



Aalto-yliopisto  
Kemian tekniikan  
korkeakoulu

Kemian tekniikan korkeakoulu  
Kemian tekniikan koulutusohjelma

Lotta Virtanen

**KVALITATIIVISTEN *RUBELLA* IGG- JA *RUBELLA* IGM -ENTSYYMI-  
IMMUNOMENETELMIEN OPTIMOINTI JA MODIFIOINTI  
KVANTITATIIVISEEN MUOTOON**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-insinöörin  
tutkintoa varten Espoossa 18.4.2016.

Valvoja

Professori Katrina Nordström

Ohjaaja

FM Antti Kokkonen

---

**Tekijä** Lotta Virtanen

---

**Työn nimi** Kvalitatiivisten *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -entsyymi-immunomenetelmien optimointi ja modifiointi kvantitatiiviseen muotoon

---

**Laitos** Biotekniikan ja kemian tekniikan laitos

---

**Professori** Soveltava mikrobiologia

**Professuurikoodi** Kem-30

---

**Työn valvoja** Professori Katrina Nordström

---

**Työn ohjaaja(t)/Työn tarkastaja(t)** FM Antti Kokkonen

---

**Päivämäärä** 18.4.2016

**Sivumäärä** 81 + 10

**Kieli** Suomi

---

### Tiivistelmä

Vihurirokko on *Rubella*-viruksen aiheuttama infektio tauti. Terveelle aikuiselle tauti on pääsääntöisesti vaaraton. Raskauden aikana sairastettu vihurirokko voi kuitenkin aiheuttaa sikiövaurioita, joista voi seurata syntymättömälle vauvalle vakavia kehitysvammoja. Taudin tunnistamiseen on kehitetty erilaisia diagnostisia testimenetelmiä. Tässä työssä modifioitiin jo olemassa olevista kvalitatiivisista *Rubella*-viruksen IgG- sekä IgM-luokan vasta-aineita tunnistavista entsyymi-immunomenetelmistä kvantitatiiviset testiversiot sekä optimoitiin jo olemassa olevia kvalitatiivisia testejä. Tavoitteena oli saada valmiiksi testit, joiden avulla vasta-aineiden määrän muutosta potilaassa pystyttäisiin seuraamaan. Lisäksi tavoitteena oli saada parannettua jo olemassa olevien testien erottelukykyä.

Testien optimointi aloitettiin vertailemalla adsorptiokyvyiltään erilaisia kuoppalevytyyppejä. Tämän jälkeen testattiin kuoppalevyjen päällystykseen käytettäviä kahden eri antigeenitoimittajan *Rubella*-virusantigeenejä. Päällystysantigeenin valinnan jälkeen verrattiin erilaisten blokkauksen menetelmien vaikutusta epäspesifisten sitoutumiskohtien peittämisessä. Lopuksi valmistettiin *Rubella* IgG -testille kalibraattorisarja ja *Rubella* IgM -testille kolme eritasoista kontrollia ja testattiin testien toimivuutta erilaiset tilastollisen testien avulla.

Testien optimoinnin jälkeen erityisesti *Rubella* IgM -testin erottelukyky parani entiseen testiversioon nähden. Tuotekehitysvaiheen alustavien testausten perusteella voitiin todeta, että molemmat testit toimivat optimoinnin jälkeen halutulla tavalla. IgM-testin kohdalla ei ehditty selvittää, mistä testin huono korrelaatio muiden valmistajien vastaavien testien kanssa johtui. Muutoin testit ovat valmiita tuotannossa tehtäviin testien validointivaiheisiin.

---

**Avainsanat** Vihurirokko, *Rubella*, ELISA, vasta-aine, menetelmäkehitys

---

---

**Author** Lotta Virtanen

---

**Title of thesis** Optimization and modification of qualitative *Rubella* IgG and *Rubella* IgM enzyme immunoassays into quantitative test formats

---

**Department** Department of Biotechnology and Chemical technology

---

**Professorship** Applied microbiology

---

**Code of professorship** Kem-30

---

**Thesis supervisor** Professor Katrina Nordström

---

**Thesis advisor(s) / Thesis examiner(s)** M.Sc. Antti Kokkonen

---

**Date** 18.4.2016

---

**Number of pages** 81 + 10    **Language** Finnish

---

### Abstract

Rubella is an infectious disease caused by the *Rubella*-virus. For healthy adults the disease is most often harmless. Rubella infection during pregnancy may however cause fetal damages and the unborn baby may develop serious birth defects. Several different laboratory tests have been developed to diagnose *Rubella*-virus infections. In this master's thesis, the already existing qualitative enzyme-linked immunosorbent assays for *Rubella*-virus IgG and IgM antibodies were optimized and modified into quantitative test formats. The aim was to develop tests by which the changes in antibody concentrations in patient could be monitored. In addition the aim was to improve the sensitivities of the current qualitative assays.

The optimization of the assays was started by comparing different microtiter plate types. After that two different *Rubella*-virus coating antigens from two different antigen distributors were compared. Following this comparison different blocking procedures were compared to prevent nonspecific binding. Finally a calibrator set for the Rubella IgG assay and three different controls for the Rubella IgM assay were prepared. The test performance was tested with various statistical data analysis.

Subsequent to the optimization of the assays especially the sensitivity of the Rubella IgM assay was improved compared to the previous test version. Based on the preliminary tests performed in the research and development phase it can be stated that the performance of both assays after the optimization was as desired. The reason for the poor correlation between the in-house IgM assay and competitors IgM assays remains to be solved. Otherwise the assays are ready to be transferred into the validation phase.

---

**Keywords** *Rubella*, ELISA, antibody, method development

---

## **ALKUSANAT**

Tämä diplomityö tehtiin AniLabsystems Ltd. Oy:n (nyk. Labsystems Diagnostics Oy) Orgenium Laboratories -yksikölle keväällä 2014. Haluan kiittää työni ohjaajaa Antti Kokkosta neuvoista ja ohjauksesta työni aikana. Kiitos myös esimiehelleni Niina Kivelle sekä kollegalleni Leena Kaikkoselle diplomityön kommentoinnista työn aikana.

Diplomityöni valvojaa professori Katrina Nordströmiä kiitän kärsivällisyydestä ja hyvistä ohjeista diplomityön aikana.

Espoossa 18.4.2016

Lotta Virtanen

## Sisällysluettelo

1	Johdanto .....	1
2	<i>Rubella</i> -virus .....	2
2.1	Viruksen elinkaari .....	2
2.2	<i>Rubella</i> -viruksen proteiinit .....	4
3	Vihurirokko .....	5
3.1	Taudin historia.....	5
3.2	Taudin eteneminen ja oireet.....	6
3.2.1	Syntymän jälkeen saatu vihurirokkoinfektio.....	6
3.2.2	Synnyttäminen vihurirokko-oireyhtymä.....	7
3.3	Vihurirokkorokote .....	8
4	Vasta-aineet .....	10
4.1	Vasta-aineluokat.....	11
4.1.1	IgG-luokan vasta-aineet .....	11
4.1.2	IgM-luokan vasta-aineet .....	12
4.1.3	IgA-luokan vasta-aineet.....	13
4.1.4	IgE-luokan vasta-aineet.....	13
4.1.5	IgD-luokan vasta-aineet .....	14
5	Virusinfektioiden immunologia .....	14
5.1	Luontainen immuunipuolustus virusinfektiossa .....	15
5.2	Opittu immuunipuolustus virusinfektiossa .....	16
6	Vihurirokon diagnostiikka .....	18
6.1	IgM-luokan vasta-aineita tunnistavat testit.....	19
6.1.1	Epäsuora ELISA-testi IgM-luokan vasta-aineille .....	19
6.1.2	IgM-kaappaus-ELISA.....	21
6.2	IgG-luokan vasta-aineita tunnistavat testit.....	23
6.2.1	Epäsuora ELISA-testi IgG-luokan vasta-aineille .....	23

6.2.2	IgG-aviditeettitestit .....	23
7	ELISA-testin optimoinnin päävaiheet .....	24
7.1	Mikroitiitterilevyn ja päällystysproteiinin valinta .....	24
7.2	Epäspesifisten sitoutumiskohtien peittäminen .....	24
7.3	Reagenssipitoisuuksien optimointi .....	25
7.4	Stressitestit.....	26
7.5	Toistettavuustestit .....	27
	TUTKIMUSOSA .....	29
8	Työn tarkoitus ja tavoitteet .....	29
9	Materiaalit ja menetelmät.....	30
9.1	Käytetyt näytteet.....	30
9.2	Standardi ja kontrolli .....	32
9.3	Käytetyt reagenssit.....	32
9.4	TORCH-tuoteryhmän ELISA-testin suoritusperiaate .....	32
9.5	Kuoppalevyn päällystäminen antigeenillä .....	33
9.6	Mikroitiitterilevyn valitseminen ja antigeenien vertailu.....	34
9.7	Blokkausmenetelmien vertailu .....	35
9.8	Päällystysantigeenin pitoisuuden sekä konjugaattipitoisuuden optimointi.....	36
9.9	Kalibraattoriseerumien sekä kontrolliseerumien valinta.....	38
9.10	Referenssinäytepaneelien kokoaminen.....	38
9.11	Protoerillä tehdyt testaukset .....	39
9.11.1	Testin sisäinen toistettavuus.....	39
9.11.2	Testisarjojen välinen toistettavuus .....	40
9.11.3	Näytelaimennosten lineaarisuus.....	40
9.11.4	Stressitestit.....	41
9.11.5	Vertailu kilpailijoiden ELISA-testien kanssa.....	41
10	Tulokset ja tulosten tarkastelu .....	42
10.1	Mikroitiitterilevyn valinta.....	42

10.2	Päällystysantigeenien vertailu IgM-testillä .....	45
10.3	Blokkausmenetelmien vertailu .....	46
10.4	Päällystysantigeenin pitoisuuden sekä konjugaatin pitoisuuden optimointi .....	49
10.5	Kalibraattorit ja kontrollit.....	51
10.6	Referenssinäytepaneelit.....	55
10.7	Protoerillä tehdyt testaukset .....	56
10.7.1	Toistettavuustestaukset .....	56
10.7.2	Näytelaimennosten lineaarisuus.....	58
10.7.3	Stressitestin tulokset.....	61
10.7.4	Vertailu kilpailijoiden Rubella IgG- ja Rubella IgM -testien kanssa.....	65
11	Johtopäätökset .....	71
12	Yhteenveto.....	75
13	Lähteet .....	77

## LIITTEET

Liite 1. Blokkauksen menetelmien vertailu IgG-testillä

Liite 2. Blokkauksen menetelmien vertailu IgM-testillä

Liite 3. Konjugaattipitoisuuden ja antigeenipitoisuuden optimointi IgG-testillä

Liite 4. Konjugaattipitoisuuden ja antigeenipitoisuuden optimointi IgM-testillä

## Lyhenneluettelo

<b>4PL</b>	<i>Four parametric logistic model</i> , Neljän parametrin logistinen malli
<b>APC</b>	<i>Antigen-presenting cell</i> , Antigeeniä esittelevä solu
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Naudan seerumin albumiini
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Yhdysvaltojen tartuntatautien valvonta- ja ehkäisykeskukset
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMV</b>	<i>Cytomegalovirus</i> , Sytomegalovirus
<b>CRS</b>	<i>Congenital Rubella Syndrome</i> , Synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä
<b>CV</b>	<i>Coefficient of variation</i> , Variaatiokerroin
<b>EIU</b>	<i>Enzyme-immunoassay unit</i> , Entsyymi-immunologinen yksikkö
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Entsyymi-immunologinen määrittäminen
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallizable</i> , Vasta-aineen kiteytyvä osa
<b>FcRn</b>	<i>Neonatal Fc receptor</i> , Vastasyntyneen Fc-reseptori
<b>Fab</b>	<i>Fragment antigen binding</i> , Vasta-aineen antigeeniin sitoutuva osa
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> , Ihmisen immunipuutosvirus
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Piparjuuriperoksidaasi
<b>HSV</b>	<i>Herpes simplex -virus</i>
<b>IgA</b>	<i>Immunoglobulin A</i> , Immunoglobuliini A
<b>IgD</b>	<i>Immunoglobulin D</i> , Immunoglobuliini D



<b>IgE</b>	<i>Immunoglobulin E, Immunoglobuliini E</i>
<b>IgG</b>	<i>Immunoglobulin G, Immunoglobuliini G</i>
<b>IgM</b>	<i>Immunoglobulin M, Immunoglobuliini M</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukin, Interleukiini</i>
<b>MOG</b>	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein, Myeliinin oligodendrosyyttiglukoproteiini</i>
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonucleic acid, Lähetti-ribonukleiinihappo</i>
<b>NCCLS</b>	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standard, Kliinisten laboratoriestandardien kansallinen komitea</i>
<b>NK-solu</b>	<i>Natural Killer cell, Luonnollinen tappajasolu</i>
<b>OD</b>	<i>Optical density, Optinen tiheys eli absorbanssi</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline, Fosfaattipuskuri</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerized chain reaction, Polymeraasiketjureaktio</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid, Ribonukleiinihappo</i>
<b>S/CO</b>	<i>Signal per cut off</i>
<b>SD</b>	<i>Standard deviation, Keskihajonta</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor, Tollin kaltainen reseptori</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha, Tuumorinekroositekijä alfa</i>
<b>TORCH-infektiot</b>	<i>Infektiot, joiden aiheuttajina ovat <i>Toxoplasma gondii</i> alkueläin, <i>Rubella-virus</i>, <i>Cytomegalovirus</i> ja <i>Herpes simplex –virus</i></i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization, Maailman terveysjärjestö</i>

## 1 Johdanto

TORCH-infektioiksi kutsutaan *Toxoplasma gondii* -alkueläimen, *Rubella*-viruksen, Sytomegaloviruksen (CMV) sekä *Herpes simplex* -virusten (HSV) aiheuttamia mikrobi-infektioita. TORCH-infektiot eivät pääsääntöisesti aiheuta aikuisille perusterveille henkilöille vaarallisia infektioita, mutta raskauden aikana sairastettuna ne saattavat aiheuttaa sikiövaurioita. Pahimmillaan raskauden aikana sairastetusta TORCH-infektiosta voi aiheutua lapselle pysyvä vammautuminen.

TORCH-infektioiden diagnosoinnissa on perinteisesti käytetty potilaan oireiden tulkittamisen lisäksi erilaisia serologisia testejä. IgG-luokan vasta-aineita tunnistavilla testeillä voidaan havaita vanhat, jo sairastetut infektiot. IgM-luokan vasta-aineita tunnistavilla testeillä puolestaan voidaan havaita akuutissa vaiheessa olevat infektiot. IgM-testit ovatkin tärkeässä asemassa, kun raskaana olevilta oireilevilta potilailta seulotaan mahdollisia taudinaiheuttajia. IgM-testien herkkyyksissä on kuitenkin eroja, eikä negatiivinen testituloks välttämättä sulje kokonaan pois infektion mahdollisuutta. Erilaisten molekyylibiologiaan perustuvien menetelmien myötä myös infektioiden diagnosoinnin herkyys ja spesifisyys on parantunut huomattavasti. Esimerkiksi PCR-menetelmään perustuvat testit ovat yleistyneet viimeisen kymmenen vuoden aikana merkittävästi.

Vaikka serologisten testien merkitys diagnostiikassa onkin vähentynyt molekyylibiologiaan perustuvien testien yleistyttyä, ovat ne silti edelleen laajalti käytössä eri testauslaboratorioissa. Molekyylibiologiset menetelmät eivät kykene tunnistamaan jo sairastettua infektiota, toisin kuin IgG-luokan vasta-aineita tunnistava serologinen testi. Lisäksi esimerkiksi kehitysmaissa kalliiden PCR-laitteiden hankinta ja puhdistilojen toiminta voi olla taloudellisesti mahdotonta.

## 2 *Rubella*-virus

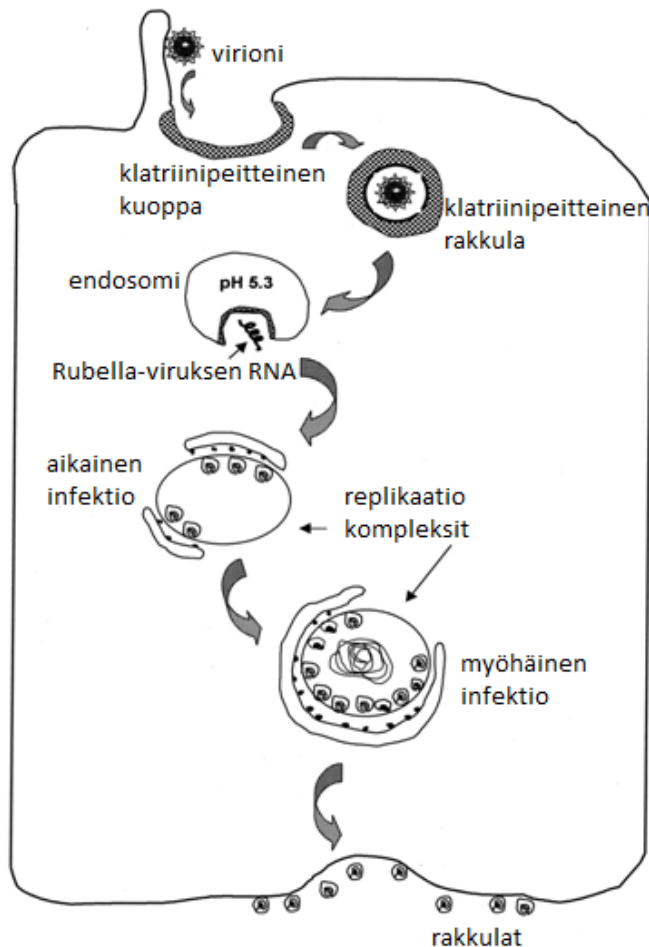
*Rubella*-virus on RNA-virus ja se kuuluu ainoana viruksena Rubivirusten sukuun. Rubivirukset, yhdessä alfavirusten kanssa, puolestaan kuuluvat *Togaviridae*-virusheimoon. Alfavirukset voivat tarttua ihmiseen niveljalkaisten välityksellä, mutta *Rubella*-virus tarttuu ainoastaan ihmisestä toiseen. Ihminen onkin tiettävästi *Rubella*-viruksen ainoa mahdollinen isäntä. Koska alfaviruksilla ja *Rubella*-viruksella on hyvin samankaltainen geneettinen rakenne ja koska *Rubella*-virusten viljely on alfavirusten viljelyä vaikeampaa, on useat *Rubella*-viruksia koskevat päätelmät itse asiassa tehty tutkimalla alfaviruksia. (Chen ja Icenogle 2007)

*Rubella*-viruksen virionit ovat 70 nm halkaisijaltaan olevia pyöreitä partikkeleita. Viruksen nukleokapsidia ympäröi kahta eri glykoproteiinia, E1 ja E2, sisältävä lipidivaippa. Nukleokapsidi koostuu kapsidiproteiinista (C-proteiini) ja se sisältää yksijuosteisen, noin 10 kiloemäksen pituisen, RNA-molekyylin. *Rubella*-viruksella RNA-genomi on polaarisuudeltaan positiivinen eli juostetta voidaan sellaisenaan käyttää translaatiossa. (White ja Fenner 1994; Chen ja Icenogle 2007).

### 2.1 Viruksen elinkaari

*Rubella*-viruksen tunkeutuminen isäntäsolun sisään tapahtuu kuvan 1 mukaisesti klatriinivälitteisellä endosytoosilla (Chen ja Icenogle 2007; Lee ja Bowden 2000). Klatriinivälitteinen endosytoosi on yleisin endosytoosin muoto. Siinä viruspartikkelin kohdatessa tietyn kohdesolun reseptorin, alkaa isäntäsolun solukalvolle muodostua kuoppa, joka on solun sisäpuolelta klatriinimolekyylien peittämä. Lopulta muodostuneet kuopat kuroutuvat irti isäntäsolun sisäpuolelle muodostaen viruspartikkelin sisältävän rakkulan. Rakkulan muodostuminen on monivaiheinen prosessi, johon osallistuu yhteensä

yli 50 erilaista proteiinia (Lee ja Bowden 2000). Rakkulan muodostumisen jälkeen klatriinikuori poistetaan. (Takei ja Haucke 2011)



Kuva 1. Rubella-viruksen replikoituminen isäntäsolun sisällä. (Lee ja Bowden 2011, muokattu)

*Rubella*-viruksen kiinnittyminen isäntäsolun solureseptoreihin tapahtuu oletettavasti lipidivaipalla sijaitsevien glykoproteiinien E1 ja E2 välityksellä. Toistaiseksi ei ole olemassa tarkkaa tietoa siitä, mitä reseptoreita virus käyttää tunkeutuessaan kohdesoluun (Chen ja Icenogle 2007; Lee ja Bowden 2000). Cong *et al.* (2011) osoittivat, että myeliinin

oligodendrosyyttiglykoproteiini (MOG) sitoutuu spesifisesti *Rubella*-viruksen E1-glykoproteiiniin. Oletettavasti MOG-reseptori olisi yksi mahdollisista reseptoreista, joita virus hyödyntää. On kuitenkin mahdollista, että virus käyttää myös muita reseptoreita tunkeutuessaan esimerkiksi eri kudostyyppien soluihin.

Kalvofuusion seurauksena virus menettää kapsidia suojaavan vaippansa. Jäljelle jäävän endosomin alhainen pH-arvo saa aikaan muutoksia *Rubella*-viruksen kapsidiproteiinissa. Kapsidiproteiinissa tapahtuvat muutokset puolestaan oletettavasti puoltavat kuoriutumisprosessia eli genomisen RNA:n vapautumista sytoplasmaan. Lisäksi endosomin alhainen pH edesauttaa virionin fuusioitumista endosomin membraanin kanssa. (Lee ja Bowden 2000)

## **2.2 *Rubella*-viruksen proteiinit**

*Rubella*-viruksen genomissa on rakenteellisten proteiinien, E1:n, E2:n ja C:n, lisäksi koodit kahdelle ei-rakenteelliselle proteiinille, p150:lle ja p90:lle. Näitä proteiineja tarvitaan viruksen monistuksessa eli replikaatiossa sekä transkriptiossa. Viruksen tunkeuduttua isäntäsoluun sen nukleokapsidi vapautuu isäntäsolun sytoplasmaan ja viruksen RNA alkaa toimia mRNA:na ei-rakenteellisten proteiinien, p150 ja p90, translaatiossa. Proteiinit p150 ja p90 puolestaan yhdessä toimivat replikaasina eli entsyyminä, joka katalysoi monistumista, kun positiivijuosteisesta RNA-genomista valmistetaan negatiivijuosteinen templaatti-RNA. Negatiivijuosteinen RNA toimii templaattina sekä uudelle genomiselle RNA:lle, että niin kutsutulle subgenomiselle RNA:lle, josta puolestaan translaatiossa saadaan muodostettua rakenteelliset proteiinit E1, E2 ja C. (Ilkow *et al.* 2010; Chen ja Icenogle 2007)

Glykoproteiineja E1 ja E2 on tutkittu paljon. Ne esiintyvät heterodimeerisauvoina viruksen vaipalla. E1-proteiinilta on löydetty yhteensä kuusi epitooppia eli rakenneosaa, jonka

vasta-aine kykenee tunnistamaan. E1-proteiini vaikuttaakin olevan merkittävämmässä asemassa isäntäsolun reseptoreihin sitoutumisessa. Toistaiseksi E2-proteiinilla ei ole havaittu kykyä sitoutua isäntäsolun reseptoreihin. (Chen ja Icenogle 2007)

### **3 Vihurirokko**

#### **3.1 Taudin historia**

*Rubella*-viruksen aiheuttaman vihurirokon historia ulottuu aina 1700-luvulle asti. Vihurirokon oletettiin ensin pitkään olevan samankaltainen kuin muita iho-oireita aiheuttavat taudit, kuten tuhkarokko ja tulirokko. Kansainvälinen lääketieteen kongressi tunnisti v. 1881 vihurirokon kuitenkin erilliseksi taudiksi. Tällöin vihurirokon ei kuitenkaan vielä tiedetty aiheuttavan mahdollisia kehityshäiriöitä sikiölle sairastettaessa raskauden aikana. (Banatvala ja Brown 2004)

Vuonna 1940 Australiassa puhkesi vihurirokkoepidemia. Australian osallistuminen toiseen maailmansotaan edisti epidemian leviämistä myös sellaisille alueille, jotka olivat pysyneet eristyksessä taudilta. Vuonna 1941 australialainen lääkäri Norman Gregg kollegoineen havaitsi, että puolen vuoden sisällä useilla vauvoilla oli esiintynyt synnynnäistä kaihia ja synnynnäistä sydänvikaa. Gregg päätteli, että epätavallisen korkealla kaihi- ja sydänvikatapausten määrällä oli jokin yhteinen tekijä. Haastattelututkimusten avulla selvisi, että 68 tapauksessa 78:sta äiti oli varmuudella sairastanut vihurirokon raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana. (Webster 1998)

*Rubella*-virus eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1962. Vuonna 1963 Euroopassa levisi vihurirokkoepidemia ja vuosina 1964–1965 epidemia levisi myös Yhdysvaltoihin. Arviolta 1,8 miljoonaa ihmistä sairastui tuolloin vihurirokkoon ja 30 000 vastasyntyneellä todettiin

synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä (Webster 1998, Best 1991). Vihurirokko aiheuttaa synnynnäistä vihurirokko-oireyhtymää (CRS), jonka oireita kaihin lisäksi ovat muun muassa kuulon heikentyminen sekä kehitysvammaisuus. (Duszak 2009; Webster 1998)

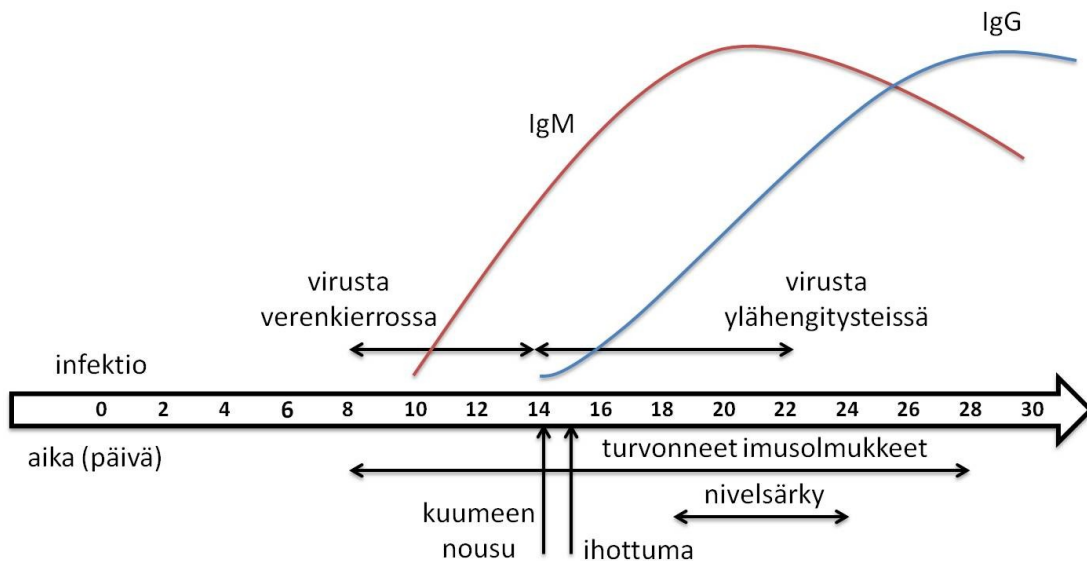
Ensimmäinen vihurirokkorokote lisensoitiin Yhdysvalloissa vuonna 1969. Rokotteen ilmestymisen jälkeen synnynnäisen vihurirokko-oireyhtymän tapaukset ovat kääntyneet laskuun maissa, joissa rokote on otettu mukaan kansalliseen rokoteohjelmaan. (Duszak 2009)

## **3.2 Taudin eteneminen ja oireet**

### **3.2.1 Syntymän jälkeen saatu vihurirokkoinfektio**

Vihurirokko on terveelle ihmiselle pääsääntöisesti vaaraton tauti. Taudin oireita ovat laukkaan ihottuman lisäksi lievä kuume, päänsärky, huonovointisuus sekä nuha. Vihurirokkoinfektion eteneminen on esitetty kuvassa 2. Lapsilla tauti on usein oireeton. Vihurirokon oireet ovat samankaltaiset kuin tuhkarokossa ja tauti voidaankin oireiden perusteella helposti sekoittaa tuhkarokkoon. Vihurirokko tarttuu ihmisestä toiseen yleensä pisaratartuntana. (Mushahwar 2007; McLean *et al.* 2012)

Vihurirokon itämisaika vaihtelee kymmenestä päivästä 21 päivään ja keskimääräinen itämisaika on 18 päivää. Tauti on tarttuvimmillaan ihottuman puhjetessa, mutta se voi tarttua ihmisestä toiseen myös seitsemän päivää ennen ja jälkeen ihottuman ilmenemisen. Ihottuma katoaa, kun IgG-luokan vasta-aineita alkaa muodostua ja viruksen määrä verenkierrossa vähenee. IgM-luokan vasta-aineiden muodostuminen alkaa IgG-luokan vasta-aineiden muodostumista aikaisemmin, jo noin kymmenennen päivän kohdalla infektion alkamisesta, kuten kuvasta 2 voidaan havaita. (Banatvala ja Brown 2004)



Kuva 2. Vihurirokkoinfektion eteneminen ja vasta-aineiden muodostuminen (Banatvala ja Brown 2004, muokattu)

### 3.2.2 Synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä

Raskauden aikana sairastettu vihurirokko voi johtaa vastasyntyneen vihurirokko-oireyhtymään. Synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä voi aiheuttaa lapselle vakavia vammoja, kuten kaihia, synnynnäistä sydänvikaa, kuulon heikentymistä, kehitysvammaisuutta sekä kehityksen yleistä viivästymistä. Kuulon heikentyminen on yleisin synnynnäisen vihurirokko-oireyhtymän oireista. Äidin sairastuttua vihurirokkoon raskauden aikana on keskenmenon sekä kuolleena syntymisen riski tavallista korkeampi. (Mushahwar 2007)

Aikuisiällä synnynnäisen vihurirokon aiheuttamia sairauksia ovat mm. aikuisiän diabetes, retinopatia eli silmän verkkokalvon sairaus sekä glaukooma eli silmänpainetauti. Lisäksi 20 %:lla synnynnäisen vihurirokko-oireyhtymän potilaista on todettu myöhemmällä iällä kilpirauhasen vajaatoimintaa sekä 5 %:lla erilaisia neurologisia oireita. Lisää tutkimuksia



kuitenkin tarvitaan, jotta erityisesti aikuisiän sairauksien riskeistä saataisiin enemmän tietoa. (Santis *et al.* 2006)

Sikiön kannalta riski saada synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä on suurimmillaan raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana (Mushahwar 2007; Webster ja Fenner 1998). Äidin virusinfektion seurauksena virus ehtii tunkeutua useisiin eri kudoksiin ennen täydellisen immuunivasteen muodostumista. Istukan kautta virus pääsee lopulta infektoimaan myös sikiön. Koska sikiön oma immuunijärjestelmä ei ole vielä tarpeeksi kehittynyt raskauden ensimmäisellä kolmanneksella, joutuu se turvautumaan äidiltä istukan kautta tuleviin IgG-luokan vasta-aineisiin. Istukan kautta tulevien vasta-aineiden määrä on raskauden alussa vain noin 5-10 % äidin vasta-aineiden määrästä, mutta määrä kasvaa koko ajan raskauden edetessä. Raskauden toisella kolmanneksella synnynnäisen vihurirokko-oireyhtymän riski onkin jo huomattavasti matalampi sikiön kehittyneemmän immuunijärjestelmän sekä istukan kautta tulevan lisääntyneen vasta-ainemäärän johdosta. (Webster ja Fenner 1998)

Vuosittain maailmanlaajuisesti yli sadalla tuhannella vastasyntyneellä todetaan synnynnäinen vihurirokko-oireyhtymä. Tapaukset ovat yleisempiä kehitysmaissa, joissa vihurirokkorokotetta ei toistaiseksi ole otettu laajamittaiseen rokotusohjelmaan. Kehittyneimmissä maissa vihurirokkotartunnat ovatkin vähentyneet merkittävästi vihurirokkorokotteen myötä (Robertson *et al.* 2003). Syndroomaa esiintyy kuitenkin aika ajoin myös kehittyneissä maissa esimerkiksi maahanmuuttajaväestön keskuudessa.

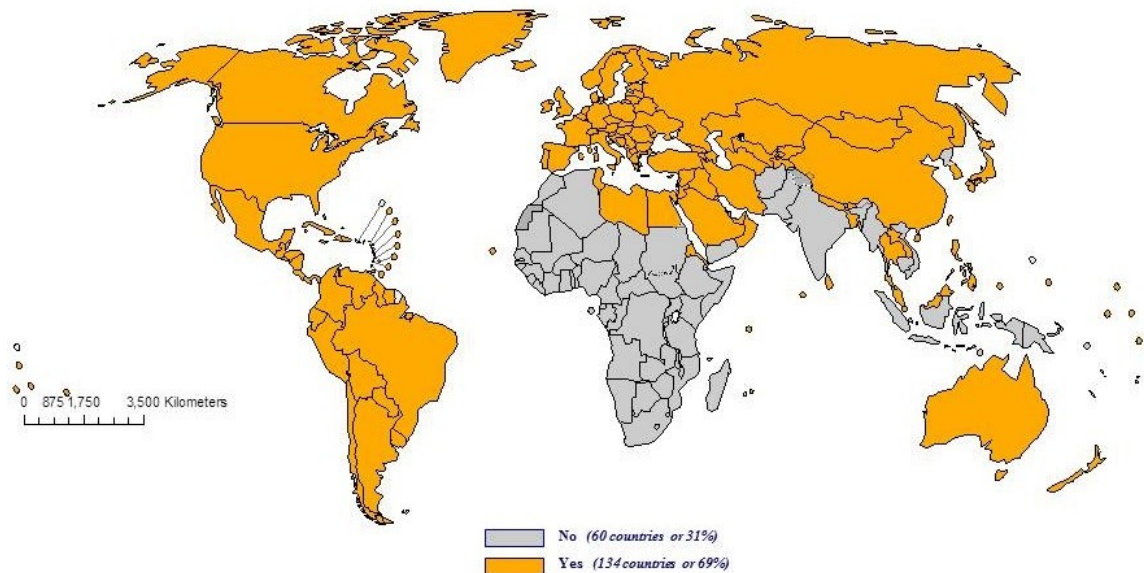
### **3.3 Vihurirokkorokote**

Vihurirokkorokotteiden kehitys alkoi, kun virus eristettiin ensimmäistä kertaa 1960-luvun alussa vain muutamaa vuotta ennen vihurirokkoepidemian puhkeamista Yhdysvalloissa vuosina 1963–1965. Epidemian seurauksena aloitettiin useassa eri tutkimusryhmässä

vihurirokkorokotekehitykset. Ensimmäiset rokotekehitykset olivat inaktivoituja virusrokotteita, jotka kuitenkin nopeasti osoittautuivat tehottomiksi (Plotkin 2006).

Elävä heikennetty virusrokote sen sijaan osoittautui toimivaksi ja vuosina 1969–1970 Yhdysvalloissa lisensoitiin kolme eri vihurirokkorokotetta, HPV-77:DE-5 Meruvax, HPV-77:DK-12 Rubelogen sekä GMK-3:RK53 Cendevax. Vuonna 1979 lisensoitiin RA 27/3 -kanta sisältävä vihurirokkorokote, joka oli tuotettu ihmisen diploidisoluviljelmissä ja samalla kaikki muut kannat päätettiin lopettaa. (CDC 2015)

RA 27/3 -rokote on elävä heikennetty virusrokote. Rokote annetaan tavallisesti yhdistelmärokotteena yhdessä sikotautirokotteen ja tuhkarokkorokotteen kanssa. Vuonna 2012 vihurirokkorokote kuului 134 maan rokotusohjelmaan. Rokotusohjelmaan kuuluvat maat on esitetty kuvassa 3.

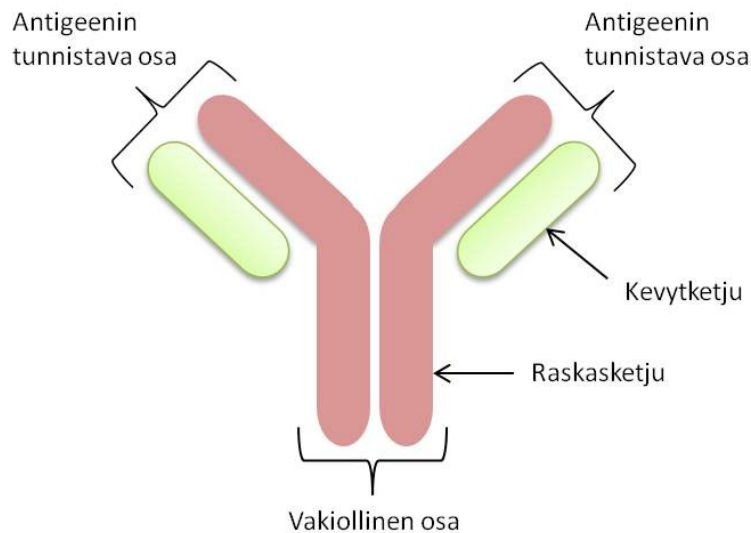


Kuva 3. Maat, joissa vihurirokkorokote kuului kansalliseen rokotusohjelmaan vuonna 2012. (WHO 2013)

## 4 Vasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, joita tuotetaan plasmasoluissa ja ne ovat tärkeässä asemassa elimistön puolustautuessa erilaisia taudinaiheuttajia vastaan. Vasta-aineet tunnistavat tietyn, tavallisesti elimistön ulkopuolisen, vieraan molekyylin eli antigeenin. Antigeeni on tavallisesti elimistön ulkopuolelta tulevan viruksen tai bakteerin pinnan proteiini tai hiilihydraatti. Antigeenin osaa, jonka vasta-aine tunnistaa kutsutaan antigeenideterminantiksi. Vasta-aineen tarttuminen patogeenin eli taudinaiheuttajan pintaan voi estää patogeenin tunkeutumisen isäntäsolun sisään ja siten neutraloida kyseisen antigeenin. (Delves *et al.* 2011)

Vasta-aineet ovat perusrakenteeltaan Y-kirjaimen muotoisia molekyyliä, jotka koostuvat kolmesta osasta; vakiolisesta osasta (Fc) ja kahdesta antigeenejä sitovasta osasta (Fab). Yksinkertaistettu rakennekuva vasta-aineen perusrakenteesta on esitettyä kuvassa 4. Antigeenejä tunnistavat osat ovat identtiset toistensa kanssa. Vasta-ainemolekyylissä on neljä polypeptidiketjua, kaksi ns. raskasketjua ja kaksi kevytketjua. Raskasketjut liittyvät Fc-osan kiinni Fab-osiin. Kevytketjut puolestaan liittyvät ainoastaan Fab-osiin. (Delves *et al.* 2011)



Kuva 4. Vasta-ainemolekyylin rakenne.

#### 4.1 Vasta-aineluokat

Vasta-aineista tunnetaan viisi pääluokkaa; IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. Vasta-aineen perusrakenne eri vasta-aineluokissa on Y-kirjaimen muotoinen molekyyli. Eri luokkien vasta-aineet eroavat toisistaan raskasketjujen perusteella, jotka on nimetty kreikkalaisin symbolein  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  ja  $\epsilon$ . Eri vasta-aineluokat poikkeavatkin toisistaan pääsin Fc-osan osalta. IgG-, IgE- ja IgD-luokkien vasta-aineet esiintyvät monomeereinä eli koostuvat vain yhdestä vasta-aineyksiköstä. IgM-luokan vasta-aineet esiintyvät pentameereinä eli ne koostuvat viidestä Y-kirjaimen muotoisesta yksiköstä. IgA-luokan vasta-aineet sitä vastoin esiintyvät monomeereinä vasta-aineina veressä, mutta dimeereinä limakalvojen eritteissä. (Rodrigo *et al.* 2015)

##### 4.1.1 IgG-luokan vasta-aineet

IgG-vasta-aineiden luokka on yleisin vasta-aineluokka. IgG-luokan vasta-aineiden puoliintumisaika ihmisellä on noin 20 päivää, kun taas muilla vasta-aineluokilla puoliintumisaika on vain muutaman päivän (Rooperian ja Sun 2010). Yleisyytensä vuoksi

se on myös eniten tutkittu vasta-aineluokka. IgG-luokan vasta-aine on neljästä ketjusta koostuva monomeeri, jota tuotetaan erityisesti sekundaarisessa immuunivasteessa. IgG-luokan vasta-aineen Fc-osa sitoutuu makrofagien ja neutrofiilien reseptoreihin. Infektion aikana makrofagien ja neutrofiilien Fc-reseptorit sitoutuvat vasta-aineiden Fc-osiin ja tuhoavat siten ulkopuolisen tunkeutujan, kuten mikrobin, johon puolestaan vasta-aineen Fab-päät ovat sitoutuneet. (Alberts *et al.* 2002)

IgG-luokan vasta-aineet ovat ainoita vasta-aineita, jotka kulkeutuvat raskausaikana äidiltä istukan kautta sikiöön. Äidin istukan soluissa on IgG-luokan vasta-aineen tunnistavia, MHC I -proteiiniluokan, FcRn-reseptoreita (Firan *et al.* 2001). Reseptoreihin sitoutuneet vasta-aineet otetaan ensin endosytoosilla solujen sisään ja kuljetetaan näiden solujen sisällä sikiöön. Lopuksi vasta-aineet vapautetaan eksosytoosissa sikiön vereen. Koska istukan Fc-reseptorit tunnistavat ainostaan IgG-luokan vasta-aineita, muut vasta-aineet eivät pääse kulkeutumaan istukan kautta sikiöön. (Rooperian ja Akilesh 2007)

#### **4.1.2 IgM-luokan vasta-aineet**

IgM-luokan vasta-aineet ovat ensimmäisiä B-lymfosyyteissä tuotettuja vasta-aineita primääri-infektioissa. IgM-luokan vasta-aineet ovat vapaina vasta-aineina pentameerejä eli viidestä Y-kirjaimen muotoisesta neliketjuisesta vasta-aineyksiköstä muodostuneita molekyyliä. Vasta-aineyksiköitä pitää toisissaan kiinni J-ketju. Näin ollen antigeneihin sitoutuvia Fab-osia on yhdellä IgM-luokan vasta-aineella yhteensä kymmenen. IgM-luokan vasta-aineet ovat tehokkaita komplementtijärjestelmän aktivoijia. (Delves *et al.* 2011)

IgM-luokan vasta-aineita esiintyy myös monomeereinä kypsyttömien B-lymfosyyttien pintaproteiineina. Kypsyttömiä B-lymfosyyttejä on jo seitsemän viikon ikäisen sikiön maksassa. Kymmenen viikon ikäisellä sikiöllä IgM-vasta-aineresptorilliset B-lymfosyytit alkavat kehittyä (Gathings *et al.* 1977). Ensimmäiset IgM-luokan vasta-aineita tuottavat

solut ovat B1-lymfosyyttejä, jotka ovat peräisin sikiön maksasoluista. 50 % vastasyntyneen B-lymfosyyteistä on peräisin maksasoluista. B1-lymfosyyttien tuottamat IgM-luokan vasta-aineet muodostuvat ilman ulkopuolista antigeeniärsykettä ja niitä kutsutaankin siksi luonnollisiksi vasta-aineiksi. Syntymän jälkeen vastasyntyneen elimistöön alkaa muodostua myös B2-lymfosyyttejä. B2-lymfosyytit muodostuvat luuytimen hematopoeettisissa kantasoluissa, josta ne kulkeutuvat pernaan ja erilaistuvat. Kohdatessaan antigeenin ja T-auttajasolun B2-lymfosyytti alkaa tuottaa IgM-luokan vasta-aineita. (Klimovich 2011)

#### **4.1.3 IgA-luokan vasta-aineet**

IgA-luokan vasta-aineet ovat yleisiä vasta-aineita erilaisissa eritteissä kuten syljessä, kyynelnesteessä, maidossa sekä hengitysteiden ja suoliston eritteissä. Ne kulkeutuvat limakalvojen epiteelisolukon läpi solun ulkopuolisissa nesteissä erityisen Fc-reseptorin avustamana. Dimeeri IgA-luokan vasta-aine sitoutuu epiteelisolun Fc-reseptoriin ja se otetaan solun sisään reseptorivälitteisessä endosytoosissa. Vasta-aine kuljetetaan epiteelisolukon läpi ja lopulta vapautetaan epiteelisolukon toiselle puolelle eksosytoosissa. (Alberts *et al.* 2002; Woof ja Kerr 2004)

#### **4.1.4 IgE-luokan vasta-aineet**

IgE-luokan vasta-aineet esiintyvät tyypillisesti erittäin pieninä pitoisuuksina seerumissa. Suurin osa IgE-luokan vasta-aineista onkin sitoutuneena syöttösolujen ja basofiilien Fc-reseptoreihin. Antigeenin sitoutuminen syöttösolussa kiinni olevaan IgE-luokan vasta-aineeseen käynnistää immuunipuolustusta auttavan tulehdusreaktion, kun syöttösolut alkavat tuottaa erilaisia sytokiineja sekä biologisesti aktiivisia amiineja (Alberts *et al.* 2002). IgE-luokan vasta-aineet onkin usein liitetty erilaisiin allergioihin. Antigeenejä, jotka saavat aikaan IgE-luokan vasta-ainevasteen, kutsutaan allergeeneiksi. (Delves *et al.* 2011; Janeway *et al.* 2001)

#### 4.1.5 IgD-luokan vasta-aineet

IgD-luokan vasta-aineiden merkitys immuunipuolustuksessa ei ole täysin selvä. Kuten IgM-luokan vasta-aineita, myös IgD-luokan vasta-aineita on B-lymfosyyttien pinnalla monomeereinä reseptorimolekyyleinä. IgD-luokan vasta-aineita esiintyy kuitenkin myös vapaana veressä, limakalvojen eritteissä sekä synnynnäisen immuunijärjestelmän solujen, kuten basofiilien pinnalla (Chen & Cerutti 2011). Vaikka IgD-luokan vasta-aineiden merkitys immuunipuolustuksessa onkin vielä osittain epäselvä, sen kohonneen pitoisuuden veressä on havaittu mm. korreloivan B-solujen aktivoitumisen kanssa (Mizuma *et al.* 1987). Lisäksi veressä oleva IgD-luokan vasta-aine saattaa edistää TNF-alfa- sekä IL-1-sytokiinien tuottoa. (Mizuma *et al.* 1996)

## 5 Virusinfektioiden immunologia

Immuunipuolustusjärjestelmä voidaan jakaa luontaiseen immunitettiin ja opittuun immunitettiin. Luontainen immuunipuolustus käynnistyy heti infektion ilmenemisen jälkeen kun taas opitun immuunipuolustuksen käynnistymiseen voi mennä päiviä tai jopa viikkoja. Luontainen ja opittu immuunipuolustus eivät kuitenkaan ole erillään toimivia immuunipuolustusmekanismeja, vaan ne toimivat pitkälti yhdessä ja luontainen immuunipuolustus aktivoi opittua immuunipuolustusta lukuisilla eri mekanismeilla. Virusinfektion seurauksena elimistössä käynnistyy monia erilaisia puolustusmekanismeja virusta vastaan. Puolustusmekanismien voimakkuus riippuu pitkälti siitä, miten virus leviää elimistössä, miten virusinfektio vaikuttaa solutasolla ja onko kyseessä elimistölle uusi vai ennestään tunnettu virusinfektio.

## 5.1 Luontainen immuunipuolustus virusinfektiossa

Luontaisessa immuunipuolustuksessa tärkeimmässä asemassa ovat makrofagit eli elimistön syöjäsolut, dendriittisolut sekä luonnolliset tappajasolut eli NK-solut. Makrofagit ja dendriittisolut ovat syöjäsoluja eli fagosyyttejä, joiden tehtävänä on tuhota elimistöön tunkeutunut taudinaiheuttaja mahdollisimman nopeasti.

Makrofagien ja dendriittisolujen pinnalla on TLR-reseptoreita, jotka tunnistavat eri taudinaiheuttajia ja aktivoivat siten fagosytoosin eli solunsyönnin. Virusinfektioissa TLR3-, TLR7-, TLR8- sekä TLR9-reseptorit ovat merkittävimmässä asemassa, sillä ne tunnistavat virusperäisiä nukleiinihapporakenteita. TLR3-reseptori tunnistaa kaksijuosteisen RNA:n, jota muodostuu eri RNA-virusten replikaatiossa. TLR3-reseptoria esiintyy erityisesti dendriittisoluilla. TLR7- ja TLR8-reseptorit tunnistavat yksijuosteisen RNA:n ja TLR9-reseptori kaksijuosteisia DNA-viruksia. TLR2- ja TLR4-reseptorit tunnistavat puolestaan muita viruksen osia kuten vaipan glykoproteiineja. (Xagorari ja Chlichlia 2008)

NK-solut eli luonnolliset tappajasolut ovat lymfosyyttejä, joilla ei ole pinnoillaan antigeenejä tunnistavia reseptoreita. Sen sijaan NK-soluilla on pinnallaan erilaisia aktivointi- ja inhibointireseptoreita, jotka nimensä mukaisesti joko aktivoivat NK-soluja tai inhiboivat NK-solujen aktivaatiota. Osa NK-solujen pinnalla olevista aktivaatioreseptoreista tunnistaa suoraan tiettyjä viruksen proteiineja, kuten influenssavirusten hemagglutiniinia. Osa aktivaatioreseptoreista puolestaan tunnistaa erilaisia niin kutsuttuja stressiproteiineja, joita ilmenee solujen pinnoilla esimerkiksi erilaisten DNA-vaurioiden seurauksena. Inhibointireseptorit sen sijaan estävät NK-solujen aktivaation. Ne tunnistavat solujen pinnoilta MHC I -luokan molekyylin. Normaaleilla tumallisilla soluilla on pinnallaan MHC I -luokan molekyyliä, jotka ovat olennaisessa osassa adaptiivisessa immuunipuolustuksessa, mutta joiden synteesiä tietyt virukset voivat estää. Mikäli solun pinnalta puuttuu MHC I -luokan molekyyli, NK-solu aktivoituu ja tuhoaa kyseisen solun. (Brandstadter ja Yang 2011)



Virusinfektioissa tärkein luonnollisen immuunipuolustuksen osa-alue on interferonijärjestelmän aktivoituminen. Interferonit ovat proteiineja, joita elimistön omat solut syntetisoivat virusinfektion seurauksena. Ne mm. estävät virusten replikaatiota sekä aktivoivat eri immuunijärjestelmän soluja, kuten makrofageja, lymfosyyttejä sekä NK-soluja. Interferonit jaetaan tyyppin 1 ja tyyppin 2 interferoneihin. Tyyppin 1 interferoneita muodostuu virusinfektion varhaisessa vaiheessa missä tahansa solutyypissä. Tyyppin 1 interferonien tuoton käynnistää tavallisesti kaksijuosteinen RNA, jota muodostuu useissa virusinfektioissa. TLR3-reseptori, joka tunnistaa kaksijuosteisen RNA:n, saa aikaan interferonigeenien transkription aktivoitumisen. Tyyppin 2 interferoneita muodostuu luonnollisen immuunipuolustuksen NK-soluissa sekä adaptiivisessa immuunipuolustuksessa T-lymfosyyteissä. (De Andrea *et al.* 2002)

## **5.2 Opittu immuunipuolustus virusinfektiossa**

Opittu immuunipuolustus perustuu lymfosyyttien eli B- ja T-solujen toimintaan. Lymfosyyttien aikaansaamat immunitetit voidaan jakaa humoraaliseen sekä soluvälitteiseen immunitettiin. Humoraalisessa immunitetissa pääosassa ovat B-solut, jotka tuottavat spesifejä vasta-aineita virusantigeenejä vastaan. Soluvälitteisessä immunitetissa sen sijaan T-solut tunnistavat suoraan vieraan virusantigeenin ja osallistuvat siten patogeenin tuhoamiseen. Virusinfektio saa aikaan samanaikaisesti sekä humoraalisen että soluvälitteisen immunitetin käynnistymisen. (Nathanson ja Ahmed 2007)

Humoraalisen immunitetin naiiveilla eli kypsillä B-soluilla on pinnallaan vasta-ainemolekyylejä, jotka tunnistavat spesifisti vieraan virusantigeenin. Antigeenin sitoutuminen B-soluun saa aikaan B-solussa solusyönnin, jolla se ottaa vieraan patogeenin sisäänsä, tuhoaa sen ja liittää pilkkoutuneet peptidiantigeenit MHC II -luokan

molekyyleihin. MHC II -molekyyliin sidottu antigeeni kuljetetaan solun pinnalle, jossa se esitellään tämän jälkeen T<sub>2</sub>-auttajasolulle, joka tunnistaessaan vieraan patogeenin alkaa tuottaa sytokiineja. Sytokiinit stimuloivat B-soluja jakautumaan ja erikoistumaan vasta-aineita tuottaviksi plasm soluiksi sekä muistisoluiksi. Vasta-aineet sitoutuvat taudinaiheuttajan antigeeniin, jonka jälkeen syöjäsolujen pinnan Fc-reseptorit tunnistavat vieraaseen taudinaiheuttajaan sitoutuneet vasta-aineet ja saavat aikaan syöjäsolujen aktivoitumisen. (Klimpel 1996)

Soluvälitteisessä immunitetissa T-solut tunnistavat suoraan infektoituneen kohdesolun pinnalta antigeenin ja tuhoavat infektoituneen solun. Dendriittisolut, makrofagit sekä B-solut ovat niin kutsuttuja antigeenejä esitteleviä soluja (APC), koska ne pystyvät ottamaan patogeenin sisäänsä, hajottamaan sen ja tämän jälkeen liittämään antigeenin MHC I -reseptoriin solun pinnalle, jossa se voidaan esitellä T-soluille. T-soluilla on pinnallaan T-solureseptoreita, jotka tunnistavat spesifisti tietyn antigeenin. Kun sytotoksinen T-solu tunnistaa MHC I -reseptoriin sidotun antigeenin, se tuhoaa suoraan antigeeniä esittelevän solun. Sen sijaan T<sub>1</sub>-auttajasolu alkaa tuottaa sytokiineja, jotka houkuttelevat paikalle muita soluja, kuten makrofageja, jotka puolestaan alkavat tuhota antigeeniä esitteleviä soluja. (Nathanson & Ahmed 2007)

Patogeenien aiheuttamat infektiot voidaan jakaa primäärisiin ja sekundaarisiin immuunipuolustusreaktioihin. Primäärissä reaktioissa elimistö kohtaa ensimmäistä kertaa vieraan patogeenin. B-solut jakautuvat ja erilaistuvat muodostaen vasta-aineita tuottavia plasm soluja sekä muistisoluja. Plasm solut ovat lyhytikäisiä ja ne tuottavat primääristen reaktioiden alussa pääasiassa IgM-luokan vasta-aineita. Muistisolut sen sijaan ovat pitkäikäisiä. Ne voivat säilyä elimistössä useita vuosia ja elimistön kohdatessa uudestaan saman antigeenin, muistisolut aktivoituvat ja muuntuvat vasta-aineita tuottaviksi plasm soluiksi. Sekundaarisissa immuunireaktioissa tuotetut vasta-aineet ovat pääosin IgG-luokan vasta-aineita. (Madigan *et al.* 2012)

## 6 Vihurirokon diagnostiikka

Vihurirokon diagnosointi pelkkien oireiden perusteella ei ole luotettavaa, koska oireet, kuten ihottuma ja kuume, eivät eroa merkittävästi muiden virustautien oireista. Lisäksi jopa 50 % vihurirokkoinfektioista voi olla oireettomia. Infektio voidaan kuitenkin todeta useilla eri laboratoriotestillä. IgM-luokan vasta-aineita tunnistavaa testiä voidaan käyttää akuutin vihurirokkoinfektion todentamiseen lähes kaikissa tapauksissa. IgG-luokan vasta-aineiden nousu vähintään nelinkertaiseksi enintään kymmenessä päivässä ensimmäisen ja toisen näytteenoton välissä viittaa myös akuuttiin vihurirokkoinfektioon. Näin ollen vihurirokon diagnosoinnissa käytetäänkin usein sekä IgG- että IgM-luokan vasta-aineita tunnistavia testejä. (WHO 2007)

Myös erilaisia vihurirokon genomien tunnistamiseen perustuvia testejä voidaan käyttää vihurirokon diagnosointiin, mutta testien suorittaminen on vasta-aineita tunnistaviin testeihin verrattuna hankalampaa, eikä niitä juurikaan käytetä rutiinidiagnostiikassa. Lisäksi viruksen genomien tunnistamiseen perustuvat testit tunnistavat infektion vain jos virusta on vielä jäljellä elimistössä, kun taas vasta-aineita tunnistavat testit tunnistavat infektion myös silloin kun varsinaista virusta ei enää ole elimistössä, mutta viruksen tunnistavia vasta-aineita on vielä jäljellä. Vihurirokkoinfektio voidaan lisäksi todeta myös viljelynäytteistä, mutta koska viljely on aikaa vievää ja työlästä, ei viljelytekniikkaa käytetä vihurirokon rutiinidiagnostiikassa. (WHO 2007)

## 6.1 IgM-luokan vasta-aineita tunnistavat testit

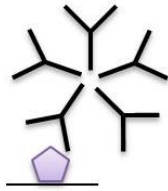
### 6.1.1 Epäsuora ELISA-testi IgM-luokan vasta-aineille

Epäsuoran ELISA-testin eli entsyymi-immunologisen määritysmenetelmän toimintaperiaate IgM-luokan vasta-aineille on esitetty kuvassa 5. Epäsuorassa IgM-ELISA-testissä näytteessä olevat IgG-luokan vasta-aineet on poistettava ennen näytteen lisäämistä kuoppalevyn kuoppaan. Poistamattomat IgG-luokan vasta-aineet sitoutuvat kuoppalevyn antigeeneihin ja kilpailevat sitoutumiskohdista IgM-luokan vasta-aineiden kanssa, mistä voi aiheutua vääriä IgM-luokan vasta-aineiden suhteen negatiivisia testituloksia (Martins *et al.* 1995). IgG-luokan vasta-aineiden lisäksi myös korkea IgM-luokan reumatekijöiden määrä voi aiheuttaa vääriä testituloksia. IgM-luokan reumatekijät sitoutuvat IgG-luokan vasta-aineiden vakiollisiin päihin ja voivat näin ollen sitoutua kuoppalevyn pohjaan kiinnittyneisiin IgG-luokan vasta-aineisiin, mistä puolestaan voi aiheutua vääriä positiivisia testituloksia (Meurman ja Ziola 1978). IgG-luokan vasta-aineet voidaan poistaa näytteestä tavallisesti lisäämällä näytelaimennospuskuriin antihumaani-IgG-vasta-ainetta sisältävää seerumia, jota on saatavana kaupallisesti (Martins *et al.* 1995).

Epäsuorassa ELISA-testissä kuoppalevyn pohja on päällystetty virusantigeenillä, johon seerumissa oleva vasta-aine sitoutuu. Ylimääräiset sitoutumattomat vasta-aineet ja muut proteiinit pestään pois ja kuoppaan lisätään entsyymillä leimattu vasta-aine, joka sitoutuu virusantigeeneihin sitoutuneisiin vasta-aineisiin. Ylimääräinen sitoutumaton vasta-aine pestään pois ennen substraatin lisäystä. Pesun jälkeen levylle lisätään kromogeeninen substraatti, joka entsyymireaktion seurauksena muuttuu värilliseksi lopputuotteeksi. Lopputuotteen intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteessä olevan vasta-aineen määrään ja se voidaan mitata spektrofotometrisesti. Käytettävä aallonpituus riippuu testissä käytettävästä substraatista.



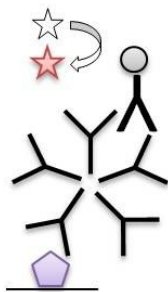
Levy päällystetään antigeenillä



Lisätään näyte: Näytteen antigeenin tunnistava vasta-aine sitoutuu antigeeniin



Lisätään entsyymillä konjugoitu vasta-aine



Lisätään substraatti. Konjugoidun vasta-aineen entsyymi muuttaa substraatin värilliseksi reaktiotuotteeksi



levyn päällystyksessä käytetty antigeeni



entsyymillä konjugoitu vasta-aine



IgM-vasta-aine



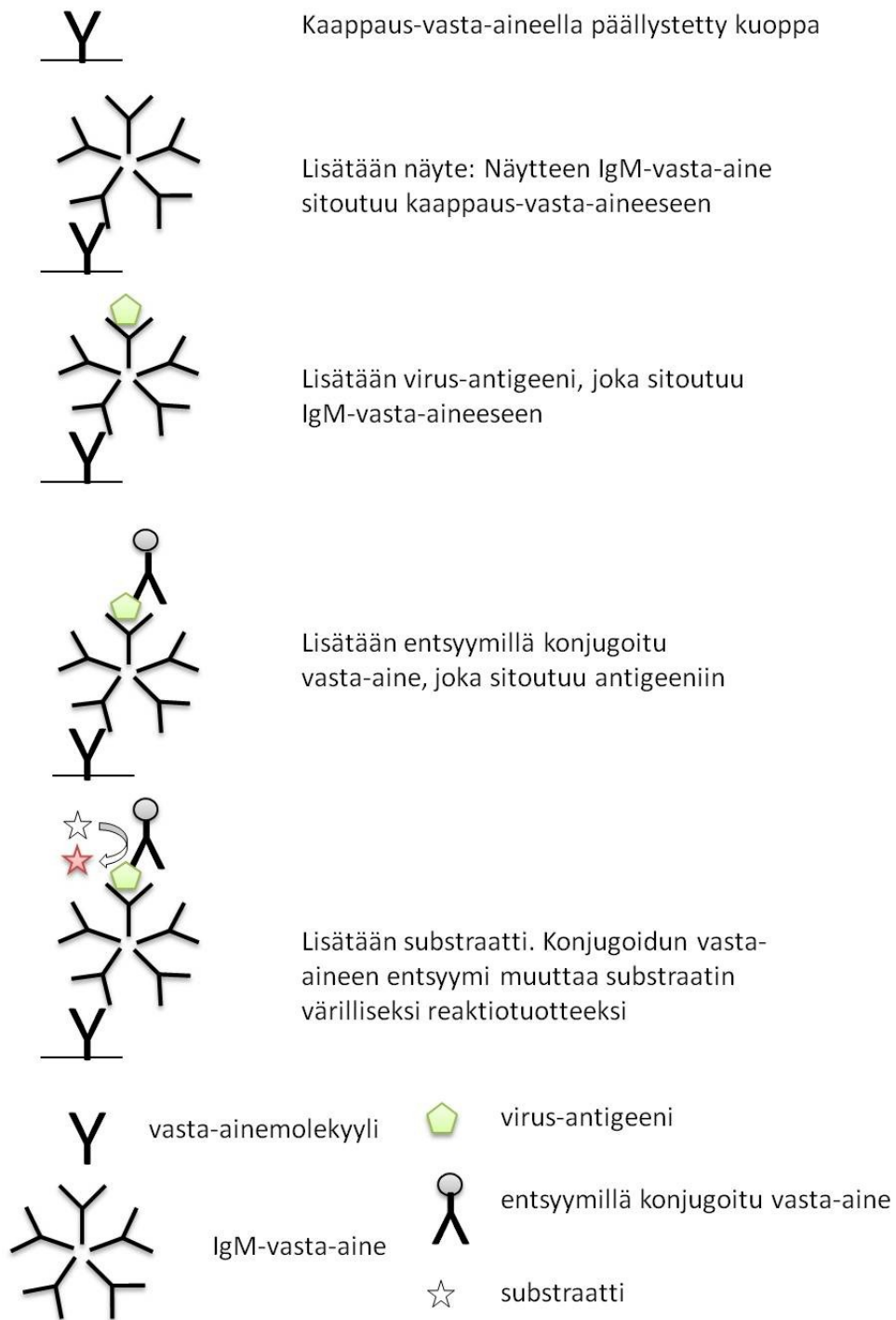
substraatti

Kuva 5. Epäsuoran IgM-testin toimintaperiaate.

### 6.1.2 IgM-kaappaus-ELISA

Kuvassa 6 on esitetty IgM-kaappaus-ELISA-testin toimintaperiaate. Potilasnäytteessä olevat IgM-luokan vasta-aineet sitoutuvat kuoppalevyn pohjaan kiinnitettyihin IgM-luokan vasta-aineita tunnistaviin vasta-aineisiin. Tämän jälkeen muut vasta-aineet ja proteiinit poistetaan pesemällä levy. Pesun jälkeen levyllä lisätään virusantigeeniä, joka sitoutuu ainoastaan kyseistä viruspartikkelia tunnistaviin IgM-luokan vasta-aineisiin. Pesun jälkeen levyllä lisätään entsyymillä leimattu vasta-aine, joka sitoutuu IgM-luokan vasta-aineisiin sitoutuneisiin virusantigeeneihin. Lopuksi levyllä lisätään kromogeeninen substraatti, jonka vasta-aineeseen sitoutunut entsyymi muuttaa värilliseksi lopputuotteeksi. Lopputuotteen määrä on suoraan verrannollinen IgM-luokan vasta-aineen määrään näytteessä.

IgM-kaappaus-ELISA-testin etu epäsuoraan ELISA-testiin on, ettei IgG-luokan vasta-aineita tarvitse erikseen poistaa testiä suoritettaessa. Myös spesifisyys on IgM-kaappaus-ELISA-testissä parempi kuin epäsuorassa IgM-ELISA-testissä. IgM-kaappaus-ELISA-testejä on saatavilla kaupallisesti useilta eri valmistajilta.



Kuva 6. IgM-kaappaus-ELISA-testin toimintaperiaate.

## **6.2 IgG-luokan vasta-aineita tunnistavat testit**

### **6.2.1 Epäsuora ELISA-testi IgG-luokan vasta-aineille**

Epäsuora ELISA testi IgG-luokan vasta-aineille noudattaa samaa periaatetta kuin epäsuora ELISA-testi IgM-luokan vasta-aineille (kuva 5). IgG-testiä voidaan käyttää varmentamaan IgM-testillä saatua positiivista testitulosta. Akuutin infektion tunnistamisessa IgG-luokan vasta-aineita tunnistavaa ELISA-testiä käytetään aina kahden eri aikaan otetun seeruminäytteen vertaamiseen. Ensimmäisen ja toisen näytteenottokerran välissä tulisi olla ainakin kymmenen päivää, jotta mahdollinen vasta-aineiden määrän nousu voidaan havaita. Mikäli IgG-luokan vasta-aineiden määrän havaitaan nousseen elimistössä nelinkertaiseksi ensimmäisen ja toisen näytteenottokerran välissä, voidaan tehdä johtopäätös akuutista vihuriokkoinfektioista. (WHO 2007)

### **6.2.2 IgG-aviditeettitestit**

IgG-aviditeettitestit mittaavat vasta-aineen ja antigeenin välisen sitoutumisen voimakkuutta eli affiniteettiä. Aviditeettitestin tarkoituksena on erottaa akuutit vihuriokkoinfektiot sekundaarisista infektioista. Vasta-aineen affiniteetti antigeeniin on heikko primääri-infektioissa, mutta se voimistuu ajan mittaan. Näin ollen potilailla, joilla on vanhaa immuniteettiä, vasta-aineen affiniteetti antigeeniin on voimakas. (WHO 2007)

IgG-aviditeettitestissä antigeenillä päällystettyyn kuoppaan lisätään vasta-ainetta sisältävä seeruminäyte. Antigeenin tunnistava vasta-aine sitoutuu antigeeniin. Tämän jälkeen kuoppaan lisätään reagenssia, joka denaturoi proteiineja. Denaturointikäsitteilyn seurauksena heikon affiniteetin sidokset tuhoutuvat, mutta voimakkaan affiniteetin sidokset pysyvät edelleen kiinni. Mittaustuloksista lasketaan voimakkaasti sitoutuneiden IgG-luokan vasta-aineiden osuus eli aviditeetti. Mitä heikompi aviditeetti on, sitä tuoreempi infektio on kyseessä. Koska aviditeettitestit mittaavat aina suhteellista



sitoutumista, on testattavan näytteen kanssa testattava rinnan sama näyte ilman proteiineja denaturoivaa reagenssia. (Hedman ja Seppälä 1988)

## **7 ELISA-testin optimoinnin päävaiheet**

### **7.1 Mikrotiitterilevyn ja päällystysproteiinin valinta**

ELISA-testeissä mikrotiitterilevyn kuopan pintaan sidotaan testityypistä riippuen joko vasta-aine tai antigeeni. Proteiinin sitoutuminen levyn pintaan tapahtuu passiivisesti ja sitoutumisen tehokkuuteen voidaan vaikuttaa eri parametreja muuttamalla. Sitoutuminen mikrotiitterilevyn pintaan tapahtuu vesiliuoksessa proteiinin hydrofobisesta osasta. (Wild 2001)

Useimmiten ELISA-testeissä käyttävien mikrotiitterilevyjen materiaalina on polystyreeni. Polystyreenilevyn pinnassa on sekä hydrofobisia että hydrofiilisiä osia. Hydrofiilisyyttä voidaan lisätä mm. säteilytyksellä, jolloin levyn pintaan sitoutuu ilmasta lisää happiatomeja. Polystyreenin käsittely esimerkiksi säteilytyksellä voi joillakin proteiineilla parantaa levyn sitomiskykyä, mutta toisaalta liika käsittely saattaa myös vaikuttaa negatiivisesti levyn sitomistehokkuuteen (Wild 2001). Eri mikrotiitterilevyjen valmistajilla on tarjolla useita sitoutumiskyvyiltään erilaisia levyjä ja levyä valitessa onkin usein syytä selvittää kokeilemalla, mikä levytyyppi soveltuu parhaiten kehitettävään testiin.

### **7.2 Epäspesifisten sitoutumiskohtien peittäminen**

Mikrotiitterilevyn päällystyksessä kuopan pohjaan sidotaan testityypistä riippuen antigeeni tai vasta-aine, johon näytteessä oleva antigeeni tai vasta-aine sitoutuu. Polystyreenin kyky sitoa proteiineja on testin toimivuuden kannalta tärkeä ominaisuus, mutta se voi aiheuttaa myös epäspesifisten proteiinien sitoutumista levyn pintaan testin

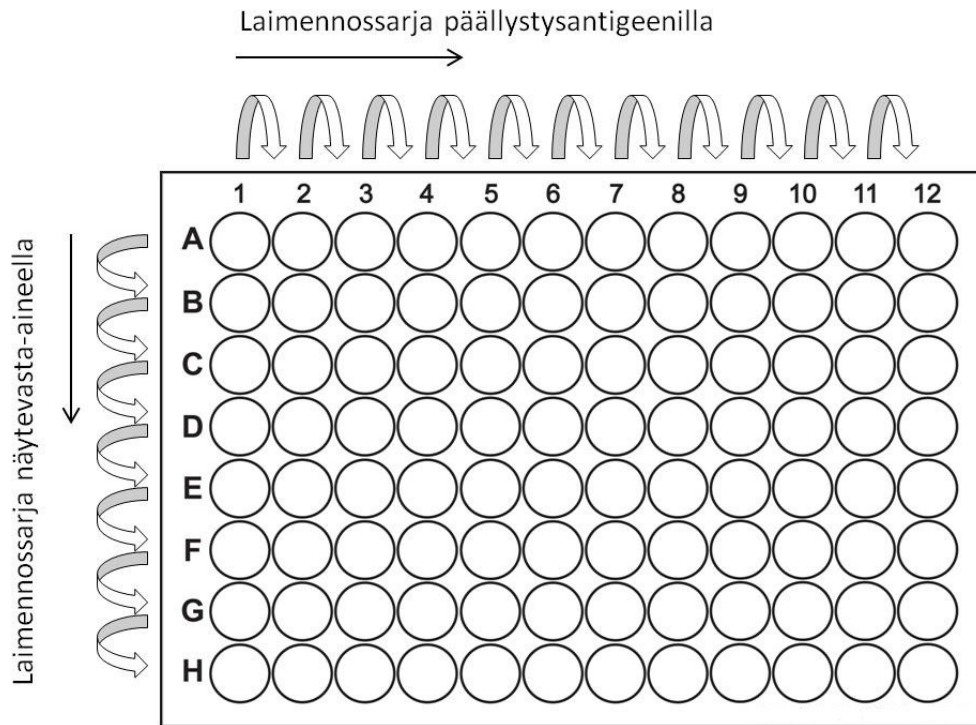
myöhemmässä vaiheessa, mikäli epäspesifisiä sitoutumiskohtia ei saada päällystysvaiheen jälkeen peitettyä. (Gibbs 2001)

Epäspesifisten sitoutumiskohtien ilmeneminen voidaan peittää lisäämällä levyille reagenssia, joka sitoutuu proteiinipäällystyksen jälkeen jäljelle jääneisiin vapaisiin sitoutumiskohtiin. Epäspesifisten sitoutumiskohtien peittoon käytettävät reagenssit ovat usein erilaisia proteiineja, detergenttejä tai näiden yhdistelmiä. Proteiineista useimmiten käytettyjä reagensseja ovat BSA, kaseiini tai maitojauhe, seerumi ja gelatiini. Yleisimmin käytetty detergentti on Tween-20. Paras kombinaatio käytettävistä reagensseista, olosuhteista ja reagenssipitoisuuksista saadaan selville ainoastaan kokeilemalla. (Gibbs 2001)

### **7.3 Reagenssipitoisuuksien optimointi**

Reagenssipitoisuuksien optimointi on tärkeä osa uuden ELISA-testin kehitystä. Tavallisesti epäsuorassa ELISA-testissä optimoitavat pitoisuudet ovat päällystysantigeenin käyttöpitoisuus, näytevasta-aineen pitoisuus sekä konjugaattivasta-aineen pitoisuus.

Niin kutsuttu checkerboard-titraus on menetelmä, jolla voidaan samanaikaisesti optimoida sekä näytteen että päällystysantigeenin pitoisuus. Menetelmässä mikrotiiterilevyllä testataan samanaikaisesti sekä eri näytelaimennospitoisuutta että päällystysantigeenipitoisuutta. Perinteisen checkerboard-titrauksen kaaviokuva on esitettyä kuvassa 7. Titrauksen perusteella valitaan kombinaatio, jossa taustan absorbanssitaso on matala eikä antigeenikonsentraation kasvattaminen merkittävästi paranna erottelukykyä. Checkerboard-titraus kannattaa suorittaa sekä positiiviselle että negatiiviselle seeruminäytteelle. (Crowther 2001)



Kuva 7. Checkerboard-titrauksen periaate. Päällystysantigeenista tehdään laimennossarja sarakkeittain ja näytevasta-aineesta riveittäin.

Lopuksi antigeenipitoisuutta testataan eri konjugaattivasta-ainepitoisuuksilla sekä usealla eritasoisella näytteellä, jotta saada käsitys miten eri konjugaattipitoisuudet vaikuttavat positiivisten ja negatiivisten näytteiden erottumiseen. Kaupallisen ELISA-testin valmistuksessa lopullinen konjugaattivasta-aineen pitoisuus säädetään jokaisella erällä erikseen tuotantovaiheessa, jotta eräkohtainen pieni absorbanssitasojen vaihtelu saataisiin minimoitua.

#### 7.4 Stressitestit

Stressitestillä tarkoitetaan nopeutettua stabiilisuustestausta, jonka tarkoituksena on nopeutetusti mallintaa tuotteen säilyvyyttä. Nopeutetussa säilyvyystestissä tuote altistetaan seurantajakson ajan tarkoituksella yhdelle tai usealle stressitekijälle, kuten tavallista säilytysolosuhdetta voimakkaammalle valolle, kosteudelle tai korkeammalle

lämpötilalle. Seurantajakson lopussa saatujen tulosten perusteella voidaan ennustaa tuotteen reaaliaikaista säilyvyyttä. Käytännössä nopeutettujen säilyvyytestausten lisäksi tehdään uuden tuotteen säilyvyytestauksissa aina myös reaaliaikainen säilyvyytestaus, jossa tuotteen stabiilisuutta seurataan sen tavallisessa säilytysympäristössä ja saatujen tulosten perusteella asetetaan tuotteelle tietty säilyvyys. Nopeutettu säilyvyysseuranta perustuu Arrheniuksen yhtälöön (1) (SFS-EN 13640).

$$K = A * e^{-\frac{E_a}{RT}}, \quad (1)$$

jossa  $k$  on reaktionopeusvakio,  $A$  on Arrheniuksen vakio,  $E_a$  on reaktion vaatima aktivaatioenergia,  $R$  on Boltzmannin vakio ja  $T$  on lämpötila. Yhtälö kuvaa hajoamisreaktion riippuvuutta lämpötilasta.

## 7.5 Toistettavuustestit

Testien toistettavuutta voidaan arvioida erilaisten tilastollisten testien avulla. Toistettavuustesteissä tarkastellaan mittaustulosten vaihtelua joko yhden testin sisällä, jolloin puhutaan testin sisäisestä toistettavuudesta tai useiden eri testikertojen välillä, jolloin puhutaan testisarjojen välisestä toistettavuudesta. Toistettavuustestauksiin otetaan tavallisesti mukaan näytteitä, jotka ovat positiivisia tai lähellä positiivisen ja negatiivisen näytteen rajaa (Raggam *et al.* 2014). Testin toistettavuutta kuvaavia tunnuslukuja ovat keskiarvo, keskihajonta (SD) ja variaatiokerroin (CV).

Testin toistettavuuteen vaikuttavia tekijöitä on olemassa useita. Tekijät, jotka vaikuttavat vasta-aineen ja antigeenin väliseen sitoutumisreaktioon, vaikuttavat myös testin toistettavuuteen. Esimerkiksi epäpuhtaudet tai riittämätön epäspesifisten sitoutumiskohtien peittäminen tyypillisesti nostaa variaatiokerrointa. Toisaalta esimerkiksi vääränlaiset inkubaatio-olosuhteet, kuten liian korkea inkubaatiolämpötila, voivat

aiheuttaa kuoppalevyllä niin kutsuttua reunaefektiä, joissa mitattava signaali on kuoppalevyn reunimmaisissa kuopissa joko levyn keskiosasta mitattavaa signaalia matalampi tai korkeampi. Myös testin suorituksessa käytettävät laitteet ja pipetointivirheet vaikuttavat toistettavuuteen. (Deshpande 1996)

## TUTKIMUSOSA

### 8 Työn tarkoitus ja tavoitteet

Tämän diplomityön tarkoituksena oli muokata jo olemassa olevat kvalitatiiviset IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita tunnistavat vihurirokkotestit kvantitatiiviseen muotoon. Lisäksi työn tarkoituksena oli optimoida jo valmiina olevia vihurirokkotestejä, jotta testien herkkyyttä ja tarkkuutta saataisiin parannettua. Kvantitatiivinen vasta-ainetestti antaa tulokseksi potilasnäytteessä olevan vasta-aineen pitoisuuden, kun taas kvalitatiivinen testi antaa tulokseksi ainoastaan tiedon, onko potilasnäyte negatiivinen vai positiivinen tutkittavan vasta-aineen suhteen. Kvantitatiivisen testin etu kvalitatiiviseen testiin nähden on mahdollisuus seurata vasta-aineiden määrän muutosta potilaassa. Lopuksi valmistettiin niin kutsutut protoerät, joiden avulla tehtiin alustavia tilastollisia testejä sekä vertailutestejä kilpailijoiden vastaavien testien kanssa.

#### Työn kulku

Työn kulun päävaiheet ovat seuraavat

1. Mikrotiitterilevytyypin valinta ja päällystysantigeenien vertailu
2. Blokkusmenetelmien vertailu
3. Päällystysantigeenipitoisuuden sekä konjugaattipitoisuuden optimointi
4. Referenssinäytepaneelin kokoaminen
5. Protoerillä tehdyt testaukset
  - stressitesti
  - tilastolliset testaukset
  - näytelaimennosten lineaarisuus
  - vertailu kilpailijoiden testien kanssa

## 9 Materiaalit ja menetelmät

### 9.1 Käytetyt näytteet

Varmennettuina seeruminäytteinä käytettiin pääosin Labquality Oy:n ulkoisten laadunarviointikierrosten näytteitä. Lisäksi varmennettuina näytteinä käytettiin muutamia kaupallisia seeruminäytteitä sekä AniLabsystems Ltd Oy:lta (nyk. Labsystems Diagnostics Oy) saatuja varmennettuja vihurirokkonäytteitä. Käytetyt varmennetut näytteet on esitetty taulukossa 1. Referenssinäytepaneelin kokoamiseen käytetyt seerumit sekä testeissä käytettäviin kalibraattoreihin ja kontroleihin käytetyt seerumit koottiin yrityksen omasta seerumivarastosta. Kaikki referenssinäytepaneelissa käytetyt näytteet, kalibraattoriseerumit sekä kontrolliseerumit oli testattu ja todettu hepatiitti B-, hepatiitti C- ja HIV-negatiivisiksi.

Testi optimoitiin aluksi toimivaksi varmennettujen seeruminäytteiden avulla. Lopuksi optimoidulla testillä etsittiin yrityksen omasta seerumivarastosta eritasoisia seerumeita, joista koottiin referenssinäytepaneelit. Referenssinäytepaneelin avulla testi voidaan tuotantovaiheessa säätää halutulle absorbanssitasolle ja testata testin toimivuutta. Paneeliin kuuluu eritasoisia näytteitä selkeistä negatiivisista näytteistä korkeisiin positiivisiin näytteisiin. Osa referenssinäytepaneelin seerumeista voi myös olla yhdistelmä useampaa eri seerumia eli niin kutsuttu seerumipooli.

Taulukko 1. Varmennetut seeruminäytteet, joiden avulla testi optimoitiin. Taulukossa (+) on positiivinen näyte, (-) on negatiivinen näyte ja (+/-) on raja-arvoinen näyte.

Näytteen alkuperä (toimittaja)	Näyte	Rub IgG	Rub IgM
Labquality	281A	+	+
Labquality	282A	+	+
Labquality	427	+/-	-
Labquality	251	+	-
Labquality	252	+/-	-
Labquality	253	+	+
Labquality	425	+	-
Labquality	426	+	+
Labquality	281B	+/-	-
Labquality	282B	+/-	-
Labquality	283	+	+
Labquality	342	+	+
Labquality	343	+	-
Labquality	344	+	-
Labquality	867	+	+
Labquality	868	+	-
Labquality	869	+	+
Labquality	361	-	-
Labquality	362	+	+
Labquality	363	+	-
Labquality	806	+	-
Labquality	807	+	-
Labquality	808	+	-
Kaupallinen toimittaja	BM145653	+	-
Kaupallinen toimittaja	BM204666	+	+
Kaupallinen toimittaja	BM145949	+	-
AniLabsystems	1541	+	-
AniLabsystems	1542	+	-
AniLabsystems	1457	+	+
AniLabsystems	1476	+	+



## 9.2 Standardi ja kontrolli

Vihurirokon IgG-luokan vasta-aineita tunnistavaa testiä optimoitaessa käytettiin lisäksi WHO:n Anti-Rubella laadunvarmistuskontrollia (Anti-Rubella QC1, 09/B577) sekä WHO:n kansainvälistä standardia (Anti Rubella immunoglobulin, RUBI-1-94). IgG-testissä näytteiden sekä kontrollien että kalibraattoreiden konsentraatiot (IU/ml) määritettiin WHO:n standardia vasten. WHO:n laadunvarmistuskontrollilla varmistettiin, että konsentraatiot jäivät testeissä oikealle tasolle.

Vihurirokon IgM-luokan vasta-aineille ei ole olemassa WHO:n kansainvälistä standardia eikä laadunvarmistusnäytettä. Näin ollen IgM-testissä näytteiden ja kontrollien absoluuttisia konsentraatioita on mahdoton määrittää. IgM-testillä päädyttiinkin käyttämään niin kutsuttua sisäistä standardia, jota vasten kontrollien konsentraatiot määritettiin EIU-yksiköissä.

## 9.3 Käytetyt reagenssit

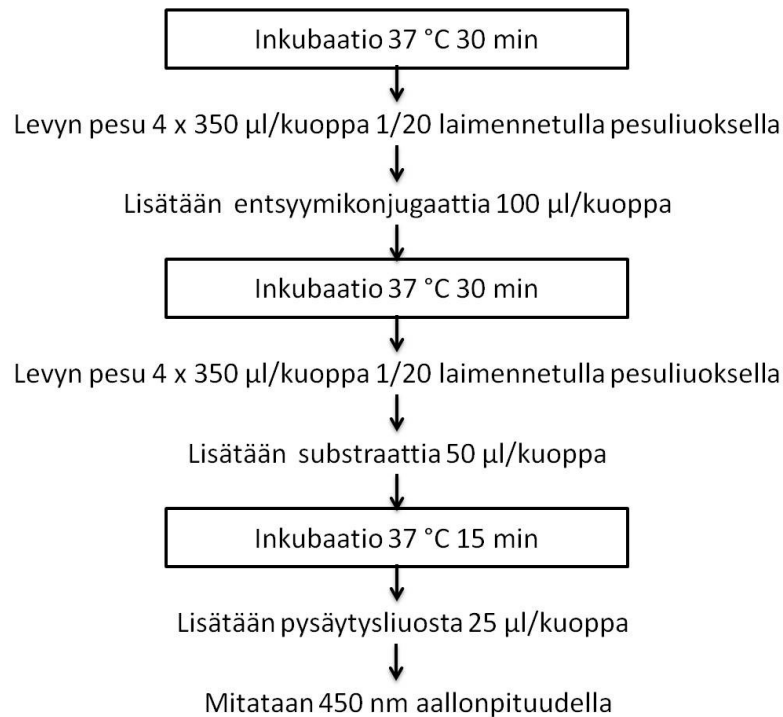
*Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testien reagensseina pyrittiin käyttämään mahdollisimman paljon jo olemassa olevien Orgenium Laboratories -yksikön kvalitatiivisten ELISA-testien reagensseja, jotta esimerkiksi testien tuotantokustannukset saataisiin minimoitua. Lisäksi kvalitatiivisten testien reagenssit oli jo itsessään todettu toimiviksi, joten reagenssien raaka-aineita ei nähty tarpeelliseksi ryhtyä muuttamaan.

## 9.4 TORCH-tuoteryhmän ELISA-testin suoritusperiaate

Kaikissa Orgenium Laboratories -yksikön TORCH-testeissä on samanlainen suoritusprosessi inkubaatioaikoja, inkubaatiolämpötiloja sekä reagenssitilavuuksia myöten. Myös reagenssit on pyritty pitämään mahdollisimman samoina jokaisessa testissä. Samat inkubaatio-olosuhteet ja reagenssitilavuudet mahdollistavat usean eri TORCH-

tuoteryhmän testin testauksen samanaikaisesti, mikä on kätevää erityisesti asiakasnäkökulmasta. Koska eri TORCH-testien suoritusprosessit haluttiin myös jatkossa pitää samanlaisina, pyrittiin myös *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testien suoritusprosessi pitämään samanlaisena kuin aikaisemmin. Itse suoritusprosessia ei siis ryhdytty optimoimaan. Testien suoritusperiaate on esitettyä kuvassa 8. Työn aikana tehdyt testit on tehty kuvan 8 mukaisella testausperiaatteella, ellei toisin ole mainittu.

Näyteseerumi laimennetaan näytelaimennospuskuriin laimennossuhteella 1/101  
Kuoppalevylle pipetoidaan laimennettuja näytteitä sekä tuotteen mukana tulleita  
kontrolleja/kalibraattoreita 100 µl/kuoppa



Kuva 8. Orgenium Laboratories -yksikön TORCH-tuoteperheen ELISA-testien suoritusperiaate.

## 9.5 Kuoppalevyn päällystäminen antigeenillä

Kuoppalevyn kuoppien päällystäminen antigeenillä oli vanhassa kvalitatiivisessa ELISA-testissä havaittu toimivaksi, joten päällystysprosessia ei lähdetty optimoimaan.

Päälystysliuoksena, johon päälystysantigeeni lisättiin, käytettiin 0,01 M fosfaattipuskuria (PBS). Lisäksi päälystysliuokseen lisättiin proteaasi-inhibiittoritabletti. Valmista päälystysliuosta pipetoitiin 96-kuoppalevyille (Nunc Lockwell C8 Maxisorp/Polysorp) 110 µl per kuoppa. Päälystettyjä levyjä inkuboitiin yön yli huoneenlämmössä (16–20 tuntia).

Inkuboinnin jälkeen levyt blokattiin eli estettiin epäspesifisten sitoutumiskohtien ilmeneminen kuoppalevyllä. Vanhassa kvalitatiivisessa testissä blokkaukseen suoritettiin tyhjentämällä levyt päälystysliuoksesta, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 125 µl blokkaukseen liuosta. Tämän jälkeen levyjä inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa, jonka jälkeen levyt tyhjennettiin blokkaukseen liuoksesta ja kuivattiin vakuumiunissa.

## 9.6 Mikrotiitterilevyn valitseminen ja antigeenien vertailu

Mikrotiitterilevyä valittaessa testattiin kahta eri kuoppalevytyyppiä, Nunc Lockwell C8 Maxisorp- sekä Polysorp-levyä. Molempien levytyyppien materiaalina on polystyreeni. Levyt eroavat toisistaan adsorptiokyvyiltään. Polysorp-levytyyppi adsorboi pintaansa pääosin hydrofobisia ryhmiä, kun taas Maxisorp-levytyyppi adsorboi hydrofoobisten ryhmien lisäksi myös hydrofiilisiä ryhmiä. Toisin sanoen Polysorp-levy soveltuu parhaiten erilaisten lipidien ja lipoproteiinien sitomiseen, kun taas Maxisorp-levy soveltuu erilaisten glykoproteiinien ja polyglykaanien sitomiseen. Koska Maxisorp-levy sitoo Polysorp-levyä tehokkaammin molekyylejä, on inkubointiolosuhteiden valitseminen helpompaa kuin käytettäessä Polysorp-levyä. Polysorp-levyä käytettäessä sitoutuminen on heikompaa, jolloin inkubaatio-olosuhteita on tehostettava esimerkiksi päälystyksessä käytettävää antigeenipitoisuutta nostamalla, päälystysaikaa pidentämällä tai päälystyslämpötilaa nostamalla. (Esser 1988)

Kaikissa testeissä oli alun perin käytössä Maxisorp-levytyyppi. *Rubella* IgG -testissä ei alun perinkään ollut suuria ongelmia erottelukyvyn kanssa, joten jo etukäteen voitiin olettaa,

että Maxisorp-levytyyppi soveltuu IgG-testiin ongelmitta. Sen sijaan *Rubella* IgM -testissä erottelukyky tiettyjen näytteiden osalta oli heikompi, joten Polysorp-levytyypillä pyrittiin saavuttamaan erottelukyvyltään parempia tuloksia. Levytyyppien vertailutesti suoritettiin itse levytyyppiä lukuun ottamatta samoilla reagensseilla. Samaa näytelaimennosta käytettiin molemmilla levytyypeillä.

Koska *Rubella* IgM -testissä oli aikaisemmin ollut ongelmia erottelukyvyyssä, päätettiin samalla kertaa vertailla myös kahden eri antigeenivalmistajan päällystysantigeenejä. Päällystysantigeenien vertailuun käytetyt antigeenit tilattiin toimittajalta A ja toimittajalta B. Aikaisemmin Orgenium Laboratories -yksikön vihurirokkotesteissä on kustannussyistä ollut käytössä toimittaja A:n antigeeni. Toimittaja A:n antigeeni sisältää kokonaisia viruspartikkeleita ja toimittaja B:n antigeeni ainoastaan vihurirokkoviruksen kuoriproteiineja E1 ja E2, joten oli oletettavissa, että toimittaja B:n antigeeni voisi toimia paremmin *Rubella* IgM -testissä. Levy- ja antigeenivertailuja tehtäessä molemmat antigeenit laimennettiin 1/1000 laimennoksella.

## 9.7 Blokkusmenetelmien vertailu

Vaikka vanhassa kvalitatiivisessa testissä myös blokkusvaihe oli todettu toimivaksi, päätettiin työn aikana silti vertailla myös erilaisia blokkusmenetelmiä. Aikaisemmin käytössä ollut lyhyt 30 minuutin inkubaatioaika saattaa suurissa tuotantomäärissä aiheuttaa ongelmia, jos levyerän prosessointiin kuluva aika on pidempi kuin inkubaatioaika. Tällöin osaa levyistä inkuboidaan väistämättä kauemmin kuin muita, mikä taas saattaa aiheuttaa epätasaisuutta päällystyserässä.

Blokkusmenetelmien vertailussa tutkittiin, riittäisikö pelkkä levyjen pesu neljä kertaa blokkusliuoksella (350 µl/kuoppa) estämään epäspesifisten sitoutumiskohtien ilmenemisen. Lisäksi testattiin, olisiko inkubaatioajan nostamisella negatiivisia vaikutuksia

päällystämisen onnistumiseen. Kukin testattu näyte testattiin kolmena rinnakkaisena näytteenä ja tuloksista laskettiin kullekin näytteelle keskiarvo, keskihajonta (SD) sekä variaatiokerroin (CV). Testatut blokkauksen menetelmät on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Testatut blokkauksen menetelmät.

Käsittely	Blokkauksen menetelmä	Blokkauksen liuoksen määrä / kuoppa
1	4 x pesu blokkauksen liuoksella	350 ul
2	3 h inkubaatio + 37 °C	125 ul
3	4 h inkubaatio + 37 °C	125 ul
4	5 h inkubaatio + 37 °C	125 ul
5	Yön yli inkubaatio + 4 °C (24 h)	125 ul
6	3 h inkubaatio huoneenlämmössä	125 ul
7	4 h inkubaatio huoneenlämmössä	125 ul
8	5 h inkubaatio huoneenlämmössä	125 ul
9	Yön yli inkubaatio huoneenlämmössä	125 ul
10	30 min inkubaatio + 37 °C (referenssi)	125 ul

Taulukon 2 testaustulosten perusteella päätettiin lisäksi testata pesukertojen vähentämisen vaikutusta testin toimivuuteen. Testattiin siis edelleen levyjen pesemistä blokkauksen liuoksella 350 µl/kuoppa (taulukko 2, käsittely 1). Pienempi pesukertojen määrä alentaa testin valmistuskustannuksia, koska blokkauksen liuoksen kulutus on tällöin pienempi. Pesukertojen määrinä testattiin neljää, kolmea, kahta ja yhtä pesukertaa. Blokkauksen menetelmiä vertailtaessa kiinnitettiin huomiota erityisesti rinnakkaisten näytteiden hajontoihin sekä nollanäytteisiin. Nollanäytteiden absorbanssien tulisi olla onnistuneesti päällystetyillä levyillä lähellä nollaa, koska epäspesifiset sitoutumiskohdat on tuolloin saatu peitettyä.

## 9.8 Päällystysantigeenin pitoisuuden sekä konjugaattipitoisuuden optimointi

Yleensä epäsuorassa ELISA-testissä optimoidaan päällystysantigeenin sekä näytevasta-aineen laimennossuhde samaan aikaan niin kutsutulla checkerboard-titrauksella

(Crowther 2001). Titrauksella saadaan samalla kertaa optimoitua sekä näytelaimennossuhde että antigeenikonsentraatio. Tässä työssä IgG- ja IgM-ELISA-testejä optimoitaessa ei kuitenkaan suoraan käytetty hyväksi checkerboard-titrausmenettelyä, koska näytelaimennossuhde haluttiin pitää samana kuin muissa TORCH-tuotesarjan tuotteissa eli 1:101-laimennossuhteena. Näytelaimennossuhde 1:101 oli myös todettu riittäväksi aikaisemmissa kvalitatiivisissa testeissä. Testattiin siis ainoastaan eri antigeenikonsentraatioiden vaikutusta näytteiden signaaleihin.

Orgenium Laboratories -yksikössä on aikaisemmin ollut käytössä kaupalliset konjugaattivasta-aineet sekä IgG- että IgM-testille. Koska Labsystems Diagnostics Oy:ssä on käytössä itse valmistetut IgG- ja IgM-konjugaatit, jotka on todettu toimiviksi lukuisissa yrityksen ELISA-testeissä, päätettiin myös *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testeissä testata yrityksen omia IgG- ja IgM-HRP-konjugaatteja. Konjugaattivasta-aineen vaihto kaupallisesta itse valmistettuun alentaisi huomattavasti testin valmistuskustannuksia.

Päällystysantigeenin pitoisuus optimoitiin testaamalla viittä eritasoista näytettä seitsemällä eri antigeenipitoisuudella ja kolmella eri konjugaattipitoisuudella. Päällystysantigeeni laimennettiin laimennossuhteilla 1:2500, 1:2000, 1:1500, 1:1000, 1:750, 1:500 ja 1:250 fosfaattipuskuriin, jonka pitoisuus oli 0,01 M. Testatut konjugaattivasta-ainepitoisuudet IgG- ja IgM-testille on esitettyinä taulukossa 3.

Taulukko 3. Testatut konjugaattipitoisuudet IgG- ja IgM-testeillä.

IgG-konjugaatti (µg/ml)	IgM-konjugaatti (µg/ml)
0,016	0,029
0,033	0,043
0,065	0,071

## 9.9 Kalibraattoriseerumien sekä kontrolliseerumien valinta

*Rubella* IgG -testiin valmistettiin viiden eritasoisen kalibraattorin sarja, joiden avulla testattavan näytteen konsentraatio pystytään määrittämään. Kalibraattoriseerumeina käytettiin kahta eri seerumia, joita titraamalla päädyttiin sopiviin sekoitussuhteisiin. Toinen seerumeista oli IgG-luokan vasta-aineiden suhteen positiivinen seerumi ja toinen IgG-luokan vasta-aineiden suhteen negatiivinen seerumi. Seerumien valintakriteereinä oli seerumien määrä seerumivarastossa sekä negatiivinen testitulos HIV- ja hepatiittitesteissä. Valittuja kalibraattoriseerumeita tuli siis olla seerumivarastossa jäljellä sen verran, että niistä voitaisiin valmistaa testien kalibraattorit vähintään seuraavan kahden vuoden aikana myytäviin testikitteihin. Lisäksi piti varmistaa, ettei samoja seerumeita oltu varattu minkään muun tuotteen kontrolli- tai kalibraattoriseerumeiksi. Seerumit olivat peräisin yrityksen omasta seerumivarastosta. Koska täysin negatiivista IgG-seerumia ei tutkimuksen puitteissa onnistuttu löytämään, päätettiin kalibraattorisarjan viimeisenä kalibraattorina käyttää pelkkää kalibraattoripuskuria.

*Rubella* IgM -testiin valmistettiin puolestaan kolme eritasoista kontrollia: negatiivinen kontrolli, positiivinen kontrolli ja raja-arvokontrolli (cut off -kontrolli). Raja-arvokontrolli on kontrolli, joka on lähellä positiivisen ja negatiivisen näytteen rajaa, jolloin niin kutsutusta cut off -alueesta eli raja-alueesta saadaan tarkempi.

## 9.10 Referenssinäytepaneelien kokoaminen

Referenssinäytepaneeli koostuu absorbansseiltaan eritasoisista seeruminäytteistä. Paneelin avulla voidaan testata tuotteen toimivuutta uuden tuote-erän valmistusvaiheessa ja kalibroida uusi tuote-erä edellisiä tuote-eriä vastaavalle tasolle. Jokaiselle referenssipaneelin näytteelle määritetään  $\pm 2SD$  ja  $\pm 3SD$  toleranssirajat, joiden sisäpuolelle näytteen tulee jäädä, kun uusi tuote-erä testataan referenssipaneelin näytteillä. Tuotteen kalibrointi suoritetaan konjugaattipitoisuutta säätämällä.

Referenssinäytepaneeleihin koottiin *Rubella* IgG -testiä varten 15 eritasoista näytettä ja *Rubella* IgM -testiä varten 17 eritasoista näytettä. Näytepaneelien näytteet koottiin pääasiassa yrityksen omasta seerumivarastosta. IgG-testin referenssiseerumeiksi löytyi melko helposti suoraan eritasoisia IgG-luokan vasta-aineiden suhteen positiivisia seerumeita. IgG-luokan vasta-aineiden suhteen negatiivisten seerumeiden löytyminen oli astetta haastavampaa, koska suurin osa testatuista seerumeista oli IgG-luokan vasta-aineiden suhteen positiivisia. Lopulta päädyttiin tilaamaan yksi kaupallinen IgG-luokan vasta-aineiden suhteen negatiivinen seerumi, jotta paneelista saataisiin tarpeeksi kattava. IgM-testiä varten koottuun referenssipaneeliin oli puolestaan vaikea löytää eritasoisia IgM-vasta-aineiden suhteen positiivisia seerumeita. Niinpä IgM-testin paneelia kootessa päädyttiin yhdistelemään muutamaa positiivista IgM-luokan vasta-ainetta sisältävää seerumia eri suhteissa IgM-vasta-aineiden suhteen negatiivisiin seerumeihin. Näin saatiin keinotekoisesti valmistettua eritasoisista seerumeista koostuva referenssipaneeli IgM-testille.

## **9.11 Protoerillä tehdyt testaukset**

### **9.11.1 Testin sisäinen toistettavuus**

Protoerien testien sisäistä toistettavuutta testattaessa testattiin IgG-testissä kalibraattoreiden sisäistä variaatiota ja IgM-testissä kontrollien sisäistä variaatiota. IgG-testiajossa kutakin kalibraattoria testattiin 16 rinnakkaisena näytteenä. IgG-testiajossa ajettiin lisäksi WHO:n standardi samassa testiajossa, jolloin myös kalibraattoreiden konsentraatioiden sisäinen variaatio saatiin määritettyä. Myös IgM-testissä kontrollien sisäistä variaatiota testattiin 16 rinnakkaisella näytteellä. Testien tuloksista laskettiin kullekin IgG-testin kalibraattorille sekä IgM-testin kontrollille keskiarvo, keskihajonta ja



variaatiokerroin. Lisäksi määritettiin 95 %:n ja 99 %:n luottamusvälit eli toleranssirajat t-jakaumaan perustuen.

### 9.11.2 Testisarjojen välinen toistettavuus

Testisarjojen välistä toistettavuutta testattiin sekä IgG- että IgM-testillä neljällä eritasoisella referenssipaneelin näytteellä. IgG-testisarjoissa näytteiksi valittiin näytteet 539, 535, H95 ja H91. IgM-testissä puolestaan testattiin näytteet RUM2, RUM6, RUM8 ja RUM9. Näytteet testattiin yhteensä kymmenessä erillisessä testiajossa siten, että jokaisessa testiajossa ajettiin yhteensä neljä erikseen laimennettua näytettä ja jokainen näytelaimennos ajettiin kahtena rinnakkaisena näytteenä. Yhteensä kutakin näytettä ajettiin siis 40 erillisenä näytelaimennoksena. Tuloksista laskettiin testisarjojen välinen keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Lisäksi kullekin testatulle näytteelle määritettiin  $\pm 2SD$  ja  $\pm 3SD$  toleranssirajat.

### 9.11.3 Näytelaimennosten lineaarisuus

Näytelaimennosten lineaarisuustestauksen tarkoituksena oli testata testin lineaarisuutta laajalla laimennosalueella, jolloin esimerkiksi mittausalueen yläpuolelle jäävät vahvasti positiiviset näytteet voidaan laimentaa useaan kertaan, jotta näytteen pitoisuus jäisi standardisuoran mittauspisteiden sisäpuolelle. Ottaen huomioon näytteen laimennuskertoimet, tulokset ovat tällöin vertailukelpoisia matalien, laimentamattomien näytteiden kanssa. Lineaarisuuden laskentakaava on kuvattuna kaavassa (2).

$$\text{Lineaarisuus\%} = \frac{\text{Havaittu arvo} * \text{laimennoskerroin}}{\text{Laskettu arvo}} * 100 \quad (2)$$

Testien lineaarisuutta tutkittiin tekemällä laimennossarja selkeästi positiivisista seeruminäytteistä näytelaimennospuskuriin ja vertaamalla testin antamia konsentraatioita

laskennallisiin konsentraatioihin. Testatut näytelaimennokset olivat sekä IgG-, että IgM-testillä 1:1 (vertailupitoisuus), 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4 ja 1:8.

#### **9.11.4 Stressitestit**

Labsystems Diagnostics Oy:ssä on päädytty antamaan tuotteelle kuuden kuukauden säilyvyys 4 °C:ssa tuotteen säilyessä 23 °C:ssa kolme viikkoa ja vuoden säilyvyys 4 °C:ssa tuotteen säilyessä 37 °C:ssa kolme viikkoa.

Protoerien säilyvyyttä testattiin säilyttämällä protoerien kittikomponentteja 23 °C:ssa ja 37 °C:ssa kolme viikkoa, jonka jälkeen kitit testattiin referenssinäytepaneelien seeruminäytteillä. Vertailussa otettiin rinnalle 4 °C:ssa säilytetty vertailukitti. Tuotteet testattiin säilyvyydestin alussa, puolivälissä ja lopussa. Testien tuloksista laskettiin konsentraatiot (IU/ml, EIU) referenssinäytteille ja verrattiin niitä aikaisemmin määritettyihin näytteiden toleranssirajoihin. Protoerillä tehtyjen säilyvyytestausten tulokset ovat suuntaa antavia, ja varsinaiset viralliset säilyvyytestaukset tehdään vasta validointivaiheen tuote-erillä.

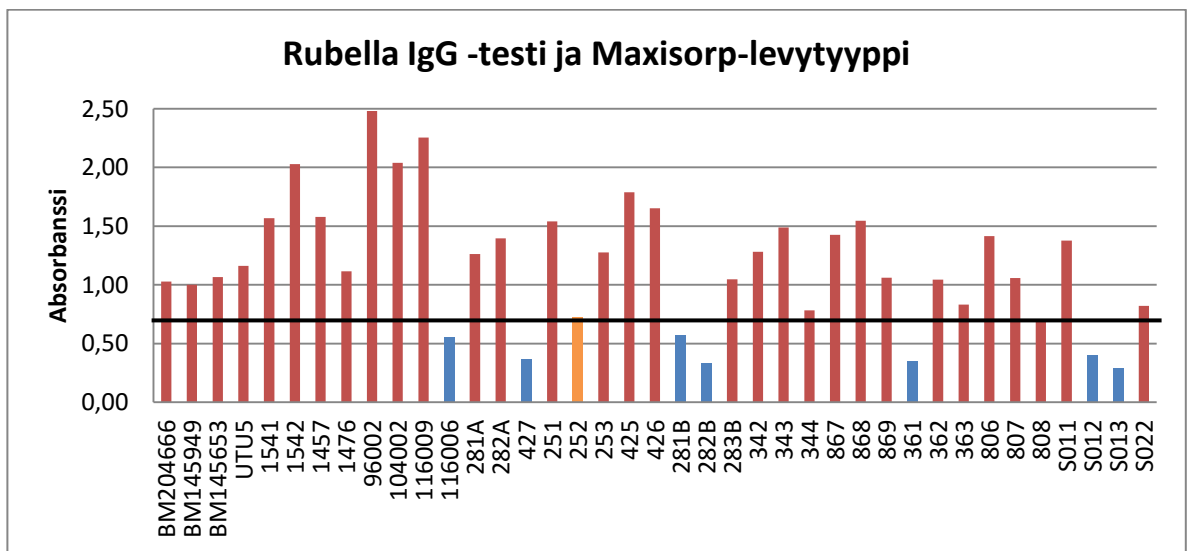
#### **9.11.5 Vertailu kilpailijoiden ELISA-testien kanssa**

Protoerillä tehtiin lisäksi vertailutestit kahden eri kilpailijan *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testien välillä. Vertailutestien tuloksista laskettiin korrelaatiot Orgenium Laboratories -yksikön testien sekä kilpailijoiden ELISA-testien välille. Vertailutestien tarkoituksena oli varmistaa, että Orgenium Laboratories -yksikön ELISA testit ovat vähintään yhtä laadukkaita kuin kilpailijoiden vastaavat ELISA-testit.

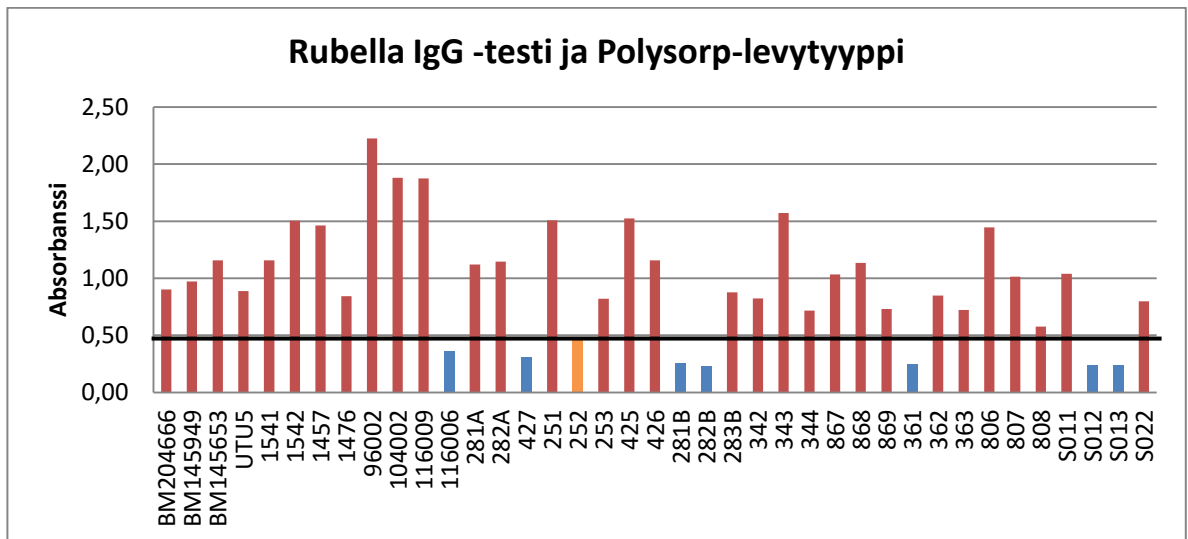
## 10 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 10.1 Mikroitiitterilevyn valinta

*Rubella* IgG -testillä ei havaittu merkittävää eroa Maxisorp- ja Polysorp-levytyyppejä vertailtaessa. Kuvissa 9 ja 10 on esitetty varmennettujen näytteiden tulokset Maxisorp- ja Polysorp-levytyypeillä. Molemmilla levytyypeillä negatiiviset näytteet pysyivät cut off -rajan alapuolella ja positiiviset näytteet cut off -rajan yläpuolella. Kuten odotettua, Maxisorp-levyllä näytteiden absorbanssitaset ovat korkeampia kuin Polysorp-levyllä tehokkaamman adsorptiokyvyn ansiosta.



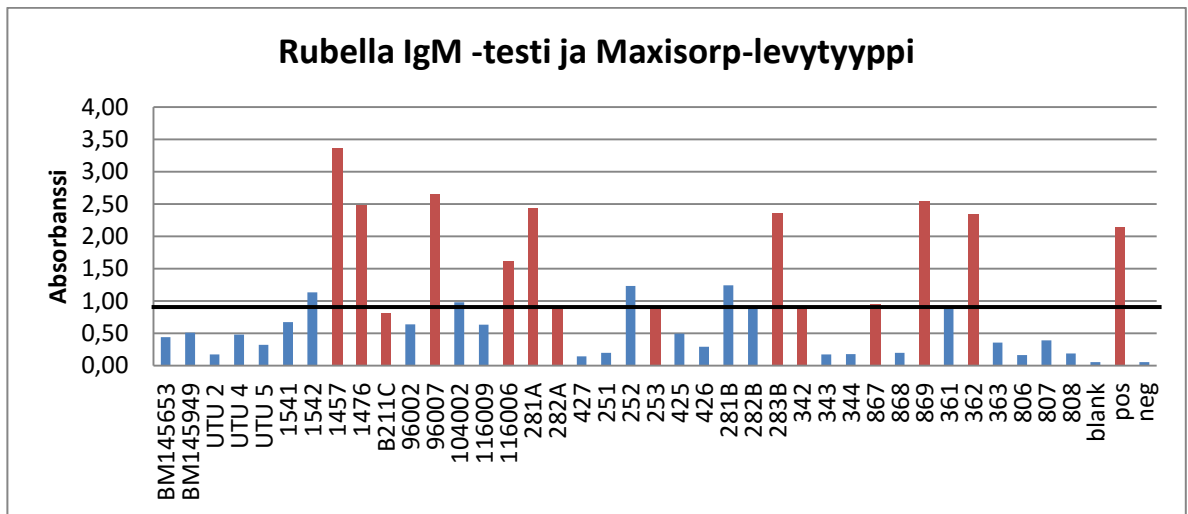
Kuva 9. *Rubella* IgG -testi ja varmennetut näytteet Maxisorp-levytyypillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi (OD). Punaiset pylväät kuvaavat positiivisia näytteitä, siniset pylväät negatiivisia näytteitä ja oranssi pylväs raja-arvoista näytettä. Musta poikkiviiva kuvaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja-alueita.



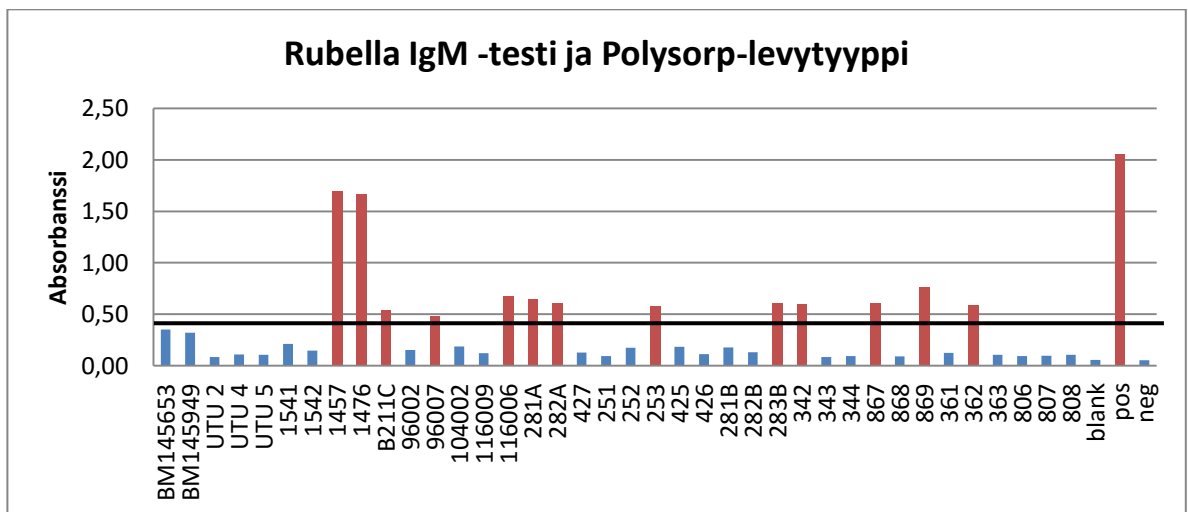
Kuva 10. Rubella IgG -testi ja varmennetut näytteet Polysorp-levytyypillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi (OD). Punaiset pylväät kuvaavat positiivisia näytteitä, siniset pylväät negatiivisia näytteitä ja oranssi pylväs raja-arvoista näytettä. Musta poikkiviiva kuvaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja-aluetta.

Kuvassa 11 on esitetty IgM-testin varmennettujen näytteiden absorbanssit eri näytteillä testattaessa Maxisorp-levytyypillä. Kuvassa 12 puolestaan on esitetty samat näytteet testattaessa Polysorp-levytyypillä. Kuten kuvista 11 ja 12 huomataan, on erottelukyky Polysorp-levytyypillä parempi kuin Maxisorp-levytyypillä, koska kaikki negatiiviset näytteet jäävät cut off -rajan alapuolelle ja positiiviset näytteet pysyvät cut off -rajan yläpuolella. Esimerkiksi IgM-vasta-aineiden suhteen negatiivisiksi varmennetut seeruminäytteet 252, 281B sekä 282B antoivat Maxisorp-levytyypillä hieman yli cut off -rajan olevia absorbansseja, kun taas Polysorp-levytyypillä kaikki edellä mainitut näytteet jäivät selvästi negatiivisiksi.

Mikrotiitterilevytyypiksi valittiin siis IgG-testillä Maxisorp-levytyyppi ja IgM-testillä Polysorp-levytyyppi, koska erottelukyky oli IgM-testissä Polysorp-levytyypillä Maxisorp-levytyyppiä parempi.



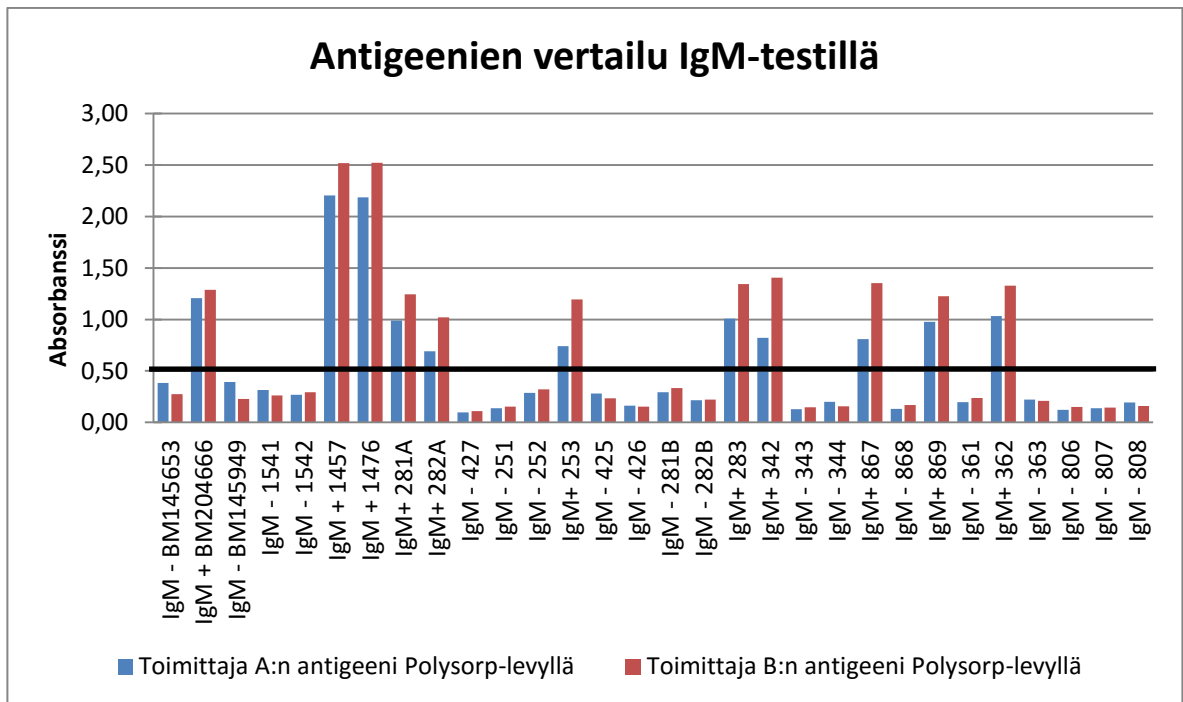
Kuva 11. *Rubella* IgM -testi ja varmennetut näytteet Maxisorp-levytyypillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi (OD). Punaiset pylväät kuvaavat positiivisia näytteitä ja siniset pylväät negatiivisia näytteitä. Musta poikkiviiva kuvaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja-alueita.



Kuva 12. *Rubella* IgM -testi ja varmennetut näytteet Polysorp-levytyypillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi (OD). Punaiset pylväät kuvaavat positiivisia näytteitä ja siniset pylväät negatiivisia näytteitä. Musta poikkiviiva kuvaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja-alueita.

## 10.2 Päälystysantigeenien vertailu IgM-testillä

Päälystysantigeenien vertailu toteutettiin vertaamalla kahden eri valmistajan *Rubella*-antigeenejä. Vertailtaviksi antigeeneiksi valikoituivat helpoimman saatavuuden perusteella toimittaja A:n antigeeni ja toimittaja B:n antigeeni. Kuvassa 13 on esitetty varmennettujen näytteiden absorbanssit sekä toimittaja A:n antigeenillä että toimittaja B:n antigeenillä. Kuten kuvasta voidaan havaita, toimittaja B:n antigeenillä erottelukyky on hieman toimittaja A:n antigeenin erottelukykä parempi. Ero ei kuitenkaan vaikuta merkitykselliseltä, koska jopa toimittaja A:n antigeenillä kaikki testatut varmennetut näytteet antavat oikean tuloksen. Koska toimittaja B:n antigeeni on huomattavasti toimittaja A:n antigeeniä kalliimpi, päätettiin IgM-testin päälystysantigeeniksi valita hieman huonommasta erottelukyvystä huolimatta toimittaja A:n antigeeni.



Kuva 13. Antigeenien vertailu IgM-testillä. Musta poikkiviiva kuvaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen raja-alueita.

### 10.3 Blokkauksen menetelmien vertailu

Eri blokkauksen menetelmissä ei havaittu oleellisia eroja. Liitteessä 1 on esitetty *Rubella* IgG -testillä tehtyjen blokkauksen menetelmien tulokset eri näytteille ja liitteessä 2 *Rubella* IgM -testin tulokset eri näytteille. Taulukossa 4 on yhteenvedonä kuvattuna kunkin näytteen variaatiokertoimet (CV) eri blokkauksen käsittelyillä ja taulukossa 5 vastaavasti kunkin näytteen variaatiokertoimet IgM-testin viidelle eritasoiselle näytteelle. Jokaisella blokkauksen menetelmällä taustan absorbanssi jäi alle arvon 0,10, joten jokaisella blokkauksen menetelmällä epäspesifisten sitoutumiskohtien ilmeneminen saatiin estettyä. Korkeat variaatiokertoimet taustan absorbanssissa joillakin blokkauksen menetelmillä johtuvat variaatiokertoimen laskentatavasta (keskihajonta/keskiarvo); matalan absorbanssin mittauksissa variaatiokerroin on tyypillisesti korkeampi kuin korkean absorbanssin mittauksissa.

Taulukko 4. IgG-testin viiden eri näytteen variaatiokertoimet (CV %) kymmenellä eri blokkauksen menetelmällä, jotka on esitetty taulukossa 2. Taulukossa (-) on negatiivinen näyte, (+/-) on raja-arvoinen näyte, (+) on positiivinen näyte ja (++) on vahva positiivinen näyte.

Menettely	540 (-)	T121 (-)	537 (+/-)	H95 (+)	H91 (++)
1	5 %	5 %	2 %	1 %	1 %
2	3 %	0 %	1 %	2 %	1 %
3	4 %	3 %	2 %	2 %	1 %
4	8 %	6 %	9 %	10 %	3 %
5	6 %	4 %	4 %	5 %	1 %
6	4 %	6 %	1 %	1 %	2 %
7	3 %	2 %	2 %	47 %	2 %
8	4 %	4 %	2 %	6 %	3 %
9	2 %	5 %	1 %	3 %	1 %
10	3 %	2 %	5 %	4 %	3 %

Kuten taulukosta 4 voidaan havaita, näytteiden variaatiokertoimet ovat alle 10 % jokaisella blokkusmenetelmällä lukuun ottamatta menetelmää 7, jossa näytteen H95 variaatiokerroin on 47 %. Menetelmässä 7 yksi näytteen H95 kolmesta rinnakkaisesta näytteestä poikkeaa kuitenkin huomattavasti kahdesta muusta ja koska menetelmässä 7 kaikkien muiden testattujen näytteiden variaatiokerroin on jopa alle 5 %, voidaan olettaa että näytteen H95 korkea variaatiokerroin johtuu niin kutsutusta outlier-pisteestä (poikkeava havainto) eikä niinkään huonosta blokkusmenetelmästä. Näin ollen IgG-testin kohdalla jokainen testattu blokkusmenetelmä oli riittävä epäspesifisten sitoutumiskohtien estämiseksi.

Taulukko 5. IgM-testin viiden eri näytteen variaatiokertoimet (CV %) kymmenellä eri blokkusmenetelmällä, jotka on esitetty taulukossa 2. Taulukossa (-) on negatiivinen näyte, (+/-) on raja-arvoinen näyte, (+) on positiivinen näyte ja (++) on vahva positiivinen näyte.

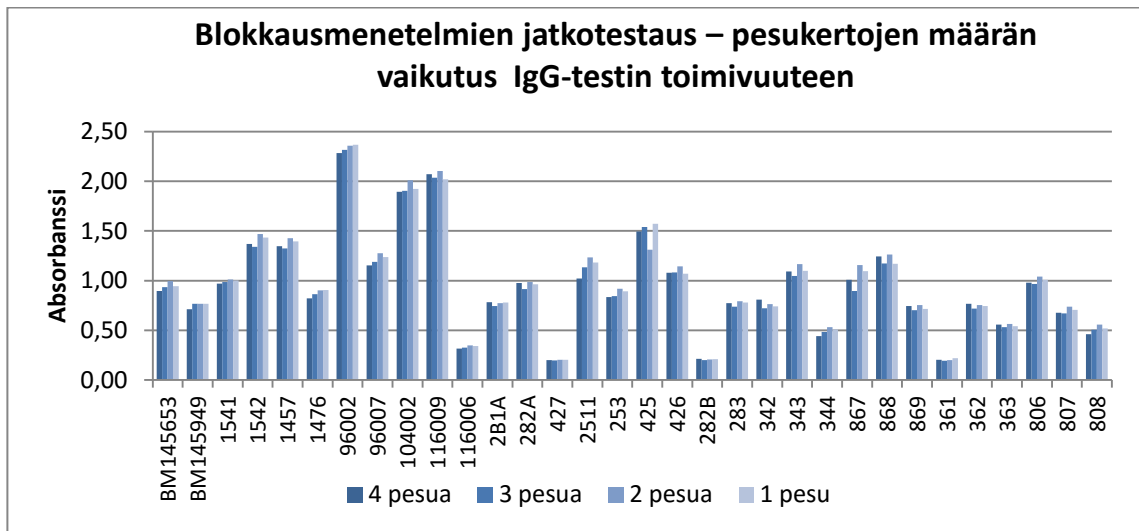
Menettely	RUM16 (-)	RUM3 (+/-)	RUM17 (+/-)	RUM9 (+/-)	RUM7 (+)
1	8 %	2 %	11 %	5 %	6 %
2	5 %	1 %	9 %	7 %	6 %
3	8 %	10 %	4 %	10 %	17 %
4	6 %	2 %	7 %	2 %	3 %
5	29 %	18 %	4 %	11 %	5 %
6	17 %	3 %	3 %	2 %	1 %
7	10 %	10 %	8 %	5 %	3 %
8	4 %	5 %	9 %	5 %	3 %
9	2 %	5 %	7 %	1 %	3 %
10	3 %	5 %	6 %	5 %	10 %

Kuten taulukosta 5 voidaan havaita, myös IgM-testillä testatut blokkusmenetelmät toimivat varsin hyvin. Menettelyillä 3 ja 5 useamman kuin yhden näytteen variaatiokerroin oli yli 10 %. Koska tuotantoteknisesti paras blokkusvaihtoehto eli pelkkä levyjen pesu

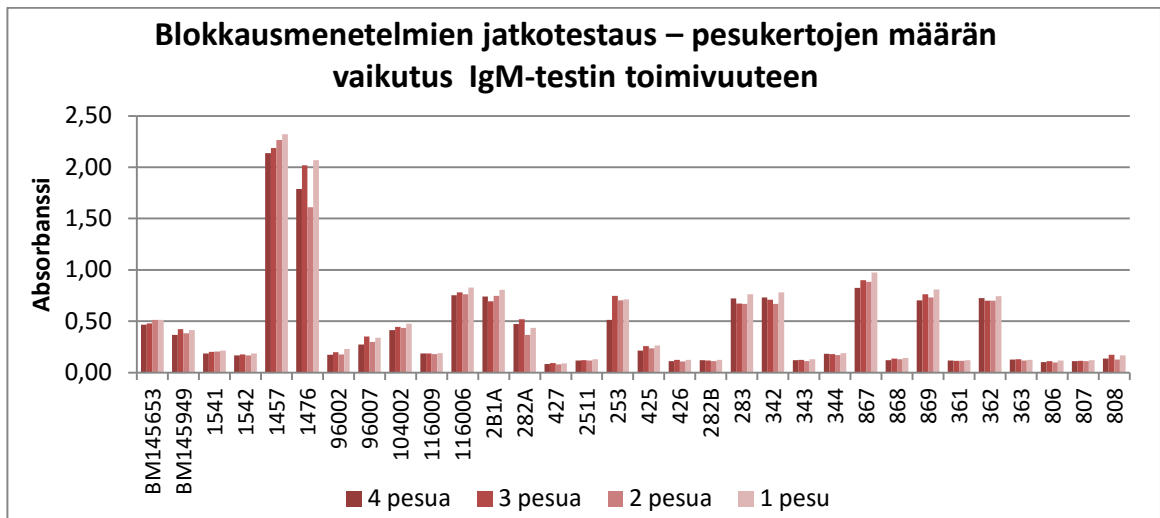


blokkauksiliuksella (käsittely 1) oli sekä IgG- että IgM-testillä toimiva, testattiin vielä pesukertojen määrän vähentämisen vaikutusta blokkaukseen.

Kuvassa 14 on esitetty eri pesukertojen määrien vaikutusta eritasoisten näytteiden absorbansseihin IgG-testillä ja kuvassa 15 vastaava testi IgM-testillä. Kuten kuvista voidaan huomata, ei pesukertojen määrällä ole vaikutusta blokkauksen onnistumiseen ja jopa yksi pesukerta blokkauksiliuksella vaikuttaisi riittävästä estämään epäspesifisten sitoutumiskohtien ilmenemisen. Vaikka yksi pesukerta vaikuttaakin olevan riittävä, päätettiin sekä IgG- että IgM-testillä pesukertojen määräksi valita varmuuden vuoksi kaksi, jotta blokkauks oli varmasti riittävä. Sama blokkauksmenetelmä molemmilla testityypeillä helpottaa testien valmistusta tuotannossa, koska molemman testityypin testit voidaan blokata samassa prosessissa.



Kuva 14. Blokkauksmenetelmien jatkotestaus – pesukertojen määrän vaikutus blokkauksen onnistumiseen IgG-testillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna testatut näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi.



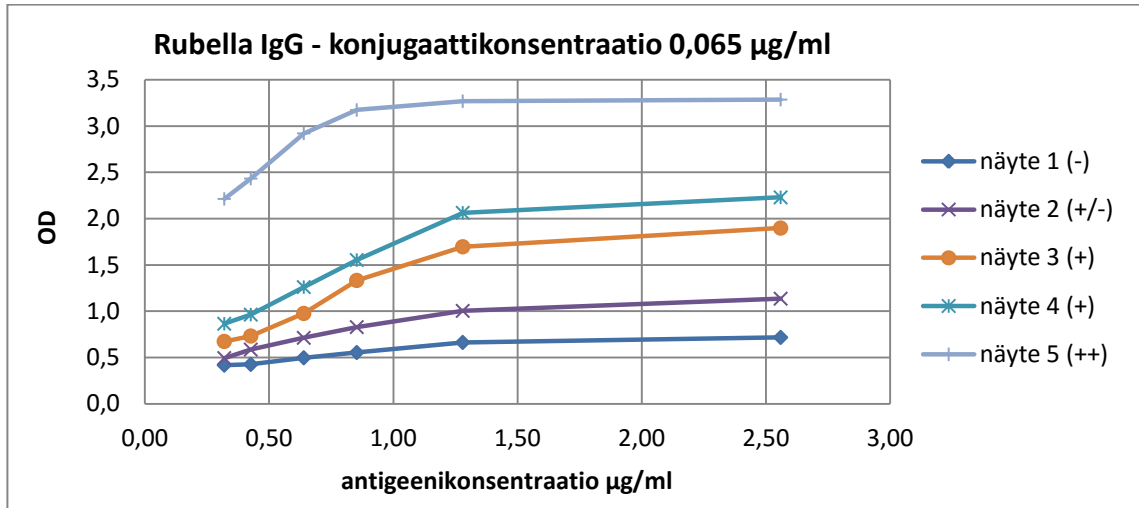
Kuva 15. Blokkausmenetelmien jatkotestaus – pesukertojen määrän vaikutus blokkauksen onnistumiseen IgM-testillä. Vaaka-akselilla on kuvattuna näytteet ja pystyakselilla näytteen absorbanssi.

#### 10.4 Päälystysantigeenin pitoisuuden sekä konjugaatin pitoisuuden optimointi

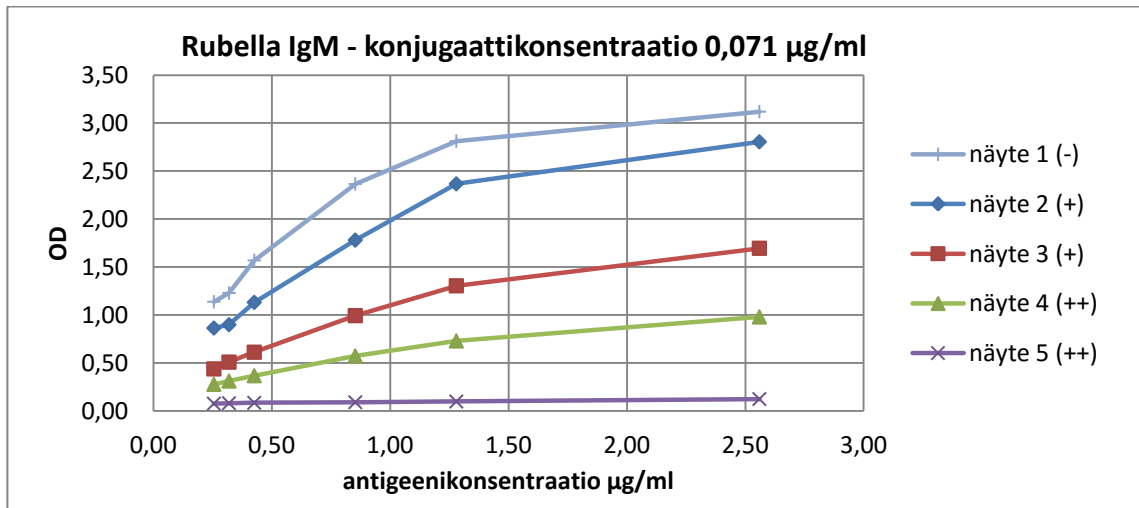
Päälystysantigeenin pitoisuudet kolmella eri antigeenipitoisuudella on esitettyä *Rubella* IgG -testille liitteessä 3 ja *Rubella* IgM -testille liitteessä 4. Tavoiteltu cut off -arvo eli positiivisen ja negatiivisen näytteen raja-arvo absorbanssiyksikköinä haluttiin asettaa molemmissa testeissä välille 0,5 – 1,0, jotta testin erottelukyvystä tulisi riittävän tarkka. Tulosten perusteella päädyttiin molempien testien osalta vahvimpaan konjugaattipitoisuuteen kolmesta testatusta konjugaattipitoisuudesta. *Rubella* IgG -testillä sopivaksi todettu konjugaattikonsentraatio oli siis noin 0,065 µg/ml ja *Rubella* IgM -testillä noin 0,071 µg/ml. Kuvissa 16 ja 17 on esitettyä viiden eri näytteen absorbanssit antigeenipitoisuuden funktiona valitulla konjugaattivahvuudella.

Antigeenikonsentraatioksi valittiin molemmilla testeillä 1:750 antigeenilaimennos, mikä vastaa noin 0,85 µg/ml konsentraatiota. Kuvista 16 ja 17 voidaan havaita, että

erottelukyky laimennossuhteella 1:750 on riittävän hyvä eikä korkeampi antigeenipitoisuus enää merkittävästi paranna erottelukykyä.



Kuva 16. *Rubella* IgG -testi ja viiden näytteen absorbanssit (OD) eri antigeenikonsentraatioilla. Vaaka-akselilla on päällystysantigeenin konsentraatio ja pystyakselilla näytteen absorbanssi.



Kuva 17. *Rubella* IgM -testi ja viiden näytteen absorbanssit (OD) eri antigeenikonsentraatioilla. Vaaka-akselilla on päällystysantigeenin konsentraatio ja pystyakselilla näytteen absorbanssi.

## 10.5 Kalibraattorit ja kontrollit

IgG-testin viisi eritasoista kalibraattoriseerumia päädyttiin valmistamaan yrityksen seerumivarastosta löytyvistä seerumeista H489 ja 358. Seerumit oli todettu hepatiitti- ja HIV-vapaiksi ja niiden määrän varastossa arvioitiin riittävän ainakin kahdeksi seuraavaksi vuodeksi.

Kalibraattoriseerumeista valmistettiin laimentamalla IgG-positiivista seerumia IgG-negatiiviseen seerumiin eri suhteilla. Absorbanssiyksiköitä vastaavat konsentraatiotasot määritettiin WHO:n kansainvälistä standardia (Anti Rubella immunoglobulin, RUBI-1-94) vasten tekemällä standardista vastaavasti laimennossarja. Standardia vasten piirretystä kuvaajasta määritettiin kalibraattorilaimennosten konsentraatiot ja valittiin viisi seerumilaimennosta, joita päädyttiin käyttämään testin varsinaisina kalibraattoreina. Laimennokset valittiin sillä perusteella, että yksi kalibraatiopiste oli lähellä positiivisen ja negatiivisen tuloksen rajaa, jotta raja-alueesta tulisi mahdollisimman tarkka. Loput kalibraattoripisteet valittiin niin, että kuvaaja kattaisi mahdollisemman hyvin koko mittausalueen, joka ulottuu kuoppalevylukijasta riippuen välille OD 2,0 - 3,0. Valitut kalibraattoreiden laimennossuhteet seerumeilla H489 ja 358 on kuvattuna taulukossa 6.

Taulukko 6. *Rubella* IgG -testin kalibraattoriseerumien valmistus.

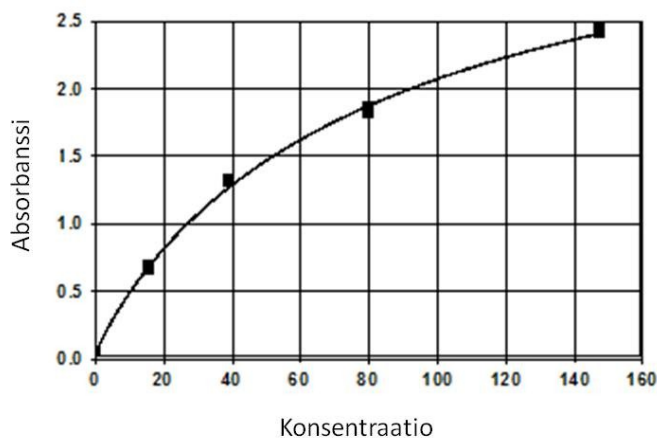
IgG-testin kalibraattori	% - H489 (IgG ++)	Määrä (µl) seerumi H489 (IgG ++)	Määrä (µl) seerumi 358 (IgG -)	Kokonaismäärä (µl)
Kalibraattori 1	25 %	250	750	1000
Kalibraattori 2	10 %	100	900	1000
Kalibraattori 3	5 %	50	950	1000
Kalibraattori 4	0,5 %	5	995	1000
Kalibraattori 5	-	-	-	

*Rubella* IgG -vasta-aineen raja-arvo on kliinisten laboratoriostandardien kansallisen komitean (NCCLS, nyk. CLSI) ehdotuksen mukaan 10 IU/ml (Skendzel 1996). IgG-testille päädyttiin taulukon 7 mukaiseen tulosten tulkintasuositukseen. Tulkintasuositukset esitetään asiakkaalle valmiin testin käyttöohjeessa. Mikäli testitulos on raja-arvoinen, suositellaan näytteen uudelleentestausta.

Taulukko 7. IgG-testille määrätyt tulkintarajat.

	Negatiivinen testitulos	Raja-arvoinen testitulos	Positiivinen testitulos
<i>Rubella</i> IgG -vasta-ainepitoisuus (IU/ml)	< 10	10-15	> 15

IgG-testin kalibraatiokuvaaja noudattaa ELISA-testille tyypillistä neljän parametrin logistista mallia (4PL). Mallin sovitus ja konsentraatioiden laskenta suoritettiin Multiscan Ascent™ -mittausohjelmalla (Thermo Scientific™). Esimerkkokuvaaja IgG-testin protoerän kalibraatiokuvaajasta on esitettyä kuvassa 18.



Kuva 18. Esimerkki IgG-testin kalibraatiokuvaajasta, jossa vaaka-akselilla on näytteen konsentraatio ja pystyakselilla mitattu absorbanssi (OD).

Valmiiseen testikittiin päädyttiin pakkamaan niin kutsutut käyttövalmiit (ready-to-use) kalibraattoriliuokset, joita asiakkaan ei tarvitsisi itse laimentaa testin suoritusvaiheessa. Kalibraattoriseerumit laimennettiin yrityksen valmiiseen kontrollipuskuriin samassa laimennossuhteessa kuin näytteet laimennetaan näytelaimennospuskuriin eli laimennossuhteessa 1:101. Kontrollipuskuri oli havaittu toimivaksi useassa yrityksen ELISA-testissä, joten puskurin koostumusta ei nähty tarpeelliseksi ryhtyä muuttamaan.

IgM-testin kontroleihin päädyttiin käyttämään yrityksen seerumivaraston seerumeita 1476 ja 535. Kuten IgG-testin kalibraattoriseerumit, myös IgM-testin kontrolliseerumit oli todettu HIV:n ja hepatiitin suhteen negatiivisiksi, joten ne soveltuivat käytettäväksi kontrolliseerumeina. Seerumi 1476 oli selkeästi positiivinen IgM-vasta-aineiden suhteen, joten se soveltui hyvin positiiviseksi kontrolliksi.

Koska ei ole olemassa kansainvälistä standardia, jota vasten IgM-pitoisuus voitaisiin määrittää, esitettiin IgM-vasta-ainetestissä tulokset määrittelemättömissä EIA-yksiköissä (EIU) kaavan 3 mukaisesti.

$$\text{Vasta-ainetaso (EIU)} = \frac{OD_{\text{näyte}} - OD_{\text{negatiivinen}}}{OD_{\text{positiivinen}} - OD_{\text{negatiivinen}}} \times 100 \text{ EIU}, \quad (3)$$

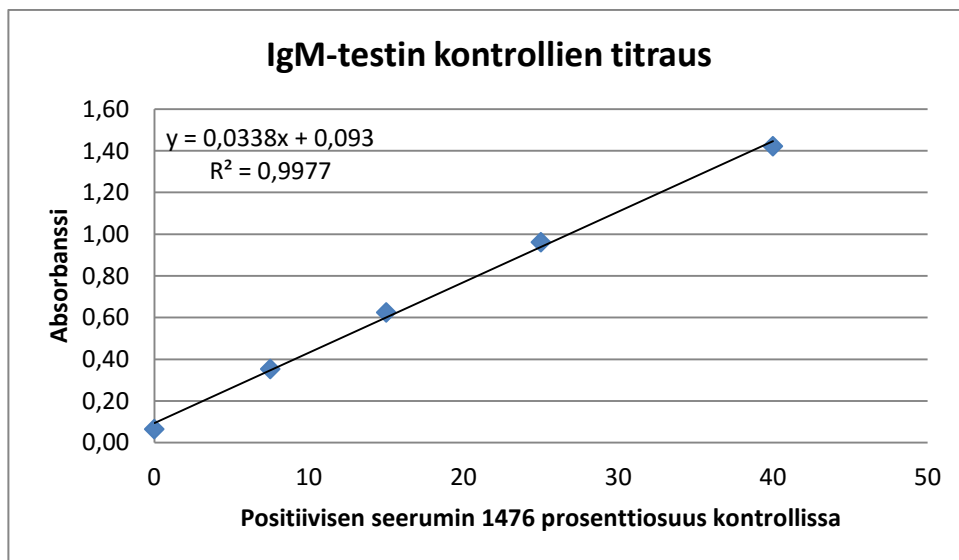
jossa  $OD_{\text{näyte}}$  on näytteen absorbanssi,  $OD_{\text{negatiivinen}}$  on negatiivisen kontrollin absorbanssi ja  $OD_{\text{positiivinen}}$  on positiivisen näytteen absorbanssi. Kuten kaavasta 3 voidaan päätellä, positiivisen kontrollin konsentraatio EIU-yksiköissä on näin ollen 100 EIU ja negatiivisen kontrollin konsentraation 0 EIU.

Taulukossa 8 on esitetty IgM-testin kontrolliseerumien valmistus. Positiivikontrollin absorbanssitaso valittiin vertaamalla sitä varmennettujen näytteiden absorbanssitasoihin.

Koska positiivisiksi varmennettujen näytteiden absorbanssit jäivät lähes poikkeuksetta matalammiksi kuin positiivisen kontrollin absorbanssi, katsottiin kontrollin olevan riittävän positiivinen IgM-vasta-aineiden suhteen. Lisäksi alue positiivisen kontrollin ja negatiivisen kontrollin välillä on lineaarinen, kuten kuvasta 19 voidaan havaita. IgG-testin tavoin myös IgM-testissä kontrollit päätettiin valmistaa käyttövalmiiksi kontrolleiksi laimentamalla seerumit kontrollipuskuriin laimennossuhteella 1:101.

Taulukko 8. IgM-testin kontrolliseerumien valmistus.

IgM-testin kontrolli	% - 1476 (IgM ++)	Määrä (µl) seerumi 1476 (IgM ++)	Määrä (µl) seerumi 535 (IgM -)	Kokonaismäärä (µl)
Positiivikontrolli	40 %	400	600	1000
Cut off -kontrolli	9 %	90	910	1000
Negatiivikontrolli	0 %	-	1000	1000



Kuva 19. IgM-testin kontrolliseerumien laimennoskuvaaja. Vaaka-akselilla on positiivisen seerumin 1476 prosenttiosuus kontrollissa ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

## 10.6 Referenssinäytepaneelit

Valmiit referenssinäytepaneelit IgG- ja IgM-testille on esitettyinä taulukossa 9. IgG-testin valmis referenssinäytepaneeli koostuu 15 eritasoisesta näytteestä ja IgM-testin referenssipaneeli 17 eritasoisesta näytteestä. Protoerillä tehdyt testaukset on tehty referenssinäytepaneelin näytteillä.

Taulukko 9. Referenssinäytepaneelit IgG- ja IgM-testille.

IgG-testin referenssipaneeli		IgM-testin referenssipaneeli	
Näyte	Konsentraatio (IU/ml)	Näyte	Konsentraatio (EIU)
538 (IgG-)	11,0	RUM1 (IgM+)	58,3
539 (IgG-)	8,9	RUM2 (IgM+)	35,9
540 (IgG-)	8,5	RUM3 (IgM+)	22,0
T121 (IgG +/-)	13,5	RUM4 (IgM+/-)	10,1
535 (IgG +/-)	12,2	RUM5 (IgM+)	83,2
537 (IgG +/-)	17,4	RUM6 (IgM+)	67,3
524 (IgG +)	26,9	RUM7 (IgM+)	24,0
246 (IgG +)	33,1	RUM8 (IgM+)	14,2
H433 (IgG +)	36,9	RUM9 (IgM+/-)	8,7
H95 (IgG +)	37,3	RUM10 (IgM-)	6,8
607 (IgG +)	53,2	RUM11 (IgM-)	5,0
H374 (IgG ++)	115,8	RUM12 (IgM+)	32,3
H91 (IgG ++)	139,0	RUM13 (IgM+)	21,6
H67 (IgG ++)	126,0	RUM14 (IgM+)	73,2
608 (IgG ++)	108,7	RUM15 (IgM-)	3,5
-	-	RUM16 (IgM-)	2,1
-	-	RUM17 (IgM+/-)	11,4



## 10.7 Protoerillä tehdyt testaukset

### 10.7.1 Toistettavuustestaukset

Testin sisäisen toistettavuustestauksen tulokset IgG-testin kalibraattoreille on esitetty taulukossa 10 ja IgM-testin kontrolleille taulukossa 11. Kuten tuloksista voidaan huomata, testin sisäisessä toistettavuudessa IgG-testin kalibraattoreilla sekä IgM-testin kontrolleilla variaatiokerroin (CV) on useimmissa tapauksissa alle 10, mikä on hyvä variaatiokerroin ELISA-testille. Testin sisäisen toistettavuuden keskiarvoja ja toleranssirajoja voidaan käyttää suuntaa-antavina arvoina IgG-testin kalibraattoreille ja IgM-testin kontrolleille. Varsinaisille validointierille kontrollien ja kalibraattoreiden arvojen määrittämisessä on kuitenkin huomioitava myös eri testauskertojen ja testin käyttäjien aiheuttama variaatio.

Taulukko 10. *Rubella*-IgG-testin sisäinen toistettavuus ja toleranssirajat kalibraattoreille.

IU/ml	toistojen lkm (n)	keskiarvo (IU/ml)	keskihajonta	CV %	Toleranssiraja (95 %)		Toleranssiraja (99 %)	
					alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Kalibraattori 1	16	152,9	18,8	12 %	112,9	192,9	97,6	208,2
Kalibraattori 2	16	71,4	5,7	8 %	59,2	83,5	54,6	88,2
Kalibraattori 3	16	39,8	3,2	8 %	33,0	46,6	30,4	49,3
Kalibraattori 4	16	15,7	1,2	8 %	13,1	18,3	12,1	19,3
Kalibraattori 5	16	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,1

Taulukko 11. *Rubella*-IgM-testin sisäinen toistettavuus ja toleranssirajat kontrolleille.

EIU	toistojen lkm (n)	Keskiarvo (EIU)	keskihajonta	CV %	Toleranssiraja (95 %)		Toleranssiraja (99 %)	
					alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Positiivinen kontrolli	16	100	6,4	6 %	86,4	113,6	81,1	118,9
Raja-arvokontrolli	16	24,4	2,7	11 %	19,8	31,4	17,5	33,7
Negatiivinen kontrolli	16	0	2,3	-	0,0	4,8	0,0	6,7

Taulukossa 12 on esitetty tulokset testisarjan välisen toistettavuustestauksen tuloksista IgG-testille ja taulukossa 13 on esitetty vastaavat tulokset IgM-testille. Koska testeissä toistojen lukumäärä (n = 40) on yli 30, on toleranssirajojen muodostuksessa käytetty normaalijakauman laskusääntöjä. Suhteelliselle varianssille ei ole olemassa yhtä yleisesti hyväksyttyä rajaa, jonka alapuolelle testitulosten tulisi jäädä, koska suhteelliset varianssit voivat vaihdella paljonkin eri testityypistä riippuen. Yleisesti ottaen Labsystems Diagnostics Oy:n ELISA-testeillä suhteelliset varianssit ovat olleet alle 20 %, useimmiten jopa lähellä 10 %.

IgG-testillä suhteellinen varianssi on suuri erityisesti näytteillä, joilla IgG-konsentraatio on korkea. Tämä johtuu kalibraatiokuvaajan muodosta (kuva 18), joka muuttuu sitä loivemmaksi, mitä korkeammaksi näytteen konsentraatio kasvaa. Korkeilla konsentraatioilla pienikin absorbanssitason muutos vaikuttaa merkittävästi konsentraatioon. Tämä ei kuitenkaan ole ongelma testin luotettavuuden kannalta, koska korkean konsentraation näytteet ovat kaukana raja-arvoalueesta, joka on testin kannalta merkittävin konsentraatioalue. Sen sijaan raja-arvoalueelle jäävän referenssinäytteen 535 suhteellinen variaatio on ainoastaan 13 %, mikä on hyväksyttävä arvo testien välistä toistettavuutta arvioitaessa. IgM-testillä suhteelliset varianssit sen sijaan ovat matalampia kuin IgG-testillä. Yksi syy tähän on kalibraatiokuvaajan muoto, joka on IgM-testissä suora toisin kuin IgG-testillä.

Testien välisen toistettavuustestauksen tulokset antavat suuntaa antavat toleranssirajat neljälle referenssinäytteelle. Näitä toleranssirajoja käytettiin myöhemmin protoerän säilyvyytestausten hyväksymisrajoina. Lopulliset toleranssirajat testien referenssinäytteille määritetään kuitenkin vasta testien validointivaiheessa vähintään kolmella eri validointierän testillä, jotta referenssinäytteiden rajoista saataisiin mahdollisimman paikkansapitävät.

Taulukko 12. *Rubella* IgG -testien välinen toistettavuustestaus neljällä näytteellä.

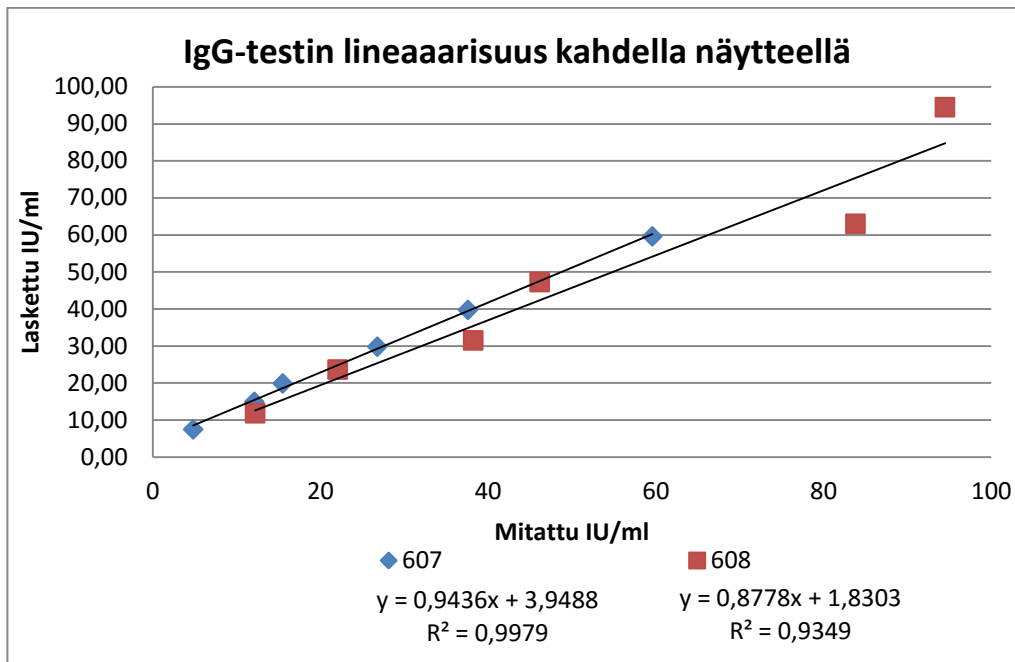
IU/ml näyte	toistojen lkm (n)	Keskiarvo (IU/ml)	keskihajonta	CV %	Toleranssiraja (95,4 %)		Toleranssiraja (99,7 %)	
					alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
539	40	8,5	1,4	16 %	5,8	11,3	4,4	12,6
535	40	12,6	1,6	13 %	9,4	15,9	7,8	17,5
H95	40	36,5	4,2	12 %	28,1	45,0	23,8	49,3
H91	40	217,8	47,7	22 %	122,4	313,1	74,8	360,8

Taulukko 13. *Rubella* IgM -testien välinen toistettavuustestaus neljällä näytteellä.

EIU näyte	toistojen lkm (n)	Keskiarvo (EIU)	keskihajonta	CV %	Toleranssiraja (95,4 %)		Toleranssiraja (99,7 %)	
					alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
RUM2	40	102,6	7,0	7 %	88,7	116,6	81,8	123,5
RUM6	40	175,1	11,1	6 %	152,8	197,4	141,7	208,5
RUM8	40	41,2	2,9	7 %	35,4	47,1	32,5	50,0
RUM9	40	30,4	3,3	11 %	23,8	37,0	20,5	40,3

### 10.7.2 Näytelaimennosten lineaarisuus

Näytelaimennosten lineaarisuuden tulokset IgG-testin kahdelle eritasoiselle näytteelle on kuvattuna kuvassa 20 sekä taulukoissa 14 ja 15. Kuten taulukoista voidaan havaita, mitattujen arvojen ja laskettujen arvojen ero on melko pieni. Saantoprosentteja tarkasteltaessa on kiinnitettävä huomiota myös konsentraation suuruuteen. Esimerkiksi taulukossa 14 laimennossuhteella 1:8 prosentuaalinen saanto on melko pieni, mutta tarkasteltaessa mitattuja ja laskettuja konsentraatioita voidaan huomata, että ero konsentraatioissa on alle 3 IU/ml. Näin ollen IgG-testin lineaarisuus voidaan todeta hyväksi.



Kuva 20. IgG-testin lineaarisuus kahdella eri absorbanssitason näytteellä. Vaaka-akselilla on näytteen konsentraatio (IU/ml) ja pystyakselilla laskennallinen konsentraatio (IU/ml).

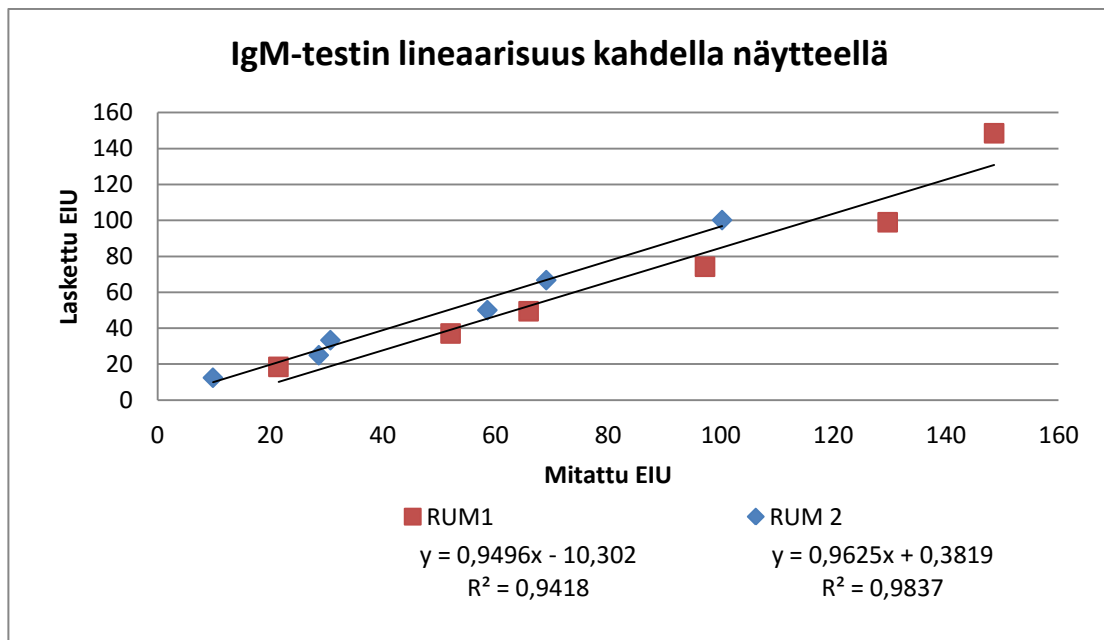
Taulukko 14. Lineaarisuustestauksen tulokset IgG-testillä näytteellä 607.

Näyte	Absorbanssi	keskihajonta	CV %	Mitattu IU/ml	Laskettu IU/ml	Saanto
607 (1:1)	1,13	0,05	5 %	59,59	59,59	100 %
607 (1:1,5)	0,85	0,04	4 %	37,6	39,73	95 %
607 (1:2)	0,68	0,01	1 %	26,79	29,80	90 %
607 (1:3)	0,47	0,00	0 %	15,51	19,86	78 %
607 (1:4)	0,40	0,01	2 %	12,13	14,90	81 %
607 (1:8)	0,22	0,00	0 %	4,83	7,45	65 %

Taulukko 15. Lineaarisuustestauksen tulokset IgG-testillä näytteellä 608.

Näyte	Absorbanssi	keskihajonta	CV %	Mitattu IU/ml	Laskettu IU/ml	Saanto
608 (1:1)	1,48	0,07	5 %	94,49	94,49	100 %
608 (1:1,5)	1,38	0,02	2 %	83,82	62,99	133 %
608 (1:2)	0,97	0,00	0 %	46,16	47,25	98 %
608 (1:3)	0,86	0,01	1 %	38,23	31,50	121 %
608 (1:4)	0,60	0,02	3 %	22,06	23,62	93 %
608 (1:8)	0,40	0,01	2 %	12,22	11,81	103 %

IgM-testin lineaarisuustestauksen tulokset kahdella eri näytteellä on puolestaan esitetty taulukoissa 16 ja 17 sekä kuvassa 21. Kuten taulukoista voidaan havaita, erityisesti näytteellä RUM1 mitattu EIU poikkeaa jonkin verran laimennossuhteiden perusteella lasketuista EIU-arvoista. Syy tähän on oletettavasti se, että näyte RUM1 ei ole enää positiivikontrollin ja negatiivikontrollin määrittämällä lineaarisella alueella.



Kuva 21. *Rubella* IgM -testin lineaarisuus kahdella näytteellä mitattuna. Vaaka-akselilla on mitattu konsentraatio (EIU) ja pystyakselilla laskennallinen konsentraatio (EIU).

Taulukko 16. Lineaarisuustestauksen tulokset IgM-testillä näytteellä RUM1.

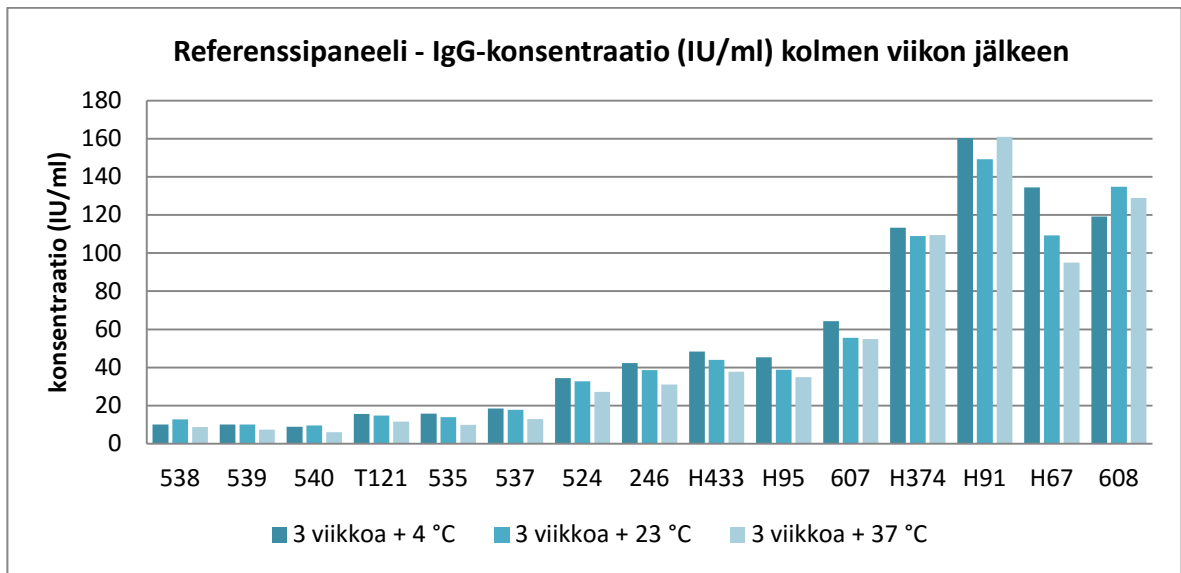
Näyte	Absorbanssi	keskihajonta	CV %	Mitattu EIU	Laskettu EIU	Saanto
RUM1 (1:1)	1,46	0,05	3 %	148,6	148,58	100 %
RUM1 (1:1,5)	1,28	0,05	4 %	129,7	99,05	131 %
RUM1 (1:2)	0,98	0,02	2 %	97,2	74,29	131 %
RUM1 (1:3)	0,68	0,01	2 %	65,9	49,53	133 %
RUM1 (1:4)	0,55	0,02	4 %	52,1	37,14	140 %
RUM1 (1:8)	0,27	0,01	2 %	21,5	18,57	116 %

Taulukko 17. Lineaarisuustestauksen tulokset IgM-testillä näytteellä RUM2.

Näyte	Absorbanssi	keskihajonta	CV %	Mitattu EIU	Laskettu EIU	Saanto
RUM2 (1:1)	1,01	0,03	3 %	100,3	100,27	100 %
RUM2 (1:1,5)	0,71	0,06	8 %	69,0	66,84	103 %
RUM2 (1:2)	0,62	0,01	1 %	58,6	50,13	117 %
RUM2 (1:3)	0,35	0,01	2 %	30,7	33,42	92 %
RUM2 (1:4)	0,33	0,00	1 %	28,6	25,07	114 %
RUM2 (1:8)	0,16	0,00	1 %	9,8	12,53	79 %

### 10.7.3 Stressitestin tulokset

Yhteenveto IgG-testin protoerän stressitestin tuloksista kolmen viikon jälkeen on esitettyä kuvassa 22. Koska ainoastaan neljän referenssipaneelin näytteen toleranssirajat oli aikaisemmin määritetty protoerän toistettavuuskokeilla, ei kaikkien näytteiden toleranssirajoista ollut lähtökohtaisesti tietoa. Neljän näytteen perusteella pystytään kuitenkin alustavasti arvioimaan tuotteen säilyvyyttä. Taulukoissa 18 ja 19 on esitetty *Rubella* IgG -protoerän stressitestin tulokset 1,5 viikon (taulukko 18) ja 3 viikon (taulukko 19) jälkeen.



Kuva 22. *Rubella* IgG -testi ja referenssinäytteiden konsentraatiot kolmen viikon stressitestin jälkeen. Vaaka-akselilla on referenssinäytepaneelin näytteet ja pystyakselilla mitatut konsentraatiot stressitestin jälkeen.

Tuloksista voidaan huomata, että *Rubella* IgG -testin säilyvyys huoneen lämmössä kolmen viikon stressitestin jälkeen on erittäin hyvä neljällä tarkastellulla näytteellä ja 37 °C:ssa kohtalainen. Huoneenlämmössä stressatulla testillä kaikki neljä referenssinäytettä jäävät 95,4 %:n toleranssirajojen sisäpuolelle ja 37 °C:ssa stressitestissä kaikki testatut näytteet jäävät 99,7 % toleranssirajojen sisäpuolelle. Näin ollen protoerän säilyvyydestin perusteella voidaan olettaa, että myös validointivaiheessa tehtävässä stressitestissä säilyvyys on hyvä.

Taulukko 18. IgG-stressitesti ja konsentraatiot 1,5 viikon stressitestin jälkeen sekä neljän näytteen toleranssirajat.

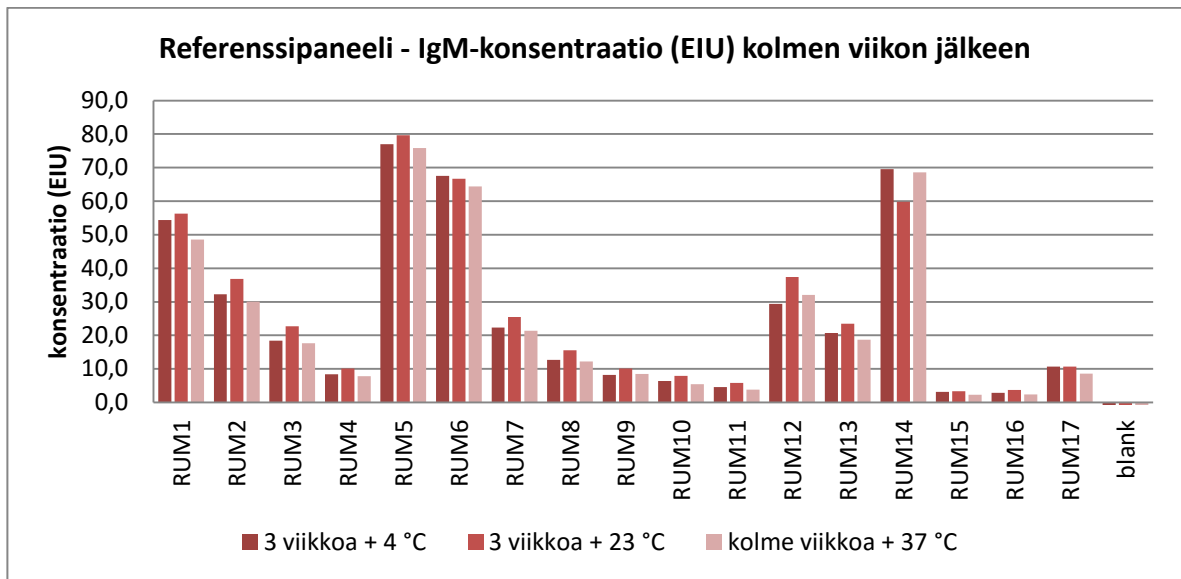
1,5 viikkoa	stressauslämpötila			95,4 % toleranssiraja		99,7 % toleranssiraja	
	+ 4 C	+ 23 C	+ 37 C	alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Näyte							
539	10,67	10,44	8,90	5,8	11,3	4,4	12,6
535	13,18	14,12	12,13	9,4	15,9	7,8	17,5
H95	45,28	44,32	34,27	28,1	45,0	23,8	49,3
H91	150,23	162,46	139,01	122,4	313,1	74,8	360,8

Taulukko 19. IgG-stressitesti ja konsentraatiot kolmen viikon stressitestin jälkeen sekä neljän näytteen toleranssirajat.

3 viikkoa	stressauslämpötila			95,4 % toleranssiraja		99,7 % toleranssiraja	
	+ 4 C	+ 23 C	+ 37 C	alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Näyte							
539	10,05	10,10	7,44	5,8	11,3	4,4	12,6
535	15,75	14,04	9,87	9,4	15,9	7,8	17,5
H95	45,27	38,85	34,91	28,1	45,0	23,8	49,3
H91	160,26	149,29	160,99	122,4	313,1	74,8	360,8

*Rubella* IgM -stressitestin tulokset on esitettyä kuvassa 23. Myös IgM-testin referenssipaneelin näytteistä tiedettiin protoerän testausvaiheessa ainoastaan neljän näytteen toleranssirajat, joten myös IgM-testin kohdalla tulokset ovat alustavia ja lopulliset stressitestit tullaan suorittamaan vasta validointivaiheessa. *Rubella* IgM -testin neljän näytteen konsentraatiot ja toleranssirajat stressitestien jälkeen on esitettyä taulukoissa Taulukko 20 ja 21. Myös IgM-testille tehtiin testi 1,5 viikon (taulukko Taulukko 20) ja 3 viikon (taulukko 21) kuluttua stressauksen alkamisesta.





Kuva 23. *Rubella* IgM -testi ja referenssinäytteiden konsentraatiot kolmen viikon stressitestin jälkeen. Vaaka-akselilla on referenssinäytepaneelin näytteet ja pystyakselilla mitatut konsentraatiot stressitestin jälkeen.

*Rubella* IgM -testillä säilyvyys kolmen viikon stressitestin jälkeen huoneenlämmössä stressatulla testillä on IgG-testin tavoin hyvä. Kolmen viikon stressauksen jälkeen kaikki neljä testattua näytettä jää huoneenlämmössä säilytetyllä kitillä testattuna 95,4 %:n toleranssirajojen sisäpuolelle. 37 °C:ssa stressatussa testissä kaikki neljä näytettä jää 99,7 %:n toleranssirajojen sisäpuolelle. Voidaan siis olettaa, että myös IgM-testin säilyvyys on verrattain hyvä myös validointivaiheen testeissä. Näytteet RUM2 ja RUM8 jäivät 1,5 viikon kohdalla 99,7 %:n toleranssirajojen alapuolelle, mutta koska samat näytteet ovat kolmen viikon stressitestin jälkeen toleranssirajojen sisäpuolella, ei toleranssirajojen alitusta pidetä huolestuttavana. Syy toleranssirajojen alitukselle 1,5 viikon jälkeen tehdyssä testissä on luultavasti inhimillinen virhe.

Taulukko 20. IgM-stressitesti ja konsentraatiot 1,5 viikon stressitestin jälkeen sekä neljän näytteen toleranssirajat. Toleranssirajojen ulkopuolelle jäävät arvot on merkitty keltaisella.

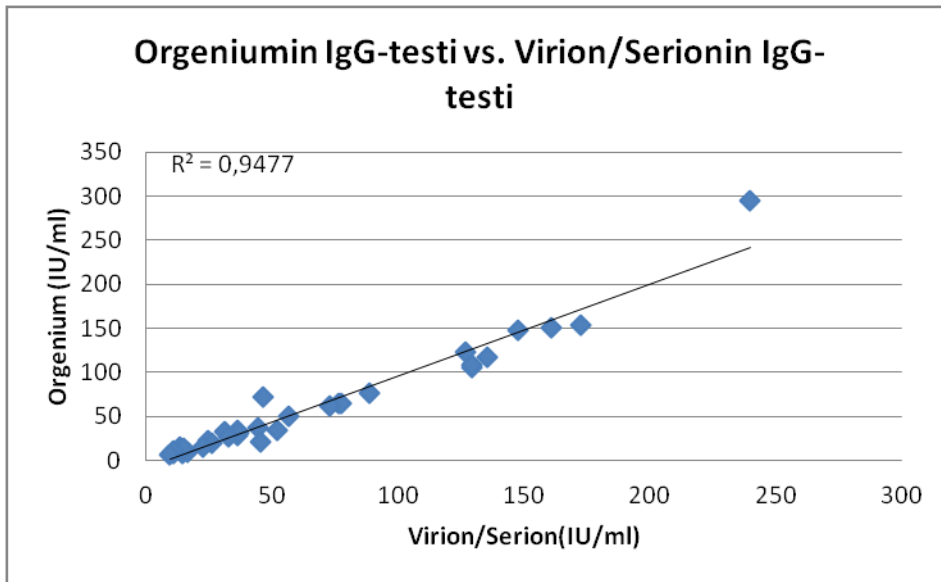
1,5 viikkoa	stressauslämpötila			95,4 % toleranssiraja		99,7 % toleranssiraja	
	+ 4 C	+ 23 C	+ 37 C	alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Näyte							
RUM2	28,21	39,90	26,93	33,1	46,8	29,7	50,2
RUM6	65,89	64,19	59,97	58,2	78,8	53,1	83,9
RUM8	12,99	14,76	11,30	13,2	18,2	11,9	19,4
RUM9	8,91	11,61	7,92	8,6	14,2	7,3	15,5

Taulukko 21. IgM-stressitesti ja konsentraatiot kolmen viikon stressitestin jälkeen sekä neljän näytteen toleranssirajat.

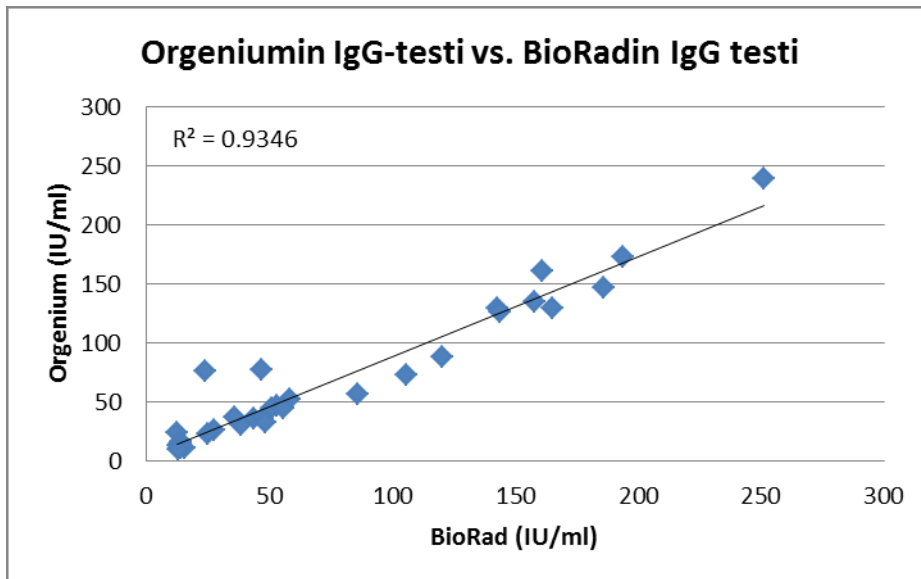
3 viikkoa	stressauslämpötila			95,4 % toleranssiraja		99,7 % toleranssiraja	
	+ 4 C	+ 23 C	+ 37 C	alaraja	yläraja	alaraja	yläraja
Näyte							
RUM2	32,29	36,83	30,08	33,1	46,8	29,7	50,2
RUM6	67,51	66,64	64,44	58,2	78,8	53,1	83,9
RUM8	12,73	15,56	12,22	13,2	18,2	11,9	19,4
RUM9	8,25	10,10	8,47	8,6	14,2	7,3	15,5

#### 10.7.4 Vertailu kilpailijoiden *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testien kanssa

Vertailutestien tulokset Virion/Serionin ja BioRadin *Rubella* IgG -testeihin on esitettyinä kuvissa 24 ja 25. Korrelaatio (R) Orgeniumin IgG-testin ja Virion/Serionin IgG-testin välillä on 0,973 ja Orgeniumin IgG-testin ja BioRadin IgG-testin välillä 0,967. *Rubella* IgG -testi antaa siis hyvin samankaltaisia tuloksia kuin kahden eri kilpailijan *Rubella* IgG -testi.



Kuva 24. Kilpailijavertailu Orgeniumin IgG-testin ja Virion/Serionin IgG-testin välillä. Vaaka-akselilla on Virion/Serionin testillä saadut konsentraatiot ja pystyakselilla Orgeniumin testillä saadut konsentraatiot samoille näytteille.



Kuva 25. Kilpailijavertailu Orgeniumin IgG-testin ja BioRadin IgG-testin välillä. Vaaka-akselilla on BioRadin testillä saadut konsentraatiot ja pystyakselilla Orgeniumin testillä saadut konsentraatiot samoille näytteille.

Talukossa 22 on esitettyä positiivisten tulosten, negatiivisten tulosten ja raja-arvoisten tulosten määrät Virion/Serionin sekä Orgeniumin *Rubella* IgG -testillä. Kuten taulukosta 22 nähdään, tulokset testien välillä ovat hyvin samankaltaiset. Ainoastaan kolme näytettä antoi testeillä toisistaan poikkeavan tuloksen. Virion/Serionin testillä kolme näytettä antoi negatiivisen tuloksen kun taas Orgeniumin testin vastaavat kolme näytettä antoivat tulokseksi raja-arvoisen tuloksen.

Taulukko 22. Positiivisten, negatiivisten ja raja-arvotulosten määrät Virion/Serionin ja Orgeniumin *Rubella* IgG -testien vertailussa.

		<b>Orgenium Rubella IgG</b>		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
<b>Virion/Serion Rubella IgG</b>	Positiivinen	24	0	0
	Raja-arvo	0	3	0
	Negatiivinen	0	3	1

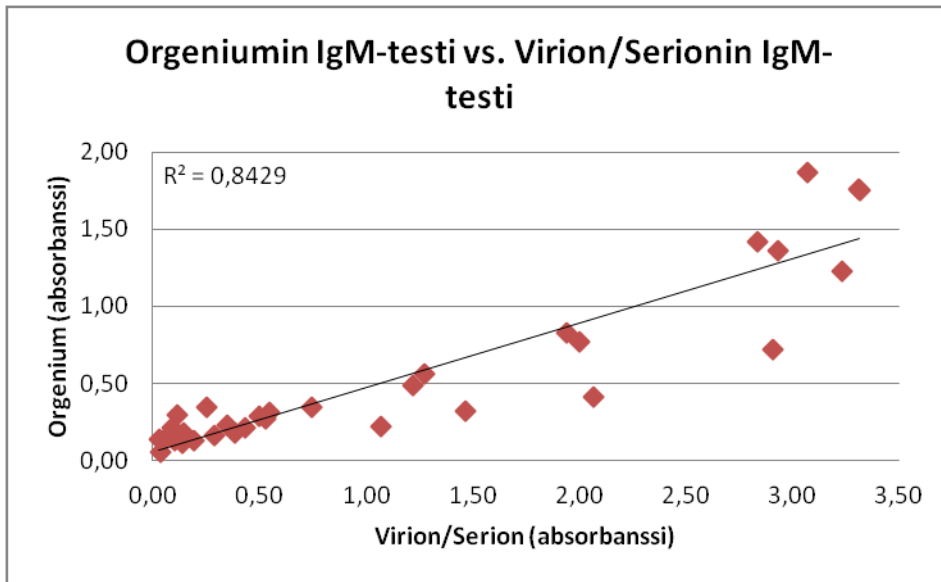
Talukossa 23 on puolestaan esitetty positiivisten, negatiivisten sekä raja-arvoisten tulosten määrät BioRadin sekä Orgeniumin IgG-testillä. Kuten taulukosta nähdään, ovat tulokset jälleen hyvin samankaltaisia. Ainoastaan kaksi näytettä antoi toisistaan poikkeavan tuloksen. Toinen näytteistä antoi Orgeniumin testillä positiivisen tuloksen, kun taas BioRadin testillä se antoi raja-arvoisen tuloksen. Sama näyte antoi Virion/Serionin testillä Orgeniumin testin tapaan positiivisen tuloksen. Toinen näytteistä puolestaan antoi Orgeniumin testillä negatiivisen tuloksen ja BioRadin testillä positiivisen tuloksen. Sama näyte antoi Virion/Serionin testillä Orgeniumin testin tapaan negatiivisen tuloksen.

Taulukko 23. Positiivisten, negatiivisten ja raja-arvotulosten määrät BioRadin ja Orgeniumin *Rubella* IgG -testien vertailussa.

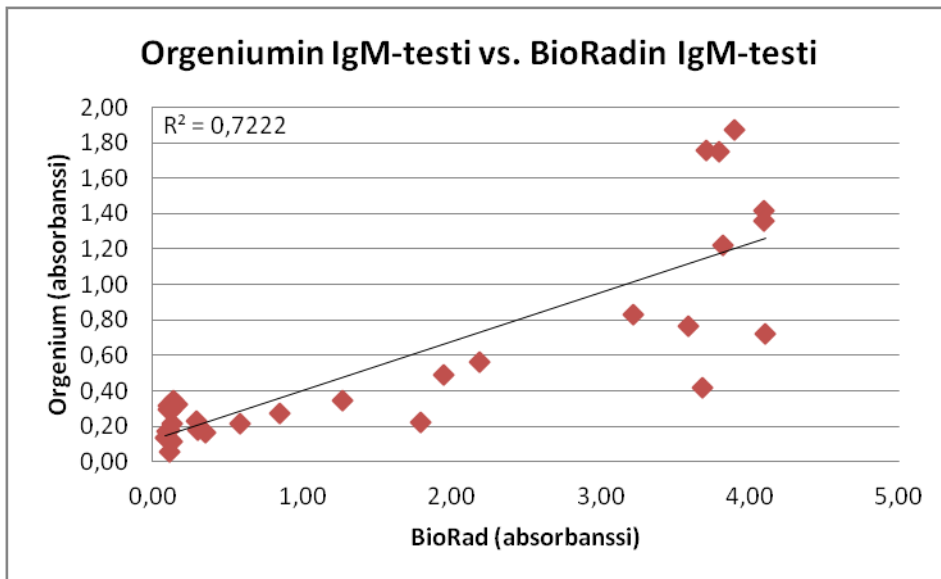
		<b>Orgenium Rubella IgG</b>		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
<b>BioRad Rubella IgG</b>	Positiivinen	23	0	0
	Raja-arvo	1	6	1
	Negatiivinen	0	0	0

Koska *Rubella* IgM -vasta-aineille ei ole olemassa kansainvälistä standardia, jota vasten testi voitaisiin kalibroida, on jokaisella testivalmistajalla hieman toisistaan poikkeavia tapoja määrittää IgM-vasta-ainepitoisuudet tutkittaville näytteille. Virion/Serion käyttää IgM-tuotteen kalibroinnissa epävirallista referenssierumia ja antaa konsentraatioyksiköksi U/ml (yksikköä millilitrassa). BioRadin testi puolestaan on kvalitatiivinen testi, ja tulokseksi saadaan signaali/raja-arvo -suhdeluku (S/CO). Suhdeluvun ollessa yli 1,0 tulkitaan näyte positiiviseksi ja suhdeluvun ollessa alle 0,8 tulkitaan näyte negatiiviseksi. Näytteet joiden suhdeluku on välillä 0,8 - 1,0 ovat raja-arvonäytteitä. Lisäksi BioRadin testi poikkeaa myös testiperiaatteeltaan Orgeniumin ja Virion/Serionin testeistä, koska BioRadin ELISA-testi oli tyypiltään niin kutsuttu  $\mu$ -kaappaus-ELISA, jossa kuoppalevyn pinta on antigeenin sijaan päällystetty kaappausvasta-aineilla, joihin näytteen vasta-aineet sitoutuvat.

Koska jokaisessa testissä tulos ilmoitetaan toisistaan poikkeavalla tavalla ja koska jokaisessa testissä signaali kasvaa näytteen vasta-ainemäärän kasvaessa, päätettiin IgM-testejä vertailtaessa verrata suoraan testattujen näytteiden absorbansseja toisiinsa. Testien tasoissa saattaa siis olla eroja, mutta näytteiden absorbanssien tulisi kuitenkin muuttua samassa suhteessa toisiinsa nähden. Kuvissa 26 ja 27 on kuvattuna Orgeniumin IgM-testin ja Virion/Serionin sekä BioRadin IgM-testien välisiä eroja.



Kuva 26. Kilpailijavertailu Orgeniumin IgM-testin ja Virion/Serionin IgM-testin välillä. Vaaka-akselilla on Virion/Serionin testillä mitatut absorbanssit ja pystyakselilla Orgeniumin testillä mitatut absorbanssit samoille näytteille.



Kuva 27. Kilpailijavertailu Orgeniumin IgM-testin ja BioRadin IgM-testin välillä. Vaaka-akselilla on BioRadin testillä mitatut absorbanssit ja pystyakselilla Orgeniumin testillä mitatut absorbanssit samoille näytteille.

Taulukossa 24 on kuvattuna positiivisten, negatiivisten ja raja-arvoisten näytteiden määriä Virion/Serionin ja Orgeniumin IgM-testien välillä. Kuten taulukosta voidaan havaita, antaa neljä näytettä toisistaan poikkeavat tulokset. Yksi näytteistä on kilpailija Virion/Serionin testillä positiivinen, mutta Orgeniumin testillä negatiivinen. Toinen näytteistä on puolestaan Virion/Serionin testillä negatiivinen, mutta Orgeniumin testillä positiivinen. Kaksi näytettä on Orgeniumin testillä raja-arvoisia ja Virion/Serionin testillä negatiivisia. Myös kuvasta 26 voidaan nähdä että näytteiden absorbanssitaset eivät muutu samassa suhteessa eri testeillä. Virion/Serionin IgM-testin ja Orgeniumin IgM-testin välinen korrelaatio on ainoastaan 0,918.

Taulukko 24. Positiivisten, negatiivisten ja raja-arvotulosten määrät Virion/Serionin ja Orgeniumin Rubella IgM -testien vertailussa.

		Orgenium Rubella IgM		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
Virion/Serion Rubella IgM	Positiivinen	14	0	1
	Raja-arvo	0	2	0
	Negatiivinen	1	2	11

Positiivisten, negatiivisten ja raja-arvoisten tulosten määriä BioRadin ja Orgeniumin IgM-testin välillä on kuvattu taulukossa 25. Jopa 10 näytettä antaa toisistaan poikkeavan tuloksen. BioRadin IgM-testin ja Orgeniumin IgM-testin välinen korrelaatio on ainoastaan 0,850. Myös Virion/Serionin ja BioRadin testeillä oli eroja, koska kahdeksan tutkittua näytettä antoi toisistaan poikkeavat tulokset.

Taulukko 25. Positiivisten, negatiivisten ja raja-arvotulosten määrät BioRadin ja Orgeniumin Rubella IgM -testien vertailussa.

		Orgenium Rubella IgM		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
BioRad Rubella IgM	Positiivinen	13	1	3
	Raja-arvo	0	0	2
	Negatiivinen	2	3	9

## 11 Johtopäätökset

Työn tarkoituksena oli muokata yrityksellä jo olemassa olevista kvalitatiivisista *Rubella* IgG - ja *Rubella* IgM -testeistä kvantitatiiviset vaihtoehdot sekä samalla optimoida vanhoja testejä. Molemmat testit onnistuttiin saattamaan kvantitatiiviseen muotoon. Myös testien erottelukykyä saatiin parannettua optimoimalla vanhoja testejä annettujen rajojen puitteissa.

Oikeanlainen kuoppalevytyyppi on tärkeä osa ELISA-testin toimivuutta. Kuoppalevytyyppinä vertailemalla löydettiin levytyyppi, jolla IgM-testin erottelukykyä saatiin parannettua huomattavasti. IgG-testin kohdalla vastaavaa erottelukyvyn paranemista ei kuitenkaan havaittu. Tässä työssä vertailtiin kuitenkin ainoastaan yhden levyvalmistajan (Nunc) kahta eri levytyyppiä, mikä on melko pieni määrä ottaen huomioon, että eri kuoppalevyvalmistajia ja adsorptiokyvyltään erilaisia levyjä on olemassa lukuisia. Laajemmalla vertailulla olisi mahdollisesti löytynyt nykyisiäkin levytyyppinä parempia levyvaihtoehtoja.

IgM-testillä vertailtiin toimittaja A:n ja toimittaja B:n antigeenejä. Eri antigeenejä päädyttiin testaamaan, koska IgM-testin erottelukyvyyssä oli aikaisemmassa testiversiossa ollut ongelmia. Tällöin ei kuitenkaan vielä tiedetty, että pelkkä kuoppalevytyypin vaihtaminen auttaisi jo merkittävästi parantamaan erottelukykyä. Toimittaja B:n antigeenillä erottelukyky osoittautuikin paremmaksi kuin aikaisemmin käytössä olleella toimittaja A:n antigeenillä, mikä oli odotettavissa, koska toimittaja A:n antigeeni koostuu kokonaisista viruspartikkeleista kun taas toimittaja B:n antigeeni koostuu ainoastaan *Rubella*-viruksen kuoriproteiineista E1 ja E2. Tästä huolimatta päätettiin kuitenkin kustannussyistä valita toimittaja A:n antigeeni, koska myös toimittaja A:n antigeenillä kaikki testatut varmennetut näytteet antoivat oikean testituloksen. Antigeenivertailu antoi



kuitenkin jatkoa ajatellen tärkeää tietoa molempien antigeenien toimivuuksista ja toimittaja B:n antigeeniä voidaan pitää varavaihtoehtona, mikäli toimittaja A:n antigeenin toimivuuden kanssa tulee tulevaisuudessa ongelmia.

Eri blokkauksen menetelmien vertailussa tultiin siihen tulokseen, että pelkkä kuoppalevyn pesu blokkauksiliuoksella riittää peittämään epäspesifiset sitoutumiskohdat kuoppalevyn pinnalta. Näin ollen vanhassa kvalitatiivisessa testissä käytetystä 30 minuutin inkubaatiosta blokkauksiliuksen kanssa voitiin luopua. Tässä työssä ei testattu koostumuksiltaan erilaisia blokkauksiliuksia, vaan käytettiin samaa blokkauksiliosta, joka oli jo aikaisemmin käytössä vanhoissa kvalitatiivisissa testeissä. Blokkauksiliuksen koostumusta voisikin jatkossa optimoida lisää. Xiao ja Isaacs (2012) totesivat tutkimuksessaan, että eri BSA-valmisteet voivat toimia eri tavoin epäspesifisten sitoutumiskohtien estämisessä. Valmistuskustannusten minimoimiseksi tulevaisuudessa olisi järkevää testata myös erilaisia BSA-valmisteita sekä matalampia BSA-pitoisuuksia blokkauksiliuksessa.

Päällystysantigeenin pitoisuus sekä konjugaatin konsentraatio vaikuttavat olennaisesti ELISA-testin erottelukykyyneen. Päällystysantigeenin laimennossuhteeksi valittiin tässä työssä 1/750-laimennospitoisuus molemmille testeille. Myös eri konjugaattipitoisuuksia testattiin eri näytteillä. Testissä käytettävä konjugaattipitoisuus voi kuitenkin vaihdella eri konjugaattierillä, koska esimerkiksi sitoutuneen HRP-entsyymin määrä voi hieman vaihdella konjugaattierästä toiseen. Näin ollen lopullinen konjugaattipitoisuus on määritettävä jokaisen testin tuotantoerän kalibrointivaiheessa erikseen.

Testin protoerillä tehdyt testaukset antoivat alustavaa tietoa testien toistettavuuksista, säilyvyyksistä sekä korrelaatioista kilpailijoiden *Rubella*-testien välillä. Protoerien testauksessa käytettiin hyväksi aikaisemmin koottuja referenssinäytepaneeleita, jotka

sisältävät eritasoisia *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -näytteitä. Samoja näytteitä on tarkoitus käyttää jatkossa eri tuotantoerien laadunvarmistustestauksissa.

Toistettavuustestauksien tarkoituksena on saada tietoa mittaustulosten vaihtelusta yhden testiajon sisällä sekä eri testiajojen välillä. Lisäksi toistettavuustestauksien perusteella voidaan määrittää hyväksymisrajat, joiden sisäpuolelle referenssinäytteiden tulisi jäädä, kun testin toimivuutta testataan tuotantovaiheessa. Toistettavuustestausten tuloksista voidaan todeta, että molempien testien kohdalla testien väliset toistettavuudet olivat hyväksyttävät, IgG-testillä raja-arvo näytteen 535 variaatiokerroin oli 13 % IgM-testin näytteen RUM6 variaatiokerroin 6 %.

Tässä työssä määritettiin alustavat hyväksymisrajat neljälle referenssinäytepaneelin näytteelle. Lopullinen hyväksymisrajojen määrittäminen tulisi kuitenkin tehdä useammalla eri tuotantoerällä, joten lopulliset hyväksymisrajat referenssinäytepaneelien näytteille tullaan määrittämään vasta testin validointivaiheessa vähintään kolmella eri validointivaiheen erällä.

Säilyvyystestausten perusteella voidaan todeta, että molempien testien säilyvyys 3 viikkoa + 37 °C:ssa on varsin hyvä, mikä tarkoittaa, että todennäköisesti testille voidaan antaa vuoden säilyvyysaika + 4 °C:ssa. Lopullinen varmistus saadaan validointivaiheessa tehtävillä uusilla säilyvyystestauksilla. Tämä oli odotettavissa, koska vanhojen kvalitatiivisten testien reagenssit pidettiin samoina myös uusissa kvantitatiivisissa testiversioissa. Kiihdytetyn säilyvyysseurannan lisäksi on syytä tehdä myös reaaliaikainen säilyvyysseuranta, jonka perusteella testille voidaan tulevaisuudessa taata jopa yli vuoden säilyvyys + 4°C:ssa.

Kun testejä lopuksi verrattiin Virion/Serionin ja BioRadin testien välillä, voitiin havaita että IgG-testin korrelaatio molempien kilpailijoiden testien kanssa oli yli 0,96, mikä on varsin hyvä. Näin ollen kehitetty *Rubella* IgG -testi vaikuttaisi toimivan vähintään yhtä hyvin kuin markkinoiden johtavilla *Rubella* IgG -testivalmistajilla.

*Rubella* IgM -testin kohdalla korrelaatio oli huonompi. Korrelaatio Virion/Serionin ja Orgeniumin testin välillä oli ainoastaan 0,918 ja BioRadin ja Orgeniumin testin välillä 0,85. BioRadin *Rubella* IgM -testi ei ole Orgeniumin ja Virion/Serionin testien tavoin epäsuora ELISA-testi, vaan IgM-kaappaus-ELISA-testi, mikä voi osittain selittää testien huonoa korrelaatiota. IgM-kaappaus-ELISA-testeissä spesifisyys on parempi kuin epäsuorassa ELISA-testissä.

Tämän diplomityön puitteissa ei ollut mahdollista selvittää, mistä merkittävät erot Orgeniumin IgM-testin ja kilpailijoiden IgM-testien välillä johtuvat. Varmennetuilla näytteillä testattaessa kaikki näytteet antoivat Orgeniumin IgM-testillä oikean testituloksen. Toisaalta esimerkiksi erilaisia ristireaktiotestejä ei tämän diplomityön aikataulun puitteissa ehditty testaamaan. Ristireaktiotestauksen tarkoituksena on varmistaa, ettei kehitetty ELISA-testi tunnista muita taudinaiheuttajia vastaan kehitettyjä vasta-aineita. Ristireaktioiden lisäksi vääriä tuloksia voi syntyä, jos tutkittavassa näytteessä on mukana runsaasti reumatekijöitä (Meurman ja Ziola 1978). Reumatekijät ovat vasta-aineita, joita sitoutuvat elimistön omiin vasta-aineisiin. Runsas reumatekijöiden määrä näytteessä voi aiheuttaa sekä vääriä positiivisia että vääriä negatiivisia tuloksia.

## 12 Yhteenveto

Tässä diplomityössä muokattiin jo olemassa olevista kvalitatiivisista *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -ELISA-testeistä kvantitatiiviset testit. Lisäksi molempia testejä optimoitiin, jotta testien spesifisyyttä ja herkkyyttä saataisiin parannettua. Lopuksi valmistettiin protoerät, joiden avulla tehtiin alustavia testejä tuotteen säilyvyydestä, toistettavuudesta ja lineaarisuudesta ennen varsinaista validointivaihetta.

IgG-testille yritys ei ollut asettanut suurta tarvetta optimoinnille, koska testin erottelukyky oli jo valmiiksi melko hyvä. Levytyyppejä vertailtaessa todettiin, että Polysorp- ja Maxisorp-levytyypeillä ei ollut merkittäviä eroja. Myöskään antigeenivalmistajia ei IgG-testin kohdalla nähty tarpeelliseksi ryhtyä vertailemaan.

Merkittävin yksittäinen parannus testejä optimoitaessa oli Maxisorp-kuoppalevytyypin vaihtaminen Polysorp-kuoppalevytyyppiin IgM-testissä. Testin erottelukyvyyssä tapahtui huomattava parannus, kun Maxisorp-levy korvattiin Polysorp-levyllä ja kaikki varmennetut IgM-luokan vasta-aineiden suhteen negatiiviset näytteet jäivät selkeästi cut off -tason alapuolelle. IgM-testin erottelukyky olisi parantunut entisestään, jos nykyisin käytössä oleva toimittaja A:n antigeeni olisi vaihdettu toimittaja B:n antigeeniin. Koska kaupallisia testejä optimoitaessa on otettava huomioon myös testien valmistuskustannukset, päätettiin antigeenin osalta kuitenkin pitäytyä nykyisin käytössä olevassa toimittaja A:n antigeenissä, koska testin erottelukyky koettiin jo levytyypin vaihdon jälkeen riittäväksi.

Blokkausmenetelmiä vertailtaessa pyrittiin löytämään yksinkertaisempi blokkauksen menetelmä, joka soveltuisi myös suurten levyerien valmistukseen. Kymmenen eri blokkauksen menetelmän vertailun jälkeen todettiin, että pelkkä levyjen pesu blokkauksiliuksella oli riittävä sekä IgG- että IgM-testin levyille.

Päällystysantigeenin pitoisuus todettiin sekä IgG- että IgM-testillä olevan sopiva laimennossuhteella 1/750. Aikaisemmissa testeissä antigeenin laimennossuhde sekä IgG- että IgM-testin levyillä oli 1/1000. Vahvempi antigeenikonsentraatio levyillä paransi testin erottelukykyä. Konjugaattikonsentraatioksi valittiin sekä IgG- että IgM-testillä vahvin testattu konjugaattikonsentraatio, koska vahvimalla testatulla konjugaattikonsentraatiolla testien erottelukyky oli ylivoimaisesti paras.

Kun testien optimointi saatiin valmiiksi, valmistettiin IgG-testille kalibraattorit ja IgM-testille kontrollit sekä eritasoisten referenssinäytteiden sarja, jota on tarkoitus käyttää uusien tuotantoerien kalibroinnissa, jotta eri tuotantoerät poikkeaisivat mahdollisimman vähän toisistaan. Lisäksi referenssinäytepaneeleilla voidaan testata validointi- ja tuotantovaiheessa valmistettujen testikittien toimivuutta.

Lopuksi valmistettiin pienet niin kutsutut protoerät, joilla tehtiin viimeiset tuotekehitysosastolla tehtävät testaukset ennen tuotteen siirtämistä validointivaiheeseen. Protoerillä testattiin alustavasti testien välistä toistettavuutta, lineaarisuutta ja säilyvyyttä sekä verrattiin testejä kilpailijoiden vastaaviin *Rubella* IgG- ja *Rubella* IgM -testeihin. Protoerien testauksissa havaittiin, että IgM-testi poikkeaa hieman kahden testatun kilpailijan IgM-testistä. Tämän diplomityön aikataulun puitteissa ei kuitenkaan ollut mahdollista tehdä tarkempaa selvitystä, mistä mahdolliset poikkeavuudet yrityksen oman IgM-testin ja kilpailijoiden IgM-testien välillä johtuivat. Muutoin protoerillä tehdyissä testauksissa ei havaittu mitään, mikä estäisi tuotteen siirtämisen tuotekehitysvaiheesta validointivaiheeseen.

## 13 Lähteet

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ja Walker, P., Chapter 24. The Adaptive Immune System - B Cells and Antibodies. Teoksessa *Molecular Biology of the Cell 4th edition*, Garland Science, New York 2002 Suora linkki teokseen (15.11.2015): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>

Banatvala, J.E. ja Brown, D. W. G., Rubella, *The Lancet* **363** (2004) 1127-1136.

Best, J. M., Rubella vaccines: past, present and future, *Epidemiol. Infect.* **107** (1991) 17-30.

Brandstadter, J.D. ja Yang, Y. Natural Killer Cell Responses to Viral Infection, *J. Innate Immun.* **3** (2011) 274-279.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hamborsky, J., Kroger, A. ja Wolfe C., Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases, Public Health Foundation, 2015. Suora linkki teoksen 13. painokseen (15.12.2015): [www.cdc.gov/vaccines/Pubs/pinkbook/default.htm](http://www.cdc.gov/vaccines/Pubs/pinkbook/default.htm)

Chen, K. ja Cerutti, A. The Function and Regulation of Immunoglobulin D, *Curr. Opin. Immunol.* **23** (2011) 345-352.

Chen, M.-H. ja Icenogle, J., Molecular Virology of Rubella Virus, Teoksessa *Rubella Viruses*, toim. Banatvala, J. ja Peckham, C., Elsevier B.V., Amsterdam 2007, ss. 1-18.

Cong, H., Jiang, Y. ja Tien, P., Identification of the Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein as a Cellular Receptor for Rubella Virus, *J. Virol.* **85** (2011) 11038–11047.

Crowther, J.R., *The ELISA Guidebook*, 1. painos, Humana Press Inc., New Jersey 2001, 436 s.

De Andrea, M., Ravera, R., Gioia, D., Gariglio, M. ja Landolfo, S. The interferon system: an overview, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **6** (2002) A41-A46.

Delves, P., Martin, S. M., Burton, D. R. ja Roitt, I. M., Antibodies, Teoksessa *Roitt's Essential Immunology*, 12. painos, Blackwell Publishing, Oxford 2011, p. 53-78.

Deshpande, S. S., Assay Development, Evaluation and Validation, Teoksessa *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development*, toim. Deshpande, S. S., Chapman & Hall, New York 1996, ss. 275-353.

Drenth, J. P., Göertz, J., Daha, M. R. ja van der Meer, J. W., Immunoglobulin D enhances the release of tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta as well as interleukin-1 receptor antagonist from human mononuclear cells, *Immunology* **88** (1996) 355-362.

Duszak, R.S., Congenital rubella syndrome – major review, *Optometry* **8** (2009) 36-43.

Esser, P., Principles in adsorption to polystyrene, Thermo Scientific Nunc Bulletin No. 6, 1988, ss. 1-5.

Firan, M., Bawdon, R., Radu, C., Ober, R. J., Eaken, D., Antohe, F., Ghetie, V. ja Ward, S., The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of  $\gamma$ -globulin in humans, *Int. Immunol.* **13** (2001) 993-1002.

Gathings, W.E., Lawton, A.R. ja Cooper, M. D., Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans, *Eur. J. Immunol.*, **7** (1977) 804-810.

Gibbs, J., Effective Blocking Procedures - ELISA Technical Bulletin - No.3, Corning Incorporated, 2001. (13.1.2016)  
<http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/elisa3.pdf>

Hedman, K. ja Seppälä, I., Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG, *J. Clin. Immunol.* **8** (1988) 214-221.

Ilkow, C. S., Willows, S.D. ja Hobman, T.C., Rubella virus capsid protein: a small protein with big functions, *Future Microbiol.* **5** (2010) 571-584.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. ja Shlomchik, M. J., Allergy and Hypersensitivity - The production of IgE, Teoksessa *Immunobiology: The Immune System in Health and*

*Disease*, Garland Science, New York 2001. Suora linkki teoksen 5. painokseen (15.11.2015): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27117/>

Klimovich, V.B., IgM and Its Receptors: Structural and Functional Aspects, *BIOCHEMISTRY (Moscow)*, **76** (2011) 654-672.

Klimpel , G. R., Immune Defenses, Teoksessa *Medical Microbiology*, toim. S. Baron, Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston 1996. Suora linkki teoksen 4. painokseen (17.11.2015): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8423/>

Lee, J.-Y. ja Bowden D. S., Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity, *Clin. Microbiol.* **13** (2000) 571-589.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., David, C., Immune Mechanisms, Teoksessa Brock Biology of Microorganisms, 13. painos, Pearson Education, San Francisco 2012, ss. 867-886.

Martins, T.B., Jaskowski, T. D., Mouritsen, C. L. ja Hill, H.H., An Evaluation of the Effectiveness of Three Immunoglobulin G (IgG) Removal Procedures for Routine IgM Serological Testing, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (**2**) 1995, 98-103.

McLean, H., Redd, S., Abernathy, E., Icenogle, J. ja Wallace, G., Rubella, Teoksessa *VDP Surveillance Manual*, 5. painos, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2012, ss. 1-14.

Meurman, O.H. ja Ziola, B.R., IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies, *J. Clin. Pathol.* **31** (1978) 483-487.

Mizuma, H., Zolla-Pazner, S., Litwin, S., el-Sadr, W., Sharpe, S., Zehr, S., Weiss, S., Saxinger, W. C. ja Marmor, M., Serum IgD elevation is an early marker of B cell activation during infection with the human immunodeficiency viruses, *Clin Exp Immunol.* **68** (1987) 5-14.

Mushahwar, I. K., Rubella Virus: Molecular Composition, Pathogenesis, Diagnosis and Control, Teoksessa *Congenital and Other Related Infectious Diseases of the Newborn*, toim. Mushahwar, I. K., Elsevier B. V., Amsterdam 2007, ss. 211-221.



Nathanson, N. ja Ahmed, R., Immune Responses to Viral Infection. Teoksessa *Viral Pathogenesis and Immunity*, 2. painos, toim. N. Nathanson, Academic Press, Lontoo 2007, ss. 72-86.

Plotkin, S. A., The History of Rubella and Rubella Vaccination Leading to Elimination, *Clin. Infect. Dis.*, **43** (2006) 164-168.

Raggam, R. B., Saldanha, J. ja Kessler, H. H., Quality assurance and quality control, Teoksessa *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases*, toim. Kessler, H. H., Walter de Gruyter GmbH, Berlin 2014, ss. 41-55.

Robertson, S. E., Featherstone, D. A., Gacic-Dobo, M. ja Hersh, B. S., Rubella and congenital rubella syndrome: global update, *Rev. Panam. Salud. Publica.* **14(5)** (2003) 306-315.

Rodrigo, G., Gruvegård, M. ja Van Alstine, J., Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography, *Antibodies*, **4(3)** (2015) 259-277.

Rooperian, D. C. ja Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nature Rev.* **7** (2007) 715-725.

Roopenian, D.C. ja Sun, V.Z., Clinical Ramifications of the MHC Family Fc Receptor FcRn, *J Clin. Immuno.*, **3** (2010) 790-797.

Santis, M. D., Cavaliere, A. F., Straface, G. ja Caruso, A., Rubella infection in pregnancy, *Reprod. Toxicol.* **21** (2006) 390-398.

SFS-EN 13640. In vitro diagnostiikkaan tarkoitettujen lääkinnällisten laitteiden stabiilisuustestaus. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto, 2002. 10 s.

Skendzel, L. P., Rubella immunity. Defining the level of protective antibody, *Am. J. Clin. Pathol.* **106(2)** (1996) 170-174.

Takei, K. ja Haucke, V., Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger, *Trends Cell Biol.* **11** (2011) 385-391.

Webster, W. S., Teratogen Update: Congenital Rubella, *Teratology* **58** (1998) 13-23.

White, D. ja Fenner, F., *Medical Virology*, 4. painos, Academic Press, Lontoo 1994, 603 s.

Wild, D., Separation Systems, Teoksessa *The Immunoassay Handbook*, Nature Publishing Group Lontoo 2001, Ss. 149-157.

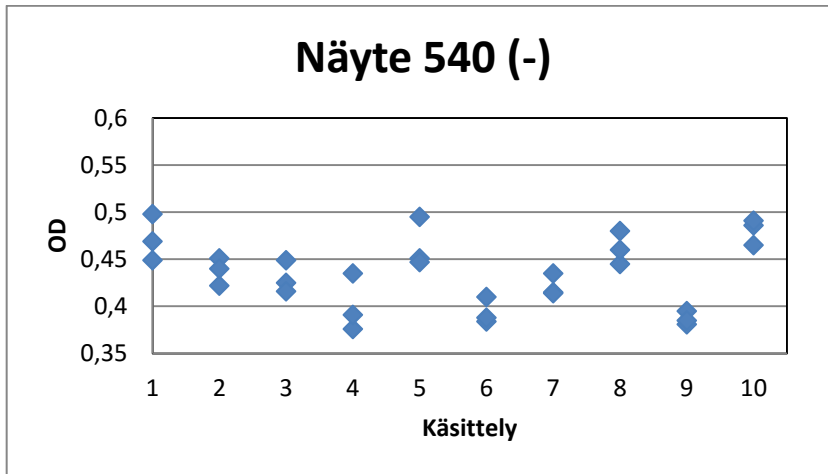
Woof, J.M ja Kerr, M.A., IgA function – variations on a theme, *Immunology* **113** (2004) 175-177.

World Health Organization (WHO). Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2007, 109 s. Suora linkki teoksen toiseen painokseen (1.11.2015): [http://www.who.int/ihr/elibrary/manual\\_diagn\\_lab\\_mea\\_rub\\_en.pdf](http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_en.pdf)

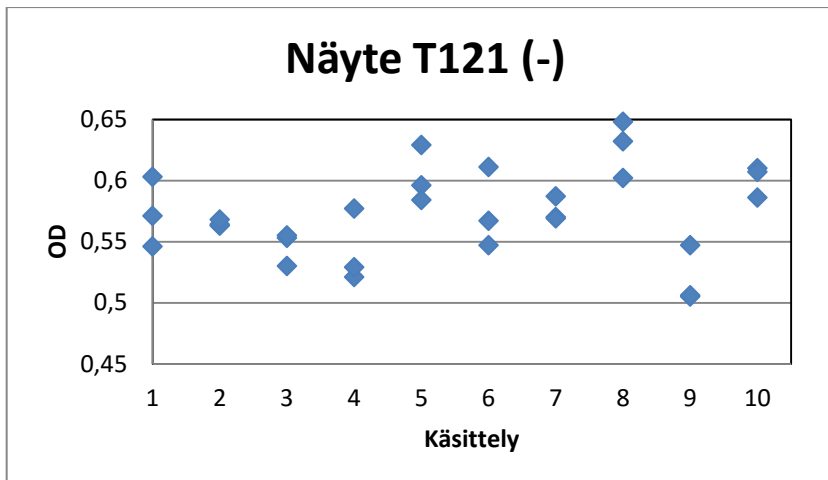
World Health Organization (WHO). Immunization surveillance, assessment and monitoring - Rubella and Congenital Rubella Syndrome (CRS), 2013. Suora linkki dokumenttiin (25.10.2015): [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/rubella/en/index.html](http://apps.who.int/immunization_monitoring/diseases/rubella/en/index.html)

Xagorari, A ja Chlichlia, K. Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses, *The Open Microbiology Journal* **2** (2008) 49-59.

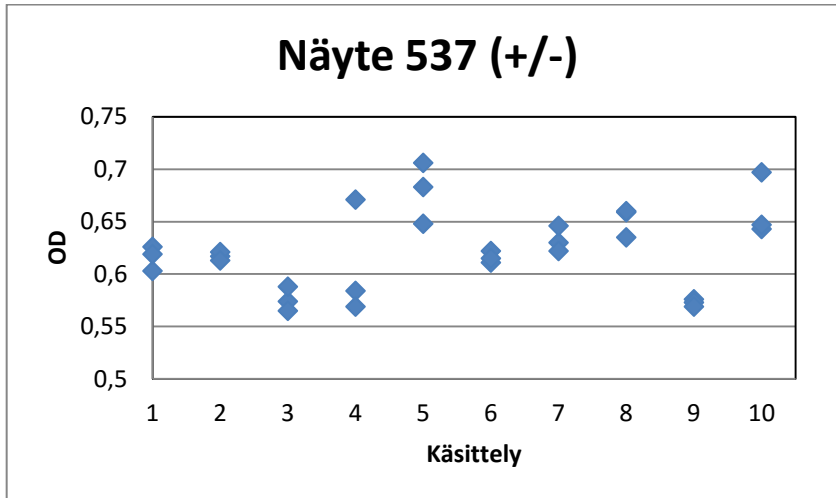
Xiao, Y. ja Isaacs, S. N., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)—not all BSAs are alike, *J. Immunol. Methods* **384** (2012) 148-151.



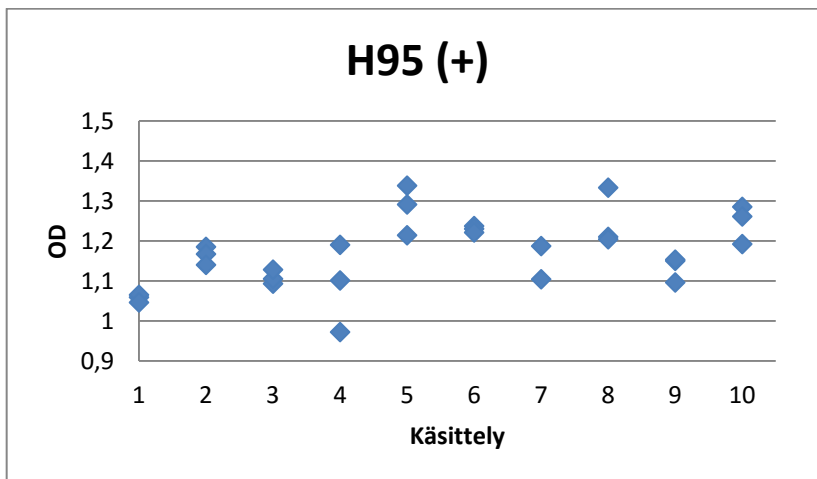
Kuva 28. Näytteen 540 absorbanssiarvot eri blokkaukskäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



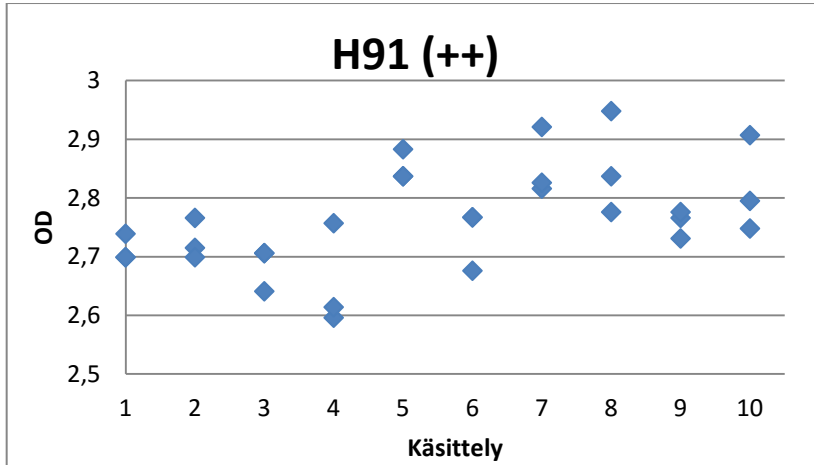
Kuva 29. Näytteen T121 absorbanssiarvot eri blokkaukskäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



Kuva 30. Näytteen 537 absorbanssiarvot eri blokkaukskäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



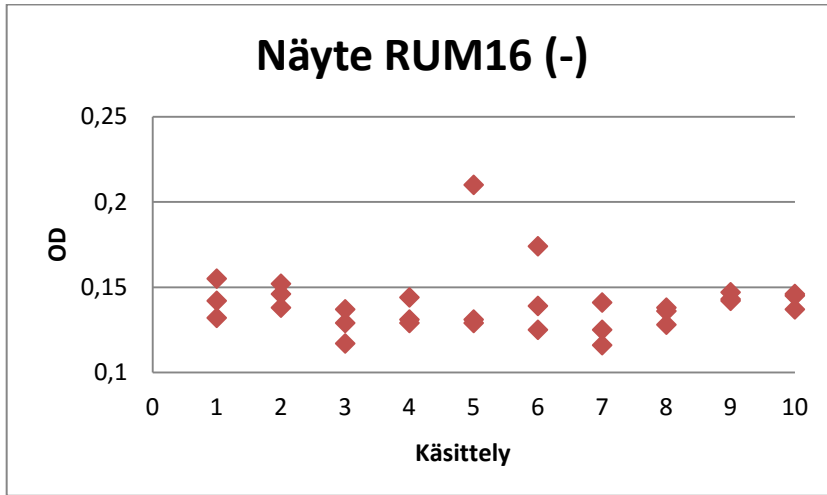
Kuva 31. Näytteen H95 absorbanssiarvot eri blokkaukskäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



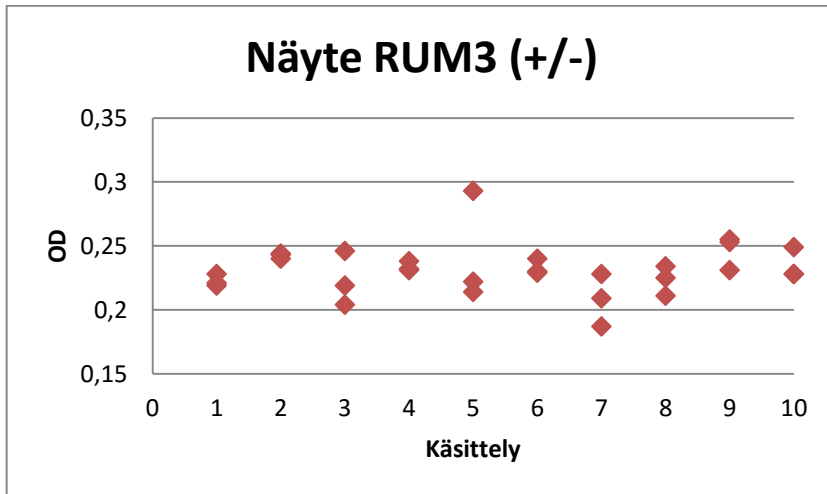
Kuva 32. Näytteen H91 absorbanssiarvot eri blokkaukskäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

Taulukko 26. Viiden eritasoisen Rubella IgG -näytepaneelin näytteiden variaatiokertoimet eri blokkaukskäsittelyillä.

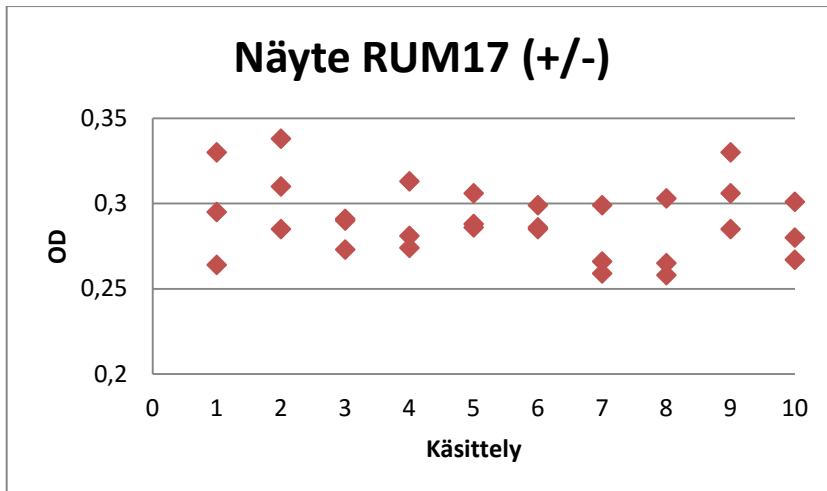
Käsittely	540 (-)	T121 (-)	537 (+/-)	H95 (+)	H91 (++)	Tausta
1	5 %	5 %	2 %	1 %	1 %	2 %
2	3 %	0 %	1 %	2 %	1 %	2 %
3	4 %	3 %	2 %	2 %	1 %	2 %
4	8 %	6 %	9 %	10 %	3 %	6 %
5	6 %	4 %	4 %	5 %	1 %	3 %
6	4 %	6 %	1 %	1 %	2 %	4 %
7	3 %	2 %	2 %	47 %	2 %	27 %
8	4 %	4 %	2 %	6 %	3 %	11 %
9	2 %	5 %	1 %	3 %	1 %	5 %
10	3 %	2 %	5 %	4 %	3 %	6 %



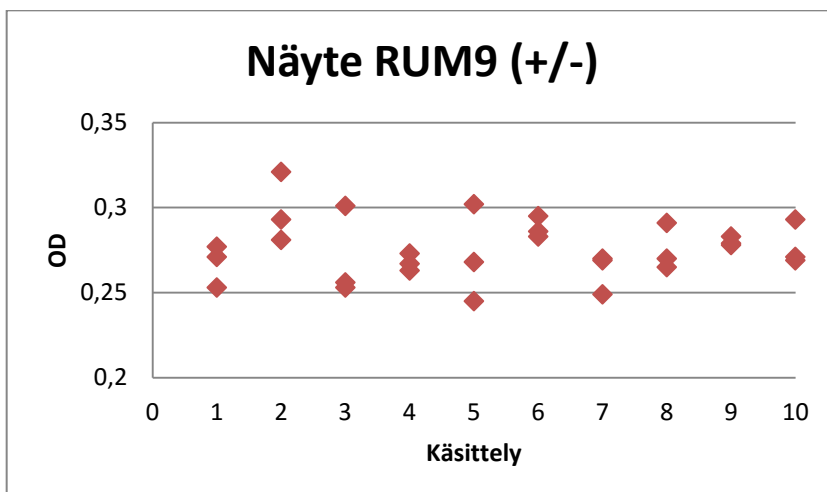
Kuva 33. Näytteen RUM16 absorbanssiarvot eri blokkaus­käsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



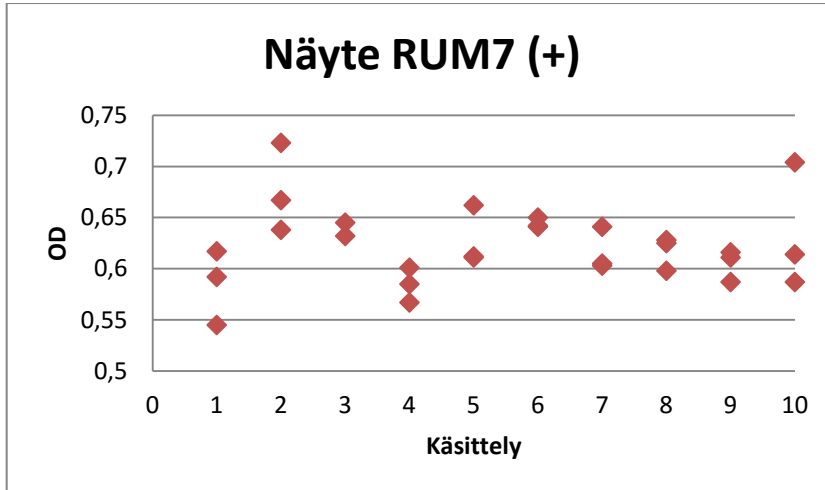
Kuva 34. Näytteen RUM3 absorbanssiarvot eri blokkaus­käsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



Kuva 35. Näytteen RUM17 absorbanssiarvot eri blokkaukäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



Kuva 36. Näytteen RUM9 absorbanssiarvot eri blokkaukäsittelyillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



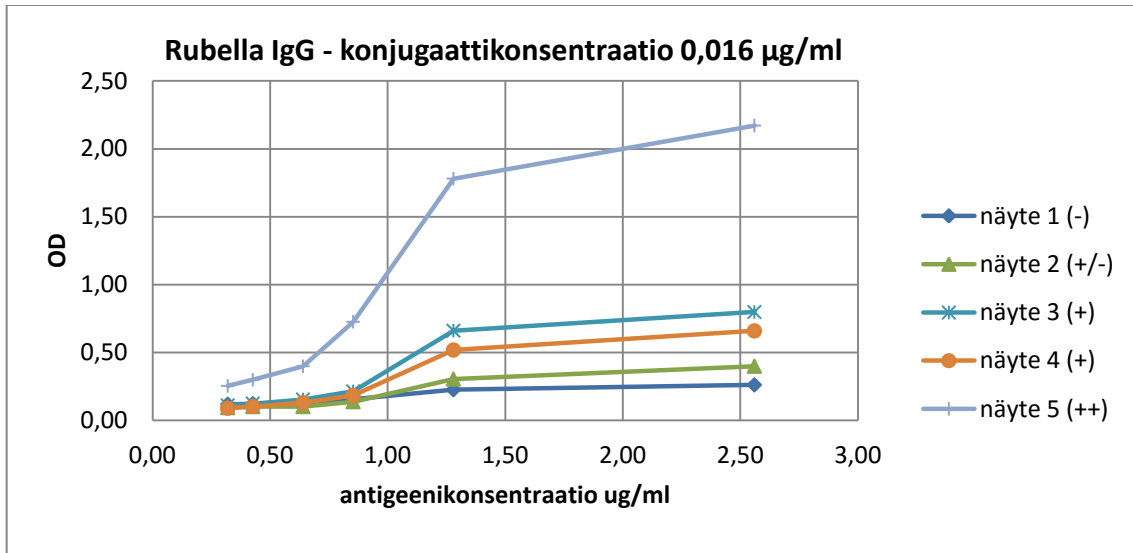
Kuva 37. Näytteen RUM7 absorbanssiarvot eri blokkusmenetelmillä. Vaaka-akselilla on käsittelynumero ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

Taulukko 27. Viiden eritasoisen Rubella IgM -näytepaneelin näytteiden variaatiokertoimet (CV %) eri blokkusmenetelmillä.

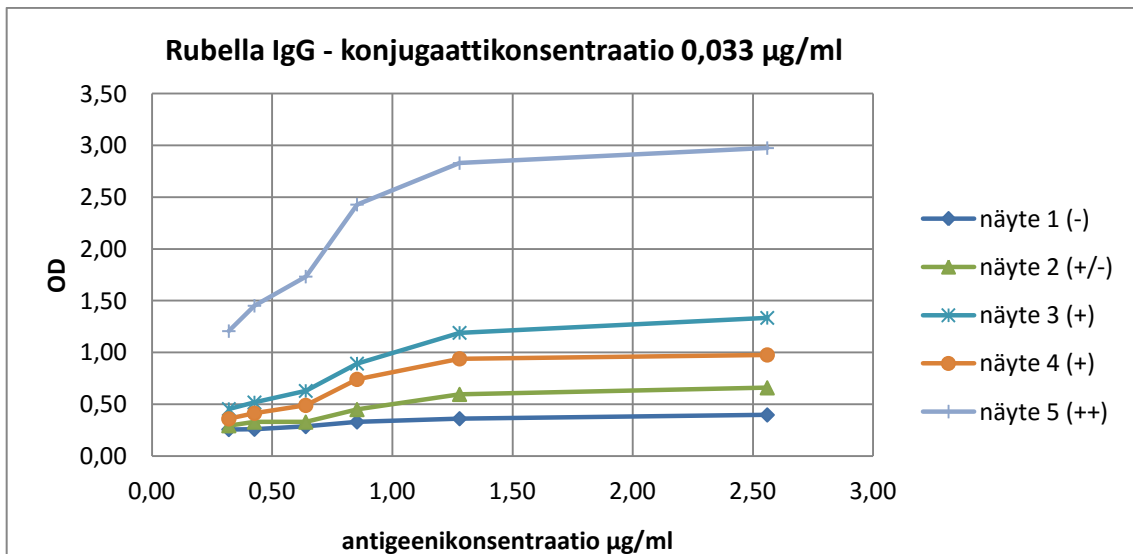
Käsittely	RUM16 (-)	RUM3 (+/-)	RUM17 (+/-)	RUM9 (+/-)	RUM7 (+)	Tausta
1	8 %	2 %	11 %	5 %	6 %	2 %
2	5 %	1 %	9 %	7 %	6 %	8 %
3	8 %	10 %	4 %	10 %	17 %	19 %
4	6 %	2 %	7 %	2 %	3 %	3 %
5	29 %	18 %	4 %	11 %	5 %	17 %
6	17 %	3 %	3 %	2 %	1 %	18 %
7	10 %	10 %	8 %	5 %	3 %	20 %
8	4 %	5 %	9 %	5 %	3 %	13 %
9	2 %	5 %	7 %	1 %	3 %	31 %
10	3 %	5 %	6 %	5 %	10 %	43 %



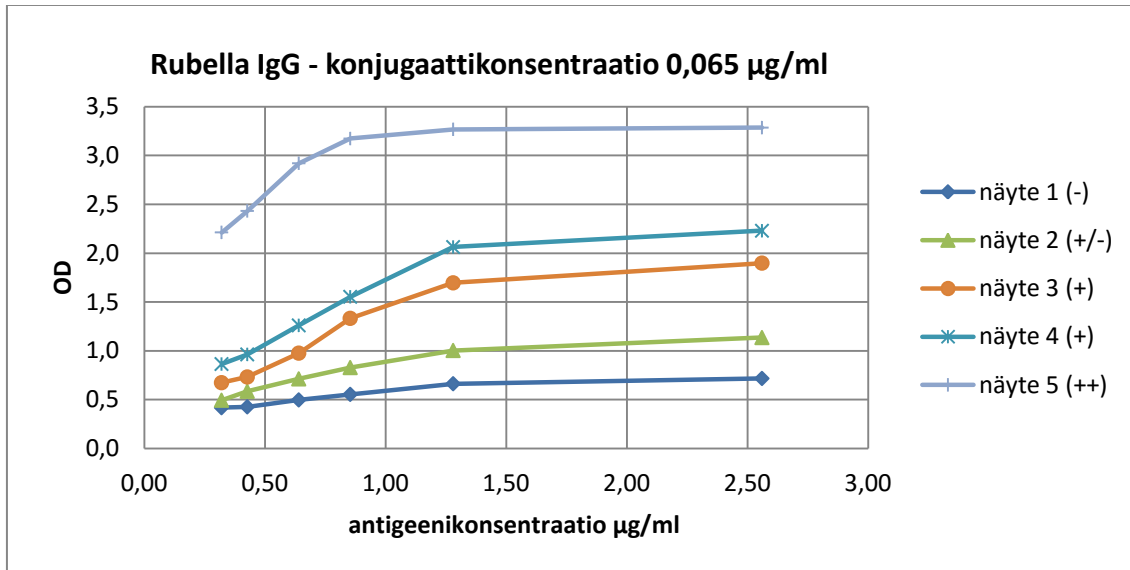
Konjugaattipitoisuuden ja antigeenipitoisuuden optimointi IgG-testillä LIITE 3(1/2)



Kuva 38. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri päällystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,016 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

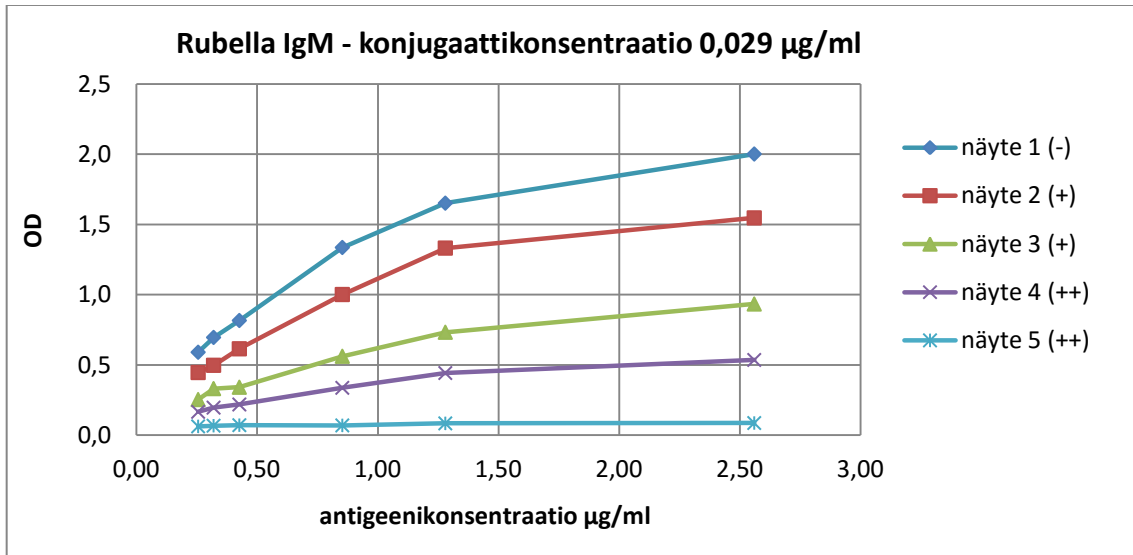


Kuva 39. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri päällystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,033 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

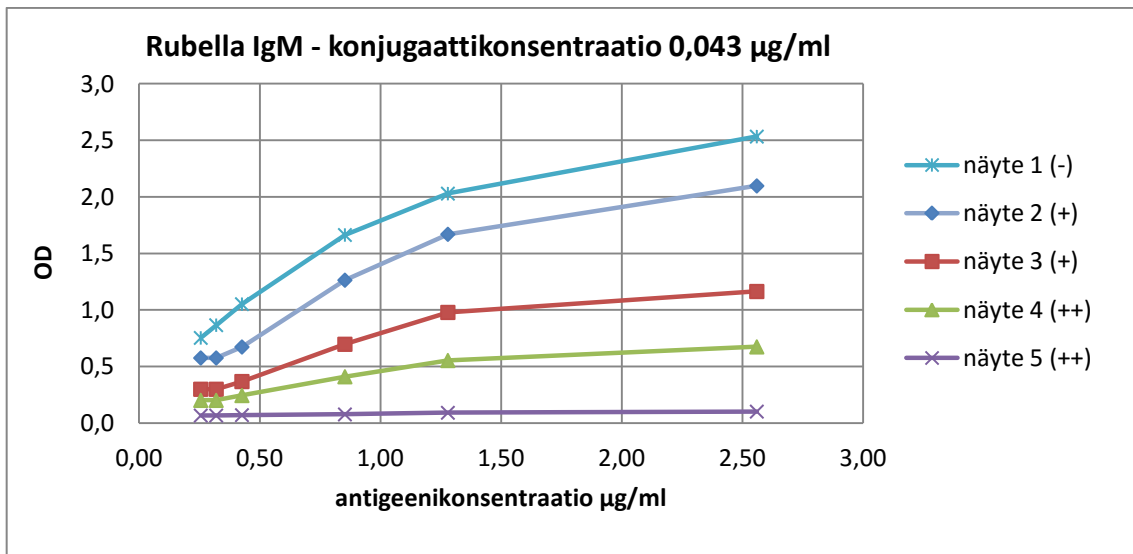


Kuva 40. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri päällystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,065 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

Konjugaattipitoisuuden ja antigeenipitoisuuden optimointi IgM-testillä LIITE 4(1/2)

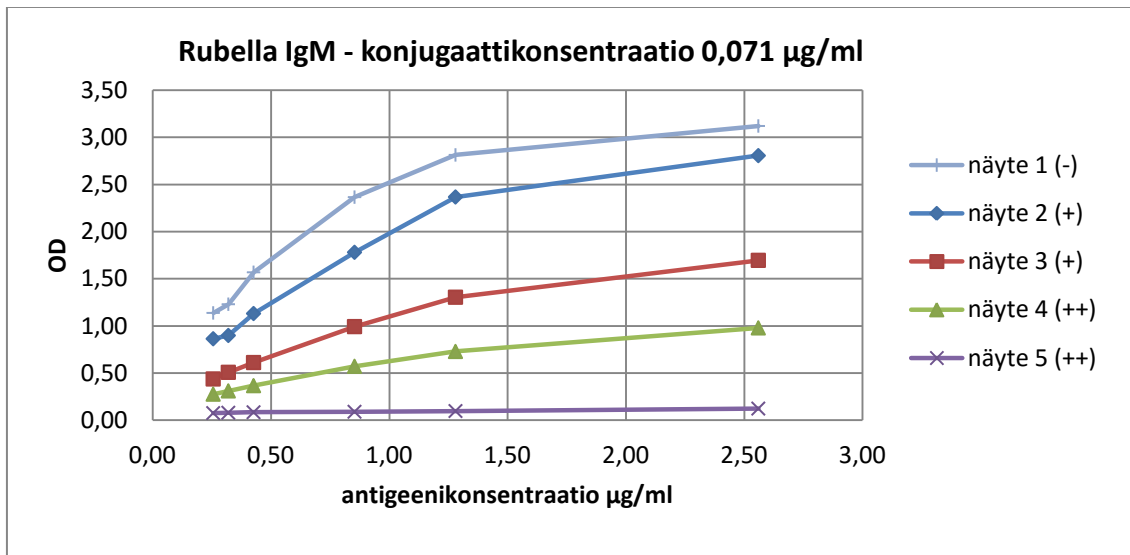


Kuva 41. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri päällystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,029 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).



Kuva 42. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri päällystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,043 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).

Konjugaattipitoisuuden ja antigeenipitoisuuden optimointi IgM-testillä LIITE 4(2/2)



Kuva 43. Viiden eritasoisen näytteen absorbanssit eri pälllystysantigeenipitoisuuksilla konjugaattikonsentraation ollessa 0,071 µg/ml. Vaaka-akselilla on antigeenikonsentraatio ja pystyakselilla absorbanssi (OD).