



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Satu Savolainen

Hepatiitti E-viruksen diagnostiikka

Menetelmien verifiointi vasta-aineiden ja nukleinihappojen
osoittamiseksi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalyttikon tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

28.11.2019

Tekijä(t) Otsikko	Satu Savolainen Hepatiitti E-viruksen diagnostiikka Menetelmien verifiointi vasta-aineiden ja nukleiinihappojen osoittamiseksi
Sivumäärä Aika	34 sivua + 2 liitettä 28.11.2019
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalyttikon tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	FT, Sairaalamikrobiologi Niina Putkuri lehtori Merja Ojala
<p>Veripalveluissa maailmanlaajuisesti seurataan eri viruksien esiintymistä väestössä, ja arvioidaan riskiä virusten leviämiseen verensiirtojen välityksellä. Viime vuosina useat veripalvelut Euroopassa ovat tehneet kartoitusta hepatiitti E-viruksen (HEV) osalta ja osa on ottanut sen tutkimisen mukaan verenluovuttajien näytteistä tehtäviin seulontoihin. SPR Veripalvelun suunnitelmissa on tehdä vastaava kartoitus Suomessa ja tutkimiseen on tarkoitus käyttää Veripalvelussa jo olemassa olevaa laitekantaa.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida menetelmät hepatiitti E-viruksen nukleinihapon ja IgG- ja IgM-vasta-aineiden osoittamiseksi. HEV RNA:n osoittamiseksi testattiin Grifolsin Panther-analysaattorilla Procleix HEV Assay ja vasta-ainetutkimuksissa käytettiin bioMérieuxin Vidas 3 -analysaattorilla VIDAS Anti HEV IgG (HEVG) ja IgM (HEVM) menetelmiä. Menetelmien verifiointissa tutkittiin menetelmien herkkyyttä, tarkkuutta ja toistettavuutta. Näytteinä käytettiin HEV RNA:n ja vasta-aineiden suhteen positiivisia (BioQkontrolli, kittikontrollit, 2 eri serokonversiopaneelia) ja negatiivisia näytteitä. Näytesarjoista saatiin Procleix HEV Assay, VIDAS Anti HEV IgG (HEVG) ja IgM (HEVM) menetelmien tarkkuus (100 %, 100 %, 100 %) herkkyys (96,23 %, 100 %, 100 %) sekä sarjojen välinen (75 %, 4,86 %, 4,26 %) että sisäinen toistettavuus (57 %, 8,86 %, 4,32 %).</p> <p>Tulokset osoittivat sekä Procleix HEV Assay, että Vidas Anti-HEV menetelmien toimivan verifiointikriteerien mukaisesti. Opinnäytetyön johtopäätöksenä on, että menetelmät soveltuvat käytettäväksi Veripalvelussa tutkittaessa hepatiitti E -viruksen esiintymistä verenluovuttajien keskuudessa.</p>	
Avainsanat	hepatiitti E-virus, procleix, vidas, HEV RNA, anti-HEV

Author(s) Title	Satu Savolainen Verification of Diagnostic Tests for Hepatitis E virus
Number of Pages Date	34 pages + 2 appendices 28 November 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Niina Putkuri, PhD, Clinical Microbiologist Merja Ojala, Senior Lecturer
<p>Blood services worldwide follow the incidence of different viruses among the population and assess the risk of contamination via blood transfusions. During last few years several surveillance studies of hepatitis E virus prevalence among blood donors have been performed throughout Europe and as a result few of the European blood services have included HEV RNA testing in their screening protocols of blood donations.</p> <p>The aim of this study was to verify the tests to detect hepatitis E virus nucleic acid and antibodies from donor samples in Finnish Red Cross (FRC) Blood Service. The verified tests are planned to be used in the surveillance study of Finnish blood donor population. The nucleic acid testing is performed by Grifols Panther Procleix HEV RNA Assay and the antibody testing with bioMérieux Vidas 3 Anti-HEV IgG and Anti-HEV IgM methods. Both analyzers exist already in FRC.</p> <p>The aim of the verification was to determine the sensitivity, specificity and precision of the tests and show the results fulfil acceptance criteria. HEV RNA and antibody positive samples (BioQcontrol, assay kit control and 2 different seroconversion panel) and negative plasma samples were used. The results of Procleix HEV RNA Assay and Anti-HEV IgG and Anti-HEV IgM specificity (100 %, 100 %, 100 %), sensitivity (96,23 %, 100 %, 100 %) and precision between run (75 %, 4,86 %, 4,26 %) and within run (57 %, 8,86 %, 4,32 %) were determined.</p> <p>The results lead to the conclusions that the methods are suitable to be used in the FRC Blood Service when studying prevalence of hepatitis E virus in Finnish blood donors. All tests met the acceptance criteria.</p>	
Keywords	hepatitis E virus, procleix, vidas, HEV RNA, anti-HEV

Käsitteitä

CLIA	Kemiluminosenssimittaus
EIA	Entsyymi-immunologinen mittaus
ELFA	Entsyymivälitteinen fluorosenssimenetelmä
ET-NANB	Enterically transmitted, non-A, non-B hepatitis virus, nimettiin myöhemmin hepatiitti E-virukseksi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
HAV	Hepatiitti A virus
HBV	Hepatiitti B virus
HCV	Hepatiitti C virus
HDV	Hepatiitti D virus
HEV	Hepatiitti E virus
HIV	Ihmisen immuunikatovirus
ID-NAT	Yksittäismäärityksenä tehty nukleiinihappotestaus (Individual Donor Nucleic Acid Test)
IFA	Epäsuora immunofluoresenssimittaus
Ig	Immunoglobuliini eli vasta-aine; perässä oleva -A, -G, -M, -E tai -D kertoo vasta-aineen luokan
MTUs	MultiTubeUnits, Panther-laitteen näyteputki
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymeraasiketjureaktio
RFV	Suhteellinen fluoresenssi arvo (Relative Fluorescence Value)
RLU	Suhteellinen valoyksikkö (Relative Light Unit)
RNA	Ribonukleiinihappo
ROC	ROC-käyrä, (Receiver Operating Characteristic) tilastollisesti muodostettu käyrä
S/CO	Signal/Cut Off
TMA	Transkriptiopohjainen nukleiinihapon amplikointimenetelmä
WHO	Maailman terveysjärjestö (World Health Organization)

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Virusdiagnostiikka	1
2.1	Hepatiittivirukset	3
2.2	Hepatiitti E-viruksen diagnostiikka	5
2.3	Nukleiinihappojen osoittaminen Procleix Panther -analysaattorilla	6
2.4	Vasta-aineiden määrittäminen Vidas 3 -analysaattorilla	6
2.5	Menetelmien verifiointi	8
3	Tutkimuksen tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	11
4	Opinnäytetyön toteuttaminen	12
4.1	Tiedonhaku	12
4.2	Näyttemateriaali	13
4.3	Panther -laitteen mittausperiaate, reagenssit ja tarvikkeet	14
4.4	Vidas 3 -laitteen mittausperiaate, reagenssit ja tarvikkeet	16
5	Tulokset	17
5.1	Tulosten käsittely	17
5.2	Vidas vasta-ainemäärittämismenetelmien toistettavuudet	18
5.3	Procleix HEV Assay-osoitusmenetelmän toistettavuus ja herkkyys	20
5.4	Spesifisyys- ja sensitiivisyystestaus	24
6	Pohdinta	29
6.1	Tulosten tarkastelu	29
6.2	Tutkimuksen luotettavuus	33
6.3	Tutkimuksen eettisyys	33
6.4	Johtopäätökset	34
6.5	Kehittämisehdotukset	34
6.6	Ammatillinen kasvu	34
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Biomex HEV Serokonversiopaneeli SCP-HEV-005b	
	Liite 2. Biomex HEV Serokonversiopaneeli SCP-HEV-006b	

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Suomen Punaisen Ristin (SPR) Veripalvelun kanssa. Veripalvelussa käynnistyi syksyllä 2018 projekti ”Hepatiitti E-viruksen esiintyvyys suomalaisessa verenluovuttaja-aineistossa ja verivälitteisen tartunnan riski” eli VerHEVi-projekti. VerHEVi-projektissa on tarkoituksena tutkia 23000 luovuttajanäytteestä hepatiitti E-viruksen esiintyvyyttä ja 1000 luovuttajanäytteestä hepatiitti E-viruksen IgG- ja IgM- vasta-aineiden yleisyyttä. Opinnäytetyön osuudeksi VerHEVi-projektista muodostui uusien menetelmien verifiointi tutkimusprojektin näytteiden tutkimiseksi. Menetelmät verifioitiin laitteille, jotka olivat jo rutiinikäytössä verenluovuttajien infektiöseulonnoissa. Nukleiinihaponosoitustutkimukset tehtiin Grifolsin Procleix Panther -analysaattoreilla ja vasta-ainetutkimukset bioMérieux Vidas 3 -analysaattorilla.

Suomessa ei ole tehty aikaisemmin kartoitusta hepatiitti E-viruksen esiintyvyydestä verenluovuttajilla. Eläinlääketieteen saralla tutkimuksia on tehty, esimerkiksi Tuija Kantala julkaisi väitöskirjan 2017, jossa tutkittiin hepatiitti E-viruksen esiintymistä suomalaisissa sikaloissa ja osana tutkimusta oli hepatiitti E-viruksen vasta-ainepitoisuudet eläinlääkäreiden keskuudessa (Kantala 2017). Hepatiitti E-virus (HEV) on maksatulehdusta aiheuttava virus, joka yleensä leviää huonosti kypsennetyn sianlihan välityksellä tai ulosteen likaamasta juomavedestä. Leviäminen on mahdollista myös elin- ja verensiirroissa. Tällä hetkellä Suomessa ei tutkita luovutettua verta hepatiitti E-viruksen osalta. Koska sitä on esiintynyt lähinnä vain huonon hygienian maissa, on sen esiintyvyyden suomalaisessa väestössä ajateltu olevan niin marginaalista, ettei tutkiminen ole ollut aiheellista. Viruksen leviäminen elintarvikkeiden välityksellä on kuitenkin lisääntynyt länsimaissa 2000-luvulla. Myös sen riski tarttua verensiirron välityksellä on kasvanut, joten monessa Euroopan maassa, kuten Ruotsissa, Tanskassa, Irlannissa ja Saksassa kartoituksia esiintyvyydestä on jo tehty, ja osassa maita hepatiitti E-viruksen seulonta verenluovuttajista on otettu käyttöön. (Krain – Nelson – Labrique 2018; Kamp – Blümel – Baylis 2018; Khuroo – Khuroo – Khuroo 2016; Vollmer – Diekmann – Knabbe – Dreier 2018.)

2 Virusdiagnostiikka

Virukset ovat pieniä, muutamien kymmenien nanometrien kokoisia partikkeleita. Pienimmät virukset ovat halkaisijaltaan vain 18-25 nm, kun taas isoimmat rokkovirukset voivat

olla kooltaan jopa 400 nm. Viruksilla ei ole omaa aineenvaihduntaa eikä solukalvoa ja ne tarvitsevatkin lisääntyäkseen isäntäsolun. Virukset sisältävät kuitenkin perintöaineksen, ja niiden genomi voi olla joko yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta. Viruksen genomia suojaa proteiinikuori eli kapsidi. Yhdessä genomi ja kapsidi muodostavat nukleokapsidin. Joillakin viruksilla nukleokapsidia suojaa vielä isäntäsoluista peräisin oleva lipidi-kerros eli vaippa. Vaippaan voi olla kiinnittynyt myös hiilihydraatteja ja proteiineja. (Barker 2004: 459-461; Goering 2019: 27-34; Solunetti 2006.)

Virusdiagnoosi perustuu joko itse viruksen tai sen genomin löytymiseen elimistöstä, tai infektoituneen ihmisen elimistön tuottaman vasta-aineen tunnistukseen. Jotta viruksen genomia voidaan tutkia ja mitata, pitää DNA:ta tai RNA:ta olla tuotteessa riittävästi. Kun tiedetään tutkittavan viruksen DNA:n tai RNA:n emäsjärjestys, voidaan rakentaa emäsjärjestystä vastaavat alukkeet ja monistaa tuotetta niiden avulla. Yleisin käytettävä monistustekniikka on PCR eli polymeerasiketjureaktio ja sen eri johdannaiset. PCR koostuu kolmesta eri päävaiheesta; denaturaatio eli DNA:n hajotus, alukkeiden kiinnittyminen avautuneeseen juosteeseen ja pidentymisvaihe. Jokainen vaihe tapahtuu omassa lämpötilassaan. Reaktion käytyä läpi nämä kolme vaihetta, alkaa sykli taas alusta. Yhden syklin aikana DNA:n määrä kaksinkertaistuu. Näitä vaihteita toistetaan, kunnes DNA:ta on riittävästi. (Brown 2010: 6-7, 147-153.)

Uudempaa tekniikkaa edustaa transkriptiopohjainen nukleiinihapon amplikointimenetelmä eli TMA-menetelmä (Transcription-Mediated Amplification). Se perustuu sekä RNA:n polymeerasiin että DNA:n käänteiskopiointiin. RNA:sta muodostetaan käänteiskopioijaensyymillä cDNA:ta ja syntyneestä cDNA:ta käytetään taas RNA:n muodostamiseen. Menetelmä on isoterminen, eli se ei tarvitse PCR-tekniikan vaatimia lämpötilamuutoksia. Sen riski kontaminoida laboratorio on myös pienempi, koska tuotteena syntyvä RNA hajoaa helposti. (Tong 2014; Abravanel ym. 2018.)

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat B-lymfosyyttien tuottamia glykoproteiineja. Vasta-aineet auttavat elimistön puolustusjärjestelmää tunnistamaan vieraat organismit eli mahdolliset taudinaiheuttajat ja auttavat elimistöä hankkiutumaan taudinaiheuttajasta eroon. Vasta-aineita on viittä eri luokkaa; IgA-, IgG-, IgM-, IgE- ja IgD -vasta-aineet. IgA estää mikrobeja tarttumasta limakalvoille, IgE:tä esiintyy allergisissa reaktioissa ja IgD:n on todettu suojaavan mm. keuhkoja. IgM -luokan vasta-ainetta syntyy, kun plasm solu kohtaa ennestään tuntemattoman antigeenin ja aktivoituu. IgM on yleensä muodoltaan

pentameeri eli siinä on viisi Y:n muotoista vasta-ainesakaraa sitoutuneena toisiinsa muodostaen lumihiihtälemäisen rakenteen. Näin sillä on kymmenen eri kärkeä, joilla se pysyy sitoutumaan herkemmin tunkeutujaan, vaikka sen reseptorien vastaavuus ei olisi-kaan täydellinen kyseistä antigeeniä kohtaan. IgG on plasmasolujen tuottamaa vasta-ainetta tunnettua antigeeniä vastaan. Virusdiagnoosissa hyödynnetään yleisimmin IgG- ja IgM- vasta-ainetestejä. (Corley 2004: 124-1409; Yates – Lyczak 2004: 15-22.)

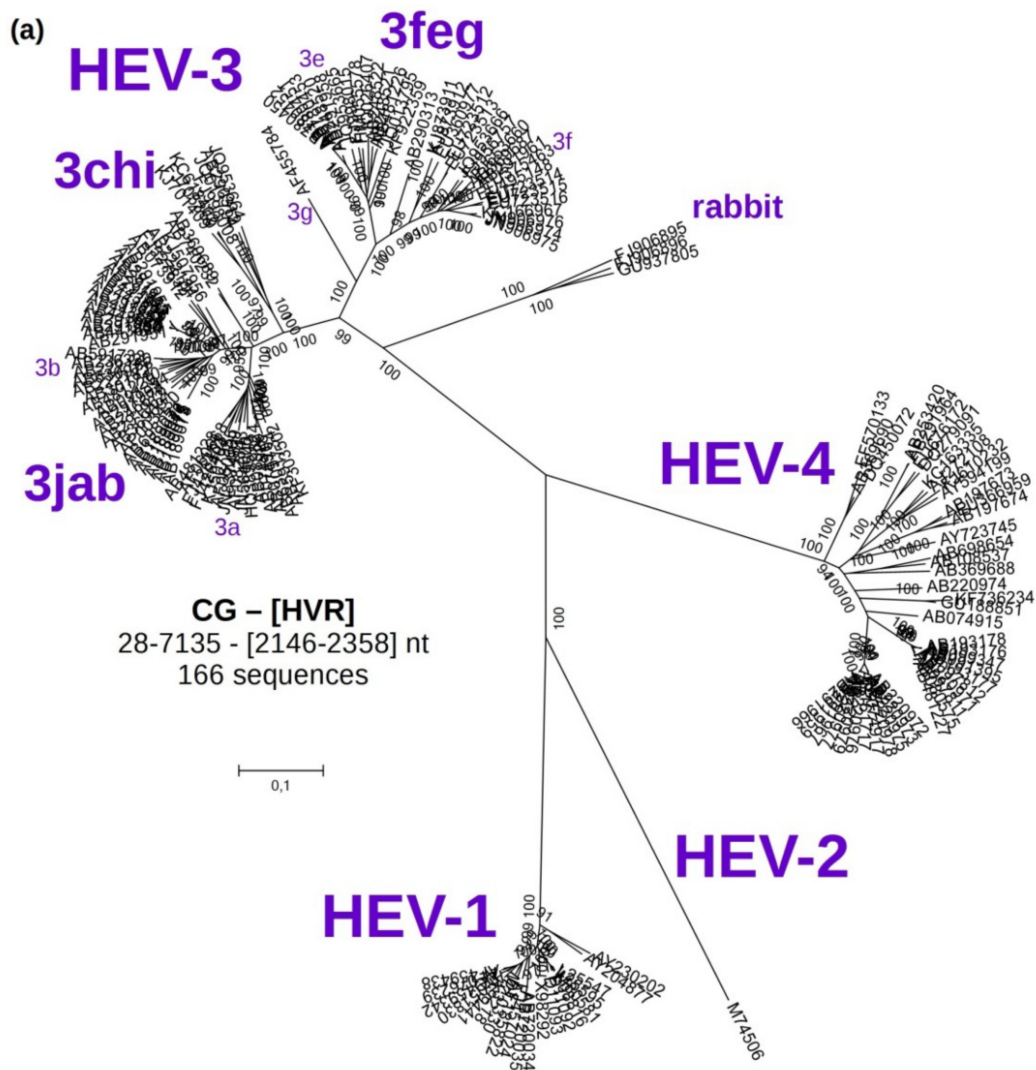
Vasta-ainemääritys perustuu vasta-aineen sitoutumiseen sille ominaiseen eli spesifiseen antigeeniin. Sitoutumisreaktio saadaan mitatuksi joko värinmuutoksesta, reaktion valon- tuoton tai muodostuneen agglutinaation avulla. Erilaisia vasta-aineiden määrittymen- telmiä ovat mm. EIA (entsyymi-immunologinen mittaus), IFA (epäsuora immunofluore- senssimittaus) ja CLIA (kemiluminosenssimittaus). (Seppälä – Meri 2011; Lappalainen – Vainionpää – Hedman 2011.)

2.1 Hepatiittivirukset

Hepatiittivirukset ovat ryhmä viruksia, jotka voivat aiheuttaa maksatulehduksen eli hepa- tiitin. Hepatiitti A- ja E -virukset tarttuvat yleensä ruoan ja juoman välityksellä, ja niiden aiheuttamat infektiot ovat lievempiä ja paranevat monesti itsestään. Molemmat voivat tarttua myös verensiirroissa. Hepatiitti B-, C- ja D-virukset tarttuvat veriteitse ja niiden aiheuttamat infektiot johtavat todennäköisemmin krooniseen maksatulehdukseen ja maksasyöpään. Hepatiitti D-virusta esiintyy vain yhdessä hepatiitti B-viruksen kanssa. Hepatiitti A- ja B-virusta vastaan on saatavilla rokotteet esim. Havrix ja Twinrix. Hepatiitti C-virusta vastaan ei ole rokotetta, mutta sen hoitoon on kehitetty tehokkaita lääkkeitä. Kiinassa on kehitetty ja lisensoitu rokotus hepatiitti E-virusta vastaan, mutta se ei aina-kaan vielä ole käytössä muualla maailmassa. (Lumio 2019; World Health Organization 2019.)

Hepatiitti E-virus kuuluu *Hepeviridae* -heimoon ja ihmiseen tarttuvat genotyypit ovat *Ort- hohepevirus* -sukua. HEV on vaipaton positiivinen yksijuosteinen RNA virus, joka on hal- kaisijaltaan noin 27- 34 nm. Siitä löytyy useampaa eri genotyyppiä, joista neljä, HEV-1, HEV-2, HEV-3 ja HEV-4 liittyvät ihmistartuntoihin. HEV-1 ja HEV-2 genotyypit ovat vain ihmisellä esiintyviä hepatiittiviruksia, jotka tarttuvat saastuneen veden tai ravinnon väli- tyksellä. Niitä esiintyy lähinnä Aasiassa, Afrikassa ja Keski-Amerikassa. HEV-3 ja HEV- 4 genotyypit ovat zoonooseja eli eläimestä ihmiseen tarttuvia, ja ne voivat tarttua esi-

merkiksi huonosti kypsennetyn sianlihan välityksellä. Näitä genotyyppiejä esiintyy yleisesti maailmanlaajuisesti, myös länsimaissa. Genotyypin lisäksi HEV voidaan jakaa subtyyppeihin niiden genomissa esiintyvien pienempien eroavaisuuksien perusteella. Kuviossa 1 näkyy HEV -genotyypit ja siinä on esitelty tarkemmin HEV-3 viruksen subtyyppejä. (Kantala 2017; Wang – Zhao – Qi – Geng 2016: 5-16; Zhou – Zhao – Tian – Xu – Wang 2016: 17-38.)



Kuvio 1. Malli HEV genomien molekyylitasoisen vaihtelusta (Vina-Rodrigues – Schlosser – Becher – Kaden – Martin 2015.)

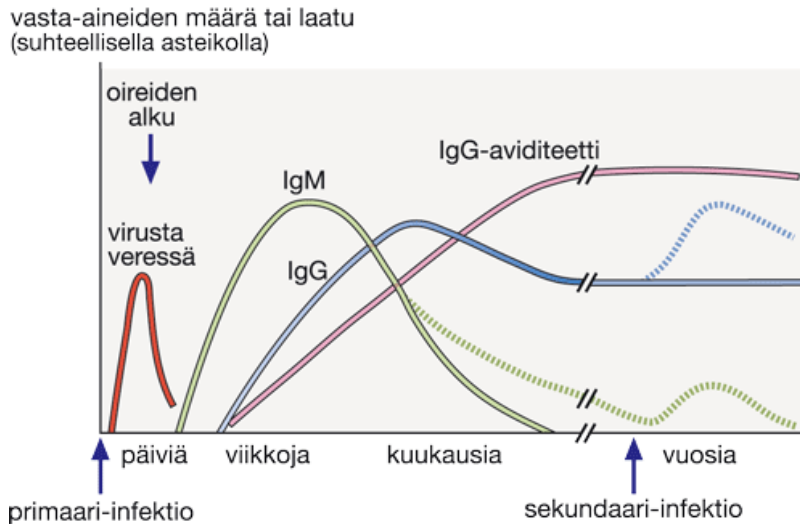
Ensimmäinen merkittävä HEV:en aiheuttama epidemia oli New Delhissä Intiassa vuosina 1956-1957. Tällöin sairastui jopa 29000 ihmistä. Myös Afrikassa ensimmäiset tunnetut tartunnat olivat 1950-luvulla. Meksikosta HEV:ta löytyi kahdesta kylästä vuosina 1986-1987. Yleisimpänä tartunnan lähteenä pidettiin saastunutta juomavettä. HEV saa-

tiin erotettua ja tunnistettua muista hepatiittia aiheuttavista viruksista ensimmäisen kerran 1980-luvulla. Sitä ennen se tunnettiin nimellä ET-NANB (enterically transmitted, non-A, non-B hepatitis virus). (Geng – Wang 2016: 49-51.)

E hepatiitin taudinkuvassa esiintyy väsymystä, huonovointisuutta, ruokahaluttomuutta ja ihon keltaisuutta. Tauti voi olla myös täysin oireeton ja se on yleensä itsestään paraneva. HEV-1 ja HEV-2 genotyyppien aiheuttamat oireet ovat monesti vakavampia. (Kantala 2017). Varsinkin raskaana oleville ja immuunipuutoksesta kärsiville taudin tiedetään voivan olla jopa kuolemaan johtava. Viimeisellä raskauskolmanneksella olevien kohdalla kuolleisuus tautiin on jopa 20-25 %. (Lumio 2019; Kamar – Dalton – Abravanel – Izopet 2014.) Maailman terveysjärjestön (WHO) mukaan tautiin sairastuu vuosittain 20 miljoonaa ihmistä, joista oireellisia on 3,3 miljoonaa. Vuonna 2015 tautiin arvioitiin kuolleen 44000 ihmistä. (World Health Organization 2019). Suomessa raportoitiin vuonna 2018 46 HEV -infektioita (THL 2019).

2.2 Hepatiitti E-viruksen diagnostiikka

Hepatiitti E-virus voidaan diagnosoida joko nukleiinihaponosoitustutkimuksella, jossa analysoidaan viruksen perintöaineuksen esiintymistä, tai vasta-ainetutkimuksilla, joissa määritetään viruksen vasta-aineita näytteestä. Nukleiinihaponosoitustutkimus antaa reaktiivisen tuloksen heti oireiden alkaessa, mutta viruksen RNA:n määrä laskee mittamattomalle tasolle jo neljän viikon päästä, ellei kyseessä ole krooninen infektio. IgM-vasta-ainetasot nousevat vajaa viikko oireiden alkamisesta ja ne säilyvät koholla jopa 5 kuukautta. IgG-vasta-aineet kohoavat muutama päivä IgM -vasta-aineen jälkeen akuutin taudin aikana ja ne voivat pysyä koholla vuosikymmeniä. Myös IgG -aviditeetin eli anti-geenin ja IgG-vasta-aineen välisen sidosvoiman mittauksella voidaan selvittää, onko kyseessä primaari-infektio vai vanha immuniteetti. IgG -vasta-aine muokkautuu ajan kuluessa vastaamaan antigeeniään paremmin ja sen kyky sitoa antigeeni vahvistuu eli IgG-aviditeetti kasvaa ajan kuluessa. Vasta-ainetasoja on vertailtu toisiinsa kuviossa 2. (Wen ym. 2018; Lappalainen ym. 2011; Seppälä – Söderlund – Lappalainen – Hedman 1994.)



Kuvio 2. Virusinfektion kulku ja vasta-ainevaste (Lappalainen ym. 2011)

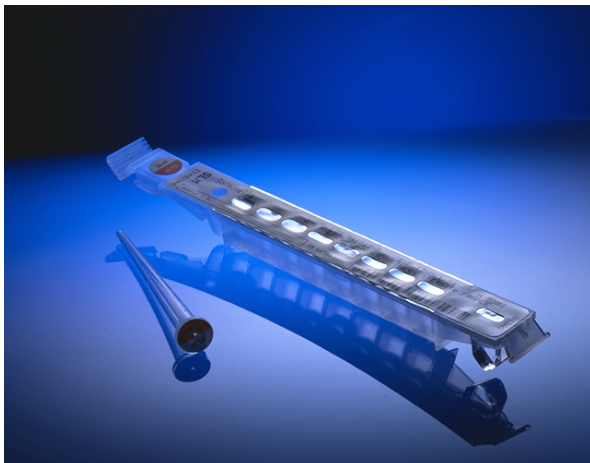
2.3 Nukleiinihappojen osoittaminen Procleix Panther -analysaattorilla

Grifolsin Procleix Panther System on täysautomaattinen nukleiinihaponosoitusanalysaattori ja näytteen käsittely tapahtuu kokonaisuudessaan laitteen sisällä. Kaikki vaiheet tapahtuvat yhdessä ja samassa MultiTubeUnits (MTUs) putkessa. Laitteella on käytössä monistustekniikkana transkriptiopohjainen nukleiinihapon amplikointimenetelmä eli TMA-menetelmä (Transcription-Mediated Amplification), jossa hyödynnetään sekä käänteistä transkriptaasia, että RNA polymeraasia. RNA viruksen määrittämisessä viruksen RNA:sta tehdään ensin DNA kopio (cDNA). Syntyneestä DNA kopiosta tehdään uusi RNA juoste. Syntynyttä RNA juostetta käytetään taas uuden DNA kopion rakentamiseen, mikä nopeuttaa tuotteen monistumista moninkertaisesti PCR menetelmiin nähden. (Procleix HEV Assay.) Menetelmä on havaittu toimivaksi HEV RNA viruksen tunnistamiseen Ranskassa vuonna 2016 tehdyssä tutkimuksessa (Abravanel ym. 2018).

2.4 Vasta-aineiden määrittäminen Vidas 3 -analysaattorilla

Biomérieuxin Vidas 3 -analysaattorissa on käytössä EIA menetelmiin kuuluva ELFA eli entsyymivälitteinen fluoresenssimenetelmä (enzyme-linked fluorescent immunoassay). Kiinteäfaasina menetelmässä toimivat reaktiokärjet (Solid Phase Receptacle, SPR), jotka ovat päällystetty hepatiitti E-viruksen antigeenillä. Lisäksi analysoinnissa tarvitaan

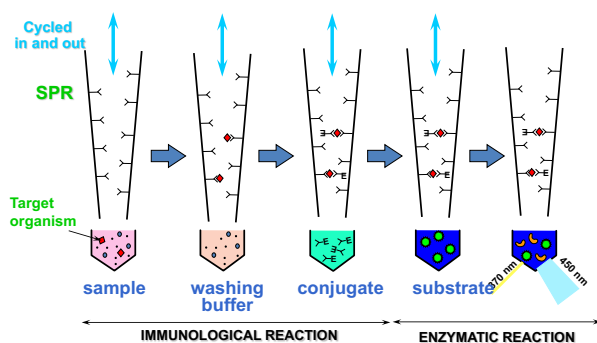
pesuliuoksia, konjugaattia ja substraattia, jotka ovat kaikki valmiina reagenssiliuskan kupeissa foliosuojan alla. Kuviossa 3 esitetään reagenssiliuska ja reaktiokärki. (bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgG (HEVG).)



Kuvio 3. Vidas 3 -analyssaattorissa käytettävät reagenssiliuska ja reaktiokärki (bioMérieux 2019)

Menetelmä perustuu siihen, että näytteessä mahdollisesti oleva vasta-aine sitoutuu kärjen sisäpinnan antigeenifaasiin. Konjugaatin sisältämät spesifiset entsyymit sitoutuvat edelleen vasta-aineeseen ja reagoivat substraatin kanssa. Mittakyvetiin kohdistetaan 370 nm aallonpituista valoa, jonka syntynyt tuote fluoresoi aallonpituudella 450 nm. Fluoresoivan valon määrä mitataan fotodiodilla ja se on suoraan verrannollinen vasta-aineen määrään. (bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgM(HEVM).) Kuviossa 4 on esitetty menetelmän periaatetta, esimerkissä kärjen kiinteäfaasina on Anti-HEV-menetelmistä poiketen vasta-aine, johon näytteessä mahdollisesti oleva antigeeni sitoutuu.

Antigen detection : example of procedure



Kuvio 4. Havainnekuva VIDAS antigeenin tunnistusmenetelmästä (bioMérieux 2019)

2.5 Menetelmien verifiointi

Arvioitaessa, soveltuuko jokin menetelmä käyttöön, tulee sille suorittaa validointi. Validointia kevyempi testaustapa on verifiointi. Verifiointia voidaan käyttää, jos menetelmälle tai laitteelle on jo olemassa aikaisempia validointeja, tai jos menetelmä tai laite on jo muussa muodossa käytössä. (Hägg 2016.) Koska hepatiitti E-viruksen tutkimiseen käytettävien menetelmien analysaattorit ovat jo ennestään infektioseulontakäytössä Veripalvelussa, ja käytössä olevat menetelmät ovat valmistajien puolelta CE-merkittyjä, eli ne ovat testattu puolueettomissa laboratorioissa ja täyttävät niille asetetut vaatimukset, on oppinnäytetyöprojektissa tarkoituksena verifioida uusien menetelmien soveltuminen laitteille ja Veripalvelun kokonaisprosesseihin.

Verifiointinissa käytettävät kriteerit ovat herkkyys, tarkkuus, sarjojen sisäinen ja välinen toistettavuus sekä toimintavarmuus. Herkkydessä katsotaan, miten matalia pitoisuuksia tutkittavaa kohdetta menetelmillä pystytään havaitsemaan. Menetelmien herkkyysrajat saadaan reagenssien pakkausselosteista, joihin on laitettu tavoitearvot, jotka valmistaja on saanut omista testeistään. Tarkkuus saadaan vertaamalla saatuja tuloksia niistä odotettuihin tuloksiin. Negatiivisten tulee olla negatiivisia toistettunakin ja positiivisten tulosten toistettuna positiivisia. Reagenssien pakkausselosteet sisältävät laitevalmistajan antamat rajat ja tulosten täytyy olla niiden rajoissa. Laskettaessa herkkyyttä ja tarkkuutta käytetään hyväksi alla olevaa kuviota 5.

		<i>Truth</i>		
		<i>Disease (number)</i>	<i>Non Disease (number)</i>	<i>Total (number)</i>
<i>Test Result</i>	<i>Positive (number)</i>	A <i>(True Positive)</i>	B <i>(False Positive)</i>	$T_{\text{Test Positive}}$
	<i>Negative (number)</i>	C <i>(False Negative)</i>	D <i>(True Negative)</i>	$T_{\text{Test Negative}}$
		T_{Disease}	$T_{\text{Non Disease}}$	<i>Total</i>

Kuvio 5. Herkkyuden (sensitivity) ja tarkkuuden (specificity) määrittäminen (Eberly College of Science 2019)

$$\text{Herkkyyys} = \frac{A}{A+C} \times 100$$

$$\text{Tarkkuus} = \frac{D}{D+B} \times 100$$

Toistettavuuksien tarkasteluissa käytetään hyväksi keskiarvoa, keskihajontaa ja variaatiota. Keskiarvo (\bar{x}) saadaan laskemalla sarjaan kuuluvat kaikki tulokset yhteen ja jakamalla tulos näytteiden lukumäärällä (n).

$$\text{Keskiarvo} \quad (\bar{x}) = \frac{\sum x}{n}$$

Keskihajonta kuvaa keskimääräistä poikkeamaa odotusarvosta. Keskihajonnassa saadusta tuloksesta vähennetään laskettu keskiarvo ja saadut tulokset lasketaan yhteen ja korotetaan toiseen potenssiin. Saatu luku jaetaan luvulla, joka on tulosten lukumäärä vähennettynä yhdellä. Keskihajonta (s) on tämän luvun neliöjuuri.

$$\text{Keskihajonta} \quad (s) = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Variaatiokerroin saadaan vertaamalla keskihajontaa keskiarvoon. Variaatiokerroin voidaan nimetä myös suhteelliseksi keskihajonnaksi (RSD).

$$\text{Variaatiokerroin} \quad cv\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

Sarjojen välinen toistettavuus lasketaan vertaamalla eri aikaan tehtyjen testisarjojen keskiarvoa, keskihajontaa ja variaatiota. Sarjojen sisäinen toistettavuus saadaan laskemalla samasta näytteestä saatujen tulosten keskiarvo, keskihajonta ja variaatio. Toimintavarmuutta ja häiriöitä tarkastellaan sarjoista tulleiden invalid-tulosten eli epäonnistuneitten analyysien perusteella. Mahdollisia häiriötekijöitä voivat olla näytteen hemolyyttisyys eli punasolujen hajoamisesta aiheutunut plasman punaisuus, ikteerisyys eli kohonnut bilirubiinipitoisuus tai lipeemisyys eli plasman kohonnut triglyseridipitoisuus. Analysoitaessa näytteitä tulee myös tarkastaa, ettei positiivinen näyte kontaminoi seuraavaa näytettä kulkeutumalla siihen jossain vaiheessa prosessia. (Jaarinen – Niiranen 2005: 30-39; Nordlab 2017). Taulukkoon 1 on koottu Procleix HEV Assay menetelmän verifiointikriteerit.

Taulukko 1. Verifiointikriteerit Panther-laitteen Procleix HEV Assay menetelmälle

Sensitivity (Herkkyys)	
Diagnostinen herkkyys	BioQControl-laimennussarjan tulokset
Hyväksymiskriteeri	>95 % positiivisia
Specificity (Tarkkuus)	
Tarkkuus	495 luovuttajanäytteen tulokset. Reaktiiviset tulokset uusitaan kahtena rinnakkaisena.
Hyväksymiskriteeri	99,5%
Precision (Toistettavuus)	
Sarjan sisäinen toistettavuus	Analysoidaan sama näyte samassa sarjassa useampana rinnakkaisena
Hyväksymiskriteeri	Tulos sama toistettaessa (neg/pos)
Sarjojen välinen toistettavuus	Analysoidaan näytteitä useammassa sarjassa toistettuna
Hyväksymiskriteeri	Tulos sama toistettaessa (neg/pos)
Robustness and interferences (Toimintavarmuus ja häiriöt)	
Epäonnistumisaste	Invalid tulosten laskeminen. Eri syyt eritellään
Carry over	Positiivisen näytematriisin siirtyminen seuraavaan näytteeseen
Häiriöt	Lipeemiset, ikteeriset ja hemolyyttiset näytteet

Taulukossa 2 on vastaavat verifiointikriteerit Anti-HEV IgM- ja Anti-HEV IgG-menetelmille. Vasta-ainemenetelmien toistettavuutta tarkastellessa huomioitiin tulosten suhteelliset keskihajonnat (RSD%).

Taulukko 2. Verifiointikriteerit VIDAS 3-laitteen Anti-HEV IgG ja Anti-HEV IgM menetelmille

Sensitivity (Herkkyys)	
Diagnostinen herkkyys	Reaktiivisista paneelinäytteistä tehty laimennossarja
Hyväksymiskriteeri	Kaikki tulokset positiivisia
Specificity (Tarkkuus)	
Tarkkuus	12 luovuttajanäytteen tulokset. Reaktiiviset tulokset uusitaan kahtena rinnakkaisena.
Hyväksymiskriteeri	99,5%
Precision (Toistettavuus)	
Sarjan sisäinen toistettavuus	Analysoidaan sama näyte samassa sarjassa useampana rinnakkaisena
Hyväksymiskriteeri	< 10 RSD%
Sarjojen välinen toistettavuus	Analysoidaan näytteitä useammassa sarjassa toistettuna
Hyväksymiskriteeri	< 15 RSD%
Robustness and interferences (Toimintavarmuus ja häiriöt)	
Epäonnistumisaste	Invalid tulosten laskeminen. Eri syyt eritellään
Carry over	Positiivisen näytematriisin siirtyminen seuraavaan näytteeseen
Häiriöt	Lipeemiset, ikteeriset ja hemolyytiset näytteet

3 Tutkimuksen tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida menetelmät hepatiitti E-viruksen nukleiinihapon osoitukseen ja vasta-aineiden määrittämiseen. Tavoitteena oli, että menetelmät tulevat käyttöön myöhemmin projektissa, missä tutkitaan hepatiitti E-viruksen yleisyyttä verenluovuttajanäytteissä. Projektinäytteistä saatuja tuloksia tullaan käyttämään arvioitaessa hepatiitti E-viruksen seulonnan tarpeellisuutta tulevaisuudessa.

Tarkoituksena oli osoittaa, että menetelmät toimivat valmistajan osoittamalla tavalla, ja että ne täyttävät niille asetetut hyväksymiskriteerit. Analysoitavilla testisarjoilla oli tarkoituksena saada varmistus, ettei laitteiden ja menetelmien toimivuudessa ja luotettavuudessa ole huomautettavaa.

Tutkimuskysymykset:

1. Ovatko Panther Procleix HEV Assay ja Vidas IgG- ja IgM -vasta-aineen määrittämisetelmät toimivia ja Veripalvelun tarpeisiin sopivia verenluovuttajien hepatiitti E -viruksen seulonnassa?
2. Ovatko Panther Procleix HEV Assay ja Vidas IgG- ja IgM -vasta-aineen määrittämisetelmien herkkyys ja tarkkuus riittävä verenluovuttajien hepatiitti E -viruksen seulontaan?
3. Ovatko Panther Procleix HEV Assay ja Vidas IgG- ja IgM -vasta-aineiden määrittämisetelmien toistettavuudet riittäviä verenluovuttajien hepatiitti E -viruksen seulontaan?
4. Täyttyvätkö kaikki verifiointin hyväksymiskriteerit?

4 Opinnäytetyön toteuttaminen

Opinnäytetyöhön saatiin aihe Veripalvelusta. Ohjaajina toimivat Metropolian lehtori Merja Ojala ja Veripalvelun laboratorioasiantuntija Niina Putkuri. Veripalvelu vastasi kaikista analysoinneissa tarvittavista materiaaleista ja niiden tilauksista. Lisäksi Veripalvelu vastasi tutkimuksessa käytettävistä laboratoriolaitteista ja laboratorioinfrastruktuurista.

4.1 Tiedonhaku

Tiedonhaussa on käytetty PubMed-tiedonhakupalvelua, sekä Finna-hakupalvelusta kirjastojen sisältämiä teoksia. Hakusanoina käytettiin termejä hepatitis E virus (1960 kpl), transcription mediated amplification (549 kpl), hepatitis E Procleix (3kpl), Panther hepatitis (11 kpl), PCR (137561 kpl), Panther (416 kpl), immunology (157491 kpl), isothermal (6820 kpl), validointi ja verifiointi. Hakutuloksia karsittiin rajaamalla hakua maksimissaan viisi vuotta vanhoihin julkaisuihin ja vain ihmisperäisiin tutkimuksiin. Hakutuloksia saatiin myös kohdennettua käyttämällä erilaisia yhdistelmiä hakusanoista. Osa käytetyistä lähteistä on vanhempia, mutta niissä oleva tieto ei ole muuttunut olennaisesti tai niistä ei ole ollut uudempaa tutkimusta. Jotkut löydettyistä aineistoista ovat olleet maksullisia. Näistä osaan Veripalvelulla on ollut käyttöoikeus ja artikkelit ovat auenneet Veripalvelun verkossa, ja osan on hankkinut ohjaajani Niina Putkuri yliopiston kautta.

4.2 Näytemateriaali

BioQControl HEV RNA positiivinen kontrollinäyte

BioQControl on kaupallinen positiivinen kontrollinäyte, jonka konsentraatio hepatiitti E-viruksen suhteen on 100 IU/ml. Näytteet säilytettiin -20 °C, ja sen käyttö tapahtui 8 tunnin kuluessa sulatuksesta. Näyte sisälsi vain HEV RNA:ta, ja näyte analysoitiin vain Procleix HEV Assay menetelmällä. Näytteestä tehtiin 1:5,6 seos (15 IU), jota käytettiin menetelmän herkkyuden ja tarkkuuden määrittämiseen. Näytteitä tutkittiin useampi testi rinnakkain, jolloin saatiin laskettua myös menetelmän sisäistä toistettavuutta. Sarjojen välinen toistettavuus saatiin laskettua analysoimalla vastaava testisarja toisella Panther-laitteella sekä analysoimalla samaa näytettä useana eri päivänä.

Vidas positiivinen kontrollinäyte C1

Vasta-ainemenetelmien toistettavuuden tarkistusta varten valmistettiin 1:1 seos sekä IgG- että IgM- menetelmien omasta kalibroinnissa käytettävästä C1 positiivisesta kontrollista negatiiviseen plasmaan. Molemmat laimennetut kontrollinäytteet jaettiin 14 eppendorf-putkeen ja pakastettiin -30°C analysointiin asti. Näytteet ajettiin eri päivinä.

Biomex HEV serokonversiopaneelit

Kaupallisia näytepaneeleita oli kaksi eri sarjaa. Toisessa sarjassa oli 23 näytettä ja toisessa 20 näytettä. Näytteet säilytettiin -20 °C. Ennen analysointia näytteet sulatettiin ja sekoitettiin varovasti välttämällä vaahdon muodostumista. Analysoinnista yli jäänyt näyte pakastettiin uudelleen heti käytön jälkeen. Toinen näytepaneeli sisälsi yhdeltä E hepatiittiin sairastuneelta potilaalta 140 ja toinen 168 vuorokauden aikana kerätyt plasma-näytteet, joiden nukleiinihappo- ja vasta-ainepitoisuudet muuttuivat taudin edetessä. Taudin alkupäivinä viruksen RNA taso nousee, vasta-ainetasojen ollessa vielä negatiivisia. IgM-luokan vasta-aineen kohotessa RNA taso vastaavasti laskee, muuttuen lopulta negatiiviseksi. IgG-luokan vasta-aineen taso nousee hieman hitaammin, mutta IgM tasojen laskiessa IgG jää koholle (kuvio 1). Paneelinäytteitä käytettiin sekä nukleiinihaponosoitusmenetelmään, että molempiin vasta-ainemääritysmenetelmiin. Koska paneelinäytteet olivat tilavuudeltaan pieniä, katsottiin pakkausselosteen antamista esitiedoista RNA:n ja vasta-aineiden määrät jokaisen näytteen kohdalta ja ajettiin vain positiivisen tuloksen antavat näytteet, sekä jos näytettä oli riittävästi, positiivista näytettä edeltävät

negatiiviset näytteet, jotka saattaisivat antaa positiivisen tuloksen toisella menetelmällä (Liite 1 ja Liite 2). Paneelinäytteiden tuloksista laskettiin menetelmien herkkyyttä.

Negatiivinen plasma

Negatiivisena näytteenä käytettiin tutkimuskäyttöön tilattua plasmaa, joka oli tutkittu muiden veripalvelussa analysoitavien virusten suhteen negatiiviseksi. Ennen käyttöä se tuli varmistaa negatiiviseksi myös hepatiitti E-viruksen, ja viruksen IgG- ja IgM-vasta-aineiden suhteen. Plasma analysoitiin kahtena rinnakkaisena näytteenä kaikilla kolmella menetelmällä. Plasmaa käytettiin sekä negatiivisena näytteenä, että laimentimena positiivisissa kontrollinäytteissä.

Muut näytteet

Verenluovuttajista saatuja muiden veripalvelussa tutkittavien virusten suhteen negatiivisia plasmanäytteitä analysoitiin 495 kpl nukleiinihapontunnistusmenetelmällä. Aiemmin tutkituista luovuttajanäytteistä kerättiin sattumanvaraisesti päivittäin 45 näytettä, jotka identifioitiin uudelleen eli anonymisoitiin ennen Procleix HEV Assay menetelmällä analysointia. Vastaavasti vasta-ainetutkimuksissa ajettiin 12 satunnaisesti valittua ja anonymisoitua luovuttajanäytettä molemmilla testeillä. Tuloksista saatiin laskettua menetelmien tarkkuutta.

4.3 Panther -laitteen mittausperiaate, reagenssit ja tarvikkeet

Veripalvelussa on käytössä neljä Grifolsin Procleix Panther -analysaattoria, joilla tutkitaan tällä hetkellä paneelitutkimuksena ihmisen immuunipuutosviruksen (HIV), hepatiitti C -viruksen (HCV) ja hepatiitti B -viruksen (HBV) perimän mahdollista esiintymistä. Tämän lisäksi tutkitaan 16 näytteen pooleista hepatiitti A -viruksen (HAV) ja parvoviruksen (B19) esiintymistä. Jos yksittäisnäytteen saama tulos on reaktiivinen eli siitä löytyy viruksen genomia, näyte tutkitaan uudestaan kahtena rinnakkaisena tutkimuksena. Uusitunakin reaktiivisen tuloksen saaneesta näytteestä tehdään erottelutestit, joilla tunnistetaan minkä paneelitutkimuksen viruksen suhteen, HIV, HCV vai HBV, näyte on positiivinen. Poolinäytteen ollessa reaktiivinen, ajetaan poolissa olleet 16 näytettä yksittäismäärityksenä. Näin saadaan erotettua poolista positiivisen tuloksen antava näyte tai näytteet. (Veripalvelu 2019.)

Panther -analysaattorissa käytettävä reagenssisetti tulee aina kalibroida ennen näyteajoja, ja kalibrointi on voimassa 24 tuntia. Procleix HEV Assay menetelmälle on käytössä negatiivinen ja positiivinen kalibraattori, joista molemmista laite tekee automaattisesti kolme rinnakkaista mittausta. Panther-analysaattori mittaa positiivisen kalibraattorin RLU (relative light unit) -arvon, sekä siihen kohteenpaiminta- eli TCR (Target Capture Reagent) -reagenssin mukana pipetoidun sisäisen kontrollin RLU-arvon. Saaduista RLU-arvojen keskiarvoista laite laskee sekä sisäiselle kontrollille että analyylille cutoff -arvon. Kalibraattorista saadusta RLU-arvosta laite laskee raja-arvon määrittääkseen sitä vasten näytteiden mahdollisen reaktiivisuuden tai negatiivisuuden. Myös sisäisen kontrollin tulee olla tiettyjen rajojen sisällä ja sen avulla seurataan, että kaikki reaktiot ovat onnistuneet. Jos sisäinen kontrolli ei ole monistunut, näyte saa invalid-tuloksen.

Panther-laitteen reagenssikittit tulevat 5000 testin pakkauksissa. Yksi reagenssikitin pullosetti sisältää aina 250 testiä, joten yhdessä pakkauksessa on 20 pullosettiä. Reagenssit on pakattu erillisiin laatikoihin niiden säilytyslämpötilan mukaan. Jokaiseen reagenssikittiin kuuluu 4 laatikkoa, joiden sisältö on kuvattu alla olevassa taulukossa 3. Lisäksi analysaattorissa on ajoliuoksia, laitteen sisällä olevia biologisia jäteastioita, filterillisiä pipetinkärkiä sekä laitteen huoltoon tarvittavia pesuliuoksia. Ajoliuokset ovat 1000 testin pulloja, ja niitä on laitteen sisällä kaksi pulloa kutakin liuosta. 5 % hypokloriittia laite käyttää näytteiden inaktivoimiseen. Analysaattorin jäteastioiden tilavuus on 750 testiä. Pesuliuoksista 0,5 % hypokloriittia ja etanolia käytetään laitteen pintojen puhdistukseen ja Mag Wash Advanced Cleaning Solution -liuosta laitteen magneettipesuasemansa pesuun sarjojen päätyttyä.

Taulukko 3. Panther -laitteen tarvitsemat reagenssit, liuokset ja tarvikkeet

BOX1 Säilytys –15° - –35°C.	Sisäinen kontrolli Monistusreagenssi Entsyymi Koetinreagenssi
BOX2 Säilytys 2 - 8°C	Kohteenpaimintareagenssi
BOX3 Säilytys 15° - 30°C	Selektioreagenssi
BOX4 Säilytys –15° - –35°C	C0 Procleix HEV Assay negatiivinen kalibraattori C1 Procleix HEV Assay positiivinen kalibraattori
Panther ajoliuokset Säilytys 15° - 30°C	R1 Auto Detect 1 R2 Auto Detect 2 Pesuliuos Silikoniöljy Deaktivointiliuoksen puskuri
Tarvikkeet	Koeputkiyksikkö MTUs (Multi-TubeUnits) Pipetinkärjet Biologisen jäteastian pussi Biologisen jäteastian kansi
Muut pesuliuokset	Hypokloriittiliuos 5% ja 0,5 % Etanoli 80% Mag Wash Advanced Cleaning Solution

4.4 Vidas 3 -laitteen mittausperiaate, reagenssit ja tarvikkeet

Veripalvelun bioMérieuxin toimittamalla Vidas 3 -laitteella tutkitaan tällä hetkellä jatkotutkimukset toistuneesti reaktiivisen tuloksen Architect analysaattorilla HIV-, HCV- tai HBV-vasta-ainetesteistä saaneista luovuttajanäytteistä. Jos näyte saa reaktiivisen tuloksen Vidas 3 -analysaattorilta, se menee vielä varmistustutkimuksiin ennen lopullisen tuloksen saamista. (Veripalvelu 2019).

Vidas 3 -analysaattorin Anti-HEV IgM-menetelmä on kvalitatiivinen, ja Anti-HEV IgG-menetelmä on kvantitatiivinen. Molemmissa menetelmissä hyödynnetään tilastollisesti muo-

dostettua ROC-käyrää (Receiver Operating Characteristic), joka on saatu laskemalla todennäköisyyksiä. Laite mittaa näytteestä RFV (Relative Fluorescence Value) arvon, josta on vähennetty taustan antama signaali. Saatua tulosta verrataan vastaavaan S1 vakiointiliuoksesta saatuun arvoon, jolloin saadaan tulos (testitulos= potilas RFV/ standardi RFV). Anti-HEV IgM-menetelmällä positiivisen tuloksen raja on ≥ 1 . Tämä tarkoittaa sitä, että tuloksen ollessa suurempi tai yhtä suuri kuin yksi, on tulos positiivinen. Jos tulos on pienempi kuin yksi, se on negatiivinen. Anti-HEV IgG-menetelmässä positiivisen näytteen raja on $\geq 0,56$ U/ml, ja menetelmän määrittämisalue on välillä 0,10-10 U/ml.

Vidas 3 -laite tekee analyysit reaktioliuskalla käyttäen pipetointiin kiinteäfaasireaktiokärkeä. Vasta-ainekitti sisältää 30 testiliuskaa ja -kärkeä, sekä laitteen kalibrointiin tarvittavan vakiointiliuoksen ja kontrolliliuoksen. Näytteet pipetoidaan reaktioliuskan näytepaikalle laitteen erillisellä pipetinkärjellä. Laitteen sisällä on vaihdettava roska-astia, johon laite tiputtaa käytetyt kärjet. Laitteen tarvitsemat tarvikkeet on koottu taulukkoon 4. Laitteen käyttämä reagenssiliuska ja kärki on esitetty kuviossa 3.

Taulukko 4. Vidas 3 -laitteen tarvitsemat reagenssit ja tarvikkeet

HEV Assay kit IgG/IgM 30 testiä Säilytys 2° - 8°C	Reagenssiliuskat Reaktiokärjet S1 Vakiointiliuos C1 Kontrolliliuos positiivinen C2 Kontrolliliuos negatiivinen
Tarvikkeet	Pipetinkärjet Näytteen laimennusastia Roska-astia

5 Tulokset

5.1 Tulosten käsittely

Saadut tulokset syötettiin Excel taulukkolaskentaohjelmaan. Tuloksista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiot. Arvoista saatiin katsottua sarjojen välistä ja sarjojen

sisäistä toistettavuutta (RSD%), tarkkuutta (specificity) ja herkkyyttä (sensitivity). Analysointipäivämäärä, sekä molempien menetelmien rinnakkaiset tulokset näytteelle. Näytteenä on käytetty laimennettua vasta-ainepositiivista C1 kontrollia. Taulukon lopussa laskettuna tulosten keskiarvo, hajonta sekä variaatio eli RSD% arvo.

5.2 Vidas vasta-ainemääritysmenetelmien toistettavuudet

Sarjojen välisten toistettavuuksien tulokset on koottu taulukkoon 5. Taulukossa näkyy analysointipäivämäärä, sekä molempien menetelmien rinnakkaiset tulokset näytteelle. Näytteenä on käytetty laimennettua vasta-ainepositiivista C1 kontrollia. Taulukon lopussa laskettuna tulosten keskiarvo, hajonta sekä variaatio eli RSD% arvo.

Taulukko 5. Sarjojen välinen toistettavuus vasta-ainemääritysmenetelmillä.

	Vidas IgM (Index)		Vidas IgG (U/ml)	
pvm	Näyte (Index 1,21-2,09) (kahtena rinnakkaisena)		Näyte (0,45-0,94 U/ml) (kahtena rinnakkaisena)	
19.3.2019	1,72	1,66	0,74	0,73
20.3.2019	1,59	1,62	0,76	0,74
20.3.2019	1,70	1,72	0,72	0,70
21.3.2019	1,58	1,65	0,75	0,72
25.3.2019	1,78	1,65	0,67	0,80
26.3.2019	1,76	1,73	0,73	0,78
27.3.2019	1,72	1,64	0,69	0,76
1.4.2019	1,70	1,68	0,82	0,80
2.4.2019	1,55	1,60	0,79	0,74
4.4.2019	1,56	1,59	0,74	0,76
5.4.2019	1,56	1,64	0,81	0,77
6.4.2019	1,64	1,60	0,74	0,76
8.4.2019	1,58	1,81	0,76	0,78
9.4.2019	1,72	1,64	0,70	0,75
ka	1,66		0,75	
keskihajonta	0,071		0,036	
variaatio	4,26		4,86	

Sarjojen sisäistä toistettavuutta varten valittiin kaupallisista serokonversiopaneeleista 4 vasta-ainepositiivista näytettä, 2 näytettä Anti-IgG-testiin ja toiset 2 Anti-IgM-testiin. Näytteet ajettiin 7 rinnakkaisena samassa sarjassa. Samoin kittien omaa C1 positiivista kontrollia ajettiin 7 rinnakkaisena näytteenä. Anti-IgG-menetelmän tulokset ovat koottu taulukkoon 6. Yläriville on merkitty näytteen tiedot. Viimeisessä sarakkeessa on positiivinen kontrolli ja sen odotettu pitoisuus. Taulukon lopussa on laskettuna keskiarvo, hajonta ja variaatio.

Taulukko 6. Sarjojen sisäinen toistettavuus IgG-vasta-ainemääritysmenetelmällä. Testauksessa käytettiin kahta referenssipaneelin näytettä sekä kitin kontrollinäytettä C1.

HEV IgG U/ml	Näyte 1 006b 12	Näyte 2 006b 23	Näyte 3 C1 (0,91-1,87 U/ml)
	6,03	8,54	1,23
	5,58	7,64	1,19
	6,31	8,64	1,32
	7,01	8,71	1,24
	6,86	7,92	1,31
	6,42	7,78	1,28
	5,64	7,95	1,22
ka	6,26	8,17	1,26
keskihajonta	0,56	0,45	0,049
variaatio	8,86	5,46	3,87

Taulukossa 7 on sarjojen sisäisen toistettavuuden IgM-testien tulokset kahdesta eri serokonversiopaneelinäytteestä ja C1 positiivisesta kontrollista. IgM-vasta-ainekittiä oli saapunut kahta eri erää, joten osa näytteistä on ajettu molemmilla erillä.

Taulukko 7. Sarjojen sisäinen toistettavuus IgM-vasta-ainemääritysmenetelmällä. Testauksessa käytettiin kahta referenssipaneelin näytettä sekä kitin kontrollinäytettä C1. IgM vanha ja IgM uusi viittaavat kahteen eri reagenssierään.

HEV IgM index	Näyte 1 005b 7		Näyte 2 005b 20		Näyte 3 C1 (Index 2,42-4,17)	
	IgM vanha	IgM uusi	IgM vanha	IgM vanha	IgM vanha	IgM uusi
	36,4	32,72	6,75	6,74	3,67	3,18
	37,01	33,14	6,48	6,41	3,63	3,40
	37,08	32,15	6,55	6,92	3,48	3,40
	39,35	33,76	7,07	7,26	3,49	3,51
	39,00	32,06	6,89	7,11	3,69	3,63
	37,04	33,21	6,62	6,89	3,53	3,34
	36,60	31,87	7,09	6,57	3,44	3,35
ka	37,50	32,70	6,78	6,84	3,56	3,40
keskihajonta	1,18	0,70	0,25	0,30	0,10	0,14
variaatio	3,14	2,15	3,62	4,32	2,82	4,15

5.3 Procleix HEV Assay-osoitusmenetelmän toistettavuus ja herkkyys

BioQkontrollinäyte laimennettiin plasmaan, laboratorioveteen ja 0,9 % natriumkloridiliuokseen pitoisuuteen 15 IU/ml. Plasmaan ja laboratorioveteen laimennetut näytteet ajettiin 10 rinnakkaisena näytteenä molemmilla Panther-laitteilla, natriumkloridiliuokseen laimennettu ajettiin vain toisella analysaattorilla. Rinnakkaiset tulokset on koottu taulukoon 8 ja taulukon lopussa on laskettuna keskiarvo, keskihajonta ja variaatio.

Taulukko 8. Näytematriisin vaikutus Panther HEV NAT- tuloksien sisäiseen toistettavuuteen. Kontrollinäyte laimennettiin sekä plasmaan, NaCl-liuokseen että veteen ja ajettiin kahdella eri Panther -analysaattorilla (Positiivinen S/CO \geq 1)

	15 IU/ plasma		15 IU/ NaCl		15 IU/ aqua	
Laite	Panther 1165	Panther 1419	Panther 1165	Panther 1419	Panther 1165	Panther 1419
Näyte	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO
1	7,12	7,07	11,93	NT	6,85	15,50
2	10,92	3,97	3,40	NT	20,42	20,65
3	3,27	2,08	15,63	NT	2,78	4,79
4	9,09	6,90	14,98	NT	7,67	4,53
5	5,24	11,25	9,91	NT	6,19	21,44
6	3,31	4,70	21,03	NT	9,50	9,88
7	5,42	2,23	9,03	NT	12,40	18,06
8	2,14	8,59	23,08	NT	22,69	6,12
9	2,29	5,68	10,78	NT	3,81	20,66
10	8,41	1,39	11,18	NT	18,05	4,03
(11)	2,04	NT	NT	NT	NT	NT
ka	5,39	5,39	13,10		11,04	12,57
hajonta	3,11	3,15	5,81		7,07	7,42
variaatio	57,71	58,45	44,36		64,07	59,02

NT=not tested

Plasmaan laimennettua 15 IU/ml näytettä käytettiin myös sarjojen välisen toistettavuuden arvioimisessa. Näytettä ajettiin kahtena rinnakkaisena kontrollinäytteenä molemmilla laitteilla useampana eri päivänä. Taulukossa 9 näkyy laitteilta saadut tulokset, sekä molempien laitteiden keskiarvot, keskihajonnat sekä variaatio tuloksille ja myös yhteenlaskettu keskiarvo, keskihajonta ja variaatio. Tuloksia voi myös käyttää menetelmän herkkyuden tarkastelussa arvioimalla, kuinka monta kertaa näyte antoi reaktiivisen tuloksen analyysissa.

Taulukko 9. BioQControl HEV 15 IU/ml laimennoksen tulokset sarjojen välisessä testauksessa Procleix HEV Assay -menetelmällä (Positiivinen S/CO \geq 1)

	Panther 1165		Panther 1419	
pvm	Näyte (kahtena rinnakkaisena)		Näyte (kahtena rinnakkaisena)	
4.6.2019	6,43	1,6	NT	NT
6.6.2019	3,27	4,09	NT	NT
7.6.2019	NT	NT	4,6	13,41
11.6.2019	4,85	2,85	NT	NT
12.6.2019	NT	NT	13,89	9,16
13.6.2019	3,61	0,53	NT	NT
14.6.2019	NT	NT	3,29	6,75
18.6.2019	NT	NT	3,93	3,86
20.6.2019	NT	NT	9,45	9,84
21.6.2019	12,52	3,84	NT	NT
2.7.2019	0,83	3,66	1,73	2,59
3.7.2019	1,88	13,24	3,1	3,09
4.7.2019	4,34	12,86	2,1	1,5
ka	5,025		5,77	
hajonta	4,17		4,11	
variaatio	83,00		71,32	
ka	5,40			
hajonta	4,09			
variaatio	75,83			

NT= not tested

Taulukossa 10 on kerättyä jokaisen analyysisarjan alussa ajettujen positiivisten kalibraattorinäytteiden kolmesta rinnakkaismittauksesta saadut S/CO-arvot ja niistä lasketut keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiot sekä laitekohtaisesti että yhteenlaskettuna.

Taulukko 10. Panther HEV Assay-menetelmän sarjojen välinen toistettavuus tarkasteltuna positiivisen kalibraattorin S/CO-arvon perusteella

	Panther 1165			Panther 1419		
pvm	Kalibraattori (kolmena rinnakkaisena)			Kalibraattori (kolmena rinnakkaisena)		
3.6.2019	34,97	32,79	32,23	NT	NT	NT
4.6.2019	32,40	33,57	34,02	33,55	34,44	31,55
5.6.2019	NT	NT	NT	33,36	34,41	30,46
6.6.2019	31,60	34,76	33,63	NT	NT	NT
7.6.2019	NT	NT	NT	33,42	33,62	32,45
11.6.2019	34,48	33,11	32,25	36,81	31,07	30,73
11.6.2019	34,91	36,22	28,74	NT	NT	NT
12.6.2019	NT	NT	NT	34,64	33,06	32,28
13.6.2019	33,54	34,09	32,36	NT	NT	NT
14.6.2019	34,00	32,90	33,08	35,15	31,98	31,74
18.6.2019	NT	NT	NT	32,63	35,86	31,49
20.6.2019	32,12	35,99	31,88	34,52	30,27	34,41
21.6.2019	33,27	33,52	33,20	NT	NT	NT
2.7.2019	34,99	34,53	30,46	35,00	33,18	30,91
3.7.2019	32,44	35,73	31,82	31,63	31,56	33,47
4.7.2019	34,29	32,79	32,88	31,86	32,82	32,09
13.8.2019	33,46	34,56	31,97	NT	NT	NT
ka	33,32			32,93		
hajonta	1,52			1,62		
variaatio	4,56			4,93		
ka	33,13					
hajonta	1,58					
variaatio	4,78					

NT=not tested

5.4 Spesifisyys- ja sensitiivisyystestaus

Kaupallisista serokonversiopaneelinäytteistä analysoitiin sekä vasta-aine- että nukleiinihappotutkimuksia. Näytteet valittiin analyysihin sen perusteella, mitä näytevalmistaja oli saanut omista tuloksistaan, esim. oletettuja RNA negatiivisia näytteitä ei tutkittu Procleix HEV Assay nukleiinihaponosoitustestillä. Vasta-ainemäärittelyyn otettiin analysoitavaksi mahdollisuuksien mukaan ensimmäistä positiivista tulosta edeltävä negatiivinen näyte. Oletuksena oli, että nyt ajettavissa testeissä tuloksien tulisi olla vastaavat kuin mitä valmistaja on saanut omista testeistään.

IgG-vasta-ainemenetelmän cutoff-arvo eli mittausraja, jossa menetelmä tulkitsee reaktion olevan positiivinen, poikkeaa huomattavasti bioMérieuxin ja näytevalmistajan käyttämän testikitin välillä, joten arvoja ei voitu suoraan verrata toisiinsa. IgM-vasta-ainetestit ei ole kvantitatiivinen bioMérieuxilla toisin kuin paneelinäytteiden valmistajan testaajalla, eli niidenkään määrällinen vertailu ei ole mahdollista. Saatuja tuloksia voidaan kuitenkin käyttää menetelmien herkkyyden määrittämiseen. Taulukkoon 11 on koottu paneelin SCP-HEV-005b näytteistä saadut tulokset. Paneelin valmistajan testeistään saamat tulokset ovat rinnakkain nyt saatujen tulosten kanssa. Lisäksi sarakkeissa on näytenumero ja päivä. Ensimmäisen näytteen ottopäivä on numeroitu 0-päiväksi, seuraava näyte on otettu 4:nä päivänä. Viimeinen näyte on otettu 140 päivän päästä ensimmäisestä näytteestä.

Taulukko 11. HEV Serokonversiopaneelinäytteet SCP-HEV-005b (liite 1) (IgG positiivinen $\geq 0,56$ U/ml, IgM positiivinen Index-arvo ≥ 1 , HEV RNA positiivinen S/CO ≥ 1 , Biomex testit : IgG/M positiivinen ≥ 24 U/ml)

		Vasta-ainemääritys				RNA-osoitus	
		IgG		IgM		RNA	
Näyte nro	Pvä	Biomex tulos U/ml	Oma tulos U/ml	Biomex tulos U/ml	Oma tulos Index	Ilmoitettu tulos IU/ml	Oma tulos S/CO
1	0	2,82	NT	6,19	NT	27,7	Neg
2	4	2,76	NT	6,03	NT	245	Neg
3	14	2,39	NT	4,14	NT	6320	1,62
4	21	2,28	<0,10	8,20	0,86	16300	3,19
5	28	31,88	6,88	123,91	33,90	299	Neg
6	35	35,23	7,83	102,04	33,31	12	Neg
7	42	42,32	NT	106,77	35,1	Neg	NT
8	49	52,40	13,88	81,28	27,87	Neg	NT
9	63	80,80	25,07	69,41	22,26	Neg	NT
10	70	91,55	31,27	60,66	18,37	Neg	NT
11	77	111,60	39,66	55,55	16,06	Neg	NT
12	84	114,33	50,50	43,02	13,79	Neg	NT
13	91	136,83	59,07	42,87	11,83	Neg	NT
14	98	140,12	58,01	43,66	11,30	Neg	NT
15	105	154,70	81,20	42,12	10,95	Neg	NT
16	112	139,54	78,17	28,96	9,28	Neg	NT
17	119	NT	93,96	35,20	8,84	Neg	NT
18	126	NT	88,62	29,88	7,02	Neg	NT
19	134	167,04	103,24	33,13	7,42	Neg	NT
20	140	161,71	NT	28,23	6,81	Neg	NT

NT= not tested

Taulukkoon 12 on koottu paneelin SCP-HEV-006b näytteistä saadut tulokset. Tähän sarjaan näytteitä on kerätty 168 päivän aikana.

Taulukko 12. HEV Serokonversiopaneelinäytteet SCP-HEV-006b (liite 2) (Veripalvelun testit: IgG positiivinen $\geq 0,56$ U/ml, IgM positiivinen Index-arvo ≥ 1 , HEV RNA positiivinen S/CO ≥ 1 , Biomex testit: IgG/M positiivinen ≥ 24 U/ml)

		Vasta-ainemääritys				RNA-osoitus	
		IgG		IgM		RNA	
Näyte nro	Pvä	Biomex tulos U/ml	Oma tulos U/ml	Biomex tulos U/ml	Oma tulos Index	Ilmoitettu tulos IU/ml	Oma tulos S/CO
1	0	3,91	NT	9,69	NT	Neg	2,77
2	3	2,87	NT	8,50	NT	Neg	1,1
3	10	3,38	NT	9,91	NT	49,4	3,58
4	18	3,36	NT	8,54	NT	67,7	7,74
5	28	2,91	NT	9,56	NT	315	29,64
6	31	2,79	NT	8,34	NT	605	34,96
7	43	3,04	NT	10,61	NT	21300	49,45
8	46	3,76	NT	13,83	0,18	3420	39,33
9	50	12,42	2,12	25,96	2,30	90,2	31,51
10	56	21,90	3,15	24,73	1,02	44,9	9,18
11	105	45,20	6,46	19,18	0,23	Neg	Neg
12	108	31,72	6,26	15,00	NT	Neg	NT
13	112	45,77	6,10	13,72	NT	Neg	NT
14	120	NT	5,74	NT	NT	Neg	NT
15	123	42,97	5,68	12,28	NT	Neg	NT
16	127	47,40	5,42	12,49	NT	Neg	NT
17	130	57,31	5,64	13,28	NT	Neg	NT
18	137	56,45	5,97	14,23	NT	Neg	NT
19	141	51,59	6,30	13,13	NT	Neg	NT
20	144	54,77	6,24	12,07	NT	Neg	NT
21	151	NT	9,47	NT	NT	Neg	NT
22	162	55,68	7,56	14,34	NT	Neg	NT
23	168	63,96	8,17	14,00	NT	Neg	NT

NT=not tested

Negatiivista plasmaa ajettiin kummallakin vasta-ainemenetelmällä 10 rinnakkaista testiä. Kaikki saadut tulokset olivat negatiivisia, tulokset näkyvät taulukossa 13.

Taulukko 13. Anti-HEV IgG- ja IgM-menetelmillä analysoidut negatiiviset plasmanäytteet Vidas 3 -analysaattorilla.

Neg PI 6880 Vidas IgG U/ml 13.8.2019	Neg PI 6880 Vidas IgM Index-arvo 13.8.2019
<0,10	0,09
<0,10	0,07
<0,10	0,08
<0,10	0,09
<0,10	0,07
<0,10	0,11
<0,10	0,06
<0,10	0,06
<0,10	0,08
<0,10	0,10

Procleix HEV Assay menetelmällä ajettiin negatiivista plasmaa näytteenä toisella Panther -analysaattorilla 20 testiä ja toisella yhteensä 30 testiä. Näitä tuloksia hyödynnettiin menetelmien tarkkuuden määrittämisessä. Negatiivisesta plasmasta saadut tulokset on koottu taulukkoon 14.

Taulukko 14. Procleix HEV Assay -menetelmällä analysoidut negatiiviset plasmanäytteet analysoituina kahdella Panther -analysaattorilla

Panther 1165 11.6.2019 Neg PI 6880 HEV Assay S/CO	Panther 1165 13.8.2019 Neg PI 6880 HEV Assay S/CO	Panther 1419 11.6.2019 Neg PI 6880 HEV Assay S/CO
0,00	0,00	0,15
0,00	0,00	0,09
0,00	0,00	0,02
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,03
0,00	0,00	0,01
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,04
0,00	-	0,07
0,00	-	0,01
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,00
0,00	-	0,01

Lisäksi molemmilla Panther -analysaattoreilla analysoitiin satunnaisesti poimittuja luovuttajanäytteitä 495 kpl. Kaikki näytteet anonymisoitiin, ja ne ajettiin 45 näytteen sarjoissa 11 päivän aikana. Saadut tulokset olivat negatiivisia hepatiitti E -viruksen suhteen. Vidas 3- analysaattorilla analysoitiin 12 kpl satunnaisesti poimittuja ja uudelleen identifi-

oituja luovuttajanäytteitä molemmilla vasta-ainemenetelmillä. Kaikki tulokset olivat negatiivisia sekä IgG- että IgM-vasta-aineiden suhteen. Näitä tuloksia käytettiin menetelmien tarkkuuden määrittämiseen.

Alla olevaan taulukkoon 15 on koottu kaikista menetelmistä saadut tulokset herkkyydestä, tarkkuudesta ja toistettavuudesta. Procleix HEV Assayn toistettavuuksien laskemiseen on käytetty plasmaan laimennetun 15 IU/ml näytteen S/CO arvoja, ja sen alapuolella on positiivisen kalibraattorin S/CO arvoista saatu variaatio.

Taulukko 15. Procleix HEV RNA Assay, VIDAS Anti-HEV IgG ja Anti-HEV IgM verifointitulokset koottuna

	HEV RNA Assay	Anti-HEV IgG	Anti-HEV IgM
Herkkyys	96,23 % (15 IU/ml)	100 %	100 %
Tarkkuus	100 %	100 %	100 %
Sarjojen välinen toistettavuus (RSD%)	75 % (15 IU/ml) 4,7 % (pos. kontrolli)	4,86 %	4,26 %
Sarjojen sisäinen toistettavuus (RSD%)	57 % (15 IU/ml) 4,6 % (pos. kontrolli)	3,87 % - 8,86 %	2,15 % - 4,32 %

6 Pohdinta

6.1 Tulosten tarkastelu

Vidas-analysaattorin IgG- ja IgM-vasta-ainetunnistusmenetelmät osoittivat toimivansa odotuksien mukaan. Taulukoissa 5, 6 ja 7 on esitetty Vidas 3 -laitteella tutkitut sarjojen väliseen ja sisäiseen toistettavuuteen vaikuttavat tulokset. Taulukossa 5 näkyy variaation olevan molemmissa menetelmissä alle 5 % tarkistettaessa sarjojen välistä toistettavuutta. Sarjojen sisäisen toistettavuuden välillä taulukoissa 6 ja 7 variaatio vaihteli 3,87 - 8,86 % IgG- ja 2,15 - 4,15 % IgM- vasta-ainetunnistusmenetelmällä. Omissa testeissä bioMérieux on saanut HEV IgG-menetelmällä pitoisuuden ollessa 0,64 U/ml sarjojen väliseksi variaatioksi 9,1 % ja sarjojen sisäisen toistettavuuden variaatioksi 5,1 %

(bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgG (HEVG)). IgM-menetelmällä sarjojen välisen toistettavuuden variaatio on ollut index-arvon ollessa 1,60 7,5 % ja sarjojen sisäisen toistettavuuden variaatio 4,1 % (bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgM (HEVM)). Hyväksymiskriteerinä on sarjojen sisäisessä toistettavuudessa RSD <10 % ja sarjojen välisessä toistettavuudessa RSD <15 %, eli tulokset täyttävät hyväksymiskriteerit toistettavuuksien suhteen.

Herkkyydessä ja tarkkuudessa käytettiin hyväksi kuvion 5 kaaviota ja siihen liittyviä laskutoimituksia. Vidas 3 -laitteen Anti-HEV vasta-ainemenetelmien herkkyyttä laskettiin taulukkoon 5 koottujen näytteiden tuloksista. Molemmilla vasta-ainemääritysmenetelmillä on analysoitu 28 näytettä, jotka kaikki antoivat positiivisen tuloksen. Näin herkkyydeksi saadaan molemmille menetelmille 100 %. Taulukoista 11 ja 12 saadaan yhteensä 29 testistä 29 positiivista IgG- ja 18 testistä 18 positiivista IgM-vasta-ainetulosta, joista laskemalla herkkyydeksi saadaan taas 100 % molemmille menetelmille. Tarkkuuden arvioimiseen käytettiin negatiivisia näytteitä. Luovuttajanäytteet (12 kpl) ja negatiivinen plasma (10 kpl) antoivat kaikista analyyseistä negatiivisen tuloksen, joten niiden perusteella tarkkuudeksi saatiin 100 %. Herkkyydessä bioMérieux on saanut IgM-menetelmälle 85 näytteellä 97,65 % ja tarkkuudeksi 303 näytteellä 99,34 %, ja IgG-menetelmälle herkkyydeksi 150 näytteellä 96,67 % ja tarkkuudeksi 307 näytteellä 96,55 % (bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgG (HEVG); bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgM (HEVM)). Omien tulosten perusteella voidaan todeta herkkyyden ja tarkkuuden täyttävän hyväksymiskriteerit.

Verrattaessa näytevalmistajan serokonversiopaneeleista saamia tuloksia omista Anti-HEV analyyseistä saatuihin tuloksiin, arvoja ei voida verrata suoraan toisiinsa eri suurusten cutoff -rajojen takia. Näytevalmistajan käyttämien testien cutoff -raja positiiviselle vasta-ainetulokselle on ollut molemmissa menetelmissä 24 U/ml, kun taas Vidas 3 -laitteen IgG-menetelmässä positiivisen tuloksen raja on 0,56 U/ml ja IgM-testissä käytetään index-arvoa, jonka positiivisen tuloksen raja on 1. Näytevalmistajan testeissään käyttämä Mikrogen recomWell ilmaisee myös pakkausselosteessaan, että heidän käyttämänsä U/ml arvo on saatu laskemalla kaavasta, eikä sitä voida suoraan verrata kansainväliseen Unit yksikköön.

Taulukossa 11 on koottuna tulokset paneelista SCP-HEV-005b. Saadut IgG- ja IgM-tulokset vastaavat paneelien oletustuloksia positiivisuuden ja negatiivisuuden suhteen. Taulukon 12 SCP-HEV-006b paneelinäytteissä saatiin näytteistä numero 9 ja 10 positiiv-

visia IgG-vasta-aineen suhteen, kun näytevalmistajan mukaan ne olisivat vielä olleet negatiivisia. On täysin mahdollista, että Vidas Anti-HEV IgG-menetelmä on herkempi ja antaa siksi näytteistä positiivisen tuloksen.

Procleix HEV Assay -menetelmän herkkyysrajan oli arvioitu olevan noin 10 IU/ml Procleixin pakkausselosteen perusteella. Herkkyyden määrittämiseen käytettiin BioQkontrollista valmistettua 15 IU/ml laimennosta. Panther-laitteilla ajettujen tulosten S/CO -arvot erosivat huomattavasti toisistaan jo laitteiden sisäisissä rinnakkaismäärittäyksissä. Jotta voitiin sulkea pois näytematriisissa mahdollisesti olevat HEV RNA:ta inhiboivat eli sen monistumista estävät tekijät, tehtiin tarkistukseksi vastaavat laimennokset laboratoriove-teen ja 0,9 % natriumkloridiliuokseen. Analyysit antoivat hieman korkeampia S/CO tuloksia, mutta keskihajonta rinnakkaisten välillä oli edelleen huomattava (plasma S/CO=5,39, RSD=54,6 %; aqua S/CO=11,80, RSD=60,1 % ja NaCl S/CO=13,1, RSD=44,4 %). Tulokset on esitetty taulukossa 8. Grifols esittikin, ettei menetelmä ole kvantitatiivinen, ja on tiedossa, että pitoisuuden lähestyessä määrittäysrajaa (LOD=limit of detection) rinnakkaisten mittausten RLU ja S/CO arvot saattavat poiketa toisistaan. 95 % LOD, eli alin raja, jossa vielä 95% tuloksista antaa positiivisen tuloksen, on HEV Assay -menetelmällä 7,86 IU/ml. Testeissään Procleix on saanut matalalla HEV Low QC -kontrollilla S/CO -arvon ollessa keskimäärin 15,44 variaatioksi 41 %. Tämä vastaa NaCl-liuokseen laimennetun BioQkontrollin arvoja, jossa S/CO arvon keskiarvon ollessa 13,1 niin variaatio oli 44,4 %. Plasmaan laimennettua BioQkontrollia ajettiin kaiken kaikkiaan 53 näytettä, joista 13.6.19 ja 3.7.19 saaduista tuloksista rinnakkaisista näytteistä toinen oli negatiivinen. 51/53 näytteestä ollessa positiivisia herkkyydeksi tulee 96,23 %. Ab-ravanelin ym. vuonna 2016 Ranskassa tehdyssä tutkimuksessa Procleix HEV Assay-menetelmän herkkyydeksi oli saatu (LOD 95 %) 24 IU/ml subtyypille 3a, 3c:lle 34 IU/ml ja 53 IU/ml 3f:lle. Näytteet olivat valmistettu WHO:n standardista.

Tarkkuuden määrittämisessä käytettiin hyväksi analysoituja 495 luovuttajanäytettä, joista kaikista tuli negatiivinen tulos. Laskukaavaan syötettynä saatiin tarkkuudeksi 100 %. Tarkkuuden määrittämisessä voidaan myös huomioda 50 negatiivista plasmanäytettä, jotka analysoitaessa olivat kaikki negatiivisia. Tällöin tarkkuus olisi 100 % 545 näytteellä. Grifols on itse ajanut tarkkuusmäärittämisessään 4494 luovuttajanäytettä, joista negatiivisia oli 4493 ja virheellisesti positiivisia 1, ja sai näin ollen tarkkuudeksi 99,98 %.

Taulukossa 11 on koottuna tulokset paneelistä SCP-HEV-005b. RNA-osoituksessa kuuden ensimmäisen näytteen olisi pitänyt antaa positiivinen tulos HEV RNA:n suhteen,

mutta näytteistä 1, 2, 5 ja 6 saatiin negatiivinen tulos Procleixin HEV Assay testillä. Näytteen 1 pitoisuus oli 27,7 IU/ml, 2. näytteen 245 IU/ml, 5. näytteen 299 IU/ml ja 6. näytteen 12 IU/ml, eli kaikki näytteet olivat Procleix HEV Assayn herkkyysrajan sisällä, ja tulosten olisi pitänyt olla positiivisia. Valitettavasti näytemäärä riitti vain yhteen määrittelyyn, joten tutkimuksia ei voitu uusida. Mahdollisia syitä virheellisiin negatiivisiin tuloksiin oli, että näytteet olivat esimerkiksi päässeet sulamaan kuljetuksen aikana ja RNA:n määrä oli pienentynyt tämän takia, tai näytteet olivat sekoittuneet huonosti, eikä RNA:ta pipetoitunut riittävästi monistamista varten. Myös 3. ja 4. näyte antoivat vain heikosti positiivisen tuloksen, 3. näytteen S/CO oli vain 1,32 ja 4. näytteen 3,19, vaikka pitoisuudet näytteissä olivat 6300 IU/ml ja 16000 IU/ml eli S/CO arvojen olisi pitänyt olla jopa yli 30 kun vertaa vastaavan vahvuisiin toisen paneelin näytteisiin. Tulokset viittasivat koko paneelin RNA-määrän pienenemiseen. On kuitenkin vaikea sanoa, mikä aiheutti liian matalat pitoisuudet paneelin SCP-HEV-005b näytteille, koska näytteet tulivat samassa lähetyksessä, säilytettiin samassa paikassa, näytteet sulatettiin samanaikaisesti ja käsiteltiin samalla tavalla toisen paneelin näytteiden kanssa. Sen tuloksissa ei vastaava alenemaa näkynyt. Taulukon 12 SCP-HEV-006b paneelinäytteissä saatiin RNA:n osoituksessa Procleix HEV Assay -menetelmällä näytteille 1 ja 2 positiivinen tulos niiden ollessa negatiivisia valmistajan mukaan. Näytteet on valmistajan puolelta ajettu RealStar HEV RT PCR -menetelmällä, jonka herkkyysrajaksi on saatu 37,8 IU/ml (Vollmer – Knabbe – Dreier 2014). Procleix HEV Assay on siis herkempi, ja tulokset voivat sen perusteella olla positiivisia.

Verifiointi kriteereihin kuului myös toimintavarmuuden ja häiriöiden seuraaminen. Anti-HEV IgM-menetelmän ensimmäinen kalibrointi epäonnistui, koska C2 negatiivinen kontrolli antoi positiivisen tuloksen. Kalibroinnin tarkistus uusittiin käyttäen toisen paketin C2 negatiivista kontrollia. Ensimmäistä väärän positiivisen tuloksen antanutta negatiivista C2 kontrollia ajettiin näytteenä, että voitiin sulkea pois kontrollipullon kontaminoituminen. Samaan sarjaan laitettiin analysoitavaksi myös C1 positiivista kontrollia kahtena erillisenä näytteenä, mutta laite antoi niille molemmille invalid-tuloksen pipetointivirheen vuoksi. Nämä olivatkin ainoat epäonnistuneet näytteet vasta-ainemenetelmien osalta. Niidenkin kohdalla syy oli todennäköisesti kontrollinäytteen liian pieni määrä näyteputkessa. Procleix HEV Assay menetelmällä ei tullut yhtään invalid tulosta. Näin ollen saatujen tulosten perusteella ei voida vielä sanoa, aiheuttaako näytteen ikteerisyys, lipeemisyys tai hemolyyttisyys vääriä positiivisia tuloksia tai invalid-tuloksia. Positiivisen näytteen kulkeutumista seuraavaan näytteeseen ei ollut havaittavissa missään menetel-

mässä. Procleix HEV Assay menetelmällä useampi sarja aloitettiin positiivisella kontrollinäytteellä, jonka jälkeen ajettiin anonymisoituja luovuttajanäytteitä, jotka kaikki saivat negatiivisen tuloksen, eli edeltävä positiivinen näyte ei aiheuttanut väärää reaktiivista tulosta.

6.2 Tutkimuksen luotettavuus

Opinnäytetyön pohjaksi käytettyyn kirjallisuuteen kerättiin mahdollisimman uutta tietoa, pyrkien valitsemaan teoksia, joiden julkaisu oli tapahtunut viiden vuoden sisällä. Joidenkin julkaisujen ajankohta on ollut aikaisemmin, mutta näissä on pyritty huomioimaan, ettei kyseisellä alueella tieto ole muuttunut olennaisesti. Käytetyt lähteet ja viittaukset lähteisiin on merkitty asianmukaisesti ja huolellisesti, eikä tekstiä ole kopioitu suoraan lähteistä opinnäytetyöhön.

Tutkimuksen laboratoriotöistä pidettiin laboratoriopäiväkirjaa, josta käy ilmi kunakin päivänä suoritettut analyysit, ajetut näytteet ja käytetty reagenssierä. Laboratoriopäiväkirja toimi taustatietona tulosten käsittelyssä ja raportin kirjoituksessa, vahvistaen näin raportin luotettavuutta. Analyysit tehtiin huolellisesti ja noudattaen hyviä laboratoriotapoja. Menetelmiin ja vaadittaviin työtapoihin perehdyttiin huolellisesti etukäteen ja analyysien suoritus suunniteltiin ennalta pyrkien minimoimaan reagenssien hävikkiä. Tilojen puhtaudesta ja siisteydestä huolehdittiin sekä ennen analyysijä että niiden jälkeen kontaminaation välttämiseksi. Saadut tulokset analysoitiin ja esitettiin rehellisesti. (Helsingin yliopisto 2019.)

6.3 Tutkimuksen eettisyys

Tutkimuksessa analysoitavat näytteet eivät identifioituneet kehenkään luovuttajaan suoraan, vaan satunnaisesti luovuttajanäytteiden joukosta kerätyille putkille annettiin uudet numerot ennen niiden analysointia. Uutta ja vanhaa numeroa ei kirjattu mihinkään siten, että niitä voisi myöhemmin yhdistää toisiinsa. (Suomen Bioanalyttikoliitto ry 2017.) Jos jokin näyte olisi antanut reaktiivisen tuloksen, hepatiitti E on kuitenkin melko vaaraton terveelle ihmiselle, jollainen verta luovuttamaan tullut henkilö on luovutushetkellä kokenut olevansa. Näin on helpompi hyväksyä se, ettei luovuttaja olisi saanut tietää mahdollisesta hepatiitti E tartunnasta.

Veripalvelu on hakenut tutkimusluvut projektilleen ”Hepatiitti E-viruksen esiintyvyys suomalaisessa verenluovuttaja-aineistossa ja verivälitteisen tartunnan riski”, ja koska opinnäytetyön menetelmäverifiointi on osa tätä suurempaa projektia, opinnäytetyötä varten ei ole haettu erillistä tutkimuslupaa.

6.4 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa Procleix HEV Assay, Vidas Anti-HEV IgG- ja Anti-HEV IgM-vasta-ainemenetelmien soveltuvuus Veripalvelussa alkavan VerHEVi-projektin tutkimusmenetelmiksi. Tarkoituksena oli selvittää täyttyvätkö kaikkien menetelmien verifiointikriteerit ja toimivatko menetelmät luotettavasti hepatiitti E-viruksen osoituksessa.

Saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että Panther- ja Vidas 3-analysaattoreiden menetelmät soveltuvat Veripalvelun tarpeisiin verenluovuttajien hepatiitti E -viruksen seulontaan. Menetelmien herkkyydet ja tarkkuudet sekä sarjojen sisäiset ja väliset toistettavuudet ovat riittävät ja kaikki verifiointin hyväksymiskriteerit täyttyivät. (Taulukko 13)

6.5 Kehittämisehdotukset

Procleix HEV Assay menetelmän toistettavuustuloksien tarkistamiseksi tehdään vielä lisätutkimuksia WHO:n standardia käyttäen. Standardinäyte ei ollut saatavilla opinnäytetyön teon aikana. Toistettavuustuloksia täydennetään tekemällä sarjoja eri vahvuisista laimennoksista WHO:n standardista. Toisella WHO standardipaneelilla osoitetaan, että menetelmä kykenee löytämään kaikki 4 eri HEV genotyyppiä.

6.6 Ammatillinen kasvu

Sekä opinnäytetyön suunnitteluvaiheessa ja raportointivaiheessa tuli käytyä läpi valtava määrä tieteellisiä artikkeleita. Työn edetessä oppi karsimaan epäolennaisia artikkeleita ja rajaamaan aiheen koskemaan vain menetelmien verifiointia, eikä uppoutumaan jatko-projektia koskeviin ulkomaisista verenluovuttajista tehtyihin tutkimuksiin. Opinnäytetyön prosessin aikana oppii hahmottamaan tutkimus- ja kehitysprojekteihin vaadittavat eri vaiheet aina työsuunnitelman tekemisestä sen toteuttamiseen ja raportointiin asti. Taito tieteelliseen kirjoittamiseen kehittyi koko prosessin ajan. Myös tulosten analyttinen ja kriittinen tarkastelu ja arvioiminen tulivat tutuksi.

Lähteet

Abravanel, Florence – Lhomme, Sébastien – Chapuy-Regaud, Sabine – Mansuy, Jean-Michel – Boineau, Jérôme – Sauné, Karine – Izopet, Jacques 2018. A fully automated system using transcription-mediated amplification for the molecular diagnosis of hepatitis E virus in human blood and faeces. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*. 109-111.

Barker, Edward 2004. *Immunity to Viruses*. Teoksessa Pier, Gerald B. – Lyczak, Jeffrey B. – Wetzler, Lee M. (toim.) 2004. *Immunology, Infection, and Immunity*. Washington DC: ASM Press 2004.

bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgG (HEVG). 09/2017. Pakkausseloste

bioMérieux VIDAS Anti-HEV IgM (HEVM). 09/2017. Pakkausseloste

bioMérieux VIDAS system. Powerpoint-perehdytysmateriaali 2019. Ranska.

Biomex HEV Seroconversion Panel 005b. 05/2016. Pakkausseloste (liite 1)

Biomex HEV Seroconversion Panel 006b. 05/2016. Pakkausseloste (liite 2)

Bio QControls. P0264 ViraQ HEV Check 125. October 2017. Pakkausseloste

Brown, Terence A. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Wiley-Blackwell publishing 2010.

Corley, Ronal B 2004. *Antibodies*. Teoksessa Pier, Gerald B. – Lyczak, Jeffrey B. – Wetzler, Lee M. (toim.) 2004. *Immunology, Infection, and Immunity*. Washington DC: ASM Press 2004.

Eberly College of Science. Pennstate 2019. Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. Verkkodokumentti. < <https://newonlinecourses.science.psu.edu/stat507/node/71/>> Luettu 10.10.2019

Geng, Yangsheng – Wang, Youchun 2016. *Epidemiology of Hepatitis E*. Teoksessa Wang, Youchun (toim.). *Hepatitis E virus*. Beijing: Springer.

Goering, Richard V. – Dockrell, Hazel M. – Zuckerman, Mark – Chiodini, Peter L. 2019. *Mim's Medical Microbiology and Immunology*. China: Elsevier.

Helsingin yliopisto. Tutkimusetiikka. Verkkodokumentti <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimus/tutkimusymparisto/tutkimusetiikka>>. Luettu 23.2.2019.

Hägg, Margareta (toim.) 2016. *Validoinnin suunnittelun opas*. VTT. Verkkodokumentti. <<https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>> Luettu 20.2.2019.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka. Laboratorion analyysitekniikat. Edita 2006.

Kamar, Nassim – Dalton, Harry R. – Abravanel, Florence – Izopet, Jacques. Hepatitis E virus Infection. Clinical Microbiology Reviews 2014. 116-138.

Kamp, Christel – Blümel, Johannes – Baylis, Sally – Bekeredjian-Ding, Isabelle – Chudy, Michael – Heiden, Margarethe – Henseler, Olaf – Keller-Stanislawski, Brigitte – de Vos, Anneke S. – Funk, Markus B. Impact of hepatitis E virus testing on the safety of blood components in Germany – result of a simulation study. Verkkodokumentti 2018. < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vox.12719> > Luettu 30.9.2019

Kantala, Tuija 2017. Presence of hepatitis E virus (HEV) and markers for HEV infection in production swine, human patients with unexplained hepatitis, and veterinarians in Finland.

Khuroo, Mohammed S – Khuroo, Mehnaaz S – Khuroo, Naira S. 2016. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. Verkkodokumentti < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4988308/> > Luettu 20.10.2019.

Krain, Lisa J. – Nelson, Kenrad E. – Labrique, Alain B. 2014. Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. Clinical Microbiology Reviews. 139-165.

Lappalainen, Maija. – Vainionpää, Raija – Hedman, Klaus. Diagnostiset menetelmät. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Vaara, Martti (toim.): Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2017. Verkkodokumentti. Luettu 19.9.2019.

Lumio, Jukka 2019. Maksatulehdus (hepatiitti) aikuisilla. Duodecim Terveyskirjasto. Helsinki. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=dlk00451> Luettu 24.1.2019

Mikrogen recomWell HEV. Pakkausseloste.

Nordlab 2017. Näytteen määrittystä haittaavat tekijät. Tiedote. Verkkodokumentti. <https://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/5_2017.pdf> Luettu 01.10.2019

Procleix HEV Assay. 2014. Pakkausseloste.

Seppälä, Ilkka J. T. – Meri, Seppo 2011. Immunologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Vaara, Martti (toim.): Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2017. Verkkodokumentti. Luettu 10.2.2019

Seppälä, Ilkka – Söderlund, Maria – Lappalainen, Maija – Hedman, Klaus 1994. Vastaineen aviditeetti immuunivasteessa ja infektioautien diagnostiikassa. Duodecimlehti 2. Saatavilla sähköisesti. <<https://duodecimlehti.fi/lehti/1995/2/duo40041>> Luettu 01.10.2019

Solunetti (2006). Solubiologia. Virukset. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virukset>> Luettu 29.03.2019.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyttikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Verkkodokumentti < https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf > Luettu 24.2.2019.

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2019. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. Verkkodokumentti < https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12176 > Luettu 20.10.2019.

Tong, Y. 2014. Isothermal amplification of specific sequences. Verkkodokumentti. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857095015500039> > Luettu 25.2.2019.

Veripalvelu 2019. Luovuttajien infektiotutkimukset. Yleisohje LP-YO-301. 23. painos.

Vina-Rodrigues, Ariel – Schlosser, Josephine – Becher, Dietmar – Kaden, Volker – Groschup, Martin H – Eiden, Martin 2015. Hepatitis E Virus Genotype 3 Diversity: Phylogenetic Analysis and Presence of Subtype 3b in Wild Boar in Europe. Verkkodokumentti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452927/>> Luettu 10.10.2019.

Volmer, T. – Dieckmann, J. – Knabbe, C. – Dreier, J. Hepatitis E virus blood donor NAT screening: as much as possible or as much as needed? Verkkodokumentti 2018. < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/trf.15058> > Luettu 10.2.2019.

Volmer, T. – Knabbe, C. – Dreier, J. Comparison of Real-Time PCR and Antigen Assays for Detection of Hepatitis E Virus in Blood Donors. Verkkodokumentti 2014. < <https://jcm.asm.org/content/jcm/52/6/2150.full.pdf> > Luettu 24.10.2019

Wang, Youchun – Zhao, Chenyan – Qi, Ying – Geng, Yansheng 2016. Hepatitis E virus. Teoksessa Wang, Youchun (toim.). Hepatitis E virus. Beijing: Springer. 1-16.

Wen, Gui-Ping – Chen, Chang-Rong – Song, Xiu-Yu – Tang, Zi-Min – Ji, Weng-Fang – Wang, Si-Ling – Zhang, Ke – Zhang, Jun – Zheng, Zi-Zheng – Xia, Ning-Shao. Long-term HEV carriers without antibody seroconversion among eligible immunocompetent blood donors. Verkkodokumentti 2018. <<https://www.nature.com/articles/s41426-018-0125-y>> Luettu 10.2.2019

Wild, David (toim.) The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford: Elsevier Science & Technology 2013.

World Health Organisation. Hepatitis E. Verkkodokumentti 2019. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>> Luettu 19.9.2019

Yates, Karen E.– Lyczak, Jeffrey B. Overview of Immunity. Teoksessa Pier, Gerald B. – Lyczak, Jeffrey B. – Wetzler, Lee M. (toim.) 2004. Immunology, Infection, and Immunity. Washington DC: ASM Press 2004. 3-26.

Zhou, Yan – Zhao, Chenyan – Tian, Yabin – Xu, Nan – Wang, Youchun 2016. Characteristics and Functions of HEV Proteins. Teoksessa Wang, Youchun (toim.). Hepatitis E virus. Beijing: Springer.

Biomex Serokonversiopaneeli SCP-HEV-005b

BIOMEX

E

HEV Seroconversion Panel

REF Catalogue No: SCP-HEV-005b

The Biomex GmbH HEV Seroconversion Panel consists of 20 members with each member containing 1.5 mL of human plasma. This panel illustrates the onset and decline of IgM and IgG Hepatitis E virus antibodies from one individual over a period of 140 days.

1. Intended Use

This Seroconversion Panel (SCP) is intended for standard testing by diagnostic manufacturers and researchers during assay development, evaluation, troubleshooting and post-marked surveillance of IgM/IgG antibody test systems and methods. Moreover, it serves as validation tool for diagnostic sensitivity, determination of analytical sensitivity, identification of cut-off values or to study the humoral immune response to this infection.

2. Storage and Stability

Store the SCP at -20°C to -80°C. Thaw samples at room temperature and mix gently by inversion before usage. Avoid foaming, contamination and repeated freeze and thaw cycles. After usage, return immediately to storage conditions.

3. Warnings and Precautions

Potentially infectious materials. Handle the product as if capable of transmitting infectious diseases. Do not pipette by mouth.

Prevention:

P264: Wash hands thoroughly after handling.

P270: Do not eat, drink or smoke when using this product

P273: Avoid the release to the environment

Disposal:

P501: Dispose of waste in accordance to applicable local or national regulations. Waste must be disposed in a secured manner.

4. Donor information

All panel members have been tested and found negative/non-reactive for anti-HIV 1/2, anti-HCV and HBsAg with CE marked tests.

Donor profile

- Sex: Male
- Age: 27
- Ethnicity: Caucasian
- Residence: Germany
- HEV Genotype: 3a

5. Detection Methods

Each panel member has been tested for HEV RNA with RealStar HEV RT-PCR kit by Altona Diagnostic Technologies (ADT). The HEV IgM and IgG antibodies were detected with Mikrogen recomWell. Testing is performed with CE marked test.

6. Limitations and Restrictions

This panel is for Research Use Only and not intended for human or animal diagnostics, or for therapeutic purposes. Each laboratory has the responsibility to ascertain the suitability of the SCP for its particular application and to establish their own guidelines for interpretation of results. Data is provided for informational purposes only. The Biomex GmbH does not claim that others can duplicate these test results exactly.

Declaration of used symbols

REF Catalog Number	LOT Lot Number	 Consult Instructions for Use	 Manufactured by	 Temperature Limitation
------------------------------	--------------------------	--	---	--

Biomex GmbH, Siemensstraße 38, 69123 Heidelberg, GERMANY
Phone +49(0) 6221-894669-0, Fax +49(0) 6221-894669-50, www.biomex.de

06/2016

Page 1 of 3

BIOMEX

E

HEV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HEV-005b

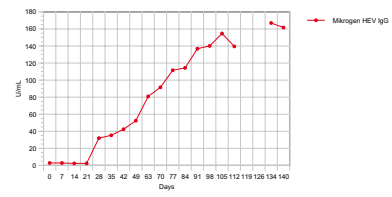
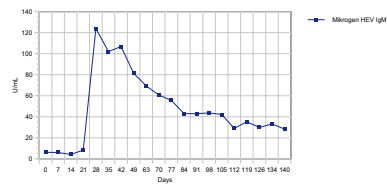
Panel Member	Day	Bleed Date	RealStar HEV RT PCR IU/mL	Mikrogen recom-Well HEV IgM U/mL	Mikrogen recomWell HEV IgM Valuation	Mikrogen recomWell HEV IgG U/mL	Mikrogen recomWell HEV IgG Valuation	GLDH U/L	ALT U/L	AST U/L	BillT mg/dL
1	0	21.07.2011	2.77E+01	6.19	negative	2.82	negative	<2.0	10	26	0.73
2	7	28.07.2011	2.45E+02	6.03	negative	2.76	negative	2.3	14	36	0.82
3	14	04.08.2011	6.32E+03	4.14	negative	2.39	negative	3.0	14	37	0.82
4	21	11.08.2011	1.63E+04	8.20	negative	2.28	negative	3.3	24	39	0.80
5	28	18.08.2011	2.99E+02	123.91	positive	31.88	positive	2.4	20	34	0.39
6	35	25.08.2011	1.20E+01	102.04	positive	35.23	positive	<2.0	17	30	0.60
7	42	01.09.2011	negative	106.77	positive	42.32	positive	<2.0	15	29	0.52
8	49	08.09.2011	negative	81.28	positive	52.40	positive	<2.0	17	30	0.66
9	63	22.09.2011	negative	69.41	positive	80.80	positive	<2.0	10	23	0.36
10	70	29.09.2011	negative	60.66	positive	91.55	positive	2.4	11	30	0.59
11	77	06.10.2011	negative	55.55	positive	111.60	positive	2.2	12	33	0.54
12	84	13.10.2011	negative	43.02	positive	114.33	positive	2.1	18	31	1.00
13	91	20.10.2011	negative	42.87	positive	136.83	positive	2.0	14	30	0.83
14	98	27.10.2011	negative	43.66	positive	140.12	positive	2.4	14	33	0.42
15	105	03.11.2011	negative	42.12	positive	154.70	positive	2.1	13	26	0.48
16	112	10.11.2011	negative	28.96	positive	139.54	positive	2.5	13	28	0.24
17	119	17.11.2011	negative	35.20	positive	NT	NT	<2.0	14	27	0.35
18	126	24.11.2011	negative	29.88	positive	NT	NT	<2.0	12	25	0.45
19	134	02.12.2011	negative	33.13	positive	167.04	positive	<2.0	17	30	0.56
20	140	08.12.2011	negative	28.23	positive	161.71	positive	2.1	13	27	0.57

NT= not tested

Biomex GmbH, Siemensstraße 38, 69123 Heidelberg, GERMANY
Phone +49(0) 6221-894669-0, Fax +49(0) 6221-894669-50, www.biomex.de

Page 2 of 3

HEV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HEV-005b



Biomex HEV Serokonversiopaneeli SCP-HEV-006b

BIOMEX**E**

HEV Seroconversion Panel

REF Catalogue No: SCP-HEV-006b

The Biomex GmbH HEV Seroconversion Panel consists of 23 members with each member containing 1.5 mL of human plasma. This panel illustrates the onset and decline of IgM and IgG Hepatitis E virus antibodies from one individual over a period of 168 days.

1. Intended Use

This Seroconversion Panel (SCP) is intended for standard testing by diagnostic manufacturers and researchers during assay development, evaluation, troubleshooting and post-marked surveillance of IgM/IgG antibody test systems and methods. Moreover, it serves as validation tool for diagnostic sensitivity, determination of analytical sensitivity, identification of cut-off values or to study the humoral immune response to this infection.

2. Storage and Stability

Store the SCP at -20°C to -80°C. Thaw samples at room temperature and mix gently by inversion before usage. Avoid foaming, contamination and repeated freeze and thaw cycles. After usage, return immediately to storage conditions.

3. Warnings and Precautions

Potentially infectious materials. Handle the product as if capable of transmitting infectious diseases. Do not pipette by mouth.

Prevention:

P264: Wash hands thoroughly after handling.

P270: Do not eat, drink or smoke when using this product

P273: Avoid the release to the environment

Disposal:

P501: Dispose of waste in accordance to applicable local or national regulations. Waste must be disposed in a secured manner.

4. Donor Information

All panel members have been tested and found negative/non-reactive for anti-HIV 1/2, anti-HCV and HBsAg with CE marked tests.

Donor profile

- Sex: Male
- Age: 22
- Ethnicity: Caucasian
- Residence: Germany
- HEV Genotype: 3c

5. Detection Methods

Each panel member has been tested for HEV RNA with RealStar HEV RT-PCR kit by Altona Diagnostic Technologies (ADT). The HEV IgM and IgG antibodies were detected with Mikrogen recomWell. Testing is performed with CE marked test.

6. Limitations and Restrictions

This panel is for Research Use Only and not intended for human or animal diagnostics, or for therapeutic purposes. Each laboratory has the responsibility to ascertain the suitability of the SCP for its particular application and to establish their own guidelines for interpretation of results. Data is provided for informational purposes only. The Biomex GmbH does not claim that others can duplicate these test results exactly.

Declaration of used symbols

REF Catalog Number	LOT Lot Number	 Consult Instructions for Use	 Manufactured by	 Temperature Limitation
------------------------------	--------------------------	--	---	--

Biomex GmbH, Siemensstraße 38, 69123 Heidelberg, GERMANY
Phone +49(0) 6221-894689-0, Fax +49(0) 6221-894689-50, www.biomex.de

06/2016

Page 1 of 3

BIOMEX**E**

HEV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HEV-006b

Panel Member	Day	Blood Date	RealStar HEV RT PCR IU/mL	Mikrogen recom-Well HEV IgM U/mL cut off 24 U/mL	Mikrogen recomWell HEV IgM Valuation	Mikrogen recomWell HEV IgG U/mL cut off 24 U/mL	Mikrogen recomWell HEV IgG Valuation	GLDH U/L	ALT U/L	AST U/L	Biit mg/dL
1	0	25.07.2011	negative	9.69	negative	3.91	negative	2.3	23	32	1.00
2	3	28.07.2011	negative	8.50	negative	2.87	negative	2.8	15	25	0.59
3	10	04.08.2011	49.4	9.91	negative	3.38	negative	2.1	17	26	0.55
4	18	12.08.2011	67.7	8.54	negative	3.36	negative	3.0	41	56	0.71
5	28	22.08.2011	315	9.56	negative	2.91	negative	2.1	29	32	0.39
6	31	25.08.2011	605	8.34	negative	2.79	negative	2.6	27	27	0.36
7	43	06.09.2011	21300	10.61	negative	3.04	negative	8.4	63	56	0.67
8	46	09.09.2011	3420	13.83	negative	3.76	negative	5.8	57	37	0.45
9	50	13.09.2011	90.2	25.96	positive	12.42	negative	2.9	36	29	0.57
10	56	19.09.2011	44.9	24.73	positive	21.90	borderline	4.8	38	30	0.62
11	105	07.11.2011	negative	19.18	negative	45.20	positive	3.1	34	33	0.42
12	108	10.11.2011	negative	15.00	negative	31.72	positive	4.1	28	30	0.44
13	112	14.11.2011	negative	13.72	negative	45.77	positive	3.3	30	36	0.20
14	120	22.11.2011	negative	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
15	123	25.11.2011	negative	12.28	negative	42.97	positive	4.6	38	35	0.88
16	127	29.11.2011	negative	12.49	negative	47.40	positive	4.6	32	31	0.74
17	130	02.12.2011	negative	13.28	negative	57.31	positive	3.8	33	31	0.60
18	137	09.12.2011	negative	14.23	negative	56.45	positive	5.5	41	34	0.71
19	141	13.12.2011	negative	13.13	negative	51.59	positive	3.5	33	32	0.48
20	144	16.12.2011	negative	12.07	negative	54.77	positive	4.6	37	35	0.27
21	151	23.12.2011	negative	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
22	162	03.01.2012	negative	14.34	negative	55.68	positive	2.0	25	27	0.71
23	168	09.01.2012	negative	14.00	negative	63.96	positive	4.3	32	35	0.49

NT= not tested

Biomex GmbH, Siemensstraße 38, 69123 Heidelberg, GERMANY
Phone +49(0) 6221-894689-0, Fax +49(0) 6221-894689-50, www.biomex.de

Page 2 of 3

HEV Seroconversion Panel, Catalogue No: SCP-HEV-006b

