

Suvi Peltomaa

# Hinkuyskän serologiseen diagnostiikkaan tarkoitettujen PT-antigeenia sisältävien ELISA-kittien vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

15.5.2014

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Suvi Peltomaa Hinkuyskän serologiseen diagnostiikkaan tarkoitettujen PT-antigeenia sisältävien ELISA-kittien vertailu  22 sivua + 1 liite 15.5.2014
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	lehtori Hannele Pihlaja biokemisti Sanna Valtanen
<p>Hinkuyskä on gramnegatiivisen <i>Bordetella pertussis</i> -bakteerin aiheuttama hengitystieinfektio, jonka oireina ovat voimakas puuskittainen yskä ja vinkuva ääni yskiessä. Hinkuyskä leviää tehokkaasti pisaratartuntana. Tautia vastaan on rokote, mutta siitä huolimatta tautia esiintyy kaikenikäisillä. Hinkuyskä esiintyy lievempänä muotona aikuisilla ja vanhemmilla lapsilla, mutta rokottamattomille lapsille se on hengenvaarallinen.</p> <p>Hinkuyskää voidaan laboratoriossa diagnosoida kolmella menetelmällä: viljelyllä, PCR:illa ja serologisesti. Näistä viljely ja PCR ovat käyttökelpoisimpia taudin alkuvaiheessa, kun taas serologia toimii parhaiten oireiden kestänytä pidempään. Serologiassa määritetään bakteeriantigeenin, kuten pintarakenteen tai virulenssitekijän, aikaansaamaa vasta-aineen pitoisuuden nousua veressä.</p> <p>Hinkuyskän serologiassa käytetään yleisesti ELISA-menetelmää, jossa aikaisemmin on yleensä käytetty antigeenina bakteerisolusonikaattia. Eurooppalainen työryhmä ECDC on kuitenkin suositellut, että antigeenina käytettäisiin puhdistettua pertussistoksiinia (PT), joka on <i>B. pertussis</i> -bakteerille spesifinen proteiini.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin Yhtyneet Medix Laboratorion toimeksiannosta. Tarkoituksena oli testata ja verrata kaupallisia pertussistoksiinia sisältäviä ELISA-kittejä, jotta YML:ssä voitaisiin siirtyä ECDC:n suosituksen mukaiseen menetelmään. Työssä testattiin kolmea IgG-kittiä ja kahta IgA-kittiä. Tutkimuksessa käytettiin näytteinä vanhoja potilasnäytteitä, ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä sekä WHO:n referenssinäytettä.</p> <p>Kiteille määritettiin spesifisyys, sensitiivisyys ja kokonaisvariaatio sekä arvioitiin tulosten oikeellisuutta referenssinäytteen avulla. Tulosten perusteella YML:ssä päädyttiin ottamaan yhden valmistajan IgG- ja IgA-kitit käyttöön ja lisätestaukseen.</p>	
Avainsanat	hinkuyskä, pertussis, serologia, pertussistoksiini, menetelmävertailu

Author(s) Title	Suvi Peltomaa Comparison of PT-containing ELISA kits used in serological diagnostics of pertussis
Number of Pages Date	22 pages + 1 appendice 15 May 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Senior Lecturer Hannele Pihlaja Biochemist Sanna Valtanen
<p>Whooping cough aka pertussis is a bacterial respitorial infection caused by gram-negative bacterium <i>Bordetella pertussis</i>. Typical symptoms are paroxysmal cough and whooping sound. Pertussis is easily spread through air droplets. Vaccination program against pertussis has existed for a long time, but the disease still cycles through population. The symptoms are milder in adults and older children and more severe in infants and young children. It can be fatal to unvaccinated infants.</p> <p>Laboratory diagnostics of whooping cough consists of culture, PCR and serology. Culture and PCR are most useful at the early stages of the disease whereas serology is best used at the later stages. Serological diagnosis means measuring the antibodies produced against antigens (such as virulence factors) of <i>B. pertussis</i>.</p> <p>Measuring the pertussis-specific antibodies is usually done with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Typically sonicated whole-cell bacteria has been used as a coating antigen. However, ECDC (European centre for disease prevention and control) has recommended using pertussis toxin (PT), which is a specific protein of <i>B. pertussis</i>, as a coating antigen.</p> <p>This thesis was carried out for Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy. The purpose of the study was to compare commercial PT-containing ELISA kits and gain enough information to enable YML to transfer from their currently used serological test to an ECDC-recommended one. Three IgG kits and two IgA kits were used in this study. The samples used in the study were old serum samples from patients, external quality assessment samples and WHO reference sample.</p> <p>The kits were compared by their specificity, sensitivity and total variation. Based on the results, the IgG and IgA kits of one of the manufactures were chosen by YML for more testing.</p>	
Keywords	whooping cough, pertussis, serology, pertussis toxin

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Bordetella pertussis	2
2.1	Epidemiologia	2
2.2	Hinkuuskän taudinkuva ja hoito	3
3	Laboratoriodiagnostiikka	4
3.1	Viljely	4
3.2	PCR	5
3.3	Serologia	5
4	Työn tarkoitus ja tavoitteet	6
4.1	Aikaisemmat tutkimukset	7
4.2	Työtä ohjaavat kysymykset	7
5	Työn toteutus	7
5.1	Näytemateriaali	7
5.2	Työn suoritus	8
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	9
6.1	Spesifisyys ja sensitiivisyys	11
6.1.1	Kliininen tarkastelu	12
6.2	Kokonaisvariaatio	13
6.2.1	Sarjan sisäinen variaatio	13
6.2.2	Sarjojen välinen variaatio	13
6.3	Oikeellisuus	14
6.3.1	Poikkeama referenssinäytteestä	15
6.3.2	EQA-näytteet	15
6.3.3	Lineaarisuus	16
6.4	IgA-kittien tulokset	16
7	Pohdinta	19
7.1	Yhteenveto tuloksista	19
7.2	Tulosten luotettavuuden arviointi	19
7.3	Lopuksi	20



## 1 Johdanto

Hinkuyskä on pääasiassa *Bordetella pertussis* -bakteerin aiheuttama hengitystieinfektio, jolle on tyypillistä puuskittaiset yskäkohtaukset, vinkuva ääni yskiessä ja hengitysvaikeudet. Hinkuyskää esiintyy pääasiassa lapsilla ja nuorilla, mutta myös aikuisilla lievempänä muotona. Erityisesti pienille rokottamattomille lapsille tauti voi olla hengenvaarallinen. Maailman terveysjärjestö WHO on arvioinut, että vuonna 2008 hinkuyskätapauksia oli maailmanlaajuisesti 16 miljoona ja näistä suurin osa kehittyvissä maissa. (WHO 2010: 385–400.)

Hinkuyskärakotteita on ollut käytössä jo 1940-luvulta lähtien, mutta rokotteen teho on heikko ja sen antama suoja ei ole elinikäinen. Hinkuyskää pidetäänkin huonoiten hallinnassa olevana, rokotteella ehkäistävissä olevana tautina. Tautia esiintyy edelleen runsaasti myös korkean rokotekattavuuden maissa, kuten Yhdysvalloissa ja useissa Euroopan maissa. Tämän epäillään johtuvan pertussisbakteerissa tapahtuneesta muuntelusta, joka on seurausta pitkään jatkuneesta rokotteen käytöstä. (Mattoo – Cherry 2005. 326–382.)

Hinkuyskää diagnosoidaan laboratoriossa kolmella menetelmällä: viljelyllä, PCR:lla ja serologisesti. Viljely ja PCR ovat pääasiassa käytössä taudin alkuvaiheessa ja pienillä lapsilla. Jos yskäoireet ovat kestäneet jo pitkään, käytetään serologista määrittystä. Hinkuyskän serologisessa määrittämisessä mitataan IgG-, IgM- ja IgA-luokan vastaaineita. Vasta-aineet ilmenevät hitaasti, joten ne eivät sovi akuutin taudin diagnostiikkaan. (Mertsola – He 2012: 170–176.) Eurooppalainen työryhmä ECDC (European centre for disease prevention and control) antoi vuonna 2012 suosituksen hinkuyskän serologisesta testaamisesta. Keskeistä suosituksessa oli, että testattaessa hinkuyskää ELISA-menetelmällä, tulisi antigeenina käyttää *Bordetella pertussis* -bakteerille spesifistä pertussistoksiinia (PT) riippumatta siitä käytetäänkö laboratoriossa kaupallisia kyttejä vai omaa in house -menetelmää. (ECDC 2012.)

Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n toimeksiannosta. Työn tarkoitus oli testata ja verrata kolmea pertussistoksiinia sisältävää kaupallista ELISA-kittiä ja saada riittävästi informaatiota kittien käytettävyydestä mahdollista suosituksen mukaiseen menetelmään siirtymistä varten.

## 2 Bordetella pertussis

*Bordetella pertussis* on ainoastaan ihmiselle patogeeninen, pieni liikkumaton gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka aiheuttaa hinkuyskää (Mertsola – He 2012: 170–176). Bordetella- sukuun kuuluu yhdeksän bakteerilajia, joista *B. pertussis* -lajin lisäksi vain *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* aiheuttavat ihmiselle infektiota, yleensä eriasteisia hengitystieinfektioita. Näistä *B. pertussis* ja *B. parapertussis* aiheuttavat varsinaista hinkuyskää, mutta parapertussiksen aiheuttamana taudinkuva on selvästi lievempi kuin *B. pertussis* -bakteerin tapauksessa. (Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

*B. pertussis* - bakteeri kolonisoii pääasiassa hengitysteiden limakalvoja, mutta se kykenee myös tunkeutumaan epiteelisolujen sisään ja selviämään solun sisäisenä parasiitina. Tähän on syynä bakteerin kyky muuttaa fenotyyppistä tilaansa ympäristön olosuhteiden mukaan. Pertussisbakteerin taudinaiheuttamismekanismeja ei täysin tunneta, mutta keskeistä siinä ovat erilaiset bakteerin tuottamat virulenssitekijät. (WHO 2010: 385-400.)

*B. pertussis* tuottaa useita erilaisia virulenssitekijöitä, joiden tuotantoa se kykenee säätelemään ympäristön signaalien perusteella. Virulenssitekijät voidaan jakaa adhesiineihin eli bakteerin kiinnittymiseen liittyviin tekijöihin sekä toksineihin. Adhesiinien avulla bakteerit kiinnittyvät värekarvallisiin lieriöepiteelisoluihin ja toksinien avulla ne lamaantuttavat värekarvojen toiminnan ja aiheuttavat paikallisen epiteelikuolion. *B. pertussis* -bakteerin tärkeimmät virulenssitekijät ovat adhesiineista filamenttihemagglutiini (FHA), pertaktiini (PRN) ja fimbriat (FIM) sekä toksineista pertussistoksiini (PT), adenylaattisyklaasitoksiini (ACT) ja henkitorven sytotoksiini (TCT). (Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

### 2.1 Epidemiologia

Ennen rokotteen käyttöönottoa hinkuyskä oli yksi yleisimmistä lastentaudeista, mutta laajat rokotukset 1950-luvulla aiheuttivat taudin esiintyvyydessä ja kuolleisuudessa rajun laskun. Tautia kuitenkin edelleen esiintyy ja WHO:n arvion mukaan esimerkiksi vuonna 2008 kuoli 195 000 lasta hinkuyskään. 95 % tautitapauksista esiintyy kehittyvissä maissa ja myös kuolleisuus on suurinta näillä alueilla. (WHO 2010: 385–400.)

Suomessa noin 97 % lapsista saa täyden rokotesarjan hinkuuskää vastaan (Mertsola – He 2012: 170–176). Aiemmin käytössä oli kokosolurokote, mutta nykyisin käytetään pääasiassa solutonta rokotetta. Rokotteen koostumus vaihtelee, mutta kaikki soluttomat rokotteet sisältävät kuitenkin PT:a. Rokotteen antama suoja näyttäisi heikentyvän 4-12 vuoden jälkeen ja tautia esiintyykin yhä enemmän vanhemmilla lapsilla, nuorilla ja aikuisilla. Rokotteen tehoa on laskenut muun muassa *B. pertussis* -bakteerin virulenssitekijöitä koodaavien geenien muuntelu. (WHO 2010: 385–400.)

## 2.2 Hinkuuskän taudinkuva ja hoito

Hinkuuskä eli pertussis on pisaratartuntana leviävä hengitystieinfektio. Hinkuuskän itämisaika on 7-10 päivää ja tauti esiintyy kahtena muotona: klassisena ja epätyypillisenä hinkuuskänä. Klassiseen hinkuuskään sairastuvat useimmiten rokottamattomat lapset. Tällöin tauti kestää 6-12 viikkoa tai pidempään, ja se jaetaan kolmeen vaiheeseen: katarraalivaiheeseen, paroksysmaalivaiheeseen ja toipilasvaiheeseen. Katarraalivaiheessa oireina ovat lievä nuha, yskä ja lämpöily. Tämän jälkeen paroksysmaalivaiheessa yskä muuttuu hinkuuskälle tyypilliseksi voimakkaaksi ja puuskaiseksi yskäksi, jota esiintyy kohtauksittain erityisesti öisin. Lapsilla voi esiintyä myös sisäänhengitysvaikeuksia, jolloin sisäänhengitykseen liittyy vinkuva ääni yskänkohtauksen loppuvaiheessa. Hinkuuskään ei yleensä liity korkeaa kuumetta tai kurkkukipua. (Mertsola – He 2012: 170–176; Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

Epätyypillistä hinkuuskää esiintyy kouluikäisillä sekä aikuisilla, jotka ovat joko saaneet riittävän rokotesuojan tai sairastaneet aiemmin *B. pertussis* -infektion. Oireina ovat lievät hengitystieoireet ja pitkittynyt, useita viikkoja kestävä puuskittainen yskä, johon ei kuitenkaan yleensä liity hengityksen vinkumista. (Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

Hinkuuskän hoitona käytetään antibiootteja, jotka tulisi aloittaa alle 2 viikon kuluessa taudin alkamisesta. Pienet rokottamattomat lapset tulisi hengitysvaikeuksien ja kouristusriskin vuoksi toimittaa sairaalahoitoon. Yskä voi antibiooteista huolimatta jatkua viikkoja, mutta toistuvia hoitoja ei yleensä tarvita. (Mertsola – He 2012: 170–176.)



### 3 Laboriodiagnostiikka

Hinkuyskän diagnosointi pelkkien kliinisten oireiden perusteella on haastavaa, koska taudin ilmenemismuodot ja oireiden voimakkuus vaihtelevat huomattavasti potilaan iän ja aikaisemman immunisaation vuoksi. WHO on laatinut kliinisen diagnoosin avuksi kriteerit, joiden täyttymisen perusteella voidaan epäillä hinkuyskää. Kriteereinä ovat vähintään kaksi viikkoa kestänyt yskä ja tämän lisäksi yskän puuskittaisuus, sisäänhengityksen vinkuminen tai yskäkohtauksen jälkeinen oksentelu. (WHO 2003: 28–30.) Kuitenkin hinkuyskän erottaminen muista hengitystieoireita aiheuttavista mikrobeista kuten *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* ja erilaisista viruksista on käytännössä mahdotonta ilman laboriodiagnostiikkaa (Zouari – Smaoui – Kerchrid 2012: 111–121).

Hinkuyskän laboriodiagnostiikassa käytettäviä menetelmiä ovat *B. pertussis* -bakteerin eristäminen viljelemällä, bakteerin nukleiinihapon tunnistus PCR-menetelmällä, suora antigeeniosoitus sekä bakteerin tai sen virulenssitekijöiden aikaansaaman immuunivasteen mittaus serologisin menetelmin. Eri menetelmien herkkyyteen ja spesifisyyteen vaikuttavat aikaisemmat kontaktit pertussisbakteerin kanssa, antibioottihoito, immunisaatio ja näytteenotto, joten paras tulos saadaan yhdistämällä eri menetelmiä. (Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

#### 3.1 Viljely

*Bordetella pertussis* -bakteerin viljely on käyttökelpoinen diagnostinen menetelmä erityisesti infektion alkuvaiheessa, mutta menetelmän herkkyys alenee nopeasti yskäoireiden kestäessä pidempään. Sitä käytetään myös lapsilla, joilla serologinen vaste voi olla heikko. Pertussisviljelyssä tulee ottaa huomioon, että negatiivinen tulos ei sulje pois hinkuyskää, sillä pitkään kestänyt infektio sekä aikaisempi antibioottihoito voivat aiheuttaa negatiivisen viljelytuloksen. (Wood – McIntyre 2008: 201-212.) *B. pertussis* -viljelyä varten otetaan näyte dacron- tai kalsium-alginaattikulla ylhäältä nenänielusta joko suoraan sieraimen kautta tai suun kautta taivutetulla näytetikulla. Näyte viljellään kefaleksiinia sisältävälle hiiliagar-maljalle ja kasvatetaan 35 °C:ssa. *B. pertussis* on oksidaasi- ja katalaasiposiitivinen ja se voidaan tunnistaa spesifisellä agglutinaatioreaktiolla. (Mattoo – Cherry 2005: 326–382; UTUlab 2009.)

### 3.2 PCR

DNA-monistusmenetelmä PCR on tehostanut hinkuuskädiagnostiikkaa huomattavasti. Yleisimmin käytetyssä menetelmässä monistetaan *B. pertussis* -bakteerille spesifisiä IS481-geenijaksoja. Viljelyn tavoin se on hyödyllinen menetelmä infektion alkuvaiheessa, mutta sitä ei tulisi käyttää jos oireilu on kestänyt yli 6 viikkoa. PCR voi antaa myös positiivisen tuloksen, vaikka potilaassa ei enää olisikaan eläviä bakteereita. Näytteenotto nukleiinihappomonistusta varten suoritetaan samoin kuin viljelyssä ja usein molemmat tutkimukset tehdäänkin samalla kertaa. Kalsium-alginaattitikon käyttöä PCR-näytteenotossa ei kuitenkaan suositella inhibitoristen tekijöiden vuoksi. (UTUlab 2010; Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

### 3.3 Serologia

Serologisilla menetelmillä mitataan pertussisbakteerin antigeenejä, esimerkiksi pintarakenteita tai toksineja, vastaan muodostuneita vasta-aineita. Pertussisinfektio aiheuttaa IgA-, IgG- ja IgM-luokan vasta-aineiden määrän nousua veressä. Vasta-aineet muodostuvat hitaasti, joten serologiset menetelmät ovat käyttökelpoisia vasta oireilun kesettyä pidempään. Serologisia menetelmiä käytetäänkin erityisesti aikuisten ja vanhempien lasten diagnostiikassa, joilla ainoa oire voi olla pitkään jatkunut yskä ja lääkäriin hakeudutaan vasta pidemmän ajan päästä. (Mattoo – Cherry 2005: 326–382.)

Pertussikselle spesifisten vasta-aineiden mittausta tehdään yleensä ELISA-menetelmällä (enzyme-linked immunosorbent assay). Menetelmä perustuu kuoppalevyn pohjaan kiinnitettyihin antigeeneihin, joihin näytteessä olevat vasta-aineet sitoutuvat. Entsyymi-lemattu sekundäärinen vasta-aine kiinnittyy tähän antigeeni-vasta-ainekompleksiin ja yhdessä substraattinsa kanssa muodostaa mitattavan värillisen tuotteen, jonka intensiteetti on verrannollinen näytteen vasta-aineiden määrään.

Pertussiksen ELISA-diagnostiikassa on tyypillisesti käytetty antigeenina yksittäisiä puhdistettuja antigeeneja kuten PT:a tai FHA:a tai antigeenisekoituksia (Guiso ym. 2011: 307–312). ECDC kuitenkin suosittelee, että hinkuuskän serologisessa määrittämisessä ELISA-menetelmällä käytettäisiin antigeenina puhdistettua pertussistoksiinia. PT on spesifinen *B. pertussis* -bakteerille, joten ristireaktiot muiden mikrobien kanssa ovat epätodennäköisempiä. (ECDC 2012.)

Hinkuyskän serologisten tulosten tulkinnassa tulee ottaa huomioon rokotuksen vaikutus. Käytössä olevat rokotteet sisältävät pertussistoksiinia, joten todellisen infektion ja rokotteen aiheuttamaa IgG-vasta-aineen pitoisuuden nousua ei voida erottaa toisistaan. Lisäksi bakteerin jatkuva kierto populaatiossa aiheuttaa sen, että käytännössä kaikilla aikuisilla esiintyy mitattavia määriä anti-PT-IgG:tä. (Guiso ym. 2011: 307–312.)

Kliinisessä käytössä diagnoosi tehdään usein yhden näytteen serologian perusteella, mutta myös parinäytteitä käytetään. Parinäytteet otetaan 2-4 viikon etäisyydellä toisistaan ja seurataan IgG -vasta-ainepitoisuuden muutosta. Voimakas nousu viittaa pertussisinfektioon. ECDC:n mukaan vain yhtä serologista näytettä käytettäessä optimaalisin cut off -raja anti-PT-IgG:lle on välillä 60 – 75 IU/ml. Mikäli selvää diagnoosia ei voida tehdä yhden näytteen perusteella, suositellaan toisen näytteen tutkimista tai vaihtoehtoisesti anti-PT-IgA -luokan vasta-aineiden mittausta. (ECDC 2012.)

#### **4 Työn tarkoitus ja tavoitteet**

Opinnäytetyön tarkoitus oli koestaa kaupallisia hinkuyskän serologiseen diagnostiikkaan tarkoitettua kittejä, jotka ovat antigeenikoostumukseltaan ECDC:n vuonna 2012 laatiman suosituksen mukaisia eli kiteissä käytetty antigeeni on *Bordetella pertussis* -bakteerin pertussistoksiini. Valittujen kittien valmistajia ei voitu opinnäytetyössä paljastaa, joten kitit numeroitiin numeroilla 1-3. Työhön valittiin kolmen eri valmistajan PT-IgG -kitit sekä kaksi PT-IgA -kittiä.

Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratorion toimeksiannosta. YML:n nykyinen hinkuyskädiagnostiikka perustuu entsyymi-immunologisella menetelmällä tehtävään *Bordetella pertussis* -vasta-aineiden määrittämiseen potilasnäytteistä. Menetelmässä käytetään antigeenina bakteerisonikaattia. ECDC suosittaa kuitenkin käyttämään määrittämisessä antigeenina puhdistettua pertussistoksiinia, joka on *Bordetella pertussis* -bakteerille spesifinen proteiini. (ECDC 2012.) Koska YML:n tällä hetkellä käytössä oleva menetelmä ei täysin vastaa suositusta, haluttiin mahdollista menetelmän vaihtoa varten testata markkinoilla olevia suosituksen mukaisia menetelmäkittejä ja niiden soveltuvuutta.

#### 4.1 Aikaisemmat tutkimukset

Kaupallisten B. pertussis -antigeenien detektioon tarkoitettuja ELISA-kittejä vertailtiin Saksalaisessa tutkimuksessa 2010. Tutkimuksessa vertailtiin Saksassa markkinoilla olevien kaupallisten kittien suorituskykyä. Tutkimuksessa oli mukana 11 IgG-kittiä ja 9 IgA-kittiä. Vain osa kiteistä sisälsi pertussistoksiinia, muissa oli antigeenisekoitus. Referenssimenetelmänä käytettiin puhdistettuja antigeeneja käyttävää in house –ELISA-menetelmää. Tutkimuksessa oli 57 näytettä, joista osa oli kliinisiä pertussisepäilyjä ja osa rokotteen saaneiden potilaiden näytteitä. Lisäksi käytettiin WHO:n referenssinäytteitä. ((Riffelmann – Thiel – Schmetz – Wirsing von Koenig 2010: 4459–4463.)

Tutkimuksen mukaan PT-kitit korreloivat hyvin referenssimenetelmän kanssa, kun taas antigeenisekoitusta käyttävät kitit eivät korreloineet suhteessa referenssiin. Lisäksi spesifisyys ja sensitiivisyys PT-IgG -kiteillä oli huomattavasti parempi kuin muilla kiteillä. Kaikki kitit tunnistivat myös rokotuksesta aiheutuneen IgG-vasta-aineen nousun. (Riffelmann ym. 2010: 4459–4463.)

#### 4.2 Työtä ohjaavat kysymykset

Kittien vertailua tehtiin määrittämällä vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

1. Mikä on kunkin kitin spesifisyys ja sensitiivisyys?
2. Mikä on kittien kokonaisvirhe eli menetelmän toistettavuus?
3. Mittaavatko kitit oikeaa asiaa ja antavatko ne oikeaa tasoa suhteessa tunnettuun referenssinäytteeseen?

## 5 Työn toteutus

### 5.1 Näytemateriaali

Opinnäytetyössä käytettiin pakastettuja seeruminäytteitä, jotka olivat vanhoja potilasnäytteitä. Näytemäärä IgG-mittauksissa oli 78 kpl ja IgA-mittauksissa 103. Osa näyt-

teistä tutkittiin sekä IgG- että IgA-kiteillä. Näytteet numeroitiin juoksevalla numerolla, eikä potilastietoja käytetty näytteiden identifiointiin.

IgG-mittauksiin valittiin vanhojen tulosten perusteella eritasoisia positiivisia näytteitä, joiden IgG-arvo oli vähintään 100 EIU. Lisäksi mukaan otettiin harmaan alueen näytteitä, joissa IgG-arvo vanhalla menetelmällä mitattuna oli 50–100 EIU. Negatiivisiksi näytteiksi valittiin näytteitä, jotka olivat sekä IgG-, IgA- ja IgM-luokan vasta-aineiden suhteen negatiivisia.

IgA-mittauksia varten etsittiin näytteitä, joiden vanha tulos oli selkeästi positiivinen (>100 EIU). Mittauksiin otettiin myös näytteitä, jotka IgG-kiteillä olivat antaneet positiivisen tuloksen. Lisäksi käytettiin IgA-negatiivisia näytteitä.

Sekä IgG- että IgA-kittien mittaussarjoissa oli mukana pakastettuja ulkoisia laaduntarkailunäytteitä eli EQA-näytteitä, joista oli tiedossa kvalitatiivinen tulos. EQA-näytteet käsiteltiin ja tutkittiin kuten potilasnäytteet.

Mittauksissa käytettiin referenssinäytteenä WHO:ltä hankittua pertussisantiseerumia, jonka sisältämäksi anti-PT-IgG-pitoisuudeksi oli ilmoitettu 106 IU ja anti-PT-IgA-pitoisuudeksi 18 IU. Näyte oli kylmäkuivattua poolattua seerumia, joka liuotettiin ja jaettiin 200 µl:n eriin pakastusta varten. Referenssinäytteen avulla tarkistettiin kittien mittaavaan oikeaa asiaa ja antavan oikeaa tasoa.

## 5.2 Työn suoritus

Opinnäytetyön tutkimusosio suoritettiin Yhtyneet Medix laboratorion tiloissa tammihelmikuussa 2014. Työssä testattiin kolmea PT-IgG ja kahta PT-IgA ELISA-kittiä. Valmistajien 1 ja 2 IgG-kittejä oli käytössä kaksi kappaletta ja valmistajan 3 kittiä oli 1,5 pakettia. IgA -kittejä oli valmistajilta 1 ja 2 kumpaakin kaksi pakkausta.

Normaalissa rutiinikäytössä hinkuuskän serologiset tutkimukset ja näytteiden laimennukset tehdään YML:ssa Bep III -analysaattorilla, mutta opinnäytetyössä kaikki ELISA-menetelmään kuuluvat vaiheet tehtiin käsin. Levyjen pesut tehtiin Wellwash Versa -pesurilla ja absorBanssien mittausta Multiskan Plus -fotometrillä. Ainoastaan valmistajan 3 kitti oli mahdollista ajaa Bep III -analysaattorilla.

Kittien ELISA-kuoppalevyt jaettiin kahtia, jotta saatiin tehtyä useampia näytesarjoja. Yhden päivän aikana tehtiin yhden tai kahden valmistajan kitit, riippuen siitä kuinka paljon aikaa kului ensin sopivien näytteiden etsimiseen. Tutkimusten suorituksessa noudatettiin aina kunkin kitin valmistajan ohjeita. Protokolla vaihteli valmistajien välillä inkubaatioaikojen suhteen, mutta muuten suoritus oli kaikilla kiteillä sama. ELISA-protokolla koostui seuraavasti:

1. Näytteiden laimennus kitin laimennuspuskurilla
2. Standardien/kalibraattorien/kontrollien ja näytteiden pipetointi levyille
3. Inkubaatio +37 °C:ssa
4. Pesu
5. Konjugaatin lisäys
6. Inkubaatio huoneenlämmössä tai +37 °C:ssa kitistä riippuen
7. Pesu
8. Substraatin lisäys
9. Inkubaatio valolta suojattuna huoneenlämmössä tai +37 °C:ssa
10. Reaktion pysäytys STOP-reagenssilla
11. Absorbanssin mittaaminen

## 6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tuloksissa keskitytään pääasiassa PT-IgG -kittien tuloksiin. Tulosten käsittely aloitetaan vertaamalla kiteillä saatuja tuloksia vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin (taulukko 1) Tulokset eivät ole kuitenkaan suoraan verrattavissa toisiinsa, koska vanha menetelmä ja tutkitut kitit mittaavat eri asiaa.

Taulukko 1. Kiteillä saadut negatiiviset tulokset, harmaan alueen tulokset (gz), ja positiiviset tulokset suhteessa alkuperäisiin vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin.

alkup. neg n=11	neg	gz	pos
valmistaja 1	9/11	1/11	1/11
valmistaja 2	9/11	1/11	1/11
valmistaja 3	3/5	1/5	1/5

<b>alkup. gz n=30</b>			
valmistaja 1	15/30	6/30	9/30
valmistaja 2	15/30	6/30	9/30
valmistaja 3	8/16	1/16	7/16
<b>alkup. pos n=40</b>			
valmistaja 1	24/39	7/39	8/39
valmistaja 2	29/39	2/39	8/39
valmistaja 3	18/31	5/31	8/31

Vanhalla menetelmällä negatiiviseksi mitattuja näytteitä (pitoisuus < 50 EIU) oli 11 kpl, joista valmistajan 1 ja 2 kiteillä negatiiviseksi saatiin yhdeksän näytettä ja positiiviseksi yksi. Lisäksi yhdestä näytteestä saatiin harmaan alueen tulos. Valmistajan 3 kitillä mitattiin negatiivisista näytteistä vain viisi, joista kitillä saatiin negatiiviseksi kolme näytettä. Näytteet, joista saatiin vanhasta negatiivisesta tuloksesta poikkeava harmaan alueen tulos sekä positiivinen tulos, olivat kaikilla kolmella kitillä samat.

Vanhalla menetelmällä mitattuja harmaan alueen näytteitä (pitoisuus 50-100 EIU) tutkittiin 30 kpl kiteillä 1 ja 2 sekä valmistajan 3 kitillä 16 kpl. Valmistajien 1 ja 2 kiteillä saatiin näistä negatiivinen tulos 15:sta näytteestä, harmaan alueen tulos kuudesta ja positiivinen yhdeksästä näytteestä. Valmistajan 3 kitillä mitattiin 16 vanhaa harmaan alueen näytettä, joista kahdeksasta saatiin negatiivinen, yhdestä gz ja seitsemästä positiivinen. Puolet vanhoista harmaan alueen tuloksista osoittautui PT-kiteillä negatiiviseksi ja näytteet, joista saatiin poikkeavia tuloksia, olivat kaikilla kiteillä samat.

Vanhoja positiivisia näytteitä (pitoisuus > 100 EIU) oli 40 kpl ja suurin osa osoittautui tutkittavilla kiteillä negatiivisiksi. Valmistajan 1 kitillä saatiin neljästä vanhasta positiivisesta näytteestä harmaan alueen tulos ja kahdella muulla kitillä samat näytteet olivat negatiivisia. Kaikilla kolmella kitillä saatiin positiiviset tulokset seitsemästä samasta näytteestä. Yksi näyte oli positiivinen valmistajan 3 kitillä, mutta negatiivinen kahdella muulla, joten voidaan olettaa tuloksen olevan virheellinen.

## 6.1 Spesifisyys ja sensitiivisyys

Vanhalla menetelmällä mitatut tulokset eivät erilaisen antigeenikoostumuksensa vuoksi ole suoraan verrattavissa PT-kiteillä saataviin tuloksiin, eikä niitä näin ollen voitu käyttää referenssinä kittien spesifisyyden ja sensitiivisyyden selvittämiseksi. Tästä syystä oikeiksi negatiivisiksi määritettiin näytteet, joista saatiin negatiivinen tulos vähintään kahdella kitillä kolmesta. Oikeita negatiivisia oli näin ollen 28 kpl. Vastaavasti oikeita positiivisia katsottiin olevan näytteet, joille vähintään 2/3 kiteistä antoi positiivisen tuloksen. Oikeita positiivisia oli näin ollen 16 kpl.

Taulukko 2. Valmistajan 1 spesifisyys ja sensitiivisyys.

	positiivinen	negatiivinen	yhteensä
<b>oikea positiivinen</b>	16	0	16
<b>oikea negatiivinen</b>	4	24	28
<b>Sensitiivisyys</b>			
		100%	
<b>Spesifisyys</b>			
		85,7 %	

Valmistajan 1 kitillä saatiin kaikista oikeista positiivista näytteistä positiivinen tulos eli kittien sensitiivisyys oli 100 %. Oikeista negatiivisista näytteistä kitti tunnisti 24, joten spesifisyydeksi saatiin 85,7 %.

Taulukko 3. Valmistajan 2 spesifisyys ja sensitiivisyys.

	positiivinen	negatiivinen	yhteensä
<b>oikea positiivinen</b>	16	0	16
<b>oikea negatiivinen</b>	0	28	28
<b>Sensitiivisyys</b>			
		100%	
<b>Spesifisyys</b>			
		100 %	

Valmistajan 2 kitti tunnisti kaikki oikeat positiiviset positiivisiksi ja negatiiviset negatiivisiksi, joten sensitiivisyydeksi ja spesifisyydeksi saatiin 100 %.



Taulukko 3. Valmistajan 3 spesifisyys ja sensitiivisyys.

	positiivinen	negatiivinen	yhteensä
<b>oikea positiivinen</b>	15	1	16
<b>oikea negatiivinen</b>	3	25	28
<b>Sensitiivisyys</b>			
		93.8 %	
<b>Spesifisyys</b>			
		89.3 %	

Valmistajan 3 kitillä saatiin oikeista positiivisista yksi negatiivinen tulos, joten sensitiivisyydeksi tuli 93,8 %. Oikeista negatiivisista näytteistä kitti antoi kolmelle positiivisen tuloksen, jolloin kitin spesifisyydeksi saatiin 89,3 %.

#### 6.1.1 Kliininen tarkastelu

Tutkituista näytteistä 16 oli lausuttu mahdollisena tuoreena tai hiljattain sairastettuna hinkuyskäinfektiona. Taulukossa 4 on esitetty kuinka monta näistä tapauksista kunkin valmistajan kitti osoitti positiiviseksi ja kuinka monta negatiiviseksi.

Taulukko 4. Todennäköiset tunnistetut hinkuyskätapaukset.

	neg/gz	pos
<b>Valmistaja 1</b>	5/16	11/16
<b>Valmistaja 2</b>	5/16	11/16
<b>Valmistaja 3</b>	4/15	11/15

Kaikki kitit tunnistivat samat näytteet positiiviseksi. On mahdollista, että osa vanhoista positiivisista hinkuyskänä lausutuista näytteistä ei ole todellisuudessa ollut hinkuyskää tai on ollut esimerkiksi *B. parapertussis* -bakteerin aiheuttamaa.

## 6.2 Kokonaisvariaatio

Kokonaisvariaatio (CV%<sub>tot</sub>) koostuu sarjan sisäisestä (CV%<sub>sis</sub>) ja sarjojen välisestä (CV%<sub>väl</sub>) variaatiosta. Nämä määritettiin jokaisen valmistajan kitille erikseen. Kokonaisvariaatio saatiin kaavalla  $2x\sqrt{CV_{sis}^2 + CV_{väl}^2}$

### 6.2.1 Sarjan sisäinen variaatio

Sarjan sisäistä variaatiota tutkittiin tekemällä osasta näytteitä rinnakkaismäärityksiä, joissa sama näyte ajettiin kahdesti saman sarjan sisällä. Tuloksista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta ja näiden perusteella saatiin sarjan sisäinen variaatio (taulukko 5).

Taulukko 5. Kittien sisäiset variaatiot.

	n	SD	KA	CV% <sub>sis</sub>	ilmoitettu
<b>Valmistaja 1</b>	30	24,1	149,5	16,1	-
<b>Valmistaja 2</b>	29	9,75	116,6	8,4	7,6 - 9,9
<b>Valmistaja 3</b>	17	2,78	40,7	6,8	2,2 - 3,7

Valmistajalla 1 oli rinnakkaisia näytteitä kaikkiaan 30 ja sisäiseksi variaatioksi saatiin 16,1 %. Valmistajalla 2 rinnakkaisia näytteitä oli 29 ja sisäiseksi variaatioksi saatiin 8,4 %, mikä on valmistajan ilmoittamissa rajoissa. Valmistajan 3 kitillä mitattiin rinnakkaisia näytteitä vain 17 ja sisäiseksi variaatioksi saatiin 6,8 %, mikä on hieman valmistajan ilmoittamaa korkeampi.

### 6.2.2 Sarjojen välinen variaatio

Sarjojen välistä variaatiota tutkittiin mittaamalla samaa näytettä aina kahdessa eri sarjassa ja laskemalla tuloksista keskiarvo, keskihajonta ja CV%. Kaikkien eri sarjoissa ajettujen näytteiden variaatiokertoimen keskiarvosta saatiin kunkin kitin sarjojen välinen variaatio (taulukko 6).

Taulukko 6. Kittien sarjojen väliset variaatiot

	<b>n</b>	<b>CV%väl</b>	<b>ilmoitettu</b>
<b>Valmistaja 1</b>	14	14,9	-
<b>Valmistaja 2</b>	19	6,4	10,7 - 16,3
<b>Valmistaja 3</b>	10	14,1	6,9 - 9,9

Valmistajan 1 kitillä mitattiin 14 näytettä eri sarjoissa ja sarjojen väliseksi variaatioksi saatiin 14,9 %. Valmistajan 2 kitillä näytteitä mitattiin 19 ja variaatioksi saatiin 6,4 %. Valmistajan 3 kitillä mitattiin 10 näytettä eri sarjoissa ja variaatioksi saatiin täten 14,1 %.

Taulukko 7. – Kittien kokonaisvariaatio

	<b>Valmistaja 1</b>	<b>Valmistaja 2</b>	<b>Valmistaja 3</b>
<b>CV%sis</b>	16,1	8,4	6,8
<b>CV%väl</b>	14,9	6,4	14,1
<b>CV%tot</b>	21,9	10,6	15,7

Valmistajan 1 kitille saatiin kokonaisvariaatioksi 21,9, valmistajan 2 kitille 10,6 ja valmistajan 3 kitille 15,7. Saadut variaatiot ovat kuitenkin vain suuntaa antavia, koska näyttemäärät ja toistot olivat pieniä.

### 6.3 Oikeellisuus

WHO:n tunnetun pitoisuuden referenssinäytteen sekä ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla selvitettiin, mittaavatko kitit oikeaa asiaa ja antavatko ne oikeaa tulostasoa. Referenssinäytettä mitattiin useaan kertaan kaikilla kiteillä ja selvitettiin, kuinka paljon tulokset poikkeavat annetusta pitoisuudesta. Lisäksi tutkittiin menetelmän lineaarisuutta tekemällä referenssinäytteestä laimennussarja.

### 6.3.1 Poikkeama referenssinäytteestä

WHO:n referenssinäytteen anti-PT IgG –pitoisuudeksi oli ilmoitettu 106 IU. Poikkeama referenssinäytteestä saatiin määrittämällä kuinka paljon keskiarvo kaikista referenssinäytteen mittaustuloksista poikkeaa tästä arvosta (taulukko 8).

Taulukko 8. Poikkeamana referenssinäytteen arvosta

	n	KA	SD	MIN	MAX	ERO %
<b>Valmistaja 1</b>	6	138,6	22,4	104,8	163,4	+ 31 %
<b>Valmistaja 2</b>	7	99,4	5,9	88,39	104,4	- 6 %
<b>Valmistaja 3</b>	5	68,8	4,3	65,1	75,2	- 35 %

Valmistajan 1 kitillä WHO:n referenssinäytettä mitattiin 6 kertaa ja tulosten keskiarvo oli 138,6 IU, mikä oli 31 % tavoitearvoa suurempi. Valmistajan 2 kitillä referenssinäyte mitattiin 7 kertaa ja keskiarvo oli 104,6 IU. Poikkeama todellisesta arvosta oli - 6 %. Valmistajan 3 kitti antoi viidellä mittauksella referenssinäytteen keskiarvoksi 68,8 IU, mikä oli 35 % matalampi kuin näytteen todellinen pitoisuus. Kaikilla kiteillä saadut tulokset referenssinäytteestä vaihtelivat suuresti sarjasta toiseen, mutta valmistajan 2 kitillä saadut tulokset olivat selvästi lähimpänä ilmoitettua pitoisuutta. Valmistajan 1 kitti antoi kaikissa mittauksissa selvästi liian korkeaa pitoisuutta ja valmistajan 3 kitti puolestaan huomattavan matalaa.

### 6.3.2 EQA-näytteet

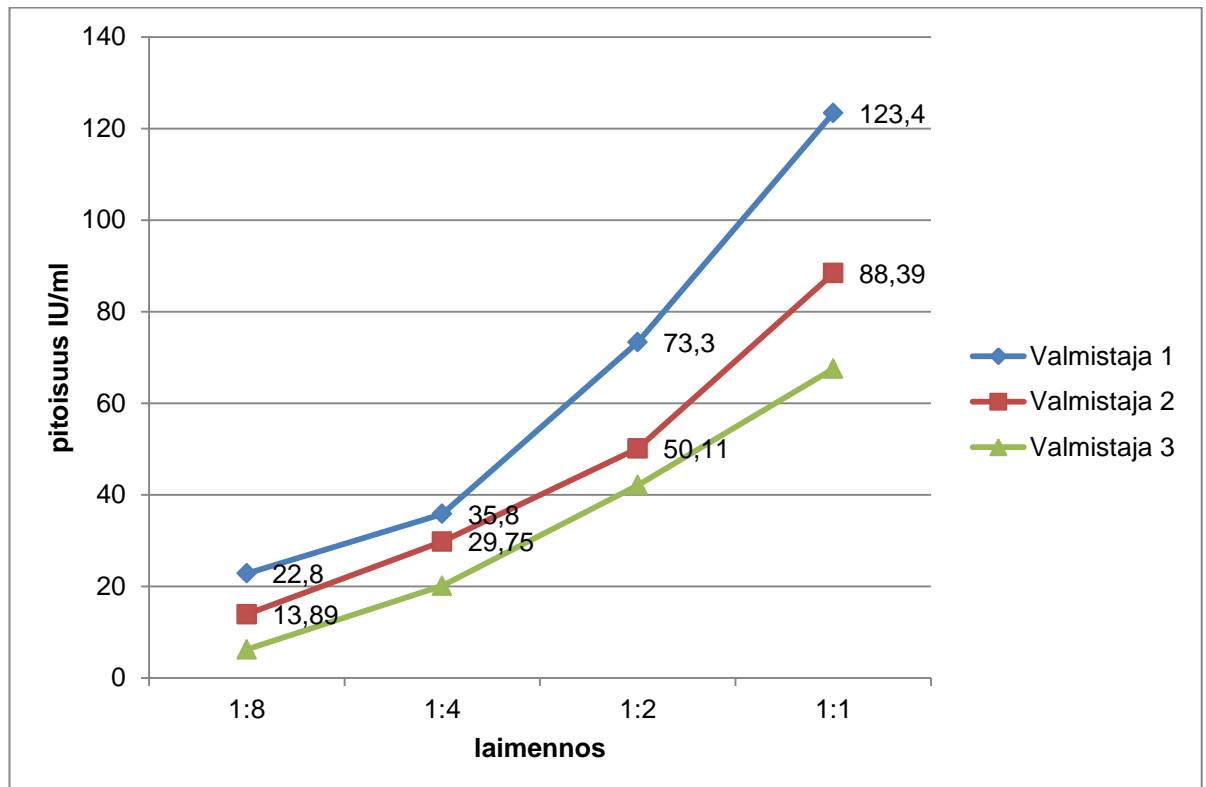
Ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä ajettiin kaikilla kiteillä 18 kpl. Näytteistä oli tiedossa kvalitatiivinen tulos, mutta ei numeerista pitoisuutta. Saadut pitoisuudet ja kvalitatiiviset tulokset on listattu taulukossa 9.

Laaduntarkkailunäytteistä saatiin kaikilla kiteillä hyvät tulokset. Kaikki kitit tunnistivat positiiviset EQA-näytteet positiivisiksi, ainoastaan yksi muilla selkeä positiivinen oli valmistajan 2 kitillä harmaan alueen tulos. Tulos oli kuitenkin lähellä positiivisen rajaa. Näytteet, joille oli annettu tulokseksi +/- olivat tutkituilla kiteillä pääosin negatiivisia.

### 6.3.3 Lineaarisuus

Kittien lineaarisuutta tutkittiin laimentamalla WHO:n referenssinäytettä kunkin kitin laimennuspuskurilla 1:2, 1:4 ja 1:8 ja mittaamalla laimennosten pitoisuudet. Tuloksista piirrettiin kuvaajat (kuvio 1).

Kuvio 1. Laimennetun referenssinäytteen pitoisuudet kaikilla kolmella kitillä.



Kaikkien kolmen kitin lineaarisuus on laimennossuoran perusteella melko hyvä. Lineaarisuudesta olisi saanut tarkemman kuvan, mikäli olisi ollut mahdollista mitata useampia rinnakkaisia näytteitä, mutta yhdenkin laimennussarjan perusteella voidaan sanoa menetelmien olevan melko lineaarisia.

### 6.4 IgA-kittien tulokset

IgA-kittien spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä ei voitu määrittää, koska vain kahden eri kitin otannalla ei voitu luotettavasti määrittellä oikeaa positiivista ja negatiivista tulosta. Tästä syystä saatuja tuloksia verrattiin vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin (taulukko 10)

Taulukko 10. IgA-kiteillä saadut tulokset suhteessa vanhoihin tuloksiin.

alkup. neg n=48	<b>neg</b>	<b>pos</b>
<b>valmistaja 1</b>	39/40	1/40
<b>valmistaja 2</b>	48/48	-
alkup. gz n=16	<b>neg</b>	<b>pos</b>
<b>valmistaja 1</b>	7/16	9/16
<b>valmistaja 2</b>	14/16	2/16
alkup. pos n=39		
<b>valmistaja 1</b>	10/39	29/39
<b>valmistaja 2</b>	25/39	14/39

Vanhoja negatiivisia näytteitä oli 48, joista valmistajan 1 kitillä saatiin negatiivinen tulos 39 näytteestä ja positiivinen yhdestä. Valmistajan 2 kitti antoi kaikista negatiivisen tuloksen. Vanhoja harmaan alueen näytteitä oli 16 kpl ja näistä valmistajan 1 kitillä saatiin 7 negatiivista ja 9 positiivista. Valmistajan 2 kitti antoi näistä 14 negatiivista ja 2 positiivista. Positiiviset tulokset saatiin molemmilla kiteillä samoista näytteistä. Toinen näistä oli aiemmin lausuttu hinkuyskänä ja näytteestä oli saatu myös IgG-kitillä positiivinen tulos.

Vanhoja positiivisia näytteitä oli 39 kpl. Näistä valmistajan 1 kitillä saatiin negatiivinen tulos 10 näytteestä ja positiivinen 29:stä. Valmistajan 2 kitillä saatiin puolestaan negatiivinen tulos 25 näytteestä ja positiivinen 14:sta.

IgG-kittien tavoin IgA-kiteistä selvitettiin kokonaisvariaatio määrittämällä sisäinen ja sarjojen välinen variaatio. Tulokset on taulukoitu alla (taulukko 11 ja 12)

Taulukko 11. IgA-kittien sarjan sisäinen variaatio

	<b>n</b>	<b>SD</b>	<b>KA</b>	<b>CV%sis</b>	<b>ilmoitettu</b>
<b>Valmistaja 1</b>	21	1,79	42,0	4,3	-
<b>Valmistaja 2</b>	20	0,45	20,7	2,2	2,1 - 9,1

Valmistajan 1 kitillä määritettiin rinnakkaisia näytteitä 21 kpl ja sisäiseksi variaatioksi saatiin 4,3 %. Valmistajan 2 kitillä rinnakkaisia näytteitä tehtiin 20 ja sisäiseksi variaati-

oksi saatiin 2,2 %. Sisäinen variaatio on molemmilla kiteillä erittäin alhainen, mikä tarkoittaa, että samasta näytteestä saadut tulokset vaihtelevat hyvin vähän.

Taulukko 12. IgA-kittien sarjojen väliset variaatiot

	<b>n</b>	<b>CV%väl</b>	<b>ilmoitettu</b>
<b>Valmistaja 1</b>	20	9,9	-
<b>Valmistaja 2</b>	21	10,8	7,0 – 12,1

Valmistajan 1 kitillä tehtiin 20 näytteestä sarjojen välisen variaation määrittämistä ja tulokseksi saatiin 9,9 %. Valmistajan 2 kitillä näytteitä tutkittiin 21 ja variaatioksi saatiin 10,8, mikä oli valmistajan ilmoittamissa rajoissa. Valmistajan 1 kitin kokonaisvariaatioksi saatiin täten 10,8 % ja valmistajan 2 kitille 11,0 %.

WHO:n referenssinäytteen mittaustuloksista IgA-kiteillä saatiin määritettyä poikkeama annetusta pitoisuudesta, joka oli 18 IU (taulukko 13).

Taulukko 13. IgA-kittien poikkeamana referenssinäytteen arvosta.

	<b>n</b>	<b>KA</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>ERO %</b>
<b>Valmistaja 1</b>	6	19,6	2,6	16,4	22,9	+ 9 %
<b>Valmistaja 2</b>	6	20,0	2,1	17,54	23,96	+ 11 %

Molemmat IgA-kitit antoivat referenssinäytteelle melko oikeasuuntaisia tuloksia. Valmistajan 1 kitillä tulosten keskiarvo erosi referenssistä 9 % ja valmistajan 2 kitillä 11 %. EQA-näytteistä saatiin myös molemmilla IgA-kiteillä erittäin hyvät tulokset. Kaikki tulokset olivat annettujen arvojen mukaisia. EQA-tulokset on esitetty taulukossa 14.

IgA-kiteillä mitatuista näytteistä 13 oli lausuttu todennäköisenä tuoreena tai hiljattain sairastettuna hinkuyskänä. Näistä valmistajan 1 kitillä saatiin positiivinen tulos 11:sta ja negatiivinen kahdesta. Valmistajan 2 kitillä positiivinen tulos saatiin kahdeksasta näytteestä ja negatiivinen viidestä. Näytteet, joista saatiin molemmilla kiteillä positiivinen tulos, olivat pääsääntöisesti olleet myös IgG-kiteillä positiivisia.

## 7 Pohdinta

### 7.1 Yhteenveto tuloksista

Työn tarkoituksena oli koestaa ja verrata pertussistoksiinia antigeeninä käyttäviä IgG- ja IgA –kittettä hinkuuskän serologisessa diagnostiikassa. Tarkoituksena oli saada alustavaa tietoa siitä, mikä kolmen eri valmistajan kiteistä olisi sopivin Yhtyneet Medix Laboratorion käyttöön. Vertailukohteina olivat kittien spesifisyys, sensitiivisyys ja kokonaisvariaatio.

Sensitiivisyys eli menetelmän kyky tunnistaa oikeat positiiviset näytteet oli kaikilla IgG-kiteillä hyvä, jopa 100 %. Spesifisyys eli kyky tunnistaa oikeat negatiiviset vaihteli enemmän, ainoastaan valmistajan 2 kitille saatiin tästäkin 100 %.

Kittien kokonaisvariaatiot määritettiin sarjan sisäisen ja sarjojen välisen variaation avulla. Pienen otoksen vuoksi variaatiot olivat melko korkeita. IgG-kiteillä matalin kokonaisvariaatio (10,6 %) oli valmistajan 2 kitillä ja korkein puolestaan valmistajalla 1 (21,9 %). IgA-kiteillä variaatiot olivat molemmilla melko samoissa lukemissa ja suhteellisen matalia.

Vertailun kannalta olisi ollut hyvä määrittää kiteille myös systemaattista virhettä, mikä olisi voitu tehdä referenssinäytteen avulla. Tämä olisi kuitenkin vaatinut huomattavasti enemmän mittaustuloksia, kuin tässä työssä oli mahdollista tehdä. Tästä syystä systemaattinen variaatio päädyttiin jättämään pois ja määrittämään myöhemmin valitun kitin käyttöönoton yhteydessä suuremmalla näytemäärällä.

Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella valmistajan 2 IgG-kitti vaikuttaisi lupavimmalta vaihtoehdolta. IgA-kittien välillä oli vähemmän eroja. Käytännössä varmaankin sekä IgG- että IgA-kitit tullaan kuitenkin hankkimaan samalta valmistajalta.

### 7.2 Tulosten luotettavuuden arviointi

Opinnäytetyössä tulosten luotettavuuden kannalta keskeistä oli pieni otos, jonka perusteella eri valmistajien kitejä arvioitiin. Näytteiden määrä itsessään oli kohtalainen, mutta ongelmaksi muodostui reagenssipakkausten rajallinen määrä. Koska kultakin valmis-



tajalta oli testattavana korkeintaan kaksi reagenssipakkausta, ei esimerkiksi toistuttavuutta ollut mahdollista testata riittävästi. Jotta sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä variaatiosta saisi luotettavaa tietoa, tulisi samaa näytettä ajaa ainakin kymmenen kertaa sarjan sisällä ja eri sarjoissa.

Toinen tulosten luotettavuuteen vaikuttava tekijä oli itse testien teko. Lähes kaikki ELISA-vaiheet tehtiin käsin, joten käsipipetoinnista johtuvaa epätarkkuutta ja heittelyä esiintyy enemmän verrattuna analysaattorilla tehtävään ELISA-testiin. Rinnakkaisnäytteen tuloksista huomaa selvästi, että pipetointirutiini kuoppalevylle kehittyi työn edessä ja rinnakkaistulokset paranivat koko ajan.

Kittien kontrollitulokset on listattu taulukoissa 14-16 ja koska kontrollitulokset olivat kaikissa sarjoissa tavoiteväleissä tai tavoitearvossa, voidaan kittien antamia tuloksia pitää luotettavina ja olettaa kittien toimivan oikein.

Referenssinäytteen tulosten perusteella voidaan sanoa kittien mittaavan oikeaa asiaa, eli IgG- ja IgA-luokan vasta-aineita pertussistoksiinille. Referenssinäytteestä saadut tulokset kuitenkin erosivat melko paljon annetusta pitoisuudesta, joten on vaikea sanoa antavatko kitit oikeaa tulostasoa. Tätäkin olisi hyvä selvittää suuremmalla määrällä mittauksia.

### 7.3 Lopuksi

Opinnäytetyön kokeellinen osuus meni sujuvasti ja ilman erityisiä ongelmia. Eniten päänvaivaa aiheutti sopivien näytteiden löytäminen. Näytteiden valinnassa käytettiin hyväksi vanhoja tuloksia, mistä syystä riittävän korkeiden positiivisten näytteiden löytäminen oli välillä hankalaa. Suuri osa vanhalla menetelmällä saaduista positiivisista tuloksista osoittautui PT-kiteillä negatiiviseksi ja vanhoista potilasnäytteistä ei löytynyt niin paljon korkeita tuloksia kuin mitä olisi toivottu. Itse ELISA-testien suoritus sujui ongelmitta ja alkoi jo loppua kohden sujua rutiinilla.

Pienestä otoksesta huolimatta vertailussa olleista kiteistä saatiin sen verran informaatiota, että YML:ssa päädyttiin ottamaan valmistajan 2 IgG- ja IgA-kitit käyttöön. Laboratorion hinkuuskädiagnostiikkaan käytettävä menetelmä tulee siis analysaattorilla tehtävien lisätestausten jälkeen vaihtumaan.

## Lähteet

Bordetella pertussis, nukleiinihapon osoitus (PCR) 2010. Ohjekirja. UTUlab. Verkkodokumentti. Päivitetty 12.10.2010.

<<http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/mikrobiologia/BORDETELLA%20PERTUSSIS%20c%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20%28PCR%29.pdf>> Luettu 4.4.2014.

Bordetella pertussis, viljely. 2009. Ohjekirja. UTUlab. Verkkodokumentti. Päivitetty 12.1.2009

<<http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/mikrobiologia/BORDETELLA%20PERTUSSIS,%20VILJELY.pdf>>. Luettu 4.4.2014.

European Centre for Disease Prevention and Control 2012. Guidance and Protocol for the serological diagnosis of human infection with Bordetella pertussis. ECDC.

Guiso, N – Berbers, G – Fry, N.K. – He, Q, Riffelmann, M – Wirsing von könig, C.H. 2011. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. European journal of clinical microbiology & infectious diseases 30. 307–312.

Mattoo, Seema – Cherry, James D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. Clinical Microbiology Reviews 18(2). 326–382.

Mertsola, Jussi – He, Qiushui 2010. Bordetella pertussis ja muut bordetellat. Teoksessa Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri, Vaara (toim.): Mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Riffelmann, M – Thiel, K. – Schmetz, J. – Wirsing von Koenig, C.H. 2010. Performance of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Bordetella pertussis. Journal of Clinical Microbiology 48. 4459–4463.

WHO 2010. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record 85(40). 385–400.

WHO 2003. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. *Vaccines and Biologicals*. 28–30.

Wood, N. – McIntyre, P. 2008. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatric respiratory reviews* 9(3). 201–212.

Zouari, Asma – Smaoui, Hanen – Kechrid, Amel 2012. The diagnosis of pertussis: which method to choose? *Critical reviews in Microbiology* 38(2). 111–121.

## Näytteiden tulokset

Taulukko 9. EQA-näytteiden IgG-kiteillä

EQA-näyte	oikea tulos	Valmistaja 1		Valmistaja 2		Valmistaja 3	
		IU/ml	tulos	IU/ml	tulos	IU/ml	tulos
1/13 s001	-/+	27	-	42,05	gz	25,9	-
1/13 s002	+	79,1	+	>max	+	>200	+
2/13 s011	+	477,7	+	>max	+	>200	+
2/13 s012	-/+	27	-	40,29	gz	30,2	-
3/13 s021	+	64,3	+	1734,59	+	>200	+
3/13 s022	-/+	25,3	-	25,85	-	12,9	-
4/13 s031	+	78,4	+	6397,5	+	>200	+
4/13 s032	-/+	52,3	-	146,2	+	42,5	+
1/11 1	+	273,1	+	249,92	+	194	+
2/11 3	+	327,5	+	315,2	+	193	+
3/11 6	+	307,3	+	92,6	gz	173	+
4/11 8	+	448,5	+	189,85	+	>200	+
1/12 1	+	277,2	+	148,71	+	>200	+
2/12 3	+	340,8	+	130,57	+	>200	+
2/12 4	-/+	37,2	-	10,23	-	24,7	-
4/12 8	+	335,2	+	145,75	+	>200	+
3/12 5	+	315,8	+	110,39	+	>200	+
3/12 6	-/+	29	-	9,39	-	5,82	-

Taulukko 14. EQA-tulokset IgA-kiteillä

	oikea tulos	Valmistaja 1		Valmistaja 2	
		IU/ml	tulos	IU/ml	tulos
EQA 1/13 s001	-	5,8	-	11,63	-
EQA 1/13 s002	+	50,4	+	39,38	+
EQA 2/13 s011	+	68,1	+	44,89	+
EQA 2/13 s012	-	5,4	-	11,72	-
EQA 3/13 s021	+	57,5	+	29,45	+
EQA 3/13 s022	-	5,7	-	10,72	-
EQA 4/13		59,1	+	33,67	+

s031					
EQA 4/13 s032		6,4	-	7,85	-
EQA 1/12 1	+	63,8	+	29,69	+
EQA 2/12 3	+	68,1	+	27,55	+
EQA 2/12 4	-	7,4	-	9,27	-
EQA 3/12 5	+	47,3	+	21,69	+
EQA 3/12 6	-	6,2	-	2,2	-
EQA 4/12 8	+	69,4	+	35,85	+

IgG-kittien kontrollitulokset

Taulukko 14. Valmistajan 1 kontrollitulokset

	Positiivinen kontrolli
sarja 1	141,4
sarja 2	179,6
sarja 3	142,5
sarja 4	162,7
keskiarvo	156,55
keskihajonta	18,22
cv%	11,63
tavoiteväli	104-194

Taulukko 15. Valmistajan 2 kontrollitulokset

	Negatiivinen kontrolli
sarja 1	neg
sarja 2	neg
sarja 3	neg
sarja 4	neg
tavoitearvo	neg

Taulukko 16. Valmistajan 3 kontrollitulokset

	Matala kontrolli	Korkea kontrolli
sarja 1	1,55	111
sarja 2	6,42	152
sarja 3	1,60	113
keskiarvo	3,19	125,3

keskihajonta	2,79	18,9
cv%	87,7	15,1
tavoitearvo	8,0	119,6
tavoiteväli	0-20	65,8-173,3