

Karoliina Sievi

**IHMISEN PAPILLOMAVIRUKSEN SEROLOGINEN
DIAGNOSTIIKKA KAHDELLA ERI MENETELMÄLLÄ MITATTUNA**

Syventävien opintojen kirjallinen työ
Kevätlukukausi 2016

Karoliina Sievi

**IHMISEN PAPILLOOMAVIRUKSEN SEROLOGINEN
DIAGNOSTIIKKA KAHDELLA ERI MENETELMÄLLÄ MITATTUNA**

Hammaslääketieteen laitos,

Suupatologian oppiaine

Kevätlukukausi 2016

Vastuhenkilö: professori Stina Syrjänen

Sisällysluettelo

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO	1
1.1 Ihmisen papilloomaviruksen rakenne ja toiminta	1
1.2 HPV-infektio	2
1.3 HPV-infektion diagnostiikka.....	3
1.4 Tutkimuksen tavoitteet	7
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	8
2.1 Tutkimuksen taustaa: HUPA-tutkimus	8
2.2 Tutkimuksen aineisto	9
2.3 HPV-vasta-aineita osoittava pikatesti Prevo-Check	10
2.4 Tutkimuksen eteneminen	11
3 TULOKSET	12
3.1 Prevo-Check–tikkutestin tulokset pienillä näytevolyyymeilla.....	12
3.2 Jatkotutkimuksen tulokset	13
4 POHDINTA	16
4.1 Pienillä näytevolyyymeilla saatujen tulosten vertailu ja tulkinta.....	16
4.2 Jatkotutkimuksen tulosten vertailu ja tulkinta.....	17
4.3 Virhelähteet	18
4.4 Yhteenveto	18
LÄHTEET	20

SIEVI, KAROLIINA: Ihmisen papilloomaviruksen serologinen diagnostiikka kahdella eri menetelmällä mitattuna

Syventävät opinnot, 23 s.
Hammaslääketiede
Huhtikuu 2016

Ihmisen papilloomavirus (HPV) on pieni kaksisäikeinen DNA-virus, joka infektoi erilaistumiseen kykeneviä ihon ja limakalvon epiteelisoluja. Virus leviää sukupuoliyhdynnän välityksellä, mutta sillä on myös muita leviämistapoja. HPV-infektio voi aiheuttaa syöpää genitaalialueiden lisäksi esimerkiksi pään ja kaulan alueella.

Tutkimukseni tavoitteena oli selvittää uuden lateral flow –menetelmään perustuvan Prevo-Check-pikatestin (Abviris, Hünfelden, Saksa) herkkyyttä HPV16-vasta-aineiden osoittamiseksi seerumista. Prevo-Check-testi tehdään sormenpäältä otetusta veripisarasta tai seeruminäytteestä. Tutkimuksessa vertasin Prevo-Check-testituloksia aikaisemmin Luminex-pohjaisella menetelmällä saatuihin tuloksiin. Testit perustuvat HPV16L1-proteiinin vasta-aineiden osoittamiseen, mutta niissä käytetyt antigeenit ovat erilaisia. Luminex-menetelmässä tulokset ilmoitettiin keskifluoresenssi-intensiteettinä (MFI), ja raja positiiviselle näytteelle asetettiin arvolle 400 MFI. Prevo-Check-tulokset analysoitiin testitikon värireaktion perusteella.

Tutkimusaineistona käytettiin seeruminäytteitä 34 miehestä, jotka olivat osallistuneet suomalaisen HPV-infektion tartuntatapoja ja luonnollista taudinkulkua selvittävään tutkimukseen (HUPA). Tutkimukseeni valitut seeruminäytteet olivat Luminex-menetelmän perusteella joko pysyvästi HPV16-seropositiivisia tai juuri HPV-serokonvertoituneita. Näytteitä oli yhteensä 40. Jokainen testattiin kuudella eri näytevolyymilla.

Prevo-Check-testi antoi positiivisen tuloksen vain noin 15 %:sta Luminex-menetelmällä positiivisiksi diagnosoiduista näytteistä. Näytteet, joista todettiin korkeat HPV-vasta-ainetitterit Luminex-menetelmällä (MFI >1500), olivat positiivisia myös Prevo-Check-pikatestillä. Lisäksi Prevo-Check-testi tunnisti positiiviseksi yhden näytteen, jonka MFI oli matala (noin 600). Pieni näytevolyymi ja näytteen pitkä reagointiaika antoivat säännöllisesti negatiivisen Prevo-Check-testituloksen. Prevo-Check-testin herkkyys ei lisääntynyt, vaikka seeruminäytteen volyymi viisinkertaistettiin.

Luminex- ja Prevo-Check –menetelmien herkkyyserot johtuvat todennäköisesti antigeeninä käytetyn HPV16L1-proteiinin eri muodoista ja niiden erilaisesta kyvystä sitoutua seerumin HPV-vasta-aineeseen. Lisäksi Prevo-Check-testissä seerumin HPV-vasta-aineiden annetaan sitoutua HPV L1-antigeeniin ennen näytteiden analysointia. Mikäli Prevo-Check-pikatesti osoittaisi seropositiivisuuden ainoastaan kliinisesti relevanteissa infektioissa, eli produktiivisissa ja kroonisissa HPV16-infektioissa, sillä olisi suuri merkitys HPV-tartunnan diagnosoinnissa ja leviämisen ehkäisyssä. Pikatestikäyttö edellyttää kuitenkin menetelmän jatkokehittämistä ja sen herkkyyden lisätutkimusta.

Asiasanat: HPV, HPV-serologia, papilloomavirukset, seurantatutkimus, virologia

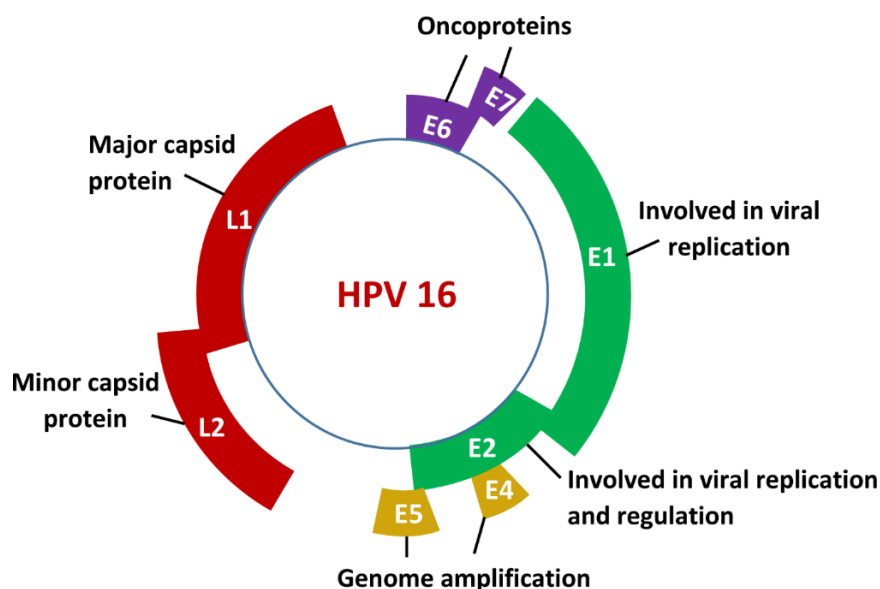
1 JOHDANTO

1.1 Ihmisen papilloomaviruksen rakenne ja toiminta

Ihmisen papilloomavirus eli HPV on kaksisäikeinen ihmisiä infektoiva DNA-virus (de Villiers ym. 2004). Pienikokoinen virus sisältää noin 8000 emäsparia ja 8 geeniä, joista diagnostiikan kannalta tärkeimpiä ovat L1-geeni ja sen tuottama proteiini (de Villiers ym. 2004). Viruksen tärkeimmät onkogeinit ovat E6 ja E7 (Stanley ym. 2007).

Jo vuonna 1981 julkaistiin alkuperäishavainnot siitä, että HPV voi aiheuttaa syöpää genitaalialueiden ohella myös pään ja kaulan alueella (Syrjänen ja Syrjänen 1981). HPV-infektio voi genitaalialueiden lisäksi sijaita esimerkiksi kurkunpään, suunielun ja ruokatorven alueella (Syrjänen ja Syrjänen 2000). HPV:stä tunnetaan yli 170 tyyppiä. Näistä alfa-perheeseen kuuluvat 12 HPV-genotyyppiä voivat aiheuttaa infektoimansa solun transformaation, joka muuttaa solun asteittain kohti syöpäsolua (McCredie ym. 2008, de Villiers 2013).

Ihmisen papilloomavirustyypeistä HPV16 on tärkein syövän aiheuttaja (Bosch ym. 1995, Munoz ym. 2003). Sen perimän rakenne esitetään kuvassa 1. Viruksen kohdesoluina toimivat erilaistumiseen kykenevät limakalvon ja ihon epiteelisolut (de Villiers ym. 2004).



Kuva 1. Kaaviokuva ihmisen papilloomaviruksen tyyppin 16 perimän rakenteesta. (Muokattu lähteestä: Proteins and Peptides- Re-emergence in Prophylactics and Therapeutics. <http://www.esciencecentral.org/ebooks/advances-in-protein-chemistry/proteins-peptides.php>)

1.2 HPV-infektio

Arviolta lähes jokainen saa jonkin HPV-tyypin aiheuttaman infektion jossain vaiheessa elämäänsä (Syrjänen ym. 1990b, Nieminen 2013). Näistä genitaalialueen infektio on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä sukupuolilyhdynnän välityksellä leviävistä infektioista (Partridge ja Koutsky 2006). HPV-infektio voi levitä myös muuten kuin sukupuoliteitse. Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että infektio on mahdollista saada jo varhaislapsuudessa tai sikiöajalla. Äiti on lapsensa tärkein tartuttaja (Puranen ym. 1996, 1997, Rintala ym. 2005, Koskimaa ym. 2012, 2014).

HPV:n luokittelu

Tunnetut HPV-tyypit on jaoteltu infektiokohtansa perusteella iho- ja limakalvotyyppisiin ja pahalaatuistumistodennäköisyyden perusteella korkean riskin (HR, high risk) ja matalan riskin (LR, low risk) ryhmiin (zur Hausen 2002, de Villiers ym. 2004, de Villiers 2013). Viruksen perimään perustuva luokittelu valmistui vuonna 2004. Tämän luokittelun perusteella on havaittu, että limakalvoa infektoivat HPV-tyypit kuuluvat pääasiallisesti alfa- ja ihoa infektoivat beta-ryhmän papilloomaviruksiin (de Villiers ym. 2004). Rokote kahta yleisintä korkean syöpäriskin HPV-tyyppiä, HPV16:ta ja HPV18:aa, vastaan otettiin käyttöön Suomessa vuonna 2013 (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 410/2013).

Eri HPV-tyyppien aiheuttamat infektiot ovat hyvin erilaisia. Suurin osa häviää, mutta pieni osa kroonistuu ja voi johtaa syövän asteittaiseen kehittymiseen (McCredie ym. 2008, Louvanto ym. 2011, Rintala ym. 2012). HPV-infektiot voidaan jakaa niille tyyppillisten piirteiden osalta kolmeen ryhmään – latentteihin, kliinisiin ja subkliinisiin. Latentti infektio saattaa olla olemassa jopa vuosikymmeniä, mutta yleensä se häviää lopulta itsestään (Pfister 1984). Se ei aiheuta potilaassa kliinisiä muutoksia, ja myös infektiokohdan epiteelin histologia tai sytologia voi olla normaali (Syrjänen ym. 1990a). Nimensä mukaisesti kliininen infektio aiheuttaa potilaassa kliinisiä muutoksia, kuten syyliä tai kasvaimia. Myös infektiokohdan epiteelin histologia ja sytologia poikkeavat normaalista. Subkliinisen infektion seurauksena epiteelin histologiassa on havaittavissa vain pieniä muutoksia, kliinisiä muutoksia ei havaita lainkaan. (Syrjänen ja Syrjänen 2000.)

Miesten HPV-infektiot

Suurin osa tähän päivään mennessä tehdyistä HPV-tutkimuksista on keskittynyt naisiin. Koska viruksen aiheuttamat infektiot kohdistuvat kuitenkin yhtä lailla molempiin sukupuoliin, on erittäin tärkeää tutkia niiden vaikutuksia myös miehissä.

Miehiin kohdistuvia tutkimuksia on vähän, ja ne viittaavat oireettomien HPV-infektioiden yleisyyteen; piilevä genitaalialueen infektio esiintyy arviolta jopa 72 %:lla miehistä (Hippeläinen 1993, Partridge ja Koutsky 2006, Nielson ym. 2007, Giuliano ym. 2008a, 2008b, Syrjänen 2009a, 2009b, Kero ym. 2011). Infektion esiintyvyyksiheyden vaihtelu eri lähteiden välillä johtuu esimerkiksi näytteenottotapojen, käytettyjen menetelmien ja aineistojen koon erilaisuudesta. Lisäksi Syrjäsen tutkimusryhmän viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että oireettomat suun limakalvon HPV-infektiot ovat yleisiä myös miehillä (Rintala ym. 2006, Louvanto ym. 2010, Rautava ym. 2012, Syrjänen ym. 2012).

HPV-infektioiden yleisyyttä ilmentää myös Hippeläisen tutkimus. Vuonna 1993 Hippeläinen tutki ihmisen papilloomaviruksen esiintyvyyttä Suomen armeijassa. Aineistona toimivat 432 suomalaisen miehen genitaalialueen irtosolunäytteet. Näistä 17 % sisälsi HPV-DNA:ta ja noin 6 %:lla miehistä havaittiin genitaalialueen syyliä. Koehenkilöistä 10,4 % kertoi sairastaneensa jonkin sukupuolitaudin. (Hippeläinen 1993.)

1.3 HPV-infektion diagnostiikka

Perinteisesti HPV-diagnostiikka on perustunut viruksen aiheuttamien solumuutosten toteamiseen erilaisten kokeiden, kuten papa-näytteiden, avulla. Suomessa ajan myötä lisääntynyt papa-seulonta on vähentänyt huomattavasti kohdunkaulan syöpien ilmaantuvuutta (Hakama ja Hristova 1997, Suomen Syöpärekisteri 2007). Viime aikoina myös viruksen perimään tai sen geenituotteiden osoittamiseen perustuvat menetelmät on otettu monessa maassa käyttöön osana papa-näytteiden analytiikkaa (Arbyn ym. 2015). Suomessa HPV-testausten sisällyttäminen osaksi joukkotarkastusta on vasta harkintavaiheessa.

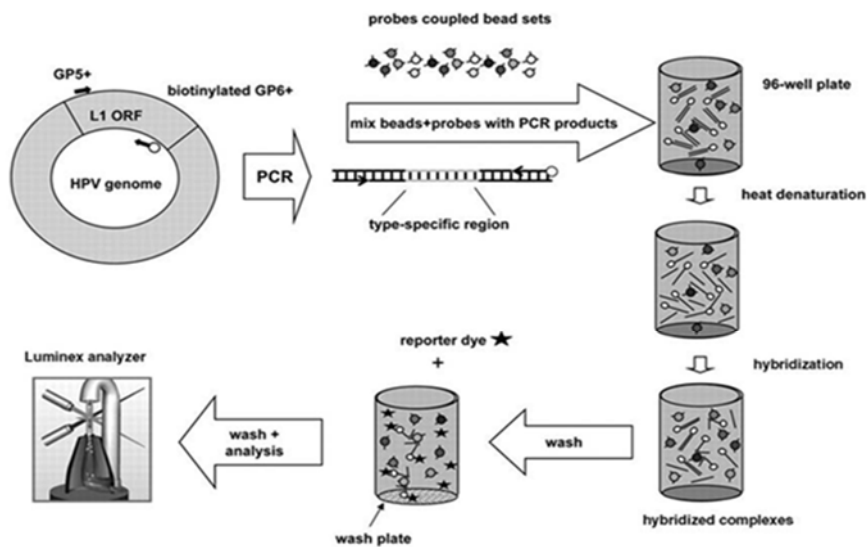
Perimään perustuva detekointi

HPV-diagnostiikka perustuu viruksen ja näytteen DNA- tai RNA-emäsjärjestysten vastaavanlaisuuteen. HPV:n perimään perustuvan testauksen haasteena on saada riittävästi tumallisia epiteelisoluja infektoituneesta kudoksesta tutkimusta varten (Kellokoski ym. 1992, Kero 2014). HPV:n osoittamiseen soveltuvia, näytteen ja viruksen nukleiinihappojen hybridisaatioon perustuvia menetelmiä ovat esimerkiksi PCR (Polymerase chain reaction, polymeerasiketjumonistus), ISH (In situ hybridization, in situ -hybridisaatio), SB (Southern blotting, southern blot -menetelmä) sekä DB (Do blot hybridization, do blot -hybridisaatio). 1980-luvulla kehitetty SB-menetelmä on usein mielletty yhdeksi kaikkien aikojen toimivimmista HPV:n osoitusmenetelmistä, koska sen avulla on tunnistettu uusia HPV-tyyppejä. Menetelmän haittana on kuitenkin se, että siinä tarvitaan paljon DNA:ta ja

menetelmän suoritus on aikaa vievä. Nykyisin eniten käytetäänkin polymeerasiketjumonistusta, sillä sen avulla hyvin pienistä DNA-näytteistä saadaan monistettua nopeasti ja vaivattomasti jopa miljoonakertaisia määriä (Rautava ja Syrjänen 2011).

Luminex-pohjainen HPV-DNA-testi Multimetrix

Luminex multiplex –menetelmään perustuvalla HPV-DNA-testillä (Multimetrix kit, Progel, Heidelberg, Saksa) näytteestä voidaan tutkia kerrallaan yhteensä 24 HPV-genotyyppiä seuraavasti: korkean riskin HPV-tyypit (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 ja 82) ja matalan riskin HPV-tyypit (HPV6, 11, 42, 43, 44 ja 70). Multimetrix-testi koostuu pienistä erivärisistä metallihelmistä, joihin on kiinnitetty värin mukaisesti eri HPV-tyypin oligonukleotideja. Lisäksi näytteen edustavuus varmistetaan helmiin kiinnitetyllä β -globiinioligonukleotidilla sekä menetelmää tarkkailevilla positiivisilla ja negatiivisilla näytteillä. Metallihelmien annetaan hybridisoitua näytteestä monistetun HPV L1-DNA:n kanssa. Monistuvaan L1-alueeseen liitetään myös biotiini. Biotiinihybridi reagoi tämän jälkeen fluoresoivalla R-fykoerytriinillä merkityn streptavidinin kanssa. Testitulosten analysointi tapahtuu Luminex-analysointilaitteella, joka suuntaa kaksi eriväristä lasersädettä näytteisiin. Punainen laser tunnistaa metallihelmet ja vihreä helmiin kiinnitetyt näytteet. (Schmitt ym. 2006, Arney ym. 2010.) Testitulokset ilmoitetaan Multimetrix-testissä keskifluoresenssi-intensiteetin (MFI) muodossa. MFI:n raja-arvot on esitetty kappaleessa 2.1. HPV-DNA:n detekointi Luminex multiplex -menetelmällä on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Luminex multiplex -menetelmän toimintaperiaate HPV-DNA-diagnostiikassa (Schmitt ym. 2006).

Kaupallisia HPV-DNA- ja -RNA-testejä

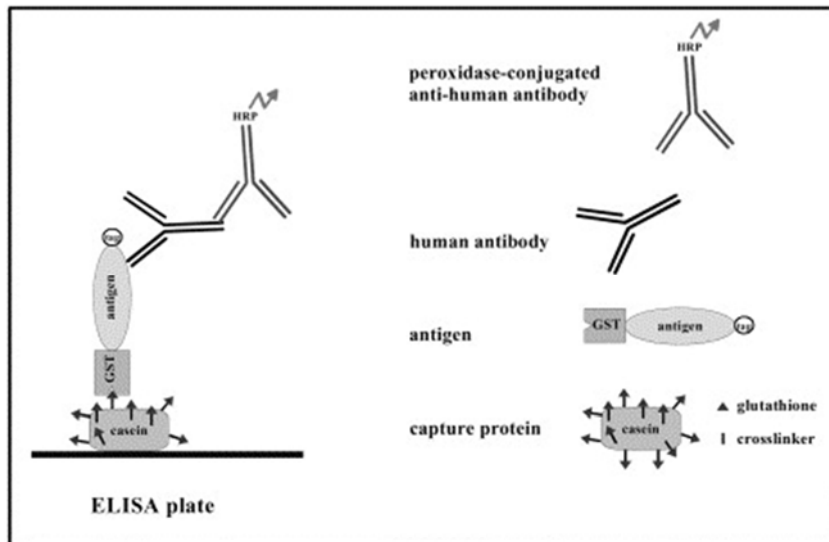
Markkinoilla on useita HPV:n perimän tunnistamiseen perustuvia diagnosointimenetelmiä. Esimerkkejä ovat Aptima (Hologic, San Diego, California, USA), Cobas® HPV test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California, USA) ja Hybrid capture (Digene Corporation, Gaithersburg, Maryland, USA). Aptima tunnistaa näytteestä 14 korkean riskin HPV-tyypin E6- ja E7-onkogeneenien lähetti-RNA:ta (Castle ym. 2007). Cobas- ja Hybrid capture -testi perustuvat HPV-DNA:n detekointiin. Cobas tunnistaa korkean riskin HPV-tyyppien DNA:ta (Cobas® HPV Test, molecular.roche.com). Hybrid capture -testi detektoi yli 20:n eri HPV-tyypin DNA:ta. Näytteen HPV-DNA muodostaa testissä koettimena käytetyn HPV-RNA:n kanssa hybridimolekyylin. (Arney ym. 2010.)

HPV-serologia

Serologiset menetelmät perustuvat proteiinien osoittamiseen seeruminäytteistä. Esimerkiksi infektioiden diagnosointi perustuu usein serologisiin testeihin, jotka havaitsevat kyseiselle infektiolle spesifisiä proteiineja potilaiden veri- tai seeruminäytteistä. HPV-vasta-aineiden osoittamista serologisista näytteistä ei ole vielä onnistuttu käyttämään diagnostisena menetelmänä, sillä HPV-serologialla on toistaiseksi ollut huono korrelaatio infektion aiheuttamiin kliinisiin muutoksiin.

ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) on määrittäminen menetelmä, joka perustuu vasta-aineen ja antigeenin pariutumiseen (Kuva 3). Mikäli näyte sisältää vasta-aineita tutkitulle proteiinille, muodostuu vasta-aineen ja proteiinin välille kompleksi. Sen seurauksena vasta-aineeseen kiinnittynyt entsyymi saa aikaan värireaktion. (ELISA Principle Basis and Extension, elisa-antibody.com.)



Kuva 3. ELISA-menetelmän toimintaperiaate (Sehr ym. 2001).

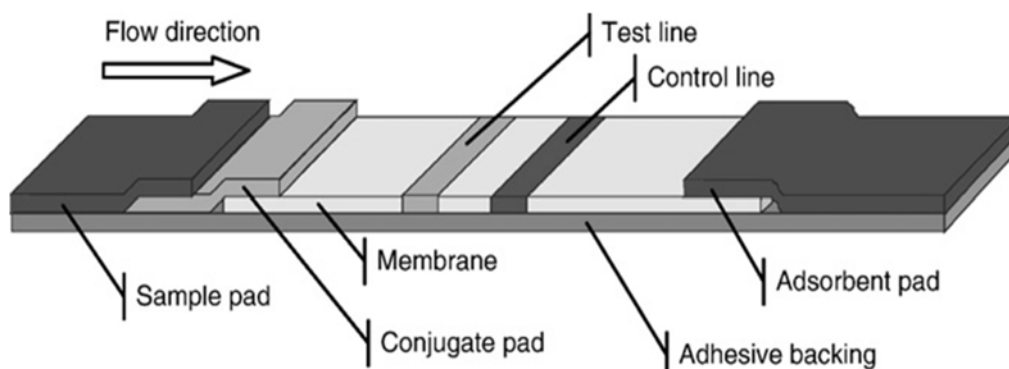
ELISA-menetelmään perustuva testi koostuu mikrotiiterilevystä, joka on päällystetty antigeenillä. Näytteen sisältämän primaarisen vasta-aineen annetaan reagoida levyllä olevan antigeenin kanssa. Seuraavaksi lisätään sekundääristä vasta-ainetta (IgG), johon on kiinnittynyt jokin värireaktion aiheuttava entsyymi. Mikäli tutkittu näyte on positiivinen, syntyy värireaktio. (ELISA Principle Basis and Extension, elisa-antibody.com.) ELISA:sta on olemassa useita erilaisia variaatioita, joista lateral flow - ja Luminex multiplex -menetelmät ovat esimerkkeinä.

Lateral flow –menetelmä

Lateral flow –menetelmä on monille kuluttajille tuttu raskaustesteistä, mutta HPV:n testaukseen sitä ei ole aiemmin käytetty. Menetelmä perustuu kapillaari-ilmion ja aineen eri olomuotojen hyödyntämiseen testitikussa.

Aluksi tutkittavan seeruminäytteen annetaan reagoida HPV L1 proteiinin kanssa. Tämän jälkeen näyte pipetoidaan testitikun alkukuoppaan, josta se kulkeutuu kapillaarivoimien

ansiosta ylöspäin kohti testi (T)- ja kontrollialuetta (C). Näillä alueilla sijaitsevat kuivat, immobilisoidut konjugaatit, joihin nesteen mukana kulkeutuva vasta-aine mahdollisesti sitoutuu. Testilinjan pitäisi pysyä negatiivisena, koska seerumin vasta-aineet on sidottu levyille jo ennen näytteen pipetointia. Antigeenin sitoutuminen konjugaattiin aiheuttaa paljaalla silmällä nähtävän värireaktion. (Ngom 2010.) Lateral flow -menetelmän toimintaperiaate esitetään kuvassa 4.



Kuva 4. Lateral flow -menetelmällä toimiva testi (Assadollahi ym. 2009).

Luminex multiplex -pohjainen HPV-serologiatesti

Luminex multiplex -pohjainen HPV-vasta-ainetestti on sovellettu versio perinteisestä ELISA-menetelmästä. Testillä voidaan tutkia samanaikaisesti viruksen neljää eri antigeeniä. Testi koostuu polystyreenihelmistä, joihin on kiinnitetty HPV:n tyyppien 16 ja 18 proteiineja antigeeni-vasta-ainekompleksin detektion mahdollistavassa muodossa (esim. HPV L1-glutathioni-S-transferaasi-fuusioproteiini). Mikäli seeruminäyte sisältää vasta-aineita tutkituille proteiineille, muodostuu niiden välille kompleksi. Näytteen positiivisuudesta eli kompleksin syntymisestä viestii värireaktio. Näytteet analysoidaan Luminex-analysointilaitteella, joka tulkitsee niitä kahdella erivärisellä lasersäteellä. (Sehr ym. 2001.)

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimusprojektin tavoitteena oli tutkia lateral flow -menetelmällä toimivaa HPV-testiä, joka tunnistaa HPV16L1-proteiinille tuotettuja seerumivasta-aineita (Prevo-Check, Abviris, Hünfelden, Saksa). Tavoitteena oli verrata tämän uuden pikatestin herkkyyttä aikaisemmin käyttämäämme Luminex-pohjaiseen menetelmään.

Nykyiset HPV-diagnostiikan menetelmät ovat haasteellisia. Lähes kaikki vaativat paljon resursseja, kuten aikaa, rahaa ja erikoisosaamista. HPV:n testauksesta tulisi huomattavasti helpompaa ja taloudellisempaa pikatestin myötä. Testaus ei vaatisi kalliita laitteita tai laboratorio-olosuhteita, vaan kuluttaja voisi suorittaa sen itsenäisesti kotioloissa. Testitulokset voitaisiin saada pikatestillä jo noin kahdessakymmenessä minuutissa, mikä olisi huomattavasti muita nykyisiä HPV-testejä nopeammin. Pikatestin ongelmana kuitenkin on, että sen perusteella ei voi päätellä, keillä HPV-positiivisista on HPV:n aiheuttama syöpä tai sen esiaste. Arviolta lähes kaikki saavat HPV:n aiheuttaman infektion jossakin elämänsä vaiheessa, mutta vain pieni osa infektioista kroonistuu ja aiheuttaa syövän esiastemuutoksia tai varsinaisen syövän. Pahanlaatuiset muutokset tulisi kyetä toteamaan muutosten varhaisvaiheessa.

Serologia on monen virusinfektion, kuten esimerkiksi hepatiitti B:n, osalta diagnostisesti toimiva, mutta HPV:n osalta vastaavaan tarkkuuteen ei ole päästy, koska infektio on paikallinen eikä yleissairaus. HPV:n elämänkaari infektoituneessa epiteelissä on toistaiseksi vielä osittain tuntematon. Prevo-Check-pikatesti, joka perustuu HPV:n koko L1-proteiinia vastaan muodostuvien vasta-aineiden tunnistamiseen verestä, voisi olla toimiva produktiivisen, eli virusta tuottavan infektion toteamiseksi. Testiä olisi mahdollista hyödyntää myös hoitojen tehokkuuden arvioinnissa seuraamalla viruksen vasta-ainetiittereiden laskua. Vielä toistaiseksi HPV-serologialla on ollut vähäinen merkitys kliinisessä diagnostiikassa, koska vasta-aineet ovat korreloineet huonosti infektiin tai sen aiheuttamiin kliiniseen oireisiin. Esimerkiksi tutkimusten perusteella noin puolet potilaista, joilla on diagnosoitu HPV:n aiheuttama kohdunkaulansyöpä, ovat HPV-seronegatiivisia (Carter 1997).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimuksen taustaa: HUPA-tutkimus

HUPA-tutkimus on Turun hammaslääketieteen laitoksen ja Turun yliopistollisen keskussairaalan yhdessä kehittämä monivuotinen HPV-seurantatutkimus. Tutkimuksen tarkoituksena on ollut selvittää viruksen dynamiikkaa ja tartuntareittejä suomalaisissa perheissä. Erityisen mielenkiinnon kohteena ovat olleet varhaislapsuudessa saadut HPV-infektiot. Tutkimuksen toteuttamiselle on saatu lupa Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin kuntayhtymän eettiseltä toimikunnalta (#2/1998, #2/2006 ja #2010). HUPA-tutkimuksesta on julkaistu 22 artikkelia ja neljä väitöskirjaa.

HUPA-tutkimus aloitettiin vuonna 1998 ja siihen osallistui 329 raskaana olevaa naista, 131 puolisoa ja heille syntyneitä lapsia. Miehistä 122 osallistui seurantakäynteihin. Suun ja genitaalialueen HPV-infektioiden esiintyvyyttä seurattiin perheenjäsenissä kuuden vuoden ajan. Heiltä kerättiin sukupuolesta riippuen suun ja genitaalialueen irtosolunäytteiden lisäksi veri-, sylki-, äidinmaito-, virtsaputki- sekä siemennestenäytteet ennen lapsen syntymää ja 2kk, 6kk, 12kk, 24kk, 36kk ja 72kk lapsen syntymän jälkeen. (Louvanto ym. 2013.)

Miehiä koskevat tulokset

HUPA:n seitsenvuotiseen seurantatutkimukseen osallistuneet miehet olivat keski-ikältään 29-vuotiaita. Tutkimuksen koehenkilöiden valintakriteereihin ei sisällynyt HPV-statusta tai sukupuolielämän rajoituksia, joten miesten taustat poikkeavat toisistaan näiltä osin. Miehistä 79,6 % kertoi, ettei ole koskaan sairastanut mitään sukupuolitautia. Miehistä 14,0 % oli ollut koko elämänsä aikana vain yhden tai kahden ihmisen kanssa sukupuoliyhteydessä. Yli kymmenestä seksikumppanista kertoi 39,5 %. (Syrjänen ym. 2015.) Seksikumppanien suuren määrän tiedetään lisäävän genitaalialueen HPV-infektioiden riskiä merkittävästi (Dunne ym. 2006).

Ennen HUPA-tutkimuksen alkua tutkimukseen osallistuneiden miesten näytteet testattiin erittäin herkällä HPV-diagnostiikan menetelmällä, sisäkkäisen PCR:n ja Multimetrix HPV-genotyypityksen yhdistelmällä. Genitaalinäytteistä 35,9 % ja virtsaputkinäytteistä 22,7 % oli positiivisia. Seitsemän vuoden jälkeen järjestettyyn viimeiseen käyntiin osallistui koehenkilöistä enää vain noin kolmasosa. Tuolloin genitaali- ja virtsaputkinäytteistä noin 33 % (15/46) ja noin 22 % (10/45) oli positiivisia. (Kero 2014.)

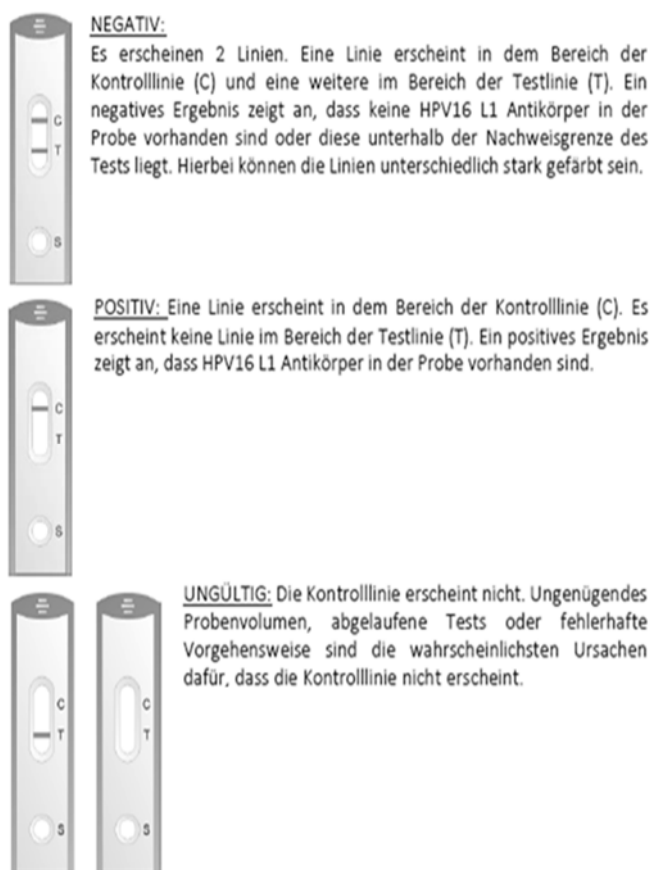
2.2 Tutkimuksen aineisto

HUPA-tutkimukseen osallistuneiden miesten seeruminäytteitä, jotka olivat Luminex-pohjaisen testin mukaan joko pysyvästi HPV16-positiivisia tai juuri HPV-serokonvertoituneita (Syrjänen ym. 2015), käytettiin aineistona tutkittaessa Prevo-Check-testin kykyä tunnistaa HPV-positiivisia näytteitä. Näytteitä oli yhteensä 40, ja ne olivat peräisin 34:stä eri miehestä. HUPA-tutkimuksen aikana kahdelta mieheltä oli otettu neljä seeruminäytettä, muilta miehiltä vain yksi. Henkilöiden suun alueen HPV-DNA-status oli tiedossa koko kuusivuotisen seurannan ajalta aikaisempien tutkimusten perusteella. Myös genitaalialueen HPV-DNA-status oli tiedossa tutkimuksen alku- ja lopputilanteissa. (Kero ym. 2011.) Irtosolunäytteet tutkittiin käyttäen kappaleessa 1.3 kuvattua Luminex-pohjaista HPV-DNA-testiä. Valitut seeruminäytteet oli aikaisemmin tutkittu myös Luminex-menetelmään perustuvalla

menetelmällä, jossa metallihelmiin oli kiinnitetty HPV16L1-proteiini. Tässä vasta-ainetestissä keskifluoresenssi-intensiteetin (MFI) raja positiiviselle näytteelle oli asetettu arvolle 400 MFI (Kero ym. 2011). Prevo-Check-tutkimukseen valittujen seeruminäytteiden MFI-arvot HPV16L1-vasta-aineelle vaihtelivat rajoissa 204,5–2842 MFI.

2.3 HPV-vasta-aineita osoittava pikatesti Prevo-Check

Prevo-Check-testipaketti koostuu testitikun lisäksi kahdesta pipetistä sekä 120µl HPV16L1-proteiiniliuosta sisältävästä reagenssiputkesta. Ennen kuin kokoveri- tai seeruminäyte pipetoidaan testitikulle, se sekoitetaan HPV16L1-proteiiniliuoksen kanssa. Näytteessä mahdollisesti olevat HPV16L1-vasta-aineet pääsevät tällöin muodostamaan komplekseja Prevo-Check-testiliuoksessa olevan HPV16L1-proteiinin kanssa. (Prevo-Check®, abviris.de). Testin toimintaperiaate esitetään kuvassa 5.



Negatiivinen testitulos

Syntyy kaksi värireaktiota. Toinen syntyy kontrolli- (C) ja toinen testialueelle (T). Negatiivinen testitulos viittaa siihen, ettei näyte sisällä HPV16L1-vasta-aineita, tai että näytteen vasta-ainepitoisuus on liian matala voidakseen tulla testin havaitsemaksi. Värireaktiot voivat olla eri vahvuisia.

Positiivinen testitulos

Kontrollialueelle (C) syntyy värireaktio. Testialueelle (T) ei synny värireaktiota. Positiivinen testitulos tarkoittaa, että näyte sisältää HPV16L1-vasta-aineita.

Mitätöity testitulos

Kontrollialueelle ei synny värireaktiota. Liian pieni näyte, vanhaksi mennyt testi ja virheellinen testin suoritustapa ovat todennäköisimmät syyt siihen, miksi kontrollialueelle ei synny värireaktiota.

Kuva 5. Prevo-Check -testiliuskan toimintaperiaate. (Prevo-Check® <http://abviris.de/pdf/pc.ifu.GB.pdf>)

Prevo-Check-testin värireaktiot

Testitulokset on positiivinen, mikäli seeruminäyte sisältää HPV16L1-vasta-aineita. Koska positiivisen seeruminäytteen HPV16L1-vasta-aineet ovat sitoutuneet Prevo-Check-testiliuoske HPV16L1-proteiineihin, jäljellä ei ole HPV16L1-proteiinia, joka sitoutuisi testiliuoske testialueella kultapartikkeleilla merkattuun HPV16L1-vasta-aineeseen. Täten Prevo-Check-testiliuoske T-alueelle ei synny värireaktiota. Ainoastaan kontrollialueelle (C) syntyy värireaktio, sillä testiliuoske C-alueella sijaitsee testin toimivuutta säätelevä itsenäinen, immunologinen kontrolli, joka on aina positiivinen testin toimiessa oikein.

Mikäli verinäyte ei sisällä HPV16L1-vasta-aineita, on testitulokset negatiivinen. Veren ja proteiiniliuoske muodostama yhdiste sisältää tällöin vapaata HPV16L1-proteiinia, joka sitoutuu testitiku T-alueen HPV16L1-vasta-aineeseen aikaansaaden värireaktion. C- ja T-alueella havaitaan värireaktio.

2.4 Tutkimuksen eteneminen

Aluksi tutkittu seeruminäyte noudettiin -70-asteisesta pakastimesta sulamaan 0-asteisille jääille testausten ajaksi. Kaikista seeruminäytteistä testattiin viisi eri näytevolyyymia, jotta selviäisi, minkä suuruisella seeruminäytteellä saadaan Prevo-Check-tikkutestissä paras testitulokset. Valmistajan ohjeen mukainen näytevolyyymi oli 25µl. Jokaiselle seeruminäytteelle numeroitiin viisi HPV16L1-proteiiniliuoske sisältävää Eppendorf-putkea numeroin 1-5 vastaamaan tilavuuksia 5µl, 10µl, 15µl, 20µl ja 25µl. Numero yksi vastasi pienintä tilavuutta ja numero viisi suurinta. Viiden edellä mainitun näytevolyyymien lisäksi testitiku toimivuutta testattiin jatkotutkimuksessa 50µl:n suuruisilla seeruminäytteillä, ja niitä merkittiin numerolla kuusi.

Kun seeruminäyte oli sulanut, sitä pipetoitiin halutun suuruinen määrä koeputkeeseen, joka sisälsi Prevo-Check-testin HPV16L1-proteiiniliuoske. Seerumin lisäshetkellä sekuntikello käynnistettiin soimaan kymmenen minuutin päästä. Seerumin ja proteiiniliuoske sisältämää näytettä sekoitettiin pipetoimalla noin viisi kertaa ylös-alas. Sen jälkeen sitä vorteksoitiin ja lopuksi sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan.

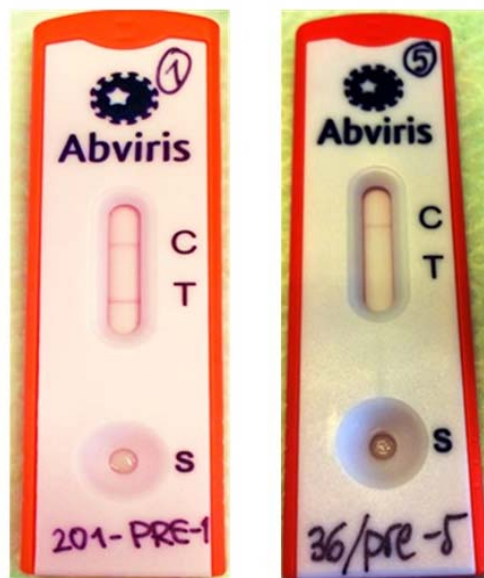
Kymmenen minuutin kuluttua 100µl näytettä pipetoitiin Prevo-Check-testiliuoske näytekuoppaan. Sekuntikello käynnistettiin soimaan viiden minuutin kuluttua. Kun aika oli kulunut, testitikulle muodostuneet värireaktiot (viivojen lukumäärä ja voimakkuus) analysoitiin silmämääräisesti. Värireaktion vahvuutta arvioitiin asteikolla 1-3 niin, että numero kolme vastasi hyvin vahvaa ja numero yksi heikkoa värireaktiota. Myös muut huomionarvoiset seikat kirjattiin taulukkoon 1. Kymmenen minuutin jälkeen testiliuoske värireaktioista tehtiin

amat havainnot kuin edellä, ja nekin kirjattiin taulukkoon 1. Jatkotutkimuksen tulokset kirjattiin taulukkoon 2.

3 TULOKSET

3.1 Prevo-Check–tikkutestin tulokset pienillä näytevolyymeilla

Prevo-Check–testillä vain 12,5 % (5/40) Luminex-pohjaisella testillä HPV-positiiviseksi todetuista näytteistä oli positiivisia. Kaikki muut näytteet antoivat negatiivisen tuloksen. Tulokset esitetään taulukossa 1 ja valokuvat negatiivisesta ja positiivisesta Prevo-Check-tikkutestistä kuvissa 6 ja 7.



Kuva 6. Negatiivinen
Prevo-Check-testitulokset

Kuva 7. Positiivinen
Prevo-Check-testitulokset

Prevo-Check-testi tunnisti positiivisiksi näytteet, joilla oli Luminex-testissä korkea keskifluoresenssi-intensiteetti (1564, 2081, 2197, 2842 MFI). Lisäksi se tunnisti positiiviseksi näytteen 168/36, vaikka sen keskifluoresenssi-intensiteetti oli vain 600,1 MFI. Poikkeuksena oli näyte 91/pre, joka korkeasta keskifluoresenssi-intensiteetistään (2779 MFI) huolimatta oli Prevo-Check-testissä kymmenen minuutin jälkeen negatiivinen.

Seerumia tarvittiin keskimäärin vähintään 20 μ l, jotta näyte oli kymmenen minuutin jälkeen positiivinen Prevo-Check-testissä. Yhden näytteen (168/12) kohdalla positiivinen tulos saatiin jo 15 μ l:n suuruisella näytteellä. Edellä mainittu näyte oli myös ainoa, joka antoi positiivisen tuloksen viiden minuutin jälkeen jo 10 μ l:n suuruisella näytteellä.

3.2 Jatkotutkimuksen tulokset

Kun Prevo-Check-tikkutestillä tutkittiin 50 μ l:n suuruisia seeruminäytteitä, noin 15 % (6/40) Luminex-pohjaisella testillä HPV-positiivisiksi todetuista näytteistä diagnosoitiin positiivisiksi kymmenen minuutin jälkeen. Loput näytteet olivat suuresta näytetilavuudesta huolimatta edelleen negatiivisia. Prevo-Check-jatkotutkimuksen tuloksia on verrattu Keron ym. (2011) vastaaviin vasta-ainepohjaisella Luminex-menetelmällä saamiin tuloksiin taulukossa 2. Lisäksi taulukossa 2 on esitetty tulokset koehenkilöiden HPV-DNA-analyysistä (Kero ym. 2011). Koehenkilöiden HPV-DNA-positiivisuuden ja Prevo-Check-testitulosten välillä ei havaittu korrelaatiota.

Taulukko 1. HPV-diagnoosi tutkimusaineiston seeruminäytteistä Prevo-Check-pikatestillä, kun reaktioaikana A) 5 min, ja B) 10 min.

A. Prevo-Check-testitulokset, kun näytteen reaktioaika testitikulla 5 min

ID	Volume 1	Notes	Volume 2	Notes	Volume 3	Notes	Volume 4	Notes	Volume 5	Notes
	T, C		T, C		T, C		T, C		T, C	
9/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1		1, 1	
23/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
29/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
35/36	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
36/pre	2, 1		1, 1		1-, 1	T very weak	0, 1	positive	0, 1	positive
37/pre	2, 1		2, 1		1, 1-	C weak	1, 1-	C weak	1, 1	
39/pre	2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
45/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		1, 1	
62/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
77/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
81/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1	
82/pre	2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1		1, 1	
83/pre	3, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1		2, 1-	C weak
91/pre	1, 1		1, 1		1-, 1	T very weak	1-, 1	T very weak	0, 1	positive
96/12	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		1, 1	
105/pre	3, 1		3, 1		2, 1		3, 1		2, 1	
128/12	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
138/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
151/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
159/pre	3, 1		2, 1		3, 1		2, 1		2, 1	
166/pre	2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
168/pre	3, 1		2, 1		1, 1		1, 1		1, 1	
168/12	1-, 1	T very weak	0, 1	positive	0, 1	positive	0, 1	positive	0, 1-	positive, C weak
168/24	2, 1		2, 1		1, 1		1, 1		0, 1	positive
168/36	2, 1		2, 1		1, 1		1-, 1	T very weak	0, 1	positive
177/pre	3, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak	2, 1		2, 1	
182/pre	3, 1		2, 1-	C weak	2, 1		2, 1		2, 1	
184/pre	3, 1		2, 1		2, 1		3, 1		2, 1	
201/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
210/12	ND		2, 1		2, 1		1-, 1	T very weak	2, 1-	C weak
216/24	3, 1		2, 1		1, 1		1, 1		1, 1-	C weak
237/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-		2, 1-	C weak
273/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
287/pre	1, 1		1, 1		0, 1-	pos., C weak	0, 1	positive	0, 1	positive
288/pre	3, 1		3, 1		3, 1		3, 1		3, 1	
288/12	3, 1		2, 1		1, 1		2, 1		2, 1	
288/24	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		1, 1-	C weak
288/36	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
289/pre	ND		2, 1-	C weak	3, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
306/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak

B. Prevo-Check-testitulokset, kun näytteen reaktioaika testitikulla 10 min

ID	Volume 1	Notes	Volume 2	Notes	Volume 3	Notes	Volume 4	Notes	Volume 5	Notes
	T, C		T, C		T, C		T, C		T, C	
9/pre	2, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
23/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
29/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
35/36	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
36/pre	2, 1		2, 1		2, 1		1-, 1	positive	0, 1	positive
37/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
39/pre	3, 1		2, 1		2, 1-	C weak	3, 1		2, 1-	C weak
45/pre	3, 1		3, 1-	C weak	2, 1-	C weak	2, 1		2, 1	
62/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
77/pre	2, 1		3, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak	2, 1	
81/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak
82/pre	3, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1		2, 1-	C weak
83/pre	3, 1		3, 1		2, 1-	C weak	2, 1		2, 1	
91/pre	1, 1		1, 1		1, 1		1, 1		1-, 1	T very weak
96/12	3, 1		2, 1		2, 1		3, 1		2, 1	
105/pre	3, 1		3, 1		3, 1		3, 1		3, 1	
128/12	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
138/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
151/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
159/pre	3, 1		3, 1		3, 1		2, 1		3, 1	
166/pre	3, 1		3, 1		3, 1		2, 1		2, 1	
168/pre	3, 1-	C weak	1, 1-	C weak	2, 1		2, 1		1, 1	
168/12	1, 1		1-, 1		0, 1	positive	0, 1	positive	0, 1-	pos., C weak
168/24	2, 1		2, 1		2, 1		1, 1		0, 1	positive
168/36	2, 1		2, 1		1, 1		1-, 1	T very weak	0, 1	positive
177/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
182/pre	3, 1		3, 1		2, 1		3, 1		2, 1	
184/pre	3, 1		3, 1		3, 1		3, 1		2, 1	
201/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
210/12	ND		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak
216/24	3, 1		2, 1		1, 1		1, 1		1, 1	
237/pre	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak
273/pre	3, 1		3, 1		3, 1		3, 1		2, 1-	C weak
287/pre	2, 1		1, 1		1-, 1	T very weak	0, 1	positive	0, 1	positive
288/pre	3, 1		3, 1		3, 1		3, 1		3, 1	
288/12	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
288/24	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	
288/36	3, 1		3, 1		2, 1		2, 1		2, 1	
289/pre	ND		3, 1		3, 1		2, 1		2, 1	
306/pre	3, 1		2, 1		2, 1		2, 1-	C weak	2, 1-	C weak

VOLUME

1=5µl
2=10µl
3=15µl
4=20µl
5=25µl

STRIPES

T=test
C=control

COLOUR

3=very strong
2=strong
1=weak
1=very weak
0=invisible

Positive
Unclear
ND (not detected)
C very weak

Taulukko 2. Prevo-Check-pikatestitulosten (A) verrattuna Luminex-menetelmän tuloksiin (B), sekä HPV-DNA-analyysituloksiin (C).

ID	A		B		C		
	Vol.6 (5 min)	Notes	Vol.6 (10 min)	Notes	HPV16L1	Mouth	Semen/urethra
	T,C		T,C		MFI	HPVtype	HPV type
9/pre	2-, 1+	C strong	2, 1+	C strong	252.00	ND	ND
23/pre	2, 1		2, 1+	C strong	243.00	HPV11	HPV18
29/pre	2, 1		3, 1		531.00	HPV-neg.	HPV-neg.
35/36	2, 1		3, 1		213.4	HPV-neg.	ND
36/pre	0, 1	Positive	0, 1	Positive	2081.00	HPV-neg.	HPV43
37/pre	2, 1		3, 1		213.00	HPV-neg.	HPV51
39/pre	2, 1		2, 1		378.00	HPV-neg.	HPV6
45/pre	2, 1		2, 1		201.00	HPV-neg.	HPV6,16,33
62/pre	2, 1		2, 1		339.00	HPV-neg.	HPV-neg.
77/pre	2, 1		2, 1		216.00	HPV11&16	HPV-neg.
81/pre	2, 1		2, 1		227.00	HPV-neg.	HPV33,56
82/pre	2-, 1		2, 1		613.00	HPV-neg.	HPV-neg.
83/pre	2, 1		2, 1		208.00	HPV-neg.	HPV-neg.
91/pre	0, 1	Positive	0, 1	Positive	2779.00	HPV43	HPV-neg.
96/12	2, 1		2, 1		238.50	HPV-neg.	ND
105/pre	2, 1		2, 1		791.50	HPV-neg.	HPV-neg.
128/12	2, 1		3, 1		245.00	HPV59	ND
138/pre	2, 1		2, 1		242.00	HPV-neg.	HPV6
151/pre	1-, 1-	T, C weak	2, 1-	C very weak	212.50	HPV-neg.	HPV-neg.
159/pre	2-, 1		2, 1		1133.00	HPV-neg.	HPV-neg.
166/pre	2, 1		2, 1		209.00	HPV-neg.	HPV16
168/pre	1-, 1	T very weak	1-, 1	T very weak	437.00	HPV-neg.	HPV-neg.
168/12	0, 1	Positive	0, 1	Positive	2197.50	HPV-neg.	ND
168/24	0, 1	Positive	0, 1	Positive	1564.50	HPV18,59	ND
168/36	0, 1	Positive	0, 1	Positive	600.1	HPV16	ND
177/pre	2, 1		2, 1		211.00	HPV-neg.	HPV-neg.
182/pre	2, 1		2, 1		237.50	HPV-neg.	HPV6
184/pre	2-, 1+	C strong	2, 1+	C strong	313.50	HPV-neg.	HPV-neg.
201/pre	2, 1		2, 1		408.50	HPV16	HPV-neg.
210/12	3, 1++	C strong	3, 1++	C strong	246.50	HPV-neg.	ND
216/24	1-, 1	T very weak	1-, 1	T very weak	466.00	HPV-neg.	ND
237/pre	2, 1		2, 1		309.50	HPV-neg.	HPV-neg.
273/pre	2, 1		2, 1		549.50	HPV-neg.	HPV-neg.
287/pre	0, 1+	Positive,C str	0, 1+	Positive,C str	2842.00	HPV82	HPV-neg.
288/pre	2-, 1		2, 1		710.00	HPV-neg.	HPV-neg.
288/12	2, 1		2, 1		507.00	HPV-neg.	ND
288/24	2, 1		3, 1		1297.65	HPV-neg.	ND
288/36	2, 1		2, 1		1033.3	HPV16	ND
289/pre	2, 1		2, 1		204.50	HPV-neg.	HPV-neg.
306/pre	2, 1		3, 1		1029.00	HPV-neg.	HPV-neg.

VOLUME

- 1=5µl
- 2=10µl
- 3=15µl
- 4=20µl
- 5=25µl
- 6=50 µl

STRIPES

- T=test
- C=control

COLOUR

- 3=very strong
- 2=strong
- 1=weak
- 1-=very weak
- 0=invisible

Positive
T weak
C strong
C very weak

4 POHDINTA

4.1 Pienillä näytevolyyymeilla saatujen tulosten vertailu ja tulkinta

Prevo-Check-testillä vain joka kahdeksas Luminex-pohjaisella testillä positiiviseksi havaituista näytteistä antoi positiivisen tuloksen, mikä viittaa joko Prevo-Check-testin epäherkkyyteen tai käytettyjen serologisten menetelmien erilaisuuteen. Pikatestissä seeruminäytteen annetaan reagoida vakiomäärän HPV16L1-proteiinia sisältävän liuoksen kanssa, joten seerumin vasta-ainetaso vaikuttaa proteiini-vasta-ainekompleksien muodostumiseen ja täten testituloksiin. Tutkimustulosten perusteella Prevo-Check-testi toimii parhaiten, kun käytetään tarpeeksi suuria näytevolyymeja ja testiliuskan värireaktiot analysoidaan heti viiden minuutin jälkeen.

Testitulokset riippuivat hyvin paljon ajasta, jonka seeruminäytteiden annettiin reagoida Prevo-Check-testitikulla. Valmistaja suositteli analysoimaan testitikulle syntyneet värireaktiot aikaisintaan viiden ja viimeistään kymmenen minuutin reagointiajan jälkeen. Tutkimuksessa kaikki testin positiiviseksi luokittelemat näytteet antoivat positiivisen testituloksen herkemmin viiden kuin kymmenen minuutin jälkeen. Todennäköinen selitys tälle ilmiölle on ajan myötä tapahtuva testiliuskan T-alueen värireaktion voimistuminen; värireaktio, joka oli viiden minuutin jälkeen heikko, saattoi muuttua Prevo-Check-testiliuskalla vahvaksi kymmenen minuuttiin mennessä. Tällöin viiden minuutin jälkeen positiivinen näyte näyttikin kymmenen minuutin jälkeen negatiiviselta.

Prevo-Check-testissä myös näytevolyyymilla oli testituloksen kannalta suuri merkitys. Aiemmin Luminex-menetelmällä HPV-seropositiiviseksi todetuista näytteistä saatiin Prevo-Check-testissä lähes poikkeuksetta negatiivisia testituloksia, kun niitä testattiin pienillä näytevolyyymeilla. Mitä suurempi näytevolyyymi oli, sitä todennäköisempi oli positiivinen testitulos. Neljässä näytteessä viidestä positiivinen Prevo-Check-testitulos edellytti vähintään 20 μ l:n suuruista seeruminäytettä. Vain yhden näytteen (168/12) kohdalla saatiin positiivinen tulos tätä pienemmillä näytevolyyymeilla. Viiden minuutin kohdalla näyte 168/12 oli positiivinen jo 10 μ l:n suuruisella näytteellä ja kymmenen minuutin jälkeen 15 μ l:n. Kaikkein pienimmällä näytevolyyymilla (5 μ l) testitulos oli aina negatiivinen näytteestä ja näytteen reagointiajasta riippumatta.

Näytteen sisältämien vasta-aineiden liian pieni määrä selittää todennäköisesti sen, miksi pieni näytevolyyymi johti Prevo-Check-testissä useiden näytteiden kohdalla vääristyneisiin testituloksiin. Koska testitikku on suunniteltu 25 μ l:n suuruisille seeruminäytteille, sitä pienemmät seropositiiviset näytteet saattavat sisältää testituloksen luotettavuuden kannalta

liian vähän vasta-aineita. Kun vähän HPV16L1-vasta-aineita sisältävä näyte yhdistetään HPV16L1-proteiinia sisältävän liuoksen kanssa, HPV16L1-proteiinia jää kompleksien muodostumisen jälkeen yli. Kun näyte siirretään testitikulle, liuokseen vapaaksi jäänyt HPV16L1-proteiiniyli jäämä sitoutuu testitikun T-alueella sijaitseviin vasta-aineisiin, ja testiliuskalle syntyy kaksi värireaktiota, jolloin syntyy virheellinen vaikutelma negatiivisesta testituloksesta.

4.2 Jatkotutkimuksen tulosten vertailu ja tulkinta

Jatkotutkimuksessa hypoteesi oli, että suuremmat näytevolyymit lisääisivät Prevo-Check-testin herkkyyttä ja positiivisten testitulosten määrä kasvaisi. Hypoteesi perustui pienillä näytevolyyymeilla suoritettuihin testauksiin, joissa saatiin lähes poikkeuksetta negatiivisia tuloksia Luminex-menetelmällä positiivisiksi todetuista näytteistä (ks. kappale 2.1). Ilmiö viittasi vahvasti Prevo-Check-testitikun epäherkkyteen.

Jatkotutkimuksen tulokset viittaavat kuitenkin siihen, että hypoteesi oli väärä. Testattaessa 50µl:n suuruisia näytevolyymeja saatiin ainoastaan yksi uusi positiivinen testitulos verrattuna aiempiin tuloksiin pienemmillä näytevolyyymeilla. Kaikki pienillä näytevolyyymeilla positiivisen testituloksen antaneet näytteet olivat positiivisia myös silloin, kun testattiin 50µl:n suuruisilla näytevolyyymeilla. Lisäksi näyte 91/pre, joka oli antanut negatiivisen tuloksen testattaessa pienillä näytevolyyymeilla, oli 50µl:n suuruisella näytevolyyymilla testattaessa positiivinen.

Näytteen 91/pre positiivinen testitulos jatkotutkimuksessa on todennäköisesti selitettävissä testituloksen tulkinnanvaraisuudella. Näytteen testitulos tulkittiin negatiiviseksi, mikäli Prevo-Check-testitikun kontrollialueen värireaktion lisäksi myös testialueella oli nähtävissä värireaktio. Kun näytteestä 91/pre testattiin pieniä näytevolyymeja, syntyi testiliuskan T-alueelle erittäin heikko värireaktio. Heikon värireaktion takia testituloksesta tehtiin ilmeisesti väärä päätelmä. Koska näyte 91/pre oli todennäköisesti jo pienemmillä näytevolyyymeilla positiivinen, positiivisten testitulosten lukumäärän voidaan katsoa pysyneen yhtä suurena alkuperäisessä tutkimuksessa ja jatkotutkimuksessa.

Koska positiivisten testitulosten määrä Prevo-Check-testissä ei kasvanut, vaikka näytevolyymeja kasvatettiin, on todennäköistä, että kyse ei ole testin epäherkkydestä. Mikäli testi olisi epäherkkä, olisi positiivisten testitulosten määrä kasvanut suurempia seeruminäytteitä testattaessa. Todennäköinen selitys tuloksille on, että lateral flow -

menetelmällä toimivassa Prevo-Check-testissä ja Luminex -pohjaisessa testissä käytetyt eri HPV-antigeenit tunnistavat seerumin HPV-vasta-aineen eri epitooppeja. Tämä saattaa olla osoitus menetelmän selektiivisyydestä.

4.3 Virhelähteet

Näytteiden käsittely saattoi vaikuttaa vääristävästi testituloksiin. Prevo-Check-testin tutkimuksissa käytettiin testin ohjeistuksessa suositeltujen kokoverinäytteiden sijaan seeruminäytteitä. Testin valmistaja ei kuitenkaan kokenut seeruminäytteiden käyttöä ongelmalliseksi. Lisäksi jokainen näyte pakastettiin ja sulatettiin kertaalleen testausten aikana, minkä vaikutus tuloksiin on epäselvä.

Silmämääräinen värireaktioiden tulkitseminen vaikutti todennäköisesti testituloksiin. Erityisesti ensimmäisenä testattujen näytteiden tulokset saattavat olla tutkijan sisäisen harhan vääristämiä, sillä värireaktioiden arviointiasteikko (1–3) hahmottui lopulliseen muotoonsa vasta sitä mukaan, kun testaukset etenivät.

Tutkimuksen aikana käytössä oli mekaanisia pipettejä. Vaikka pipettiin pyrittiin säätämään oikea tilavuus, on mahdollista, että tilavuus on ollut epätarkka. Esimerkiksi pipetin kärkeen on saattanut päästä ilmakuplia, jolloin pipetoitu tilavuus on ollut haluttua pienempi. On myös mahdollista, ettei pipetti ole toiminut ideaalisesti, jolloin pipetointitilavuus on ollut tutkijasta riippumattomien tekijöiden takia epätarkka. Toisaalta suurempien näytevolyyymien käytön olisi pitänyt kompensoida nämä tilanteet.

4.4 Yhteenveto

Tässä työssä käytetyt serologiset menetelmät mittaavat seeruminäytteistä todennäköisesti eri asioita. Molemmat testit perustuvat HPV16L1-vasta-aineisiin, mutta Luminex-pohjaisessa testissä antigeeninä on L1-peptidi, kun taas Prevo-Check-testissä antigeeninä toimii koko L1-proteiini viruksenkaltaisena partikkelina. Aikaisemman kirjallisuuden perusteella Luminex-pohjaisella testillä mitattu HPV-serologia korreloi huonosti HPV-infektion kliiniseen kuvaan. Toistaiseksi ei ole julkaistua tietoa Prevo-Check-testillä osoitetun HPV-serologian korrelaatiosta HPV-infektion kliiniseen tautitilaan, mutta alustavien tulosten perusteella testillä on voitu osoittaa HPV-tiitterien lasku HPV16-positiivisten pään ja kaulan alueen syöpien hoidon jälkeen.

Mahdollista on, että Prevo-Check-testi tunnistaa positiivisiksi ainoastaan ne näytteet, jotka sisältävät HPV-DNA:ta. Vaikka HPV:n kohdesolukkona on pidetty ainoastaan epiteelisoluja,

viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että virus voi infektoida myös osaa verisoluista (Chen ym. 2009).

On myös mahdollista, että Prevo-Check tunnistaa positiiviseksi vain ne näytteet, joissa vallitsee samanaikaisesti sekä suun että genitaalialueen HPV-infektio. Mikäli Prevo-Check-testi ei ota huomioon potilaan aiemmin sairastamia sukupuolitauteja, vaan toteaa seropositiivisuuden ainoastaan testin tekohetkellä vallitsevissa kliinisesti relevanteissa infektioissa eli produktiivisissä ja kroonisissa HPV16-infektioissa, sillä olisi suuri merkitys HPV-tartunnan diagnosoinnissa ja leviämisen ehkäisyssä. HPV-infektion diagnosointi Prevo-Check-testillä edellyttää kuitenkin pikatestin jatkokehittämistä sekä menetelmän selektiivisyyden ja herkkyuden lisätutkimusta.

LÄHTEET

- Arbyn M, Snijders P, Meijer C, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan B, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21:817-26.
- Arney A, MT (ASCP), Bennett KM, PhD, MB (ASCP). Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. *J Lab Med.* 2010; 41:523-530.
- Assadollahi S, Reiningger C, Palkovits R, Pointl P, Schalkhammer T. From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay. *Sensors.* 2009; 9:6084-6100.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:796-802.
- Carter JJ, Galloway DA. Humoral immune response to human papillomavirus infection. *Clin Dermatol.* 1997; 15:249-59.
- Castle PE, Dockter J, Giachetti C, Garcia FA, McCormick MK, Mitchell AL, Holladay EB, Kolk DP. A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:2599-2605.
- Chen AC, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA, Antonsson A. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol.* 2009; 81:1792-6.
- Cobas® HPV Test. <http://molecular.roche.com/assays/Pages/cobasHPVTest.aspx> (Viitattu 30.6.2015).
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324:17-27.
- de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013; 445:2-10.
- Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among Men: A systematic Review of the literature. *J Infect Dis.* 2006; 194:1044-1057.
- ELISA Principle Basis and Extension. <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle> (Viitattu 18.7.2015).
- From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay. <http://www.elisa-antibody.com/mdpi.com/1424-8220/9/8/6084>. (Viitattu 5.7.2015).
- Giuliano AR, Lu B, Nielson CM, Flores R, Papenfuss MR, Lee JH, Abrahamsen M, Harris RB. Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis.* 2008; 198:827-835.
- Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Markowitz LE, Smith D, Harris RB. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J Infect Dis.* 2007; 196:1146-1152.
- Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, Burchell AN, de Sanjose S, Kjaer SK, Muñoz N, Schiffman M, Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine.* 2008; 26 Suppl 10:K17-28.
- Hakama M, Hristova L. Effect of screening in the Nordic cancer control up to the year 2017. *Acta Oncol.* 1997; 36:119-128.

- Hippeläinen M, Syrjänen S, Koskela H, Pulkkinen J, Saarikoski S, Syrjänen K. Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: A study on Finnish conscripts. *Sex Transm Dis.* 1993; 20:321-328.
- Kellokoski J, Syrjänen S, Yliskoski M, Syrjänen K. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. *J Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7:19-23.
- Kero K. 2014. Outcome of human papillomavirus infection among men in the Finnish Family HPV Study. Turku, Turun yliopisto
- Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes in male genitalia and their concordance among pregnant spouses participating in the Finnish Family HPV study. *J Sex Med.* 2011; 8:2522-2531.
- Koskimaa H, Paaso A, Welters MJ, Grénman SE, Syrjänen K, van der Burg SH, Syrjänen S. Human papillomavirus 16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses in children and their mothers who developed incident cervical intraepithelial neoplasia during a 14-year follow-up of the Finnish family HPV cohort. *J Transl Med.* 2014; 12:44.
- Koskimaa H, Waterboer T, Pawlita M, Grénman S, Syrjänen K, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes. *J Pediatr.* 2012; 160:837-843.
- Louvanto K, Rautava J, Willberg J, Wideman L, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S. Genotype-specific incidence and clearance of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS ONE.* 2013; 8:e53413.
- Louvanto K, Rintala M, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S. Genotype-specific persistence of genital human papillomavirus (HPV) infections in women followed for 6 years in the Finnish Family HPV Study. *J Infect Dis.* 2010; 202:436-444.
- Louvanto K, Syrjänen KJ, Rintala MA, Grénman SE, Syrjänen SM. Human papillomavirus and predictors of cervical intraepithelial neoplasia among young mothers in a prospective follow-up study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011; 9:167-73. doi: 10.1111/j.1600-0412.2010.01029.x.
- McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, Skegg DC. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: A retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008; 9:425-434.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-527.
- Ngom B, Guo Y, Wang X, Bi D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: A review. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397:1113-1135.
- Nielson CM, Flores R, Harris RB, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Dunne EF, Markowitz LE, Giuliano AR. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:1107-1114.
- Nieminen P. Papillomavirusinfektio. *Terveysportti.* 2013
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.utu.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00309&p_haku=hpv (Viitattu 30.6.2015).

- Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6:21-31.
- Pfister H. Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1984; 99:111-181.
- Prevo-Check® Rapid test for the qualitative detection of antibodies against HPV 16 L1 in whole blood. http://abviris.de/pdf/pc_ifu_GB.pdf (Viitattu 14.4.2016).
- Proteins and Peptides- Re-emergence in Prophylactics and Therapeutics. <http://www.esciencecentral.org/ebooks/advances-in-protein-chemistry/proteins-peptides.php> (Viitattu 17.6.2015).
- Puranen M, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjänen K, Syrjänen S. Vertical transmission of human papillomavirus from infected mothers to their newborn babies and persistence of the virus in childhood. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174:694-699.
- Puranen MH, Yliskoski MH, Saarikoski SV, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176:1039-1045.
- Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *J Am Dent Assoc.* 2011; 142:905-914.
- Rautava J, Willberg J, Louvanto K, Wideman L, Grénman S, Syrjänen S. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: A six-year follow-up study. *PLoS ONE.* 2012; 7:e42171.
- Rintala M, Grénman S, Puranen M, Isolauri E, Ekblad U, Kero P, Syrjänen S. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol.* 2005; 4:376-381.
- Rintala M, Grénman S, Puranen M, Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol.* 2006; 35:89-94.
- Rintala MA, Louvanto K, Rantanen V, Grénman SE, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk human papillomavirus associated with incident cervical intraepithelial neoplasia developing in mothers in the Finnish Family HPV Study cohort. *Scand J Infect Dis.* 2012 ;44:115-25. doi: 10.3109/00365548.2011.619999.
- Coseo SE, Porras C, Dodd LE, Hildesheim A, Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Jimenez S, Solomon D, Bougelet C, van Doorn LJ, Quint W, Safaeian M. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Evaluation of the polyclonal ELISA HPV serology assay as a biomarker for HPV exposure. *J Sex Transm Dis.* 2011; 38:976–982.
- Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJF, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:504-512.
- Sehr P, Zumbach K, Pawlita M. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods.* 2001; 253:153-162.
- Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus 410/2013
- Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: From infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:1456-1460.
- Suomen Syöpärekisteri. Syöpä Suomessa 2004 ja 2005. Suomen Syöpäyhdistyksen julkaisuja. No. 72. Helsinki: Suomen Syöpäyhdistys 2007.
- Syrjänen K. Annual disease burden due to human papillomavirus (HPV) 6 and 11 infections in Finland. *Scand J Infect Dis Suppl.* 2009a; 107:3-32.

- Syrjänen K. Annual disease burden due to human papillomavirus 16 and 18 infections in Finland. *Scand J Infect Dis Suppl.* 2009b; 108:2-32.
- Syrjänen S, Saastamoinen J, Chang FJ, Ji HX, Syrjänen K. Colposcopy, punch biopsy, in situ DNA hybridization, and the polymerase chain reaction in searching for genital human papillomavirus (HPV) infections in women with normal PAP smears. *J Med Virol.* 1990a; 31:259-266.
- Syrjänen K, Syrjänen S. Histological evidence for the presence of condylomatous epithelial lesions in association with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1981; 43:181-194.
- Syrjänen K, Syrjänen S. 2000. Papillomavirus infections in human pathology. London-Paris: Wiley, 1-615
- Syrjänen S, Termine N, Capra G, Paderni C, Panzarella V, Campisi G. Oral HPV infection: Current strategies for prevention and therapy. *Curr Pharm Des.* 2012; 18:5452-5469.
- Syrjänen K, Yliskoski M, Kataja V, Hippeläinen M, Syrjänen S, Saarikoski S, Ryhänen A. Prevalence of genital human papillomavirus infections in a mass-screened Finnish female population aged 20-65 years. *Int J STD AIDS.* 1990b; 1:410-5.
- Syrjänen S, Waterboer T, Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Grenman S, Pawlita M. Oral human papillomavirus infection in men might contribute to HPV serology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:237-45.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:342-50.