



qRT-PCR-menetelmät COVID-19-taudin diagnostiikassa: kirjallisuuskatsaus

Aapo Kauppinen

Saku Saaristo

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2021

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

KAUPPINEN, AAPO & SAARISTO, SAKU:
qRT-PCR-menetelmät COVID-19-taudin diagnostiikassa: kirjallisuuskatsaus

Opinnäytetyö 44 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Marraskuu 2021

SARS-CoV-2 on uusi koronavirus, joka on aiheuttanut maailmanlaajuisen pandemian lähdettyään leviämään Wuhanin kaupungista Kiinasta loppuvuonna 2019. Virus on läheistä sukua epidemioita 2000-luvulla aiheuttaneille SARS- ja MERS-koronavirukselle. Sen aiheuttamaa hengitystiesairautta kutsutaan nimellä COVID-19. Pandemian torjunnassa ja hallinnassa keskeistä on nopeiden ja luotettavien diagnostisten menetelmien käyttäminen. qRT-PCR-menetelmät ovat valikoituneet käytetyimmäksi menetelmäksi näiden kriteerien saavuttamiseksi COVID-19-taudin diagnostiikassa.

Opinnäytetyön tarkoitus oli esitellä kootusti COVID-19-taudin qRT-PCR-diagnostiikkaa, epidemiologiaa ja SARS-CoV-2-viruksen rakennetta sekä tehdä kirjallisuuskatsaus viruksen osoittamiseen tarkoitettujen qRT-PCR-menetelmien ominaisuuksien vertailemiseksi. Työn tavoitteena oli vertailla menetelmien eroja kirjallisuuskatsauksen ja meta-analyysin avulla. Opinnäytetyön aihe saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:n mikrobiologian laboratoriosta.

Kirjallisuuskatsauksen tulokset osoittivat, että qRT-PCR-menetelmät ovat herkkiä ja tarkkoja SARS-CoV-2-viruksen osoittamiseksi, mutta näytemateriaalilla ja näytteen käsittelyllä on vaikutusta menetelmän herkkyyteen etenkin vähän virusmateriaalia sisältävien näytteiden kohdalla. Diagnostisten menetelmien vertailua toisiinsa vaikeuttaa kultaisen standardin menetelmän puuttuminen, minkä vuoksi on suotavaa käyttää erilaisia laskennallisia yhdistelmästandardeja. Haasteita menetelmien vertailemiseen luovat lisäksi analyyseissä käytettävien näytemateriaalien ja työtapojen eroavaisuudet. Edellä mainituista seikoista huolimatta työmme tukee käsitystä siitä, että qRT-PCR-menetelmät ovat luotettavia COVID-19-taudin diagnostiikassa.

Asiasanat: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnostiikka, qRT-PCR-menetelmä

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Biomedical Laboratory Science

KAUPPINEN, AAPO & SAARISTO, SAKU:
qRT-PCR Assays in Diagnostics of the COVID-19 Disease: Systematic Review

Bachelor's thesis 44 pages, appendices 2 pages
November 2021

SARS-CoV-2 is a novel coronavirus which has caused a worldwide pandemic after it started to spread from the city of Wuhan in China, late 2019. The virus is closely related to the SARS- and MERS-coronaviruses which have caused epidemics in the 2000's. It causes a respiratory illness called COVID-19. Having fast and reliable diagnostic assays available is crucial in preventing and containing a pandemic. To answer these goals qRT-PCR-assays have been selected as the primary method for diagnosing COVID-19.

The purpose of this study is to present an overview on epidemiology and structure of SARS-CoV-2, and to perform a systematic review and meta-analysis of qRT-PCR assays used in the diagnostics of COVID-19. The aim of the study is to compare the analytical differences in these assays.

The results of our systematic review show that qRT-PCR assays have high sensitivity and specificity in detecting SARS-CoV-2. We also found that the sample material and its handling affect the sensitivity of the assay, especially when analysing low viral load samples. The lack of a gold standard makes it difficult to compare different assays with each other, therefore it is recommended to use a computational composite standard as a reference method. In addition, the differences in the used sample materials and working methods create challenges in comparing the performance of different assays. Despite the aforementioned observations our study corroborates the notion that qRT-PCR assays are a highly dependable method in the diagnosis of COVID-19.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnostics, qRT-PCR assay

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	SARS-CoV-2-VIRUS.....	7
	2.1 Epidemiologia.....	7
	2.2 Taksonomia	8
	2.3 Rakenne.....	9
	2.4 Genomi	11
3	COVID-19-TAUDIN qRT-PCR-DIAGNOSTIIKKA	13
	3.1 Preamalytiikka.....	13
	3.2 PCR-analytiikka.....	14
	3.3 qRT-PCR	16
	3.4 Virhelähteet.....	17
	3.5 Diagnostisia ominaisuuksia kuvaavat termit.....	17
4	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	20
5	KIRJALLISUUSKATSAUKSEN JA META-ANALYYYSIN TOTEUTUS .	21
	5.1 Aineiston kerääminen.....	22
	5.2 Tutkimusten valinta	23
	5.3 Meta-analyysi	25
6	TULOKSET	26
	6.1 Tutkimusten piirteet.....	26
	6.2 Tulosten analysointi	28
	6.3 Aineiston laadun arviointi	33
7	POHDINTA	34
	7.1 Meta-analyysin tulosten pohdinta.....	35
	7.2 Opinnäytetyön eettisyys ja luotettavuus	36
	7.3 Jatkotutkimusehdotukset ja yhteenveto	37
	LÄHTEET.....	39
	LIITTEET	44
	Liite 1. TAULUKKO 6. Menetelmien koko nimet ja valmistajat sekä tässä työssä käytetyt lyhenteet.....	44
	Liite 2. TAULUKKO 7. QUADAS-2-laadunarviointityökalun tulokset...	45

LYHENTEET JA TERMIT

ACE2	angiotensiinikonvertaasi 2
CDC	Yhdysvaltain tautikeskus
cDNA	komplementaarinen DNA
CI	katso: Luottamusväli
COVID-19	SARS-CoV-2-viruksen aiheuttama tauti
CRS	yhdistetty vertailustandardi
CT	kynnyssykli
DNA	deoksiribonukeliinihappo
dNTP	deoksinukleosiditriposfaattimolekyylit
FN	väärä negatiivinen tulos
FP	väärä positiivinen tulos
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, virusgenomien sekvenssitietoja yhteen kokoava tietokanta
Komplementaarinen	Toistensa kanssa pariutumaan kykenevien molekyylien (DNA, RNA) vastakkaiset nukleiinihappojuosteet
LoD	havaitsemisen alaraja
Luottamusväli	Millä välillä todellinen perusjoukon tunnusluvun arvo on tietyllä todennäköisyydellä
NPA	negatiivinen prosentuaalinen yhdenmukaisuus
Nukleokapsidi	Viruksen perimäaineksen ja sitä ympäröivän proteiini-kuoren muodostama kokonaisuus
ORF	avoin lukukehys
PCR	polymeraasiketjureaktio
PPA	positiivinen prosentuaalinen yhdenmukaisuus
qRT-PCR	kvantitatiivinen käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio
RNA	ribonukleiinihappo
SARS-CoV-2	vakava akuutti hengitystieoireyhtymä -koronavirus 2
TN	todellinen negatiivinen tulos
TP	todellinen positiivinen tulos
Trimeeri	kolmesta monomeeriyksiköstä muodostunut oligomeeri
Virioni	kokonainen infektiokykyinen viruspartikkeli

1 JOHDANTO

Vuonna 2019 puhjennun COVID-19-pandemian taustalla on ennestään tuntematon koronavirus, jolle annettiin nimi SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Pandemian laajetessa diagnostisille ratkaisuille on kasvava kysyntä, johon useat toimijat pyrkivät vastaamaan. Taudin diagnosoinnissa on käytetty olemassa olevia, nukleiinihappojen osoitukseen perustuvia PCR-ratkaisuja ja apuna on ollut aikaisemmat muista koronaviruksista tehdyt tutkimukset. Virusgenomin sekvenssien tultua julki alkoivat useat eri tutkimuslaitokset kehittämään viruksen tunnistamiseksi alukkeita ja koettimia (näistä käytämme yhteisnimitystä "diagnostinen menetelmä" tai pelkkä "menetelmä"). Maailman terveysjärjestö WHO on julkaissut verkkosivuillaan 7 eri molekyyliagnostista menetelmää, jotka ovat yleisesti käytössä viruksen diagnostiikassa eri puolilla maailmaa. (Corman ym. 2020.)

Nykyaikainen virusdiagnostiikka perustuu viruksen genomin tai sen osien tunnistamiseen hengitysteistä otetusta näytteestä monistamalla sitä PCR-menetelmällä ja tunnistamalla monistetut juosteet fluorometrisesti. Koronavirus on RNA-virus, jonka diagnostiikassa käytetään tyypillisesti reaaliaikaista käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiota (qRT-PCR). Diagnostiikka on pitkälle automatisoitua: esimerkiksi viruksen eristäminen ja qRT-PCR tapahtuu yleensä automatisoidusti. (Corman ym. 2020.)

Opinnäytetyössä avaamme aluksi SARS-CoV-2-viruksen epidemiologiaa, taksonomiaa ja rakennetta sekä COVID-19-taudin diagnostiikkaa. Käsittelemme muun muassa näytteenottoa, näytemateriaaleja, PCR-analytiikkaa sekä taudin diagnostiikan virhelähteitä ja terminologiaa. Työmme tarkoitus on toteuttaa kirjallisuuskatsaus ja meta-analyysi COVID-19-taudin diagnostisten menetelmien ominaisuuksista ja tavoitteena tehdä vertailu eri menetelmien diagnostisten ominaisuuksien eroista, keskittyen menetelmien tarkkuuksiin ja herkkyyksiin.

2 SARS-CoV-2-VIRUS

2.1 Epidemiologia

COVID-19-taudin leviäminen alkoi joulukuussa 2019 Kiinassa Wuhanin kaupungissa, todennäköisesti viruksen siirryttyä ihmisiin villieläintuotteita myyvällä torilla. Tautiin varhain sairastuneiden ihmisten näytteistä löydettiin koronaviruksia tutkivassa Wuhanin virologisessa instituutissa koronavirusta, jonka todettiin uuden sukupolven sekvensointimenetelmää ja PCR:a käyttämällä omaavan 79,6 % geneettisen yhtenevyyden vuosina 2002–2004 epidemioita aiheuttaneen SARS-CoV:n kanssa. Löytyneen uuden koronaviruksen ja SARS-CoV:n kahdentumista koodaavien perimän alueiden, replikaatidomeenien, samankaltaisuuksien vuoksi virusten arvioitiin kuuluvan samaan sukuun. Suurin perimän samankaltaisuus havaittiin hevosenkenkälepakosta löydetyn koronavirustyyppin kanssa, jonka perusteella viruksen arvioitiin olevan peräisin lepakoista. (Zhou ym. 2020.) Maaliskuun 2020 alkuun mennessä tauti oli levinnyt 114 maahan ja Maailman terveysjärjestö WHO julisti COVID-19-taudin olevan pandemia (World Health Organization 2020).

Marraskuun 2021 alkuun mennessä maailmanlaajuisesti on ilmoitettu lähes 250 miljoonaa laboratoriovarmennettua SARS-CoV-2-tartuntaa ja COVID-19-tautiin on kuollut yli viisi miljoonaa ihmistä (World Health Organization 2021). Tauti voi aiheuttaa laajan kirjon erilaisia oireita, joista yleisimpiä ovat kuume, yskä, hengenahdistus ja väsymys. Muita yleisiä oireita ovat pääkipu, haju- ja makuaistin heikkeneminen, tukkoisuus, lihassäryt, vuotava nenä ja kurkkukipu. (European Centre for Disease Prevention and Control 2021a.) Myös oksentelun, ripulin ja vatsakipujen kaltaisia ruoansulatuselimistön oireita voi esiintyä. Vakavammissa tapauksissa potilaalle voi kehittyä keuhkokuume tai akuutti hengitysvajausoireyhtymä, mistä voi seurata monielinvaurio ja jopa kuolema. (Ciotti ym. 2020, 216.)

SARS-CoV-2-virus leviää ihmisestä toiseen pääasiallisesti ilmateitse pisara- tai aerosolitartuntana sekä kosketustartuntana. Etäisyys viruksen kantajaan ja tämän läheisyydessä vietetty aika ovat tärkeitä tekijöitä tartunnan todennäköisyydelle. Muihin ihmisiin etäisyyden pitämisen lisäksi viruksen leviämistä voidaan

ehkäistä hyvällä käsihygienialla ja käyttämällä hengityssuojaimia. Tartunnan tapahtuessa viruksen piikkiproteiini sitoutuu isäntäsolun ACE2-pintareseptoriin (angiotensiinikonvertaasi-entsyymi 2), mikä johtaa viruksen kulkeutumiseen isäntäsolun sisään. Tartunnan alkuvaiheissa virus lisääntyy etenkin ylähengitysteissä suu- ja nenänielussa ja taudin edetessä virusta alkaa esiintyä myös alahengitysteissä. (Meyerowitz, Richterman, Gandhi & Sax 2020.)

Taudin itämisajan arvioidaan olevan keskimäärin 5–6 vuorokautta, mutta se voi vaihdella kahden ja neljäntoista päivän välillä. Viruksen erittyessä se voidaan havaita RT-PCR-testeillä, mutta erittyminen ei tarkoita, että potilas olisi tartuttava, sillä erittymistä tapahtuu myös taudin oireettomassa muodossa tai ennen oireiden ilmaantumista. Toisaalta RT-PCR-testien on todettu tuottavan positiivisia tuloksia potilailta, joiden diagnoosin saamisesta on kulunut jopa kuukausia. Viruskuorma on korkeimmillaan joitain päiviä ennen oireiden ilmaantumista, ja se on erityisen korkea vakavaa tautimuotoa sairastavilla ja ikääntyneillä. (European Centre for Disease Prevention and Control 2021b.)

2.2 Taksonomia

Kansainvälisen virusluokituskomitean ICTV:n (International Committee on Taxonomy of Viruses) koronaviruksia tutkiva työryhmä on tehnyt linjauksen SARS-CoV-2-viruksen tieteellisestä luokittelusta ja nimeämisestä. Nykyaikainen virusten luokittelu tapahtuu sekvensoimalla viruksen perimän osa, joka on kykenevä monistumaan itsenäisesti isäntäsolussa. Nimeäminen perustuu tyypillisesti viruksen aiheuttamaan tautiin, sen vaikutuskohtaan elimistössä, isäntälajiin tai maantieteelliseen esiintyvyyteen. SARS-CoV-2 kuuluu *Nidovirales*-lahkoon, koronavirusten heimoon ja beetakoronavirusten sukuun, ja se on 39. luokiteltu koronavirusslaji. (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020.)

SARS-CoV-2 on seitsemäs ihmisiä tartuttava koronavirus. Alfakoronavirukset HCoV-229E ja HCoV-NL63 sekä beetakoronavirukset HCoV-OC43 ja HCoV-HKU1 ovat yleisiä ihmisten koronaviruksia ja aiheuttavat lieväoireisia tauteja.

Beetakoronavirukset SARS-CoV ja MERS-CoV ovat aiheuttaneet tauteja, joihin on liittynyt suhteellisen korkea kuolleisuus. (Chen ym. 2020.)

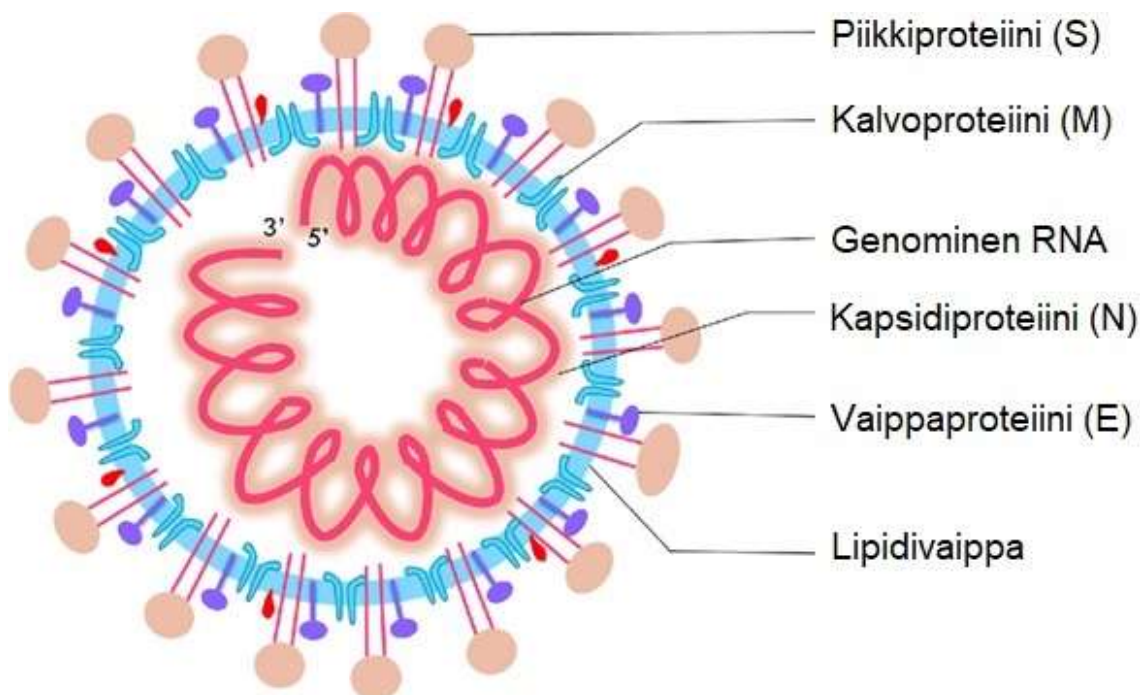
SARS-CoV levisi 29 maahan vuosina 2002–2003 ja sen aiheuttamia kuolemia raportoitiin 774. Valtaosa tautitapauksista oli Etelä-Kiinasta, lisäksi tauti levisi Hong Kongissa, Singaporessa, Vietnamissa, Taiwanissa ja Kanadassa, muissa maissa esiintyi lähinnä yksittäisiä tautitapauksia. (Hui, Chan, Wu & Ng 2004.) MERS-CoV lähti leviämään Saudi-Arabiasta vuonna 2012 ja on aiheuttanut löytymisensä jälkeen paikallisia epidemioita viidellä mantereella 27 maassa. Se on aiheuttanut 845 kuolemaa noin 35 % kuolleisuudella. MERS-CoV on levinnyt pääosin Lähi-Idän alueella, 84 % tautitapauksista on raportoitu Saudi-Arabiasta. Korean tasavallassa on raportoitu lähes 200 tapausta, Lähi-Idän ulkopuolella tautia on esiintynyt vain yksittäisiä tapauksia. (World Health Organization 2019.)

Epidemiologisen tutkimuksen tueksi on olemassa avoimia tietokantoja, joihin tutkijat eri puolilta maailmaa voivat tallentaa tutkimustuloksiaan toisten tutkijoiden käytettäväksi. Esimerkiksi virusten kehittymisen ja leviämisen tutkimisen tueksi perustettu GISAID-tietokanta (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data) kokoaa sekvensoituja genomeja sekä kliinistä, epidemiologista ja maantieteellistä tutkimustietoa mm. SARS-CoV-2-viruksesta. GISAID-tietokantaa ylläpitää Saksan liittovaltion ympäristö- ja ruokaministeriö ja sen hallinnoinnista vastaa monikansallinen tieteentekijöiden yhteisö. Datan perusteella voidaan tuottaa tilastoja ja visuaalisia esityksiä viruksen evoluution ja leviämisen havainnollistamiseksi. Tällaisista palveluista mainittakoon esimerkkeinä yhdysvaltalaisen Fred Hutchinson -syöpätutkimuskeskuksen ja Baselin yliopiston tutkijoiden yhteistyössä toteuttama Nextstrain-projekti sekä muun muassa Edinburghin, Oxfordin, ja Cambridgen tutkijoiden yhteistyössä luoma pangolin-työkalu. GISAID-tietokantaan on 8.11.2021 mennessä tallennettu lähes viisi miljoonaa SARS-CoV-2-viruksen perimää. (GISAID 2021; Nextstrain 2021; O’Toole ym. 2021.)

2.3 Rakenne

SARS-CoV-2 on ei-segmentoitu yksijuosteinen positiivissäikeinen RNA-virus. Sen rakenne on esitetty kuviossa 1. Sillä on juosteen 5’-päässä nukleotidisuojaus

ja 3'-päässä metyloitunut häntäosa. Sen ulkohalkaisija on 80–160 nm ja genomin pituus on noin 30 000 nukleotidia. Kaksi virionin pääkomponenttia, genominen RNA ja sitä ympäröivä proteiinikuori (kapsidi) muodostavat nukleokapsidin, jota ympäröi viruksen uloin kerros, proteiinirakenteita sisältävä kaksoiskerroksinen fosfolipidikalvo eli vaippa. Perimä koodaa neljää rakenteellista proteiinia: piikki- (S, spike), kalvo- (M, membrane), vaippa- (E, envelope) ja kapsidiproteiini (N, nucleocapsid). (Hosseini ym. 2020.)



KUVIO 1. SARS-CoV-2-viruksen rakenne (Jalandra ym. 2020, muokattu)

Piikkiproteiini on suurikokoinen, trimeerimäinen glykoproteiini, joka rakentuu kahdesta toiminnallisesta osasta. S1-alayksikkö on paljaana virionin pinnalla ja sisältää reseptoria sitovan domeenin, minkä sitoutuminen isäntäsolun pintareseptoriin mahdollistaa viruksen kulkeutumisen isäntäsolun sisään. S2-domeeni sisältää viruksen ja isäntäsolun kalvojen yhdistymisen mahdollistavan fuusiopeptidiasan. Piikkiproteiini kykenee sitoutumaan isäntäsolun solukalvon pinnan angiotensiinikonvertaasi 2 -entsyymiin kanssa, mikä johtaa virionin ja solun kalvojen fuusioitumiseen ja viruksen kulkeutumiseen isäntäsolun sisään. (V'kovski ym. 2020.)

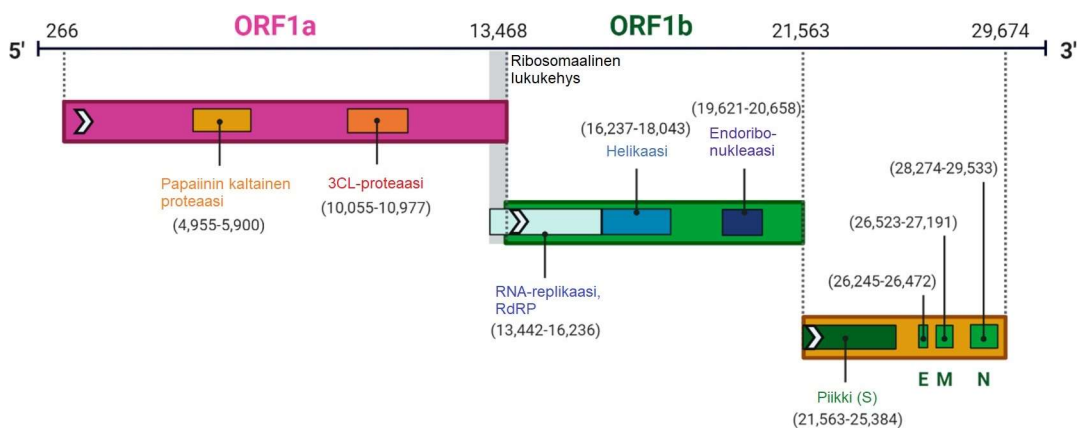
E- ja M-proteiinit ovat piikkiproteiinia pienempiä, vaipan läpäiseviä rakennekomponentteja. E-proteiini on koronaviruksen pienikokoisin rakenneproteiini, kool-

taan 76–109 aminohapon pituinen. Se koostuu lyhyestä, hydrofiilisestä 7–12 aminohapon muodostamasta N-päästä (aminopää), 25 aminohapon muodostamasta hydrofobisesta transmembraanidomeenista ja pitkästä hydrofiilisestä C-karboksyyliterminuksesta, joka muodostaa suurimman osan E-proteiinista. Keskeisin viruksen muotoa määrittävä komponentti on M-proteiini. Se koostuu karboksyyliterminaalista, kolmesta hydrofobisesta transmembraanidomeenista ja lyhyestä, virionin ulkopinnalle ulottuvasta aminohappotermiuksesta. (Hosseini ym. 2020; Aldaais ym. 2021.)

Koronaviruksen N-proteiinin pääasiallinen tehtävä on viruksen perimäaineksen pakkaaminen pitkäksi ribonukleoproteiini-kompleksiksi. Lisäksi se suojaa genomia, tukee virionin rakennetta kiinnittymällä muihin rakenneproteiineihin ja osallistuu viruksen replikaatioprosessiin. N-proteiini rakentuu kahdesta RNA:han kiinnittyvästä domeenista ja niitä erottavasta toiminnallisesta osasta, joka muun muassa säätelee RNA:han sitoutumista ja osallistuu solusignalointiin. (McBride, Van Zyl & Fielding 2014.)

2.4 Genomi

SARS-CoV-2-viruksen genomi koostuu yhdestä noin 30 kiloemäksen (kb) pituisestä RNA-juosteesta (kuvio 2).



KUVIO 2. SARS-CoV-2-viruksen genomin rakenne (Xiu ym. 2020, muokattu)

RNA:n 5'-päässä on kaksi avointa lukukehystä, ORF1a ja ORF1b, jotka käsittävät noin kaksi kolmannesta koko genomista. ORF1a ja ORF1b koodaavat 16 ei-rakenteellista proteiinia, muun muassa replikaatioon tarvittavia proteiineja. 3'-päässä on lyhyempiä lukukehyksiä, joissa sijaitsee rakenneproteiineja koodaavat perimän osat. (Chen ym. 2020.) Genomin rakenne on järjestyksessä: 5' – ei-koodaava alue (UTR) – pitkä avoin lukukehys (replikaatiokompleksi ORF1ab) – rakenneproteiinia S koodaava alue – ei-rakenteellista proteiinia ORF3a koodaava alue – rakenneproteiinia E koodaava alue – rakenneproteiinia M koodaava alue – ei-rakenteellisia proteiineja ORF6, ORF7a, ORF7b ja ORF8 koodaava alue – rakenneproteiinia N koodaava alue – ei-rakenteellista proteiinia ORF10 koodaava alue – ei-koodaava alue (UTR) – 3' (Hosseini ym. 2020).

3 COVID-19-TAUDIN qRT-PCR-DIAGNOSTIIKKA

3.1 Preanalytiikka

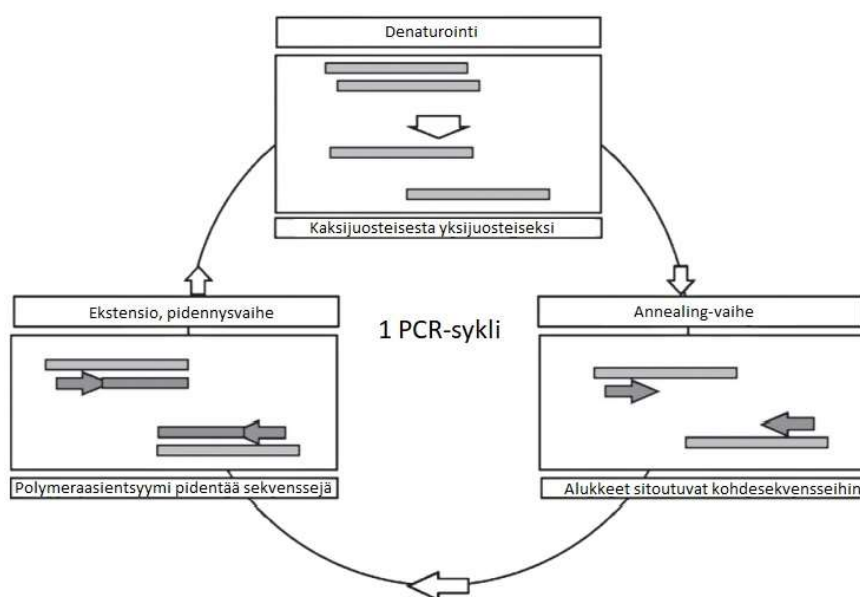
COVID-19-taudin mikrobiologisten tutkimusten ensisijaiseksi näytteeksi suositellaan nenänielusta otettavaa tikkunäytettä. Jos se ei esimerkiksi verenvuototaipumuksen vuoksi tai muusta syystä ole mahdollista, voidaan ottaa myös nielunäyte. Nenänielunäytteeksi pyritään saamaan epiteelisolukkoa, hankaamalla näytteenottotikkua nenänielun takaosan limakalvoilla. (Savolainen-Kopra & Melin 2020.) Näyte kuljetetaan tutkivaan laboratorioon kuljetusnestettä, kuten Copan UTM[®], sisältävässä putkessa, joka pakataan salpapussiin tai imutyynyn kanssa kierrekorkilliseen kuljetuskoteloon. Kuljetus suositellaan tehtävän kylmäkuljetuksena. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2021.) Laboratoriopalveluita tuottava Fimlab Laboratoriot Oy ohjeistaa ottamaan näytteen nenästä tai viimeisijaisesti nielusta, mikäli nenänielunäytteenotto ei ole mahdollista (Fimlab Laboratoriot Oy 2021).

Eri diagnostiikkapalveluja tarjoavien laboratorioalan yritysten ja sairaanhoitopiirien antamat näytteenotto-ohjeet nenänielunäytteen ottamiseksi poikkeavat hieman toisistaan. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä ohjeistaa aluksi mittaamaan potilaan sierain-korvanipukka-etäisyyden, ja näyte pyritään ottamaan mitan mukaiselta syvyydeltä. Aikuisilla tämä mitta on yleensä noin 12–15 cm, mutta aina yli 10 cm. Näyte otetaan hankaamalla nylonnukkatikulla nenänielun limakalvoa kiertoliikkeellä, jotta tikkuun tarttuisi limakalvon soluja. Tikku katkaistaan virusnäytteiden kuljetukseen tarkoitettuun Copan UTM-RT-putkeen tai keittosuolaa sisältävään kierrekorkilliseen putkeen. (Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä 2020.) Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjeen mukaan nenänielunäyte otetaan aikuisilla noin 10–12 cm syvyydestä taipuisa- tai jäykkävartisella nukkatikulla, jonka harjaosaa pyöritetään Vacuette 2 ml Virus stabilizaton -putken sisäreunoihin nestepinnan alapuolella, jonka jälkeen tikku poistetaan putkesta. Näyttemateriaalina voi olla myös esimerkiksi imulimanäyte, yskös- tai bronkoalveolaarinen huuhtelunäyte. (Fimlab Laboratoriot oy 2021.)

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen ohjeistuksen mukaan COVID-19-taudin näytteenotossa tulee suojautua tavanomaisten varotoimien mukaisesti. Tämä tarkoittaa suojautumista eriteroiskeilta: suojakäsineiden, suojatakin tai hihallisen suojaesiliinan, kirurgisen suu-nenäsuojuksen sekä suojalasien tai visiirimaskin käyttämistä. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020; Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2021.)

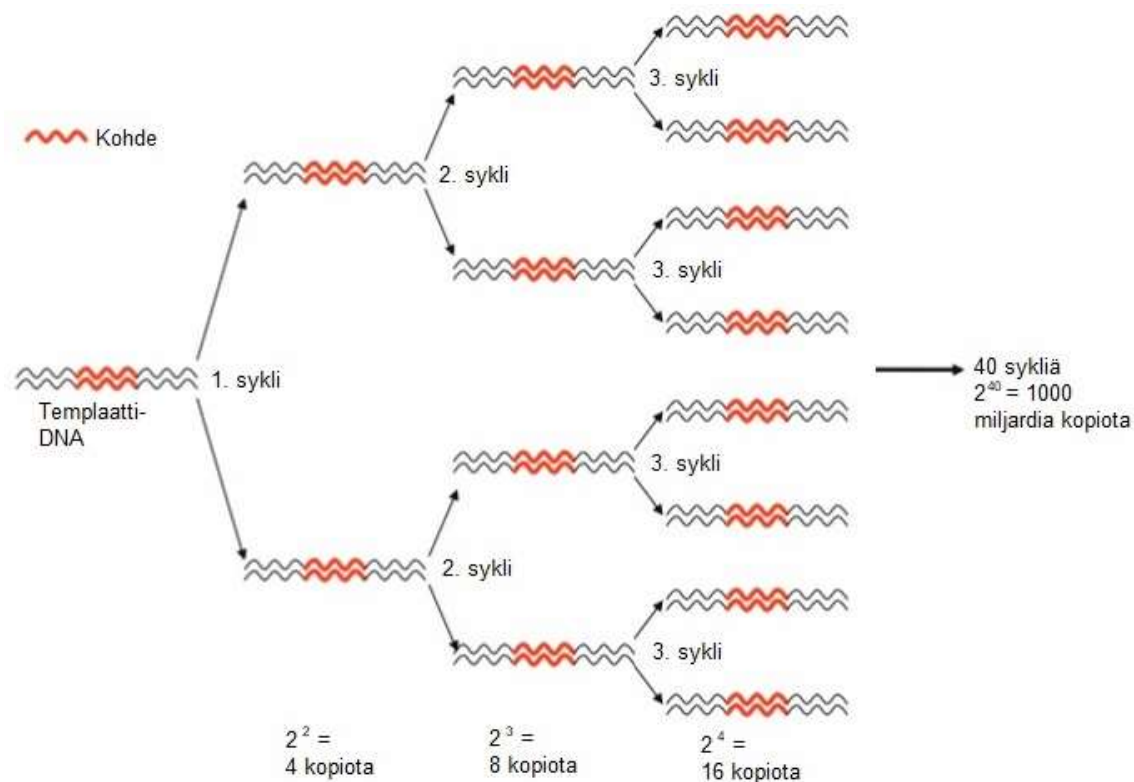
3.2 PCR-analytiikka

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on yksi molekyylibiologian perusmenetelmistä. Se on *in vitro* -menetelmä, joka perustuu pienen määrän etsittävää DNA:ta monistamiseen tuhat- tai miljoonakertaiseksi. Monistusprosessissa näytettä inkuboidaan monia kertoja peräkkäin kolmessa eri lämpötilassa: denaturointivaiheessa kaksijuosteinen DNA avautuu yksijuosteiseksi lämpötilan ollessa korkea, alukkeiden liitymisvaiheessa lämpötilaa lasketaan ja komplementaariset sekvenssit sitoutuvat toisiinsa – tätä vaihetta käytetään alukkeiden kiinnittämiseen kohdesekvensseihin – ja ekstensiovaiheessa lämpötilaa nostetaan, jolloin polymeraasi-entsyymi kykenee syntetisoimaan alukkeiden välille DNA-juosteen. (Walker & Rapley 2008, 29; Life Technologies 2012, 3–4.) PCR-sykli on esitelty kuviossa 3.



KUVIO 3. PCR-syklin vaiheet: denaturointi, annealing-vaihe ja ekstensio (Walker & Rapley 2008, 31, muokattu)

Jokaisessa syklistä syntetisoitu uusi DNA-juoste toimii templaattina seuraavissa sykleissä. Siten PCR-reaktio monistaa alkuperäistä kohdesekvenssiä ja syntetisoituja juosteita eksponentiaalisesti, kunnes reaktio on kulunut ajallisesti loppuun tai siinä käytettävät reagenssit ovat kuluneet loppuun. (Walker & Rapley 2008, 30-31.) Eksponentiaalinen monistuminen on esitetty kuviossa 4.

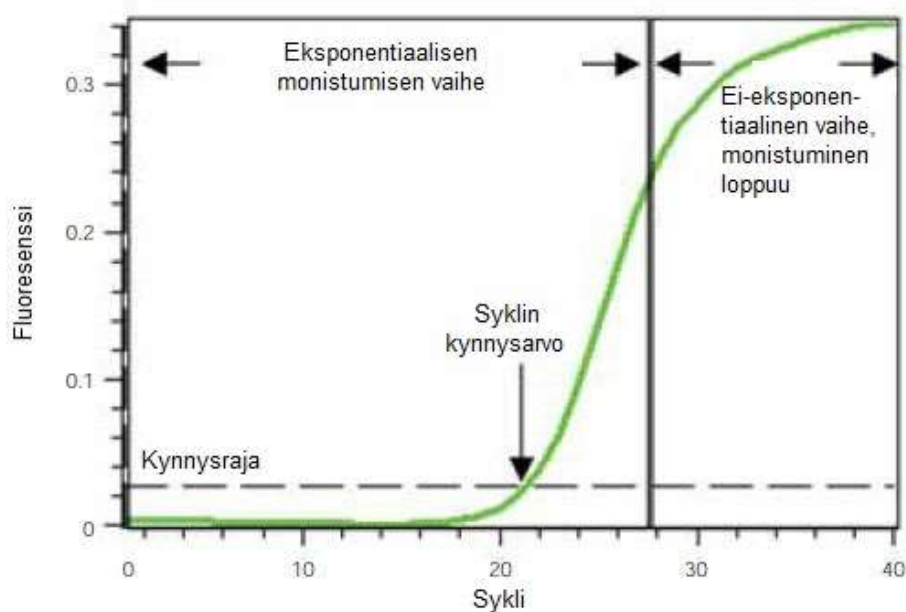


KUVIO 4. Eksponentiaalinen monistuminen PCR-reaktiossa (Behlke 2019, 2, muokattu)

PCR-reaktiossa tarvittavat reagenssit sisältävät oligonukleotidialukkeita, polymeeraasi-entsyymiä, dNTP-molekyylejä ja magnesiumioneja. Alukkeet ovat komplementaarisia etsittävän nukleinihapposekvenssin 5'- ja 3'-päille ja rajaavat siten näytteestä etsittävän perimän osan reaktiossa monistettavaksi kohdesekvenssiksi. Polymeeraasi-entsyymi syntetisoi DNA-juostetta, eli pidentää kohdesekvenssiin sitoutunutta aluketta liittämällä siihen vapaita dNTP-molekyylejä. PCR-reaktion vaiheita toistamalla syntetisoitujen DNA-jaksojen määrä kasvaa lähes eksponentiaalisesti. (Walker & Rapley 2008, 30.)

3.3 qRT-PCR

Reaaliaikaisella PCR-reaktiolla voidaan mitata muodostuvan DNA:n määrää jokaisen reaktiosyklin jälkeen fluoresoivaa merkkiainetta käyttämällä. Mittauksen avulla voidaan arvioida alkuperäisessä näytteessä olleen tietyn nukleiinihapposekvenssin määrää. (Life Technologies 2012, 3.) Tällaisesta mittauksesta käytetään myös nimeä qPCR, mikä viittaa tutkimuksen kvantitatiivisuuteen (quantitative). Laitteistoon kuuluu PCR:n mahdollistavan lämpötilayksikön lisäksi optinen mittalaite, joka havaitsee reaktiossa muodostuvat fluoresenssisignaalit. Fluoresoiva merkkiaine sitoutuu spesifisti monistettavaan sekvenssiin, jolloin fluoresenssin määrä kasvaa reaktion edetessä. Jokaisella PCR-syklillä mitatun fluoresenssin määrä tallentuu laitteen muistiin ja piirtyy reaktiokuvaajaksi. (Bio-Rad n.d.) qPCR-reaktion fluoresenssikuvaaja on havainnollistettu kuviossa 5.



KUVIO 5. PCR-reaktion kulku (Bio-Rad n.d., muokattu)

PCR-tekniikkaa voidaan käyttää myös, kun lähtömateriaalina on DNA:n sijaan RNA. RNA:sta syntetisoidaan komplementaarista DNA:ta käänteiskopioijaentsyymien (reverse transcriptase) avulla, jonka jälkeen PCR-reaktio voi jatkua kuten kuvattu kappaleessa 3.2. (Walker & Rapley 2008, 154.) qRT-PCR voidaan siis kääntää tarkoittamaan kvantitatiivista käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktiota.

3.4 Virhelähteet

PCR-testin virheellinen tulos tarkoittaa väärän negatiivisen tai väärän positiivisen testituloksen saamista. Väärä negatiivinen tulos tarkoittaa, että todellisuudessa tautia sairastava henkilö saa testistä negatiivisen tuloksen, ja väärä positiivinen antaa terveelle henkilölle positiivisen tuloksen. Väärä negatiivinen testitulos voi johtua esimerkiksi väärin ajoitetusta näytteenotosta tai näytteenotossa, säilytyksessä, kuljetuksessa tai käsittelyssä tapahtuneesta virheestä. (Prinzi 2020.)

Ylähengitysteistä tehtävä näytteenotto tulisi ajoittaa mieluiten taudinkuvan alkuvaiheille, sillä silloin viruskuorma on näytteenottokohdassa korkeimmillaan. Mitä myöhemmin oireiden alkamisesta näyte otetaan, sitä vähemmän virusta esiintyy näytteenottokohdassa ja todennäköisempää on väärän negatiivisen testituloksen saaminen. Näytteen hajoaminen lisää väärän negatiivisen todennäköisyyttä, minkä estämiseksi näyte tulee kuljettaa virusnäytteiden kuljettamiseen tarkoitettussa kuljetusnesteessä ja -putkessa ja säilyttää jääkaappilämpötilassa tai pitempiaikaisesti pakastettuna. (Prinzi 2020.)

Väärä positiivinen testitulos voi olla seurausta kontaminaatiosta tai ristireaktiosta. Kontaminaatio voi tapahtua näytettä ottaessa, RNA:n eristysvaiheessa, PCR-tuotteen käsittelyvaiheessa tai tutkimusvälineistöä valmistavassa laboratoriossa. Mikäli näytettä sisältävä kuljetusneste tai PCR-ajossa käytettävä, näytettä sisältävä neste aerosolisoituu tai muutoin leviää ympäristöönsä, muodostuu riski näytteiden väliselle ristikontaminaatiolle. Ristireaktio tarkoittaa muiden DNA- tai RNA-lähteiden välistä reaktiota, joka johtaa monistumiseen RT-PCR-testissä. (Mayers & Baker 2020.)

3.5 Diagnostisia ominaisuuksia kuvaavat termit

Herkkyydellä ja tarkkuudella kuvataan analyttisten menetelmien ominaisuuksia ja laboratoriotutkimusten kliinistä käyttökelpoisuutta. Herkkyys kuvaa tutkimuksessa saatujen positiivisten tulosten osuutta kaikista varmuudella positiivisiksi tiedetyistä potilaista. Tarkkuudella kuvataan saatujen negatiivisten tulosten osuutta

kaikista varmuudella negatiivisiksi tiedetyistä potilaista. Herkkä menetelmä antaa positiivisen tuloksen kaikille sairaille potilaille ja tarkka vastaavasti negatiivisen tuloksen kaikille terveille potilaille. (Marshall, Lapsley & Day 2017.)

Kun määritellään uuden menetelmän diagnostisia ominaisuuksia, sen suorituskykyä verrataan referenssimenetelmään. Referenssimenetelmä on tiedemaailman parhaana pitämä menetelmä tutkittavan analyytin havaitsemiseksi. Se voi olla jokin yksittäinen tutkimus tai menetelmä, tai yhdistelmä eri menetelmiä tai tekniikoita. Joissain tapauksissa referenssimenetelmää voidaan käyttää vain osittain, tai sellaista ei kyetä muodostamaan ollenkaan. (Center for Devices and Radiological Health 2003, 6-7.)

Uuden menetelmän suorituskykyä ei ole välttämättä mahdollista verrata mihinkään olemassa olevaan referenssimenetelmään. Tällöin suositellaan käytettäväksi termejä positiivinen prosenttiosuus (positive percent agreement, PPA) herkkyydestä puhuttaessa ja negatiivinen prosenttiosuus (negative percent agreement, NPA) tarkkuudesta puhuttaessa. Ne lasketaan samoilla laskentakaavoilla, kuin herkkyys ja tarkkuus, mutta terminologialla korostetaan niiden olevan vertautuvuuksia tutkittavan menetelmän ja ei-referenssimenetelmänä käytetyn standardin tulosten välillä. Kaavat ovat

$$\begin{aligned} \text{Herkkyyssensitiivisyys} &= 100\% \times \left(\frac{TP}{TP + FN} \right) \text{ tai PPA} = \left(\frac{TP}{TP + FN} \right) \\ \text{Tarkkuusspesifisyys} &= 100\% \times \left(\frac{TN}{TN + FP} \right) \text{ tai NPA} = \left(\frac{TN}{TN + FP} \right), \end{aligned} \quad (1)$$

jossa TP on oikeiden positiivisten, TN oikeiden negatiivisten, FP väärien positiivisten ja FN väärien negatiivisten testitulosten lukumäärä. (Center for Devices and Radiological Health 2003, 11.)

Yksinkertainen ja käytetty metodi referenssin luomiseksi tilanteessa, jossa virheetön referenssimenetelmä (kultainen standardi) puuttuu, on yhdistetyn vertailustandardin (composite reference standard, CRS) käyttäminen. Menetelmällä muodostetaan usean epätäydellisen testin tuloksista niin sanottu valereferenssi. Yhdistetty vertailustandardi voidaan muodostaa ”yksikin positiivinen” -säännön

kautta, jolloin yhdenkin standardissa käytetyn testin antama positiivinen määrittää tutkitun näytteen positiiviseksi, tai ”kaikki positiivisia” -säännöllä, jolloin jokaisen standardin testin tulee antaa positiivinen tulos, jotta näyte katsotaan positiiviseksi. Mikäli käytettäviä referenssitestejä on useita, voidaan käyttää myös toisenlaisia sääntöjä, kuten positiiviseksi laskeminen kun vähintään kaksi menetelmää antaa näytteelle positiivisen tuloksen. (Tang, Hemyari & Canchola 2015.)

4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tarkoituksena on koota tutkimustietoon perustuvaa tietoa COVID-19-taudin diagnostiikasta, epidemiologiasta ja SARS-CoV-2-viruksen taksoniasta ja rakenteesta sekä tehdä kirjallisuuskatsaus COVID-19-taudin diagnostiikassa käytettyjen menetelmien diagnostisista ominaisuuksista. Lisäksi esittelemme diagnostisten menetelmien vertailemisessa huomioitavia seikkoja, kuten sopivan referenssimenetelmän valintaa sekä potilasryhmien ja näytetyyppien rajausta. Opinnäytetyön alkuperäinen aihe saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:ltä sairaalamikrobiologi Bruno Luukiselta.

Tutkimusongelmia ovat:

1. Minkälaisia SARS-CoV-2-viruksen tunnistamisessa käytettyjen qRT-PCR-menetelmien herkkyudet ja tarkkuudet ovat?
2. Mitkä seikat vaikuttavat näiden menetelmien herkkyyteen ja tarkkuuteen?
3. Kuinka menetelmien diagnostista suorituskykyä on tutkittu?

Työn tavoitteena on tehdä systemaattisen kirjallisuuskatsauksen ja meta-analyysin kautta vertailu taudin diagnostiikassa käytettyjen menetelmien diagnostisten ominaisuuksien eroista. Kirjallisuuskatsaus kohdistuu tutkimuksiin, joissa on vertailtu COVID-19-taudin analytiikassa käytettäviä kaupallisia ja in-house qRT-PCR-menetelmiä vertailustandardiin tai referenssimenetelmään. Jätimme vertailusta pois muut diagnostiset menetelmät rajataksemme aihealuetta ja mahdollistaaksemme tulosten yhdenmukaisen vertailun. qRT-PCR-menetelmän herkkyyteen ja tarkkuuteen vaikuttaa useat eri seikat, joita pyrimme havainnollistamaan meta-analyysin tulosten ja pohdinnan kautta. Työmme voi toimia retrospektiivinä COVID-19-pandemiassa käytetystä diagnostiikasta, jonka lisäksi sitä on mahdollista käyttää oppimateriaalina RNA-virusten diagnostiikkaa käsittelevissä opinnoissa.

5 KIRJALLISUUSKATSAUKSEN JA META-ANALYYSIN TOTEUTUS

Systemaattinen kirjallisuuskatsaus pyrkii systemaattisesti tietoa etsien kokoaamaan oleellisen aikaisemman tutkimustiedon yhteen. Menetelmän pohjana on tarkasti määritelty tutkimuskysymys, johon etsitään vastauksia aikaisempia tutkimustuloksia yhdistelemällä. Systemaattinen kirjallisuuskatsaus toteutetaan valitsemalla ja noudattamalla tarkkoja menettelytapoja ja aineiston hakuperiaatteita. (Stolt, Axelin & Suhonen 2016, 14.)

Systemaattista kirjallisuuskatsausta seuraa usein alkuperäisten tutkimusten tulosten käsittely meta-analyysin keinoin. Meta-analyysi yhdistää tilastollisesti kirjallisuuskatsauksen alkuperäistutkimusten kvantitatiiviset tulokset tai tulosten vaikutukset luotettavuuteen ja objektiivisuuteen pyrkien. Meta-analyysin käytön edellytyksenä on löytää systemaattisen kirjallisuuskatsauksen kautta riittävä määrä rinnakkain vertailukelpoisia tutkimuksia. (Salminen 2011, 9-10; Stolt ym. 2016, 14-17.)

Diagnostisten testien tarkkuutta tarkastelevat kirjallisuuskatsaukset käsittelevät tutkimuksia, joissa on verrattu yhden tai useamman testin tarkkuutta referenssimenetelmään, arvioitu testin suorituskykyä, tehty vertailua eri testien tarkkuuksien välillä ja tunnistettu testien tarkkuuksiin vaikuttavia tekijöitä. Kirjallisuuskatsaus tulee raportoida niin, että siitä käy riittävän hyvin ilmi käytettyjen metodien laatu sekä tulosten paikkansapitävyys ja sovellettavuus. (McInnes ym. 2018.) Systemaattisen kirjallisuuskatsauksen alkuperäistutkimusten laadun arviointi lisää luotettavuutta ja tukee katsauksen tulosten ja vaikutusten voimakkuuden tulkintaa. Laadun arvioinnissa tarkastellaan alkuperäistutkimusten tuottaman tiedon luotettavuutta, tulosten tulkintaa ja kliinistä merkitystä. (Kontio & Johansson 2007, 101.)

Kirjallisuuskatsauksien raportoinnin tueksi on luotu suosituksia, kuten PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), joka määrittelee vaatimukset diagnostisten testien tarkkuutta käsittelevien kirjallisuuskatsauksien sisällölle ja QUADAS-työkalu diagnostisten testien tarkkuutta tutkivien systemaattisten kirjallisuuskatsausten laadun arvioinnin tueksi (Whiting ym.

2011; McInnes ym. 2018). Työssämme suoritamme systemaattisen kirjallisuuskatsauksen ja meta-analyysin noudattaen PRISMA-DTA-ohjeistusta työn sisällön määrittämiseksi ja QUADAS-2-työkalua kirjallisuuskatsauksen alkuperäistutkimusten laadun arvioimiseksi.

5.1 Aineiston kerääminen

Ennen kirjallisuuskatsauksen suorittamista tutustuimme aineistohakuun ja aiheesta tehtyihin tutkimuksiin tekemällä kokeiluhakuja Google Scholar -tietokannasta ja kokeilemalla erilaisten hakusanojen ja -lausekkeiden toimivuutta Ovid- ja Scopus-tietokannoissa. Käyttämämme tietokannat, hakulausekkeet ja käytetyt rajaukset on esitelty taulukossa 1. Lisäksi teimme haun suomenkielisillä hakutermeillä Ovid- ja Scopus-tietokannoissa sekä Tampereen korkeakoulu yhteisön kirjaston hakupalvelu Andorissa, mutta haut eivät tuottaneet yhtään suomenkielistä hakutulosta. Varsinaiset aineistohaut tehtiin Ovid- ja Scopus-tietokantoihin 22.4.2021.

TAULUKKO 1. Hakulausekkeet ja rajaukset

Tietokanta	Hakulauseke	Rajaukset
Ovid	("sars-cov-2" or "covid-19") and pcr and swab and sensitivity and specificity and (compar* or evaluat*)	Aikaikkuna: 2020-2021
Scopus	sars-cov-2" OR "covid-19" AND *pcr AND swab AND sensitivity AND specificity AND (compar* OR evaluat*)	Aikaikkuna: 2020-2021 Julkaisun taso: vain julkaistut tutkimusartikkelit tai -raportit.

Kirjallisuuskatsaukseen sisällytettävälle alkuperäistutkimuksille tulee määrittää ennen valittavien tutkimusten valintaa tarkat, kirjallisuuskatsauksen tutkimuskysymyksiin perustuvat sisäänottokriteerit (Stolt & Routasalo 2007, 59). Taulukossa 2 esitellään kriteerit, joiden perusteella valitsimme kirjallisuuskatsauksemme hyväksyttävät tutkimukset.

TAULUKKO 2: Aineistolle asetetut kriteerit

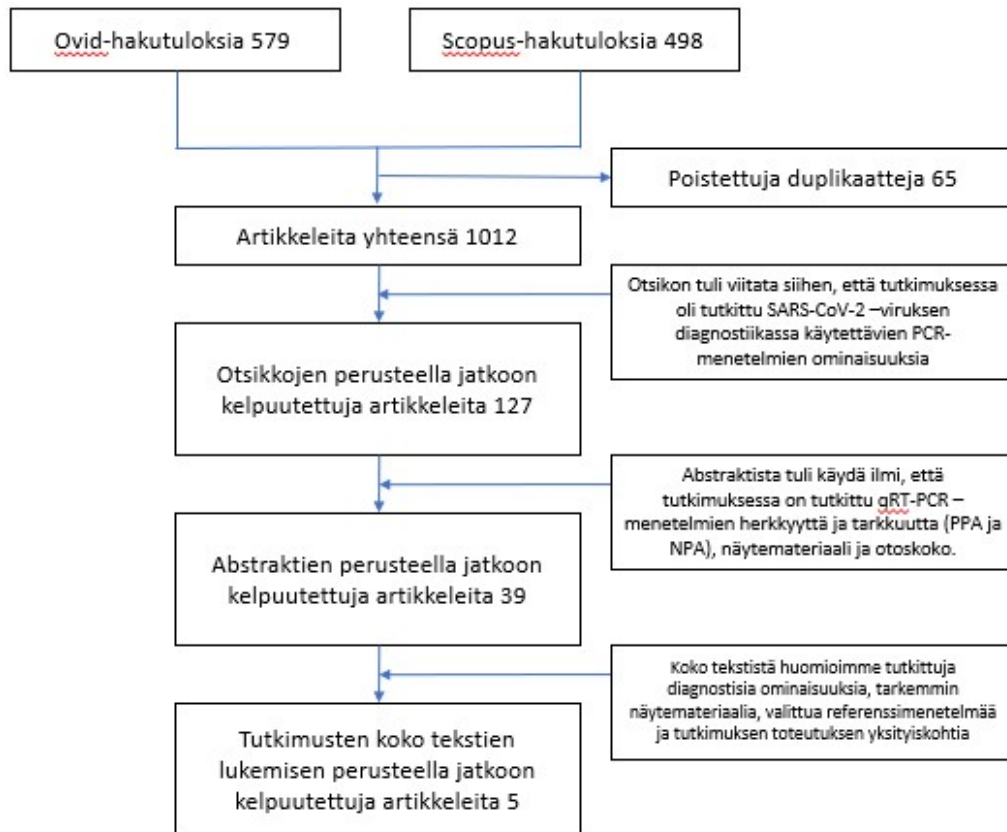
Kriteeri	Hyväksymisperuste
Tutkittava ominaisuus	Diagnostiset ominaisuudet, vähintään herkkyys ja tarkkuus
Näyttemateriaali	Vähintään osa näytteistä otettu nenänielusta
Referenssimenetelmä	Jokin valittu kultainen standardi tai laskennallinen referenssimenetelmä
Tutkittava kohde	Kokonainen menetelmä, ei esimerkiksi kitistä irrallaan oleva yksittäinen sekvenssi
Tutkimusjoukko	Näytteiden menetelmäkohtainen n oltava vähintään 50
Menetelmän testaus	Analyysi on tehtävä valmistajan ohjeiden mukaisesti
Menetelmän kehittäjä	Joko pelkästään kaupallisia menetelmiä, tai sekä kaupallisia että in house -menetelmiä
Yhdistettävyyys	Tulosten tulee olla selkeästi yhdistettävissä tutkittuun menetelmään

Tietokannoista tehtävien hakujen tulokset käsiteltiin Mendeley desktop -ohjelmalla. Ohjelmalla tehtiin duplikaattien poisto automaattisesti ja käsin. Duplikaattien poiston jälkeen luimme tutkimusten otsikot ja otsikkojen perusteella hylkäsimme työhöme kuulumattomat tutkimukset. Tämän jälkeen luimme jäljelle jääneiden tutkimusten abstraktit, joiden perusteella valitsimme tutkimukset koko tekstin lukuun. Viimeisenä luimme jäljelle jätetyt tutkimukset kokonaan, minkä perusteella valitsimme aineistohakumme tulokset ja meta-analyysiin valittavat tutkimukset.

5.2 Tutkimusten valinta

Aineistohaut Ovid-tietokantaan tuotti 579 hakutulosta ja Scopus-tietokantaan 498 tulosta, yhteensä 1077 tulosta. Tulokset tulostettiin Scopusista samalle tiedostolle .bib-tiedostomuodossa. Ovidista tulokset tulostettiin 6 .ris-tiedostona, joissa kussakin oli enintään 100 tulosta. Hakutulokset siirrettiin Mendeley-desktop -ohjelmaan, joka teki tiedostojen aukaisuvaiheessa automaattisen duplikaattien poiston. Teimme lisäksi duplikaattien poiston käsin. Duplikaattien poiston jälkeen tuloksia oli jäljellä 1012 kappaletta. Otsikkoperusteinen karsinta jätti jäljelle noin

kymmenesosan tutkimuksista, 127 kappaletta. Abstraktien lukemisen jälkeen tuloksia oli jäljellä 39 ja koko tekstien lukemisen perusteella systemaattisen kirjallisuuskatsaukseen valikoitui 5 tutkimusta. Teimme manuaalisen haun abstraktien perusteella valittujen artikkeleiden lähdeaineistoihin, mikä ei tuottanut työhömme lisää tuloksia. Systemaattisen kirjallisuuskatsauksen kulku ja hakutulosten karsinta on kuvattu kuviossa 6. Hakumme eivät tuottaneet yhtäkään kriteereihin sopivaa suomenkielistä tutkimusta.



KUVIO 6. Hakutulosten karsinta

Syitä tutkimusten pois jättämiselle aineistohaussamme oli useita. Abstraktien perusteella kelpuutimme jatkoon 39 artikkelia, joista luimme koko tekstit ja arvioimme yhdessä jokaisen tutkimuksen sisältöä ja käyttökelpoisuutta työsämme. Koko tekstin luennassa yleisin syy pois jättämiselle oli vertailukelvottomana pitämämme referenssimenetelmän käyttäminen: referenssimenetelmää ei ollut ollenkaan, referenssimenetelmä oli jaoteltu kohdegeneittain osiin tai referenssinä oli laskennallinen tulos, jonka laskentakaava poikkesi huomattavasti yhdistetyn vertailustandardin laskentatavasta. Toiseksi yleisin hylkäämisperuste oli valittu näytemateriaali: näytteitä ei ollut otettu analysoitavaksi ollenkaan nenänie-

lusta, tai näytemateriaali oli epäselvä. Joissain tutkimuksissa näytteiden kerääminen oli tehty tarkasti määritellystä potilasjoukosta, minkä johdosta näytteiden viruskuorma oli poikkeavan korkea. Yhdessä tutkimuksessa oli tutkittu pelkkiä menetelmien herkkyksiä, joten siitä saatava tieto olisi ollut vaillinaista. Hylkäsimme myös tutkimuksen, jossa menetelmät olivat anonymisoituja, eli saatuja tutkimustuloksia ei pystynyt jäljittämään tutkittuihin menetelmiin.

5.3 Meta-analyysi

Meta-analyysiä varten taulukoimme alkuperäistutkimuksissa tutkittujen menetelmien herkkyudet, tarkkuudet ja 95 % luottamusvälit ja koostimme tuloksista forest plot -kaavion, joka on esitetty työn tulososiossa (kuvio 7). Laskimme yhteen menetelmillä tutkittujen näytteiden määrät, todellisten positiivisten ja todellisten negatiivisten määrät, väärin positiivisten ja väärin negatiivisten määrät sekä keskiarvot menetelmien saamille herkkyyksille.

6 TULOKSET

6.1 Tutkimusten piirteet

Valtaosassa tutkimuksista oli analysoitu nenänielusta otettuja näytteitä, mutta näytteitä oli otettu myös nenästä ja nielusta. Nenänäytteiden osuus kaikista tutkituista näytteistä oli 21 %, nielunäytteiden tarkkaa määrää ei ollut kerrottu, mutta se oli enintään 15 % kaikista näytteistä. Tutkimuksiin oli kerätty näytteet yhteensä 694 potilaalta, joista potilastiedot olivat saatavilla 663 tapauksessa. Näytteistä 391 oli positiivisia ja 303 negatiivisia. 640 potilaalta näyte oli otettu hengitystieoireiden vuoksi (92,2 %), loput olivat joko oireettomia tai heidän potilastietojaan ei ollut käytettävissä. Valtaosa näytteistä (70,6 %) oli kerätty potilailta COVID-19-rutiinidiagnostiikan yhteydessä. Näytteistä 18,3 % oli otettu ensiavun potilailta, teho-osaston potilailta 0,7 % ja muilta vuodeosastopotilailta 4,5 %. Procop ym. (2021) oli ilmoittanut keskimääräisen ajan, mikä oli kestänyt oireiden alkamisesta näytteenottoon, mutta hajonta oli ollut suurta.

Kolmessa tutkimuksessa viidestä referenssimenetelmänä käytettiin tutkittavien menetelmien CRS-tulosta, jossa näytettä pidettiin positiivisena, kun tietty määrä tutkittavista menetelmistä antoi näytteelle positiivisen tuloksen. Procop ym. (2021) määritteli konsensukseksi kahden menetelmän tuloksen viidestä, eli näyte laskettiin referenssipositiiviseksi, kun kahden tai useamman menetelmän tulos oli positiivinen. Zhen ym. (2020) valitsi määräksi kolme positiivista tulosta neljästä ja Lephart ym. (2021) kaksi positiivista tulosta neljästä. Jokela ym. (2020) käytti referenssimenetelmänä kolmea eri rutiinikäytössä olevaa PCR-menetelmää ja Freire-Paspuel ym. (2021) valitsi referenssimenetelmäksi Yhdysvaltain tautikeskus CDC:n 2019-nCoV-menetelmän. Tutkimukset, niiden kirjoittajat sekä tutkimusten yleispiirteet esitetään taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Kirjallisuuskatsaukseen valitut artikkelit ja niiden yleispiirteet

Tutkimuksen kirjoittajat ja nimi	Näytteiden lkm.	Positiivisten lkm.	Negatiivisten lkm.	Näytteenänielusta	Näytteenästä	Näytteeniästä	Referenssimenetelmä
Procop, G., Brock, J., Reineks, E., Shrestha, N., Demkowicz, R., Cook, E., Ababneh, E. & Harrington, S. A Comparison of Five SARS-CoV-2 Molecular Assays With Clinical correlations	239	168	71	93	146	0	CRS
Freire-Paspuel, B., Vega-Mariño, P., Velez, A., Cruz, M., Peres, F. & Garcia-Bereguain, M. Analytical and clinical comparison of Viasure (CerTest Biotec) and 2019-nCoV CDC (IDT) RT-qPCR kits for SARS-CoV-2 diagnosis.	156	86	70	156	0	0	CDC
Jokela, P., Jääskeläinen, A., Jarva, H., Holma, T., Ahava, M., Mannonen, L., Lappalainen, M., Kurkela, S. & Loginov, R. SARS-CoV-2 sample-to-answer nucleic acid testing in a tertiary care emergency department: evaluation and utility	107	61	46	?	0	?	3 verrokkimenetelmää
Zhen, W., Manji, R., Smith, E. & Berry, G. Comparison of Four Molecular <i>In Vitro</i> Diagnostic Assays for the Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Specimens	104	51	53	104	0	0	CRS
Lephart, P., Bachman, M., LeBar, W., McClellan, S., Barron, K., Schroeder, L. & Newton, D. Comparative study of four SARS-CoV-2 Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) platforms demonstrates that ID NOW performance is impaired substantially by patient and specimen type	88	25	63	88	0	0	CRS

Tutkimuksissa tehtiin yhteensä 1951 analyysiä 14 erillisellä menetelmällä, yhteensä tutkittiin 10 eri menetelmää. Yhdysvaltain tautikeskus CDC:n 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel -menetelmää tutkittiin yhdessä tutkimuksessa alkuperäisessä muodossaan, jossa etsitään kolmea eri lokusta viruksen nukleokapsidia koodaavassa geenissä (Procop ym. 2021). Zhen ym. (2020) muokkasivat CDC:n menetelmää jättämällä siitä yhden nukleokapsidia kohtaan käytettävän aluke- ja koetinsetin pois. Cepheid-yhtiön Xpert Xpress SARS-CoV-2-menetelmää tutkittiin kolmessa tutkimuksessa, kuten myös DiaSorin Molecular -yhtiön Simplexa COVID-19 Direct Kit -menetelmää (Jokela ym. 2020; Zhen ym. 2020; Lephart ym. 2021; Procop ym. 2021). Muut menetelmät esiintyivät tutkimuksissa vain kerran. Esittelemme menetelmien koko nimet ja valmistajat sekä tutkimuksista käyttämämme lyhenteet taulukossa 6 (Liite 1.).

Menetelmäkohtainen tutkittavien näytteiden määrä vaihteli välillä 86–239. Yhteensä oikeita positiivisia tuloksia saatiin 1077, vääriä positiivisia 15, oikeita negatiivisia 805 ja vääriä negatiivisia 51. Lephart ym. (2021) tutkimuksessa hylättiin

kolme tulosta. Oikeiden positiivisten ja negatiivisten sekä väärien positiivisten ja negatiivisten perusteella laskettu herkkyiden keskiarvo oli siten 95,48 % ja tarkkuuden 98,17 %. Systemaattisen kirjallisuuskatsauksen tulokset on kuvattu taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Systemaattisen kirjallisuuskatsauksen tulokset

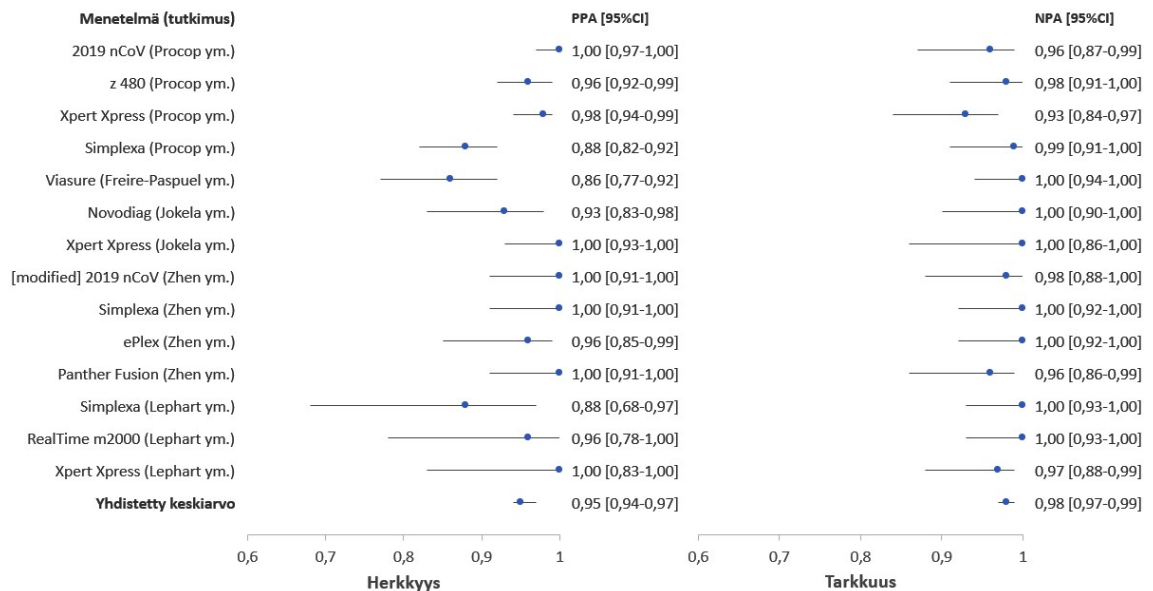
Menetelmä	Potilaiden lkm.	Kohdegeeni	TP	FP	TN	FN	Herkkyys (PPA)	Tarkkuus (NPA)
2019 nCoV (Procop ym.)	234	<i>N1, N2 & N3</i>	165	3	66	0	1,00	0,96
z 480 (Procop ym.)	208	<i>E & RdRP</i>	137	1	65	5	0,96	0,98
Xpert Xpress (Procop ym.)	238	<i>E & N2</i>	163	5	66	4	0,98	0,93
Simplexa (Procop ym.)	239	<i>S & ORF1ab</i>	148	1	70	20	0,88	0,99
Viasure (Freire-Paspuel ym.)	156	<i>N & ORF1ab</i>	74	0	70	12	0,86	1,00
Novodiag (Jokela ym.)	106	<i>N & ORF1ab</i>	57	0	45	4	0,93	1,00
Xpert Xpress (Jokela ym.)	90	<i>E & N2</i>	60	0	30	0	1,00	1,00
[Modified] 2019 nCoV (Zhen ym.)	104	<i>N1 & N2</i>	51	1	52	0	1,00	0,98
Simplexa (Zhen ym.)	104	<i>S & ORF1ab</i>	51	0	53	0	1,00	1,00
ePlex (Zhen ym.)	104	<i>N</i>	49	0	53	2	0,96	1,00
Panther Fusion (Zhen ym.)	104	<i>ORF1ab</i>	51	2	51	0	1,00	0,96
Simplexa (Lephart ym.)	88	<i>S & ORF1ab</i>	22	0	63	3	0,88	1,00
RealTime m2000 (Lephart ym.)	86	<i>N & RdRP</i>	24	0	61	1	0,96	1,00
Xpert Xpress (Lephart ym.)	87	<i>E & N2</i>	25	2	60	0	1,00	0,97

Kahdeksan eri koetin-aluke-paria kuudessa eri menetelmässä käytti koettimia ja alukkeita *N*-geenin eri lokuksien monistamiseen ja tunnistamiseen. Koettimia ja alukkeita *ORF1ab*-geeniä kohtaan käytettiin neljässä eri menetelmässä, *E*- ja *RdRP*-geenejä kohtaan kahdessa menetelmässä ja *S*-geeniä kohtaan yhdessä menetelmässä.

6.2 Tulosten analysointi

Menetelmille saadut todellisten ja väärien positiivisten sekä todellisten ja väärien negatiivisten arvot sekä herkkyiden ja tarkkuuden tai PPA- ja NPA-lukuarvot kerättiin käsin Excel-tilukkaan. Kolmessa tutkimuksessa oli laskettu menetelmien herkkyksien ja tarkkuuksien 95 % luottamusvälit. Painotukset niiden laskentataivoissa poikkesivat toisistaan, ja koska kahdessa tutkimuksessa luottamusvälejä ei ollut ilmoitettu ollenkaan, päädyimme yhdenmukaisuuden vuoksi laskemaan luottamusvälit jokaiselle tutkimuksessa tarkastellulle menetelmälle samalla, www.sarstats.net-sivustolta löytyvällä automaattisella laskimella TP-, TN-, FP- ja FN-

arvoja käyttämällä (Lowry 2021). Vertailimme tutkimuksissa annettuja luottamusvälien arvoja itse laskemiimme ja huomasimme eroja luvuissa. Erot ovat pieniä, mutta on silti huomioitava, että toteutustapamme vuoksi tuloksiin sisältyy virheen mahdollisuus. Tutkimusten menetelmille saadut PPA- ja NPA-arvot sekä niiden 95 % luottamusvälit on esitetty forest plot -kaaviossa 1.



KUVIO 7. Tutkimusten PPA- ja NPA-arvot sekä 95 % luottamusvälit

Kahden menetelmän (Xpert Xpress ja Simplexa) osalta kolmessa eri tutkimuksessa herkkyiden vaihteluväli on 0,12 ja tarkkuuden vaihteluväli 0,07. Suurin vaihteluväli yhden tutkimuksen sisällä on 0,12 herkkydessä ja 0,06 tarkkuudessa. Kaikkien menetelmien eri tutkimuksissa saatujen arvojen vaihteluväli herkkydessä on 0,14 ja tarkkuudessa 0,07. Toisin sanoen, saman menetelmän eri tutkimuksissa saatujen tulosten, samassa tutkimuksessa eri menetelmien saatujen tulosten ja kaikkien tutkimusten eri menetelmien tulosten vaihteluvälit ovat lähes samaa luokkaa. (Jokela ym. 2020; Zhen ym. 2020; Lephart ym. 2021; Procop ym. 2021.)

Tutkimuksista ilmeni useita qRT-PCR-menetelmistä mitattuihin arvoihin vaikuttavia seikkoja. Eri menetelmät käyttävät ohjeiden mukaan suoritettuina eri tilavuuden näyttemateriaalia, mikä voi vaikuttaa menetelmästä mitattuun herkkyteen (Zhen ym. 2020; Procop ym. 2021). Useassa tutkimuksessa todettiin, että tutkitujen näytteiden viruskonsentraatioon vaikuttaa se, minkälaisista potilasryhmistä

näytteet ovat peräisin. Matalan konsentraation näytteet tuottavat todennäköisemmin vääriä negatiivisia tuloksia (Zhen ym. 2020). Selkeä esimerkki tällaisesta tilanteesta nähtiin, kun näytteet kerättiin sekä potilailta, joiden tautidiagnoosista on kulunut pitkä aika ja jotka ovat jo paranemisvaiheessa, että taudin vuoksi tehosastolla olevilta potilailta (Lephart ym. 2021). Procop ym. (2021) totesivat, että jos menetelmä ei sisällä erillistä nukleinihappojen eristysvaihetta, se tuottaa todennäköisemmin vääriä negatiivisia tuloksia. Näytemäärien vähäisyyden nähtiin olevan keskeinen rajoite tutkimuksen tulosten yleistettävyydessä kahdessa tutkimuksessa (Feirie-Paspuel ym. 2021; Lephart ym. 2021).

Procopin ym. (2021) tutkimuksessa käytetyn näytemateriaalin nähtiin korreloivan menetelmän herkkyuden kanssa. Tutkimuksessa näytemateriaalina käytettiin sekä nenänielu-, että nenänäytteitä. Materiaalin vaikutus nähtiin selkeästi Diasorin Molecularin Simplexa-menetelmällä, jolla 20 % nenänäytteistä sai väärän negatiivisen testituloksen. Nenänielunäytteistä menetelmä tunnisti oikein positiiviseksi noin 95 % ja kokonaisherkyys oli 88,1 %. Toinen korrelaatio väärin negatiivisten määrään liittyi taudin vaiheeseen, jossa potilaat olivat näytteenottohetkellä olleet: pidentynyt aika oireiden alkamisesta näytteenottoon lisäsi väärän negatiivisen tuloksen todennäköisyyttä. Molempien muuttujien todettiin vaikuttavan näytteen viruskuormaan laskevasti. Tutkimuksessa havaittiin matalan viruskuorman negatiivinen vaikutus menetelmien herkkyyteen muillakin tutkituilla menetelmillä, mutta selkein vaikutus havaittiin Simplexalla. Näin ollen sen pääteltiin tunnistavan viruksen muita menetelmiä heikommin matalan viruskonsentraation näytteistä. (Procop ym. 2021.)

Lephart ym. (2021) olivat saaneet Simplexan herkkyudeksi Procopin ym. (2021) tutkimusta vastaavan tuloksen, 88 %. Heidän tutkimuksessaan oli käytetty pelkkiä nenänielunäytteitä, jotka oli analysoitu ensimmäisenä Simplexalla. Osassa näytteistä voidaan olettaa olleen vähäiset määrät virusmateriaalia, sillä 15 % potilaista oli toipuvia COVID-19-potilaita, loput näytteistä oli otettu ensiavun potilailta. (Lephart ym. 2021.) Zhen ym. (2020) saivat Simplexalle kahdesta edellisestä poikkeavan herkkyuden, ei yhtään väärää negatiivista tulosta, mikä oli risiiritaista, sillä tässäkin tutkimuksessa ilmoitettiin käytetyn myös matalan viruskuorman näytteitä. (Zhen ym. 2020.)

Menetelmien havaitsemisrajat (limit of detection, LoD) oli tutkittu neljässä tutkimuksessa (taulukko 5). Zhen ym. (2020) testasivat havaitsemisrajat käyttämällä Exact Diagnostics -yhtiön synteettistä SARS-CoV-2-viruksen RNA:ta. Simplexa sai testatuista menetelmistä parhaimman tuloksen, 50 kopiota/ml. Tutkimuksessa menetelmien havaitsemisrajat testattiin laimennussarjoilla, joissa oli käytetty valmiiksi eristettyä näytettä. Kuitenkin Simplexan menetelmäohjeen mukaan eristystä ei tehdä ja potilasnäytteet olivatkin analysoitu ilman RNA:n eristämistä. (Zhen ym. 2020.)

Zhen ym. (2020) kertovat lisäksi havainneensa kliinisen korrelaation havaitsemisrajan ja herkkyuden välillä. Korrelaatiota perusteltiin sillä, että parhaan havaitsemisrajan saanut menetelmä (Simplexa) sai PPA arvoksi 1,0 ja huonoimman havaitsemisrajan saanut menetelmä (1000 kopiota/ml, ePlex) sai PPA arvoksi 0,96. (Zhen ym. 2020.) Pidämme päätelmää kyseenalaisena, sillä myös modifioitu 2019 nCoV sai saman 1000 kopiota/ml havaitsemisrajan mutta siitä huolimatta sai PPA arvoksi 1,0. Pidämme perusteita korrelaation toteutukseksi riittämättöminä.

TAULUKKO 5. Menetelmien havaitsemisrajat

Menetelmä	Testimateriaali	LoD, kopiota/ml	LoD, valmistajan ilmoittama	Herkkyys (PPA)
2019 nCoV (Procop ym.)	kaupallinen, määrittämätön	20 000	?	1,00
z 480 (Procop ym.)	Exact Diagnostics; SeraCare	20 000	?	0,96
Xpert Xpress (Procop ym.)	-	-	-	0,98
Simplexa (Procop ym.)	-	-	-	0,88
Viasure (Freire-Paspuel ym.)	Viasure kit	2000	?	0,86
Novodiag (Jokela ym.)	TCID50	250	313	0,93
Xpert Xpress (Jokela ym.)	TCID50	300	250	1,00
[Modified] 2019 nCoV (Zhen ym.)	Exact Diagnostics	1000	?	1,00
Simplexa (Zhen ym.)	Exact Diagnostics	50	?	1,00
ePlex (Zhen ym.)	Exact Diagnostics	1000	?	0,96
Panther Fusion (Zhen ym.)	Exact Diagnostics	100	?	1,00
Simplexa (Lephart ym.)	ZeptoMetrix	521	242	0,88
RealTime m2000 (Lephart ym.)	ZeptoMetrix	32,5	100	0,96
Xpert Xpress (Lephart ym.)	ZeptoMetrix	65	250	1,00

2019 nCoV-, Xpert Xpress- ja Simplexa-menetelmille mitatuissa havaitsemisarjoissa oli merkittäviä eroja eri tutkimusten välillä. Huomattavin tämä ero oli 2019

nCoV -menetelmän kohdalla, jossa kahden tutkimuksen välinen ero oli 20-kertainen. Syynä eriävyyksiin saattaa olla vaihtelu havaitsemisrajojen mittausten menetelmissä. Lephart ym. (2021) saivat tutkimuksessaan Simplexan havaitsemisrajaksi 521 kopiota/ml ja herkkyudeksi 88 %, mutta muissa tutkimuksissa huomattavastikin huonomman havaitsemisrajan saaneille menetelmille oli mitattu merkittävästi paremmat herkkyydet. Näistä syistä korrelaation toteaminen havaitsemisrajan ja herkkyyden välillä ei mielestämme ole aina perusteltua.

Lephart ym. (2021) tutki qRT-PCR-menetelmien lisäksi isotermaaliseen nukleinihappojen monistukseen perustuvan ID NOW -menetelmän suorituskykyä käyttämällä nenästä otettuja näytteitä, menetelmä sai tutkimuksessa vain 48 % PPA-arvon. Muut heidän tutkimansa menetelmät olivat qRT-PCR-menetelmiä, joilla tutkittiin nenänielunäytteitä ja PPA-arvot olivat välillä 88–100 %. (Lephart ym. 2021.) Toisessa tutkimuksessa ID NOW -menetelmän suorituskykyä oli tutkittu käyttämällä näyttemateriaalina nenästä otettujen näytteiden lisäksi nenänielunäytteitä, ja tässä tutkimuksessa mitattu herkkyys oli huomattavasti parempi, 83 %. Myös tässä tutkimuksessa nenästä otettujen näytteiden todettiin kuitenkin tuottavan todennäköisemmin vääriä negatiivisia tuloksia. (Procop ym. 2021.) Kummassakin edellä mainitussa tutkimuksessa ID NOW -menetelmä oli osana yhdistetyn vertailustandardin luomisessa, mikä tulee ottaa huomioon tuloksia tulkitessa. Koska ID NOW ei ole qRT-PCR-menetelmä, emme sisällyttäneet sitä meta-analyysiimme.

Kaikkiaan on nähtävissä, että työssämme käsitellyt qRT-PCR-menetelmät ovat herkkyydeltään ja tarkkuudeltaan luotettavia menetelmiä, erityisesti tarkkuuden osalta. Herkkyyksissä on enemmän variaatiota, mutta näyttemateriaalin osuus tähän lienee melko merkittävä. Valtaosa näytteistä oli otettu COVID-19-taudin rutiinidiagnostiikkaa varten, mikä todennäköisesti selitti osittain suurehkoa viruskuorman vaihtelua näytteissä. Lievää tautia sairastavilta tai taudista toipuvilta potilailta kerätyt näytteet sisälsivät todennäköisesti vähemmän virusta, jolloin osan menetelmistä todettiin saavan todennäköisemmin vääriä negatiivisia tuloksia. Muita hajontaa luovia tekijöitä ovat näytteenottoaika, käytetty kuljetusliuos, näytteen pakastaminen ja muu käsittely sekä nukleinihapon eristysvaiheen puuttuminen.

6.3 Aineiston laadun arviointi

Käytimme Bristolin yliopiston verkkosivuilta löytyvää QUADAS-2-työkalua aineistomme laadun arviointiin. Työkalua käytetään Microsoft Access -ohjelmalla syöttämällä siihen käsin arviot aineiston luotettavuuteen liittyvistä seikoista. QUADAS-2-työkalu koostuu neljästä alkuperäistutkimusten laatua eri kriteerein arvioivasta osiosta: potilaiden tai näytteiden valinta, testien suorittaminen, käytetyt referenssimenetelmät ja testien kulkuun ja ajoitukseen liittyvät kysymykset (Whiting ym. 2011). Kolmen ensin mainitun kohdalla arvioitiin lisäksi erikseen harhan riskiä ja sitä, kuinka hyvin tutkimuksessa vastattiin tutkimuskysymykseen, eli miten sovellettavissa olevana tutkimusta voidaan pitää.

Pidimme käsittelemiemme tutkimusten laatua pääosin hyvänä ja riskejä laatuun vaikuttaviin seikkoihin matalana. Näytteiden valintaan liittyi epäselväksi arvioimamme riski kolmen tutkimuksen kohdalla sen osalta, kuinka hyvin näytevalinta vaikutti tutkimuskysymykseen vastaamiseen. Näytteiden valinnassa oli myös harhan riski kahden tutkimuksen osalta. Näytteen kulkuun ja ajoitukseen liittyi harhan riski yhdessä tutkimuksessa. Freirie-Paspuel ym. (2021) ja Zhen ym. (2020) tutkimusten kohdalla pidimme jokaisen arviointikriteeristön osion kohdalla riskejä matalana, muissa tutkimuksissa oli vähintään yksi osio, jossa pidimme riskejä epäselvinä. Emme pitäneet riskejä laatuun vaikuttavista seikoista korkeana yhdenkään tutkimuksen kohdalla. QUADAS-2-työkalun tulokset on esitetty taulukkomuodossa liiteosiossa, taulukossa 7.

7 POHDINTA

Aineistohaun suunnitteluvaiheessa tiesimme haluavamme etsiä numeerista dataa eri menetelmien suorituskyvyistä. Pidimme keskeisinä menetelmien herkkyyden ja tarkkuuden arvoja, sillä niiden kautta saadaan hyvä kuva menetelmän soveltuvuudesta COVID-19-taudin diagnosointiin ja seulontaan. Aineistohaun edettyä loppuvaiheeseen tutustuimme meille uusiin termeihin ”positive percent agreement” (PPA) ja ”negative percent agreement” (NPA), jotka ovat synonyymejä herkkyydelle ja tarkkuudelle tilanteessa, missä menetelmää ei voida verrata kultaiseen standardiin. Ymmärsimme, että aineistohakumme oli puutteellinen, sillä emme olleet käyttäneet kyseisiä hakutermejä OR-säännön kanssa herkkyyden ja tarkkuuden kohdalla. Kokeilimme uutta hakua käyttämiimme tietokantoihin sekä sisällyttämällä PPA- ja NPA-termit hakulausekkeisiin, että ilman niitä. PPA- ja NPA-termien sisällyttäminen tuotti muutaman prosentin lisäyksen tulosten määrässä, kuin haut ilman niitä. Olimme kuitenkin tuossa vaiheessa tehneet jo usean päivän ajan aineistohakua ja -käsittelyä, emmekä aikarajoitteiden vuoksi voineet enää aloittaa aineistohakuprosessia alusta. Koska hakutuloksista vain murtoosa täytti valintakriteerimme tullakseen sisällytetyksi työhömmе, arvioimme tämän puutteen vaikutuksen vähäiseksi, mutta tiedostamme sen vaikuttavan tuloksiin.

Pidämme lähtökohtaisesti ongelmallisena sitä, että yhdistetty vertailustandardi muodostetaan konsensuksena menetelmistä, joista osa on epäherkkiä, tai joilla on tutkittu toissijaisesta paikasta otettuja näytteitä. Tällöin kasvaa todennäköisyys sille, että referenssimenetelmä antaa todellisuudessa positiivisesta näytteestä negatiivisen tuloksen. Työssämme tämä koskee etenkin Lephart ym. (2021) ja Procop ym. (2021) tutkimuksia, joissa yhtenä tutkituista menetelmistä oli ID NOW -vierianalysointilaitte, joka ei ole qRT-PCR-menetelmä, ja osa näytteistä oli otettu nenästä. Emme myöskään sisällyttäneet kyseistä menetelmää meta-analyysiimme.

Kirjallisuuskatsauksen aineistohakumme tuotti verrattain vähän tuloksia, viisi tutkimusta. Tehdessämme aineistohaun abstraktien lukemisen vaiheen jälkeen koko tekstien lukua jouduimme pohtimaan rajauksia lopulliseen meta-analyysiin

pääsyn kriteereiksi ja totesimme, että tulosten vertailtavuus edellyttää tiukkojen kriteerien luomista. Tästäkin huolimatta meta-analyysiin sisällyttämämme tutkimusten välillä on oleellisia eroja esimerkiksi potilasvalintojen osalta. Tiukan kriteeristön hyvänä puolena pidämme sitä, että sen läpäisevät tutkimukset ovat lähtökohtaisesti luotettavia. Meta-analyysimme käsitti lopulta 14 itsenäisesti tutkitun menetelmän vertailun ja tätä määrää pidämme hyvänä. Voimme myös olettaa, että vähintään osa meta-analyysimme menetelmistä on valikoitunut alkuperäis-tutkimuksiin sen vuoksi, että ne ovat laajalti käytössä, mikä voi lisätä tulosten hyödynnettävyyttä.

Tämän työn toteuttaminen keskellä COVID-19-pandemiaa oli monella tapaa haastavaa. Aiheen saamisen aikaan, alkukeväällä 2020, emme voineet tietää, kuinka suuret vaikutukset viruksella on elämiimme ja minkälaisessa roolissa PCR-diagnostiikka tulee olemaan taudin torjunnassa. Aiheen valinnasta alkaen elimme useaan otteeseen epätietoisuudessa siitä, mihin suuntaan työemme etenee ja päädyimme vaihtamaan tutkimuksemme suuntaa useaan otteeseen. Aloimme kiinnostua mahdollisuudesta tehdä vertailua eri menetelmien suorituskykyjen välillä ja pian menetelmäksemme valikoitui systemaattinen kirjallisuuskatsaus. Teimme muutamia testihakuja ja totesimme keväällä 2021, että löytäisimme todennäköisesti riittävästi materiaalia kattavan vertailun tekemiseksi. Emme tuolloin kuitenkaan tieneet, kuinka työlääksi menetelmäksi meta-analyysin käyttäminen osoittautuu, ja jouduimme opettelemaan sen suorittamisen lähes alusta pitäen itsenäisesti. Emme kyenneet pysymään opinnäytetyön tekemiselle alun perin annetussa aika-tilassa.

7.1 Meta-analyysin tulosten pohdinta

Huonoin herkkyys kaikista menetelmistä eri tutkimuksissa oli mitattu Viasure -menetelmälle. Tutkimuksessa oli käytetty pelkästään CDC:n 2019 nCoV -menetelmää kultastandardina. Vaikka tutkimuksissa CDC:n menetelmällä saadut tulokset olivat hyviä, pidämme yksistään sen käyttämistä kultaisen standardin referenssinä ongelmallisena. Viidessä näytteessä oli saatu positiivinen tulos N-kohdesekvenssille, mutta Orf1ab-kohdesekvenssi oli antanut negatiivisen tuloksen. Menetelmäohjeen mukaisesti tällainen tulos tulkitaan negatiiviseksi mutta Freire-

Paspuel ym. (2021) pohtivat, että mikäli tulos luettaisiin ”oletettavasti positiiviseksi” olisi herkkyys 92 %. Tällöin Viasuren tulos olisi lähempänä muiden menetelmien herkkyyden tuloksia. Menetelmän korkeahkoa LoD:ia (2000 kopiota/ml) ei voida pitää syynä verrattain huonoon herkkyyteen, sillä juuri N antoi positiivisen tuloksen ja Orf1ab jäi negatiiviseksi, vaikka sen LoD oli parempi (1000 kopiota/ml) kuin N:n (2000 kopiota/ml). Emme löytäneet tutkimuksesta mitään selkeää selittävää syytä väärin negatiivisten määrälle.

Tutkimusten heikoin tarkkuus, 93 %, oli saatu Procopin ym. (2021) tutkimuksessa Xpert Xpress -menetelmälle. Tutkimuksessa Xpert Xpress -menetelmän tuloksia ei ollut tulkittu menetelmävalmistajan ohjeiden mukaan. Menetelmä käyttää kahta koetin-aluekeparia, N2- ja E-geenejä kohtaan, ja valmistajan ohjeen mukaan näyte tulee tulkita positiiviseksi vain kummankin kohteen monistuessa yli kynnysarvon, ja vain yhden kohdesekvenssin monistuessa ”oletetuksi positiiviseksi”. Tutkimuksessa myös sellaiset tulokset tulkittiin positiivisiksi, joissa E-kohdesekvenssi oli monistunut ja N2-kohdesekvenssi ei ollut. Xpert Xpress sai tutkimuksessa 5 väärää positiivista tulosta ja pidämme mahdollisena, että tähän on voinut vaikuttaa valittu tulkintatapa. Tutkimuksessa ei kuitenkaan kerrottu montako ”oletettua positiivista” tulosta Xpert Xpress oli saanut, minkä vuoksi emme voi tehdä suoraa johtopäätöstä niiden vaikutuksesta menetelmälle mitattuun tarkkuuteen. Tutkimuksessa oli kohdeltu kahta muuta menetelmää eri tavalla: CDC:n 2019 nCoV -menetelmä oli saanut 5 epävarmaa tulosta, kun vain kaksi kolmesta kohdesekvenssistä oli monistunut, ja nämä tulokset oli hylätty tutkimuksesta kokonaan. z 480 -menetelmän kohdalla jopa 31 vastaavaa tulosta oli hylätty. Näiden menetelmien epävarmojen tulosten sisällyttäminen tutkimukseen olisi vaikuttanut menetelmille mitattuihin tarkkuuksiin. (Procop ym. 2021.)

7.2 Opinnäytetyön eettisyys ja luotettavuus

Opinnäytetyössä on noudatettu hyvää tieteellistä käytäntöä. Pyrimme systemaattista kirjallisuuskatsausta ja meta-analyysiä tehdessämme mahdollisimman läpinäkyvään toteutukseen, emmekä jättäneet keskeisiä havaintoja kirjaamatta. Mainitsimme käytetyt lähteet ja lähdeviitteet asianmukaisesti. Työhön ei kuulunut erillistä rahoitusta eikä työn tekijöillä ole mainittavia sidonnaisuuksia.

Pyrimme keräämään meta-analyysiin tutkimuksia, joissa analysoitujen näytteiden määrät olisivat mahdollisimman korkeita, olettaen tämän parantavan tutkimuksen tarkkuutta. Aineistohakua tehdessämme huomasimme kuitenkin, että useissa tutkimuksissa oli analysoitu hyvin suppea määrä näytteitä, minkä vuoksi meta-analyysimme ulkopuolelle rajautui useita muuten käyttökelpoisia tutkimuksia. Diagnostisten testien ominaisuuksien tutkimisessa tarvittavaa näytemäärää on pyritty arvioimaan eri laskentatavoilla ja yleispätevänä lukuna pidetään 300:aa tutkittavaa, mutta tarkan lukumäärän arvioiminen on vaikeaa ja siihen vaikuttaa esimerkiksi taudin prevalenssi ja tuloksen merkitys, eli tehdäänkö taudin seulontaa vai haetaanko tarkkoja diagnooseja (Bujang & Adnan 2016). Rajasimme aineistohaun tutkimusten tutkimusjoukon koon vähintään 50:een ja pohdimme, että tämä saattaa heikentää työmme luotettavuutta. Suurin menetelmäkohtainen n oli 239 ja pienin 86.

Aineistohakumme kriteeristön määrittelyn vuoksi pidämme meta-analyysiin sisällyttämiämme tutkimuksia lähtökohtaisesti melko luotettavina. Tätä tukee QUADAS-2-laadunarviointityökalusta saamamme tulokset (Liite 2., taulukko 7.), joissa emme nähneet tutkimuksiin liittyvän yhtään korkean riskin kysymystä, joka olisi saattanut luoda tutkimukseen jotain harhaa tai muodostaa riskin tutkimuksen sovellettavuudelle.

7.3 Jatkotutkimusehdotukset ja yhteenveto

Menetelmien herkkyyden ja tarkkuuden vertailua eri tutkimusten välillä vaikeuttaa esimerkiksi kultaisen standardin puuttuminen, vaihtelevat tavat määrittää havaitsemisrajaa, erot näyttemateriaalissa ja sen käsittelyssä sekä tulosten tulkinnassa. Jatkotutkimuksena olisi hyödyllistä selvittää parhaita tapoja yhtenäistää qRT-PCR-menetelmien testausta SARS-CoV-2-viruksen diagnosoinnissa. Pohdimme lisäksi mahdollisuuksia tutkia menetelmien havaitsemisrajojen eroja kohdesekvensseittäin: minkälaisia eroja eri geeneihin kohdennettujen koetin-alueparien väleillä on havaittu. Myös tämän opinnäytetyön tapaisen uuden tutkimuksen te-

keminen myöhemmässä vaiheessa pandemiaa voisi olla hedelmällistä, sillä silloin olisi mahdollista tuottaa suuremmasta aineistosta entistä yleistettävämpiä tuloksia.

Menetelmien ominaisuuksia tutkimalla voidaan arvioida kunkin menetelmän hyviä ja huonoja puolia ja valita sopivin menetelmä kulloiseenkin käyttötarkoitukseen. Vaikka useat SARS-CoV-2-viruksen diagnosoinnissa käytetyt qRT-PCR-menetelmät on kehitetty hyvin lyhyessä ajassa, ne ovat osoittautuneet luotettaviksi menetelmiksi suurten näytemäärien diagnosoinnissa ja näin olleet hyvin merkittävä tekijä pandemian hallinnassa.

LÄHTEET

Aldaais, E., Yegnaswamy, S., Albahrani, F., Alsowaiket, F. & Alramadan, S. 2021. Sequence and structural analysis of COVID-19 E and M proteins with MERS virus E and M proteins—A comparative study. *Biochemistry and biophysics reports*, 2021, 26: 101023. Luettu 13.11.2021.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101023>

Behlke, M. A. 2019. *Polymerase chain reaction: theory and technology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Bio-Rad. n.d. What is Real-Time PCR (qPCR)? Luettu 14.9.2021.

<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>

Bujang, M. A. & Adnan, T. H. 2016. Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 10.10: YE01. Luettu 20.9.2021.

<https://dx.doi.org/10.7860%2FJCDR%2F2016%2F18129.8744>

Center for Devices and Radiological Health. 2003. *Guidance for Industry and FDA Staff - Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests*. Luettu 30.8.2021. <https://www.fda.gov/files/medical%20devices/published/Guidance-for-Industry-and-FDA-Staff---Statistical-Guidance-on-Reporting-Results-from-Studies-Evaluating-Diagnostic-Tests-%28PDF-Version%29.pdf>

Chen, B., Tian, E., He, B., Tian, L., Han, R., Wang, S., Xiang, Q. Zhang, S., El Arnaout, T. & Cheng, W. 2020. Overview of lethal human coronaviruses. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-16. Luettu 23.4.2021.

<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0190-2>

Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S., Sagnelli, C., Bianchi, M., Bernardini, S. & Ciccozzi, M. 2020. COVID-19 Outbreak: An Overview. *Chemotherapy*, 64(5-6), 215-223. Luettu 28.9.2021.

<https://doi.org/10.1159/000507423>

Corman, V., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M., Mulders, D., Haagmans, B., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. & Drosten, C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045. Luettu 28.9.2020.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536. Luettu 23.4.2021. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41564-020-0695-z>

European Centre for Disease Prevention and Control. 2021a. Clinical characteristics of COVID-19. Päivitetty 7.9.2021. Luettu 28.9.2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/clinical>

European Centre for Disease Prevention and Control. 2021b. Incubation period. Päivitetty 21.9.2021. Luettu 28.9.2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/infection>

Fimlab laboratoriot oy. 2021. COVID-19 (SARS-CoV-2) NUKLEIINIHAPPO (KVAL). Tutkimusohjekirja. Päivitetty 10.9.2021. Luettu 28.9.2021. <https://fimlab.fi/tutkimus/11434>

Freire-Paspuel, B., Vega-Mariño, P., Velez, A., Cruz, M., Perez, F. & Garcia-Berreguiain, M. 2021. Analytical and clinical comparison of Viasure (CerTest Biotech) and 2019-nCoV CDC (IDT) RT-qPCR kits for SARS-CoV2 diagnosis. *Virology*, 2021, 553: 154-156. Luettu 3.11.2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.10.010>

GISAID. 2021. Governance & Expertise. Influenssa- ja SARS-CoV-2-virusten perimien tietokanta. Luettu 28.9.2021. <https://www.gisaid.org/about-us/governance/>

Hosseini, E., Kashani, N., Nikzad, H., Azadbakht, J., Bafrani, H. & Kashani, H. 2020. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 2020, 551: 1-9. Luettu 7.9.2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.011>

Hui, D., Chan, M., Wu, A. & Ng, P. 2004. Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgraduate medical journal*, 2004, 80.945: 373-381. Luettu 1.11.2021. <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2004.020263>

Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. 2020. COVID-19 (SARS-CoV-2): hengitystienäytteenotto -CV19NhO-tutkimukseen. Julkaistu 24.3.2020. Luettu 11.8.2021. <https://www.islab.fi/documents/7350541/8480571/Liite+1+16-2020+COVID-19+Hengitystien%C3%A4ytteenotto+-CV19NhO+-tutkimukseen.docx.pdf/bd63f650-e420-4f11-bb8d-f9658fad5f52>

Jalandra, R., Yadav, A., Verma, D., Dalal, N., Sharma, M., Singh, R., Kumar, A. & Solanki, P. 2020. Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 129: 110446. Luettu 13.11.2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110446>

Jokela, P., Jääskeläinen, A., Jarva, H., Holma, T., Ahava, M., Mannonen, L., Lappalainen, M., Kurkela, S. & Loginov, R. 2020. SARS-CoV-2 sample-to-answer nucleic acid testing in a tertiary care emergency department: evaluation and utility. *Journal of Clinical Virology*, 2020, 131: 104614. Luettu 3.11.2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104614>

Kontio, E. & Johansson, K. 2007. Systemaattinen tarkastelu alkuperäistutkimuksien laatuun. Teoksessa Johansson, K., Axelin, A., Stolt, M. & Ääri, R. 2007. Systemaattinen kirjallisuuskatsaus ja sen tekeminen. Turku: Turun yliopisto.

Lephart, P., Bachman, M., LeBar, W., McClellan, S., Barron, K., Schroeder, L. & Newton, D. 2021. Comparative study of four SARS-CoV-2 Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) platforms demonstrates that ID NOW performance is impaired substantially by patient and specimen type. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2021, 99.1: 115200. Luettu 3.11.2021.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115200>

Life Technologies. 2012. Real-time PCR handbook. California: Life Technologies Corporation.

Lowry, R. 2021. Clinical calculator 1. VassarStats: Website for statistical computation. Luettu 20.8.2021. <http://vassarstats.net/clin1.html>

Maloney, D., Medd, N., Attwood, S., Aanensen, D., Holmes, E., Pybus, O. & Rambaut, A. 2021. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evolution*, 7(2), veab064. Luettu 28.9.2021.

<https://doi.org/10.1093/ve/veab064>

Marshall, W.J., Lapsley, M. & Day, A. 2021. *Clinical chemistry*. 9th ed. Edinburgh: Elsevier.

Mayers, C. & Baker, K. 2020. Impact of false-positives and false-negatives in the UK's COVID-19 RT-PCR testing programme. UK Government. Luettu 22.9.2021. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/895843/S0519_Impact_of_false_positives_and_negatives.pdf

McBride, R., Van Zyl, M. & Fielding, B. 2014. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*, 2014, 6.8: 2991-3018. Luettu 13.11.2021.

<https://doi.org/10.3390/v6082991>

McInnes, M., Moher, D., Thoms, B., McGrath, T. & Bossuyt, P. 2018. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies: The PRISMA-DTA Statement. *Jama*, 319(4), 388-396. Luettu 11.8.2021. <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2670259>

Meyerowitz, E., Richterman, A., Gandhi, R. & Sax, P. 2020. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Annals of internal medicine*, 174(1), 69-79. Luettu 28.9.2021.

<https://doi.org/10.7326/M20-5008>

Nextstrain. 2021. What is Nextstrain? Patogeenien genomien tietokanta. Luettu 23.4.2021. <https://docs.nextstrain.org/en/latest/learn/about.html>

O'Toole, Á., Scher, E., Underwood, A., Jackson, B., Hill, V., McCrone, J., Colquhoun, R., Ruis, C., Abu-Dahab, K., Taylor, B., Yeats, C., du Plessis, L., Maloney, D., Medd, N., Attwood, S., Aanensen, D., Holmes, E., Pybus, O. &

Rambaut, A. 2021. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evolution*, 2021, 7.2, veab064. Luettu 1.11.2021. <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>

Prinzi, A. 2020. False negatives and reinfections: the challenges of SARS-CoV-2 RT-PCR testing. *American Society for Microbiology*, April, 2020, 27:2020. Luettu 10.11.2021. <https://asm.org/Articles/2020/April/False-Negatives-and-Reinfections-the-Challenges-of>

Procop, G., Brock, J., Reineks, E., Shrestha, N., Demkowicz, R., Cook, E., Ababneh, E. & Harrington, S. 2021. A Comparison of Five SARS-CoV-2 Molecular Assays With Clinical Correlations. *American Journal of Clinical Pathology*, 2021, 155,1: 69-78. Luettu 3.11.2021. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa181>

Rajul, P., Mathai, A., Parikh, S., Sekhar, G. & Thomas, R. 2008. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian journal of ophthalmology*, 56(1), 45. Luettu 30.8.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2636062/>

Salminen, A. 2011. Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyyppeihin ja hallintotieteellisiin sovelluksiin. Vaasa: Vaasan yliopisto. Luettu 30.8.2021. https://www.uwasa.fi/materiaali/pdf/isbn_978-952-476-349-3.pdf

Savolainen-Kopra, C. & Melin, M. 2020. COVID-19-diagnostiikka ja sen osuus. *Lääkärilehti* 24-33/2020 VSK 75, 1530-1532. Luettu 10.11.2021. <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2021041510493>

Stolt, M., Axelin, A. & Suhonen, R. 2016. Erilaiset Kirjallisuuskatsaukset. Teoksessa Stolt, M., Axelin, A. & Suhonen, R. 2016. Kirjallisuuskatsaus hoitotieteessä. 2. korjattu painos. Hoitotieteen laitoksen julkaisuja, A:73. Turku: Turun yliopisto.

Stolt, M. & Routasalo, P. 2007. Tutkimusartikkelien valinta ja käsittely. Teoksessa Johansson, K., Axelin, A., Stolt, M. & Ääri, R. 2007. Systemaattinen kirjallisuuskatsaus ja sen tekeminen. Turku: Turun yliopisto.

Tang, S., Hemyari, P. & Canchola, J. 2015. Composite reference standard in diagnostic research: a new approach to reduce bias in the presence of imperfect reference tests. *Biometrics*. In Review. Luettu 20.9.2021. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.2046.9844>

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2020. Tavanomaiset varotoimet ja varotoimiluokat. Päivitetty. 30.1.2020. Luettu 1.11.2021. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/infektioiden-ehkaisy-ja-torjuntaohjeita/tavanomaiset-varotoimet-ja-varotoimiluokat>

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2021. Koronaviruksen COVID-19 laboratorio-tutkimukset. Päivitetty 20.5.2021. Luettu 11.8.2021. <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/koronavirus-covid-19/koronaviruksen-covid-19-laboratoriotutkimukset>

- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. 2020. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19.3: 155-170. Luettu 11.11.2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Walker, J. & Rapley, R. 2008. *Molecular Biomechanics Handbook*. 2. painos. New Jersey: Humana Press.
- Whiting, P., Rutjes, A., Westwood, M., Mallett, S., Deeks, J., Reitsma, J., Leefland, M., Sterne, J. & Bossuyt, P. 2011. QUADAS-2: A Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies. *Annals of internal medicine*, 155(8), 529-536. Luettu 17.8.2021. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00009>
- World Health Organization. 2019. WHO MERS global summary and assessment of risk. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Luettu 1.11.2021. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326126/WHO-MERS-RA-19.1-eng.pdf>
- World Health Organization. 2020. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Luettu 28.9.2021. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization. 2021. WHO Coronavirus COVID-19 Dashboard 2021. Luettu 28.9.2021. <https://covid19.who.int/>
- Xiu, S., Dick, A., Ju, H., Mirzaie, S., Abdi, F., Cocklin, S., Zhan, P. & Liu, X. 2020. Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities. *Journal of medicinal chemistry*, 2020, 63.21: 12256-12274. Luettu 13.11.2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00502>
- Zhen, W., Manji, R., Smith, E. & Berry, G. 2020. Comparison of four molecular in vitro diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens. *Journal of clinical microbiology*, 2020, 58.8: e00743-20. Luettu 3.11.2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.00743-20>
- Zhou, P., Yang, X., Wang, X., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H., Zhu, Y., Li, B., Huang, C., Chen, H., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R., Liu, M., Chen, Y., Shen, X., Wang, X., Zheng, X., Zhao, K., Chen, Q., Deng, F., Liu, L., Yan, B., Zhan, F., Wang, Y., Xiao, G. & Shi, Z. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. Luettu 28.9.2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

LIITTEET

Liite 1. TAULUKKO 6. Menetelmien koko nimet ja valmistajat sekä tässä työssä käytetyt lyhenteet

Menetelmän koko nimi, valmistaja suluissa	Lyhenne
2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Centers for Disease Control and Prevention)	2019 nCoV
z 480 Assay (TIB MOLBIOL/Roche)	z 480
Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid)	Xpert Xpress
Simplexa COVID-19 Direct Kit (DiaSorin Molecular)	Simplexa
[Modified] 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (CDC)	[Modified] 2019 nCoV
ePlex SARS-CoV-2 (GenMark)	ePlex
Panther Fusion SARS-CoV-2 (Hologic)	Panther Fusion
Novodiag Covid-19 (Mobidiag)	Novodiag
RealTime m2000 SARS-CoV-2 Assay (Abbott)	RealTime m2000
Viasure RT-qPCR kit (CerTest Biotec)	Viasure

Liite 2. TAULUKKO 7. QUADAS-2-laadunarviointityökalun tulokset

Tutkimus	HARHAN RISKI				SOVELLETTAVUUS		
	Näytteiden valinta	Testien suoritus	Refrenssi- menetelmä	Kulku ja ajoitus	Näytteiden valinta	Testien suoritus	Kulku ja ajoitus
Procop ym.	+	+	+	+	?	+	+
Freire-Paspuel ym.	+	+	+	+	+	+	+
Jokela ym.	?	+	+	?	?	+	+
Zhen ym.	+	+	+	+	+	+	+
Lephart ym.	?	+	+	+	?	+	+
	+	Matala riski	?	Epäselvä riski	-	Korkea riski	