kuin ruotsalaistutkimusten tulokset. Ruotsalaistutkimusten B19V-DNA-esiintyvyyden onkin havaittu olevan suurempi kuin aiemmin on oletettu nimenomaan loppuraskauden sikiökuolemien kohdalla. Suomalais tutkimusten alhaisempien B19V-esiintyvyytulosten luotettavuutta puolustaa se, että parvorokkoviruksen aiheuttamia sikiökuolemia esiintyi pääasiassa suuren parvorokkovirusepidemian aikana (Riipinen ym. 2008).

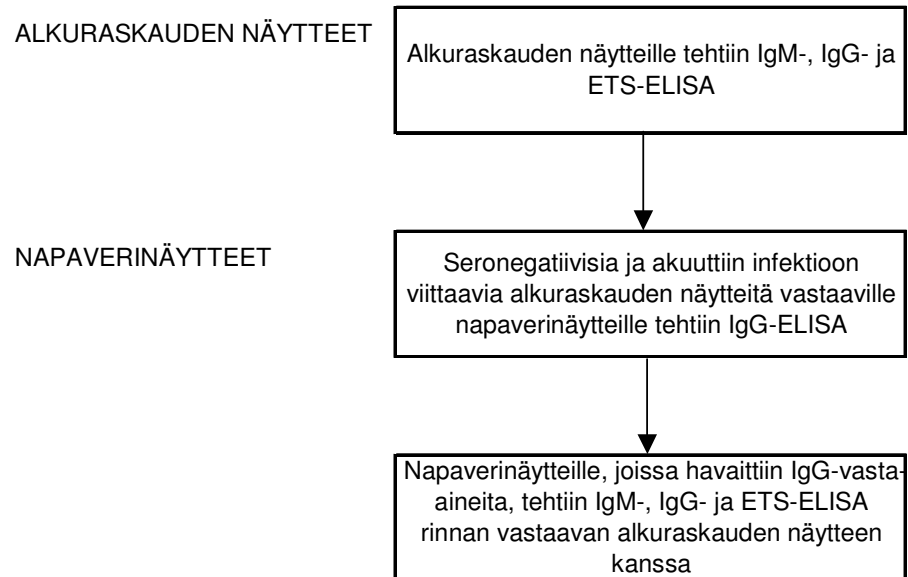
Työterveyslain (738/2002) säädösten mukaan työntekijän terveydelle haittaa aiheuttavat biologiset tekijät on rajoitettava niin vähäisiksi, ettei niistä aiheudu haittaa tai vaaraa työntekijän terveydelle tai lisääntymisterveydelle. Sairasvakuutuslain (1224/2004) mukaan raskaana olevalla naisella on oikeus saada erityisäitiysrahaa, jos hänen työtehtäviinsä tai työoloihinsa liittyy tekijä, joka voi vaarantaa hänen tai sikiön terveyden. Käy-

täntö parvorokkoviruksen kohdalla on kuitenkin ollut toistaiseksi epäselvä, eikä tällä hetkellä ole selviä ohjeita, kuinka raskaana olevan naisen kanssa tulisi menetellä työympäristössä riehuvan parvorokkoepidemian aikana. Tämän takia kattava selvitys parvorokkoviruksen yleisyydestä raskauden aikana on tärkeää mahdollisten lakimuutosten kannalta. Lakimuutos, joka oikeuttaisi erityisäitiysrahaan sekä erityisäitiysvapaaseen parvorokkoepidemian riehussa päiväkodissa tai koulussa, olisi toivottava, varsinkin vaikeiden raskauksien kuten hedelmöityshoitojen yhteydessä, sillä B19V aiheuttaa raskauskomplikaatioita ja sikiökuolemia.

Insinööriön tarkoituksena oli tutkia parvorokkoviruksen esiintyvyyttä raskauden aikana sekä selvittää virukselle alttiiden raskaana olevien naisten osuus. Työssä tutkittiin serokonversion (vasta-ainenegatiivisen muuttuminen vasta-ainepositiiviseksi) yleisyyttä äidin ja vastasyntyneen seeruminäytteiden välillä sekä akuutteja tautitapauksia raskauden alussa ja lopussa. Näytteet olivat peräisin suuren parvorokkoepidemian ajalta vuosilta 1992-1993.

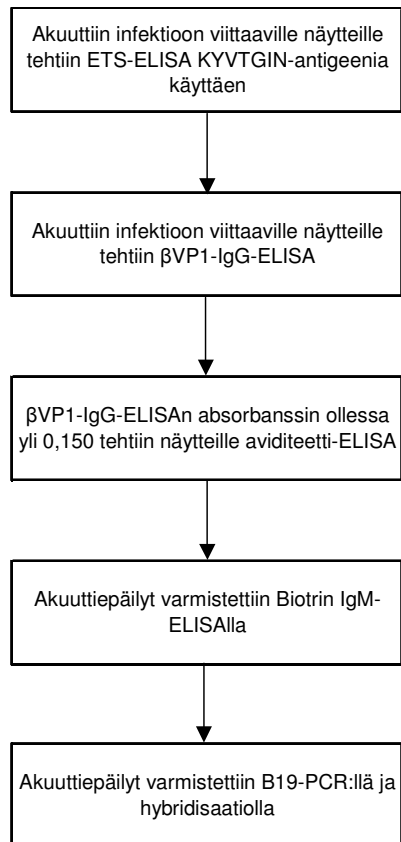
9.2 Työn kulku

Insinööriyön vaiheet on esitetty lyhyesti kuvassa 8. Insinööriyö aloitettiin tutkimalla alkuraskauden näytteet. Negatiivisia ja akuuttiin infekioon viittaavia näytteitä vastaavat napaverinäytteet tutkittiin niiltä osin, kuin näytettä oli saatavana.



Kuva 8. Alkuraskauden näytteiden ja napaverinäytteiden tutkiminen.

Alkuraskauden näytteiden ja napaverinäytteiden tutkimisen jälkeen valittiin näytteistä ne, jotka tulosten perusteella viittasivat akuuttiin infektiin. Kuvassa 9 on esitetty, kuinka akuuttiin infektiin viitanneet näytteet on tutkittu.



Kuva 9. *Akuuttiin infektiin viitanneiden näytteiden tutkiminen.*

Tutkimusaineisto, joka kattoi äitien alkuraskaus- ja sikiöiden napaveriseerumeita, tutkittiin serologisesti yhdessä työterveyslääkäri Anita Riipisen kanssa, jonka väitöstyöhön opinnäytetyö liittyy.

10 Materiaalit ja menetelmät

10.1 Näytemateriaali

Tutkimuksessa käytetyt seeruminäytteet saatiin Oulun Kansanterveyslaitokselta. Tutkimuksessa oli mukana 4 237 tutkimusajanjakson 1.9.1992-31.8.1993 aikana synnyttäneen naisen seeruminäytettä raskauden ensimmäiseltä kolmannekselta sekä 1 022 vastasyntyneen lapsen napaverinäytettä (hypotyreoosinäytettä). Tutkimusajanjakso kattaa laajan parvorokkoepidemian ajan Suomessa vuosina 1992-1993. Näytteitä oli säilytetty -20 °C lämpötilassa.

Tutkimusaineisto rajattiin naisiin, joilla oli ollut raskaus tutkimusajanjakson aikana ja jotka olivat olleet työssä raskauden aikana. Vaadittavan työajanjakson pituudeksi määriteltiin vähintään 60 työpäivää ensimmäisen raskauspuoliskon aikana. Vaadittu työajanjakso oli näin pitkä, jotta voidaan todennäköisin syin olettaa, että tutkimushenkilöt olisivat olleet töissä vähintään kuukauden ajan raskauden aikana. Rekisteristä ei saatu selville mahdollisten lomien tai sairauslomien ajankohtia. Näyteaineistoa ei ollut rajattu ensisynnyttäjiin.

10.2 μ -kaappaus-IgM-ELISA

Reagenssit ja materiaalit

- 0,05 M karbonaattipuskuri, pH 9,6, Sigma
- Steriili vesi
- 3 % ja 0,5 % naudan seerumialbumiini, Bovine serum albumin (BSA), Sigma-aldrich
- Ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava, vuoheissa tuotettu polyklonaalinen vasta-aine, Cappel, ICN Biomedicals
- B19-rakenneproteiini-VP2-antigeeni, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla

- Fostaattipuskuroitu suolaliuos, Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5
 - 0,003 M KCl
 - 0,13 M NaCl
 - 0,008 M Na₂HPO₄
 - 0,001 M KH₂PO₄
- Tween® 20, ICN Biomedicals
- Streptavidiniparjuuriperoksidaasi, Streptavidin horseradish peroxidase (SHRP), Dako
- 1,2-fenyleeni-diamiinidihydrokloridi-tabletit (OPD, 2 HCl), OPD-tablets, Dako
- 30 % vetyperoksidi, Merck
- 0,5 M rikkihappo, Riedel-de Haën
- Kahdeksankuoppaisia kuoppalevyliuskoja, F8 Polysorp nunc-immuno module, Nunc
- Kahdeksankuoppaisia, tasapohjaisia kuoppalevyliuskoja entsyymiin yhdistetyn vasta-ainetestin (E.I.A) tai immunoradiometrisen analyysin suorittamiseen, E.I.A., Costar

μ-kaappaus-IgM-ELISAssa käytettiin sekä Nunc polysorp -kuoppalevyliuskoja että Costarin kuoppalevyliuskoja. Kahdeksankuoppaisia liuskoja voitiin laittaa levykehikkoon 12 kappaletta rinnakkain. Kertakäyttöiset polystyreeni-kuoppalevyt päällystettiin kaupallisella, polyklonaalisella, vuohessa tuotetulla ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavalla vasta-aineella, joka laimennettiin 0,05 M karbonaattipuskuriin. Nunc polysorp -kuoppalevyjä käytettäessä laimennussuhde oli 1:500 ja Costarin kuoppalevyjä käytettäessä 1:1200. Liuosta pipetoitiin levyille 100 μl/kaivo ja annettiin olla yön yli huoneenlämmössä, valolta suojattuna. Valmistettiin pesuliuos lisäämällä 1000 ml:aan PBS:ää 0,5 ml Tween 20:tä, liuosta kutsuttiin PBST:ksi. Vasta-aineliuos pestiin pois neljä kertaa PBST:llä. Levyille pipetoitiin 3 % BSA-liuosta 100 μl/kaivo ja inkuboitiin 37 °C:ssa puoli tuntia. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin kerran PBST:llä. Levyjä säilytettiin jääkaapissa kosteudelta ja valolta suojattuna.

Seerumi- ja kontrollinäytteet laimennettiin 1:200 PBST:hen ja pipetoitiin ELISA-levylle, kukin näyte kahteen kaivoon, 100 μl/kaivo. Jokaisessa testissä käytettiin kont-

rolleina negatiivista, akuuttia ja vanhan immuniteetin kontrolliseerumia. Seeruminäytteitä inkuboitiin 60 minuuttia huoneenlämmössä ELISA-levysekoittimella 400 rpm. Seerumit pestiin pois viisi kertaa PBST:llä.

Antigeenina käytettiin biotinyloitua hyönteissoluissa baculoviruksen avulla tuotettua B19-rakenneproteiini-VP2:ta, joka laimennettiin 0,5 % BSA:han. Antigeenilaimennosta pipetoitiin 100 µl/kaivo. Nunc polysorp -kuoppalevyille antigeenia lisättiin 20 ng/kaivo ja Costarin levyille 10 ng/kaivo. Inkuboitiin 45 minuuttia 37 °C:ssa. Antigeeni pestiin pois viisi kertaa PBST:llä.

Streptavidiniparjuuriperoksidaasikonjugaatti laimennettiin 0,5-prosenttiseen BSA:han suhteessa 1:12 000 ja laimennosta pipetoitiin 100 µl/kaivo. Inkuboitiin 45 minuuttia 37 °C:ssa. Konjugaatti pestiin pois viisi kertaa PBST:llä.

OPD-substraattitabletit liuotettiin steriloituun veteen suhteessa yksi tabletti kolmea millilitraa steriiliä vettä kohden. Liuokseen lisättiin 30 % vetyperoksidia 1,25 µl / 3 ml vettä. Substraattilaimennosta lisättiin 100 µl/kaivo. Nunc polysorp -kuoppalevyillä substraattia inkuboitiin 30 min ja Costar-levyillä 15 min 37 °C:ssa. Substraattireaktio pysäytettiin lisäämällä kaivoihin 100 µl 0,5 M rikkihappoa.

Absorbanssit mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 492 nm. ELISA-levyt mitattiin päällystämätöntä kuoppalevyliuskaa vastaan, jolle oli pipetoitu 100 µl substraattia ja 100 µl rikkihappoa.

10.3 IgG-ELISA

Reagenssit ja materiaalit

- B19-rakenneproteiini-VP2-antigeeni, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla
- Ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava, kanissa tuotettu polykloonaalinen vasta-aine, joka on yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymiin (HRP), Polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP, Dako Cytomation
- Taustaa vähentävä pesuaine, Diluent, Loy-factor-X, Ani Labsystems
- Fostaattipuskuroitu suolaliuos, Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5
 - 0,003 M KCl
 - 0,13 M NaCl
 - 0,008 M Na₂HPO₄
 - 0,001 M KH₂PO₄
- Tween 20, ICN Biomedicals
- 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-tabletit (OPD, 2 HCl), OPD-tablets, Dako
- 30 % vetyperoksidi, Merck
- Steriili vesi
- 0,5 M rikkihappo, Riedel-de Haën
- Streptavidiinilla päällystettyjä kahdeksankuoppaisia kuoppalevyliuskoja, Bio-Bind Assembly Strips 1x8 Streptavidin Coated, Thermo Scientific

IgG-ELISA:ssa käytettiin streptavidiinipäällysteisiä kuoppalevyjä. Kuoppalevyille pipetoitiin PBST:hen laimennettua biotinyloitua VP2-antigeenilaimennosta 100 µl/kaivo. Antigeenipitoisuus oli 40 ng/kaivo tai 33,33 ng/kaivo, riippuen puhdistetusta, biotinyloidusta antigeenierästä. IgG-levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä ELISA-levysekoittimella 400 rpm, 60 min, jonka jälkeen levyt pestiin kolme kertaa 10 min ajan taustaa vähentävällä pesuaineella.

Levyille lisättiin 1:200 PBST:hen laimennetut seerumi- ja kontrollinäytteet. Jokaista näytettä pipetoitiin 100 µl kahteen kaivoon. Testissä käytettiin kontrollinäytteinä negatiivista, akuuttia ja vanhan immuniteetin kontrolliseerumia. Levyjä inkuboitiin huoneen-

lämmössä 60 minuuttia, 400 rpm. Levyt pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan PBST:llä.

Kanissa tuotettua polyklonaalista, ihmisen IgG:n vakiollisen osan tunnistavaa vastaainetta, johon oli liitetty piparjuuriperoksidaasientsyymi, laimennettiin Loy-factor-X:ään suhteessa 1:2 000. Liuosta pipetoitiin levyille 100 µl/kaivo. Levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä 60 minuuttia, 400 rpm, jonka jälkeen levyt pestiin neljä kertaa viiden minuutin ajan PBST:llä.

OPD-substraattitabletit liuotettiin steriloituun veteen suhteessa yksi tabletti kolmea millilitraa steriiliä vettä kohden. Liuokseen lisättiin 30 % vetyperoksidia 1,25 µl / 3 ml vettä. Substraattilaimennosta lisättiin 100 µl/kaivo ja inkuboitiin 10 min huoneenlämmössä. Substraattireaktio pysäytettiin lisäämällä kaivoihin 100 µl 0,5 M rikkihappoa.

Absorbanssit mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 492 nm. ELISA-levyt mitattiin päällystämätöntä kahdeksankuoppaista kuoppalevyliuskaa vastaan, jolle oli pipetoitu 100 µl substraattia ja 100 µl rikkihappoa.

10.4 Epitooppityyppispesifinen IgG-ELISA (ETS-ELISA)

Reagenssit ja materiaalit

- B19-rakenneproteiini-VP2-antigeeni, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla
- B19-rakenneproteiini-VP2:n 24-aminohappoinen lineaarinen peptidisekvenssi, KYVTGIN-peptidi, New England Peptide
- B19-rakenneproteiini-VP2:n KYVTGIN-peptidisekvenssi nelihaaraisena, New England Peptide
- Taustaa vähentävä pesuaine, Diluent, Loy-factor-X, Ani Labsystems

- Fostaattipuskuroitu suolaliuos, Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5
 - 0,003 M KCl
 - 0,13 M NaCl
 - 0,008 M Na₂HPO₄
 - 0,001 M KH₂PO₄
- Tween 20, ICN Biomedicals
- Ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava, kanissa tuotettu polykloonaalinen vasta-aine, joka on yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymiin (HRP), Polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP, Dako Cytomation
- 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-tabletit (OPD, 2 HCl), OPD-tablets, Dako
- 30 % vetyperoksidi, Merck
- Steriili vesi
- 0,5 M rikkihappo, Riedel-de Haën
- Streptavidiinilla päällystettyjä kahdeksankuoppaisia kuoppalevyliuskoja, Bio-Bind Assembly Strips 1x8 Streptavidin Coated, Thermo Scientific

ETS-ELISAt suoritettiin samalla tavalla kuin IgG-ELISA, vain antigeeneissa ja niiden pitoisuuksissa oli eroa. B19-rakenneproteiini-VP2-antigeenia lisättiin 40 ng/kaivo tai 33,33 ng/kaivo, riippuen puhdistetusta, biotinyloidusta antigeenierästä. Lineaarista KYVTGIN-peptidiä (ETS1) ja nelihaaraista KYVTGIN-peptidiä (ETS4) lisättiin 16 ng/kaivo.

Absorbanssit mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 492 nm kuten IgG-ELISAssa. ETS-suhteet laskettiin kullekin näytteelle jakamalla konformaationaalisien epitoopin eli VP2-kapsidin absorbanssitulos lineaarisen epitoopin eli lineaarisen KYVTGIN-peptidin tai nelihaaraisen KYVTGIN-peptidin absorbanssilla. Tämä tehtiin käyttäen Microsoft Excel-ohjelmaa.

10.5 IgG-aviditeetti-ELISA

Reagenssit ja materiaalit

- B19-rakenneproteiini-VP1:n uniikkialue yhdistettynä GST-proteiiniin (glutatio-ni-S-transferaasi), VP1u-GST, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla
- B19-rakenneproteiini-VP1 yhdistettynä β -galaktosidaasiin, β VP1, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla
- Taustaa vähentävä pesuliuos, Diluent, LOY-factor X, Ani Labsystems
- Fostaattipuskuroitu suolaliuos, Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5
 - 0,003 M KCl
 - 0,13 M NaCl
 - 0,008 M Na₂HPO₄
 - 0,001 M KH₂PO₄
- Tween 20, ICN Biomedicals
- 8 M urea
- Ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava kanissa tuotettu polyklo-naalinen vasta-aine, johon on yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymi, Poly-clonal rabbit anti-human IgG/HRP, Dako Cytomation
- 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-tabletit (OPD, 2 HCl), OPD-tablets, Dako
- 30 % vetyperoksidi, Merck
- Steriili vesi
- 0,5 M rikkihappo, Riedel-de Haën
- Kahdeksankuoppaisia kuoppalevyliuskoja, F8 Polysorp Nunc-immuno Module, Nunc

Nunc polysorp -kuoppalevyt päällystettiin 1:110 laimennetulla β VP1-antigeenilla tai 1:3 000 laimennetulla VP1u-GST-antigeenilla. Antigeenien tarkkaa pitoisuutta (ng/kaivo) ei ollut mitattu, vaan antigeenin laimennussuhde oli optimoitu testiin sopivaksi kokeelli-sesti. Antigeenilaimennosta pipetoitiin 100 μ l/kaivo, ja levyjä inkuboitiin yön yli huo-neenlämmössä. Levyt pestiin seuraavana päivänä 2x5 min 8 M urealla, 4x10 min PBST:llä ja minuutin ajan steriloidulla vedellä. Levyjen annettiin kuivua 30 minuuttia

huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne peitettiin muoveilla ja laitettiin säilytystä varten -20 °C:seen.

Päällystettyjen ELISA-levyjen annettiin sulaa huoneenlämmössä, jonka jälkeen levyt pestiin 3x10 minuutin ajan taustaa vähentävällä pesuliuksella, LOY-factor-X:llä. Akuutin infektion kontrolliseerumista, vanhan immuniteetin kontrolliseerumista sekä seeruminäytteistä tehtiin laimennussarjat suhteessa 1:12,5, 1:50, 1:200, 1:800, 1:3200 PBST:hen. Seeruminäytteet pipetoitiin kuoppalevyille taulukon 1 mukaisessa järjestyksessä niin, että yhdelle kuoppalevyliuskalle pipetoitiin aina yhden potilaan seeruminäytteestä tehdyt laimennukset. Seerumeita inkuboitiin 60 minuuttia 37 °C:ssa.

Taulukko 1. Seerumilaimennosten pipetointi 8-kuoppaiselle kuoppalevyille.

A	1:50	} Seerumi pestiin pois PBST:llä
B	1:200	
C	1:800	
D	1:3200	
E	1:12,5	} Seerumi pestiin pois 8 M UREAlla
F	1:50	
G	1:200	
H	1:800	

Kunkin kuoppalevyliuskan neljä ylintä kaivoa pestiin 3x5 minuuttia PBST:llä ja neljä alinta 3x5 minuuttia 8 M urealla (taulukko 1). Levyille pipetoitiin 100 µl/kaivo kanissa tuotettua, ihmisen IgG:n vakiollisen osan tunnistavaa polyklonaalista vasta-ainetta, johon oli yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymi, laimennettuna LOY-factor X:ään suhteessa 1:2 000. Levyjä inkuboitiin 60 minuuttia 37 °C:ssa.

Levyt pestiin 4x5 minuuttia PBST:llä. Substraattina käytettiin OPD-tabletteja, jotka liuotettiin steriloihuun veteen, yksi tabletti kolmea millilitraa vettä kohden. Liuokseen lisättiin 30 % vetyperoksidia 1,25 µl / 3 ml vettä. Substraattilaimennosta lisättiin 100 µl/kaivo ja inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä. Substraattireaktio pysäytettiin lisäämällä kaivoihin 100 µl 0,5 M rikkihappoa.

Absorbanssit mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 492 nm. ELISA-levyt ajettiin päällystämätöntä kuoppalevyliuskaa vasten, jolle oli pipetoitu 100 µl substraattia ja 100 µl rikkihappoa. Aviditeetti-indeksit laskettiin Avidity 1.2-ohjelmalla.

10.6 Biotrin IgM-ELISA

Reagenssit ja materiaalit

- Parvovirus B19 -IgM-vasta-ainetestin reagenssipakkaus, Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay, Biotrin
- Steriili vesi

B19-IgM-vasta-ainetestin reagenssipakkaus sisälsi yhden kuoppalevyn, jossa on 12 kappaletta kahdeksan kuopan liuskoja. Kuoppalevy oli päällystetty kanissa tuotetulla ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavalla vasta-aineella. Testi suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan. Reagenssipakkauksen mukana tulleet kontrollit pipetoitiin kukin kahteen kuoppaan, mutta kukin näyte pipetoitiin vain yhteen kuoppaan. Substraattina käytettiin reagenssipakkauksen mukana tullutta tetrametyylibentsidiinia (tetramethylbenzidine, TMB). ELISA-levyt mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 450 nm.

10.7 IgG-ELISA, antigeenina B19 rakenneproteiini VP1 yhdistettynä β -galaktosidaasiin (β VP1-IgG-ELISA)

Reagenssit

- B19-rakenneproteiini-VP1 yhdistettynä β -galaktosidaasiin, β VP1, tuotettu Haartman-instituutin virologian osastolla
- Taustaa vähentävä pesuliuos, Diluent, LOY-factor X, Ani Labsystems
- Fostaattipuskuroitu suolaliuos, Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,5
 - 0,003 M KCl
 - 0,13 M NaCl
 - 0,008 M Na₂HPO₄
 - 0,001 M KH₂PO₄
- Tween 20, ICN Biomedicals
- Ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava kanissa tuotettu polykloonaalinen vasta-aine, johon on yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymi, Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP, Dako Cytomation
- 1,2-fenyleenidiamiinidihydrokloridi-tabletit (OPD, 2 HCl), OPD-tablets, Dako
- 30 % vetyperoksidi, Merck
- Steriili vesi
- 0,5 M rikkihappo
- Kahdeksankuoppaisia kuoppalevyliuskoja, F8 Polysorp Nunc-immuno Module, Nunc

ELISA-levyt päällystettiin kuten aviditeetti-IgG-ELISAssa. Antigeenina käytettiin B19-rakenneproteiini-VP1:tä yhdistettynä β -galaktosidaasiin.

Päällystettyjen levyjen annettiin sulaa huoneenlämmössä, jonka jälkeen levyt pestiin 3x10 minuuttia LOY-factor-X:llä. Seerumi- ja kontrollinäytteet laimennettiin 1:100 PBST:hen. Kontrollinäytteet pipetoitiin levyille kahteen kuoppaan, seeruminäytteet vain yhteen kuoppaan, 100 μ l/kaivo. Jokaisessa testissä käytettiin kontrollinäytteinä negatiivista, akuuttia ja vanhan immuniteetin kontrolliseerumia. Seerumeita inkuboitiin 60 minuuttia 37 °C.

Levyt pestiin 3x5 minuuttia PBST:llä. Levyille pipetoitiin kanissa tuotettua, ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavaa polyklonaalista vasta-ainetta, johon oli yhdistetty piparjuuriperoksidaasientsyymi, laimennettuna LOY-factor X:ään suhteessa 1:2 000. Levyjä inkuboitiin 60 minuuttia 37 °C:ssa.

Levyt pestiin 4x5 minuuttia PBST:llä. Substraatin lisäys suoritettiin kuten IgG-aviditeetti-ELISAssa. Absorbanssit mitattiin Multiskan®-EX-spektrofotometrillä, aallonpituudella 492 nm. ELISA-levyt mitattiin päällystämätöntä kahdeksankuoppaista kuoppalevyliuskaa vastaan, jolle oli pipetoitu 100 µl substraattia ja 100 µl rikkihappoa.

11 Tulokset

11.1 Menetelmien optimointi

11.1.1 Absorbanssitason vaihtelu IgM-ELISA-testissä Nunc polysorp -kuoppalevyllä

IgM-vasta-ainetestaukset aloitettiin käyttämällä μ -kaappaus-IgM-ELISAssa kuoppalevynä kaupallisia Nunc polysorp -kuoppalevyjä. Pian havaittiin kuitenkin huomattavaa vaihtelua eri näytesarjojen absorbanssitasoissa. Testaamalla IgM-ELISA-testin eri parametreja havaittiin, että absorbanssitaso vaihteli huomattavasti kuoppalevyn tuotantoerästä riippuen. Taulukossa 2 on esitetty eri tuotantoerien antamia absorbanssituloksia kontrollinäytteille. Erät 101056, 084726 ja 092289 tutkittiin rinnakkain kaksi kertaa.

Taulukko 2. *IgM-ELISA, Nunc polysorp -kuoppalevyn kolmen tuotantoerän vertailu.*

Tuotantoerän numero	101056		084726		092289	
Negatiivinen kontrolli	0,062	0,014	0,143	0,127	0,018	0,018
Positiivinen kontrolli 1	0,741	0,599	2,085	2,300	0,588	0,612
Positiivinen kontrolli 2	0,408	0,498	1,406	1,558	0,478	0,406
Matala positiivinen kontrolli	-	0,075	-	0,561	-	0,063
Vanhan immuniteetin kontrolli	0,066	0,024	0,123	0,132	0,023	0,026

Tuloksista havaitaan, että kauttaaltaan korkeimpaa absorbanssitasoa antoi tuotantoerä 084726, matalimpaa tasoa antoi 092289 ja tuotantoerän 101056 absorbanssitaso oli edellisten välissä. Vain tuotantoerä 084726 antoi tarpeeksi korkeat absorbanssit positiivisille kontrolleille. Toisaalta samainen erä antoi liian korkeat absorbanssit negatiivisille kontrolleille, jolloin väärää positiivisia tuloksia olisi saattanut ilmetä. Todettiin, että Nunc polysorp -kuoppalevyjen eri tuotantoerät aiheuttavat niin suurta vaihtelua absorbanssitasossa, että IgM-ELISA olisi pitänyt optimoida erikseen jokaiselle tuotantoerälle. Tämän takia päätettiin vaihtaa kuoppalevyjen valmistajaa. Päätettiin kokeilla Costarin muovilevyä, koska se oli toiminut hyvin toisen tutkimusryhmän ELISAssa.

11.1.2 IgM-ELISAn optimointi Costar-kuoppalevyille

IgM-ELISA sovitettiin Costar-kuoppalevyille optimoimalla sopiva VP2-antigeenipitoisuus ja levyjen päällystyksessä käytetyn ihmisen IgM:n vakiollisen osan tunnistavan vasta-aineen pitoisuus. Optimoinnin tulokset on esitetty liitteessä 1.

Paras absorbanssitaso saavutettiin antigeenipitoisuudella 10 ng/kaivo. Paras levyjen päällystyksessä käytetyn ihmisen IgM:n vakiollisen osan tunnistavan vasta-aineen pitoisuus olisi ollut arvojen 1:1350 ja 1:1125 välillä. Yksinkertaisuuden vuoksi päädyttiin päällystysvasta-aineen laimennussuhteeseen 1:1200. Costar-kuoppalevyllä VP2-antigeenin määrä voitiin pudottaa puoleen ja päällystyksessä käytetyn primäärisen vasta-aineen määrä alle puoleen Nunc-polysorp –kuoppalevyllä käytetystä määrästä.

Lisäksi tutkittiin, onko Costar-kuoppalevyjen tuotantoerissä eroja. Verrattiin rinnakkain kahta Costarin tuotantoerää, 11404008 ja 5306003, käyttäen 12 eri kontrollinäytettä. Samalla kerralla tutkittiin, kuinka pitkään streptavidiiniparjuuriperoksidaasia (SHRP) ja substraattia tulisi inkuboida kuoppalevyillä. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. *IgM-ELISAn optimointi Costar-kuoppalevyille.*

	Tuotantoerä			
	Substraatti 15 min		Substraatti 20 min	
Näytteet	lot 11404008	lot 5306003	lot 11404008	lot 5306003
negatiivinen kontrolli	0,155	0,044	0,122	0,077
positiivinen kontrolli	1,225	1,309	1,517	1,332
vanhan immunitetin kontrolli	0,063	0,047	0,078	0,06
1 pv sairastumisesta -kontrolli	1,044	1,042	1,249	1,246
6 pv sairastumisesta -kontrolli	1,354	1,361	1,781	1,625
46 pv sairastumisesta -kontrolli	0,351	0,343	0,422	0,402
85 pv sairastumisesta -kontrolli	0,306	0,302	0,362	0,351
126 pv sairastumisesta -kontrolli	0,099	0,086	0,119	0,106
kontrolli 1	1,311	1,374	1,592	1,62
kontrolli 2	0,133	0,11	0,158	0,141
kontrolli 3	0,081	0,077	0,09	0,086
kontrolli 4	0,691	0,767	0,817	0,899

SHRP
30 min

	Tuotantoerä			
	Substraatti 15 min		Substraatti 20 min	
Näytteet	lot 11404008	lot 5306003	lot 11404008	lot 5306003
negatiivinen kontrolli	0,097	0,122	0,169	0,175
positiivinen kontrolli	1,363	1,156	1,474	1,501
vanhan immunitetin kontrolli	0,058	0,054	0,071	0,07
1 pv sairastumisesta -kontrolli	1,117	1,028	1,239	1,237
6 pv sairastumisesta -kontrolli	1,507	1,449	1,613	1,701
46 pv sairastumisesta -kontrolli	0,359	0,285	0,401	0,414
85 pv sairastumisesta -kontrolli	0,317	0,355	0,354	0,189
126 pv sairastumisesta -kontrolli	0,109	0,091	0,115	0,107
kontrolli 1	1,454	1,372	1,608	1,644
kontrolli 2	0,139	0,112	0,157	0,143
kontrolli 3	0,076	0,071	0,083	0,087
kontrolli 4	0,752	0,778	0,811	0,904

SHRP
45 min

Tulosten perusteella Costar-kuoppalevyissä ei havaittu huomattavaa tuotantoeristä johdettavaa herkkyysvaihtelua. Tuloksissa ei havaittu merkittävää muutosta streptavidinipi-parjuuriperoksidaasi-inkubointiaikaa muutettaessa. Inkubointiaika päätettiin pitää 45 minuutissa. Sen sijaan 15 minuutin substraatti-inkubointiaika vaikutti selkeästi paremmalta, kuin 20 minuutin inkubointiaika, sillä inkubointiaikaa pidennettäessä negatiiviset näytteet nousivat lähes positiivisen tuloksen rajalle (taulukko 3).

Varsinaista tutkimusta päätettiin jatkaa käyttäen Costar-kuoppalevyjä. Taulukossa 4 on esitetty IgM-ELISA-testin parametrit, joihin päädyttiin optimoitaessa kyseinen ELISA-testi Costar-kuoppalevyille.

Taulukko 4. *IgM-ELISA-testin parametrit käytettäessä Costar-kuoppalevyä.*

Parametri	Optimoinnin tulos
VP2-antigeeni	10 ng/kaivo
Päällystysvasta-aineen laimennussuhde	1:1200
SHRP:n inkubointiaika	45 min
Substraatin inkubointiaika	15 min

11.1.3 Biotinyloidun VP2-antigeenierän optimointi IgM- ja IgG-ELISA-testiin

Vanhan antigeenierän loppuessa uusi antigeenierä optimoitiin sekä IgM- että IgG-ELISA-testiin sopivaksi. Optimointi tapahtui laimentamalla antigeenia eri suhteissa ja testaamalla ELISAn toiminta tietyillä, useasti testatuilla kontrollinäytteillä.

Optimoinnin tulokset on esitetty taulukossa 5. Paras absorbanssitaso saavutettiin antigeenipitoisuudella 10 ng/kaivo. Tällöin negatiivinen kontrolli ja vanhan immuniteetin kontrolli antoivat tarpeeksi matalan tuloksen, ja positiivinen kontrolli puolestaan antoi tarpeeksi korkean absorbanssin.

Taulukko 5. Biotinyloidun VP2-antigeenierän optimointi IgM-ELISA-testiin.

Näytteet	VP2-antigeenin pitoisuus (ng/kaivo)		
	20	10	7,5
negatiivinen kontrolli	0,083	0,049	0,036
positiivinen kontrolli	2,725	1,844	1,416
vanhan immuniteetin kontrolli	0,075	0,046	0,038
1 pv sairastumisesta -kontrolli	2,293	1,538	1,252
1 pv sairastumisesta -kontrolli 2	3,376	2,099	1,559
6 pv sairastumisesta -kontrolli	3,081	2,289	1,795
19 pv sairastumisesta -kontrolli	3,119	2,011	1,745
46 pv sairastumisesta -kontrolli	1,128	0,748	0,717
85 pv sairastumisesta -kontrolli	0,585	0,320	0,340
117 pv sairastumisesta -kontrolli	0,130	0,082	0,065
126 pv sairastumisesta -kontrolli	0,161	0,102	0,067
kontrolli 1	2,995	2,012	1,584
kontrolli 2	0,151	0,096	0,089
kontrolli 3	0,136	0,084	0,074
kontrolli 4	1,166	0,910	0,801
kontrolli 5	0,134	0,073	0,052

Antigeenin optimointi tehtiin vastaavalla tavalla IgG-ELISAlle. Uutta antigeenierää käytettäessä paras absorbanssitaso IgG-ELISAssa saavutettiin antigeenimäärällä 33 ng/kaivo.

11.1.4 ETS-ELISAssa käytettyjen antigeenien vertailu

ETS-ELISAssa käytettiin kahta eri antigeenia, lineaarista KYVTGIN-peptidiä (ETS1) ja nelihaaraista KYVTGIN-peptidiä (ETS4), joista ensimmäistä käytettiin varmistustestinä ja jälkimmäistä päätestinä. Työssä haluttiin verrata, onko antigeenien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa. Vertailuun otettiin mukaan 156 sattumanvaraisesti valittua napa-verinäytettä, joille oli tehty ETS-ELISA käyttäen sekä lineaarista KYVTGIN-peptidiä että nelihaaraista KYVTGIN-peptidiä. ETS-ELISAt oli suoritettu keskenään samalla tavalla, vain antigeeni oli erilainen.

Peptidiantigeenien eroa vertailtiin selvittämällä, onko niiden antamalla absorbansseilla keskenään tilastollisesti merkitsevä ero. Vertailu suoritettiin käyttäen Microsoft Excel – ohjelman regressiotyökalua. Regressiotyökalu edellyttää, että x-muuttuja olisi virheetön eikä siis mittaussuure kuten tässä tarkastelussa. Aineisto oli kuitenkin niin suuri (156

näytettä), että virhe arvioitiin käytännön kannalta merkityksettömäksi. X-akselille päätettiin kuitenkin valita pienempää hajontaa antava peptidiantigeeni.

Peptidiantigeenien hajonnat selvitettiin ryhmittelemällä kumpikin antigeeni vuorollaan absorbanssien mukaiseen suuruusjärjestykseen ja laskemalla toisen antigeenin absorbanssien keskihajonnat kaikissa niissä tapauksissa, jossa toisella oli vakioarvo. Keskihajonnoista laskettiin vielä painotetut neliölliset keskiarvot. Keskihajontojen painotettu neliöllinen keskiarvo oli lineaarisella KYVTGIN-peptidillä 0,0358 ja nelihaarisella KYVTGIN-peptidillä 0,0366. Toistettavuus oli siis yhtä hyvä kumpaakin antigeenia käytettäessä. Vaikka ero antigeenien antamien arvojen välillä olikin hyvin pieni, päätettiin pienemmän hajonnan omaava lineaarinen KYVTGIN-peptidi valita x-akselille.

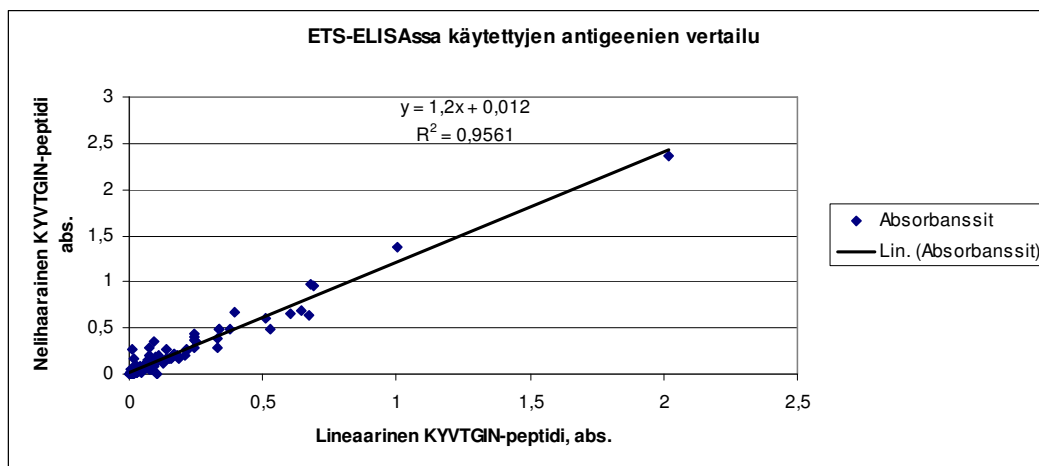
Regressioanalyysi suoritettiin ja sen tulokset on esitetty taulukossa 6. Tulosten perusteella peptidiantigeeneilla oli tilastollisesti merkitsevä systemaattinen ero. Nelihääräinen KYVTGIN-peptidi antoi hieman eli keskimäärin n. 20 % ($y = 0,012 + 1,2x$) suurempia absorbansseja kuin lineaarinen KYVTGIN-peptidi. Muuttujien välinen korrelaatio oli erittäin hyvä, 95,6 % (kuva 10). Vaikka ero antigeenien välillä on tilastollisesti merkitsevä, ei sillä todennäköisesti ole käytännön merkitystä.

Taulukko 6. Regressioanalyysi, jossa vertailtu ETS-ELISassa käytettyjen antigeenien, lineaarisen KYVTGIN-peptidin ja nelihääräisen KYVTGIN-peptidin, absorbanssien eroa.

<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroin R	0,978
Korrelaatiokerroin	0,956
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,956
Keskivirhe	0,057
Havainnot	156

ANOVA					
	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	10,890	10,890	3 350	0,000
Jäännös	154	0,501	0,003		
Yhteensä	155	11,391			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>	<i>Alin 95%</i>	<i>Ylin 95%</i>
Leikkauspiste	0,012	0,005	2,339	0,021	0,002	0,022
KYVTGIN-abs.	1,200	0,021	57,882	0,000	1,159	1,241



Kuva 10. ETS-ELISassa käytettyjen antigeenien, lineaarisen KYVTGIN-peptidin ja nelihaaraisen KYVTGIN-peptidin, korrelaatio-suora.

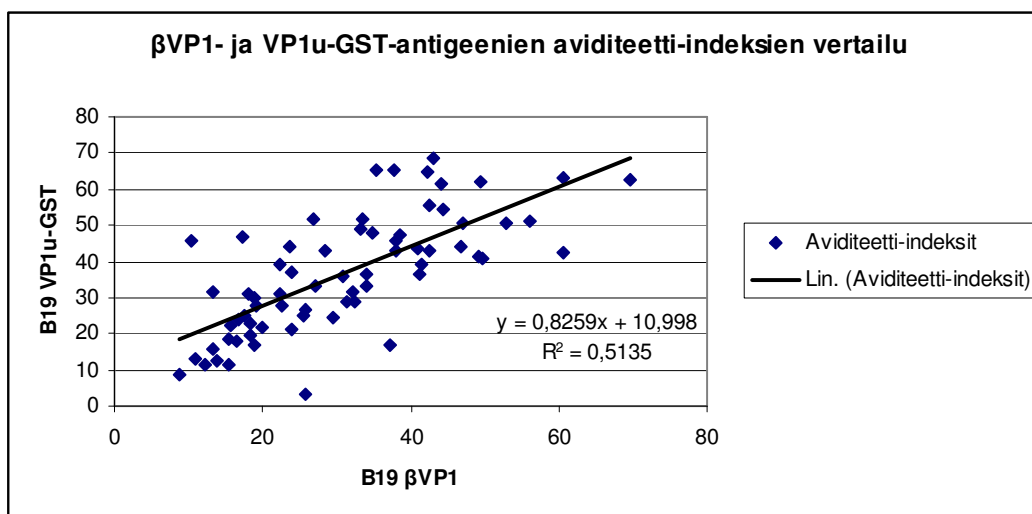
11.1.5 IgG-aviditeetti-ELISassa käytettyjen antigeenien vertailu

Kaikissa aviditeetti-ELISA-testeissä käytettiin antigeenina β VP1:tä. Mielenkiinnosta haluttiin tutkia, minkälaisia tuloksia antaisi toinen antigeeni, B19-rakenneproteiini-VP1:n uniikkialue yhdistettynä GST-proteiiniin (VP1u-GST). Sattumanvaraisesti valittu osa akuuttiin infektiioon viitanneista alkuraskauden näytteistä ($n = 68$) tutkittiin rinnakkain aviditeetti-ELISalla käyttäen antigeeneina β VP1:stä ja VP1u-GST:tä. Aviditeetti-ELISAt suoritettiin samalla tavalla kumpaakin antigeenia käytettäessä.

Antigeenejä vertailtiin tutkimalla niiden antamien aviditeetti-indeksien suuruuseroa ja hajontaa Microsoft Excel –ohjelman parittaisella kahden otoksen t-testillä. Saadut tulokset on esitetty taulukossa 7. Tulosten perusteella antigeeneillä on tilastollisesti merkitsevä ero. P-arvoksi saatiin 0,00014, joka on erittäin merkitsevä 0,05:n merkitsevyystasolla. Antigeenien antamien aviditeetti-indeksien välinen korrelaatio oli kuvan 11 perusteella 51,3 %. VP1u-GST-antigeeni antoi matalilla arvoilla selvästi suurempia aviditeetti-indeksejä kuin β VP1-antigeeni, jolle nimenomainen testi on sovitettu. Juuri matalat aviditeetti-indeksit ovat merkki akuutista infektiosta. Näin ollen VP1u-GST-antigeeni ei sovellu hyvin tähän testiin ainakaan ilman optimointia. VP1u-GST-antigeenin hajonta oli lisäksi suurempi kuin β VP1-antigeenin. Antigeeneillä on eroa, jolla on todennäköisesti myös käytännön merkitystä.

Taulukko 7. Parittainen kahden otoksen t-testi, jossa vertailtu VP1u-GST- ja β VP1-antigeenien antamia aviditeetti-indeksejä.

	B19 VP1u-GST	B19 β VP1
Keskiarvo	36,5	30,9
Varianssi	257,9	194,2
Havainnot	68	68
Pearsonin korrelaatio	0,72	
Arvioitu keskiarvojen ero va	-	67
t Tunnusluvut	4,04	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,00	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,67	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,00014	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,00	



Kuva 11. Aviditeetti-ELISassa käytettyjen antigeenien, β VP1 ja VP1u-GST, antamien aviditeetti-indeksien korrelaatio-suora.

11.1.6 IgM-, IgG- ja ETS-ELISA-testien antamien absorbanssien hajonta

Tutkittiin μ -kaappaus-IgM-, IgG- ja ETS4-ELISA-testien antamien absorbanssitulosten hajontaa. Alkuraskauden näytteet, joita vastaavissa napaverinäytteissä havaittiin vastaaineita B19V:n rakenneproteiini-VP2:ta kohtaan (169 kpl), tutkittiin rinnakkain napaverinäytteiden kanssa päätesteillä. Näin ollen kyseiset alkuraskauden näytteet oli tutkittu kahteen kertaan IgM-, IgG- ja ETS4-ELISA-testeillä. Testien antamien absorbanssien hajontaa havainnollistettiin piirtämällä kuvat kaikista ELISA-testeistä (kuvat 1, 2 ja 3, liite 2). Kussakin tapauksessa x-akselilla on otettu logaritmi kunkin näytteen kahdella

eri mittauskerralla antamien absorbanssien keskiarvosta ja y-akselilla on logaritmi näytteen absorbanssien erotuksesta. Kaikista kuvista voidaan havaita selvä korreloiva riippuvuus, jonka mukaan suuremmilla absorbanssiarvoilla hajonta on selkeästi suurempaa kuin pienemmillä absorbanssiarvoilla. Tulos oli odotettu. Vaikka ELISA-testit ovat kvantitatiivisia, ei niiden perusteella voida tarkasti arvioida vasta-aineiden määrää korkeiden absorbanssiarvojen suuren hajonnan takia.

11.2 Alkuraskauden näytteiden tutkiminen IgM-, IgG- ja ETS-ELISA-testeillä

Työ aloitettiin tutkimalla 4 237:ää alkuraskauden näytettä. Näytteille tehtiin aluksi ns. päätestit eli IgM-ELISA, IgG-ELISA ja ETS4-ELISA. ELISA-testien arvojen tulkinta on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. *Vasta-ainetestien arvojen tulkinta.*

	Akuutti	Raja-arvo	Vanha immuniteetti	Ei vasta-aineita
IgM-ELISA (abs.)	> 0,220	0,171 - 0,220	-	< 0,171
IgG-ELISA (abs.)*	-	-	≥ 0,198	< 0,198
ETS-ELISA (suhde)	< 10	10 - 20	> 20	-
IgG-avid-ELISA (%)	≤ 15	16 - 25	> 25	-

*Yhden näytteen absoranssiarvo ei kerro infektion ajankohtaa, mutta esim. kahden viikon välein otettujen näytteiden absorbanssien nelinkertainen nousu viittaa tuoreeseen infektiin kun taas samankaltaiset absorbanssiarvot viittaavat vanhaan immuniteettiin.

Taulukossa 9 on esitetty kunkin ELISA-testin tulokset alkuraskauden näytteille.

Taulukko 9. *Alkuraskauden näytteiden (4 237 kpl) tulokset ELISA-testeittäin.*

Testi	Testitulokset	Kappalemäärä	Osuus näytteistä (%)
IgM-ELISA	positiivinen	77	1,8
	raja-arvo	156	3,7
	negatiivinen	4004	94,5
IgG-ELISA	positiivinen	2408	56,8
	negatiivinen	1829	43,2
ETS4-ELISA*	akuutti	45	1,1
	raja-arvo	65	1,5
	vanha immuniteetti	4127	97,4

*ETS-ELISAssa antigeenina neliahaarainen KYVTGIN-peptidi.

Alkuraskauden näytteitä, jotka antoivat ns. päätestien perusteella seronegatiivisen tuloksen tai jotka viittasivat akuuttiin infektiin, oli yhteensä 1 971 kappaletta. Nämä näytteet olivat mielenkiintoisia mahdollisen serokonversion sekä alkuraskauden akuutin infektiin takia, joten niille etsittiin vastaavat napaverinäytteet. Vastaavaa napaverinäytettä ei sen sijaan tutkittu vanhan immuniteettituloksen antavista alkuraskauden näytteistä, koska B19 infektiin immuunivaste on elinikäinen.

Seronegatiivisia ja akuutilta vaikuttavia alkuraskauden näytteitä oli yhteensä 1 971 kappaletta, mutta vain 1 022:lle eli 51,9 %:lle löydettiin vastaava napaverinäyte. Tämä johtui siitä, että napaverinäytteitä ei ollut säilytetty tutkimuksen ajankohtaan asti, näytteitä ei ollut enää jäljellä, äiti oli synnyttänyt toisessa maassa tai sikiö oli saattanut kuolla ennen syntymää. Jatkotutkimuksiin päätyneet napaverinäytteet yhdistettiin koodinumeroilla vastaaviin alkuraskauden näytteisiin.

11.3 Napaverinäytteiden tutkiminen

11.3.1 Napaverinäytteiden tutkiminen IgG-ELISA-testillä

Napaverinäytteille tehtiin aluksi vain B19V-IgG-ELISA, jolla tarkastettiin, onko napaverinäytteissä IgG-vasta-aineita parvorokkovirusta vastaan. Jos IgG-vasta-aineita ilmeni, valittiin näytteet jatkotutkimuksiin rinnan alkuraskauden näytteen kanssa. Tutkimuksessa IgG:n absorbanssirajaksi oli asetettu 0,198 (Kaikkonen ym. 1999), mutta tässä kohdassa absorbanssirajaa laskettiin arvoon 0,100, jotta varmasti kaikki serokonvertoituneet näytteet saatiin mukaan. Kaikkiaan IgG-positiivisia napaveriä havaittiin 169 kappaletta (taulukko 10).

Taulukko 10. *Napaverinäytteiden IgG-ELISA-testin tulokset.*

	Kappalemäärä	Osuus tutkituista napaverinäytteistä (%)
IgG-abs. \geq 100	169	16,5
IgG-abs. < 100	853	83,5

11.3.2 B19V-IgG-positiivisten napaverinäytteiden tutkiminen rinnan alkuraskauden näytteen kanssa

IgG-ELISAn absorbanssirajan 0,100 ylittäneille 169 napaverinäytteille tehtiin ns. päätestit eli IgM-, IgG- ja ETS4-ELISA. Napaverinäytteet tutkittiin rinnan vastaavan alkuraskauden näytteen kanssa, jotta voitiin olla varmoja, että tulokset ovat varmasti keskenään vertailukelpoisia. Kaikille 169 napaverinäytteelle tehtiin lisäksi ETS1-ELISA, jotta lopullisen testituloksen luotettavuutta voitiin varmentaa.

Työssä tutkittiin 1 022 napaverinäytettä. Kuitenkin vain 949 napaverinäytettä vastasi seronegatiivista alkuraskauden näytettä. Tämä johtui siitä, että napaverinäyte tutkittiin kaikilta akuuttiin infektiioon viitaneilta alkuraskauden näytteiltä, joista osa havaittiin myöhemmin varmistustesteillä vanhaksi immuniteetiksi.

Tulosten perusteella varmoja raskaudenaikaisia infektiota eli vasta-aineiden serokonversioita alkuraskauden ja napaverinäytteen välillä havaittiin 44 näyteparissa. Näissä kaikissa alkuraskauden näyte oli negatiivinen ja loppuraskauden näyte akuutti tai vanhaan immuniteettiin viittaava. Seronegatiivisten äitien raskaudenaikainen serokonversio prosentti oli 4,6 % (44/949).

11.4 Akuuttiin infektiin viitannet näytteet

11.4.1 Akuuttiin infektiin viitannet näytteiden tutkiminen

Kaikki mahdolliseen akuuttiin infektiin viitannet alkuraskauden näytteet sekä napaverinäytteet tutkittiin ns. varmistustesteillä. Näytteille tehtiin aluksi ETS1-ELISA. Tämän jälkeen näytteille tehtiin β VP1-IgG-ELISA ja aviditeetti-ELISA. β VP1-IgG-ELISA tehtiin resurssiensäästösyistä, sillä aviditeetti-ELISAssa kunkin näytteen tutkimiseen tarvittiin kahdeksan kuoppalevykuoppaa, jotta aviditeetti-indeksi voitiin laskea. β VP1-IgG-ELISAlla tutkittiin jokainen näyte vain yhdellä kuoppalevykuopalla. Tällöin nähtiin, sisältääkö tutkittava näyte vasta-aineita myös B19V:n rakenneproteiini-VP1:tä kohden ja kannattaako aviditeetti-ELISAA ylipäättään suorittaa. Jos vasta-aineita ilmeni eli β VP1-IgG-absorbanssi oli yli 0,150, näytteille tehtiin aviditeetti-ELISA. Absorbanssin ollessa alle 0,150 aviditeetti-ELISAn tulosta ei olisi pystytty laskemaan tai tulos olisi ollut epäluotettava.

Akuuteilta vaikuttaville näytteille tehtiin lisäksi kaupallinen Biotrin-IgM-ELISA, jolla varmistettiin Haartman-instituutissa pystytetyn IgM-ELISAn tulokset. Taulukossa 11 on vertailtu IgM-ELISA-testillä ja kaupallisella Biotrin-IgM-ELISA-testillä tutkittujen alkuraskauden näytteiden ja napaverinäytteiden tuloksia (149 kpl). Testit antoivat eriävän tuloksen 33 näytteen kohdalla.

Taulukko 11. *IgM-ELISAn tulosten vertailu kaupallisen Biotrin-IgM-ELISAn tuloksiin. Testien antamat raja-arvotulokset on laskettu positiivisiksi tuloksiksi.*

	Biotrin positiivinen	Biotrin negatiivinen
IgM positiivinen	16	26
IgM negatiivinen	7	100

Akuuttiin infektiin viittaavat näytteet tutkittiin vielä B19-spesifisellä PCR:llä, jonka tulokset varmistettiin hybridisaatiokokeella.

11.4.2 Akuutit alkuraskauden näytteet

Akuutteja alkuraskauden näytteitä havaittiin 27 (0,64 %). Alkuraskauden näytteen tuli antaa positiivinen tulos joko toisella IgM-testillä tai PCR:llä, jotta se hyväksyttiin akuutiksi näytteeksi. ETS-suhteet ja aviditeetti-indeksit vahvistivat tuloksia. Näytteiden tulokset on esitetty testeittäin taulukossa 12. Alkuraskauden akuuteista näytteistä 17 oli positiivisia IgM-ELISAlla, Biotrin IgM-ELISAlla ja PCR:llä. IgM-positiivisia μ -kaappaus-IgM-ELISA-testillä oli 19 (70,4 %) näytettä eli 0,45 % kaikista alkuraskauden näytteistä. Biotrin IgM-positiivisia havaittiin 20 (74,1 %). Kaikkien näytteiden ETS-suhdetta tai IgG-aviditeettia ei voitu laskea, koska IgG-taso oli liian matala. PCR-positiivisia näytteitä 27 akuutista alkuraskauden näytteestä oli 24 (88,9 %).

Taulukko 12. *Akuuttien alkuraskauden näytteiden tulokset.*

	Näyte	IgM	Biotrin IgM	IgG	ETS-suhde	Aviditeetti-indeksi	PCR
1	2216	negatiivinen	raja-arvo	negatiivinen	-	-	positiivinen
2	111	positiivinen	positiivinen	positiivinen	22,6	16,5	positiivinen
3	875	positiivinen	positiivinen	positiivinen	16,1	15,5	positiivinen
4	1418	positiivinen	positiivinen	positiivinen	2,2	13,9	positiivinen
5	3799	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,2	-	negatiivinen
6	3568	positiivinen	positiivinen	positiivinen	17,8	10,3	positiivinen
7	270	negatiivinen	positiivinen	positiivinen	3,4	12,4	negatiivinen
8	743	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,1	13,3	positiivinen
9	947	negatiivinen	positiivinen	positiivinen	1,3	12,1	positiivinen
10	1609	negatiivinen	raja-arvo	positiivinen	8,1	15,7	positiivinen
11	1581	positiivinen	positiivinen	positiivinen	31,6	7,5	positiivinen
12	2252	negatiivinen	raja-arvo	positiivinen	10,7	16,4	positiivinen
13	1290	negatiivinen	raja-arvo	positiivinen	7,6	15,3	positiivinen
14	1193	positiivinen	positiivinen	positiivinen	43,4	13,4	positiivinen
15	3215	positiivinen	positiivinen	positiivinen	4,2	18,3	positiivinen
16	1047	positiivinen	negatiivinen	positiivinen	5,1	8,3	negatiivinen
17	3020	positiivinen	positiivinen	positiivinen	0,7	-	positiivinen
18	3976	positiivinen	positiivinen	negatiivinen	-	-	positiivinen
19	4003	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,3	21,1	positiivinen
20	4068	positiivinen	positiivinen	positiivinen	3,7	7,8	positiivinen
21	4070	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,1	6,2	positiivinen
22	4143	positiivinen	positiivinen	positiivinen	6	-	positiivinen
23	4172	positiivinen	positiivinen	positiivinen	3,1	6,6	positiivinen
24	3782	positiivinen	positiivinen	negatiivinen	-	-	positiivinen
25	2502	positiivinen	positiivinen	positiivinen	15,5	29,5	positiivinen
26	3440	negatiivinen	raja-arvo	positiivinen	13,5	16	positiivinen
27	1663	raja-arvo	negatiivinen	negatiivinen	-	-	positiivinen

Taulukossa 13 on esitetty alkuraskauden näytteiden tulokset jaoteltuna kolmeen luokkaan sekä laskettu raskaudenaikainen seroprevalenssi. Seroprevalenssia laskettaessa seropositiivisiksi näytteiksi valittiin sekä seropositiiviset että akuutit näytteet.

Taulukko 13. Alkuraskauden näytteiden tulokset.

Näytteen luokka	Kappalemäärä	Osuus alkuraskauden näytteistä (%)
Seropositiivinen	2 381	56,2
Seronegatiivinen	1 829	43,2
Akuutti	27	0,6
Raskaudenaikainen seroprevalenssi	2 408	56,8

Todennäköisiksi raskaudenaikaisiksi infektioksi määriteltiin näytteet, jotka antoivat joko akuutin tuloksen alkuraskauden seeruminäytteessä (27 kpl) tai joissa havaittiin serokonversio (44 kpl). Nämä tulokset ekstrapoloitiin kuvaamaan koko näyteaineistoa, jolloin todennäköinen raskaudenaikainen infektio havaittiin 2,6 %:ssa raskauksista (taulukko 14). Tässä on huomattava, että akuuteista alkuraskauden näytteistä ei voida varmuudella todeta, onko infektio tapahtunut ennen hedelmöitystä vai sen jälkeen.

Taulukko 14. Todennäköisten raskaudenaikaisten infektioiden määrä.

	Kappalemäärä	Osuus näytteistä (%)
Akuutti alkuraskauden näyte	27	0,64
Raskaudenaikainen serokonversio	44	4,6
Todennäköinen raskaudenaikainen infektio	71	2,6

Suomessa on hieman alle 60 000 synnytystä vuodessa. Tämän tutkimuksen mukaan 43,2 % eli noin 26 000 synnyttävistä naisista on seronegatiivisia raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana. Raskaudenaikaiseksi serokonversioprosentiksi epidemia-aikana saatiin 4,6 %. Näin ollen raskaudenaikaisia serokonversioita esiintyy epidemia-aikana Suomessa noin 1 200 vuodessa.

11.4.3 Sikiön infektio

Sikiön infektio voitiin tutkimuksessa havaita mittaamalla IgM-vasta-aineita napaverinäytteestä. Lisäksi positiivinen PCR-tulos napaverinäytteestä saattaa kertoa sikiön infektiosta. On kuitenkin huomioitava, että napaverestä havaittava positiivinen PCR-tulos voi olla merkki myös vain äidin akuutista infektiosta. Sikiö ei nimittäin välttämättä ole ehtinyt infektoitua, vaikka napaverestä virusta havaittaisiinkin.

Sikiön infektiioon viittaavia napaverinäytteitä havaittiin 19 (taulukko 15). Näistä yhdeksää näytettä voidaan pitää varmana sikiön infektiona, sillä ne antoivat positiivisen tuloksen kummallakin IgM-ELISA-testillä. Lisäksi näytteiden ETS- ja aviditeettitulokset viittasivat akuuttiin infektiioon. Kaikista näytteistä ei tosin ETS-suhdetta ja aviditeettiindeksiä voitu laskea matalan IgG-tason takia. Napaverinäytteistä seitsemän oli IgM-negatiivisia, mutta antoi positiivisen tuloksen PCR:llä. Näiden näytteiden ETS-suhteet ja aviditeetti-indeksit viittasivat mahdolliseen viimeaikaiseen B19-infektiioon. Valitettavasti kaikille näytteille ei oltu tehty Biotrin IgM-ELISAA. Kolme napaverinäytettä antoi positiivisen PCR-tuloksen vasta hybridisaatiokokeessa. Näiden kolmen näytteen ETS- ja aviditeettitulokset viittasivat mahdolliseen viimeaikaiseen B19-infektiioon.

Taulukko 15. Sikiön infektiioon viittaavien napaverinäytteiden tulokset.

	Näyte	IgM	Biotrin IgM	IgG	ETS-suhde	Aviditeetti-indeksi	PCR
1	299	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,4	12,8	positiivinen
2	1262	positiivinen	positiivinen	positiivinen	3,1	16	pos. / neg.
3	1163	positiivinen	positiivinen	positiivinen	0,6	-	positiivinen
4	1452	positiivinen	positiivinen	positiivinen	0,6	-	positiivinen
5	1536	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1	-	positiivinen
6	1584	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,2	-	pos. / neg.
7	1076	positiivinen	positiivinen	positiivinen	6,6	-	pos. / neg.
8	1253	positiivinen	positiivinen	positiivinen	1,1	-	positiivinen
9	1572	positiivinen	positiivinen	negatiivinen	-	-	positiivinen
10	701	negatiivinen	negatiivinen	positiivinen	21,4	20,7	positiivinen
11	1558	negatiivinen	-	positiivinen	26,9	22,2	positiivinen
12	1601	negatiivinen	-	positiivinen	10,7	38,3	positiivinen
13	1616	negatiivinen	-	positiivinen	13,2	29,8	positiivinen
14	1633	negatiivinen	-	positiivinen	26,8	16,6	positiivinen
15	1658	negatiivinen	-	positiivinen	14,6	30,4	positiivinen
16	1622	negatiivinen	-	positiivinen	23,7	28,4	positiivinen
17	228	negatiivinen	negatiivinen	positiivinen	13,4	22,4	positiivinen
18	314	negatiivinen	negatiivinen	positiivinen	12,2	25,4	positiivinen
19	1549	negatiivinen	negatiivinen	positiivinen	45,3	14,2	positiivinen

12 Tulosten tarkastelu

12.1 Raskaudenaikainen seroprevalenssi

Tulosten mukaan 56,8 prosentilla raskaana olevista naisista on vasta-aineita parvorokkoviirusta vastaan raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana. Samaan suuruusluokkaan on päädytty Turun seudulla tehdyssä tutkimuksessa, jonka mukaan 58,6 prosentilla raskaana olevista naisista (n = 558) on immuniteetti B19V:tä kohtaan (Alanen ym. 2005). Kyseisessä tutkimuksessa käytettiin kaupallisia Biotrin IgG- ja IgM-ELISA-testejä.

Muissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu hieman suurempia seroprevalensseja. Tanskalaisen tutkimuksen mukaan 65,0 % raskaana olevista naisista on seropositiivisia (Valeur-Jensen ym. 1999). Valeur-Jensenin ym. (1999) tutkimusaineisto oli kattava, se sisälsi 30 946 raskaana olleen naisen seeruminäytettä, jotka tutkittiin kaupallisella Dakon ELISA-testillä. Kattava näyteaineisto (n= 40 517) oli myös saksassa tehdyssä tutkimuksessa (Enders ym. 2007), jossa havaittiin IgG-prevalenssin olevan 69,8 % raskaana olevien naisten keskuudessa. Kyseisessä tutkimuksessa sekä IgM- että IgG-vasta-aineet oli tutkittu käyttäen kaupallisia Biotrin ELISA-testejä. Alankomaissa tehdyssä tutkimuksessa seroprevalenssin todettiin olevan 70 % (n = 2 567) (van Gessel ym. 2006). Näytteet tutkittiin kaupallisella Biotrin IgG-ELISA-testillä. Tanskassa tehdyn tutkimuksen mukaan seropositiivisten osuus raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana oli 66 % (Jensen ym. 2000). Heidän tutkimuksessaan vasta-aineet testattiin kaupallisilla Dakon IgM- ja IgG-ELISA-testeillä.

Biotrin ELISA-testi oli aiemmin Dakon ELISA-testi, joten kaikki edellä esitetyt tutkimukset on suoritettu samoilla testeillä. Insinööriyössä vasta-ainemittaukset suoritettiin Haartman-instituutissa pystytetyillä ELISA-testeillä lukuun ottamatta Biotrin IgM-ELISA-testiä, jolla varmistettiin akuuttiin infektiin viitanneet näytteet. Insinööriyössä seeruminäytteiden tuloksia varmistettiin lisäksi B19V-IgG-epitooppityypispesifisyyteen ja -IgG-aviditeettiin perustuvilla ELISA-testeillä.

Raskaudenaikaista seroprevalenssia on lisäksi tutkittu viiden Euroopan maan kattavassa tutkimuksessa, jossa raskauden aikaisen seroprevalenssin arvioitiin olevan Suomessa 56,5 %, Italiassa 60,1 %, Englannissa ja Walesissa 61,9 %, Puolassa 63,2 % ja Belgiassa 74,0 %. Kaikki vasta-ainetestaukset oli suoritettu kaupallisella Mikrogenin IgG-ELISAlla. Eroja eri maiden seroprevalenssissa on selitetty mm. maiden välisillä käytäytymis- ja kulttuurieroilla. Lisäksi näytteenoton aikana mahdollisesti ilmenneet epidemiat ovat saattaneet vaikuttaa tuloksiin. (Mossong ym. 2008.)

12.2 Akuutit alkuraskauden näytteet

Alkuraskauden näytteistä akuutteja oli 0,64 % (27/4237). Näistä IgM-positiivisia μ -kaappaus-IgM-ELISA-testillä oli 70,4 % eli 0,45 % alkuraskauden näytteistä. Yksi alkuraskauden näyte antoi IgM-raja-arvotuloksen. Esimerkiksi Endersin ym. (2007) tutkimuksessa 3,0 %:lla raskaana olevista naisista havaittiin IgM-vasta-aineita. Insinööri-työssä akuutti näyte todettiin μ -kaappaus-IgM-ELISAn lisäksi ETS-ELISA-testeillä, aviditeetti-ELISAlla, kaupallisella Biotrin IgM-ELISAlla, PCR:llä ja hybridisaatiokokeella.

Tuloksiin on saattanut aiheutua virhettä siitä, että raskaus saattaa vaikuttaa naisen vastaainepitoisuuksiin. Vasta-aineet saattavat nousta ja laskea raskauden edetessä. Raskauden aikana esimerkiksi IgM-vasta-aineet voivat olla havaitsemattomissa vaikka kyseessä olisi akuutti infektio. (Enders ym. 2006; Enders ym. 2007.) Esimerkiksi ruotsalaistutkimuksissa on tutkittu raskauden loppupuoliskolla kuolleita sikiöitä ja havaittu niistä 7,5-15 %:n olevan B19V-DNA-positiivisia, vaikka useimmalla äidillä ei ollut todettu serologisesti akuuttia infektiota. (Tolfvenstam ym. 2001, Skjöldebrand-Sparre ym. 2000.) Sen sijaan Riipinen ym. (2008) havaitsivat vain 2,4 % kuolleista sikiöistä olevan B19V-DNA-positiivisia. Kaikki tapaukset oli todettu serologisesti akuuteiksi infektioiksi.

12.3 Raskaudenaikainen serokonversioprosentti

Tutkimuksen mukaan alkuraskauden B19V-negatiivisten äitien raskaudenaikainen serokonversioprosentti oli epidemia-aikana 4,6 %. Alasen ym. (2005) tutkimuksen perusteella negatiivisten äitien serokonversioprosentti oli melko matala, 1,3 %. Heidän tutkimusaineistonsa kattoi tosin vain ei-epidemia-ajan ajanjakson. Serokonversioprosentti Alankomaissa tehdyssä tutkimuksessa oli 2,4 % (van Gessel ym. 2006). Heidän tutkimuksessaan loppuraskauden näyte oli otettu raskauden kolmannen kolmanneksen aikana eikä vasta napaverestä kuten tässä tutkimuksessa. Valeur-Jensenin ym. (1999) tutkimuksen perusteella seronegatiivisten äitien raskaudenaikainen serokonversioprosentti oli 1,5 % ei-epidemia-aikana ja 13,0 % epidemia-aikana. Jensen ym. (2000) päätyivät lähes samoihin tuloksiin havaitessaan tutkimuksessaan serokonversioprosentin alkuraskauden näytteen ja napaverinäytteen välillä olevan ei-epidemia-aikana 1,0 % ja epidemia-aikana 13,5 %. Insinööriyön näyteaineisto kattoi suuren parvorokkoepidemian ajan Suomessa vuosina 1992-1993.

12.4 Todennäköinen raskaudenaikainen infektio

Todennäköinen raskaudenaikainen infektio eli akuutti alkuraskauden näyte tai raskaudenaikainen serokonversio havaittiin 71 näytteessä eli 2,6 %:ssa raskauksista. Akuuteista alkuraskauden näytteistä ei tosin voida varmuudella todeta, onko infektio tapahtunut ennen vai jälkeen hedelmöityksen. Tämän takia todellinen raskauden aikaisten infektioiden määrä saattaa olla hieman alle 2,6 % raskauksista. Toisaalta aivan raskauden loppuvaiheessa tapahtuneet äidin infektiot jäivät myös huomaamatta, sillä äidin IgG-taso ei ollut vielä välttämättä ehtinyt nousta havaittavaksi.

Raskaudenaikainen serokonversio havaittiin 44 näyteparissa, joten tutkimuksessa ilmeni ainakin 44 varmaa raskaudenaikaista infektiota. Näistä 19:llä oli akuuttiin B19V-infektioon viittaavia tuloksia loppuraskauden napaverinäytteissä. Lisäksi ilmeinen akuutti-infektio todettiin 27:llä äidillä jo alkuraskaudessa, eivätkä he tämän takia kuulu niihin, joilla todettiin serokonversio. Osalla näistä B19V-infektio on kuitenkin saattanut tapahtua jo ennen hedelmöityshetkeä, joten tapaukset eivät ole aivan varmoja raskau-

denaikaisia infektoita. 27:stä ilmeisen akuutti-infektion omaavasta äidistä vain 12:lle löytyi vastaava napaverinäyte. Lopuille 15 näytteelle ei ollut saatavissa vastaavaa napaverinäytettä. Tämä saattoi johtua muun muassa siitä, että napaverinäytteitä ei ollut säilytetty tutkimuksen ajankohtaan asti, näytteitä ei ollut enää jäljellä tai äiti oli saattanut synnyttää toisessa maassa. Yksi merkittävä syy on myös se, että sikiö on voinut kuolla ennen syntymää. Yhteensä todennäköinen raskaudenaikainen infektio havaittiin siis 71 äidin näytteissä.

12.5 Sikiön infektio

Todennäköinen raskaudenaikainen infektio havaittiin yhteensä 71 äidin kohdalla. Ei kuitenkaan varmasti voida tietää, kuinka monen äidin sikiö infektoitui. Ainakin niillä joiden napaverinäytteessä todettiin IgM-luokan vasta-aineita (9 kpl) oli infektio ulottunut sikiöön asti. Myös napaveren PCR-positiivisuus lisää sikiöinfektion mahdollisuutta, näin ollen tutkimuksessa todettiin 19 todennäköistä sikiöinfektiota. Kirjallisuudessa on arvioitu, että noin 30 % raskaudenaikaisista infektoista ulottuu itse sikiöön, eli laskennallisesti se tarkoittaisi tässä tutkimuksessa noin 21 sikiöinfektiota. Näin ollen havaittu mahdollinen 19 sikiön infektiomäärä vaikutti realistiselta. Tuloksista ei kuitenkaan voitu havaita raskauden alku- ja keskivaiheilla tapahtuneita sikiöinfektioita, jolloin infektio on vaarallisin.

Todennäköisten sikiöinfektioiden määrä saattaa olla yliarvio, sillä mukaan laskettiin myös sellaiset näytteet, jotka antoivat negatiivisen IgM-tuloksen, mutta positiivisen tuloksen PCR:llä ja hybridisaatiokokeella. Parvorokkovirus pääsee kulkeutumaan istukan läpi ja napaverestä havaittava positiivinen PCR-tulos voi olla merkki myös pelkästään äidin akuutista infektiosta, jos sikiö ei ole vielä ehtinyt infektoitua.

Toisaalta työssä havaittu todennäköisten sikiöinfektioiden määrä saattaa olla aliarvio, sillä jos sikiö on infektoitunut raskauden alussa, niin IgM-vasta-aineet eivät välttämättä enää näy napaverinäytteessä. Lisäksi aivan raskauden alussa sikiön vasta-aineiden tuotokyky on vielä kehittymätön, eikä sikiö välttämättä pysty muodostamaan vasta-aineita.

Infektoituneita sikiöitä saattaa olla havaittua enemmän myös sen takia, että napaverinäytettä ei ollut saatavissa kaikissa tapauksissa. Tähän merkittävä syy voi olla se, että sikiö on saanut B19-infektion raskauden aikana ja kuollut siihen.

Koska napaverinäytteet tutkittiin aluksi vain IgG-ELISAlla, hyvin akuutit äidin ja sikiön infektiot, joiden IgG-vasta-ainepitoisuudet ei vielä olleet ehtineet nousta havaittavalle tasolle, jäivät huomaamatta. Aivan akuutit sikiön infektiot, joiden IgG ei ole vielä ehtinyt nousta, mutta joiden IgM olisi jo saattanut ehtiä nousta, olisi voitu havaita napaverinäytteestä IgM-ELISAlla. Lisäksi sikiön tai äidin infektio olisi voitu havaita napaverinäytteestä PCR:llä ja hybridisaatiolla. Katsottiin kuitenkin, että tällaisten näytteiden määrä jäisi todennäköisesti hyvin pieneksi eikä aiheuttaisi merkittäviä muutoksia serokonversioprosenttiin tai infektoituneiden sikiöiden määrään. Näin myöhäisestä sikiön infektiosta ei lisäksi pitäisi olla haittaa sikiölle.

12.6 Tulosten luotettavuuden arviointi

Käytettyjen ELISA-testien herkkyudet ja spesifisyydet olivat hyvin korkeita, joten tuloksia voidaan pitää hyvin luotettavina. Tutkimuksessa käytetyn IgG-ELISAn herkkyys oli 97,8 % (Kaikkonen ym. 1999). ETS-ELISAn herkkyys lineaarista KYVTGIN-peptidiä käyttäen on havaittu olevan 98 % ja spesifisyys 94 %. Aviditeetti-ELISAn herkkyys puolestaan oli 100 % ja spesifisyys 88,7 % (Kaikkonen ym. 2001). Koska käytetyt ELISA-testit perustuvat eri asioihin ja ovat toisistaan riippumattomia, kasvaa testituloksen luotettavuus suoritettaessa useampi eri testi samalle näytteelle. Jos esimerkiksi ensimmäisen testin spesifisyys on 95 % ja toisen testin spesifisyys on 98 %, on testiyhdistelmän spesifisyys 99,9 % (Vainionpää ym. 2000). Näin ollen varmistustesteillä varmistettujen näytteiden tulokset ovat erittäin luotettavia.

Tulosten luotettavuutta olisi voitu lisätä toistamalla kaikki testit. Tämä oli kuitenkin mahdoton ajatus työmäärän ja resurssien kaksinkertaistumisen takia. Ja toisaalta ELISA-testit itsessään olivat jo hyvin herkkiä ja spesifisiä. Lisäksi positiiviseen tulokseen viitanneet näytteet varmistettiin useilla ELISA-testeillä kuten ETS- ja aviditeetti-

ELISAlla. Akuuttiin infektiioon viittaavat näytteet tutkittiin vielä näiden lisäksi PCR:llä ja hybridisaatiokokeella. Näin ollen tuloksia voidaan pitää erittäin luotettavina.

Luotettavuutta olisi tietenkin parantunut myös se, että kaikki ELISA-testit olisi tehty kaikille näytteille eikä edellisten tulosten perusteella valikoiduille näytteille. Työn määrä olisi kuitenkin moninkertaistunut, ja koska aineisto oli niin suuri, olisi aikaa ja resursseja kulunut huomattavan paljon. Lisäksi näytteet, joille varmistustestit tehtiin, olivat tarkoin valikoituja ja perusteltuja. Varmistustestit eivät olisi antaneet sen enempää tietoa esimerkiksi negatiivisiksi todetuista näytteistä. Näin ollen tulokset eivät todennäköisesti olisi merkittävästi muuttuneet vaikka kaikki näytteet olisi testattu useammalla testillä.

Näyttemateriaali

Tutkittu näyttemateriaali saattaa sisältää useampia näytteitä äitiä kohti, sillä naiset ovat saattaneet tulla uudestaan raskaaksi tutkimusajanjakson aikana. Näytteiden koodit olivat äitikohtaisia, joten esimerkiksi keskenmenon saanut nainen on voinut tulla uudestaan raskaaksi tutkimusajanjakson sisällä ja sama koodi on esiintynyt aineistossa useaan kertaan. Lisäksi näyteaineisto saattaa sisältää kaksos- ja monikkoraskauksia, joissa äidin koodia vastaa useampi napaverikoodi. Insinöörityön valmistuessa kaikkia näitä useamman kerran esiintyneitä koodeja ei ollut ehditty selvittämään. Tästä voi aiheutua pientä virhettä tuloksiin. Tapauksia esiintyi kuitenkin vain muutamia.

13 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli tutkia parvorokkoviruksen yleisyyttä raskaana olevien naisten keskuudessa epidemia-aikana Suomessa. Työssä tutkittiin 4 237 alkuraskauden näytettä sekä 1 022 napaverinäytettä entsyymi-immunologisella menetelmällä. Tarkoituksena oli selvittää raskaudenaikaisten serokonversioiden määrä sekä tutkia akuutteja tautitapauksia raskauden alussa ja lopussa.

Tulosten perusteella 43,2 % raskaana olevista naisista oli alttiita B19V:lle ensimmäisen raskauspuoliskon aikana. Akuutti B19-infektio havaittiin 0,64 %:ssa alkuraskauden näytteistä. Varma raskaudenaikainen infektio eli serokonversio alkuraskauden ja loppuraskauden näytteen välillä todettiin 44 näytteessä. B19-infektioille alttiiden naisten serokonversioprosentiksi saatiin 4,6 %.

Tulokset osoittivat, että epidemia-aikana todennäköisen raskaudenaikaisen B19-infektion sai 2,6 % odottavista äideistä. Raskaana olevan äidin infektoituessa sikiöistä on todettu infektoituvan noin 30 %. Varmoja sikiön infektoita tässä tutkimuksessa havaittiin yhdeksän. Sikiöinfektion on arvioitu olevan kohtalokas noin 5 %:lle infektoituneista sikiöistä. Kaikista sikiön infektoista ei aiheudu raskauskomplikaatioita, sillä sikiö voi sairastaa infektion ja parantua siitä.

Kattavalla selvityksellä parvorokkoviruksen yleisyydestä raskauden aikana saattaa olla merkitystä raskaana olevia työntekijöitä koskevaan lainsäädäntöön. Lakimuutos, joka oikeuttaisi erityisäitiysrahaan sekä erityisäitiysvapaaseen parvorokkoepidemian riehussa päiväkodissa tai koulussa, olisi toivottava, varsinkin vaikeiden raskauksien kuten hedelmöityshoitojen yhteydessä, sillä B19V aiheuttaa raskauskomplikaatioita ja sikiökuolemia.

Insinööriön tulokset ovat vasta suuntaa antavia, sillä näytteiden varmistustestit jatkuvat vielä ja tulokset tarkastetaan uudestaan sekä analysoidaan tilastollisesti. Tutkimuksessa oli tarkoitus verrata päiväkotityöntekijöiden parvorokkovirusinfektion yleisyyttä samankaltaisissa ammateissa työskenteleviin naisiin, jotka eivät työskentele lasten kanssa. Tätä osaa ei kuitenkaan pystytty suorittamaan, koska tietoja äitien ammateista ei vielä ollut saatu selville. Tutkimus suoritetaan kuitenkin loppuun asti, ja ammattitiedot avataan, jolloin infektiioleisyyttä ammattiryhmien välillä voidaan tarkastella. Näyteaineistoa ei ollut rajattu ensisynnyttäjiin. Ensisynnyttäjät selvitetään kuitenkin aineistosta ja analysoidaan erikseen, jotta voidaan arvioida raskaana olevien naisten omien lasten vaikutusta B19-infektioriskiin raskauden aikana. Tutkimuksesta julkaistaan tieteellinen artikkeli.

Lähteet

Alanen Anna 2002: Virusinfektiot raskauden aikana. Suomen lääkärilehti 20 s. 2187-2191.

Alanen A., Kahala K., Vahlberg T., Koskela P., Vainionpää R. 2005: Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112, s. 50-56.

Allander T., Tammi M., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B. 2005: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 36, s. 12891-12896.

Anderson M., Lewis E., Kidd I., Hall S., Cohen B. 1984: An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *The Journal of Hygiene* 93, s. 85-93.

Anderson M., Higgins P., Davis L., Willman J., Jones S., Kidd I., Pattison J., Tyrrell D. 1985: Experimental parvoviral infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases* 152, s. 257-265.

Brown K., Anderson S., Young N. 1993: Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262, s. 114-117.

Brown K., Hibbs J., Gallinella G., Anderson S., Lehman E., McCarthy P., Young N. 1994: Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *The New England Journal of Medicine* 330, s. 1192-1196

Brown T., Anand A., Ritchie L., Clewley J., Reid T. 1984: Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 2 s. 1033-1034.

Cartter M., Farley T., Rosengren S., Quinn D., Gillespie S., Cary G.W., Hadler J. 1991: Occupational risk factors for infection with parvovirus B19 among pregnant women. *The Journal of Infectious Diseases* 163, s. 282-285.

Cossart Y., Field A., Cant B., Widdoes D. 1975: Parvovirus-like particles in human sera. *The Lancet* 1, s. 72-73.

de Jong E., de Haan T., Kroes A., Beersma M., Oepkes D., Walther F. 2006: Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Journal of clinical virology* 36 1-7.

Enders M., Weidner A., Zoellner I., Searle K., Enders G. 2004: Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenatal Diagnosis* 24, s. 513-518.

Enders M., Schalasta G., Baisch C., Weidner A., Pukkila L., Kaikkonen L., Lankinen H., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. 2006: Human parvovirus B19 infection during pregnancy – value of modern molecular and serological diagnostics. *Journal of Clinical Virology* 35, s. 400-406.

Enders M., Weidner A., Enders G. 2007: Current epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection during pregnancy and childhood in the western part of Germany. *Epidemiology and Infection* 135, s. 563-569.

Enders M., Weidner A., Rosenthal T., Baisch C., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. 2008: Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1.

Heegaard E. and Brown K. 2002: Human parvovirus B19. *Clin Microbial Rev* 15, s. 485-505.

Hokynar K., Norja P., Hedman K., Söderlund-Venermo M. 2007: Tissue persistence and prevalence of B19 virus types 1-3. *Future Virology* 2, s. 377-388.

Hokynar Kati 2007: Human parvovirus B19: Tissue persistence and prevalence of prototypic and new variants. Helsinki: Helsinki University Printing House.

ICTVdB - The Universal Virus Database, versio 4. 2006. (WWW-dokumentti)
<<http://phene.cpmc.columbia.edu/Ictv/index.htm>> 25.04.2006. Luettu 28.03.2009.

Jensen I. P., Thorsen P., Jeune B., Møller B., Vestergaard B. 2000: An epidemic of parvovirus B19 in a population of 3596 pregnant women: a study of sociodemographic and medical risk factors. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 107, s. 637-643.

Jones M., Kapoor A., Lukashov V., Simmonds P., Hecht F., Delwart E. 2005: New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *Journal of Virology* 79 s. 8230-8236.

Jordan J. and DeLoia J. 1999: Globoside expression within the human placenta. *Placenta* 20, s. 103-108.

Kaikkonen L., Lankinen H., Harjunpää I., Hokynar K., Söderlund-Venermo M., Oker-Blom C., Hedman L., Hedman K. 1999: Acute-phase-specific heptapeptide epitope for diagnosis of parvovirus B19 infection. *Journal of Clinical Microbiology* 37, s. 3952-3956.

Kaikkonen L., Söderlund-Venermo M., Brunstein J., Schou O., Jensen I.P., Rousseau S., Caul O., Cohen B., Valle M., Hedman L., Hedman K. 2001: Diagnosis of human parvovirus B19 infections by detection on epitope-type-specific VP2 IgG. *Journal of Medical Virology* 64, s. 360-365.

Kapoor A., Slikas E., Simmonds P., Chieochansin T., Naeem A., Shaukat S., Alam M. M., Sharif S., Angez M., Zaidi S., Delwart E. 2009: A newly identified bocavirus species in human stool. *Journal of infectious diseases* 199, s. 196-200.

Kinney J., Anderson L., Farrar J., Strikas R., Kumar M., Kliegman R., Sever J., Hurwitz E., Sikes R. 1988: Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus B19 infection. *The Journal of Infectious Diseases* 157, s. 663-667.

Meltomaa S., Ekblad U. 1996: Äidin virusinfektiot ja sikiön sekä vastasyntyneen tartunnan ehkäisy. *Suomen lääkärilehti* 29 s. 2975-2980.

Mossong J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., Siennicka J., Trzcinska A., van Damme P., Beutels P., Vyse A., Shkedy Z., Aerts M., Massari M., Gabutti G. 2008: Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiology and Infection* 136, s. 1059-1068.

Mäkelä Aila 2003: Nelihaaraisen peptidin toimivuus antigeenina parvorokkovirusvastaineiden epitooppitutkimuksessa. *Opinnäytetyö*. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia.

Norbeck O., Papadogiannakis N., Petersson K., Hirbod T., Broliden K., Tolfvenstam T. 2002: Revised clinical presentation of parvovirus B19-associated intrauterine fetal death. *Clinical Infectious Diseases* 35, s. 1032–1038.

Pattison J., Jones S., Hodgson J., Davis L., White J., Stroud C., Murtaza L. 1981: Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anemia. *Lancet* 1, s. 664-665.

Price Laura 2008: Infectious disease in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* 18:7, s.173-179.

Reid D., Reid T., Brown T., Rennie J., Eastmond C. 1985: Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1, s. 422-425.

Riipinen A., Väisänen E., Nuutila M., Sallmen M., Karikoski R., Lindbohm M., Hedman K., Taskinen H., Söderlund-Venermo M. 2008: Parvovirus B19 infection in fetal deaths. *Clinical Infectious Diseases* 47: 1519-25.

Seppälä I., Söderlund M., Lappalainen M., Hedman K. 1994: Vasta-aineen aviditeetti immuunivasteessa ja infektiotautien diagnostiikassa. *Duodecim* 110, s 178-184.

Skjöldebrand-Sparre L., Tolfvenstam T., Papadogiannakis N., Wahren B., Broliden K., Nyman M. 2000: Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG* 107, s. 476–480.

Söderlund M., Brown K., Meurman O., Hedman K. 1992: Prokaryotic expression of a VP1 polypeptide antigen for diagnosis by a human parvovirus B19 antibody enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* 30, s. 305-311.

Söderlund M., Brown C., Cohen B., Hedman K. 1995a: Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *The Journal of Infectious Diseases* 171, s. 710-713.

Söderlund M., Brown C., Spaan W., Hedman L., Hedman K. 1995b: Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases* 172, s. 1431-1436.

Söderlund Maria 1996: Human parvovirus B19 - development and application of new diagnostic methods based on molecular immunology and PCR. Helsinki: Hakapaino.

Söderlund-Venermo M., Hokynar K., Nieminen J., Rautakorpi H., Hedman K. 2002: Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathologie Biologie* 50, s. 307-316

Tolfvenstam T., Papadogiannakis N., Norbeck O., Petersson K., Broliden K. 2001: Frequency of human parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. *Lancet* 357, s. 1494–1497.

Vainionpää R., Hedman K., Hyypiä T. 2000: Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnostiikasta. *Duodecim* 116, s. 17-24.

Valeur-Jensen A., Pedersen C., Westergaard T., Jensen I., Lebech M., Andersen P., Aaby P., Pedersen B., Melbye M. 1999: Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy. *Jama* 281, s. 1099-1105.

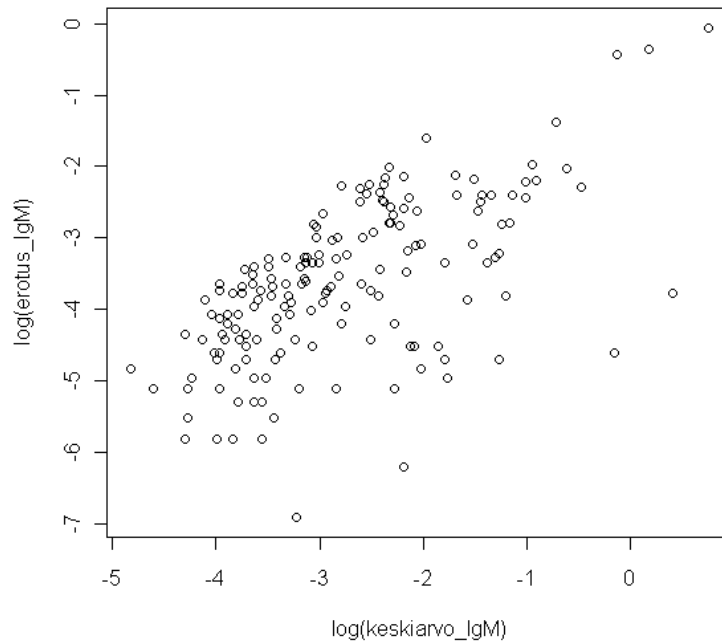
van Gessel P., Gaytant M., Vossen A., Galama J., Ursem N., Steegers E., Wildschut H. 2006: Incidence of parvovirus B19 infection among an unselected population of pregnant women in the Netherlands: a prospective study. *European Journal on Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 128, s. 46-49

White D., Woolf A., Mortimer P., Cohen B., Blake D., Bacon P. 1985: Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1, s. 419-421.

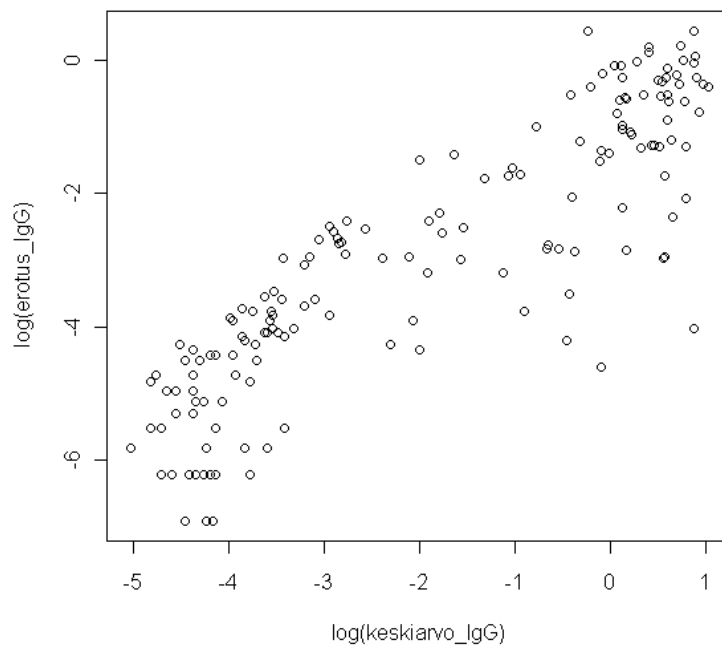
Liite 1: IgM-ELISAn optimointi Costar-kuoppalevyille

Näytteet	Ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava, vuohessa tuotettu vasta-aine																	
	1:1620						1:1350						1:1125					
	Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)		Antigeenimäärä (ng/kaivo)	
	30	20	10	30	20	10	30	20	10	30	20	10	30	20	10	30	20	10
negatiivinen kontrolli	0,167	0,159	0,096	0,148	0,115	0,058	0,154	0,144	0,071	0,154	0,144	0,071	0,154	0,144	0,071	0,154	0,144	0,071
positiivinen kontrolli	3,051	3,115	2,311	3,032	2,946	1,950	3,093	3,072	2,044	3,093	3,072	2,044	3,093	3,072	2,044	3,093	3,072	2,044
vanhan immunitetin kontrolli	0,157	0,154	0,092	0,125	0,097	0,060	0,138	0,164	0,090	0,138	0,164	0,090	0,138	0,164	0,090	0,138	0,164	0,090
vanhan immunitetin kontrolli 2	0,133	0,103	0,056	0,090	0,073	0,046	0,097	0,090	0,059	0,097	0,090	0,059	0,097	0,090	0,059	0,097	0,090	0,059
1 pv sairastumisesta -kontrolli	2,916	2,761	1,832	2,886	2,381	1,541	2,832	2,565	1,716	2,832	2,565	1,716	2,832	2,565	1,716	2,832	2,565	1,716
1 pv sairastumisesta -kontrolli 2	3,187	3,217	2,170	3,322	2,807	1,853	3,461	3,042	1,993	3,461	3,042	1,993	3,461	3,042	1,993	3,461	3,042	1,993
6 pv sairastumisesta -kontrolli	3,280	3,549	2,574	3,280	3,352	2,189	3,190	3,792	2,251	3,190	3,792	2,251	3,190	3,792	2,251	3,190	3,792	2,251
9 pv sairastumisesta -kontrolli	3,173	3,201	2,764	3,474	3,423	2,336	3,336	3,173	2,571	3,336	3,173	2,571	3,336	3,173	2,571	3,336	3,173	2,571
13 pv sairastumisesta -kontrolli	3,074	2,998	2,299	2,998	3,220	1,935	3,118	3,220	2,091	3,118	3,220	2,091	3,118	3,220	2,091	3,118	3,220	2,091
18 pv sairastumisesta -kontrolli	3,697	4,060	2,396	3,192	2,891	1,946	2,998	3,493	1,940	2,998	3,493	1,940	2,998	3,493	1,940	2,998	3,493	1,940
19 pv sairastumisesta -kontrolli	3,665	3,665	2,318	3,409	2,845	1,860	3,586	2,917	2,090	3,586	2,917	2,090	3,586	2,917	2,090	3,586	2,917	2,090
42 pv sairastumisesta -kontrolli	3,014	2,947	1,873	3,051	2,555	1,508	3,072	2,792	1,671	3,072	2,792	1,671	3,072	2,792	1,671	3,072	2,792	1,671
46 pv sairastumisesta -kontrolli	1,128	1,048	0,671	1,042	0,900	0,602	1,115	0,999	0,707	1,115	0,999	0,707	1,115	0,999	0,707	1,115	0,999	0,707
85 pv sairastumisesta -kontrolli	0,975	0,817	0,500	0,811	0,662	0,401	0,891	0,741	0,472	0,891	0,741	0,472	0,891	0,741	0,472	0,891	0,741	0,472
104pv sairastumisesta -kontrolli	0,794	0,703	0,437	0,697	0,606	0,394	0,743	0,615	0,401	0,697	0,606	0,394	0,743	0,615	0,401	0,697	0,606	0,394
117 pv sairastumisesta -kontrolli	0,185	0,157	0,087	0,150	0,123	0,068	0,166	0,148	0,087	0,166	0,148	0,087	0,166	0,148	0,087	0,166	0,148	0,087
121 pv sairastumisesta -kontrolli	0,320	0,292	0,166	0,274	0,246	0,152	0,313	0,204	0,158	0,313	0,204	0,158	0,313	0,204	0,158	0,313	0,204	0,158
126 pv sairastumisesta -kontrolli	0,295	0,252	0,162	0,232	0,201	0,113	0,257	0,220	0,141	0,257	0,220	0,141	0,257	0,220	0,141	0,257	0,220	0,141
129 pv sairastumisesta -kontrolli	0,538	0,457	0,303	0,445	0,388	0,244	0,482	0,431	0,275	0,482	0,431	0,275	0,482	0,431	0,275	0,482	0,431	0,275
144 pv sairastumisesta -kontrolli	0,348	0,303	0,157	0,313	0,215	0,112	0,315	0,252	0,144	0,315	0,252	0,144	0,315	0,252	0,144	0,315	0,252	0,144
231 pv sairastumisesta -kontrolli	0,273	0,233	0,119	0,229	0,175	0,097	0,250	0,199	0,117	0,250	0,199	0,117	0,250	0,199	0,117	0,250	0,199	0,117
kontrolli 1	3,293	2,992	2,566	2,975	2,993	2,217	3,528	2,942	2,286	3,528	2,942	2,286	3,528	2,942	2,286	3,528	2,942	2,286
kontrolli 2	0,373	0,343	0,209	0,342	0,279	0,170	0,328	0,306	0,208	0,328	0,306	0,208	0,328	0,306	0,208	0,328	0,306	0,208
kontrolli 3	0,260	0,222	0,137	0,236	0,216	0,096	0,262	0,200	0,125	0,262	0,200	0,125	0,262	0,200	0,125	0,262	0,200	0,125
kontrolli 4	1,560	1,496	1,262	1,412	1,343	1,092	1,469	1,365	1,140	1,469	1,365	1,140	1,469	1,365	1,140	1,469	1,365	1,140
kontrolli 5	0,298	0,245	0,140	0,207	0,189	0,094	0,248	0,196	0,102	0,248	0,196	0,102	0,248	0,196	0,102	0,248	0,196	0,102
kontrolli 6	0,295	0,252	0,161	0,241	0,224	0,102	0,265	0,218	0,133	0,265	0,218	0,133	0,265	0,218	0,133	0,265	0,218	0,133
kontrolli 7	0,398	0,352	0,249	0,321	0,296	0,179	0,267	0,320	0,203	0,267	0,320	0,203	0,267	0,320	0,203	0,267	0,320	0,203
kontrolli 8	0,786	0,714	0,521	0,669	0,590	0,429	0,742	0,613	0,436	0,742	0,613	0,436	0,742	0,613	0,436	0,742	0,613	0,436
kontrolli 9	0,297	0,269	0,185	0,254	0,236	0,152	0,286	0,253	0,163	0,286	0,253	0,163	0,286	0,253	0,163	0,286	0,253	0,163
kontrolli 10	0,450	0,424	0,346	0,406	0,392	0,307	0,438	0,422	0,340	0,438	0,422	0,340	0,438	0,422	0,340	0,438	0,422	0,340
kontrolli 11	0,417	0,395	0,320	0,392	0,357	0,289	0,418	0,385	0,305	0,418	0,385	0,305	0,418	0,385	0,305	0,418	0,385	0,305

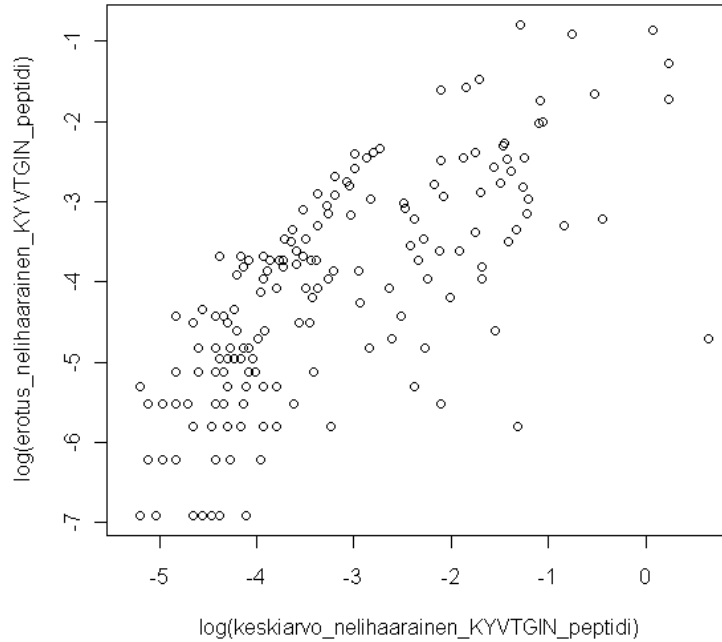
Liite 2: ELISA-testien absorbanssien hajonta



Kuva 1. *IgM-ELISAn absorbanssien hajonta. X-akselilla on logaritmi kunkin näytteen antamien absorbanssien keskiarvosta ja y-akselilla logaritmi näytteiden erotuksesta.*



Kuva 2. *IgG-ELISAn absorbanssien hajonta. X-akselilla on logaritmi kunkin näytteen antamien absorbanssien keskiarvosta ja y-akselilla logaritmi näytteiden erotuksesta.*

Liite 2: ELISA-testien absorbanssien hajonta

Kuva 3. ETS4-ELISAn absorbanssien hajonta. X-akselilla on logaritmi kunkin näytteen antamien absorbanssien keskiarvosta ja y-akselilla logaritmi näytteiden erotuksesta.