

Katariina Laihola

**RESPIRATORISTEN VIRUSINFEKTIOIDEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA  
LAPSILLA**

BioDigi-hanke

# **RESPIRATORISTEN VIRUSINFEKTIOIDEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA**

## **LAPSILLA**

BioDigi-hanke

Katariina Laihola  
Opinnäytetyö  
Kevät 2020  
Bioanalytiikka  
Oulun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

---

Tekijä: Katariina Laihola

Opinnäytetyön nimi: Respiratoristen virusinfektioiden laboriodiagnostiikka lapsilla – BioDigi-hanke

Työn ohjaaja: Mika Paldanius

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: Kevät 2020

Sivumäärä: 52

---

Tämän opinnäytetyön tilaajana toimi Oulun ammattikorkeakoulu, joka on mukana kansallisessa BioDigi-hankkeessa. BioDigi-hanke on usean ammattikorkeakoulun yhteistyössä tuotettu digitaalinen opintoportaali, jossa opiskelua voi suorittaa joustavasti englannin kielellä tuotettuja verkko-oppimateriaaleja hyödyntäen.

Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa laadukasta ja informatiivista verkko-oppimateriaalia BioDigi-hankkeeseen. Opinnäytetyössä tuotettiin opintoportaaliin kaksi englannin kielistä diaesitystä ja monivalintatesti, jotta verkko-oppimateriaali on myös vaihto-opiskelijoiden käytettävissä. Ensimmäinen diaesitys koskee yleisimpiä lasten respiratorisia viruksia ja toinen niiden laboriodiagnostiikkaa. Monivalintatesti tukee opiskelijan oman oppimisen arviointia aiheutta koskien.

Laadukkaan verkko-oppimateriaalin tuottamiseksi opinnäytetyössä perehdyttiin monipuolisesti alan kirjallisuuteen ja tieteellisiin julkaisuihin, jotka käsitelivät lasten respiratorisia infektioita aiheuttavia viruksia ja laboratoriomenetelmiä niiden toteuttamiseksi. Lisäksi perehdyttiin verkkopedagogiikkaan muun muassa oppimisen, verkko-oppimateriaalien sisällön luomisen ja esteettömyyden näkökulmasta.

BioDigi-hankkeen myötä tuotettua verkko-oppimateriaalia voidaan hyödyntää opetuksessa kansainvälisesti usealla eri taholla niin opettajien kuin opiskelijoiden toimesta. Koska laboratoriomenetelmät kehittyvät jatkuvasti, oppimateriaalia tulee päivittää ajoittain vastaamaan sen hetkistä tietämystä. Opetusmateriaalin testaaminen opiskelijoilla tulee ajoittumaan myöhempään ajankohtaan. Tulevaisuudessa aiheen opetusmateriaalia on mahdollista täydentää esimerkiksi tehtävillä ja asiantuntijavideoilla sekä perehtymällä laboratoriomenetelmien tulevaisuuden näkymiin.

---

Asiasanat: lapset, respiratoriset virukset, laboriodiagnostiikka, verkko-oppimateriaali, BioDigi-hanke

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Program in Biomedical Laboratory Science

---

Author: Katariina Laihola

Title of thesis: Laboratory Diagnostics in Respiratory Virus Infections with Children – BioDigi-project

Supervisor: Mika Paldanius

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2020      Number of pages: 52

---

This thesis was produced for the Oulu University of Applied Sciences which participates the national BioDigi-project. BioDigi-project has been established to produce a digital learning portal for Biomedical laboratory students. Learning material was produced in English to ensure learning possibilities for exchange students.

The aim of the practise-based thesis was to produce learning material that meets the set objectives: quality, information, visuality and accessibility. Knowledge of respiratory viruses, their laboratory methods and producing digital learning materials was gathered by studying lots of literature and scientific publications of these fields. Learning material consists of two slideshows and a multiple-choice test. First slideshow elaborates respiratory viruses with children and the second slideshow handles laboratory diagnosing methods for these viruses. Multiple choice test has been created to enable self-evaluation of the learning process.

The produced learning material for the Biodigi-project can be exploited by teachers and students without language barrier. Laboratory methods are developing continuously which requires updating of the learning material periodically. Testing of the digital learning portal with students will be dated in future. For further research the learning material can be supplemented with different kind of tasks and for example with a slideshow dealing future's laboratory methods.

---

Keywords: Children, Respiratory viruses, Laboratory diagnostics, E-learning material, BioDigi-project

*“Kuulen ja unohdan. Näen ja muistan. Teen ja ymmärrän.”*

*- Kungfutse*

# SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	7
2	LASTEN RESPIRATORISET VIRUKSET.....	8
2.1	Influenssavirus A ja B.....	8
2.2	Respiratory syncytial virus (RSV) .....	10
2.3	Parainfluenssavirus .....	11
2.4	Adenovirus .....	13
2.5	Rinovirus .....	14
2.6	Ihmisen metapneumovirus .....	16
3	VIRUSNÄYTTEET .....	17
4	LABORATORIODIAGNOSTIIKKA.....	18
4.1	Elektronimikroskopia .....	19
4.2	Virusviljely .....	20
4.3	Virusantigeenien osoittaminen .....	21
4.4	Virusnukleiinihappojen osoitus .....	23
4.5	Serologia .....	29
5	BIODIGI-HANKE.....	35
6	VERKKOPEDAGOGIIKKA .....	36
7	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	38
8	TOTEUTUS .....	39
8.1	Toiminnallinen opinnäytetyö.....	39
8.2	Oppimateriaalin luonti.....	39
8.3	Oppimateriaalin palaute ja arviointi .....	41
9	POHDINTA .....	42
	KIITOKSET .....	43
	LÄHTEET.....	44

# 1 JOHDANTO

Hengitystieinfektiot ovat tavallisimpia lasten sairauksia ja ne ovat yleisimmin respiratoristen virusten aiheuttamia. Lasten respiratoristen virusten aiheuttajaa voi harvoin diagnosoida pelkästään oireiden perusteella, sillä oirekuva on hyvin samankaltainen eri virusten välillä. Osa viruksista aiheuttaa suurimman osan tietyistä oirekuvista, kuten RS-viruksen aiheuttama bronkioliitti, adenoviruksen aiheuttama tonsilliitti ja parainfluenssaviruksen aiheuttama laryngiitti. Vaikka respiratorisiin viruksiin, influenssaa lukuun ottamatta, ei ole toistaiseksi saatavilla antiviraalista lääkettä, niiden diagnosointi vähentää turhia antibioottikuureja ja auttaa eristystarpeen arvioinnissa epidemia-aikana.

Respiratoristen virusten laboratoriodiagnostiikka on kehittynyt suurin harppauksin viimeisten vuosikymmenien aikana. Diagnostiikan kulmakiven muodostavista ei-molekylaarisista menetelmistä on kehitytty pitkä matka kohti nykyisiä molekyyliomenetelmiä, jotka ovat nopeita, herkkiä ja spesifisiä menetelmiä virusten osoittamiseksi. Opinnäytetyössä keskityttiin sekä virusdiagnostiikkaan että respiratorisia infektioita aiheuttaviin viruksiin.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda verkko-oppimateriaalia BioDigi-hankkeeseen, josta se on käytettävissä kaikkia hankkeessa mukana olevia yhteistyötahoja varten. Opinnäytetyö toteutettiin siten toiminnallisena opinnäytetyönä, jossa tuotettiin opintoportaaliin kaksi englannin kielistä diaesitystä ja monivalintatestiä.

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Oulun ammattikorkeakoulu ja ohjaajana Koulutus- ja tki-johdaja Mika Paldanius.

## 2 LASTEN RESPIRATORISET VIRUKSET

### 2.1 Influenssavirus A ja B

Influenssavirukset A ja B aiheuttavat epidemioita vuosittain ja influenssa A-virus kykenee lisäksi laajan muuntautumiskykynsä vuoksi aiheuttamaan pandemioita harvakseltaan. (Subbarao & Katz 2004.) Influenssaviruksen aiheuttaman hengitystieinfektion oireet voivat vaihdella lähes oireettomasta infektiosta aina hengenvaaralliseen tautiin, etenkin pienillä lapsilla, vanhuksilla ja immuunipuutteisilla potilailla (Templeton et al. 2004). Influenssaa on oireidensa perusteella hankalaa erottaa muista hengitystieinfektioista aiheuttavista viruksista. Etenkin pienillä lapsilla rajuoireinen influenssa johtaa infektion alkuvaiheessa usein sairaalahoitoon, koska oireet voivat muistuttaa sepsistä. Lapsilla oireita ovat tyypillisesti nopeasti korkeaksi nouseva kuume, päänsärky, kurkkukipu, nenän tukkoisuus, kuiva yskä ja yleinen huonovointisuus. Infektion aiheuttamista komplikaatioista yleisin on välikorvatulehdus. Alle 3-vuotiailla se ilmaantuu noin 40 %:lle ja 3-6-vuotiailla noin 20 %:lle. Harvinaisempi komplikaatio on keuhkokuume, joka ilmaantuu noin 2 %:lle lapsista. Influenssa tarttuu aerosoli- tai kosketustartuntana. Itämisaika on 1-2 vuorokautta ja tartuttavuus voi alkaa jo vuorokautta ennen oireiden puhkeamista. Nämä tekijät mahdollistavat viruksen leviämisen epidemioina nopeasti maasta toiseen. (Hedman et al. 2010, 481–482.)

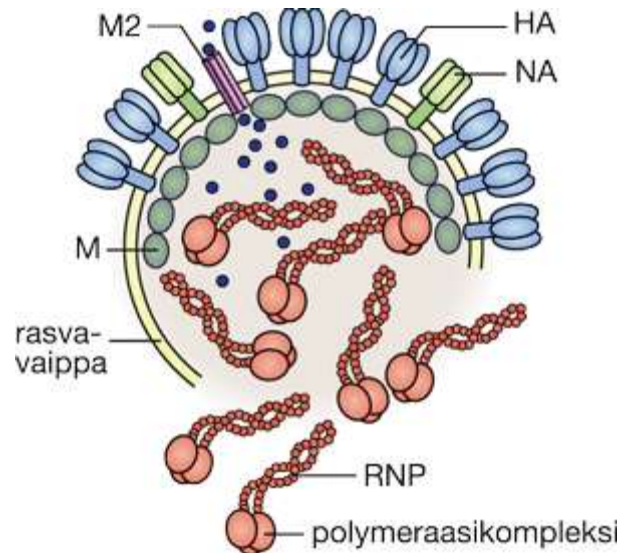
Koska etenkin lapsilla influenssaa on vaikeaa oireiden perusteella erottaa muista hengitystieviruksista, laboratoriodiagnostiikka on usein tarpeen oireiden syiden selvittelyssä. Influenssa A- ja B-viruksen diagnostinen näyte on ensisijaisesti nenänielun tikkunäyte. Tikkunäytteen sijaan voidaan tarvittaessa ottaa nenänielun imulimanäyte. Näyte tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa ja analysoida 48 tunnin kuluessa näytteenotosta. Näytteistä voidaan etsiä influenssa A- ja B-viruksia pikatestien ja geeninmonistusmenetelmän avulla. Virusinfektio voidaan todeta lisäksi seerumin vastaainetutkimuksella, mutta se on aikaa vievää eikä siksi sovi nopean diagnoosin tekemiseen. (Leinonen & Meurman 1992; NordLab 2019, viitattu 3.6.2019.) Influenssaa hoidetaan oireenmukaisesti levolla ja tulehduskipulääkkeillä. Antiviraalista lääkitystä (amantadiini, tsanamiviiri ja oseltamiviiri) on saatavilla, mutta se tulisi aloittaa 48 tunnin kuluessa oireiden alkamisesta. Lääkityksen avulla voidaan lievittää infektiota ja lyhentää sen kestoja tai käyttää taudin puhkeamisen estämiseen, jos-



kin sen teho on noin 60 % (Lumio 2019, viitattu 31.5.2019.) Influenssaa vastaan on saatavilla lapsille rokote, joka vähentää tautiin sairastuvuutta ja taudin vakavien oireiden kehittymistä (Hedman et al. 2010, 483–484).

Influenssavirukset kuuluvat *Orthomyxovirus*-heimoon. Niitä tunnetaan tällä hetkellä neljä tyyppiä, A, B, C ja D, joista tässä työssä keskitytään A- ja B-tyyppeihin (WHO 2019, viitattu 31.5.2019). Influenssa A-virusta tavataan ihmisten lisäksi useilla nisäkäs- ja lintulajeilla ja se voi tarttua eläimestä ihmiseen. Influenssa B-virus on tällä hetkellä vain ihmisessä tavattava virus ja voi siten tarttua vain ihmisestä toiseen. Influenssa A-virus kykenee muuntautumaan runsaasti, minkä vuoksi sen erilaisen alatyypien määrä on moninaista. Influenssa B-virus muuntautuu rajoitetummin ja hitaammin. Se on myös pääasiassa vain lasten hengitystieinfektioiden aiheuttaja, sillä sen hitaan muuntautumiskykynsä vuoksi lapsuudessa saatu vastustuskyky suojaa yleensä koko eliniän. (Brummer-Korvenkontio 2007, 94-95.)

Influenssavirusten genomi on yksijuosteista ja jaokkeista RNA:ta. Influenssa A- ja B-tyypeillä jaokkeita on kahdeksan kappaletta, joiden tiedetään koodaavan 10-11 proteiinia. Virus on tyypillisesti pallomainen tai soikea, jota ympäröi infektion yhteydessä isännän solun kalvorakenteista peräisin oleva lipidivaippa. Virus koodaa lipidivaippaan pintaproteiineja, joista valtaosa koostuu hemagglutiniini- ja neuraminidaasi-glykoproteiineista. (Infante-Resa et al. 2011.) Lisäksi lipidivaippaan koodataan ionikanavana toimivaa M2-proteiinia ja viruksen genomia suojaamaan M1-proteiinista koostuvaa nukleokapsidia (*KUVIO 1*) (Hedman et al. 2010, 471–472). Virukset kykenevät tuottamaan hemagglutiniinista (HA) ja neuraminidaasista (N) erilaisia muotoja, joiden perusteella viruksia voidaan luokitella erilaisiin alatyyppeihin. Influenssa A-virus voi tuottaa 16 erilaista hemagglutiniini-glykoproteiinia (tyypit H1-H16) ja yhdeksän neuraminidaasi-glykoproteiinia (tyypit N1-N9). (Du et al. 2019). Erilaisia A-viruksen alatyyppejä voi muodostua paljon. Esimerkiksi sikainfluenssapandemia vuosina 2009-2010 oli seurausta influenssa A-viruksen H1N1-muodosta. Virusmuuntelua tapahtuu isäntäsolun sisällä viruksen lisääntymisen yhteydessä. Viruksen RNA-polymeraasilla ei ole oikolukuaktiivisuutta, minkä seurauksena syntyy lukuvirheiden aiheuttamia muuntuneita genomeja. Influenssaviruksen runsaan muuntelun seurauksena rokotteen antama suoja ei ole koskaan täydellinen. Rokotteita tulee kehittää vuosittain ajankohtaisten virusten pintarakenteiden mukaan. (Hedman et al. 2010, 470–483.)



KUVIO 1. Influenssa A-viruksen rakenne. HA = hemagglutiniini, NA = neuraminidaasi, M1 = vaippaproteiini, M2 = ionikanavan muodostava proteiini, RNP = ribonukleiiniproteiinikompleksi (Hedman et al. 2010, 472).

Hemagglutiniinin merkitys on tunnistaa isännän solukalvojen reseptoreita, jotka auttavat isäntäsolun sisään tunkeutumisessa. Hemagglutiniini toimii viruksen genomia suojaavan nukleokapsidin vapauttajana sisällä olevan viruksen RNA:n isäntäsolussa. Kun virusta on lisääntynyt tarpeeksi isäntäsolun sisään, neuraminidaasin tehtävänä on irrottaa hemagglutiniinin ja isäntäsolun reseptorin välinen liitos. Uudet virukset voivat infektoida edelleen uusia isäntäsoluja, kun reseptorin ja hemagglutiniinin liitos on irrotettu. (Hedman et al. 2010, 472.)

## 2.2 Respiratory syncytial virus (RSV)

RSV eli respiratory syncytial virus on *Paramyxovirus*-heimoon kuuluva suuri, vaipallinen RNA-virus, jolla tunnetaan kaksi antigeenisesti erilaista alatyppiä, A ja B. RSV A on taudinaiheuttamiskyvyltään vaarallisempi, kuin B-tyyppi. (Peltola & Salo 2010, 199.) RS-viruksen alatyypit ovat seurausta lipidivaipan F- ja G-glykoproteiineista, joista G-proteiinilla on suurempi merkitys viruksen vuosittaiselle muuntelulle. F-glykoproteiini auttaa virusta fuusioitumaan isäntäsolun kanssa. G-glykoproteiini sisältää hemagglutiniinin ja neuraminidaasin, jotka edistävät sekä viruksen isäntäsoluun kiinnittymistä että irtoamista infektion leviämiseksi. (Sullender 2000; Tawar et al. 2009.) RSV on maailmanlaajuisesti pienten lasten yleisin hengitystieinfektioiden aiheuttajavirus. Pienillä lapsilla ja vanhuksilla se voi aiheuttaa keuhkokuumetta, alempien hengitysteiden tulehdusta ja bronkioliittia eli ilmatiehyiden tulehdusta. Jopa 50 – 80 % sairaalahoitoa vaatineista bronkioliiteista on RS-viruksen

aiheuttamia ja vain yksi prosentti lapsista saa tartunnan ilman oireita. (Zorc & Hall 2010.) RS-virus tarttuu herkästi aerosoli- tai kosketustartuntana ja sen itämisaika on 4-5 vuorokautta. Suomessa RS-viruksen aiheuttamia epidemioita havaitaan keskimäärin joka toinen vuosi, jolloin keväisin havaitaan pienempi infektioaalto ja syksyllä laajempi, noin kolme kuukautta kestävä epidemia. Epidemioiden aikana virustiheys on niin suuri, että tartunnalta on vaikeaa välttää. Uudet infektiot lapsuudessa ja aikuisuudessa ovat mahdollisia viruksen muuntelukyvyn vuoksi. (Korppi & Ruuskanen 2007, 193-195.) Cooperin tutkimusryhmän (2003, 452) mukaan lähes kaikki alle kaksi vuotiaat lapset ovat sairastaneet ainakin yhden RSV:n aiheuttaman infektion.

RSV-infektion oireita ovat tyypillisesti alussa ylähengitysteiden oireet, kuten nuha ja yskä, joita seuraa muutaman vuorokauden kuluttua uloshengityksen vaikeus ja sen vinkuna, kun virus leviää hengitysteiden epiteelillä keuhkojen alempiin osiin. RS-virus infektoi ilmatiehyiden epiteeliä, minkä seurauksena solut tuhoutuvat ja immuunivasteen reaktio aiheuttaa tiehyisiin limaisuutta ja siten hengitysvaikeuksia. Runsas limaisuus voi olla hankalaa etenkin imeväisikäisillä lapsilla, sillä ravinnonsaannin vähentyessä elimistön kuivuminen voi vaatia nesteytyshoitoa. Lapsilla kuumetta ja väsymystä voi esiintyä vaihtelevasti. Tyypillinen jälki-infektio on välikorvatulehdus. Hankalimpien oireiden riskiryhmään kuuluvat keskoset, alle kolmen kuukauden ikäiset vauvat ja pienet lapset, joilla on synnynnäinen sydänsairaus, tai keuhkosairaus. Diagnoosin tukena käytetään oirekuvan lisäksi nenänielunäytteestä tehtävää pikatestiä ja geeninmonistusmenetelmää. (Hedman et al. 2010, 497–498; Korppi & Ruuskanen 2007, 193–195.) RSV-infektion hoito on oireenmukaista. Pienten lasten ja etenkin riskiryhmien kohdalla sairaalahoito, jopa tehohoito on voi olla tarpeen. Riskiryhmiin kuuluville voidaan ennaltaehkäisevästi, ennen oireiden ilmaantumista, käyttää IgG-luokan vasta-ainetta ehkäisemään vakavimpien infektioiden kehittymistä. Vasta-aineen tehon on kuitenkin todettu olevan heikko, vain noin seitsemän prosenttia. RSV-rokotteita on kehitetty kauan ja lapsille on odotettavissa rokote RS-virusta vastaan lähivuosina. (Tampereen yliopiston rokotetutkimuskeskus 2018, viitattu 3.6.2019.)

### 2.3 Parainfluenssavirus

Parainfluenssavirukset (HPIV) ovat merkittävä lasten hengitystieinfektioiden aiheuttaja. Ne aiheuttavat oireita nuhakuumeesta keuhkokuumeeseen ja ovat yleinen laryngiitin aiheuttaja. Kyseessä on *Paramyxovirus*-heimoon kuuluva keskikokoinen ja vaipallinen, yksijuosteinen RNA-virus, joka jaetaan antigeeniensa perusteella viiteen alatyyppiin: 1, 2, 3, 4A ja 4B. (Hedman et al. 2010, 492;

Schomacker et al. 2012.) Influenssavirusten tavoin parainfluenssaviruksen alatyypit luokitellaan niiden pinnan sisältämien hemagglutiniini- ja neuraminidaasi-glykoproteiinien perusteella (Dirr et al. 2017). Virukset ovat keskenään hyvin samankaltaisia, mutta niiden pienet rakenteelliset erot saavat aikaan eroja niiden virulenssissa. HPIV-1 on yleisin parainfluenssavirustyyppi etenkin pienillä lapsilla. Ensimmäinen tartunta saadaan 7-36 kuukauden iässä, jota yleensä seuraa lievempioreiset infektiot kahden ja kolmen vuoden iässä. (Henrickson 2003.) HPIV-1 aiheuttaa tyypillisimmin äänihuulten alueella laryngiitin, mutta myös vakavammat, alempien hengitysteiden infektiot ovat mahdollisia. Tutkimusten mukaan viisi vuotiaista lapsista noin 75 %:lla on vasta-aineita HPIV-1-virusta vastaan ja noin 25 %:lla vastasyntyneistä ja pienistä lapsista taudinkuva kehittyy kliinisesti voimakkaaksi. (Nichols 1985 artikkelissa Durbin & Karron 2003.) Uusien tartuntojen myötä oireet heikentyvät ja ilmenevät lähinnä ylempien hengitysteiden tulehduksena (Henrickson 2003). HPIV-2 on virulenssiltaan hyvin samankaltainen kuin HPIV-1, mutta sen esiintyvyys on harvinaisempaa. HPIV-3 aiheuttaa vakavia alahengitystietulehduksia edellisiä useammin. (Fiore et al. 1998.) Se on yleinen lähinnä alle yksi vuotiailla lapsilla (Parija et al. 2019, viitattu 4.6. 2019). HPIV-4A ja -4B ovat vielä vähemmän tunnettuja viruksia, mutta niiden aiheuttamien infektioiden tiedetään olevan lieviä (Henrickson 2003; Schomacker et al. 2012).

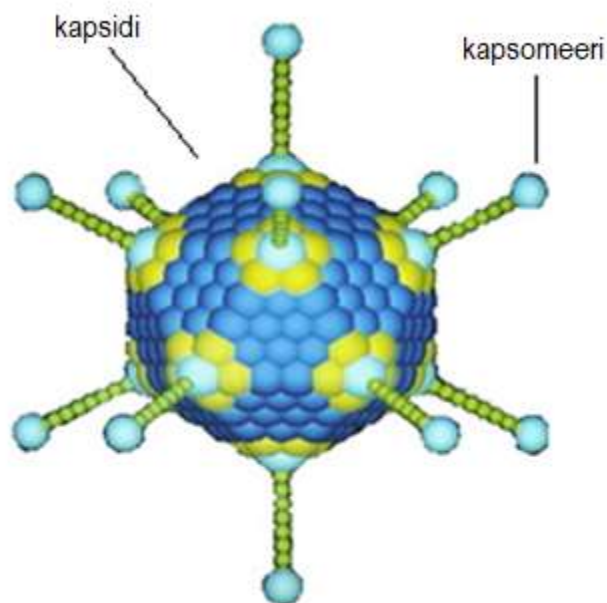
Taudin itämisaika on 1-7 vuorokautta. Virus tarttuu herkästi aerosoli- ja kosketustartuntana. HPIV-1, HPIV-2 ja HPIV-4-virukset tarttuvat 3-4 vuorokautta ennen oireiden alkamista ja tartuttavuus jatkuu noin 10 vuorokauden ajan. HPIV-3-virus puolestaan tarttuu jo kuusi vuorokautta ennen oireiden alkamista ja tartuttavuus jatkuu jopa kuuden viikon ajan ensimmäisten oireiden ilmaantumista. (Frank et al. 1981.) Oireet vaihtelevat flunssasta keuhkokuumeeseen riippuen yksilöstä ja viruksen alatyypistä. Kuten jo mainittiin, HPIV on yleisimpiä laryngiitin ja alempien hengitystietulehdusten aiheuttajia. Viruksilla on tyypin mukaan erilainen kyky levitä alempiin hengitysteihin ja siten taudinkuva voi vaihdella suurestikin. Puolustusjärjestelmän aikaansaama immuniteetti virusta vastaan on lyhytkestoinen, minkä vuoksi uudet infektiot ovat mahdollisia, tosin lievempiä. Hoito on oireenmukaista ja rokotetutkimuksilla ei ole toistaiseksi saatu kehitettyä tarpeeksi tehokasta rokotetta. (Hedman et al. 2010, 492–493.)

Diagnosointiin käytetään oirekuvan lisäksi viruksen osoitusta nenänielunäytteestä antigeeniosoituksella tai geeninmonistusmenetelmällä. Seerumin IgG-luokan vasta-aineiden osoitus on myös mahdollista, mutta HPIV-1, -2, -3 ja -4:n ristireagointi estää kyseisten alatyypien määrittämisen. Serologisella tutkimuksella voidaan kuitenkin todeta yleisesti taudinaiheuttajaksi parainfluenssavirus. HPIV:n määrittämiseen voidaan käyttää lisäksi virusviljelyä. Tällöin on kiinnitettävä erityistä

huomiota viruksen asianmukaiseen ja nopeaan kuljetukseen tutkimusta varten, jotta viruksen infektiokyky säilyy. (Hedman et al. 2010, 493; Henrickson 2003; NordLab 2019, viitattu 4.6.2019.)

## 2.4 Adenovirus

Ihmisen adenovirukset kuuluvat *Mastadenovirus*-heimoon. Ne ovat keskikokoisia, vaipattomia ja kaksijuosteisia DNA-virusia, joiden genomi on symmetrisen monikulmion, ikosahedraalisen kapsidin sisällä. Kapsidin pinnalla on kiinnittyneenä proteiineja, kapsomeereja, joiden avulla virus kiinnittyy isäntäsolunsa pintarakenteisiin (KUVIO 2). Adenovirukset aiheuttavat lasten hengitystieinfektioista 5-8 %. Adenovirusepidemioita esiintyy läpi vuoden, sillä virus tarttuu erittäin herkästi sekä aerosoli- ja kosketustartuntana että uloste-suu-reittiä pitkin. Adenovirustartunnan saakin tyypillisesti päiväkodissa, koulussa, sairaalassa tai varuskunnassa. Noin puolet tartunnan saaneista eivät oireile, mutta kuitenkin tartuttavat virusta edelleen. Adenoviruksen aiheuttamat infektiot ovat yleisimpiä alle viisi vuotiailla, mutta oireilevat infektiot vanhemmallakin iällä ovat mahdollisia. (Huovinen et al. 2003, 444–445.)



KUVIO 2. Adenoviruksen genomi sijaitsee kapsidin sisällä. Kapsidissa on ulokkeita, kapsomeereja, joiden rakenne vaihtelee viruksen alatyypin välillä (Myts 2007, viitattu 28.6.2019).

Adenoviruksen itämisaika on viikosta kahteen viikkoon. Virus lisääntyy hengitysteiden epiteelin lisäksi myös suoliston epiteelillä. Oireita ovat tyypillisesti pelkkä kuume tai kuumeinen ylähengitys-

tietulehdus, peitteinen tonsilliitti tai korvatulehdus. Pienillä lapsilla esiintyy myös mahasuolitulehdusta. Vakavana taudinkuva voi aiheuttaa kuumekouristuksia tai edetä keuhkokuumeeksi. (Hedman et al. 2010, 502–504.) Ihmisen adenovirusia on useita eri alatyyppejä ja ne aiheuttavat erilaisia infektioita. Erilaiset alatyypit ovat seurausta viruksen pintarakenteen kapsomeerien vaihtelevuudesta. (De Jong et al. 1999.) Adenovirukset A ja F aiheuttavat tyypillisesti suolisto-oireita, B1-, C-, D- ja E-virukset aiheuttavat hengitystieoireita, B2-virus munuaisoireita, ja D-virus hengitystieoireiden lisäksi silmäoireita (Ghebremedhin 2014). Tutkimusten mukaan kouluikäisillä voidaan löytää vasta-aineita vähintään kolmea hengitystieoireita aiheuttavaa alatyyppeä vastaan sekä lisäksi vielä vasta-aineita suolisto-oireita aiheuttavia alatyyppejä kohtaan. Siten eri alatyyppeiden aiheuttamat infektiot ovat lyhyelläkin aikavälillä mahdollisia ja immuniteetin antama suoja tiettyä alatyyppeä kohtaan on myös lyhytikäinen. Adenovirukseen ei ole olemassa lääkehoitoa ja siten hoito on oireenmukaista. (Hedman et al. 2010, 501–504.)

Oirekuvan perusteella adenoviruksen aiheuttaman infektion erottaminen streptokokkitonsilliitista on vaikeaa ilman laboratoriodiagnostiikkaa. Kaikilla ihmisen adenovirusilla on kapsidissaan niille yhteinen heksoniantigeeni, joka voidaan määrittää antigeeniosoituksella. Hengitystie-eritteen tai uloste-antigeeniosoitus ja geeninmonistusmenetelmä ovat kliinisesti merkittävimpiä laboratoriomenetelmiä. Serologiset vasta-ainetutkimukset ovat herkkiä, mutta verraten hitaita ja siksi vähemmän käytettyjä. Virusta on myös mahdollista viljellä tai tarkastella elektronimikroskopiolla sen tyypillisen kapsidirakenteensa perusteella. (Hedman et al. 2010, 504; Huovinen et al. 2003, 445; NordLab 2019, viitattu 4.6.2019.)

## 2.5 Rinovirus

Rinovirukset eli human rhinovirus (HRV) kuuluvat *Picornavirus*-heimoon. Ne ovat pieniä ja yksijuosteisia, vaipattomia RNA-virusia. Rinovirukset ovat maailmanlaajuisesti yleisin ylähengitystieinfektioiden aiheuttaja. Ne aiheuttavat lapsilla lisäksi muun muassa välikorva- ja nenän sivuontelotulehdusta sekä bronkioliittia. (Jacobs et al. 2013, Hedman et al. 2010, 518.)

HRV tarttuu aerosoli- ja kosketustartuntana hengitystie-eritteistä. Virus tarttuu herkästi, sillä se säilyttää infektiokykynsä pinnoilla jopa useita vuorokausia. (Jacobs et al. 2013.) Virus on hyvin yleinen pienillä lapsilla ja yli puolet kliinisesti todetuista rinovirusinfektioista on tavattu alle neljävuotiaiden lasten keskuudessa (Jaakkola et al. 2017, 10). Viruksen itämisaika on yhdestä kahteen vuorokautta

ja infektion kesto on 1-2 viikkoa. Tyypillisiä oireita ovat ylähengitystietulehduksen oireet, päänsärky ja kuume. Myös poskiontelotulehdus liittyy tyypillisesti rinovirusinfektioon, sillä niistäminen edesauttaa virusten siirtymistä nenän sivuonteloihin. Vakavampi alahengitystieinfektio on mahdollinen etenkin riskiryhmissä, kuten pienillä lapsilla, vanhuksilla ja immuunipuutteisilla henkilöillä. Oireilu on voimakkainta alle viisi vuotiailla lapsilla, mutta oireilevia infektioita tavataan myös aikuisilla. Aikuisilla kuitenkin yli puolet tartunnoista ovat oireettomia. Akuuttien infektioiden lisäksi rinovirusten on todettu liittyvän kroonisen keuhkohtaumataudin kehittymiseen lapsilla (COPD). Kehittyvän keuhkokudoksen altistuminen rinovirusinfektion aiheuttamille soluvaurioille lapsuudessa toimii altistavana tekijänä COPD:lle. Lisäksi mahdollinen infektion aiheuttama bronkioliitti toimii astman altistavana tekijänä. Toistaiseksi toimivaa antiviraalista hoitoa tai rokotetta ei ole saatavilla viruksen monimuotoisuuden vuoksi. Diagnoosinnin perusteella voidaan kuitenkin pyrkiä estämään viruksen leviämistä edelleen ihmisestä toiseen. (Jacobs et al. 2013; Peltola et al. 2008.)

Rinoviruksilla tavataan yli 150 erilaista virustyyppiä, jotka jaetaan edelleen A-, B- ja C-lajeihin. HRV-A lajeja tunnetaan kaikkiaan 80, HRV-B lajeja 32 ja HRV-C lajeja 54 kappaletta. Lajeilla on keskenään hyvin samantyyppinen antigeenirakenne, joka on seurausta niiden viruskapsidirakenteen pienistä eroista. Rinoviruksen kapsidi muodostaa symmetrisen ikosahedraalisen rakenteen, joka koostuu neljästä rakenneproteiinista VP1-VP4. Näistä VP1-VP3 muodostavat kapsidin ulkopinnan, joiden perusteella määritetään rinovirusten antigeeniset erot. (McIntyre et al. 2013.) Koska erivirustyyppisiä on runsaasti eikä antiviraalista lääkettä ole vielä kehitetty, niiden erittelemisen kliinistä päätöksentekoa varten ei ole mielekäästä. Laboratoriodiagnostiikalla pyritään erottelemaan bakteeri- ja virusinfektiot toisistaan ja löytämään infektion todellinen aiheuttaja etenkin alahengitystieinfektioiden yhteydessä. (Kares et al. 2004.) Laboratoriodiagnostiikka kohdentuu tyypillisesti riskiryhmiin eli pieniin lapsiin, vanhuksiin ja immuunipuutteisiin henkilöihin, joilla vakavamman oireiston kehittyminen on todennäköisempää (Jacobs et al. 2013). Käytetyin menetelmä rinoviruksen osoitukseen on nenänielunäytteestä tai bronkoalveolaarinsteestä tehtävä viruksen nukleiinihapon osoitus geenimonistusmenelmää hyödyntäen (Huslab 2019, viitattu 5.6.2019; Jacobs et al. 2013; NordLab 2019, viitattu 5.6.2019).

## 2.6 Ihmisen metapneumovirus

Metapneumovirus (MPV) kuuluu *Paramyxovirus*-heimoon ja se on vaipallinen, yksijuosteinen RNA-virus. Viruksen rakenne muistuttaa läheisesti RS-virusta esimerkiksi pintarakenteiden F- ja G-glykoproteiinien osalta. (Hamelin et al. 2004.) Kyseessä on suhteellisen tuore viruslöytö, jonka Van den Hoogen kollegoineen löysi vuonna 2001 (Jartti et al. 2008). MPV on maailmanlaajuisesti merkittävä hengitystieinfektioiden aiheuttaja erityisesti alle viisi vuotiailla lapsilla sekä vanhuksilla ja immuunipuutteisilla henkilöillä, joilla infektion oirekuva on myös yleensä hankalampi (Hedman et al. 2010, 499–500). Kaikista lasten hengitystieinfektioista metapneumovirus käsittää noin viisi prosenttia ja epidemiat ajoittuvat yleensä talvikuukausille (Jartti et al. 2008). MPV-infektion oireet muistuttavat läheisesti RS-viruksen aiheuttamaa infektiota flunssan oireineen. MPV:lle on lisäksi tyypillistä äkillinen välikorvatulehdus. Vakavammat sairaalahoitoa vaativat oireukset liittyvät muun muassa bronkiitin ja pneumonian kehittymiseen riskiryhmiin kuuluvilla henkilöillä, kuten pienillä lapsilla, joilla pienten keuhkoputkien tulehdus on yleinen löydös MPV-infektiossa (Jartti et al. 2002.) Virus tarttuu aerosoli- ja kosketustartuntana. Infektion itämisaika on kolmesta viiteen vuorokautta ja oirekuva kestää joitakin vuorokausia. Turvallista antiviraalista lääkettä tai rokotetta ei ole vielä kehitetty ja infektion hoito on siten oireenmukaista. Lähes kaikki lapset saavat tartunnan viiteen ikävuoteen mennessä. (American Lung Association 2018, viitattu 5.6.2019.)

Metapneumovirukselta on löydetty kaksi toisistaan geneettisesti poikkeavaa linjaa, A ja B, jotka jakautuvat edelleen kahteen alaryhmään: A1, A2, B1 ja B2. Alaryhmät eroavat toisistaan etenkin pintaproteiineiltaan. On todennäköistä, että viruksen kannat vaihtelevat vuosittain RS-viruksen tapaan. Siten MPV-infektio ei anna pitkäkestoista immunitettia, vaan uudet infektiot ovat mahdollisia. (Jartti et al. 2008.) MPV:n laboratoriodiagnostiikka perustuu etupäässä nenänielunäytteestä tai bronkoalveolaarinsteestä tehtävään viruksen geenimonistusmenetelmään ja antigeenitunnistukseen (Mackay et al. 2003, NordLab 2019, viitattu 5.6.2019).



### 3 VIRUSNÄYTTEET

Respiratoristen infektioiden virusnäytteet ovat tyypillisimmin nielun, nenänielueritteen tai keuhkoputken tikku-, imulima- tai huuhtelunäytteitä ja ne otetaan oireiden esiintymisalueelta. Huuhtelu- ja imulimanäytteitä on pidetty tikkunäytteitä luotettavampina näytteinä, mutta esimerkiksi influenssavirusten havaitseminen virusantigeeniosoituksessa on suositeltavampaa tehdä tikkunäytteestä. (Agoritsas et al. 2006.) Yleisesti näytteet kerätään helppouden vuoksi tikkunäytteinä ja vasta tarvittaessa imu- tai huuhtelunäytteinä. Virusnäytteille on asetettu erilaisia vaatimuksia käytettävän tutkimusmenetelmän mukaan. Virusviljelyyn, antigeeniosoitukseen ja nukleiinihappo-osoitukseen käytettävät näytteet tulee ottaa mahdollisimman varhain, heti infektion ensimmäisten oireiden ilmaannuttua. Silloin infektiivien viruspartikkelien määrä on korkeimmillaan ja niiden tasot alkavat laskea nopeasti immuunipuolustuksen käynnistymisen myötä. Jos menetelmänä käytetään virusvasta-aineiden osoitusta, näytteiden ottamisella ei ole kiirettä, sillä vasta-aineet muodostuvat immuunipuolustuksen toiminnan tuloksena. Esimerkiksi IgM-luokan vasta-aineiden määrä on suurimmillaan vasta viikkojen kuluttua infektiosta ja IgG-luokan vasta-aineilla jopa kuukausien kuluttua (KUVIO 7). (Hedman et al. 2011, 55, 63.)

Laboratoriossa on virusnäytteiden toimittamiseen omat ohjeistuksensa näytetyypistä ja menetelmästä riippuen. Esimerkiksi virusviljely- ja nukleiinihappo-osoitusnäytteet tulee toimittaa laboratorioon viipymättä ja jäähdytettyinä kun taas antigeeniosoitukseen ja vasta-ainetutkimuksiin tarvittavat näytteet voidaan toimittaa huoneen lämpöisinä. Nenästä ja nielusta otettavat tikkunäytteet laitetaan viruskuljetusputkeen ja huuhtelunäytteet tiiviiseen, steriiliin astiaan. Asianmukaisen toimituksen lisäksi näytteessä tulee olla mukana menetelmän valintaan vaikuttavat esitiedot, kuten näytetyppi, oireet, matkustusanamneesi, rokotustiedot ja mahdollinen raskaus. Perusteellisten esitietojen avulla voidaan valita oikeat tutkimukset ja tulkita tuloksia asianmukaisesti. (Hedman et al. 2011, 63-64.)

## 4 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

Virusdiagnostiikan kehittymisen myötä useat menetelmät ovat kehittyneet nopeammiksi, tarkemmiksi ja herkemmiksi. (Souf 2016) Sen rinnalla virusten lääkehoito on myös parantunut, vaikka ainoa tarpeeksi tehokas antiviraalinen lääke on tällä hetkellä saatavilla ainoastaan influenssavirukselle. Useimmiten antiviraalinen hoito tulisi aloittaa infektion alkuvaiheessa, minkä vuoksi nopean ja tarkan virusdiagnostiikan tarve on lisääntynyt. Nykyiset menetelmät voivat antaa vastauksen parhaimmillaan muutamassa tunnissa. Primaarin virusinfektion osoituksen lisäksi virusdiagnostiikkaa tarvitaan antiviraalisen lääkkeen hoitovasteen seurantaan, latenttien infektioiden reaktivaatioiden osoittamiseen ja immuniteettitutkimuksiin. Erilaisilla laboratoriodiagnostisilla menetelmillä pyritään osoittamaan itse viruksia tai niiden nukleiinihappoja, proteiineja tai mittaamaan infektion aikaansaamia vasta-aineita. Menetelmä valitaan sen perusteella, minkä tyyppinen infektio on kyseessä ja kuinka kauan se on kestänyt. Taustatietojen perusteella voidaan päätellä, onko kyseessä primaari-infektio, krooninen infektio vai latentin infektion reaktivaatio. Potilaan kliinisen kuvan tueksi valitaan sopivat diagnostiset näytteet ja menetelmät. Koska infektioita aiheuttavia viruksia on paljon ja niillä jokaisella on omat virulenssitekijänsä, erilaisia diagnostisia menetelmiä tarvitaan laaja kirjo (TAULUKKO 1). (Das et al. 2018; Hedman et al. 2011, 54–55; Souf 2016.)

*TAULUKKO 1. "Virustutkimusten kliininen käyttökelpoisuus ja informaation sisältö suhteellisella asteikolla. Viruslajien ja taudinsyntymekanismien monilukuisuuden sekä kliinisten tilanteiden monitoriteisuuden vuoksi tämä ohjeisto on vain suuntaa antava" (Hedman et al. 2011, 56).*

Tutkimuksen tavoite	Virusviljely ja EM	Virusantigeenien osoitus	Viruksen nukleiinihappo-osoitus	Serologia
Primaari-infektion ajoitus	+	+	+	+++
Reaktivaation toteaminen	++	+++	+++	+
Paikallisen virusaktivaation osoitus	++	++	+++	+
Virusgenomin määrän tai laadun selvittäminen	-	-	+++	-
Viruksen kantajuuden tai tartuntahistorian määrittäminen	-	-	+/-	+++

## 4.1 Elektronimikroskopia

Elektronimikroskopia (EM) on yksi vanhimmista suorista tutkimusmenetelmistä, jota käytetään sekä kliiniseen virusten diagnosointiin että niiden hienorakenteen ja patogeneesin tutkimiseen (Roingear 2008). Elektronimikroskopiolla on ollut keskeinen tehtävä uusien virusten tunnistamisessa. Esimerkiksi vuosien 2002-2003 SARS-epidemian aiheuttanut koronavirus löydettiin elektronimikroskooppisesti. (Falsey & Walsh 2003.)

Elektronimikroskopiassa näytteeseen kohdistetaan näkyvän valon sijaan elektronivirta, joka saa aikaan kuvan näytteestä epäsuorasti. Elektronimikroskoopin erotuskyky on jopa kaksi nanometriä ja se mahdollistaa huomattavasti valomikroskooppia pienempien yksityiskohtien tutkimisen. Virusnäyte laimennetaan näytelevylle ja se kuivataan sekä värjätään väriaineella, jossa on raskasmetalleja, jotka mahdollistavat näkyvän kuvan muodostumisen. Kuva on mahdollista muodostaa laitteiston mukaan joko läpivalaisukuvana tai pinnan rakenteet havainnollistavana pintapyyhkäisykuvana. Läpäisyelektronimikroskoopi ohjaa elektroneja näytteen läpi magneettilinsien avulla muodostaen kuvan fluoresoivalle levylle. Pyyhkäisyelektronimikroskoopi muodostaa kuvan digitaaliselle näytölle virusnäytteen pinnasta irtoavista tai heijastuvista elektroneista. Lisäksi edellä mainitut tekniikat on yhdistetty pyyhkäisy-läpivalaisumikroskoopissa, jossa virusnäytteestä voidaan tutkia sekä pinnanmuotoja, että rakenteita. (Hedman et al. 2011, 57–58; Vernon-Parry 2000.)

EM mahdollistaa virusten diagnosoinnin silloin kun muita diagnostisia menetelmiä ei voida käyttää tai kyseessä on ennestään tuntematon virus. Elektronimikroskopiolla voidaan nopeasti tunnistaa virusten morfologiaa usean tyyppisistä näytteistä. Vaikka EM:lla on useita etuja virusten tutkimuksessa, nykyään sen käyttö kliinisen diagnoosin tukena on vähäistä. Elektronimikroskopia vaatii käyttäjältään huomattavaa teknistä osaamista ja asiantuntijuutta. Lisäksi tutkittavalta näytteeltä vaaditaan korkeaa viruspartikkelien pitoisuutta ja menetelmä itsessään on suhteellisen epäherkkä ja vaatii kalliit laitteistot. Siten uudet menetelmät ovat korvanneet suurelta osin EM:n hyödyntämisen virusten diagnostiikassa. Uusien virusten tutkimustyössä elektronimikroskopian rooli on kuitenkin yhä korvaamaton. (Goldsmith & Miller 2009; Hazelton & Gelderblom 2003; Hedman et al. 2011, 58.)

## 4.2 Virusviljely

Virusviljely oli paljon käytetty perusmenetelmä respiratoristen virusten diagnosoinnissa vuosikymmenten ajan. Nykyään virusviljelmiä hyödynnetään lähinnä viruspartikkelien lukumäärän kasvatuksessa ja tutkimustyön parissa. Virusviljelmiä käytetään vielä muun muassa adeno-, influenssa-, RS-, rino- ja parainfluenssavirusten eristämisessä ja tunnistamisessa. Esimerkiksi rinovirukselle viljely soveltuu erityisen hyvin, koska sen useiden alatyyppeiden vuoksi antigeeniosoitus ja serologiset menetelmät ovat osoittautuneet ongelmallisiksi. Influenssavirusten diagnostiikassa viljely mahdollistaa antigeenivaihtelusta johtuvan viruksen muuntumisen tarkastelun, joka toimii myös pohjana rokotteiden vuosittaiselle kehitykselle. (Leinonen & Meurman 1992; Olsen et al. 1993.) Näytteeksi käy nielu- ja nenänielunäyte tai bronkoalveolaarihuuhtelunäyte. Viljeltävän viruksen tulee olla infektiokykyinen, minkä vuoksi virusnäyte tulee toimittaa jäähdytettynä ja viipymättä laboratorioon. (Hedman et al. 2011, 63; NordLab 2019, viitattu 11.6.2019.)

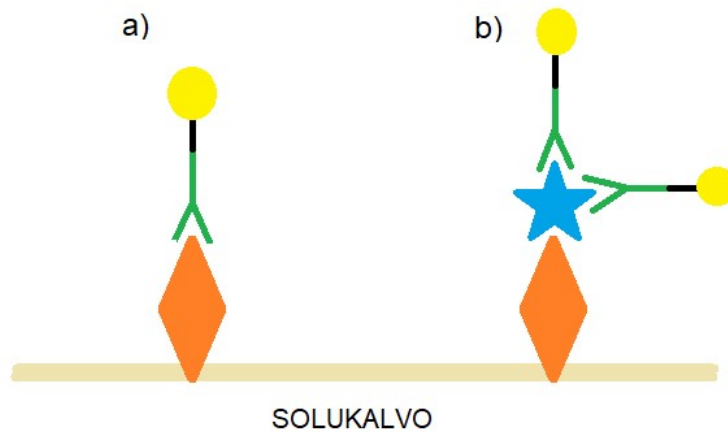
Virusviljelyssä virusta kasvatetaan soluviljelmässä *in vitro* erityisiä viljelyputkia hyödyntäen. Viljelyalustana voidaan käyttää esimerkiksi primaariviljelmiä, jotka valmistetaan irrottamalla soluja kudoksista ja siirtämällä ne ravintoneesteeseen. Primaariviljelmän solut voivat jakautua rajallisen määrän ja niiden elinaika on joitakin viikkoja. Primaariviljelmien lisäksi hyödynnetään tyyppillisesti jatkosolukantoja, jotka valmistetaan rajattomasti jakautuvista syöpäkasvaimista. Koska eri viruslajeilla on erilaiset edellytykset infektoida soluja, viljelmän solukot tulee valita sillä oletuksella, mitä viruksia kyseisissä näytteissä odotetaan esiintyvän. Kasvatuksen jälkeen virus voidaan todeta viljelmästä usealla tavalla. Virukset saavat viljelmässä aikaan solujen rikkoutumista virukselle tyyppisellä tavalla. Sytopaattista vaikutusta voidaan tutkia tarkemmin valomikroskoopilla. Eroja voidaan havaita sytopaattisen vaikutuksen ilmenemisnopeudessa ja siinä, missä solukotyyppissä sitä esiintyy. Lisäksi eroja voidaan havaita esimerkiksi solujen pyöristymisessä, kuolemassa ja irtoamisessa alustastaan. Soluviljelmissä havaittujen ilmiöiden pohjalta voidaan alustavasti päätellä, mikä viruslaji on kyseessä. Tarkempi viruksen tyyppitys voidaan tehdä immunologista menetelmää hyödyntäen, esimerkiksi estämällä viruksen kasvua viljelmässä viruslajispesifisellä vasta-aineella. (Hedman et al. 2011, 56; Hematian et al. 2016.)

Virusviljelyn etuna on sen herkkyys, yksikin viruspartikkeli riittää muodostamaan laajan infektion viljelmässä. Oleellisen tärkeää viljelmän onnistumiseksi onkin, että näyte on otettu oikeasta paikasta ja että se toimitetaan laboratorioon infektiokykyisenä. Menetelmä on myös edullinen tapa kasvattaa useanlaisia viruksia – niin tunnettuja kuin tuntemattomia. Putkimenetelmällä voidaan

kasvattaa useita solulinjoja, joka mahdollistaa useiden eri virusten samanaikaisen havaitsemisen. (LaSala, et al. 2007.) Ongelma viljelyissä on, että viljelty virus ei aina ole kyseisen tutkittavan infektion aiheuttaja. Esimerkiksi adenovirus ja enterovirus erittyvät ulosteeseen pitkään infektion jälkeen. Toisaalta viljelyn tuloksena voidaan löytää sellainen infektion aiheuttaja, jota ei alun perin osattu epäillä. Lisäksi ongelmana voidaan kokea, että viljelmät ovat suhteellisen työläitä tehdä ja negatiivisen tuloksen saaminen voi joissain tapauksissa viedä viikkoja. Virusviljely on herkkä kontaminaatioille. Viljelymenetelmiä kuitenkin kehitetään jatkuvasti ja esimerkiksi tulosten saamista voidaan nopeuttaa sentrifugoitua putkikasvatusta hyödyntämällä. Uudet molekyyli menetelmät ovat hiljalleen syrjäyttäneet virusviljelmien valta-asemaa. Virusviljely on edelleen tärkeä kultainen standardi osassa virusdiagnoosin menetelmiä. (Hedman et al. 2011, 56-57; Hematian et al. 2016; Vainionpää et al. 2000.)

### 4.3 Virusantigeenien osoittaminen

Antigeenit ovat virusten pintarakenteissa esiintyviä proteiineja tai polysakkarideja, jotka saavat aikaan elimistön immuunivasteen käynnistymisen ja vasta-aineiden tuottamisen. Spesifinen vasta-aine tarttuu antigeeniin kuin avain lukkoon tehostaen immuunireaktiota kyseistä virusta vastaan. (Tirri et al. 2001, 55.) Virusantigeenien osoittamiseen kehitetyt menetelmät perustuvat näiden viruksen proteiiniantigeenien havaitsemiseen merkittyjen vasta-aineiden avulla. Virusantigeenin osoittamisessa voidaan käyttää useita menetelmiä, joista käytetyimpiä ovat immunofluoresenssitekniikka (FIA, fluorescence immunoassay) ja entsyymi-immunologiset menetelmät (EIA, enzyme immunoassay). FIA:ssa virusantigeeniin liitettävässä spesifisessä vasta-aineessa käytetään merkkiaineena fluoresoivia molekyylejä, jotka säteilevät valoa. Fluoresoidut näytteet tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla visuaalisesti. Jos näyte fluoresoi, näytteessä on läsnä tutkittavan viruksen antigeenia. EIA:ssa virusantigeenit liuotetaan ja kerätään spesifisen vasta-aineen avulla mikrotiterilevyn pohjalle. Näytelevylle lisätään toinen vasta-aine, johon on liitetty merkkiaineeksi entsyymi. Näytteessä tapahtuva entsyymaattinen reaktio osoittaa, että näytteessä on läsnä tutkittavan viruksen antigeenia (KUVIO 3). (Halonen et al. 1996.) Näytteeksi soveltuu nielu- ja nenänielunäyte tai bronkoalveolaarihuuhtelunäyte. Näytteen kuljetus ei vaadi virusviljelyn tapaan erityisiä toimia, sillä näytteeksi soveltuu myös avirulentti näyte. (Hedman et al. 2011, 59; NordLab 2019, viitattu 12.6.2019.)



KUVIO 3. Viruksen antigeenin osoittaminen merkattulla vasta-aineella. Merkattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti viruksen pinnan antigeeniproteiiniin. a) Fluoresoivalla merkkiaineella leimattu vasta-aine sitoutuu suoraan tutkittavaan antigeeniin. b) Primaarinen vasta-aine sitoutuu viruksen tutkittavaan antigeeniin ja sen sitoutuminen osoitetaan entsyymileimatulla sekundaarivasta-aineella.

Menetelmillä on useita etuja. Ne ovat nopeita, spesifisiä ja herkkiä. Lisäksi ne mahdollistavat usean respiratorisen viruksen samanaikaisen tutkimisen yhdestä potilasnäytteestä, joka parantaa varhaista diagnoosia ja mahdollistaa myös epidemioiden varhaisen havaitsemisen. Virusantigeeni-osoitukset soveltuvat hyvin myös myöhemmän viruksen reaktivaation toteamiseen. Serologisilla menetelmillä tutkittavaa IgM-luokan vasta-aineiden vastetta ei reaktivaatiossa aina muodostu (TAULUKKO 1). Antigeenien havaitsemiseen perustuvat menetelmät mahdollistavat myös sellaisen virusten osoittamisen, joiden kasvatus soluviljelmissä on joko hidasta tai se ei ole lainkaan mahdollista.

Respiratoristen virusten osoittamiseen tarkoitettavat pikatestit (POC, point-of-care) mahdollistavat taudinaiheuttajan osoittamisen jopa alle 30 minuutissa. Esimerkiksi influenssadiagnostiikka (A ja B) sekä RS-viruksen osoitus on mahdollista toteuttaa POC-testinä. Ne ovat edullisia ja suhteellisen helppoja toteuttaa, mikä tekee niistä arvokkaita diagnostisia työkaluja muun muassa vastaanotoilla, ensiavussa ja tilanteissa, joissa resurssit ovat rajallisia. POC-testien ansiosta lisäkokeiden ja turhien antibioottikuurien määrä on vähentynyt. (Ginocchio 2007; Stone & Mahony 2018.) POC-testien herkkyys on heikompaa verrattuna laboratorioissa tehtäviin määrittäisiin. Kuitenkin lapsilla testit ovat herkempiä ilmeisesti sen vuoksi, että lapsipotilailla viruspartikkelien pitoisuus on korkeampaa ja pidempikestoista kuin aikuisilla. Esimerkiksi Slinger kollegoineen (2004) ovat tutkimuksellaan osoittaneet, että RS-viruksen tutkimiseen kehitetty QuickLab POC-testin herkkyys on lapsilla 81%

ja aikuisilla 29%. Antigeenimenetelmistä parhaimpaan herkkyteen päästään immunofluoresensitekniikalla, jossa herkkyys esimerkiksi RS-viruksen ja MPV:n kohdalla on lähes 100% (Shafik et al. 2011; Aslanzadeh et al. 2008; Vinh et al. 2008). Kaupallisia kittejä koskevia tutkimustuloksia tulee kuitenkin tarkastella kriittisesti, koska tutkimusasetelmat ja tulokset voivat olla tieteellisestä tutkimuksesta huolimatta puolueellisia.

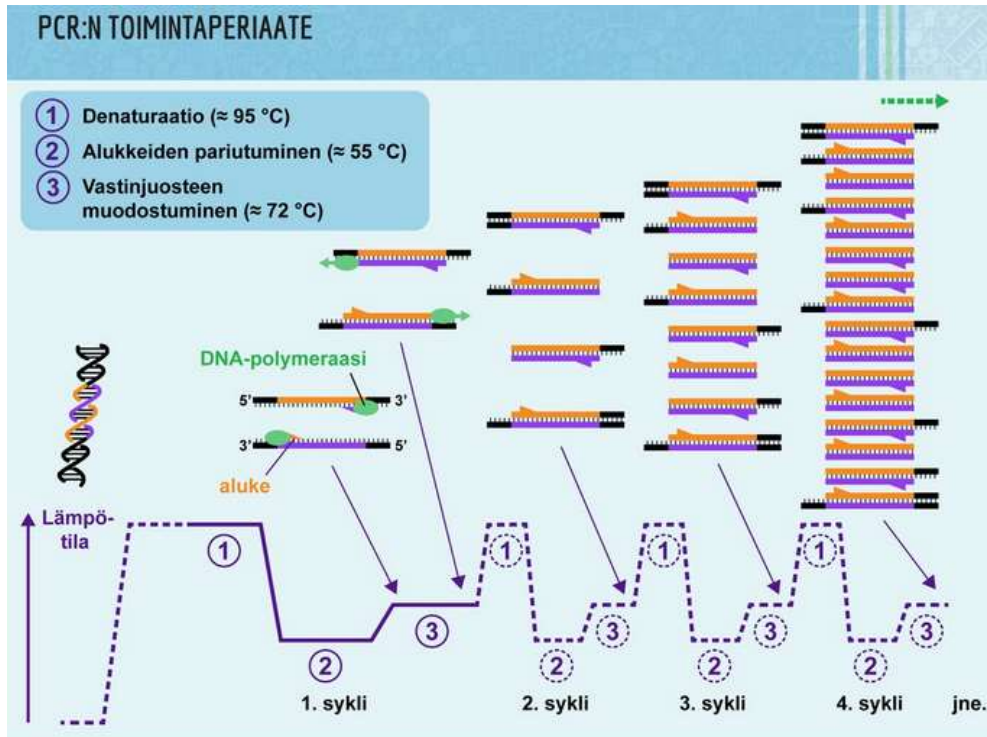
Menetelmien heikkoudet liittyvät lähinnä käyttäjien asiantuntemukseen. Fluoresenssimikroskopia edellyttää käyttäjältään erityisosaamista laitteiston käyttöön ja visualisoidun kuvan tulkintaan. POC-testien herkkyys ja tarkkuus eivät yllä laboratoriossa suoritettujen testien tasolle. Tämä on mahdollisesti yhteydessä testejä käyttävien henkilöiden perehdytykseen. Tulosten luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä voi muodostua näytteenotossa, POC-testin suorittamisessa ja laitteiston lauseuranassa tai sen puutteessa. Vakioidut preanalyttiset ja analyttiset tekijät ovat jalkautuneet osaksi laboratorioden laatutoimintaa, mutta laboratorioden ulkopuolella niiden noudattamisessa on vielä haasteita. (Hedman et al. 2011, 59; Mäkitalo & Holappa-Girginkaya 2017.)

#### **4.4 Virusnukleiinihappojen osoitus**

Virusnukleiinihappojen osoitus geeninmonistustekniikalla (PCR, polymeerasiketjureaktio) on parantanut respiratoristen virusten diagnostiikkaa viimeisten vuosikymmenien aikana merkittävästi. Esimerkiksi vaikeasti viljeltävä rinovirus on PCR-tekniikan myötä nykyisin luotettavasti ja nopeasti diagnosoitavissa. Käytännössä kaikki uudet respiratoriset virukset ovat diagnosoitavissa PCR-tekniikan avulla. (Sloots et al. 2008.) Laboratorioilla on käytössä erilaisia PCR-kittejä ja paneeleita respiratoristen virusten osoittamiseen.

Virusnukleiinihappojen osoitus on geenien monistusta hyödyntävä menetelmä, jossa tutkittavaa viruksen DNA:ta monistetaan PCR-laitteella toistetuilla entsyymireaktioilla ja kun tutkittavaa materiaalia on paljon, se voidaan osoittaa spesifisesti. Tutkittava virusnäyte tulee ensin puhdistaa siten, että jäljelle jäävistä nukleiinihapoista on mahdollista monistaa haluttua geenisekvenssiä spesifisiä nukleotidialukkeita hyödyntäen. Monistusreaktiossa reaktioseosta kuumennetaan 94-98 asteeseen. Tällöin DNA denaturoituu ja sen vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Lämpötilaa lasketaan 45-72 asteeseen, jolloin seoksen spesifiset nukleotidialukkeet sitoutuvat DNA-juosteisiin. Lämpötila

nostetaan 72 asteeseen, jolloin polymeraasientsyymi alkaa toimia luoden seoksen deoksinukleotideista uusista vastinjuosteiden alukkeista alkaen. Kun näitä vaiheita toistetaan useita kertoja, saadaan aikaan kohde-DNA:n eksponentiaalinen monistuminen (KUVIO 4).



KUVIO 4. PCR:n vaiheet. 1) Lämpötilan nousu saa DNA:n denaturoitumaan, jolloin vastinjuosteet irtaavat toisistaan. 2) Lämpötilan lasku saa spesifiset alukkeet kiinnittymään juosteisiin. 3) Lämpötilan nosto aktivoi DNA-polymeraasientsyymien toimimaan, jolloin uudet vastinjuosteet alkavat muodostua. (Mutanen et al. 2014, viitattu 17.6.2019.)

Jos kyseessä on RNA-virus, genomi täytyy ensin kopioida RT-PCR:lla (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) komplementaariseksi DNA-molekyyliksi, jossa geenit ovat lähetti-RNA:n tapaan ilman introneja. RT-PCR on reaaliaikainen PCR-tekniikka, joka muuttaa viruksen genomin RNA-käänteiskopioijaensyymien avulla komplementaariseksi DNA:ksi ennen varsinaista PCR-vaihetta. (Hedman et al. 2011, 59–60; Salkinoja-Salonen et al. 2002, 569–569.) Komplementaarinen DNA on keinotekoisesti viruksen RNA:sta valmistettu yksijuosteinen DNA-molekyyli, joka valmistetaan käänteiskopioijaensyymien avulla käänteisessä transkriptiossa. Tämän jälkeen voidaan jatkaa genomin monistamista PCR:n avulla. (Tirri et al. 2001, 92.) Virusnukleiinihappojen osoittaminen voidaan tehdä usealla eri menetelmällä; monistetusta DNA-jaksosta voidaan analysoida sen emäsjärjestys, geelielektroforeesissa osoittaminen perustuu monistetun DNA-jakson kokoon ja hybridisaatiossa monistettu DNA-jakso leimataan tunnetulla nukleiinihappoketjulla eli koettimella, jolloin



sen havaitseminen on mahdollista. Laitteet ja menetelmät ovat kehittyneet siihen pisteeseen, että erillistä osoitusmenetelmää ei tarvitse enää erikseen suorittaa vaan monistustuotteen syntymistä on mahdollista seurata reaaliajassa. (Hedman et al. 2011, 59.) Nykyisissä laitteistoissa käytetään valmiita, kaupallisia kittejä, jotka sisältävät muun muassa reaktioihin vaadittavat alukkeet, deoksinukleotidit, DNA-polymeraasin, tarvittavat ionit ja puskuriliuoksen (Loeffelholz & Chonmaitree 2010).

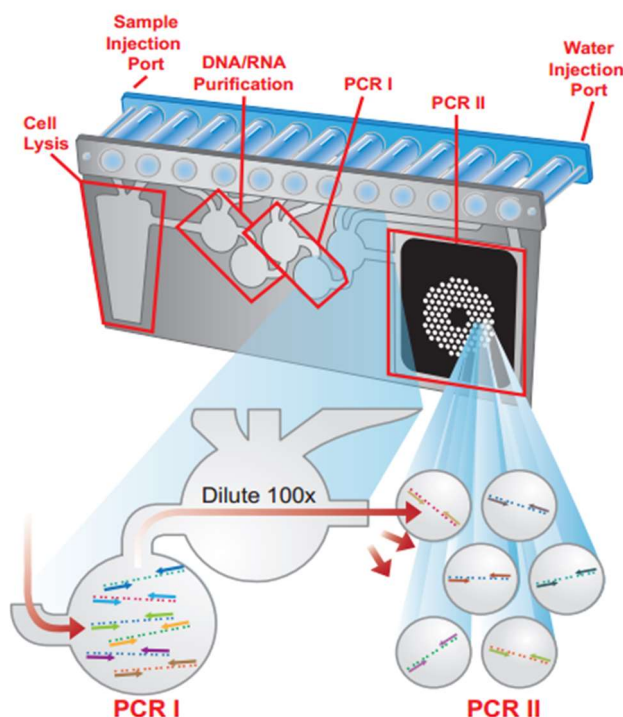
Testin onnistumisen edellytyksenä on laadukas näyte. Respiratoristen virusten nukleiinihappo-osoituksessa näyte voi olla muun muassa nielu- tai nenänielunäyte tai bronkoalveolaarineneste, joista ensimmäiset nenä- ja nenänielunäytteet ovat lapsilla helpommin ja pienemmin resurssien saavissa joko tikkunäytteinä tai imunäytteinä. Näytteet tulee toimittaa laboratorioon mahdollisimman nopeasti. Lähetettävät näytteet tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa ja analyysin tulee tapahtua 1-3 vuorokauden sisällä näytteen ottamisesta. (Hammit et al. 2012; NordLab 2019, viitattu 17.6.2019.)

Yksittäisen viruksen tunnistamisen rinnalle ovat tulleet Multiplex PCR-paneelit, jotka mahdollistavat usean eri respiratorisen viruksen tutkimisen yhdestä näytteestä samanaikaisesti. Tämä nopeuttaa oikeaan diagnoosiin pääsemistä merkittävästi ja lisäksi ne ovat suhteessa yksittäisiä patogeeneja tunnistavia Monoplex-paneelleja edullisempia. (Reijans et al. 2008.) Multiplex-PCR perustuu usean eri viruksen alukkeen käyttämiseen yhtäaikaan samassa reaktiossa. Respiratorisille viruksille on saatavilla erilaisia paneelleja. Paneelien erot pohjautuvat niiden havaitsemien patogeeneiden monimuotoisuuteen, kykyyn luokitella kyseisiä patogeeneja niiden alatyyppeihin, testin vastausaikaan, helppokäyttöisyyteen ja muun muassa siihen, voidaanko tuloksia havaita yksitellen testin aikana vai vasta lopuksi kaikkien patogeeneiden valmistuttua. Kaupallisia Multiplex-paneelleja on saatavilla tällä hetkellä useille respiratorisille viruksille, kuten muun muassa influenssa A:lle ja B:lle, parainfluenssa 1-3:lle, RS-virukselle, adenovirukselle, ihmisen metapneumovirukselle ja rinovirukselle. (Elnifro et al. clin microbiol rev.; NordLab 2019, viitattu 17.6.2019.) Esimerkiksi BioFire® FilmArray® Respiratory Panel 2 *plus* on kaupallinen, laaja respiratoristen patogeeneiden paneeli, jolla voidaan todeta yhdestä näytteestä 18 virusta ja 4 bakteeria (KUVIO 5).

Viruses	Bacteria	
Adenovirus	Influenza A/H1	<i>Bordetella pertussis</i>
Coronavirus 229E	Influenza	<i>Bordetella parapertussis</i>
Coronavirus HKU1	A/H1-2009	<i>Chlamydophila</i>
Coronavirus OC43	Influenza A/H3	<i>pneumoniae</i>
Coronavirus NL63	Influenza B	<i>Mycoplasma</i>
Human Metapneumovirus	Parainfluenza 1	<i>pneumoniae</i>
Human Rhinovirus/Enterovirus	Parainfluenza 2	
Influenza A	Parainfluenza 3	
Middle East Respiratory Syncial CoronaVirus (Mers-CoV)	Parainfluenza 4	
	RSV	

KUVIO 5. BioFire® FilmArray® Respiratory Panel 2 plus. Esimerkki respiratorisen Multiplex-paneelin havaitsemista patogeeneista (Biomérieux 2019, viitattu 17.6.2019).

Testikasetin analysointiin käytettävä FilmArray® -laite suorittaa kaikki tarvittavat analyysin vaiheet, kuten näytteen esivalmistelun, nukleiinihappojen uuttamisen ja PCR:n. Testikasetin rakenne on esitelty kuviossa 6. Kasetin yläreunan ensimmäiseen kammioon siirtyy tutkittava näyte. Lopuissa kammioissa sijaitsevat testiin käytettävät reagenssit ja täyttökammio PCR-reaktion liukselle. Alussa tapahtuu solujen hajotus isossa kammiossa, jonka jälkeen näyte puhdistetaan. Sen jälkeen näyte siirtyy ensimmäiseen PCR-reaktioon ja siitä edelleen toiseen PCR-reaktioon. Tarvittava työ-määrä on pieni. Testin käyttäjä siirtää näytteen testikasettiin, asentaa sen laitteeseen ja käynnistää sen. Tulos havaitaan patogeenoittain joko positiivisena tai negatiivisena ja sen luotettavuuden arviointi vaatii laitteen käyttäjältä yksinkertaisuudestaan huolimatta erityisosaamista. (Biomérieux 2019, viitattu 17.6.2019; Poritz et al. 2011.)



KUVIO 6. FilmArray® -testikasetti. Kasetin yläreunan ensimmäiseen kammioon siirtyy tutkittava näyte. Lopuissa kammioissa sijaitsevat testiin käytettävät reagenssit ja täyttökammio PCR-reaktion liuokselle. Alussa tapahtuu solujen hajotus isossa kammiossa (Cell Lysis), jonka jälkeen näyte puhdistetaan (DNA/RNA Purification). Sen jälkeen näyte siirtyy ensimmäiseen PCR-reaktioon (PCR I) ja siitä edelleen toiseen PCR-reaktioon (PCR II). (Biomérieux 2019, viitattu 17.6.2019.)

Multiplex-paneeleilla on useita etuja yksittäisten patogeenien PCR-tutkimuksiin verrattuna. Useiden patogeenien tutkiminen samasta näytteestä, samanaikaisesti, vähentää työmäärää sekä kustannuksia ja negatiiviset tulokset saadaan nopeasti noin tunnissa. Tämä vähentää turhia antibiootikuureja ja hoitokustannuksia sekä nopeuttaa kriittisten tulosten saantia hoitoratkaisujen ja eristämisen arvioinnissa. Myös näytteiden määrän tarve ja reagenssien kulutus on pienempää yksittäisten patogeenien tutkimiseen verrattuna. Menetelmä on myös PCR:n tapaan hyvin herkkä ja spesifinen. Menetelmän haitat liittyvätkin osin sen korkeaan herkkyyteen. Herkkyyden kasvaessa myös väärin positiivisten tulosten määrä lisääntyy, sillä hyvin herkkä menetelmä voi ei-toivotusti havaita mahdollisen näytteenottovaiheen kontaminaation tai edellisen näytteen monistamistuotteiden joutumisen seuraavaan reaktioon. Myös alukkeiden samankaltaisuus voi aiheuttaa ristireagoitua eri virusten välillä johtuen niiden genomirakenteen samankaltaisuudesta. Nämä tekijät aiheuttavat haasteita tulosten tulkinnessa. Lisäksi etenkin pienillä lapsilla sekainfektiot ovat tavallisia. 5-8%:ssa kaikista respiratorisista näytteistä on löytynyt kaksi tai kolme virusta, jotka voivat olla seurausta peräkkäin tai samanaikaisesti sairastetuista infektioista tai oireettomasta tartunnasta. (Jacobs et

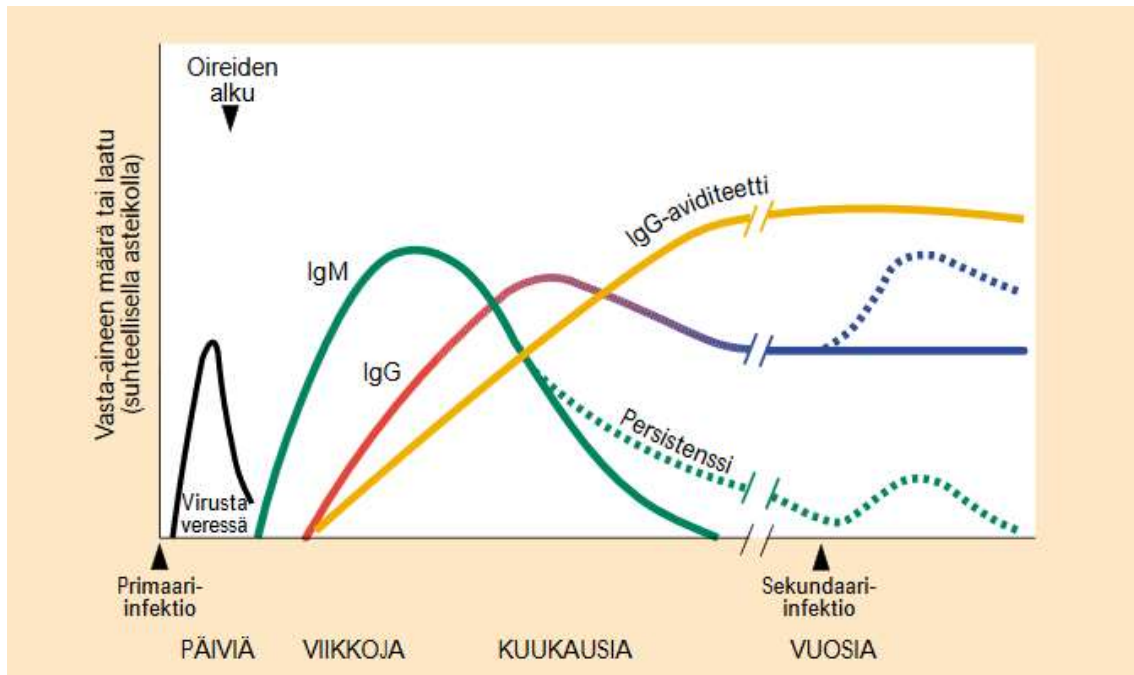
al. 2013; Mahony et al. 2007; Mahony et al. 2008.) Lapsilla usean viruksen positiivisten näytteiden osuus on jopa 20-40% (Nascimento-Carvalho & Ruuskanen 2016). Tulosten kliininen merkitys on siten aina punnittava tapauskohtaisesti ja harkittava sopivan ja luotettavan erotusmenetelmän, kuten herkemman virusspesifisen PCR:n käyttämistä tarvittaessa. Laitteet ja testit ovat arvokkaita. Niiden käyttäminen vaatii osaavaa henkilökuntaa ja hyviksi todettuja työtapoja esimerkiksi kontaminaation estämiseksi biosuojakaapein, aseptisellä työskentelyllä ja oikeanlaisilla tilaratkaisuilla. Testejä tulee myös päivittää aika ajoin virusten muuntumisen seurauksena etenkin influenssaviruksen kohdalla. Kustannuksiin voidaan vaikuttaa harkitsemalla testien tarpeellisuutta. Esimerkiksi laajan testipaneelin tilaaminen tulee huomattavasti kalliimmaksi kuin yhden, spesifisen testin tekeminen tilanteessa, jossa tiettyä patogeenia osataan epäillä infektion aiheuttajaksi. (Dorak 2006, viitattu 19.6.2019; Lappalainen 2013, viitattu 19.6.2019.)

Virusnukleiinihappojen osoittaminen yksittäisten patogeenien geeninmonistamisella tai useampien patogeenien Multiplex-paneeleilla ovat nopeuttaneet ja parantaneet respiratoristen virusten kliinistä diagnosointia. Respiratoristen virusten nopealla tunnistamisella voidaan mahdollisesti käyttää antiviraalista lääkettä ja välttää turhia antibioottikuureja. Tutkimukset mahdollistavat myös hoitovasteen seurannan ja potilaan ennusteen arvioinnin sekä mahdollisen eristyksen tarpeen epidemiatilanteiden välttämiseksi. Menetelmiä hyödynnetään lisäksi tutkimuskäytössä esimerkiksi respiratoristen virusten esiintymisen kartoituksessa. (Lappalainen et al. 2011, viitattu 18.6.2019.) Kehitystyö on kiivasta POC-testien parissa ja markkinoilla onkin saatavilla PCR-vieritestejä ainakin influenssa- ja RS-viruksille. Niiden herkkyys ei yllä laboratoriossa suoritettavien PCR-testien tasolle. POC-testien herkkyys jää lapsilla noin 80%:n ja aikuisilla 30%:n tasolle. Lapsilla ne ovat kuitenkin käyttökelpoinen diagnostinen apu ensiavussa epidemioiden yhteydessä. (Chartrand et al. 2015.) POC-testit ovat verraten nopeita, sillä tulos saadaan jo alle puolessa tunnissa. Ne ovat myös kohtuullisen helppokäyttöisiä ja sopivat siten myös muun hoitohenkilökunnan suoritettaviksi. Ne ovat kuitenkin arvokkaita ja alltiita kontaminaatiolle ja siten väärille tuloksille. (Azar & Landry 2018; Brendish et al. 2015.) POC-testejä käytetään respiratoristen virusten, etenkin influenssavirusten, toteamiseen useissa Etelä-Suomen terveydenhuollon yksiköissä. Mainittakoon myös, että NordLab on hankkimassa Oulun seudun yhteispäivystykseen PCR-pikatestejä respiratoristen virusten havaitsemiseen. Testien käyttö tulee mahdollisesti laajenemaan muihinkin yksiköihin. (Ted 2018, viitattu 19.6.2019.)

## 4.5 Serologia

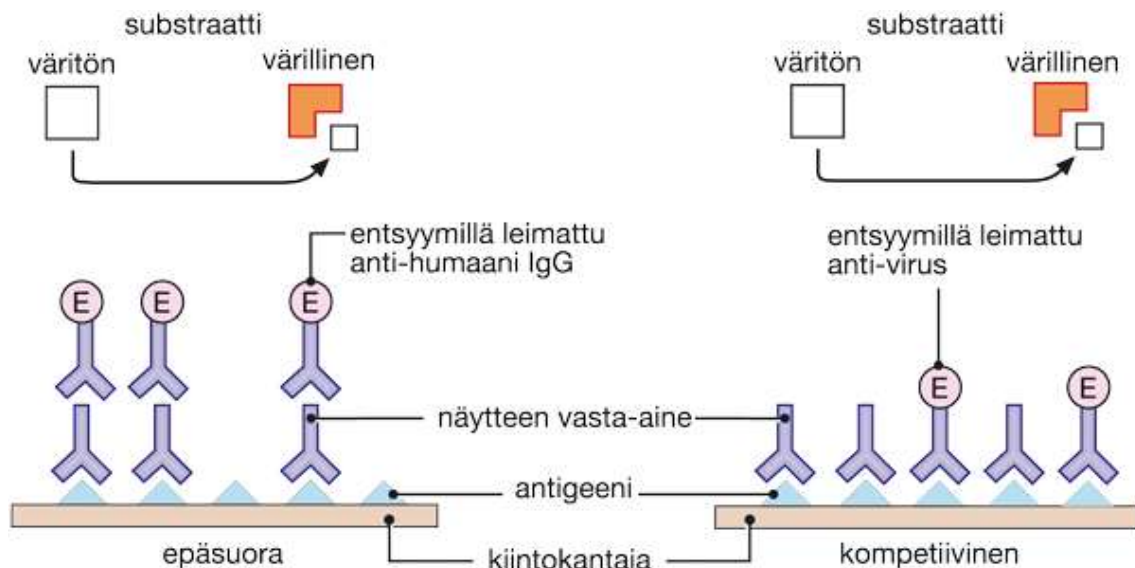
Serologiassa infektioiden diagnosointi perustuu seerumin vasta-aineiden tutkimiseen ja patogeenien tyypittämiseen vasta-aineiden avulla (Tirri et al. 2001, 636). Valtaosa spesifisistä respiratoristen virusten diagnooseista perustuu vasta-aineiden mittaamiseen, sillä ne ovat potilasta ajatellen helppoja testejä, ja menetelmien herkkyys on hyvällä tasolla. Menetelmiä on useita ja ne valitaan sen mukaan, halutaanko selvittää potilaan immuniteetti tai tartuntahistoria tiettyä taudinaiheuttajaa vastaan, primaari-infektion ajankohta vai viruksen reaktivaatio, johon serologiset tutkimukset tosin sopivat varauksella. (Hedman et al. 2011, 61.)

Serologiset tutkimukset perustuvat vasta-aineiden tutkimiseen ja niiden hyödyntämiseen. Viruksen pintarakenteet toimivat antigeeneinä, jotka saavat aikaan immuunipuolustuksessa vasta-aineiden tuoton. Vasta-aineita on olemassa useita pää- ja alaluokkia. Rakenteensa perusteella ne jaetaan pääluokkiin IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Jokaisella vasta-aineella on oma spesifinen tehtävänsä immuunipuolustuksessa. Virusserologia perustuu IgG- ja IgM-vasta-aineiden mittaamiseen ja niiden välisiin eroihin. IgM-vasta-ainepitoisuudet nousevat veressä runsaasti infektion alussa ja sen aikana ja laskevat hiljalleen 1-3 kuukauden kuluessa alle mittausrajojen. Siten kyseisen vasta-aineen määrityksellä voidaan selvittää, onko infektio tuore vai sairastettu jo aikaisemmin. IgM-vasta-aineet osoitetaan yhdestä seeruminäytteestä. IgM-luokan vasta-aineiden pitoisuuksia tulkitessa tulee kuitenkin huomioida, ettei niitä esiinny kaikissa virusinfektioissa ja niiden erityis voi jatkua kauankin infektion jälkeen. IgG-vasta-aineiden tasot nousevan taasen hitaammin ja säilyvät korkealla tasolla pitkään, yleensä eliniän, kertoen hankitusta immuniteetista kyseistä patogeenia kohtaan (KUVIO 7). IgG-vasta-aineet osoitetaan pariseerumeista, joista toinen näyte otetaan mahdollisimman aikaisin heti oireiden alettua ja toinen näyte pari viikkoa myöhemmin. Molempien seeruminäytteiden IgG-tasojen nousu kertoo akuutista infektiosta. Infektion itämisajan tulee olla riittävän pitkä, jotta vasta-aineita ehtii muodostua mittaamiseen vaadittava määrä. Immuunipuolustuksen aikaansaama vasta-aineiden tuottaminen on potilaskohtaista ja riippuvaista myös infektion aiheuttajasta. (Hedman et al. 2011, 60–62; Seppälä et al. 1994.)



KUVIO 7. Virusinfektion kulku ja vasta-ainevaste (Hedman et al. 2011, 55).

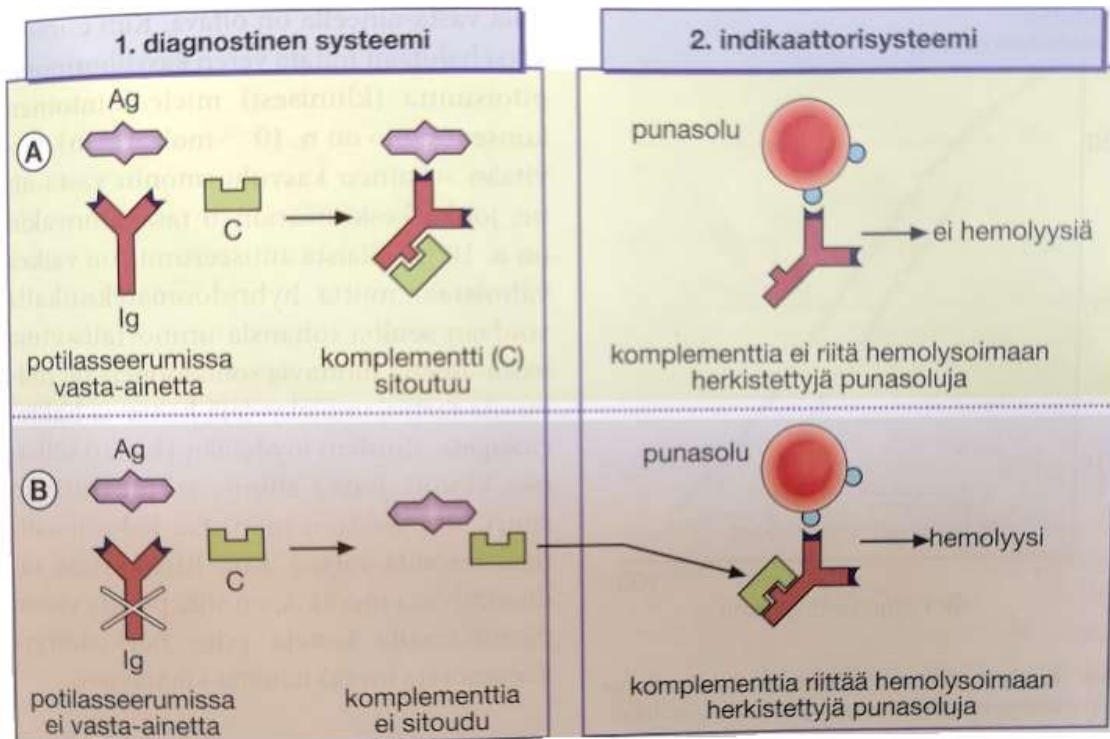
Serologiset menetelmät soveltuvat erityisesti adeno-, influenssa-, parainfluenssa- ja RS-virusten diagnostiikkaan. IgG-vasta-aineen pariseerumeiden tutkiminen on suositeltavin menetelmä näiden virusten diagnostiikassa, sillä IgM-vasta-aineiden vaste jää usein liian heikoksi. Käytetyimpiä serologisia menetelmiä ovat EIA- ja komplementin sitoutumistesti (CF, complement fixation test), joista respiratoristen virusten akuuttien infektioiden toteamiseen suositellaan käytettäväksi CF-testiä. Kuten jo virusantigeenin osoitusmenetelmien kohdalla mainittiin, EIA on entsyymi-immunomenetelmä, jossa merkkiaineena käytetään vasta-aineeseen kiinnitettyä entsyymileimaa. Serologisessa menetelmässä seeruminäytteen IgG-vasta-aine sitoutuu spesifisesti kuoppalevyn pohjalla olevaan viruksen antigeeniin. Sitoutuneeseen IgG-antigeenikompleksiin liitetään entsyymillä leimattu antihumaani IgG-vasta-aine, joka tarttuu näytteen IgG-vasta-aineeseen. Kuoppalevylle lisätään vielä substraattia, jolloin entsyymien ja substraatin reagoitessa keskenään syntyy värillinen yhdiste, joka mitataan fotometrisesti (KUVIO 8). IgG-vasta-ainemäärittystä EIA-menetelmällä käytetään influenssa A- ja B-virusten diagnostiikassa. Vasta-ainelöydös osoittaa potilaan sairastaneen influenssainfektion jossain elämänvaiheessaan ja merkittävästi kohonnut vasta-ainetaso osoittaa tuoreen influenssainfektion. (Koivunen & Krogsrud 2006; NordLab 2019, viitattu 20.6.2019.)



KUVIO 8. IgG-vasta-aineen pitoisuuden mittaus EIA-menetelmällä. Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan vasemman puoleista menetelmää, jossa näytteen vasta-aine detektoidaan käyttäen entsyymillä leimattua anti-humaania IgG-vasta-ainetta. (Hedman et al. 2011, 62.)

Komplementin sitoutumistestillä (CF) voidaan osoittaa spesifinen vasta-aine yhdestä seeruminäytteestä. Pariseeruminäytteitä tutkimalla voidaan kuitenkin osoittaa mahdollinen akuutin respiratorisen infektion aiheuttaja. Komplementtijärjestelmä on osa immuunipuolustusta. Se koostuu joukosta maksan tuottamia, seerumissa ja kudosteissa esiintyviä proteiineja, jotka aktivoituvat muun muassa klassista reittiä pitkin havaitessaan patogeenin pintaan sitoutuneen spesifisen vasta-aineen. Komplementin aktivoituminen saa aikaan voimistuvan kaskadin, joka johtaa patogeenin proteolyttiseen hajoamiseen ja immuunivasteen voimistumiseen. (Souf 2016.) Se voi johtaa myös punasolujen hajoamiseen eli hemolyysiin, jota hyödynnetään CF-testissä. CF-testissä potilaan seeruminäytteen sisältämät komplementtijärjestelmän proteiinit poistetaan ensin denaturoimalla ne nostamalla seerumin lämpötilaa siten, etteivät näytteessä olevat vasta-aineet tuhoudu. Kun testiä häiritsevät potilaan omat komplementtijärjestelmän proteiinit ovat poistettu, näytteeseen lisätään tunnettu määrä marsunseerumin komplementtiproteiineja ja tutkittavan viruksen antigeenia. Näytteeseen lisätään myös indikaattorina toimivia lampaan punasoluja, joiden pinta on herkistetty lampaanpunasoluvasta-aineilla. Indikaattorin hemolysoituessa komplementtiproteiinin toimesta muodostuu vaaleanpunainen yhdiste, joka voidaan havaita näytteessä. Jos seeruminäytteessä on spesifisiä vasta-aineita tutkittavaa virusta vastaan, ne sitoutuvat toisiinsa muodostaen antigeeni-vasta-ainekompleksin, johon edelleen komplementtijärjestelmän proteiini sitoutuu. Tällöin komplementtiproteiinia ei riitä hemolysoimaan indikaattorina toimivaa lampaan punasolua, eikä vaaleanpunaista väriä muodostu, jolloin näyte tulkitaan positiiviseksi. Jos seeruminäytteessä ei ole spesifisiä vasta-

aineita, antigeeni-vasta-ainekompleksia ei muodostu. Tällöin vapaat komplementtiproteiinit voivat sitoutua lampaan punasoluihin ja hemolysoida ne saaden aikaan näytteen vaaleanpunaisen, negatiivisesta tuloksesta kertovan värin (KUVIO 9). (Hedman et al. 2011, 92–93.)



KUVIO 9. Komplementin sitoutumistestin (CF) periaate. A) Jos seeruminäytteessä on spesifisiä vasta-aineita tutkittavaa virusta vastaan, ne sitoutuvat toisiinsa muodostaen antigeeni-vasta-ainekompleksin, johon edelleen komplementtijärjestelmän proteiini sitoutuu. Tällöin komplementtiproteiinia ei riitä hemolysimaan indikaattorina toimivaa lampaan punasolua, eikä vaaleanpunaista väriä muodostu, jolloin näyte tulkitaan positiiviseksi. B) Jos seeruminäytteessä ei ole spesifisiä vasta-aineita, antigeeni-vasta-ainekompleksia ei muodostu. Tällöin vapaat komplementtiproteiinit voivat sitoutua lampaan punasoluihin ja hemolysoida ne saaden aikaan näytteen vaaleanpunaisen, negatiivisesta tuloksesta kertovan värin. (Hedman et al. 2011, 93.)

Komplementin sitoutumistestiä käytetään adeno-, influenssa A- ja B-, parainfluenssa- ja RS-virusten diagnostiikkaan. Pariseerumeissa merkitsevän korkea IgG-vasta-ainetaso vain toisessa näytteessä merkitsee äskettäin sairastettua infektiota ja molempien näytteiden IgG-tason merkitsevä nousu viittaa akuuttiin tai äskettäin sairastettuun infektiin. CF ei sovi immuniteetin mittaamiseen ja sitä käytetään akuuttien respiratoristen infektioiden diagnostiikassa (NordLab 2019, viitattu 20.6.2019; Vainionpää et al. 2000.) Serologinen diagnostiikka on hidasta, sillä respiratoristen vi-



rusten kohdalla vaaditaan pariseeruminäytteiden käyttämistä. Herkkyydeltään serologiset tutkimukset ovat verrattavissa antigeeniosoitustesteihin. EIA-menetelmillä saavutetaan parempi herkkyys kuin komplementinsitoutumistestillä (TAULUKKO 2). (Leinonen & Meurman 1992.)

TAULUKKO 2. Antigeeniosoituksen, EIA:n ja CF:n vertailu respiratoristen virusinfektioiden diagnostiikassa (Leinonen & Meurman 1992).

Virus	Näytteitä (n)	Positiivisia löydöksiä (%)		
		Antigeenin osoitus	EIA	CF
Adenovirus	52	85	77	67
Influenssa A-virus	50	58	74	22
RS-virus	26	79	92	50

Primaari-infektioiden toteamiseen IgM- ja IgG-vasta-ainetasojen mittaamisen lisäksi on kehitetty IgG:n aviditeettiin perustuva diagnoosimenetelmä. Aviditeetti kertoo vasta-aineen sitoutumisesta antigeeniinsa. Mitä suurempi on vasta-aineen aviditeetti, sitä tiukemmin se sitoutuu antigeeniinsa. Aviditeetti yleensä suurenee immuunivasteen kuluessa. Vasta-aineen aviditeettia mittaamalla voidaan siten erottaa, onko kyseessä viruksen aiheuttama primaari-infektio, reinfektio, reaktivaatio vai hankittu immunitaetti. Vasta-aineen aviditeetti antigeenia kohtaan kasvaa sairastetun infektion myötä, minkä vuoksi se on suurempaa reaktivaation aiheuttamassa uusintainfektiossa kuin primaari-infektiossa (KUVIO 7). Aviditeettiin perustuvassa menetelmässä seeruminäytettä laitetaan koeputkeen, jossa on tunnettu määrä taudinaiheuttajan antigeenia. Näytteen vasta-aineet sitoutuvat antigeeneihin, jonka jälkeen niiden väliset sidokset denaturoidaan reagenssin avulla. Löyhimmät sidokset katkeavat ja vahvimmin sitoutuneet vasta-aine-antigeenikompleksit jäävät jäljelle. Mittaamalla sitoutuneet kompleksit saadaan selville voimakkaiden IgG-vasta-aineiden määrä, joka kertoo, kuinka pitkä aika on kulunut infektiosta näytteen saamiseen. Jos tuloksena on heikko IgG-aviditeetti, on kyseessä akuutti- tai toipilasvaiheen infektio ja jos aviditeetti on vahva, kyseessä on viruksen reaktivaatio tai reinfektio ja hankitun immunitaetin aikaansaama IgG-vaste. (Hellstén 2005, 97; Seppälä et al. 1994.) Lasten respiratoristen virusten kohdalla aviditeettitutkimus sopii RS-viruksen ensimmäisen primaari-infektion toteamiseen sen heikon aviditeetin perusteella (Meurman et al. 1992).

Yhteenvedon voidaan todeta, että akuutin respiratorisen infektion diagnostiikassa voidaan hyödyntää kolmea erilaista serologista osoitusta:

- 1) Spesifisen IgG-vasta-ainetason nousun osoitus pariseerumeissa.
- 2) Spesifisen IgM-vasta-aineen osoitus yhdestä seeruminäytteestä.
- 3) Spesifisen IgG-vasta-aineen matalan aviditeetin osoitus akuutin vaiheen seeruminäytteestä.

Vaikkakin serologinen tutkimus on pariseerumien käytön vuoksi hidasta, ne soveltuvat hyvin lasten adenovirusten, influenssavirusten, parainfluenssavirusten ja RS-virusten diagnostiikkaan. Niiden avulla voidaan havaita yksittäisten taudinaiheuttajavirusten lisäksi myös usean eri viruksen aiheuttamat sekainfektiot pienillä lapsilla vastasyntyneet pois lukien, koska heidän vasta-ainevasteensa on vielä yleensä heikko. (Chkhaidze et al. 2006.) Nykyään respiratoristen virusten laboratoriodiagnostiikassa yhdistetään serologisia tutkimuksia ja nukleiinihappo-osoitustestejä keskenään diagnostisen tarkkuuden ja herkkyden parantamiseksi (Vainionpää et al. 2000).

## 5 BIODIGI-HANKE

Biodigi-hanke on usean ammattikorkeakoulun yhteistyössä tuotettu digitaalinen opintoportaali, jossa tehdään englanninkielisiä bioanalytiikan tutkinto-ohjelman keskeisimpiä opintomoduuleja. Opintoportaaliin tuotettu materiaali on vaihto-opiskelijoiden käytettävissä. Hankkeella lisätään ammattikorkeakoulujen välistä opetusyhteistyötä sekä yhtenäistetään bioanalytiikan tutkinto-ohjelmien koulutustarjontaa. Hanke mahdollistaa joustavampien opintopolkujen toteuttamisen ja edistää opiskelijoiden tasa-arvoa riippumatta siitä, missä ammattikorkeakoulussa opiskelee. (Metropolia 2017, viitattu 25.6.2019.)

## 6 VERKKOPEDAGOGIIKKA

Verkkopohjaiset oppimateriaalit korostavat oppijan subjektiivista oppimisprosessia, jossa oppija ottaa ennen käytettyyn opettajajohtoisten oppimiseen verrattuna enemmän itse vastuuta oppimisestaan. Nykyisen, vallalla olevan konstruktivistisen oppimiskäsityksen mukaan oppija rakentaa itse uutta tietoaan aiemman tietopohjansa varassa. Oppiminen on siten itseohjautuvaa, tilannesidonnaista ja kokemusperäistä. Verkossa opiskelu tukee konstruktivistisen oppimiskäsityksen mukaista oppimista. (Matikainen & Manninen 2001, 70–71.) Verkko-oppimateriaaleihin ja niiden tuottamiseen liittyy erilaisia huomioitavia yksityiskohtia. Oppijat voivat olla eri paikoissa, heitä voi olla paljon ja heistä muodostuva joukko voi vaihtua nopeasti. Luodakseen laadukasta verkko-oppimateriaalia, opettajalta vaaditaan asiantuntemusta ja kykyä luoda tuoreita, mielenkiintoisia näkökulmia opiskeltavaan aiheeseen. (Suominen & Nurmela 2011, 5.) Verkko-oppimateriaalien luonnissa tulee huomioida nämä seikat muun muassa suunnittelemalla oppimateriaali mahdollisimman useaa erilaista oppijaa palvelevaksi ja saavutettavaksi (Sun & Chen 2016). Opiskeltavan asian ymmärtäminen voi vaatia havainnollistamista eri keinoin, kuten tekstien, kuvien, piirrosten ja videoitten tai animaatioiden avulla.

Opetushallitus on tuottanut verkko-oppimateriaalille laatukriteeristön, joka koostuu neljästä keskeisestä osa-alueesta: pedagogiset, käytettävyyden, esteettömyyden ja tuotannon laatukriteerit. Pedagogiset laatukriteerit liittyvät siihen, kuinka verkko-oppimateriaali tukee oppimista ja millaista lisäarvoa se tarjoaa oppimisen tueksi. (OPH 2006, 15–17.)

Laadukkaan verkko-oppimateriaalin tulee muun muassa aktivoida oppijan omaa ajattelua ja tukea oppimista viimeisimmän tiedon mukaisesti. Oppimisen tavoitteet kuvataan oppimateriaalissa ja oppijan on mahdollista palata seuraamaan niiden toteutumista. Verkko-oppimateriaalin rakenne tulee suunnitella siten, että se tukee kokonaisuuden hahmottamista ja vaikeasti opittavien asioiden omaksumista. Verkko-oppimateriaalin tieto tulee esittää kohderyhmän lähtötaso huomioiden ja hyödyntää sitä oppimateriaalin toteutuksessa. Laadukas verkko-oppimateriaali sisältää myös arviointiin liittyviä tekijöitä, kuten oppimistestejä tai tavoitteiden täyttymiseen liittyviä tekijöitä. (OPH 2006, 15–17; Sun & Chen 2016.) Käytettävyyden laatukriteerit liittyvät verkko-oppimateriaalin rakenteen ja teknisen toteutuksen sujuvuuteen ja helppouteen. Verkko-oppimateriaalin tulee toimia muun muassa eri käyttöjärjestelmillä ja selaimilla ja sitä päivitetään hiljaisina käyttöaikoina. Käytettävän kielen tulee tukea käyttäjäryhmää ja noudattaa verkkokirjottamisen normeja, kuten loogisesti

etenevää ja tyyli puhdasta tekstiä. Verkko-oppimateriaalin tulee visuaalisesti tukea oppimista. Käytettävyyteen liittyviä heikkouksia voivat olla esimerkiksi materiaalissa esiintyvät toimimattomat linkit, epäselvä otsikointi, materiaalin vaikea hahmotettavuus ja virheilmoitukset. (OPH 2006, 18–21.) Esteettömyyden laatu kriteerit linkittyvät läheisesti saavutettavuuden kriteereihin ja usein rajan veto näiden kahden tekijän välille ei ole mielekäs. Esteettömyyden kriteereissä kuitenkin korostetaan oppimateriaalin käytettävyyttä erilaisten ihmisten toimesta riippumatta heidän fyysisistä, psyykkisistä tai terveydellisistä ominaisuuksistaan. Käytettävyyteen liittyvät tekijät voivat olla esimerkiksi näkökykyyn, motoriikkaan tai kuulemiseen liittyviä seikkoja, jotka tulee huomioida laadukasta verkko-oppimateriaalia suunniteltaessa. Esimerkiksi tekstin tulee olla otsikoitu ja ositeltu pienempiin palasiin siten, että se on helposti kuunneltavissa ruudunlukuohjelmalla. Tämä koskee myös kuvia, joille tulee laatia ruudunlukuohjelmalla luettavissa oleva sisältöteksti. Verkko-oppimateriaalin tulee olla ymmärrettävissä ilman värinäköä ja toisaalta voimakkaiden värien käyttämisestä tulee välttää epileptisten kohtausten välttämiseksi. Videoiden yhteydessä tulee käyttää äänen lisäksi tekstitystä ja äänet tulee pystyä kytkemään pois tarvittaessa. Tekstin ja taustan kontrastin tulee olla riittävä ja informaation määrä sivua kohden kohtuullinen. Tekijöitä on runsaasti, mutta jo nämä peruseriaatteen huomioimalla verkko-oppimateriaalin esteettömyyteen voidaan vaikuttaa oleellisesti. (OPH 2006, 21–24.) Tuotannon laatu kriteerit liittyvät verkko-oppimateriaalin ammattimaiseen tuottamiseen edellä mainitut laatu kriteerit huomioiden. Verkko-oppimateriaalin tulee pohjautua oppimista tukeviin tavoitteisiin ja huomioida käyttäjäryhmät, käyttötilanteet, materiaalin esteettömyys ja saavutettavuus. Tuotettavan materiaalin toimivuus varmistetaan ja viimeistelyssä hyödynnetään esimerkiksi vertaisarviointia. Materiaalia päivitetään ja sen laatua seurataan esimerkiksi käyttäjäkyselyiden pohjalta saadun palautteen mukaisesti. (OPH 2006, 25–28.)

## 7 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli laatia verkko-oppimateriaalia BioDigi-hankkeeseen, joka on ammattikorkeakoulujen yhteinen digitaalinen opintoportaali bioanalytiikan tutkinto-ohjelmaa varten. Oppimateriaali lasten yleisimmistä respiratorisista viruksista ja niiden diagnostisista laboratoriomenetelmistä toteutettiin englanninkielellä diaesityksinä ja monivalintatestinä. Ne muodostavat yhden, spesifisen aihepiirin osana laajempaa opintomodulia. Oppimateriaali on tarkoitettu bioanalytiikan opiskelijoille ja opetuskäyttöön kaikissa BioDigi-hankkeessa mukana olevissa ammattikorkeakouluissa vaihto-opiskelijat huomioiden.

Opinnäytetyön tavoitteena oli laatia sisällöltään ja visuaalisuudeltaan laadukasta oppimateriaalia, johon tutustumisen jälkeen oppijalla on selkeä yleiskuva lasten yleisimmistä respiratorisista infektioita aiheuttavista viruksista sekä niiden diagnosointiin käytettävistä laboratoriomenetelmistä.

## 8 TOTEUTUS

### 8.1 Toiminnallinen opinnäytetyö

Opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena opinnäytetyönä, jossa tuotettiin verkko-oppimateriaalia bioanalytiikan opiskelijoille. Opinnäytetyö oli osa BioDigi-hanketta ja sen toimeksiantajana toimi Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelma.

Toiminnallisessa opinnäytetyössä tuotetaan toiminnallinen tuotos, kuten jokin tuote, palvelu tai opetusdemonstraatio. Tuotoksen tulee olla työelämää palveleva ja osoittaa oman alan asiantuntijuutta. Se voi esimerkiksi opastaa tai järjeistää käytännön toimintaa työelämässä. Tuotoksen ohella kirjoitetaan opinnäytetyöraportti, joka toimii viitekehyksenä toiminnalliselle tuotokselle. Toiminnallisen opinnäytetyön aiheen rajaaminen on tärkeä osa työtä, ettei tuotos kasva liian suureksi, sillä toiminnalliseen opinnäytetyöhön kuluu usein enemmän aikaa kuin kirjallisen tuotoksen tekemiseen. (Vilka & Airaksinen 2003, 9–18.) Opinnäytetyön toiminnallinen osuus rajattiin käsittämään yleisimmät lasten respiratoriset virukset ja niiden diagnostiset laboratoriomenetelmät, joiden parissa bioanalytiikan opiskelijat tulevat todennäköisimmin työelämässä työskentelemään.

### 8.2 Oppimateriaalin luonti

Oppimateriaalien luomiseen valittiin Powerpoint, koska kyseisellä ohjelmalla voidaan tuottaa visuaalisesti selkeitä ja rakenteeltaan monitasoisia esityksiä. Lisäksi Office-ohjelmistoon kuuluva Powerpoint on yleisesti käytetty ohjelma, jonka tiedostomuotoa nykyiset laitteet tukevat laajasti – oli sitten kyse tietokoneesta tai mobiililaitteesta.

Toiminnallisena opinnäytetyönä tuotetussa verkko-oppimateriaalissa pyrittiin huomioimaan OPH:n laatimia laatukriteeristön seikkoja mahdollisimman laajasti. Verkko-oppimateriaali tuotettiin diaesityksinä ja monivalintatestinä, koska pitkien, kirjaa muistuttavien tekstien tuottaminen verkkoon ei ole kannattavaa, sillä verkkotekstiä luetaan harvoin kokonaan. Informatiivisista ja tiivistetyistä diaesityksistä oppija voi poimia tarvitsemansa tiedon nopeasti ja vaivattomasti navigoiden. Laaja aihe ositettiin kahteen erilliseen diaesitykseen: lasten yleisimpiin respiratorisiin viruksiin ja niiden diagnostiikassa käytettäviin laboratoriomenetelmiin. Kokonaisuuden pilkkominen helpommin hahmotet-

taviin osiin auttaa oppijaa havainnoimaan, millaisista osatekijöistä hallittava kokonaisuus muodostuu. Pilkkominen sopiviin tietokokonaisuuksiin auttaa oppijaa myös välttymään informaatioähkyä, kun yhden palasen oppimiseen voi käyttää lyhyemmän ajan. Sisällöt tulee pilkkoa siten, että ne vastaavat johonkin tarpeeseen tai merkitykselliseen kysymykseen. Oppimateriaalia on hankalaa käyttää, jos oppijan tulee siirtyä materiaalista toiseen ilman, että hän kokee saavansa uutta merkityksellistä tietoa. Tällöin kokonaisuuden hahmotus heikentyy ja tietotulva voi muodostua hankalasti yhdistettävistä palasista. (Suominen & Nurmela 2011, 81.)

Verkko-oppimateriaalissa toimii parhaiten lyhyt, jaksotettu ja runsaasti otsikoitu teksti. Otsikot ovat tärkeitä, koska ne toimivat oppijalle hakusanoina ja sen alle kuuluvan tiedon tuoteselosteena. Otsikoiden avulla oppija voi poimia nopeasti itselleen tärkeät kohdat suuremmasta tietovirrasta ja hahmottaa käsiteltävän kokonaisuuden helpommin. Usein oppimisen kannalta on kannattavinta edetä suuremmalta tasolta kohti yksityiskohtaisempaa tietoa. (Suominen & Nurmela 2011, 68, 79, 85.) Tuotetuissa diaesityksissä tärkeimmät asiat eli ydin kerrotaan dian otsikoinnissa, josta tekstin sisältö jatkuu tiivistelmään opittavasta asiasta ja lopulta etenee good-to-know-tiedosta kohti nice-to-know-tietoa.

Verkko-oppimateriaalin käyttäjäkunnan saavutettavuus huomioiden materiaali toteutettiin englannin kielisenä. Esityksissä käytettiin tekstiä ja kuvia esteettömyyden ja saavutettavuuden laatuksiterit huomioiden. Sekä kuvat, että teksti ovat kuunneltavissa ruudunlukuohjelmalla ja kuvat laadittiin tukemaan tekstin ymmärtämistä. Esteettömyys huomioitiin myös muun muassa esitysten kontrastin, fonttikoon ja asettelun suunnittelussa.

Laatukriteeristön mukainen mahdollisuus oppimisen itsearviointiin ja tavoitteiden toteutumisen seuraamiseen huomioitiin selkeällä diaesitysten tavoitteiden asettelulla, niiden toteutumisen tarkastelulla ja lopuksi suoritettavalla monivalintatestillä oppijalähtöisesti.

Opinnäytetyöraportissa ja verkko-oppimateriaalissa käytetyt kuvat ovat valikoitu Pixabayn tai Googlen tarkennetun kuvahaun kautta siten, että ne ovat vapaasti käytettävissä, muokattavissa ja jaettavissa. Biomerieux-Groupilta on myönnetty lupa kahden influenssan pikatestausta koskevan kuvan käyttöön sähköpostilla.



### 8.3 Oppimateriaalin palaute ja arviointi

Tuotettu oppimateriaali suunniteltiin siirrettäväksi Moodlen sähköisen oppiportaalin välityksellä Metropolia ammattikorkeakoulun BioDigi-hankkeessa mukana oleville opettajille palautetta varten. Teknisten ongelmien ja aikataulurajoitteiden vuoksi oppimateriaalin palaute tullaan keräämään bioanalytiikan opiskelijoilta tulevaisuudessa. Oulun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan lehtori Irja Parkkinen arvioi oppimateriaalin toteutusta ja laatua. Häneltä saadun palautteen perusteella oppimateriaalin laatutavoitteet ovat täyttyneet ja oppimateriaali voidaan luovuttaa opetuskäyttöön.

## 9 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa englanninkielistä verkko-oppimateriaalia BioDigi-hankkeeseen. Tavoitteena oli laatia sisällöltään ja visuaalisuudeltaan laadukasta oppimateriaalia, johon tutustumisen jälkeen oppijalla on selkeä yleiskuva lasten yleisimmistä respiratorisista infektioita aiheuttavista viruksista sekä niiden diagnosointiin käytettävistä laboratoriomenetelmistä. Tavoiteluiksi kriteereiksi nousivat muun muassa helppolukuisuus ja -käyttöisyys, selkeys, informatiivisuus ja saavutettavuus. Oppimateriaalit täyttivät nämä käyttäjäystävällisyyden ja oppimisen huomioivat laatukriteerit ja opinnäytetyölle asetetut tavoitteet täyttyivät siten hyvin. Työn haasteeksi nousi aiheen rajaaminen, koska respiratorisia infektioita aiheuttavia viruksia on paljon. Laajan kirjallisuuskatsauksen perusteella virukset saatiin rajattua lasten yleisimpiin respiratorisia infektioita aiheuttaviin viruksiin ja niiden laboriodiagnostiikkaan. Lisäksi oppimateriaalin tuottaminen englannin kielellä asetti omat haasteensa terminologian osalta.

Opinnäytetyön tekeminen oli opettavainen prosessi. Ensimmäisen opiskeluvuoden lopussa aloitettu opinnäytetyö vaati perinpohjaista perehtymistä aiheesta koskevaan kirjallisuuteen. Oppimateriaalin tuottaminen vaati tiedon jäsentämistä useaan kertaan, jotta se saatiin koottua mahdollisimman käyttäjäystävälliseen muotoon. Siten opinnäytetyöprosessi on antanut paljon tietoa itse aiheesta ja lisäksi laadukkaan verkko-oppimateriaalin luomisesta. Tässä kohtaa voidaan todeta, että työ tekijäänsä opettaa.

Toivon, että verkko-oppimateriaalit päätyvät osaksi BioDigi-hanketta ja että sitä hyödynnetään opetuksessa usealla eri taholla. Lisäksi toivon, että materiaalia päivitetään laboratoriomenetelmien kehittyessä. Tulevaisuudessa aiheen opetusmateriaaleja olisi mahdollista täydentää esimerkiksi tehtävillä ja asiantuntijavideoilla sekä perehtymällä laboratoriomenetelmien tulevaisuuden näkymiin. Oppimateriaalia tullaan testaamaan bioanalytiikan opiskelijoilla tulevaisuudessa. Saadun palautteen perusteella oppimateriaalia voidaan kehittää edelleen vastaamaan tavoiteltuja verkko-oppimateriaalia laatuvaatimuksia.

## KIITOKSET

Suurimmat kiitokset osoitan ohjaajalleni Koulutus- ja tki-johtaja Mika Paldaniukselle. Arvostan saamaani mielenkiintoista aihetta ja ammatillista tukea projektin aikana. Kiitos positiivisista kyynärpäistäsi, joiden vauhdittamana projektini valmistui jo ensimmäisen opiskeluvuoden jälkeen sekä arvostuksestasi työtä kohtaan. Kiitän myös lehtori Irja Parkkista osallistumisesta oppimateriaalin ja opinnäytetyön raportin arviointiin. Läheisten tuki kuluneen puolen vuoden aikana on ollut korvaamaton. Kiitos tuesta ja kärsivällisyydestä.

## LÄHTEET

Agoritsas, K., Mack, K., Bonsu, BK., Goodman, D., Salamon, D. & Marcon, MJ. 2006. Evaluation of the Quidel QuickVue test for detection of influenza A and B viruses in the pediatric emergency medicine setting by use of three specimen collection methods. *J Clin Microbiol.* 44 (7), 2638–2641.

American Lung Association 2018. Learn about human metapneumovirus (hMPV). Viitattu 5.6.2019, <https://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/human-metapneumovirus-hmpv/learn-about-hmpv.html>.

Aslanzadeh, J., Zheng, X., Li, H., Tetreault, J., Ratkiewicz, I., Meng, S. et al. 2008. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J Clin Microbiol.* 46 (5), 1682–1685.

Azar, M. & Landry, M. 2018. Detection of influenza A and B viruses and respiratory syncytial virus by use of clinical laboratory improvement amendments of 1988 (CLIA)-waived point-of-care assays: a paradigm shift to molecular tests. *J Clin Microbiol.* (56) 7, 1–13.

Biomérieux 2019. BioFire ® FilmArray ® RP panel. Viitattu 17.6.2019, <https://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarrayr-respiratory-panel>.

Brendish, N., Schiff, H. & Clark, T. 2015. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: the current landscape and future potential. *J Infect.* 71 (5), 501–510.

Brummer-Korvenkontio, M. 2007. Virusten ja prionien luonnonhistoriaa: myyräkuumeesta SARS:iin, ebolasta AIDS:iin ja arboviruksista lintuinfluenssaan. Helsinki: Gaudeamus.

Chartrand, C., Tremblay, N., Renaud, C. & Papenburg, J. 2015. Diagnostics accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 53 (12), 3738–3749.

Chkhaidze, I., Manjavidze, N. & Nemsadze, K. 2006. Serodiagnosis of acute respiratory infections in children in Georgia. *Indian J Pediatr.* 73 (7), 569–572.

Cooper, A., Banasiak, N. & Allen, P. 2003. Management and Prevention Strategies for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bronchiolitis in Infants and Young Children: A Review of Evidence-Based Practice Interventions. *Pediatric Nursing* 29 (6), 452–456.

Das, S., Dunbar, S. & Tang, Y-W. 2018. Laboratory diagnosis of respiratory tract infections in children – the state of the art. *Front Microbiol.* 9, 2478.

De Jong, J., Wermenbol, A., Verweij-Uijterwaal, M., Slaterus, K., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G. & Hierholzer, J. 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol.* 37 (12), 3940–3945.

Dirr, L., El-Deeb, I., Chavas, L., Guillon, P. & Itzstein, M. 2017. The impact of the butterfly effect on human parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitor design. *Scientific Reports* 7, 4507.

Dobson, J., Whitley, R.J., Pocock, S. & Monto, AS. 2015. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* 385 (9979), 1729–1737.

Dorak, M. 2006. Real-time PCR. Viitattu 19.6.2019, <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html/>.

Du, R., Cui, Q. & Rong, L. 2019. Competitive cooperation of hemagglutinin and neuraminidase during influenza A virus entry. *Adv Exp Med Biol.* 726, 201–221.

Durbin, A. & Karron, R. 2003. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. *Clin Infect Dis.* 37 (12), 1668–1677.

Falsey, AR. & Walsh, E.E. 2003. Novel coronavirus and severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1312–1313.

Fiore, A., Iverson, C., Erdman, D., Lett, SM., Talkington, DF., Anderson, L., Fields, B., Carlone, G., Breiman, R. & Cetron, M. 1998. Outbreak of pneumonia in a long-term care facility: antecedent human parainfluenza virus 1 infection may predispose to bacterial pneumonia. *J Am Geriatr Soc.* 46 (9), 1112–1117.

Frank, A., Taber, L., Wells, J., Glezen, W. & Paredes, A. 1981. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. *J Infect Dis.* 144, 433–441.

Ghebremedhin, B. 2014. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol.* 4 (1), 26–33.

Ginocchio, C. 2007. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol.* 40 (1), 11–14.

Goldsmith, CS. & Miller, SE. 2009. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev.* 22, 552–563.

Hamelin, M-E., Abed, Y. & Boivin, G. 2004. Human metapneumovirus: A new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis.* 38 (7), 983–990.

Hammit, L., Murdoch, D., Scott, J., Driscoll, A., Karron, R., Levine, O. & O'brien, K. 2012. Specimen collection for the diagnosis of pediatric pneumonia. *Clin Infect Dis.* 54 (2), 132–139.

Hazelton, P. & Gelderblom, H. 2003. Electron microscopy for rapid diagnosis of emerging infectious agents. *Emerg Infect Dis.* 9 (3), 294–303.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2010. *Mikrobiologia: mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet.* Helsinki: Duodecim.

Hedman, K. & Vainonpää R. 2003, *Mikrobiologia ja infektiosairaudet: Kirja 2.* Helsinki: Duodecim.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2011. *Infektiosairaudet: mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3.* Helsinki: Duodecim.

Hematian, A., Sadeghifard, N., Mohebi, R., Taherikalani, M., Nasrolahi, A., Amraei, M. & Ghafourian, S. 2016. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect.* 7 (2), 77–82.

Hellstén, S. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Henrickson, K. 2003. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, 16 (2), 242–264.

Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Helsinki: Duodecim.

Huslab 2019. Tutkimusohjekirja. Viitattu 5.6.2019, <https://huslab.fi/ohjekirja/>.

Infante-Resa, P., Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. 2011. The influenza virus RNA synthesis machine: Advantages in its structure and function. *RNA biol.* 8 (2), 207–215.

Jaakkola, S., Lyytikäinen, O., Rimhanen-Finne, R., Salmenlinna, S., Savolainen-Kopra, C., Liitsola, K., Jalava, J., Toropainen, M., Nohynek, H., Virtanen, M., Löflund, J-E-, Kuusi, M. & Salminen, M. 2017. Tartuntataudit Suomessa 2017. Raportti 6/2018. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

Jacobs, S., Lamson, D., George, K. & Walsh, T. 2013. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 26 (1), 135–162.

Jartti, T., Van den Hoogen, B., Garofalo, RP., Osterhaus, AD. & Ruuskanen, O. 2002. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 360, 1393–1394.

Jartti, T., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M., Hyypiä, T. & Ruuskanen O. 2008. Uudet hengitystievirukset. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 124 (20), 2313–2319.

Kares, S., Lönnrot, M., Vuorinen, P., Oikarinen, S., Tauriainen, S. & Hyöty, H. 2004. Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using lightcycler. *J Clin Virol.* 29 (2), 99–104.

Koivunen, M. & Krogsrud, R. 2006. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine*, 37 (8), 490–497.

Korppi, M. & Ruuskanen, O. 2007. Bronkioliitti. Teoksessa Ruuskanen, O., Peltola, H., Vesikari, T. 2007. Lasten infektiosairaudet . Jyväskylä: Gummerus kirjapaino.

Lappalainen, M. 2013. Multiplex-PCR ym. uudet monianalyyttimenetelmät – laboratorion näkökulma. Viitattu 19.6.2019, [https://thl.fi/attachments/Shp-SIRO-FiRe/8.%20Maija%20Lappalainen\\_%20SIRO-FiRe%202013%20LYH.pdf](https://thl.fi/attachments/Shp-SIRO-FiRe/8.%20Maija%20Lappalainen_%20SIRO-FiRe%202013%20LYH.pdf).

Lappalainen, M., Vainionpää, R. & Hedman, K. 2011. Infektiosairaudet. Viitattu 18.6.2019, [https://www.oppiportti.fi/op/isa00402/do?p\\_haku=elektronimikroskopia#s4](https://www.oppiportti.fi/op/isa00402/do?p_haku=elektronimikroskopia#s4).

LaSala, P., Bufton, K., Ismail, N & Smith, M. 2007. Prospective comparison of R-mix shell vial system with direct antigen test and conventional cell culture for respiratory virus detection. *J Clin Virol.* 38 (3), 210–216.

Leinonen, M. & Meurman, O. 1992. Hengitystieinfektioiden mikrobiologinen diagnostiikka. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 108 (20), 1727.

Loeffelholz, M. & Chonmaitree, T. 2010. Advances in diagnosis of respiratory virus infections. *Int J Microbiol.* 2010, 1–5.

Lumio J. 2019. Influenssa. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 31.5.2019, [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00570](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00570).

Mackay, I., Jacob, K., Woolhouse, D., Waller, K., Syrmis, M., Whiley, D., Siebert, D., Nissen, M. & Sloots, T. 2003. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol.* 41 (1), 100–105.

Matikainen, J. & Manninen, J. 2001. Aikuiskoulutus verkossa. Tampere: Tammer-Paino.

McIntyre, C., Knowles, N. & Simmonds, P. 2013. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned species. *J Gen Virol.* 94 (8), 1791–1806.

Metropolia 2017. BioDigi – Bioanalytiikan digitaalinen verkkoportaali. Viitattu 25.6.2019, <https://www.metropolia.fi/tutkimus-kehittaminen-ja-innovaatiot/hankkeet/biodigi/>.

Meurman, O., Waris, M. & Hedman, K. 1992. Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol.* 30 (6), 1479–1484.



Mutanen, J., Aivelo, T. & Rastila, A. 2014. Symbioosi 5. Bioteknologia. Viitattu 17.6.2019, <https://peda.net/oppimateriaalit/e-oppi/näytekirjat/on/biologia/bsuok53/7dtotl>.

Myts, D. 2007. Adenovirus. Viitattu 28.6.2019, [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Adenovirus\\_weis.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Adenovirus_weis.jpg).

Mäkitalo, O. & Holappa-Girginkaya, J. 2017. Potilasturvallisuus osaksi poliklinikoiden näytteenottoa. *Poliklinikka*, 2, 4–5.

Nascimento-Carvalho, CM. & Ruuskanen, O. 2016. Clinical significance of multiple respiratory virus detection. *Pediatr Infect Dis J*. 35 (3), 338–339.

Nichols, EK. 1985. Institute of medicine committee on issues and priorities for new vaccine development: prospects for immunizing against respiratory syncytial virus. New vaccine development: establishing priorities vol 1. Washington DC: National academy of sciences press. 397–409.

NordLab 2019. Tutkimusohjekirja. Viitattu 3.-25.6.2019, <http://oyslab.fi/>.

Olsen, M., Shuck, K., Sambol, A., Flor, S., O'Brien, J. & Cabrera, B. 1993. Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: a practical and highly sensitive method. *J Clin Microbiol*. 31 (2), 422–425.

OPH 2006. Verkko-oppimateriaalin laatukriteerit. Viitattu 25.6.2019, [https://www.oph.fi/download/47132\\_verkko-oppimateriaalin\\_laatukriteerit.pdf](https://www.oph.fi/download/47132_verkko-oppimateriaalin_laatukriteerit.pdf).

Parija, S., Wallace, M. & Marrie, T. 2019. Human parainfluenza viruses (HPIV) and other parainfluenza viruses. Viitattu 4.6.2019, <http://misc.medscape.com/pi/android/medscapeapp/html/A224708-business.html>.

Peltola, H. & Salo, E. 2010. Infektiotaudit. Teoksessa Rajantie, J., Mertsola, J. & Heikinheimo, M. Lastentaudit. Hämeenlinna: Duodecim, 173–276.

Peltola, V., Reunanen, T., Ziegler, T., Silvennoinen, H. & Heikkinen, T. 2005. Accuracy of clinical diagnosis of influenza in outpatient children. *Clin Infect Dis.* 41 (8), 1198–1200.

Peltola, V., Waris, M., Österback, R., Susi, P., Ruuskanen, O. & Hyypiä, T. 2008. Rhinovirus transmission within families with children: Incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *J Inf Dis.* 197 (3), 382–389.

Poritz, M., Blaschke, A., Byington, C., Meyers, L., Nilsson, K., Jones, D., Thatcher, S., Robbins, T., Lingenfelter, B., Amiot, E., Herbener, A., Daly, J., Dobrowolski, S., Teng, D. & Ririe, K. 2011. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS One* 6 (10), 1–14.

Reijmans, M., Dingemans, G., Klaassen, C., Meis, J., Keijndener, J., Mulders, B., Eadie, K., Leeuwen, W., Belkum, A., Horrevorts, A. & Simons, G. 2008. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 46 (4), 1232–1240.

Roingard, P. 2008. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol Cell* 100, 491–501.

Schlaberg, R., Queen, K., Simmon, K., Tardif, K., Stockmann, C., Flygare, S., Kennedy, B., Voelkerding, K., Bramley, A., Zhang, J., Eilbeck, K., Yandell, M., Jain, S., Pavia, AT., Tong, S. & Ampofo, K. 2017. Viral pathogen detection by metagenomics and pan-viral group polymerase chain reaction in children with pneumonia lacking identifiable etiology. *J Infect Dis.* 215 (9), 1407–1415.

Schomacker, H., Schaap-Nutt, A., Collins, P. & Schmidt, A. 2012. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2 (3), 294–299.

Seppälä, I., Söderlund, M., Lappalainen, M. & Hedman, K. 1994. Vasta-aineen aviditeetti immuunivasteessa ja infektioautien diagnostiikassa. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim,* 110 (2), 178.

Shafik, C., Mohareb, E. & Youssef, F. 2011. Comparison of direct fluorescent assay and real-time rt-PCR as diagnostics for respiratory syncytial virus in young children. *J Trop Med.* 2011.

Slinger, R., Milk, R., Gaboury, I. & Diaz-Mitoma, F. 2004. Evaluation of the QuickLab RSV test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. *J Clin Microbiol.* 42, 3731–3733.

Sloots, T., Whiley, D., Lambert, S. & Nissen, M. 2008. Emerging respiratory agents: new viruses or old diseases? *J Clin Virol.* 42 (3), 233–243.

Souf, S. 2016. Recent advances in diagnostics testing for viral infections. *Bioscience Horizons* 9, 1–11.

Stone, C. & Mahony, J. 2018. Point-of-care (POC) tests for infectious diseases – the next generation! *Ann Infect Dis Epidemiol.* 3 (1), 1025.

Subbarao, K. & Katz, J. 2004. Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol.* 283, 313–342.

Sullender, WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev.* 13 (1), 1–15.

Tampereen yliopiston rokotetutkimuskeskus 2018. RS-viruksen aiheuttama infektio lapsilla. Viitattu 3.6.2019, <https://rokotetutkimus.fi/taudit/rs-virus/>.

Tawar, R., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Varela, P., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bhella, D., Eléouët, J. & Rey, F. 2009. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326 (5957), 1279–1283.

Ted, tenders electronic daily 2018. Hankintailmoitus, Suomi-Oulu, laboratorioreagenssit. Viitattu 19.6.2019, <https://ted.europa.eu/TED/notice/udl?uri=TED:NOTICE:523564-2018:HTML:FI:HTML>.

Templeton, K., Scheltinga, S., Beersma, M., Kroes, A. & Claas, E. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4. *J Clin microbiol.* 42 (4), 1564–1569.

Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2001. Biologian sanakirja. Helsinki: Otava.

Vainionpää, R., Hedman, K. & Hyypiä, T. 2000. Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnostiikasta. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 116 (1), 17–24.

Vernon-Parry, KD. 2000. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* 13 (4), 40–44.

Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Gummerus.

Vinh, D., Newby, D., Charest, H. & McDonald, J. 2008. Evaluation of a commercial direct fluorescent-antibody assay for human metapneumovirus in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 46 (5), 1840–1841.

World Health Organization (WHO) 2019. Influenza (Seasonal). Viitattu 31.5.2019, [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).

Zorc, J. & Hall, C. 2010. Bronchiolitis: Recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics* 125, 342–349.