

Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Jere Linjala

Adenovirus-pikatestien evaluointi

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

20.5.2019

Tekijä(t) Otsikko	Jere Linjala Adenovirus-pikatestien evaluointi
Sivumäärä Aika	23 20.5.2019
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Merja Ojala Sairaalamikrobiologi Hannimari Kallio-Kokko
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää kolmen eri adenovirus-vieritestin (Quidel AdenoPlus, Savyon Diagnostics QuickStripe Adenovirus, CerTest Adenovirus Resp.) käytökelpoisuutta adenovirusdiagnoosissa sekä määrittää sensitiivisyys, spesifisyys ja ennustarvot, sekä QuickStripe Adenovirus- ja AdenoPlus -vieritestien alin detektiopitoisuus. Sensitiivisyys, spesifisyys ja ennustarvot määritettiin testaamalla adenoviruspositiivisia ja -negatiivisia potilasnäytteitä mainituilla testeillä. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämiseen käytettiin yhteensä 100 näytettä, joista 50/100 olivat PCR-menetelmällä adenoviruksen suhteen positiivisiksi todettuja, ja loput 50/100 vastaavasti negatiivisiksi todettuja. Positiivisista näytteistä 18/50 oli keuhkojen imulimaa ja 32/50 nenänielun tikkunäytteitä. Negatiivisista näytteistä kaikki olivat silmän sidekalvon tikkunäytteitä. Alin detektiopitoisuus määritettiin testaamalla adenoviruksella infektoidusta soluviljelmästä tehtyä laimennossarjaa. Laimennossarjojen näytteitä oli yhteensä 16. Työ suoritettiin HUSLABin Virologian yksikön tiloissa.</p> <p>Savyon Diagnosticsin ja CerTestin vieritestien sensitiivisyys ei yltänyt valmistajien ilmoittamiin lukemiin, molemmat jääden joko 30 prosenttiin tai sen alle. Myöskään AdenoPlus:n sensitiivisyys ei vastannut valmistajan ilmoittamaa lukemaa jääden 80 prosenttiin. Spesifisyys sen sijaan kaikilla testeillä oli 100 %.</p> <p>Näiden tulosten perusteella Savyon Diagnostics QuickStripe Adenovirus tai CerTest Adenovirus Resp. -vieritestejä ei voida pitää luotettavina työkaluina testauksessa käytetyille näytelaaduille adenovirusdiagnoosissa. Sen sijaan AdenoPlus:n suorituskyky tekee siitä vartenotettavan vaihtoehdon vieritestidiagnostiikassa. Opinnäytetyön suorituksessa käytetyt varastoidut näytteet eivät olleet testien kannalta optimaalisia, joka voi olla osasy heikoille tuloksille. Tästä syystä tuloksia ei voida pitää täysin luotettavina.</p>	
Avainsanat	adenovirus, vieritesti, virologia

Author(s) Title	Jere Linjala Evaluation of Adenovirus Point-of-Care -tests
Number of Pages Date	23 pages 20 May 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Degree Programme for Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Merja Ojala, Lecturer Hannimari Kallio-Kokko, Hospital Microbiologist
<p>The aim of this thesis was to evaluate three different adenovirus Point-of-Care -tests (Quidel AdenoPlus, Savyon Diagnostics QuickStripe Adenovirus, CerTest Adenovirus Resp.) for adenovirus diagnostic purposes by determining their sensitivity, specificity and predictive values. Lowest detection limits for AdenoPlus and QuickStripe Adenovirus were also determined. I determined these values by using the tests on adenovirus positive and negative patient samples, as well as adenovirus-infected cell cultures in dilution series. This work was done in the department of Virology, HUSLAB.</p> <p>For the sample material used only one of the tests reached the sensitivity as announced by their manufacturers. The best performance was obtained with AdenoPlus, with the sensitivity of 80 %. However, all tests had specificity of 100 %.</p> <p>Based on these results only AdenoPlus can be considered a viable option for adenovirus diagnostics in a clinical setting. However, as the patient samples were stored for a long period of time and were therefore sub-optimal for QuickStripe or CerTest, these results should not be considered definitive.</p>	
Keywords	adenovirus, point-of-care, virology

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Vieritestien evaluointi	1
3	Adenovirukset sekä niiden aiheuttaman konjunktiviitin ja hengitystieinfektion diagnosointi	2
3.1	Adenovirusten rakenne ja toiminta	3
3.2	Adenoviruksen aiheuttamat infektiot	4
3.3	Diagnosointimenetelmät	4
3.3.1	Polymeraasiketjureaktio eli PCR	5
3.3.2	Immunofluoresenssi ja virusviljely	5
3.3.3	Quidel AdenoPlus	7
3.3.4	Savyon Diagnostics Ltd. QuickStripe Adenovirus	9
3.3.5	CerTest Adenovirus Resp.	9
4	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymys	10
5	Opinnäytetyön toteutus	10
5.1	Näytteet	10
5.2	Sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittäminen	11
5.3	Detektioherkkyyden määrittäminen	13
6	Opinnäytetyön tulokset	15
6.1	Detektioherkkyys	15
6.2	Sensitiivisyys ja spesifisyys	15
6.3	Yhteenveto	18
7	Pohdinta	19
7.1	Tulosten tarkastelu	19
7.2	Johtopäätökset	21
7.3	Kehittämissuhteet	21
7.4	Eettisyys	22
7.5	Luotettavuus	23
7.6	Ammatillinen kasvu	23
	Lähteet	24

Käsitteet

ATCC: American Type Culture Collection. Yhdysvaltalainen järjestö, jonka tehtävänä on muun muassa mikrobien ja solulinjojen hankinta, säilytys, tuottaminen ja jakaminen tutkimuskäyttöön.

CPE: Sytopaattinen efekti, eli viruksen aiheuttama solumuutos.

CRP: C-reaktiivinen proteiini, jonka pitoisuus veressä kasvaa yleensä bakteeri-infektioiden yhteydessä.

Detektioherkkyys: Alin pitoisuus etsittävää analyyttiä, jonka käytettävä menetelmä kykenee havaitsemaan.

Endosytoosi: Solun tapa ottaa sisäänsä nestettä ja liukoisia molekyylejä sen ulkopuolelta muodostamalla solukalvoon kuopan, jonka se kuroo irti rakkulaksi soluliman sisään.

Evaluointi: Toiminnan arviointi.

Heksoni: Ikosahedraalisen viruksen kuoren sivujen kuusikulmainen proteiini.

Ikosahedri: 20-tahokas. Virologiassa viittaa tietynlaiseen viruksen kapsidin muotoon.

Immunofluoresenssimenetelmä: Tutkittavat solut altistetaan merkkiaineella leimatuille vasta-aineille, jotka kiinnittyvät niissä mahdollisesti oleviin antigeeneihin. Positiivinen tulos näkyy hohteena fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltaessa.

Kapsidi: Viruksen kuori, joka koostuu useista, toistuvista proteiinialayksiköistä: heksooneista ja pentoneista.

Leukosytoosi: Perifeerisen veren tavallista korkeampi valkosoluarvo, joka viittaa usein infekioon.

Nukleinihappo-osoitus: Menetelmä, jossa todetaan, sisältääkö näyte etsittävän taudinaiheuttajan perimäainesta.

Pentoni: Ikosahedraalisen viruksen kuoren kärkien viisikulmainen proteiini.

Vieritesti: Tunnetaan myös nimellä pikatesti tai "point of care" eli POC-testi. Kliinisessä diagnostiikassa ja hoitotyössä käytetty testin muoto, joka voidaan suorittaa potilaan yhä läsnä ollessa, ja jonka tulokset saadaan useasti minuuteissa.

Virusviljely: Menetelmä, jossa viruksia viljellään niille soveltuviin viljeltyihin soluihin. Menetelmän avulla tutkittavia viruksia voidaan saada melkein rajattomasti.

1 Johdanto

Adenovirukset ovat laaja ja monipuolisesti infektoiva suku, ja ne aiheuttavat vuosittain lähes tuhat infektiota. Alle 5-vuotiaat lapset ovat erityisen alttiita tartunnalle; vuonna 2018 pienten lasten osuus oli yli puolet kaikista adenovirusinfektioista. Loppuvuodesta 2017 ja vuoden 2018 alussa Helsingissä ja Uudellamaalla todettiin myös tavallista useampia adenovirusten aiheuttamia sidekalvontulehduksia eli konjunktiviittia. (Tartuntataudit Suomessa 2017 2018.) Tästä syystä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriopalvelu HUSLABissa heräsi kysymys, voisiko adenoviruksen luotettavaa toteamista nopeuttaa.

Tämän opinnäytetyön aiheena on kolmen eri adenoviruspikatestin evaluointi. Työn on tilannut HUSLABin Virologian yksikkö, jonka kanssa yhteistyössä se myös toteutettiin. Tavoitteena on selvittää AdenoPlus-, Savyon Diagnostics Ltd. QuickStripe Adenovirus- sekä Certest Adenovirus Resp. -vieritestien soveltuvuus diagnostisena työkaluna epäil-täessä adenovirusinfektioita silmän sidekalvolla tai hengitysteissä. Testien osoittautumi-nen luotettavaksi nopeuttaisi diagnoosin tekoa tai adenovirusinfektion poissulkua mer-kittävästi verrattuna perinteisiin immunofluoresenssiin tai virusviljelyyn perustuviin me-netelmiin.

Opinnäytetyön aihepiiri eli virologia valikoitui oman mielenkiintoni mukaan. Työn aihe syntyi HUS:n ja HUSLABin tarpeesta evaluoida nopea ja luotettava menetelmä adenovi-ruksen aiheuttaman konjunktiviitin toteamiseen sekä selvittää pikatestien käytettävyyttä hengitystienäytteiden tutkimiseen. Oppimistavoitteinani oli virologiaan syventyminen ja virologisiin laboratoriotutkimuksiin tarkempi tutustuminen, sekä tutkimusluonteiseen työskentelyyn perehtyminen.

2 Vieritestien evaluointi

Kliinisessä analytiikassa käytettäviä testejä ja laitteita evaluoidaan eli arvioidaan usein niiden sensitiivisyyden eli herkkyden sekä spesifisyyden eli tarkkuuden perusteella. Li-säksi arviointiin vaikuttavat positiivinen ja negatiivinen ennustearvo. Nämä luvut ilmoite-taan usein prosentteina. Luvut lasketaan a. oikeiden positiivisten, b. väärin positiivisten,

c. väärin negatiivisten ja d. oikeiden negatiivisten tulosten perusteella. Laskukaavat näille on esitetty taulukossa 1. (Trevethan 2017.)

Taulukko 1. Taulukossa a = Oikeat positiiviset, b = Väärät positiiviset, c = Väärät negatiiviset, d = Oikeat negatiiviset. Taulukko mukaeltu Trevethanin (2017) mukaan.

Määre	Laskentaan käytetty kaava
Sensitiivisyys	$a/(a+c) \times 100$
Spesifisyys	$d/(b+d) \times 100$
Positiivinen ennustearvo	$a/(a+b) \times 100$
Negatiivinen ennustearvo	$d/(c+d) \times 100$

Sensitiivisyys tarkoittaa sitä, kuinka monta testattavan analyysin suhteen positiivista näytettä laite tai testi havaitsee positiiviseksi. Spesifisyys kertoo, kuinka monta tutkittavan analyysin suhteen negatiivista näytettä laite tai testi tulkitsee negatiiviseksi. Toisin sanoen se ilmaisee, kuinka spesifi laite tai testi on juuri tutkittavan analyysin suhteen. Alhainen spesifisyys tarkoittaisi sitä, että positiivisten tulosten joukossa voisi olla vääriä positiivisia tuloksia, jolloin testi on reagoinut johonkin muuhun kuin testattavaan analyysiin. Positiivinen ennustearvo kertoo, kuinka todennäköisenä testin antamaa positiivista vastausta voidaan pitää. 100 % positiivinen ennustearvo siis merkitsee, että 100 % positiivisiksi havaituista näytteistä on oikeasti positiivisia. Vastaavasti negatiivinen ennustearvo kertoo, kuinka usein laitteen tai testin antama negatiivinen tulos on oikeasti negatiivinen. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden sekä ennustearvojen määrittämisessä käytetään apuna referenssimenetelmää, joka on usein alalla yleisesti hyväksytty niin sanottu ”kultainen standardi” tutkittavan analyysin diagnostiikassa. Määrittämisen tuloksia verrataan tämän referenssimenetelmän saamiin tuloksiin. (Trevethan 2017.) Esimerkiksi tässä opinnäytetyössä testattujen vieritestien tuloksia verrataan samoista näytteistä PCR-menetelmällä tai virusviljelyllä saatuihin tuloksiin.

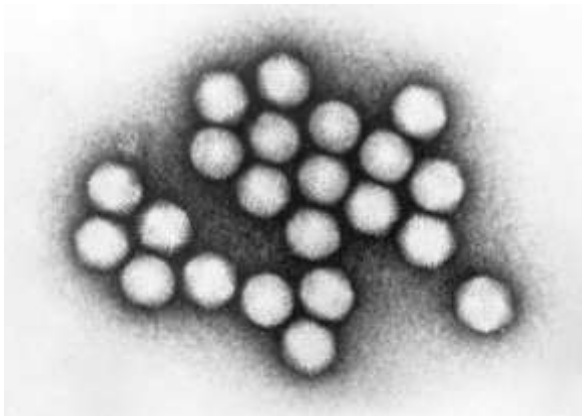
3 Adenovirukset sekä niiden aiheuttaman konjunktiviitin ja hengitystieinfektion diagnosointi

Adenovirukset (*Adenoviridae*) ovat laaja heimo kooltaan, rakenteeltaan ja proteiini koostumukseltaan samanlaisia, mutta epitoopiltaan vaihtelevia viruksia. Ne jaetaan viiteen sukuun: atadenovirukset, aviadenovirukset, ichtadenovirukset, mastadenovirukset ja

siadenovirukset. (ICTV 2017; Meurman – Ruuskanen 2010.) Ihmisen adenovirukset kuuluvat mastadenovirusiin. Ihmisen mastadenovirusia tunnetaan 51 serotyyppiä, jotka jaetaan luokkiin A, B1, B2, C, D, E ja F. Adenovirukset aiheuttavat tavallisimmin kuumeisia ylähengitystieinfektioita, mutta voivat infektoida myös välikorvaa, silmän sarveis- ja sidekalvoa, alahengitysteitä ja maha-suolikanavaa. Immuunipuutteisilla voi esiintyä vakavia yleisinfektioita, ja tulehdusta voi olla esimerkiksi aivoissa, maksassa, virtsarakossa ja peräsuolella. Konjunktiviittia aiheuttavat aikuisilla pääosin tyypit 8, 19 ja 37, ja lapsilla tyypit 3 ja 7. (Meurman – Ruuskanen 2010; Seppänen 2018.) Vuoden 2017 syystalvella Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä todettiin tavallista runsaammin adenovirusinfektioita (94–127 kuukaudessa) ja poikkeuksellisen useita viruskonjunktiviitteja. Niiden aiheuttajaksi paljastuivat pääosin tyypin 3 ja 4 adenovirukset. (Adenoviruksen esiintyvyys 2018.)

3.1 Adenovirusten rakenne ja toiminta

Adenovirukset ovat ikosahedraalisia, vaipattomia, noin 65–80 nm:n läpimittaisia DNA-virusia. Sen kapsidi koostuu 240 heksonista ja 12 pentonista. Jokaisessa pentonissa on antennimainen uloke, jolla virukset tarttuvat solun pinnan reseptoriin. Niiden ulkomuoto on helposti erotettavissa elektronimikroskoopilla. Kaikilla adenovirusilla on yhteinen heksoniantigeeni, jota hyödynnetään antigeeniosoitukseen perustuvissa diagnostisissa menetelmissä. (Meurman – Ruuskanen 2010.) Kuviossa 1 näytetään adenoviruspartikkeleita läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna.



Kuvio 1. Adenoviruspartikkeleita läpäisyelektronimikroskoopilla kuvattuna (CDC 2017)

Adenovirukset leviävät joko kosketus- tai aerosolitartuntana tai uloste-suutietä, ja infektoivat kohde-elimen epiteelisoluja. Ne käyttävät reseptoreinaan pääosin solun pinnan

CAR-proteiinia, tai B-ryhmän viruksien tapauksissa CD46-proteiinia. Virus siirtyy soluun endosytoosin kautta, ja noudattaa sen jälkeen tavanomaista DNA-viruksen lisääntymisreittiä. Jokainen infektoitunut solu tuottaa noin 50 000 – 100 000 uutta viruspartikkelia. Infektion itämisaika on noin viikosta kahteen viikkoon. (Meurman – Ruuskanen 2010.)

3.2 Adenoviruksen aiheuttamat infektiot

Konjunktiviitin eli silmän sidekalvon tulehduksen oireina on silmän punoitus ja kirvely, sekä mahdollisesti eritevuoto ja valonarkuus. Bakteri-, virus- tai sieni-infektion lisäksi silmän sidekalvon voi tulehduttaa myös allerginen reaktio, mekaaninen ärsytys, kuivasilmäisyys tai jopa paikallinen lääkitys. Märkäinen, kellertävä erite eli rähmä voi viitata bakteeritulehdukseen, mutta vetistävä ja valonarka silmä voi herättää epäilyn viruskonjunktiviitista. Tulehdus on usein helppo todeta ja hoitaa, mutta oireiden pitkittyessä voidaan turvautua laboratoriotutkimuksiin taudin aiheuttajan selvittämiseksi. (Seppänen 2018.)

Hengitystieinfektioita adenoviruksista aiheuttavat tyypit 1, 2, 3, 4, 5 ja 7. Ne aiheuttavat pääosin kuumeista ylähengitystieinfektiota ja voivat aiheuttaa tulehdusta nielurisoidissa, korvissa ja keuhkoissa. Oireena on usein korkea ja pitkäkestoinen kuume, joka voi esiintyä myös ilman muita oireita. Laboratoriolöydöksinä voi muista virusinfektioista poiketen todeta leukosytoosia ja korkeaa CRP:tä. Näiden löydösten ja taudinkuvan perusteella adenovirusinfektio saatetaan virheellisesti todeta bakteeri-infektioksi, joka voi johtaa tarpeettomiin antibioottihoitoihin. (Meurman – Ruuskanen 2010.)

3.3 Diagnosointimenetelmät

Adenovirusten diagnosoinnissa käytetään virusviljelyä, antigeeniosoitusta immunofluoresenssimenetelmällä sekä nukleiinihappo-osoitusta PCR-menetelmällä respiratorisissa infektioissa. Lisäksi esimerkiksi HUS:n silmä-korvasairaalan silmätautien päivystyspoliklinikka käyttää AdenoPlus -vieritestä adenoviruksen toteamiseen konjunktiviittiepäilyissä. Immunofluoresenssi sekä adenovirukselle tyypillisen solumuutoksen toteaminen – niin sanottu sytopaattinen efekti eli CPE (katso kuvio 3) – virusviljelystä ovat molemmat herkkiä ja luotettavia menetelmiä, mutta niillä on heikkoutensa. Virusviljely on menetelmänä hidas, ja sen vastauksissa voi joissain tapauksissa kulua kaksikin viikkoa näytteenotosta. Silmän sidekalvolta otettavan tikkunäytteen niukkuuden vuoksi antigeeniosoitusta immunofluoresenssimenetelmällä ei välttämättä aina onnistu, sillä menetelmä

vaatii huolellisesti otetun näytteen, jossa on tarpeeksi infektoituneita soluja tuloksen luotettavuuden takaamiseksi.

3.3.1 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

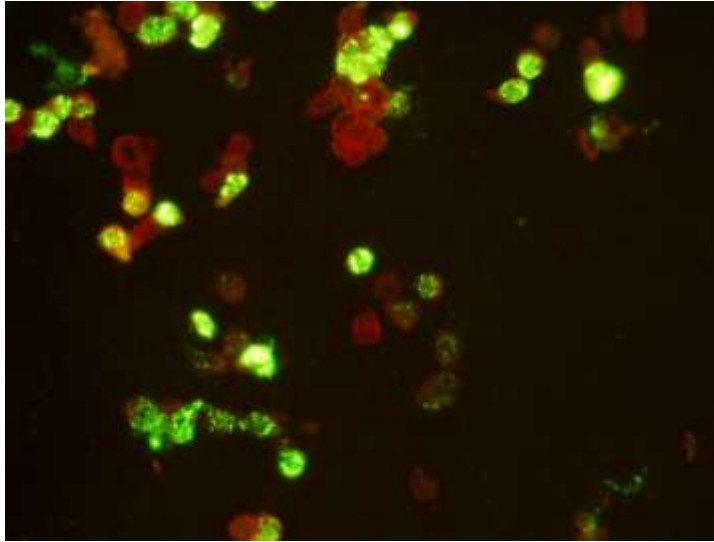
PCR eli polymeraasiketjureaktio on adenoviruksen toteamisessa käytetty diagnosointimenetelmä etenkin hengitystienäytteissä. Se perustuu näytteessä olevan mahdollisen kohde-DNA:n eli niin sanotun templaatti-DNA:n monistamiseen ja toteamiseen. Ennen PCR:n aloitusta näytteessä olevat solut hajotetaan, ja niistä eristetään niiden sisältämä DNA. Eristetty DNA sekoitetaan reaktioon tarvittavien reagenssien kanssa, ja syntynyt liuos siirretään termosykleriin eli laitteeseen, joka lämmittää ja viilentää reaktiota PCR-reaktion vaiheiden vaatimien lämpötilojen mukaisesti sykleittäin. Reaktio voidaan tulkita joko geelielektrofooresilla reaktion päätyttyä, tai esimerkiksi reaaliaikaisesti fotometrisesti hyödyntämällä reaktioon lisättyjä fluoresoivia aineita, jotka aktivoituvat kiinnittyessään kohde-DNA:han. (Valones ym. 2009; Yu – Cao – Ji 2017.)

PCR-reaktio sisältää tutkittavan DNA:n lisäksi monistukseen tarvittavat tutkittavalle DNA-jaksolle spesifit alukkeet, polymeraasientsyymiin, vapaita nukleotideja (dNTP) sekä reaktiolle suotuisat olosuhteet varmistavan puskuriliuoksen. PCR:n syklit koostuvat useimmiten kolmesta vaiheesta: denaturaatio, alukkeiden kiinnittymisvaihe sekä pidentymisvaihe. Esidenaturaation ja denaturaation aikana kaksijuosteisen kohde-DNA:n juosteet irtoavat toisistaan. Alukkeiden kiinnittymisvaiheessa alukkeet kiinnittyvät niille spesifeihin kohtiin DNA:ssa, rajaten monistettavan alueen. Pidentymisvaiheessa polymeraasientsyymi alkaa rakentaa DNA-juosteille vastinparia emäsparisäännön mukaisesti käyttäen vapaita nukleotideja, alkaen juosteisiin kiinnittyneistä alukkeista. Pidentymisvaiheen jälkeen sykli alkaa alusta. Tällaisia syklejä on tavallisimmin 30–40 kappaletta, ja jokaisen syklin aikana kohde-DNA monistuu eksponentiaalisesti aiempien syklien tuotteita monistamalla. (Yu ym. 2017.)

3.3.2 Immunofluoresenssi ja virusviljely

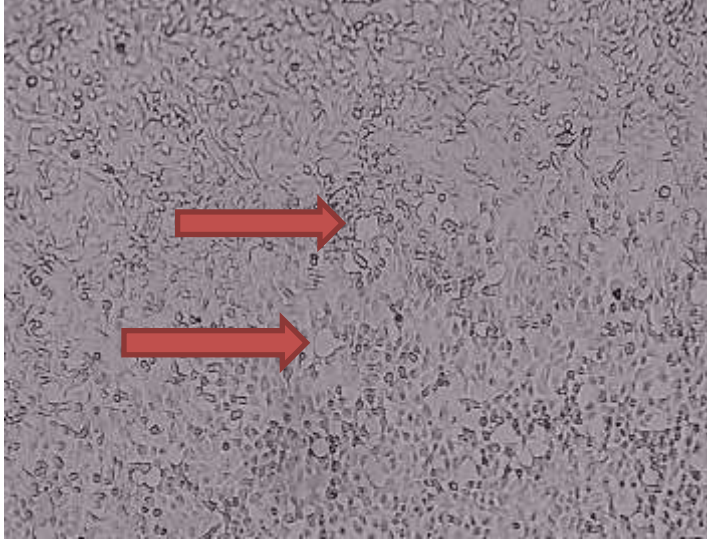
Virologian laboratorioon tuleville silmänäytteille suoritetaan tilaavan yksikön toiveista riippuen useimmiten antigeeniosoitus ja virusviljely. Antigeeniosoituksessa näytteen sisältämät solut fiksoidaan objektilasille, jonka jälkeen solut peitetään adenovirukselle spesifillä vasta-aineella, johon on valmiiksi konjugoitu fluoresoiva väriaine. Ylimääräinen väriaine huuhdellaan pois kiinnittymättömien vasta-aine-fluorofori-kompleksien

poistamiseksi. Valmis lasi mikroskopoidaan fluoresenssimikroskopilla, jossa positiivinen reaktio näkyy värillisenä hohtena. (Sundaramurthy – Dhodapkar – Kaliaperumal – Harish 2018.) Kuviossa 2 käytetty reagenssi hohtaa vihreänä.



Kuvio 2. Immunofluoresenssireaktio näkyy vihreänä hohtena. Terveet solut näkyvät punaisina.

Virusviljely on menetelmä, jossa soluviljelyputkeen siirretään epäiltyä virusta sisältävää näytettä. Eri viruksille käytetään erilaisia solulinjoja. Virus infektoi viljelyputken soluja, ja viljely laitetaan lämpökaappiin rikastumaan. Infektoituneet solut alkavat tuottamaan uusia viruspartikkeleita, jolloin infektio leviää edelleen muihin viljelyputken soluihin. Näin virus rikastuu, ja pienestäkin määrästä lähtömateriaalia voidaan saada suuri määrä infektoituneita soluja. Menetelmä on kuitenkin hidas, ja tulokset saattavat näkyä vasta kahden viikon kuluttua siirrokselta. Viljelyä voidaan kuitenkin käyttää myöhemmin jatkotutkimuksiin, esimerkiksi viruksen tyypin selvittämiseen. Virusviljelyputkea sellaisenaan mikroskopoidessa voidaan kuitenkin todeta kullekin virukselle tyypillisen sytopaattisen efektin (CPE). Kuviossa 3 on adenovirukselle tyypillinen CPE, joka ilmenee solujen morfologian muutoksena ja solukoihin ilmaantuneina aukkoina. Tyypillistä on myös adenoviruksella infektoituneen solun kuperuus ja kiilto, mutta valokuvan kaksikulotteisuuden vuoksi kyseistä ilmiötä ei kuvasta voi havaita. Kuviossa 4 on vertailun vuoksi tervettä solukkoa. (Sundaramurthy ym. 2018.) Positiivisen virusviljelyn tulos varmistetaan vielä antigeeninosoitumenetelmällä.



Kuvio 3. Adenoviruksen infektoimaa solukkoa. Adenovirukselle tyypillinen solukoon aukkoja muodosta sytopaattinen efekti osoitettu punaisella nuolella. Kuva otettu valomikroskoopista suurennoksella 40x.



Kuvio 4. Tervettä adenoviruksen virusviljelyssä käytettyä solukkoa. Kuva otettu valomikroskoopista suurennoksella 40x.

3.3.3 Quidel AdenoPlus

AdenoPlus on Yhdysvaltalaisen Rapid Pathogen Screening, Inc.:n (RPS) kehittämä, nykyään Quidelin omistama immunokromatografiaan perustuva adenovirusten osoitukseen tarkoitettu vieritesti. Testi on suunniteltu erityisesti silmänäynteille. Valmistaja on todennut sen reagoivan positiivisesti serotyyppeihin 1, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 19, 31 ja 37. Ei ole tietoa, kokeiltiinko samalla muita serotyyppejä. Testiä tutkittiin myös ristireaktioi-

den varalta muilla silmän infektoita aiheuttavilla bakteereilla ja viruksilla. Testattavia bakteereita olivat *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia Trachomatis* H ja I sekä *Staphylococcus epidermis*. Testattaviin viruksiin kuuluivat Echovirukset 6, 7 ja 11, Parainfluenssavirukset 1, 2 ja 3, Rinovirus 1A, Herpes Simplex -virukset 2G, 1F ja 1HF sekä Coxsackievirus B1. Ristireaktiota ei havaittu yhdenkään testatun mikrobin kohdalla. (AdenoPlus 2018: 7.)

AdenoPlus -vieritestin herkkyyttä on tutkittu sekä valmistajan että kahden riippumattoman tutkimusryhmän toimesta. Valmistaja ilmoittaa testin mukana tulevassa ohjeessa testin herkkyydeksi 85 % (n = 128) (Sambursky ym. 2013). Kuitenkin tutkimusryhmä Kam, Ong, Bunce, Ogunbowale ja Verma (2015) omassa tutkimuksessaan toteavat herkkyyden olevan vain 39,5 % (n = 121). Myös tutkimusryhmä Sachdev, Boukouvala, Ahluwalia, Crossman ja Mehta (2018) saivat herkkyydeksi vain 33,3 % (n = 27).

Testin periaate on immunokromatografinen. Näytteessä olevat viruksen antigeenit (kapsidin heksoniproteiini) tarttuvat testin kahteen heksoniproteiinille spesifiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen. Ensimmäinen, kullalla päällystetty vasta-aine on näytteen lisättävässä puskuriliuoksessa ja toinen vasta-aineista on kiinnitetty varsinaiselle detektioalueelle (result zone). Kultaleimatut vasta-aineet tarttuvat mahdolliseen antigeeniin, joka siirtyy nestefaasissa kapillaari-ilmiön seurauksena liuskaa ylöspäin. Kultaleimatun vasta-aine-antigeenikompleksin kohdatessa detektioalueeseen kiinnitetyn toisen vasta-aineen ne sitoutuvat siihen, ja reaktio on silmin nähtävissä punaisena viivana. Liuskassa on myös kontrolliviiva (control zone), jonka tulisi näkyä sinisenä testin valmistuttua. Mikäli kontrolliviivaa ei muodostu, testitulokset ei ole hyväksytyt. (AdenoPlus 2018: 2, 5.) Kuviossa 5 esiintyy kaksi positiivista ja yksi negatiivinen testiliuska.



Kuvio 5. Kuvassa Quidel AdenoPlus. Kaksi ylintä ovat positiivisia tuloksia, alin on negatiivinen. Testiviiva näkyy punaisena, kontrolliviiva on sininen.

3.3.4 Savyon Diagnostics Ltd. QuickStripe Adenovirus

Israelilaisen Savyon Diagnostics Ltd.:n QuickStripe Adenovirus -vieritesti on suunniteltu adenoviruksen toteamiseen respiratorisista näytteistä. Testi on immunokromatografinen, ja soveltuu keuhkojen imulimanäytteillä sekä nenänielun tikkunäytteille. Savyon Diagnostics Ltd. ilmoittaa testinsä spesifisyyden ja herkkyuden olevan yli 99 % (n = 25). Vieritestille ei ole todettu ristireaktioita. (QuickStripe Adenovirus 2012: 3.) Kuviossa 6 esitetään kaksi positiivista ja yksi negatiivinen testiliuska.



Kuvio 6. Savyon Diagnostics QuickStripe Adenovirus. Kaksi positiivista ja yksi negatiivinen testiliuska. Testiviiva on sininen, kontrolliviiva on vihreä.

3.3.5 CerTest Adenovirus Resp.

Espanjalainen CerTest on kehittänyt respiratoristen adenovirusten toteamiseen CerTest Adenovirus Resp. -vieritestin. Testi on immunokromatografinen, ja se voi käyttää sekä tikkunäytettä nenäontelosta että keuhkojen imulimanäytettä. Näyteliuskaan on kiinnitetty testialueelle (T) hiiren monoklonaalisia vasta-aineita, sekä kontrollialueelle (C) jäniksen polyklonaalisia vasta-aineita. Liuskan näytealueella (S) on hiiren monoklonaalisiin adenovirus-vasta-aineisiin konjugoituja punaisia lateksipartekkeleita, jotka kiinnittyvät testialueen (T) vasta-aineisiin, mikäli näytteestä löytyy adenoviruksen antigeenejä. Lisäksi näytealueella (S) on jäniksen polyklonaalisiin adenovirus-vasta-aineisiin konjugoituja vihreitä lateksipartikkeleita, jotka kiinnittyvät kontrollialueen (C) vasta-aineisiin. Valmistajan mukaan vieritestille ei ole todettu ristireaktioista johtuvia vääriä positiivisia tuloksia. CerTest ilmoittaa testinsä spesifisyyden ja herkkyuden olevan yli 99 % (n = 25). (CerTest Adenovirus Resp. 2013: 5.) Kuviossa 7 esitetään kolme positiivista ja kaksi negatiivista testiliuskaa.



Kuvio 7. CerTest Adenovirus Resp. Kuvassa alkaen vasemmalta: Kaksi positiivista, kaksi negatiivista ja yksi positiivinen. Testiviiva näkyy punaisena, kontrolliviiva on vihreä.

4 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymys

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää herkkyys- ja spesifisyys AdenoPlus-, QuickStripe Adenovirus- sekä Certest Adenovirus Resp. -vieritesteille. Lisäksi määritetään AdenoPlus- ja QuickStripe Adenovirus -vieritestien alin detektiopitoisuus käyttämällä virusviljelyksestä tehtävää laimennossarjaa. Tavoitteena on kyseisten vieritestien arvioinnin soveltuvaksi diagnostiseen käyttöön. Vieritestien toteaminen luotettavaksi nopeuttaisi diagnoosia ja oikean hoidon aloittamista. Se vähentäisi osaltaan tehtävien virusviljelyiden määrää ja näin pienentäisi tutkivan laboratorion työmäärää. Tutkimuskysymyksenä oli, ovatko edellä mainitut vieritestit luotettavia työkaluja silmän tai hengitysteiden adenovirusinfektion diagnosointiin.

5 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön aineistonkeruu tehtiin yhteistyössä HUSLABin Virologian yksikön kanssa kyseisen yksikön laboratorion tiloissa. Tätä ennen suoritettiin viikon kestävä perehtymisjakso, jossa tutustuttiin adenovirusdiagnostiikassa käytössä oleviin menetelmiin, aineiston keräämisessä käytettäviin työmenetelmiin ja -tiloihin sekä infektiivisen materiaalin käsittelyyn liittyviin työturvallisuuskäytäntöihin. Käytännön osuus valmistui marraskuussa 2018. Kerätystä aineistosta muodostettiin frekvenssijakauma, josta laskettiin sensitiivisyys, spesifisyys sekä ennustearvot.

5.1 Näytteet

Näytteinä toimivat diagnostisiin tarkoituksiin kerätyt potilasnäytteet sekä virusviljelyssä rikastetut adenoviruskannat. Tutkittavia näytteitä oli kaikkiaan 158. Potilasnäytteet olivat

imulima- tai tikkunäytteitä. Imulimanäytteet (18/158) oli otettu nenänielusta puhtaisiin muoviputkiin. Tikkunäytteet oli otettu dacron- tai nukkatikulla joko silmän sidekalvolta (92/158) tai nenänielusta (32/158) ja säilötty Copanin kuljetusnestettä sisältäviin viruskuljetusputkiin (Copan UTM Viral Transport Media). Virusviljelynäytteitä oli yhteensä 16/158. Kaikki näytteet ja reagenssit sekoitettiin huolellisesti niiden homogenisoimiseksi ennen tutkimista. Dacron- ja nukkatikkuja puristettiin kuljetusputken seinämiin niin, että niiden sisältämät solut valuivat kuljetusnesteeseen puristellun nesteen mukana. Testauksiin käytettiin joko imulimaa tai soluja sisältävää kuljetusnestettä. Virusviljelyä lukuun ottamatta kaikki näytteet olivat varastoitu -20°C asteeseen. Näytteet olivat kerätty vuosien 2017–2018 kuluessa ja olivat siten eri ikäisiä. Käytetyt näytteet ja niiden lukumäärä on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Käytettävät näytteet, niiden lukumäärä ja niille tarkoitetut testit.

<i>Testi</i>	<i>Laimennossarja</i>	<i>Eri kannat</i>	<i>PCR-positiiviset hengitystienäytteet</i>	<i>Antigeeni-osoitus- ja virusviljelypositiiviset silmänäytteet</i>	<i>Antigeeni-osoitus-negatiiviset ja virusviljelypositiiviset silmänäytteet</i>	<i>Negatiiviset silmänäytteet</i>
<i>Quidel AdenoPlus</i>	Tyypit 4, 8 ja 19	Tyypit 1, 2, 3	0 kpl	10 kpl	0 kpl	10 kpl
<i>CerTest Adenovirus Resp.</i>	Ei tehty	Ei tehty	50 kpl	10 kpl	0 kpl	40 kpl
<i>QuickStripe Adenovirus</i>	Tyypit 4, 8 ja 19	Tyypit 1, 2, 3	50 kpl	30 kpl	12 kpl	50 kpl

5.2 Sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittäminen

Määrittäminen suoritettiin testaamalla näytteitä testipakettien mukana tulevia ohjeita noudattaen. Testeille ei ajettu erikseen kontrolleja testiliuskojen rajallisen määrän vuoksi. Toisaalta positiivisiksi luokitellut näytteet oli todettu adenoviruspositiivisiksi PCR-menetelmällä (hengitystienäytteet) tai antigeeni- ja/tai virusviljelymenetelmällä (silmänäytteet). Näytelaatuina käytettiin adenoviruksen suhteen PCR-positiivisia hengitystienäytteitä, adenoviruksen suhteen positiivisia silmän tikkunäytteitä, sekä täysin negatiivi-

sia silmän tikkunäytteitä. Käytettyjen näytteiden määrät ja niille suoritettut testit ovat esitetty taulukossa 2. Näytteet olivat pakastettuja, joten niiden annettiin sulaa ennen käyttöä. Kaikki näytteet ja reagenssit sekoitettiin ennen tutkimista Vortex-sekoittimella. Ilmoitettu positiivisuus ja negatiivisuus on suhteessa adenovirukseen.

QuickStripe Adenovirus -vieritestin sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämisessä testattiin yhteensä 100 näytettä, joista oli PCR-menetelmällä positiivisiksi todettuja 50/100, ja negatiivisiksi todettuja loput 50/100. Positiiviset näytteet olivat joko nenänielusta imettyä limaa (18/50) tai nenänielusta pyyhittyjä tikkunäytteitä (32/50). Negatiiviset näytteet olivat silmän sidekalvolta otettuja tikkunäytteitä. Imulimanäytteitä testattaessa näytettä pipetoitiin 300 µl erilliseen putkeen. Siihen lisättiin 3 tippaa testin mukana tulevaa näytteen laimenninta käyttäen laimentimen pullon tippakorkkia, jonka jälkeen se sekoitettiin huolellisesti Vortex-sekoittimella. Tikkunäytteitä testattaessa laimennusnestettä lisättiin 15 tippaa ensin testiputkeen, jonka jälkeen siihen lisättiin näyte asettamalla siihen näytetikku, jota sekoitetaan ja puristetaan nesteeseen. Tikku poistettiin putkesta. Testiliuska poistettiin pussistaan, ja asetettiin kärki edellä testiputkeen. Tulos luettiin kymmenen minuutin kuluttua. Positiivinen tulos näkyi sinisenä viivana liuskan testialueella. Lisäksi kontrollialueella tulee näkyä viiva, muutoin testi hylätään ja uusitaan. (QuickStripe Adenovirus 2012.) Yhtään QuickStripe Adenovirus -vieritestin tulosta ei tässä opinnäytetyössä jouduttu hylkäämään.

CerTest Adenovirus Resp. -vieritestin sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämiseen käytettiin yhteensä 90 näytettä, joista 50/90 olivat PCR-menetelmällä positiivisiksi todettuja, ja 40/90 negatiivisiksi todettuja. Positiiviset näytteet olivat joko nenänielusta imettyä limaa (18/50) tai nenänielusta pyyhittyjä tikkunäytteitä (32/50). Negatiiviset näytteet olivat silmän sidekalvolta otettuja tikkunäytteitä. Imulimanäytteitä testattaessa näytettä tiputettiin 6 tippaa erilliseen testiputkeen käyttäen testin mukana tulevaa pipettiä. Testiputkeen lisättiin 9 tippaa testin mukana tulevaa reagenssia käyttäen reagenssipullon tippakorkkia. Tikkunäytettä testattaessa testiputkeen lisättiin ensin 15 tippaa reagenssia, jonka jälkeen tikku upotettiin testiputkeen, ja sen kärkeä puristettiin putken seinämiin voimakkaasti minuutin ajan. Tikku poistettiin putkesta. Testiputkea sekoitettiin Vortex-sekoittimella minuutin ajan. Testikasetti poistettiin pussistaan, ja asetettiin vaakatasoon työtasolle. Testiputkesta pipetoitiin näytettä testin mukana tulevalla pipetillä 4 tippaa testikasetin näyteikkunaan (S). Tulos luettiin 10 minuutin kuluttua. Positiivinen tulos näkyi punaisena viivana testialueella (T). Kontrollialueella (C) tulee myös näkyä viiva, muutoin

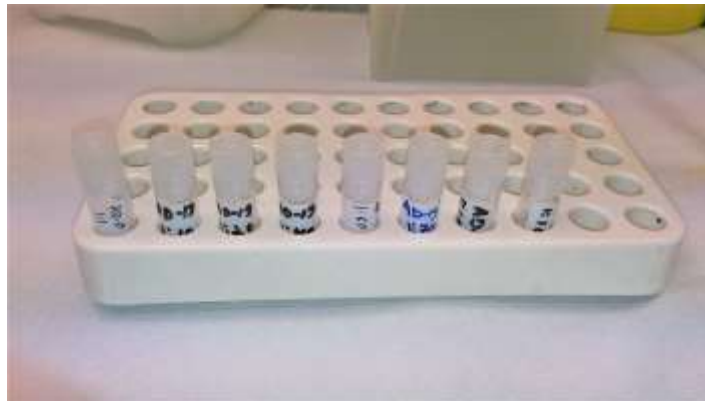
testi hylätään ja uusitaan. (CerTest Adenovirus Resp. 2013.) Yhtään CerTest Adenovirus Resp. -vieritestin testitulosta ei jouduttu hylkäämään.

Sensitiivisyys ja spesifisyys sekä ennustearvot laskettiin käyttämällä lukuja a. Oikeat positiiviset, b. Väärät positiiviset, c. Väärät negatiiviset ja d. Oikeat negatiiviset. Saadut luvut on esitetty taulukossa 6. QuickStripe Adenovirus ja CerTest Adenovirus Resp. -vieritestien sensitiivisyyden, spesifisyyden ja ennustearvojen laskentaan käytettiin vain adenoviruksen suhteen PCR-positiivisten hengitystienäytteiden tuloksia sekä vastavasti negatiivisia silmän tikkunäytteiden tuloksia. AdenoPlus -vieritestin tulosten laskennassa käytettiin vain adenoviruksen suhteen positiivisten ja -negatiivisten silmän tikkunäytteiden tuloksia. Laskentaan käytetyt kaavat on esitetty taulukossa 1.

5.3 Detektioherkkyysmäärittelyn suoritus

AdenoPlus ja QuickStripe Adenovirus -vieritestien detektioherkkyysmäärittelyt toteutettiin käyttäen tunnetuista viljelyistä viruksista tehtyjä laimennossarjoja. CerTest Adenovirus Resp. -vieritestille ei tehty detektioherkkyysmäärittelyä opinnäytetyöhön varattujen testien määrän rajallisuuden vuoksi. AdenoPlus -vieritestin valmistaja ilmoittaa testinsä detektioherkkyudeksi 40–50 viruspartikkelia mikrolitrassa. Tästä syystä AdenoPlus -vieritestin detektioherkkyuden testaus oli erityisen mielenkiinnon kohteena. Laimentimena käytettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS). HUSLABin Virologian yksikön adenovirusdiagnoosissa käyttämää solulinjaa, käytettyä ravintoliuosta tai rikastusolosuhteita ei salassapitosopimukseen nojaten kerrota. Viruskannoiksi valittiin tyypit 4 ja 8, jotka ovat olleet yleisimpiä viljelylöydöksiä silmänäytteistä HUSLABin Virologian yksikössä. Kannat olivat tunnettuja, eristettyjä viruskantoja, jotka on tilattu tutkimuskäyttöön American Type Culture Collection ATCC:ltä. Lisäksi testejä kokeiltiin 1:10 -suhteella laimennettuihin potilasnäytteistä viljeltyihin adenovirustyyppeihin 1, 2, 3 ja 19, joista tyyppiä 19 tehtiin vielä laimennossarja (kuvio 8). Tämä tyyppi 19 laimennossarja analysoitiin kvantitatiivisella PCR-menetelmällä, jolloin selvitettiin näytteessä olleiden viruspartikkeleiden määrä. Tyypit 4 ja 8 testattiin opinnäytetyön toteutuksen alussa, ja tyyppi 19 toteutuksen lopussa. Tästä syystä tyypeille 4 ja 8 ei suoritettu kvantitatiivista PCR -tutkimusta, sillä se oli suunniteltu suoritettavaksi viimeisenä tutkimuksena. Näytteet tyypeistä 1, 2, 3 ja 19 saatiin HUSLABin omista potilasnäytteistä, joille oli aikaisemmin suoritettu serotyyppitys. Näytteet tutkittiin käyttäen AdenoPlus- ja QuickStripe -vieritestejä valmistajien käyttöohjeiden mukaisesti.

Jokaiselle virustyyppille sovellettiin viljelyssä samaa näytemäärä/rikastusliemi -sekoitus-suhdetta, mutta viruspartikkeleiden määrä lähtömateriaalissa oli näytelaadusta johtuen eri. Testit suoritettiin, kun näytteessä oli valomikroskoopilla havaittavissa riittävän voimakas adenovirukselle tyypillinen CPE (sytopaattinen efekti). Rikastuminen tapahtui hie-man eri vauhtia, joten testaus suoritettiin useana eri päivänä. Kaikkiin näytteisiin pyrittiin saamaan testaushetkellä yhtä voimakas CPE, jotta tulokset olisivat mahdollisimman hyvin toisiinsa verrattavia. Tyypistä 8 tehtiin kokeilun vuoksi laimennokset sekä rikastus-liemestä että putken seinältä raaputetuista soluista, mutta tuloksissa ei ollut näillä tes-teillä havaittavaa eroa.



Kuvio 8. Adenovirus 19 -laimennossarja. Pitoisuudet alkaen vasemmalta: Laimentamaton näyte, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:70, 1:100 ja 1:1000

AdenoPlus -kitin mukana tulee näytteen keräimiä, testikasetteja sekä puskuriliuospulloja. Näyte otetaan keräimessä olevalla näytetyynyllä testattavasta silmästä hieroen kevyesti tulehtunutta kudosta luomen sisäpuolelta, kunnes näytetyyny kiiltää. Keräimen kärki asetetaan testikasetin ikkunaan, kunnes se naksahdaa. Testikasetin kärjen korkki irrotetaan ja kastetaan puskuriliuokseen vähintään 20 sekunniksi. Jokaiselle testille käytetään omaa puskuriliuospulloaan. Korkki asetetaan takaisin, ja testi asetetaan vaakatasoon kymmeneksi minuutiksi, jonka aikana neste kulkeutuu liuskaa pitkin. Tulos luetaan kymmenen minuutin kuluttua. Mikäli testi on negatiivinen tai neste ei ole kulkenut koko matkaa, odotetaan 5 – 10 minuuttia, jonka jälkeen tulos luetaan uudestaan. (AdenoPlus 2018: 4–6.) Koska tässä opinnäytetyössä näytettä ei otettu suoraan potilaasta vaan säilötystä näytteestä, kastettiin näytteen keräimen näytetyyny näyteputken nesteeseen silmän sidekalvon sijaan. QuickStripe Adenovirus -vieritestiä käytettiin kuten sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämisessä.

6 Opinnäytetyön tulokset

Kaikkiaan testattuja näytteitä oli yhteensä 158, joista 16/158 koostui detektioherkkyyssmäärittäjä varten tehdyistä viruskantojen laimennossarjoista. Näytteistä 148/158 tutkittiin vuoden 2018 marraskuussa. AdenoPlus -vieritestin spesifisyysmäärittäjäseen käytetyt negatiiviset silmänäytteet (n = 10) tutkittiin Virologian yksikön toimesta tammikuussa 2019.

6.1 Detektioherkkyys

Detektioherkkyyssmäärittäjä suoritettiin käyttämällä kolmesta adenoviruksen eri serotyypistä tehtyjä laimennossarjoja. Laimennossarjaan kuuluivat laimennokset pitoisuuksilla 1:1, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:70, 1:100 ja 1:1000. Alimman detektioherkkyyden virusmäärän määrittäjä tehtiin tyypistä 19 tehdyn laimennossarjalle. QuickStripe Adenovirus -vieritesti antoi positiivisen tuloksen tyypin 19 adenovirukselle alimmillaan 1:20 -pitoisuudessa (289 viruspartikkelia per µl). Tyypin 4 adenovirusta QuickStripe Adenovirus -vieritesti havaitsi alimmillaan 1:100 -pitoisuudessa. AdenoPlus -vieritesti havaitsi tyypin 19 adenovirusta alimmillaan 1:60 -pitoisuudessa (70,5 viruspartikkelia per µl). Tyypin 4 ja 8 adenovirusta AdenoPlus -vieritesti havaitsi alimmillaan 1:100 -pitoisuuksissa. Tulokset on eritelty taulukossa 3.

Taulukko 3. Detektioherkkyyssmittausten tulokset

Tyyppi	Alin detektioherkkyys (viruspartikkeleiden määrä sulkeissa) QuickStripe Adenovi- rus	Alin detektioherkkyys (viruspartikkeleiden määrä sulkeissa) AdenoPlus	Kasvatuspäiviä
4	1:100	1:100	2
8	1:10	1:100	2
19	1:20 (289 / µl)	1:60 (70,5 / µl)	10

6.2 Sensitiivisyys ja spesifisyys

PCR -menetelmällä adenoviruspositiivisiksi todettuja keuhkon imulima- sekä nenänielun tikkunäytteitä oli yhteensä 50. Niitä testattiin CerTest Adenovirus Resp. ja QuickStripe

Adenovirus -testeillä. Näitä näytteitä ei testattu AdenoPlus -vieritestillä, koska tätä testiä ei ollut valmistajan ilmoittamasta käyttötarkoituksesta ja testin korkeasta hinnasta johtuen aiheellista evaluoida muille kuin silmänäytteille. Näytteistä CerTest Adenovirus Resp. -vieritesti havaitsi positiivisiksi 18/50. Positiivisiksi havaituista näytteistä 12/18 oli tikkunäytteitä ja 6/18 imulimaa. Vastaavat luvut QuickStripe Adenovirus -vieritestillä olivat 11/50 positiiviseksi havaitusta 9/11 tikkunäytettä ja 2/11 imulimaa. Lisäksi kaikki QuickStripe Adenovirus -vieritestin positiivisiksi havaitsemat olivat positiivisia myös CerTest Adenovirus Resp -vieritestillä. QuickStripe Adenovirus -vieritesti ei siis havainnut yhtään positiivista, jota CerTest Adenovirus Resp. -vieritesti ei olisi havainnut. Tulokset on eritelty taulukossa 4.

Taulukko 4. PCR-positiivisten näytteiden tulokset

<i>Tulokset</i>	<i>CerTest Adenovirus Resp.</i>	<i>QuickStripe Adenovirus</i>
<i>Positiivisia</i>	18	11
<i>Positiivisia %</i>	36,0 %	22,0 %
<i>Negatiivisia</i>	32	39
<i>Negatiivisia %</i>	64,0 %	78,0 %
<i>Yhteensä</i>	50	50

Silmän sidekalvolta otettuja, sekä antigeeniosoitus- että virusviljelymenetelmällä adenoviruspositiivisiksi todettuja tikkunäytteitä oli yhteensä 30. CerTest Adenovirus Resp.- tai QuickStripe Adenovirus -vieritestit eivät kummatkaan saaneet yhtään positiivista tulosta. AdenoPlus -vieritesti havaitsi adenovirusta 8/10 testatusta näytteestä. Näistä 10:stä AdenoPlus -vieritestillä tutkitusta silmänäytteestä laskettiin kyseisen vieritestin sensitiivisyys ja spesifisyys. Tulokset on eritelty taulukossa 5. Taulukossa testin nimen perässä oleva luku ilmoittaa kyseisellä testillä testattujen näytteiden määrän. Kullakin vieritestillä tutkittavien näytteiden määrään vaikutti opinnäytetyöhön varattujen vieritestien määrä.

Taulukko 5. Antigeeniosoitus- ja virusviljelypositiivisten silmänäytteiden tulokset.

<i>Tulokset</i>	<i>CerTest Adenovirus Resp. n = 10</i>	<i>QuickStripe Adenovirus n = 30</i>	<i>AdenoPlus n = 10</i>
<i>Positiivisia</i>	0	0	8
<i>Positiivisia %</i>	0 %	0 %	80 %
<i>Negatiivisia</i>	10	30	2
<i>Negatiivisia %</i>	100 %	100 %	20 %
<i>Yhteensä</i>	10	30	10

Vastaavasti silmän sidekalvolta otettuja, adenovirukselle virusviljelypositiivisia mutta antigeeniosoitusnegatiivisia näytteitä tutkittiin yhteensä 12. Näitä näytteitä tutkittiin vain QuickStripe Adenovirus -vieritestillä. QuickStripe Adenovirus ei havainnut näistä näytteistä yhtään positiivista. Näitä näytteitä ei tutkittu AdenoPlus- tai CerTest Adenovirus Resp. -vieritesteillä käytettävissä olevien vieritestien rajallisen määrän vuoksi. Tulokset on eritelty taulukossa 6.

Taulukko 6. QuickStripe Adenovirus- vieritestillä adenovirukselle viljelypositiiviset mutta antigeeniosoitusnegatiiviset näytteet.

<i>Tulokset</i>	<i>QuickStripe Adenovirus n = 12</i>
<i>Positiivisia</i>	0
<i>Positiivisia %</i>	0 %
<i>Negatiivisia</i>	12
<i>Negatiivisia %</i>	100 %
<i>Yhteensä</i>	12

Spesifisyyden tutkimiseksi kaikkia kolmea vier testiä testattiin myös negatiivisilla näytteillä. Näytteet olivat tutkitusti adenovirus -negatiivisia silmän tikkunäytteitä. Näytteet oli todettu negatiivisiksi viljely- ja antigeeniosoitusmenetelmillä. Vieritestit eivät saaneet yhtään väärää positiivista tulosta. Ei ole tiedossa, sisälsivätkö näytteet mitään muita mikrobeja. Tulokset on eritelty taulukossa 7. Taulukossa vieritestin nimen perässä oleva

numero ilmoittaa testattujen näytteiden määrän. Testattujen näytteiden määrään vaikutti opinnäytetyöhön varattujen vieritestien määrä. AdenoPlus -vieritestillä testatut negatiiviset näytteet testattiin Virologian yksikön toimesta tammikuussa 2019.

Taulukko 7. Negatiivisten silmänäytteiden tulokset.

Tulokset	<i>CerTest Adenovirus Resp. n = 40</i>	<i>QuickStripe Adenovirus n = 50</i>	<i>AdenoPlus n = 10</i>
<i>Positiivisia</i>	0	0	0
<i>Positiivisia %</i>	0 %	0 %	0 %
<i>Negatiivisia</i>	40	50	10*
<i>Negatiivisia %</i>	100 %	100 %	100 %
<i>Yhteensä</i>	40	50	10

**Tutkittu työn suorituksen jälkeen Virologian yksikön toimesta*

6.3 Yhteenveto

Vieritestien sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämiseen käytettyjä näytteitä oli yhteensä 142. Saadut tulokset koottiin taulukoihin, ja taulukoista tehtiin yhteenveto (taulukko 8). Tästä yhteenvedosta laskettiin näiden tulosten perusteella saadut sensitiivisyys, spesifisyys sekä positiivinen ja negatiivinen ennustearvo. AdenoPlus -vieritestin sensitiivisyys ylsi 80 %:iin (n = 10), CerTest Adenovirus Resp. -vieritesti 36 %:iin (n = 50) ja QuickStripe Adenovirus -vieritesti 22,0 %:iin (n = 50). Spesifisyys ja positiivinen ennuste oli kaikilla kolmella vieritestillä 100 % (AdenoPlus n = 10, CerTest Adenovirus Resp. n = 40, QuickStripe Adenovirus n = 50). Negatiivinen ennuste oli AdenoPlus -vieritestillä 83,3 %, CerTest Adenovirus Resp. -vieritestillä 55,6 % ja QuickStripe Adenovirus -vieritestillä 56,2 %. Oikeita positiivisia tuloksia AdenoPlus -vieritesti sai 8/10, CerTest Adenovirus Resp. -vieritesti 18/50 ja QuickStripe Adenovirus -vieritesti 11/50. Oikeita negatiivisia tuloksia AdenoPlus -vieritestillä oli 10/10, CerTest Adenovirus Resp. -vieritestillä 40/40 ja QuickStripe Adenovirus -vieritestillä 50/50.

Taulukko 8. Yhteenveto

<i>Testi</i>	<i>Oikeat positiiviset</i>	<i>Väärät positiiviset</i>	<i>Väärät negatiiviset</i>	<i>Oikeat negatiiviset</i>	<i>Sensitiivisyys</i>	<i>Spesifisyys</i>	<i>Positiivinen ennuste</i>	<i>Negatiivinen ennuste</i>
<i>AdenoPlus</i>	8	0	2	10	80,0 %	100,0 %	100,0 %	83,3 %
<i>CerTest Adenovirus Resp.</i>	18	0	42	40	30,0 %	100,0 %	100,0 %	48,8 %
<i>QuickStripe Adenovirus</i>	11	0	39	50	22,0 %	100,0 %	100,0 %	52,6 %

7 Pohdinta

Soluviljelyillä rikastettuja viruksia lukuun ottamatta näytteet olivat potilasnäytteitä. Adenovirusepäilyjen suhteellisen harvinaisuuden vuoksi tuoreita potilasnäytteitä ei ollut kohtuullista odottaa, joten tutkimuksen potilasnäytteet olivat pakastettuja ja useita kuukausia vanhoja. QuickStripe Adenovirus -vieritestin käyttöohjeiden mukaan testattavat näytteet tulisi olla alle 8 tuntia vanhoja, ja CerTest ilmoittaa oman vieritestinsä herkkyyden laskevan näytteen säilytysajan kasvaessa. Pitkää säilytysaikaa ei voi poissulkea testien heikon suoriutumisen syynä. Lisäksi näytteet olivat jo kertaalleen analysoituja, joten on myös mahdollista, ettei näytteissä olleiden virusten määrä ylittänyt testien dektektorirajaa. Antigeeniosoituksella positiivisiksi todetut näytteet olivat silmän tikkunäytteitä, joiden tutkimiseen CerTest Adenovirus Resp.- tai QuickStripe Adenovirus -vieritestejä ei ole suunniteltu. Vaikka QuickStripe Adenovirus-testin myyjältä saadun tiedon mukaan myös silmän tikkunäytteiden olisi pitänyt soveltua testimateriaaliksi, tämä on todennäköisesti syynä sille, miksei kumpikaan testeistä havainnut näistä näytteistä yhtään positiivista. Nämä heikot tulokset olivat siis myös osittain odotettuja.

7.1 Tulosten tarkastelu

AdenoPlus:n sensitiivisyys ylsi tässä opinnäytetyössä 80 %:iin. Luku on hieman matalampi kuin valmistajan ilmoittama 85 % (Sambursky ym. 2012), mutta merkittävästi korkeampi kuin Kamin tai Sachdevin tutkimusryhmien tulokset 39,5 % ja 33,3 % (Kam ym. 2015; Sachdev ym. 2018). Syy näille eroille ei ole tiedossa. Kaikki kolme tutkimusryhmää

suorittivat sensitiivisyyden määrittämisen ottamalla tutkittavan näytteen suoraan potilaan sidekalvolta, mihin testi on suunniteltu. Tässä opinnäytetyössä käytettiin potilaasta otettuja tikkunäytteitä, jotka oli säilytetty Copanin viruskuljetusputkiin (Copan UTM Viral Transport Media). Näytemateriaalina toimi viruskuljetusputkien kuljestusneste. Näin itse näytettä saatiin runsaasti. Toisaalta voisi olettaa, että suurempi nestemäärä olisi viruskonsentraatioltaan matalampi, kuin suoraan silmästä imeytetty neste.

QuickStripe Adenovirus sekä CerTest Adenovirus Resp. suoriutuivat valmistajan ilmoittamia lukemia heikommin: QuickStripe Adenovirus -vieritestin sensitiivisyys oli tässä tutkimuksessa vain 22 % ja CerTest Adenovirus Resp. -vieritestin 36%. Todennäköisin syy alhaisille lukemille on näytteiden pitkä säilytysaika, sillä kyseiset vieritestit ovat tarkoitettu tuoreille näytteille. QuickStripe Adenovirus ja CerTest Adenovirus Resp. -vieritestejä testattiin myös silmänäytteillä, mutta näiden näytteiden joukosta mainitut vieritestit eivät löytäneet yhtään positiivista. Toisaalta kyseisiä vieritestejä ei ole suunniteltu silmänäytteille, joten tulokset olivat odotettuja.

Koska AdenoPlus on suunniteltu nimenomaan silmänäytteille, ei sen tuloksia voida suoraan verrata respiratorisille näytteille tarkoitettujen CerTestin tai QuickStripen testien tuloksiin. Lisäksi on huomioitava testien välillä poikkeava näytemäärä, joka osaltaan vääristää ennusteprosentteja. Tästä syystä tulokset eivät ole keskenään verrannollisia. Tulokset viittaavat testien olevan hyvin spesifejä, mutta yhdenkään testin herkkyys ei yletä valmistajien ilmoittamiin lukemiin.

Detektioherkkyysmäärittäykset suoritettiin QuickStripe Adenovirus- sekä AdenoPlus -vieritesteille. AdenoPlus valikoitui määrittämiseen siksi, että tarve herkkyuden määrittämiseen tulee myös testin klinikkakäytöstä johtuen, ja lisäksi sen oli suorittanut myös valmistaja itse. QuickStripe Adenovirus -vieritestille se suoritettiin mielenkiinnosta, sillä kyseisiä testejä jäi sen suuremman pakkauskoon vuoksi spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittämisen jälkeen yli. CerTest Adenovirus Resp. -vieritestin valmistaja ei ilmoittanut testin detektioherkkyttä, eikä testejä jäänyt spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittämisen jälkeen ylimääräisiä. Näistä syistä sen detektioherkkyttä ei myöskään tässä opinnäytetyössä määritetty.

QuickStripe Adenovirus -vieritestin detektoraja (289 virusta / μl) osoittautui AdenoPlus -vieritestiä (70,5 virusta / μl) korkeammaksi. Toisaalta QuickStripe Adenovirus -vieritestiä ei ole suunniteltu silmänäytteille, joissa tutkittava solumäärä on respiratorisia näytteitä

vähäisempi. Tästä syystä QuickStripe Adenovirus -vieritestin ei välttämättä tarvitse ylittää samanlaiseen detektioherkkyyteen. Lisäksi AdenoPlus ei myöskään tässä suhteessa yltänyt valmistajan ilmoittamaan detektiorajaan 40–50 virusta per µl. Toisaalta valmistaja ilmoittaa 40–50 viruspartikkelin olevan vain arvio, sillä valmistajan tutkimuksessa käytettiin irrallisia heksoniproteiineja viruksen infektoimien solujen sijaan. Tämä voi osaltaan vaikuttaa tässä opinnäytetyössä ja valmistajan tutkimuksessa saatujen lukujen eroon.

7.2 Johtopäätökset

Kaikki vieritestit eivät yltäneet niiden valmistajien ilmoittamiin lukemiin. Pelkästään näiden tulosten perusteella sekä CerTest Adenovirus Resp. - että QuickStripe Adenovirus -vieritestit eivät tuo tarvittavaa diagnostista lisäarvoa eivätkä sovellu työn tilanteen laboratorion käyttöön respiratorisen adenoviruksen diagnosointiin. Opinnäytetyössä käytettyjen näytteiden pitkän säilytysajan vuoksi tuloksia ei kuitenkaan voi pitää täysin luotettavina, ja näiden vieritestien kohdalla lisätutkimukset olisivat tarpeen.

AdenoPlus -vieritesti jäi 80 % sensitiivisyydellään vain 10 % alle valmistajan ilmoittaman lukeman, ja opinnäytetyön tilaaja on kertonut tuloksen olevan lupaava. AdenoPlus -vieritestin sensitiivisyyttä testattiin tosin vain 10:llä näytteellä, joten on mahdollista, että mainittu 10 % ero kapenisi suuremmalla näytemäärällä. Ei ole myöskään varmuutta, onko tässä opinnäytetyössä käytetyn näytelaadun ja AdenoPlus -vieritestille tarkoitetun näytelaadun erolla vaikutusta tuloksiin. Näiden seikkojen varmistamiseksi lisätutkimukset olisivat tarpeen. Kuitenkin puhtaasti tämän opinnäytetyön tuloksia tarkastellessa AdenoPlus -vieritestiä voidaan pitää käyttökelpoisena vieritestinä adenoviruksen aiheuttaman konjunktiviitin diagnostiikassa. Niin ikään näiden tulosten perusteella QuickStripe Adenovirus ja CerTest Adenovirus Resp. -vieritestit eivät heikon suoritumisensa vuoksi sovellu testatussa käyttötarkoituksessa respiratorisen adenoviruksen toteamiseen.

7.3 Kehittämisehdotukset

Tässä opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat viljeltyjä viruskantoja lukuunottamatta potilasnäytteitä, joita oli säilytetty joistain kuukaudesta jopa vuoteen. Quidel, CerTest sekä Savyon Diagnostics Ltd. (QuickStripe Adenovirus) ilmoittavat vieriestiensä toimivan parhaiten tuoreilla näytteillä, joten säilötyt näytteet eivät olleet niiden käyttöön nähden optimaalisia. Sopivien näytteiden saaminen on epävarmaa niiden satunnaisuuden ja

adenoviruksen epidemiallisen luonteen vuoksi, joten luotettavamman tuloksen saamiseksi tämän kaltaisen tutkimuksen tulisi olla pidempiaikainen. CerTest Adenovirus Resp.- ja QuickStripe Adenovirus -vieritestien kohdalla näytteet tulisi analysoida heti niiden saavuttua tutkivaan laboratorioon. AdenoPlus -vier testiä tulisi käyttää jo hoitoyksikössä potilaan läsnä ollessa, sillä sen näytteenkeräin on suunniteltu käytettäväksi suoraan potilaan silmän sidekalvolle. Tällä tavoin myös tutkittava näytemäärä voisi olla suurempi, mikä osaltaan lisää tutkimuksen luotettavuutta.

7.4 Eettisyys

Opinnäytetyölle myönnettiin HUS:n tutkimuslupa marraskuussa 2018. Testattavat näytteet olivat potilasnäytteitä sekä rikastettuja tai kaupallisia, tunnettuja viruskantoja. Työn kannalta alkuperäisten näytteiden antaneiden potilaiden tiedot eivät ole relevantteja, eikä niitä käsitellä raportissa. Näytteiden tuloksia käsiteltiin työn aikana pseudonymisoituna. Näytteiden tunnistamiseksi välttämättömiä tietoja sisältäneet dokumentit jäivät Virologian yksikön haltuun. Opinnäytetyön aikana ei tapahtunut potilaskontaktia. Työssä pyrittiin noudattamaan tarkasti Tutkimuseettisen neuvottelukunta TENK:n määrittämää hyvää tieteellistä käytäntöä: työssä ja tulosten raportoinnissa kiinnitettiin erityisesti huomiota huolellisuuteen ja tarkkuuteen (Hyvä tieteellinen käytäntö 2012). Työskentely eteni suunnitellusti vaiheittain. Eri vieritestien reagensseja ei käsitelty samaan aikaan ristikon-taminaation välttämiseksi. Infektioriskin minimoimiseksi työskentely tapahtui biosuoja- tai vetokaapissa. Näyteputket suljettiin heti näytteen pipetoimisen tai näytetikun poistamisen jälkeen kontaminaatoriskin välttämiseksi. Käytetyt näytetikut, testeissä käytetyt reaktioputket, käytetyt pipetit ja pipetinkärjet ja testiliuskat ja -kasetit sekä virusviljelyputket hävitettiin asianmukaisesti infektiotaarallisen biologisen jätteen astiaan HUSLABin ohjeiden mukaisesti.

Vieritestien tulokset kirjattiin ylös tarkasti sellaisena, kuin ne testiliuskoissa näkyivät. Erittäin heikkojen positiivisten tulosten kohdalla tulosten tulkintaan pyydettiin varmistusta laboratorion työntekijältä. Ennen opinnäytetyön aloitusta allekirjoitettua salassapitosopimusta noudatettiin tarkasti. Tämän opinnäytetyön kohdalla salassapitosopimus vaikutti erityisesti potilasnäytteiden tunnistetietoihin sekä solu- ja virusviljelyssä sekä immuno-fluoresenssimenetelmässä käytettyihin solulinjoihin, reagensseihin ja työohjeisiin.

Opinnäytetyön tekijällä ei ole sidonnaisuuksia AdenoPlus-, QuickStripe Adenovirus- tai CerTest Adenovirus Resp -vieritestien valmistajiin, maahantuojiin tai jälleenmyyjiin. Opinnäytetyöntekijä ei vastaanota työstä rahoitusta.

7.5 Luotettavuus

Sambursky ym. (2013) käytti Quidel AdenoPlus -vieritestin detektioherkkyysmäärittämisessä näytteenään puhdistettua viruksen heksoniproteiinia, johon AdenoPlus -vieritesti reagoi. Tässä tutkimuksessa käytettiin soluviljelmään viljeltyjä viruksia. Toisaalta viljeltyt virukset voivat antaa realistisemman kuvan testin toiminnasta, sillä ne ovat viljelyssä luonnollisemmassa tilassa kuin irrallisina heksoniproteiineina. Opinnäytetyössä käytetyt näytteet tai niiden lukumäärä eivät olleet vieritestien kannalta täysin optimaalisia, sillä näytteet olivat olleet pakastettuna (20°C) pisimmillään vuoden ajan. Tämä seikka on otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

Tutkimuksen toteutus kuvattiin mahdollisimman tarkasti ja yksityiskohtaisesti luotettavuuden ja toistettavuuden parantamiseksi. Tiettyjä HUSLABin omia, talon sisäisiä menetelmiä ei salassapitosopimuksen ehtojen noudattamiseksi kuvata. Näihin lukeutuvat työohjeiden lisäksi virusviljelyssä käytetyt solut sekä elatusaine sekä immunofluoresenssissa käytetyt reagenssit. Salassapitosopimus ei koske käytettyjä vieritestejä (Quidel AdenoPlus, Savyon Diagnostics Ltd. QuickStripe Adenovirus ja CerTest Adenovirus Resp.), sillä niiden työohjeet ovat julkisesti saatavilla verkosta.

7.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön suorituksen aikana tutustuin minulle aiemmin käytännössä tuntemattomiin työmenetelmiin, kuten virusviljelyyn ja sen tulosten tulkintaan sekä HUSLABin vaatiman tason PCR-työskentelyyn. Työskentely opetti minulle huolellisuutta, tarkkuutta ja suunnitelmallisuutta. Koen nyt olevani vastuullisempi ja itsevarmempi. Myös työn raportoinnissa opin tarkkuutta ja tärkeiden yksityiskohtien havainnointia, esimerkiksi näyteläätujen ja tulosten erottelussa. Tästä huolimatta koen tutkimussuunnitelman ja -raportin kirjoittamisen edelleen haasteelliseksi. Opinnäytetyö kuitenkin kasvatti mielenkiintoani tutkimusluonteista työtä kohtaan.

Lähteet

AdenoPlus 2018. Työohje. Saatavilla myös sähköisesti. <<http://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/EF1337502EN00.pdf>> Luettu 2.10.2018

Adenoviruksen esiintyvyys 2018. Terveiden ja hyvinvoinninlaitos THL <<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys/adenoviruksen-esiintyvyys>> Luettu 20.5.2019

CDC Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=237>> Luettu 3.10.2018

CerTest Adenovirus Resp. 2013. Työohje. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.certest.es/products/adenovirus-resp/>> Luettu 15.10.2018

Hyvä tieteellinen käytäntö 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta TENK <<http://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanta>> Luettu 3.10.2018

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses 2017. Taxonomy. <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> Luettu 2.10.2018

Kam, Ronald – Ong, Hon Shing – Bunce, Catey – Ogunbowale, Lola – Verma Seema 2015. Sensitivity and specificity of the AdenoPlus point-of-care system in detecting adenovirus in conjunctivitis patients at an ophthalmic emergency department: a diagnostic accuracy study. *British Journal of Ophthalmology* 2015;99:1186-1189. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://bj.o.bmj.com/content/99/9/1186>> Luettu 2.10.2018

Meurman, Olli – Ruuskanen, Olli 2010. Adenovirukset. *Mikrobiologia*. Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti. <<http://www.oppiporssi.fi/op/mbg04901/do>> Luettu 2.10.2018

QuickStripe™ Adenovirus 2012. Savyon® Diagnostics Ltd. Verkkodokumentti. <<https://www.savyondiagnosics.com/product/quickstripe-adenovirus/>> Luettu 15.10.2018

Sachdev, Amun – Boukouvala, Stavroula – Ahluwalia, Harpreet – Crossman, Richard – Mehta, Purnima 2018: Role of the Adenoplus test in refractory, recurrent and clinically undiagnosed conjunctivitis. *Canadian Journal of Ophthalmology* 2018;53(5):532-592. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2017.12.004>> Luettu 9.11.2018

Sambursky, Robert – Trattler, William – Tauber, Shachar – Starr, Christopher – Friedberg, Murray – Boland, Thomas – McDonald, Marguerite – DellaVecchia, Michael – Luchs, Jodi 2013: Sensitivity and Specificity of the AdenoPlus Test for Diagnosing Adenoviral Conjunctivitis. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(1):17-21. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/1556875>> Luettu 9.11.2018

Seppänen, Matti 2018. Silmän sidekalvotulehdus (konjunktiviitti). Lääkärikirja Duodecim. Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01069> Luettu 2.10.2018

Sundaramurthy, Raja – Dhodapkar, Rahul – Kaliaperumal, Subashini – Harish, Belgode 2018: Investigational approach to adenoviral conjunctivitis: comparison of three diagnostic tests using a Bayesian latent class model. The Journal of Infection in Developing Countries JIDC 2018;12(1):43-51. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://jdc.org/index.php/journal/article/view/9439/1796>> Luettu 20.5.2019

Tartuntataudit suomessa 2017 2018. Terveyden ja hyvinvoinninlaitos THL. Verkko-dokumentti. <<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-343-148-5>> Luettu 23.5.2019

Trevethan, Robert 2017: Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5701930/>> Luettu 2.4.2019

Valones, Marcela Agne Alves – Guimarães, Rfaael Lima – Brandão, Lucas André Cavalcanti – de Souza, Paulo Roberto Eleutério – Carvalho, Alessandra de Albuquerque Tavares – Crovela, Sergio 2009: Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostics fields: a review. Brazilian Journal of Microbiology 2009;40(1): 1–11. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768498/>> Luettu 20.5.2019

Yu, Miao – Cao, Yue – Ji, Yubin 2017: The principle and application of new PCR technologies. IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences 100. IOP Publishing. Verkkodokumentti. <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/100/1/012065/pdf>> Luettu 20.5.2019

