

Kommentit tutkimuksesta Nagy et al, Development and evaluation of a one-step real-time RT-PCR assay for universal detection of influenza A viruses from avian and mammal species. Arch Virol 2010; 155: 665–673

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20229116/>

Tässä artikkelissa kuvataan käänteinen reaaliaikainen PCR-testi geneettisen materiaalin havaitsemiseksi erilaisista näytteistä perustuen A-influenssavirusten membraaniproteiineissa (MP) stabiiliin sekvenssin havaitsemiseen.

Menetelmän kuvauksen perusteella menetelmä ei ole spesifinen. PCR-sykliden lukumäärä on 45. Virusten havaitsemisessa yli 35 syklin määrällä havaitaan vain signaaleja, jotka eivät korreloi soluviljelmästä eristämällä määritetyn tartuttamiskykyisen viruksen kanssa. Jos näytettä testataan PCR-testillä positiiviseksi käyttämällä vähintään 35 syklin kynnyksiarvoa, todennäköisyys sille, että kyseinen henkilö on todella saanut tartunnan, on alle 3 %, ja todennäköisyys sille, että kyseinen tulos on väärä positiivinen (false positive), on 97 prosenttia (1).

On siis odotettavissa, että menetelmä antaa enimmäkseen vääriä positiivisia tuloksia.

Kuten PCR-menetelmän keksijä ja nobelisti, tohtori Kary Mullis selitti, PCR tekniikka ei sovellu diagnostisiin tarkoituksiin. PCR on suunniteltu ainoastaan monistamaan geneettistä materiaalia näytteestä. Tämän vuoksi on väistämättä väärin tehdä mitään kansanterveydellisiä ja eläinlääkinnällisiä toimenpiteitä epidemioiden ehkäisemiseksi pelkästään membraaniproteiinien geneettisen sekvenssin havaitsemisen perusteella.

Lisäksi tämä sekvenssi valittiin bioinformatiikan perusteella eikä testaamalla kliinisesti karakterisoituja näytteitä. Kuten COVID-19 PCR-pandemian kohdalla, myös tässä tutkimuksessa on kyse *in silico* -biologiasta, ei todellisesta biologiasta.

Eteenpäin ja taaksepäin suuntautuvien alukkeiden sekvenssit on kuvattu, mutta koettimen sekvenssiä ei ole kuvattu (ainoastaan viite). Kirjoittajat eivät käsittele CG-nukleotidien suhdetta etu- ja käänteisalukkeissa. Tässä tapauksessa CG-pitoisuus etummaisessa alukkeessa on 70 % (12/17) ja käänteisen alukkeen pitoisuus on vähintään 58 % (10/17). Yksi positio käänteisen alukkeen sisällä on degeneroitunut, joten se voi olla mikä tahansa nukleotidi. Tämä lisää epäspesifisyyttä. Kuten PCR-tekniikan asiantuntijat (1) neuvovat, CG-pitoisuuden tulisi olla 40–60 %, ja jos suhde on suurempi, lujittumislämpötila (T_m , annealing temperature) saattaa olla suboptimaalinen molemmille tai jommalle kummalle alukkeista, korkeampi, jolloin alukkeet voivat tarttua lujittuvat mihin tahansa näytteessä olevaan sekvenssiin, mikä johtaa testin epäspesifisyyteen.

Eteenpäin ja taaksepäin suuntautuvien alukkeiden pitoisuus on 600 nM, kun sen pitäisi optimaalisesti olla 100-200 nM (1). Tätä korkeammat pitoisuudet johtavat testin spesifiyden heikentymiseen.

Molekyylibiologista validointia sekvensoimalla tai ajamalla geeliä, jossa on DNA molekyyli­markkerit mukana, DNA-viivaimella (1) ei esitetty.

Virusdiagnostiikassa vähintään kolmen alukeparin on tunnistettava kolme erillistä viruksen geeniä (mieluiten mahdollisimman kaukana toisistaan viruksen genomissa) (1). Tässä tapauksessa vain MP-geeni todennettiin. (kursivointi – lainaus viitatus­ta julkaisusta (1)).

PCR-testiputkessa ei mainita olleen negatiivista kontrollia.

Testin todentamiseen käytettyjä näytteitä ei ole karakterisoitu. Jää epäselväksi, millä perusteella ne on luokiteltu influenssa A:ksi tai joksikin muuksi virukseksi.

Ei ole mainintaa kultaisesta standardista tai mistään muusta menetelmästä (esim. immunofluoresenssi mikroskopointi), jota olisi pitänyt käyttää vertailumenetelmänä.

Kliinisiä potilasnäytteitä ei ole kuvattu.

Menetelmän spesifisyyttä ei ole määritetty. Spesifisyyden tutkimiseksi olisi käytettävä kliinisiä näytteitä, jotka liittyvät samanlaisiin oireisiin, mutta joilla on todistetusti muu etiologia.

Kommentit tutkimuksesta Nagy et al., A universal RT-qPCR assay for "One Health" detection of influenza A viruses. PLoS ONE 2021 16(1): e0244669

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33471840/>

Tässä saman tutkimusryhmän julkaisussa kuvataan menetelmä, jota kirjoittajien mukaan tulisi käyttää One Health -lähestymistapana influenssa A:n diagnosoimiseksi ihmisillä, nisäkkäillä ja siipikarjalla.

Vaikka se on kirjoitettu yli kymmenen vuotta myöhemmin, kirjoittajat eivät ole korjanneet edellisen asiakirjan puutteita.

Syklien määrä on sama 45, mikä johtaa epäspesifisyyteen.

Näytteitä, joita käytettiin "validointiin", ei ollut kliinisesti karakterisoitu.

Eteenpäin ja taaksepäin suuntautuvat alukkeet ovat samat kuin edellisessä tutkimuksessa (GC-suhde 12/17 ja 10/17). Tällä kertaa julkaistiin koettimen sekvenssi. Tässä julkaisussa alukkeiden pitoisuus oli 1400 nM, mikä on suurempi kuin aiemmin (600 nM), kun sen pitäisi olla 100–200 nM.

Edelleen on epäselvää, mitä menetelmää vasten kuvattu menetelmä validoitiin.

Johtopäätökset

Tarkastelluissa julkaisuissa (Nagy et al. 2010 ja 2021) on useita teknisiä puutteita. Kuvattu menetelmä näyttää olevan huomattavan epäspesifinen. Siksi on todennäköistä, että tämä menetelmä, joka on tarkoitettu One Health -lähestymistavaksi lintuinfluenssan havaitsemiseksi (ja joka on nyt Suomen viranomaisten käytössä), tuottaa suuren määrän vääriä positiivisia tuloksia, mikä paisuttaa A-influenssan diagnooseja ihmisillä, linnuilla ja muilla eläimillä. Epäspesifisen menetelmän käyttö rutiiniluonteisesti voi johtaa tuhoisiin eläinlääkinnällisiin ja kansanterveydellisiin toimenpiteisiin.

Tamara Tuuminen, MD, PhD, kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri, lääketieteellisen mikrobiologian dosentti.

Helsingissä, 8. elokuuta 2023

Viite

1. Corman-Drosten review report BY AN INTERNATIONAL CONSORTIUM OF SCIENTISTS IN LIFE SCIENCES (ICSLS) Review report Corman-Drosten et al. Eurosurveillance 2020 November 27, 2020