



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

OHJE MININEPHPLUS™ -NEFELOMETRIN KÄYTTÖÖN

Opetusvideo bioanalytiikan opiskelijoille

Alina Iakubovskaia

Jannika Isoeskelä

Opinnäytetyö
Lokakuu 2018
Bioanalyttikkokoulutus
Tampereen ammattikorkeakoulu



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

IAKUBOVSKAIA ALINA & ISOESKELI JANNIKA:
Ohje MININEPHPLUS™ -nefelometrin käyttöön
Opetusvideo bioanalytiikan opiskelijoille

Opinnäytetyö 57 sivua, joista liitteitä 7 sivua
Lokakuu 2018

Nefelometria on menetelmä, jota kliinisessä kemiassa käytetään kliinisesti merkittävien spesifisten proteiinien mittauksissa. Menetelmä kuuluu immunologisiin määritysmenetelmiin, joista suomenkielellä saatavaa materiaalia löytyy rajoitetusti. Nefelometria on yksi bioanalytikkokoulutuksessa opetettavista perusmenetelmistä. Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksen harjoitustunneille tarvitaan selkeä suomenkielinen video MININEPHPLUS™ -nefelometrin käytöstä. Videollinen ohje toimii oppimista tukevana oppimateriaalina, jonka kautta opiskelijat voivat perehtyä analysaattorin toimintaan. Opinnäytetyön toimeksiantajana on Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutus.

Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa opiskelijoiden tietoa nefelometriasta sekä kehittää taitoja käyttää mittausmenetelmää lähes itsenäisesti. Tuotoksena tehtiin mahdollisimman selkeä videollinen analysaattorin käyttöohje. Videon tarkoituksena on toimia opiskelua tukevana, mutta ei korvaavana oppimateriaalina. Tehtävänä oli tuottaa videollinen oppimateriaali, jonka avulla opiskelijat perehtyvät nefelometriseen mittausmenetelmään sekä MININEPHPLUS™ -analysaattorin käyttöön. Tämä mahdollistaa oppimisprosessin tehostamisen sekä opiskelijoiden itsevarmuuden lisäämisen itsenäisempään työskentelyyn.

Opinnäytetyössä käytettiin toiminnallista menetelmää, joka sisältää tuotoksen eli opetusvideon sekä kirjallisen raportin. Videossa esiteltiin MININEPHPLUS™ -analysaattorin periaatteen sekä työskentelyprosessin ja raportissa keskityttiin teoreettisiin lähtökohtiin sekä työn toteutusprosessin pohdintaan.

Asiasanat: nefelometria, immunoanalyysi, immunokompleksi, vasta-aine, antigeeni

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

IAKUBOVSKAIA ALINA & ISOESKELI JANNIKA:
MININEPHPLUS™ Nephelometer User Guide
A Video Guide for Students of Biomedical Laboratory Science

Bachelor's thesis 57 pages, appendices 7 pages
October 2018

Nephelometry is a method used in clinical chemistry for the measurement of clinically relevant specific proteins. The method is one of the immunological assay methods and a part of study programme in Biomedical Laboratory Science. Information on the topic available in Finnish is somewhat limited. The thesis was requested by Tampere University of Applied Sciences as there was a need for an educational video on nephelometry with the aim of supporting students' learning process.

The objective of this study was to improve students' knowledge about nephelometry in order to be able to use the measurement method almost independently. Therefore, the video guide was made as user-friendly as possible. The purpose of this study was to create the video material that can be used as a teaching tool to familiarise students with the nephelometric measurement method and to improve their self-confidence in more independent work. As a result, students would be able to work independently using the video in the university's laboratory of clinical chemistry. The purpose of this study is to act as a supportive, but not a substitute learning material.

The study has a functional approach. It is a practice-based study with an output, the educational video, and a written report supplementing the theoretical content. The video introduces the principle of the MININEPHPLUS™ analyser and its working process. In the report, we deepened the theory presented in the video and analysed the implementation process of the study, along with its outcomes.

Key words: nephelometry, immunoassay, immune complex, antibody, antigen

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	IMMUNOLOGISET MENETELMÄT.....	8
2.1	Vasta-aine ja antigeeni immunologisissa määrityksissä.....	9
2.2	Latex-partikkeli menetelmä.....	13
2.3	Reagenssit.....	14
2.4	Virhelähteet immunokemiallisissa määrityksissä.....	19
3	NEFELOMETRIA JA MININEPHPLUS™.....	22
3.1	Nefelometrian periaatteet ja kliininen käyttö.....	22
3.2	MININEPHPLUS™ -analysointilaitteen ominaisuudet.....	25
3.3	Laitteen osat, reagenssit ja tarvikkeet.....	27
4	OPETUSMATERIAALIN TUOTTAMINEN OPINNÄYTETYÖNÄ.....	30
4.1	Toiminnallinen opinnäytetyö.....	30
4.2	Video opetusmateriaalina.....	31
5	OPINNÄYTETYÖN PROSESSI.....	36
5.1	Työn toteutus.....	36
5.2	Tuotoksen laadun arviointi.....	38
6	POHDINTA.....	41
	LÄHTEET.....	44
	LIITTEET.....	51
	Liite 1. Opetusvideon käsikirjoitus.....	51
	Liite 2. Arviointilomakkeet.....	55

ERITYISSANASTO

Agglutinaatio	Solujen tai partikkelien takertuminen toisiinsa
Antigeeni	Molekyyli, joka aiheuttaa immunologisen reaktion
CRP	C-reaktiivinen proteiini
CLIA	Kemiluminesenssi immunomääritys
ELISA	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
Epitoooppi	Antigeenimolekyylin osa, jonka immuunijärjestelmä spesifisesti tunnistaa
FIA	Fluoroimmunomääritys
Hook-efekti	Mittausta häiritsevä tilanne, jossa tutkittavaa molekyyliä on merkittävästi enemmän kuin siihen sitoutuvaa vasta-ainetta
Immunoglobuliini	Vasta-aineena toimiva proteiini
Immunokompleksi	Vasta-aineen ja antigeenin yhdistelmä
Immunopresipitaatio	Antigeenin saostaminen liuksesta käyttämällä vasta-ainetta, joka spesifisesti sitoutuu siihen
Myeloomasolu	Plasmasolu, joka tuottaa kontrolloimattomasti yksittäistä vasta-ainetta
Nefelometri	Valon sirontaa mittaava analysaattori
Polymorfismi	Monimuotoisuus
Polypeptidiketju	Aminohapoista koostuva ketju, joka muodostaa proteiinin
Presipitaatti	Saostamisen seurauksena muodostuva sakka
Prozone-efekti	kts. Hook-efekti
Semi-kvantitatiivinen	Menetelmä, jossa tulos on määrällisesti suuntaa antava
RIA	Radioimmunomääritys

1 JOHDANTO

Nefelometria on kliinisissä laboratorioissa käytettävä mittaumenetelmä, jota sovelletaan erityisesti spesifisten proteiinien pitoisuusmäärittämisessä seerumista ja virtsasta. Erityisesti nefelometriä käytetään immunoglobuliinien, niiden alaluokkien, komplementtien sekä spesifisten proteiinien määrittämisessä seerumista ja virtsasta.

Opinnäytetyön aiheena on videollinen ohje MININEPHPLUS™ -nefelometrin käytöstä Tampereen ammattikorkeakoululle bioanalytiikan koulutusohjelman opetuskäyttöön. Nefelometri on hyvin hyödyllinen opetuskäytössä, koska kyseinen laite on puoliautomaattinen, yksittäisten näytteiden mittaamiseen suunniteltu laite. Opiskelijat pääsevät tekemään suurimman osan työtä itse, manuaalisesti, jolloin he pystyvät näkemään prosessin eri vaiheita ja oppimaan aihetta tehokkaammin.

Opinnäytetyön tarkoituksena on luoda opetuskäyttöön helppokäyttöistä videomateriaalia, jota voidaan hyödyntää bioanalytiikan koulutuksessa. Video on ammattikorkeakoulujen bioanalytikko-opiskelijoille tarkoitettu oppimista helpottava materiaali. Aiheena on nefelometrin käyttö korkeakoulun laboratorio-olosuhteissa, jossa voidaan harjoitella valvotusti menetelmän käyttöä.

Opinnäytetyön tavoite on lisätä bioanalytikko-opiskelijoiden tietoa ja taitoa nefelometrin käytössä, antaa työkaluja opetukseen ja opiskelijoiden käyttöön. Omana tavoitteena oli perehtyä kyseiseen aiheeseen ja luoda video, joka on opiskelijoiden näkökulmasta toimiva ja oppimisen kannalta hyödyllinen. Video on opiskelijoille helppo oppimateriaali kerrata uudelleen ja tällä tavoin yhtenäistää opetusta. Opetus on siten tehokkaampaa ja siitä hyötyvät niin opettaja kuin opiskelijat.

Tampereen ammattikorkeakoulun kliinisen kemian opetuslaboratorioissa opetukseen käytettävällä MININEPHPLUS™ -nefelometrillä tehdään ensisijaisesti C-reaktiivisen proteiinin määrittäystä (CRP-tutkimusta eli ns. tulehdusarvon määrittämistä). Tutkimus on hyvä harjoitustyö, koska CRP:tä esiintyy terveelläkin henkilöllä sekä siitä syystä, että menetelmässä joudutaan usein tekemään tarvittavia jatkolaimennoksia. Samaa tutkimusta määritetään harjoitustöissä myös immunoturbidimetrisesti mm. Konelab-

analysaattoreilla sekä Orion Diagnostican QuikRead go -vierilaitteella. Näin opiskelijat pääsevät konkreettisesti perehtymään ja vertailemaan kolmea yleisesti käytettävää immunologista määrittämenetelmää keskenään.

Opiskelijat oppivat pipetoimaan tarkasti laitteen ohjaamana pieniä näytemääriä laitteen kiinteällä sähköpipetillä mittausastiaan eli kyvettiin. He oppivat myös laimentamaan näytteitä tarkasti sekä käyttämään taloudellisesti kalliita reagensseja. Sellaiset harjoitukset auttavat opiskelijoita ymmärtämään menetelmää vaihe vaiheelta ja tulkitsemaan reagenssivalmistajien monivaiheisia ohjeita.

Opinnäytetyömme on menetelmältään toiminnallinen. Se sisältää tuotoksen eli opetusvideon ja siihen kuuluvan raportin. Kirjallinen raportti sisältää teoreettista tietoa immunologisista mittauksista, erityisesti nefelometriasta, sekä opinnäytetyön prosessin kuvauksen. Opetusjärjestelmässä ammattikorkeakoulujen painotus on ensisijaisesti käytännön osaamisessa, jonka välttämättömänä tukena on teoreettinen tietopohja. Toiminnallisen opinnäytetyön tekeminen suuntautuu pääpainotteisesti käytännön taitojen kehittämiseen. Se edistää valitun osa-alueen osaamista sekä käytännön näkökulmasta että tieteellisesti.

Työprosessi suunniteltiin niin, että kuvasimme ensin videon MININEPHPLUS™ -nefelometrin käytöstä. Seuraavaksi video editoitiin ja analysoitiin tietyn kohderyhmän palautteen vertaisarviointina, jonka perusteella tehtiin korjaukset. Lopuksi julkaisimme videon Youtube-kanavalle, jossa se on vapaassa käytössä kaikille videosta kiinnostuneille opiskelijoille. Tämän jälkeen keskityimme opinnäytetyöraportin työstämiseen.

2 IMMUNOLOGISET MENETELMÄT

Kliinisessä laboratoriossa käytetään monia, immunologiseen reaktioon perustuvia määrittämenetelmiä. Niitä ovat esimerkiksi fluoresenssiin ja kemiluminesenssiin perustuvat leimamenetelmät, joissa tietty spesifinen vasta-aine tai antigeeni on leimattu tietyllä merkkiaineella. Käytössä ovat myös saostus- ja agglutinaatiomenetelmät, joita pystytään vahvistamaan esim. käyttämällä latex-partikkeleita. (Stevens 2010, 124.) Immunohematologisissa menetelmissä käytetään vastaavasti punasoluja mm. veriryhmän ja plasman veriryhmävasta-aineiden määrittäyksissä (Stevens 2010, 140). Vierirtesteissä havainnointiin käytetään usein värireaktiota, joko silmämääräisesti tulkiten tai pienanalyysaattorilla mitaten.

Vanhimmat, yhä käytössä olevat menetelmät, perustuvat homogeeniseen immunoreaktioon. Havainnoinnin kohteena on näkyvä sakka tai sameuden määrä. Sameus syntyy hienorakenteisesta sakasta eli immunopresipitaatista. Se muodostuu, kun liukoinen vasta-aine ja mitattava liukoinen antigeeni sekoittuvat keskenään ja reaktiossa syntyy liukenemattomia immunokomplekseja. (Stevens 2010, 124.) Immunopresipitaatin eli mitattavien partikkelien muodostumista ja menetelmän herkkyyttä voidaan vahvistaa erilaisilla apuaineilla. Turbidimetrisessä ja nefelometrisessä mittauksissa käytetään latex-partikkeleita, joihin on kiinnitetty spesifinen vasta-aine. Tekniikka otettiin käyttöön jo 1950-luvulla ja se syrjäytti osin punasolujen käytön agglutinaation havainnointimenetelmänä. (Ullman 2013, 67.)

Immunologisia mittauksia ja niiden erilaisia sovelluksia on erittäin paljon. Niitä poistuu käytöstä ja uusia tulee automaation ja tekniikoiden kehittymisen myötä. Stevensin (2010, 153) mukaan, yhä nopeampia, spesifisempiä ja sensitiivisempiä immunologisia analyysejä kehitettiin, kun haluttiin mitata hyvin pienikokoisia analyyttejä sekä erittäin alhaisia pitoisuuksia. Erilaisia leimoja eli merkkiaineita hyödyntäviä menetelmiä ja mittalaitteita on kehitetty lukuisia. Nämä merkkiaineet ovat kiinnitetty reagenssiin (vasta-aineisiin tai antigeeneihin), ja ne antavat erilaisia mitattavissa olevia signaaleja. Ensimmäisiä menetelmiä on ollut tiedossa jo 1950-luvun loppupuolesta, jolloin Yalow ja Berson kehittivät radioaktiivisia leimamolekyylejä hyödyntävän radioimmunologisen määrittämenetelmän (RIA). Merkkiaineina voidaan käyttää myös entsyymaattisia

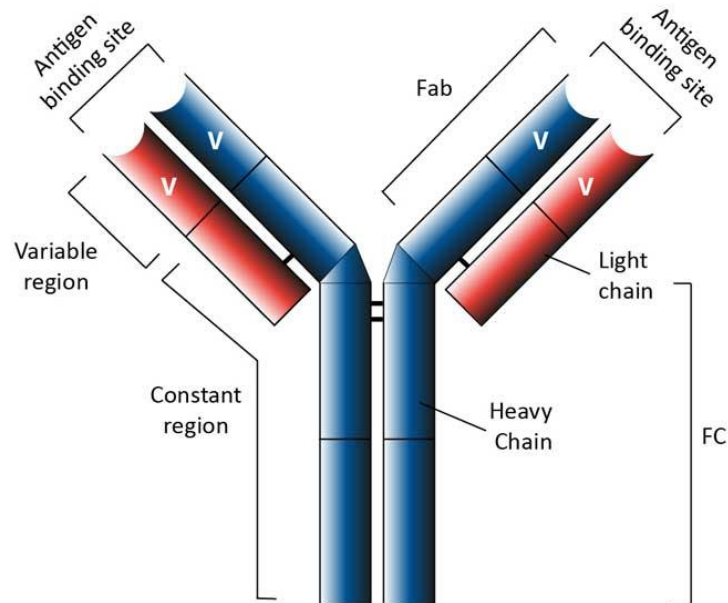
leimoja (ELISA) tai erilaisia luminosenssia tuottavia molekyyliä, kuten fluorisoivia molekyyliä tai valoa tuottavia molekyyliä (FIA ja CLIA). Mittausmenetelmä ja laitteisto ovat riippuvaisia käytetystä merkkiaineesta sekä antigeenin ominaisuuksista. (Stevens 2010, 161.)

Tässä opinnäytetyöraportissa keskitytään MININEPHPLUSTM -nefelometrin mittausmenetelmään ja siihen liittyvään immunologiseen reaktioon. Kyseinen menetelmä on homogeeninen, ja se perustuu immunopresipitaatin muodostumiseen.

2.1 Vasta-aine ja antigeeni immunologisissa määrityksissä

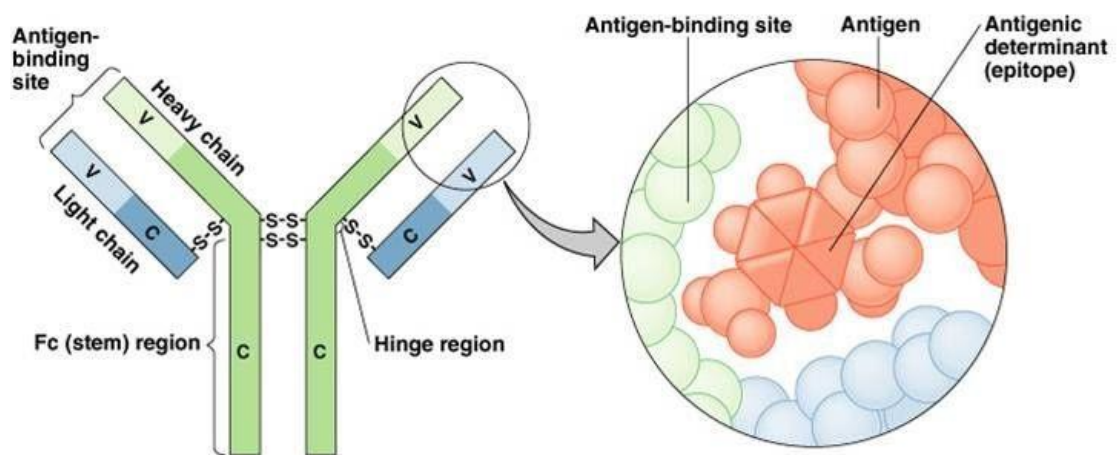
Immunokemiallisessa mittauksessa eli immunoanalyysissä muodostuu antigeeni-vasta-ainekomplekseja, kun vasta-aine sitoutuu tiettyyn antigeeniin, jolle se on spesifinen. Vasta-aine on Y-kirjaimen muotoinen proteiini, jonka molemmissa päissä sijaitsevat sitoutumiskohdat ovat spesifisiä tietylle antigeenin osalle eli epitoopille. Molemmat vasta-aineen sakarat ovat sitoutumisalueiltaan identtisiä, mutta vaihtelevat riippuen siitä, mikä antigeeni on kyseessä. (Stevens 2017a, 62.) Vasta-aine pystyy sitoutumaan antigeeneihin omilla sitoutumiskohdillaan siten, että yksittäinen vasta-ainemolekyyli voi kiinnittyä yhteen tai kahteen samankaltaiseen antigeeniin eli partikkeliin. Tämä johtaa ns. immunokompleksien muodostumiseen, kun vasta-aineet muodostavat silloituksen antigeenien kanssa. (Van Lente 1997, 13.)

Vasta-ainemolekyylit eli immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, jotka koostuvat yhdestä tai useammasta yksiköstä, joista kukin sisältää neljä polypeptidiketjua: kaksi identtistä raskasketjua (H) ja kaksi identtistä kevytketjua (L). Polypeptidiketjujen päät osoittavat huomattavaa vaihtelua aminohappokoostumuksessa ja niitä kutsutaan vaihteleviksi alueiksi (V) niiden erottamiseksi vasta-aineen vakioalueista (C). Jokainen kevytketju koostuu siis yhdestä vaihtelevasta ja yhdestä vakiodomeenista. Raskasketjut koostuvat yhdestä vaihtelevasta ja kolmesta vakiodomeenista (kuva 1). Immunoglobuliinien luokittelu viiteen perusluokkaan IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE perustuu molekyylissä olevan raskaan ketjun tyyppiin. (Feldkamp & Carey 1996, 17; Harlow & Lane 1988.)



KUVA 1. Vasta-aineen rakenne (AMS Biotechnology Ltd 2013)

Vasta-aineet ovat voimakkaita tutkimusvälineitä, koska ne sitoutuvat spesifisesti tiettyyn epitooppiin antigeenissä (kuva 2), mikä mahdollistaa spesifisen proteiinin määrittämisen välttämättä muita proteiineja. Spesifinen sitoutumiskyky mahdollistaa vasta-aineiden käytön diagnostiikassa, kuten raskaustesteissä sekä terapeuttisissa sovelluksissa, kuten syövän hoidossa ja seurannassa. (Pacific Immunology 2018.)



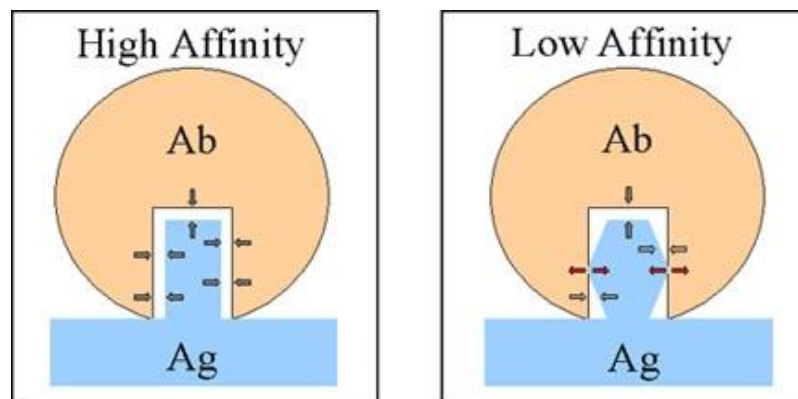
KUVA 2. Vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiskohta (Cummings 2001)

Antigeeninä voi toimia mm. proteiini, immunoglobuliini tai jokin lääkeaine. Näiden yhdistyminen käynnistää kemiallisen reaktiosarjan, joka johtaa näytteessä tapahtuvaan partikkelien kasautumisen syntyyn. (Stevens 2017a, 17–18.) Menetelmä, joka mittaa tällaista reaktiota, kutsutaan immunoanalyysiksi.

Antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen interaktio eli yhteisvaikutus on hyvin tunnettu ja tutkittu ilmiö. Mittauksessa reagenssina käytetyn vasta-aineen ja mittavan proteiinin välille syntyy useita ei-kovalenttisia sidoksia, elektrostaattista voimaa sekä vetysidoksia. (Feldkamp & Carey 1996, 19.) Immunopresipitaation eli saostuman synty edellyttää, että käytetty vasta-aine on joko bivalentti eli sillä on kaksi sitoutumiskohtaa, tai multivalentti, jolloin näitä sitoutumiskohtia on useampi kuin kaksi. Mitattavalla antigeenimolekyylillä tulee olla vähintään kaksi epitooppia eli antigeenireseptoria, jotka vasta-aine tunnistaa. (Marmer & Hurtubis 1996, 368.)

Vasta-aineen ja antigeenin välille syntyvän vuorovaikutuksen vahvuus riippuu ensisijaisesti kahdesta vasta-aineiden ominaisuudesta, jotka ovat affiniteetti ja aviditeetti. Nämä ominaisuudet ovat tärkeitä kliinisen laboratorion näkökulmasta, koska ne liittyvät analyysin herkkyyteen ja spesifisyyteen. (Stevens 2017b, 141.)

Affiniteetti on alkuperäinen voima, joka esiintyy vasta-aineen yksittäisen Fab-kohdan ja antigeenin yhden epitoopin välillä. Epitooppi ja sitoutumiskohta tulevat lähelle toisiaan muodostaen useita erilaisia ei-kovalenttisia sidoksia, jotka pitävät niitä yhdessä. Näihin kuuluvat ionisidokset, vetysidokset, hydrofobiset sidokset ja van der Waals -voimat. Kaikki nämä ovat melko heikkoja sidoksia, jotka voivat esiintyä vain lyhyen matkan päässä (noin 1×10^{-7} mm), joten antigeenin ja vasta-aineen on oltava hyvin lähellä toisiaan. (Stevens 2017b, 141.)

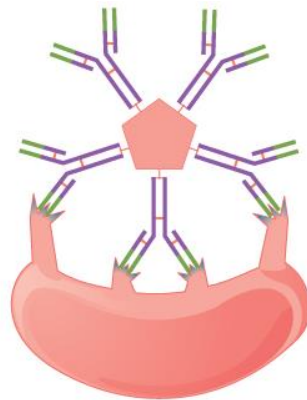


KUVA 3. Sidosten vaikutus affiniteettiin (Mayer 2017)

Affiniteetti riippuu vasta-aineen spesifisyydestä tietyn antigeenin suhteen. Yksi vasta-ainemolekyylillä pystyy sitoamaan lukuisia erilaisia antigeenejä, mutta epitoopin muoto ja tapa, jolla se sopii yhteen vasta-ainemolekyylin sitoutumiskohdan kanssa, määrittää sidoksen pysyvyyden (kuva 3). Vasta-aineet kykenevät reagoimaan sellaisten antigeenien

kanssa, jotka ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin alkuperäinen antigeeni. Ilmiötä kutsutaan ristireaktiivisuudeksi (eng. cross-reactivity). Mitä enemmän ristireagoiva antigeeni muistuttaa alkuperäistä antigeeniä, sitä vahvempi sidos on antigeenin ja sitoutumiskohdan välillä. Affiniteetti riippuu näin ollen epitoopin ja vasta-aineen sitoutumiskohdan yhteensopivuustasosta, eli mitä täydellisempi sidos on, sitä korkeampi on affiniteetti. (Stevens 2017b, 141.) Ominaisuus kuvaa yksittäistä antigeeni-vasta-aineen vuorovaikutusta eli käsittelee sitä yhden sidoksen tasolla.

Aviditeetti puolestaan tarkoittaa kaikkien antigeeni-vasta-ainesidosten yhteisesti aiheuttama sidosvoimaa eli vahvuutta, jolla monivalenssi vasta-aine (IgM, IgA) sitoo antigeeneja. Se kuvaa antigeeni-vasta-ainesidosten yleistä pysyvyyttä ja voimaa, joka pitää molekyylit yhdessä kun sitoutuminen on tapahtunut. Korkea aviditeetti pystyy siten kompensoimaan alhaisen affiniteetin. Tyypillisesti multimeerisillä vasta-aineilla, kuten pentameerisella IgM:llä, on alempi affiniteetti kuin monomeerisillä. Toisaalta IgM:llä on korkeampi aviditeetti useamman sitoutumiskohdan ansiosta (kuva 4). (Stevens 2010, 124–125.)



KUVA 4. IgM vasta-aineen sitoutuminen ja aviditeetti (Rice University 2012)

Immunokemiallisessa nefelometriassa mitataan yleensä sitä saostumaa, joka ei ole liuennut. Liukenemattoman presipitaatin syntyä edeltää useita tapahtumia. Ensimmäisessä vaiheessa, kun vasta-aine ja antigeeni kohtaavat, syntyy primaari immunokompleksi. Toisessa vaiheessa yksinkertaiset pienet kompleksit verkostoituvat suuremmiksi immunokomplekseiksi. Lopulta muodostuu suuria aggregaatioita, jotka näkyvät silmännähdessä sameutena. Pysyvän saostuman synty edellyttää vasta-aineylimäärää. (Marmer & Hurtubis 1996, 368.) Putkessa tapahtuvat reaktiot voivat kestää useita tunteja, jonka vuoksi nefelometrisissa mittauksissa reaktiot nopeutetaan erilaisilla tekniikoilla ja kemiallisilla aineilla.

2.2 Latex-partikkeli menetelmä

Latex-tehostettu CRP-testi perustuu alun perin menetelmään, jonka kehittivät lääkärit Singer J. M. ja Plotz C. M. vuonna 1956. Heidän tutkimusten tuloksena kehitettiin immunologinen menetelmä, jossa punaolut korvattiin biologisesti reaktiokyvyttömällä eli inerteillä latex-mikropartikkeleilla. Mikropartikkelit vahvistavat agglutinaation positiivisessa reaktiossa. Muodostunut agglutinaatio on selkeä, koska presipitaatin partikkelikoko on suurempi ja reaktio muodostaa havaittavia valkoisia kokkareita. Vuonna 1957 Singer ja Plotz kehittivät serologisen CRP latex-testin, jossa akuutin vaiheen proteiinien mittaaminen on mahdollista havaita visuaalisesti ja joka antaa kvalitatiivisen ja semi-kvantitatiivisen tuloksen. (Plotz & Singer 1956.)

Mittausalueen laajentamiseksi erityisesti hyvin matalalle tulostasolle, mittauksissa käytetään latex-tehostettuja menetelmiä. Latex-mikropartikkelit on päällystetty reagenssina toimivalla vasta-aineella. Yhteen latex-partikkeliin voidaan sitoa suuri määrä reagoivia yksiköitä. (Kasahara 1997, 10–11.) Reaktionsamentuman muodostuminen vahvistuu merkittävästi, kun immunokompleksissa on mukana suuria rakenteita, kuten latex-partikkeleita ja niiden muodostamia verkostoja. Latex-partikkeleiden käyttö reagenssina lisää mittauksen herkkyyttä suurentamalla mitattavien immunokompleksien kokoa. (Ullman 2013, 67.) Menetelmä näin ollen mahdollistaa tarkan kvantitatiivisen tuloksen alhaisillakin proteiinipitoisuuksilla.

Latex-partikkelit ovat muovia ja nestemäisenä reagenssi on visuaalisesti maitomaisen samea. Käytetty partikkelikoko vaihtelee menetelmän ja havainnointitavan mukaan. Latex-partikkelin pinnalle kiinnitetään olosuhteita säätelemällä optimaalinen määrä polyklonaalista tai monoklonaalista vasta-ainetta menetelmästä riippuen. Partikkelien päällystäminen tapahtuu käyttämällä hyväksi passiivista adsorptiota tai pakottamalla, jossa kiinnittymistä edesautetaan esim. lämmön avulla. (Newman, Henneberry & Price 1992.)

Menetelmää käytetään edelleen ja sen periaatteena on presipitaatin muodostuminen immunologisen reaktion ansiosta. Reaktio tapahtuu lateksipartikkeleihin sidottujen CRP-antiseerumin ja CRP-molekyylien välillä. Sakka tulee näkyväksi noin kahdessa minuutissa, siinä tapauksessa, että seerumin CRP:n pitoisuus on korkeampi kuin 0.8

mg/dl eli 8 mg/l. (Diagnostic Automation 2015.) Seerumin CRP:n pitoisuus on normaalisti alle 10 mg/l, eli testi pystyy osoittamaan C-reaktiivisen proteiinin läsnäolon merkittäväällä tasolla antamalla positiivisen reaktion. Semi-kvantitatiivisissa määrittelyissä näyte laimennetaan fysiologisella keittosuolaliuoksella (NaCl 0,9%) tietyissä suhteissa ja tulos tulkitaan eri pitoisuustasojen reaktioiden mukaisesti. (Aryal 2018.)

Samalla periaatteella toimivat myös immunohepatologiset määrittelyt, joissa suurena partikkelina on punasolu, jonka pinnalla esiintyy veriryhmää määrääviä antigeenejä. Reagensseina käytetään tiettyjä kaupallisia vasta-aineita ja punasoluja immunologisen reaktion saavuttamiseksi. Veriryhmästä sekä plasmassa sisältyvistä vasta-aineista riippuen näissä määrittelyissä tapahtuu agglutinaatiota eli solujen liimautumista yhteen, jolloin saadaan positiivinen tulos. Vastaavasti saadaan negatiivinen tulos, jos immunokomplekseja ei muodostu. (Stevens 2017b, 147–149.)

Erilaisten ihmisen kehon proteiinien määrittäminen, kuten CRP:n mittaaminen nefelometrisesti tai turbidimetrisesti kliinisessä laboratoriossa, samoin kuin CRP:n vierimittaus eli niin kutsuttu ”pikatesti”, perustuu saostumisreaktion mittaamiseen. Reaktio aiheutuu anti-humaani-CRP vasta-aineilla päällystettyjen latex-partikkelien ja näytteen sisältämän CRP:n välillä tapahtuvasta immunologisesta reaktiosta. (Diagnostic Automation 2015.)

2.3 Reagenssit

Materiaalistandardit ovat erityisen tärkeitä biolääketieteen alalla, missä määrittelyihin kuuluvat monimutkaisia aineita vaativat näytemuodot, kuten esimerkiksi proteiinit seeruminäytteessä. (Batty 1976, 124.) Reagensseja koskevia vaatimuksia on monenlaisia. Niitä on olemassa yleisiä sekä suurimmaksi osaksi reagenssikohtaisia, jotka voivat liittyä aineen säilymisen olosuhteisiin, kuten lämpötila tai valosta suojaminen, käyttöajan voimassaoloon tai erikoiseen käsittelyyn. (Howanitz & Howanitz 1997, 1185). Nämä ovat välttämättömiä ja tärkeitä tekijöitä huomioida määrittelyjen tarkkuuden sekä toistettavuuden varmistamiseksi.

Nykyään on mahdollista tuottaa lukuisia määriä erilaisia puhdistettuja antigeenejä ja vasta-aineita keinotekoisesti. Ne voivat kuitenkin olla epästabiileja, eivätkä välttämättä käyttäydy samalla tavalla kuin luontaiset vasta-aineet ja antigeenit. Tämä voi johtaa eri määrityskertojen välillä toistettavuuden häiriintymiseen ja virheellisiin mittaustuloksiin. Yleisten standardien mukaan immunologisissa määrityksissä reagenssien on oltava vakaita, fysikaalisesti homogeenisia eli tasakoosteisia, puhtaita ja bakteerikontaminaatio-vapaita. (Batty 1976, 124.)

Vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti kiinnostuksen kohteena olevaan antigeeniin, käytetään lukuisissa immunomäärityksissä. Esimerkiksi ELISA-määritykset eli entsyymivälitteiset immunosorbenttimääritykset mahdollistavat spesifisten proteiinien havaitsemisen sekä kvantitatiivisen määrityksen. Immunohistokemia mahdollistaa spesifisen proteiinin lokalisoinnin solussa tai kudoksessa ja immunosaostus mahdollistaa tietyn proteiinin eristämisen proteiinien seoksesta. (Pacific Immunology 2018.)

Sekä polyklonaalisilla että monoklonaalisilla vasta-aineilla on omat edut ja haitat, jotka tekevät niistä käyttökelpoisia eri sovelluksissa (taulukko 1). Polyklonaalisten vasta-aineiden etuja ja haittoja ovat määritetty pääasiassa niiden multiepitopispesifisyyden perusteella ja vastaavasti monoklonaalisilla vasta-aineilla niiden korkean spesifisyyden antigeenin ja saman epitopin suhteesta toisiinsa (kuva 5). (Kricka, Phil, Chem & Path 2008, 156–157.)

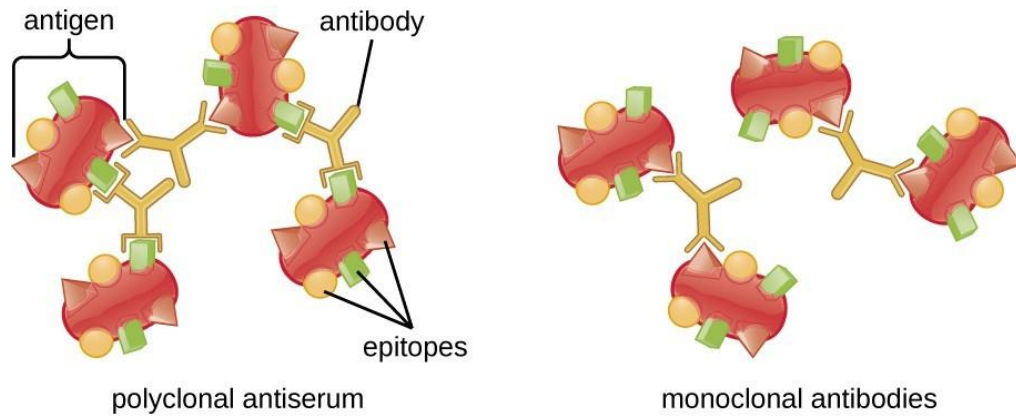
Polyklonaalisia vasta-aineita tuotetaan injektoimalla eläin (esim. hiiri tai kani) immunogeenillä eli halutulla antigeenillä. Sen jälkeen, kun eläin on rokotettu spesifisellä antigeenillä primaarisen immuunivasteen aikaansaamiseksi, eläin voidaan injektoida toisen ja kolmannenkin kerran. Tämä aikaansaa vahvemman immunisaation ja korkeamman vasta-aineiden määrän haluttua antigeeniä vastaan. Immunisoinnin jälkeen polyklonaaliset vasta-aineet voidaan eristää suoraan seerumista eli verestä, josta hyytymisproteiinit ja punasolut on poistettu, tai puhdistettuna, jolloin saadaan liuos, joka ei sisällä muita seerumin proteiineja. (Miller 2017, 469.)

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan identtisiä B-imusoluja käyttäen, jotka ovat klooneja yhdestä B-imusolusta. Tämä tarkoittaa sitä, että monoklonaalisilla vasta-aineilla on hyvin spesifioitu affiniteetti eli kyky tunnistaa vain yhden tietyn epitopin

antigeenistä. Toisin kuin elävien eläinten tuottamat polyklonaaliset vasta-aineet, monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan niin kutsutulla ex vivo-menetelmällä hyödyntäen kudosisviljelmätekniikoita. Prosessi alkaa injektoimalla useita kertoja haluttu antigeeni eläimeen, usein hiireen. Kun eläin kehittää immuunivasteen, B-lymfosyytit eristetään eläimen pernasta ja fuusioidaan myeloomasolulinjan kanssa, jolloin syntyy B-solun ja myeloomasolun jatkuvasti jakautuvia hybridisoluja. Yksittäisen hybridoomasolun muodostamia soluklooneja viljellään erillään ja loppuvaiheessa testataan. (Kricka ym. 2008, 156–157.)

	Polyklonaaliset vasta-aineet	Monoklonaaliset vasta-aineet
Edut	<ol style="list-style-type: none"> 1) Lyhyt tuotantoaika ja alhaiset kustannukset. 2) Hyvin stabiili ja kestävä pH:n tai puskurin muutoksiin. 3) Suuri affiniteetti. Koska vasta-aineet sitoutuvat useampaan kuin yhteen epitooppiin, ne pystyvät vahvistamaan signaalin kohdeproteiinin alhaisellakin pitoisuudella. 4) Polyklonaaliset vasta-aineet ovat vähemmän herkkiä antigeenin muutoksille (lievä denaturointi, polymorfismi ym.) 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Erittäin spesifinen tunnistus yhden tietyn epitoopin suhteen. 2) Kuolemattomien hybridoomasolulinjojen kyky tuottaa rajoittamattomia määriä vasta-aineita. 3) Koostumuksen suuri toistettavuus määritysten välillä. 4) Vähäinen tausta- ja ristireaktiivisuus
Haitat	<ol style="list-style-type: none"> 1) Alttius vaihtelevuuteen erästä toiseen. 2) Useiden epitooppien vuoksi ristireaktiivisuuden todennäköisyys 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen vie aikaa ja vaatii korkeat tekniset taidot. 2) Liian korkea spesifisyys saattaa olla haittana eri lajien välillä. 3) Herkkyys epitoopin rakenteen muutoksiin, joka voi negatiivisesti vaikuttaa sitoutumiskykyyn.

TAULUKKO 1. Polyklonaalisten ja monoklonaalisten vasta-aineiden edut ja haitat immunologisissa määrityksissä (Creative Diagnostics 2018, muokattu)



KUVA 5. Polyklonaalisten ja monoklonaalisten vasta-aineiden spesifisyys (Creative Diagnostics 2018)

Polyklonaaliset vasta-aineet ovat täydellisiä reagensseja diagnostisissa määrityksissä ja hemagglutinaatio-reaktioissa, koska ne kykenevät tunnistamaan kohdemolekyylin eri epitoopit. Polyklonaalisten vasta-aineiden paras ominaisuus on myös kyky tunnistaa tuntemattomia antigeenejä. Polyklonaalisia vasta-aineita käytetään mm. sekundaarisena vasta-aineena immunoanalyyseissä (esim. ELISA, Western blotting, microarray-määritykset, immunohistokemia, virtausytometria). Niiden tehtävänä on sitoutua eri epitooppeihin ja vahvistaa signaalia, mikä johtaa parempaan tunnistukseen. (Liddell 2013, 248–249.)

Monoklonaaliset vasta-aineet puolestaan tarjoavat rajoittamattoman valikoiman homogeenisia vasta-aineita, joiden ominaisuudet ovat tutkittavissa ja siten ennustettavissa. Monoklonaalisia vasta-aineita käytetään usein primäärisinä vasta-aineina immunoanalyyseissä johtuen niiden kyvystä spesifisesti sitoutua yhteen antigeenin epitooppiin. Nykyään eri vasta-ainetyyppien haitat kliinisessä käytössä pystytään mitätöntämään mm. puhdistamalla polyklonaalisia vasta-aineita ristireaktiivisuuden vähentämiseksi tai käyttämällä monoklonaalisten vasta-aineiden yhdistelmiä reaktioiden spesifisyyden laajentamiseksi. (Bhagavan 2002, 819–820.)

Immunologisissa määrityksissä merkittävä rooli on myös puskuriliuosten käytöllä. Niitä käytetään muun muassa: tutkittavien proteiinien laimentamiseen, säilyttämiseen sekä niiden ominaisuuksien ja rakenteiden suojaamiseen. Puskuriliuoksia käytetään esimerkiksi myös fermentointiprosesseissa eli käymisessä, jossa pilkotaan orgaanisia

aineita, kuten hiilihydraatteja tai aminohappoja, kemiallisissa analyyseissa, pH-mittareiden kalibroinnissa ja DNA:n eristämisessä. (Helmenstine 2018.)

Happoarvon muuttumisen taustalla ovat liuokseen sisältyvät ionit - vetyionit (H^+) ja hydroksidi-ionit (OH^-). Vetyionien lisääminen korottaa vetyionien konsentraatiota, joten pH-arvo laskee. Hydroksidi-ionit taas pystyvät yhdistymään liuoksessa vetyionien kanssa, muodostaen vettä (H_2O) ja näin ollen poistaen vetyioneja ja nostaen pH:ta. Puskuriliuoksen tehtävä on vastustaa näitä muutoksia. (International Labmate Ltd 2014.)

Puskuriliuos valmistetaan heikosta haposta ja sitä vastaavasta emäksestä (suolamuodossa) tai heikosta emäksestä ja sitä vastaavasta haposta. Esimerkiksi emästä lisätessä OH^- ionit muodostavat liuoksessa olevien H^+ ionein kanssa vettä, joilla puskuriiin sisältyvä heikko happo pystyy kompensoimaan vetyionien kulumista hajoamalla osittain. Jos liuokseen lisätään happoa, siitä muodostuvat ylimääräiset vetyionit yhdistyvät konjugoidun emäksen kanssa heikoksi hapoksi eli huonosti liukenevaksi hapoksi. Näin OH^- ja H^+ ionien konsentraatiot pysyvät suhteellisen samana, eivätkä muuta pH-arvoa merkittävästi. Puskuriliuokset esiintyvät luonnollisesti veri-plasmassa, minkä takia veressä pystytään säilyttämään tasaisen pH-arvon 7,35 ja 7,45 välillä. (Bhagavan 2002, 4–5.)

Jotta puskuriliuokset olisivat hyödyllisiä kliinisen laboratorion määrityksissä, niiden on täytettävä useita kriteereitä. Erityisesti niiden on oltava vesiliukoisia, mutta liukenemattomia orgaanisiin liuottimiin. Lisäksi niiden on oltava myrkyttömiä, inertejä eli reagoimattomia muiden aineiden kanssa sekä stabiileja kaikissa kokeissa, joihin niitä käytetään. (Helmenstine 2018.)

Vierianalytiikassa, kuten esimerkiksi QuikRead go CRP pikatestissä, käytetään käyttövalmiita reagenssipakkauksia, jotka sisältävät kaikki tarvittavat reagenssit ja tarvikkeet testin suorittamiseen, eikä niitä tarvitse käsitellä käsin. Reagensseja sisältävät kyvetit ja korkit mahdollistavat nopean ja toistettavan diagnostiikan kliinisen laboratorion ulkopuolella. Kyvetissa oleva puskuriliuos hemolysoi kokoveren verisolut ja reagenssien lisäyksen jälkeen seoksen saostumisreaktio mitataan immunoturbidimetrisesti. (Orion Diagnostica n.d.)

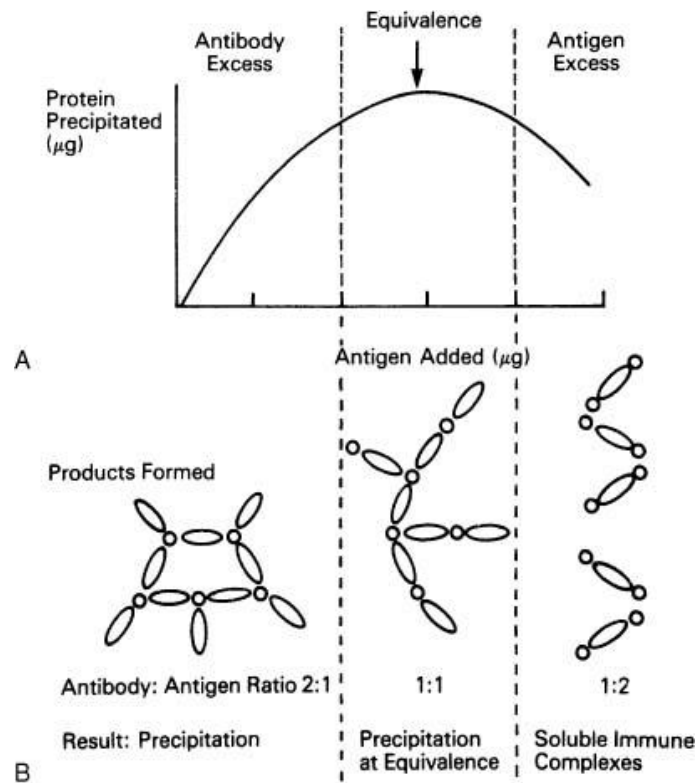
2.4 Virhelähteet immunokemiallisissa määrittelyissä

Immunoanalyysissä antigeenien ja vasta-aineiden välinen ei-kovalenttinen sidos on hyvin spesifinen, mutta siitä huolimatta niiden reaktioissa saattaa esiintyä häiriöitä. Immunologista reaktiota häiritseviä haitallisia aineita voivat esiintyä sekä näytteessä, että reagensseissa. Jotkin häiriötekijät ovat samankaltaisia kuin kemiallisissa määrittelyissä. Immunoanalyysille tyypillisiä häiriötekijöitä ovat esimerkiksi hook-efekti, ristireagointi rakenteellisesti samanlaisten tai identtisten epitooppien kanssa, heterofiiliset vasta-aineet, autovasta-aineet ja matriisin vaikutus. (Meulenberg 2012.)

Kaikkien immunoanalyysien pääominaisuus on se, että reagenssi, joka havaitsee kohdeanalyytin, sisältää sitä vastaavaan spesifisen vasta-aineen. Näin alhaisen vasta-ainespesifisyyden takia analyysissä voi esiintyä virheelliset korkeat tulokset. Lisäksi preanalyttiset tekijät voivat vaikuttaa reaktioiden kulkuun ja tuloksiin. (Meulenberg 2012.)

Vasta-aineen ja antigeenin suhde on yksi tärkeimmistä virhelähtieistä, jota Heidelberger ja Kendall kuvasivat vuonna 1929. He tutkivat, miten antigeenin lisäys vaikuttaa presipitaatin eli saostuman muodostumiseen, kun vasta-aineen määrä pysyy vakiona. He osoittivat kokeellisesti, että antigeenin määrän lisääntyessä liuoksessa, presipitaatin muodostus lisääntyy tiettyyn pisteeseen sakka. Immunopresipitaattikäyrästä (kuva 6) tuli perusta kaikille homogeenisille immunologisille mittauksille ja se tulee huomioida jokaisen menetelmän käyttöönoton yhteydessä. (Tulip Diagnostics Ltd n.d., 15.)

Vasta-aine ja antigeeni ovat reaktion alussa liukoisessa muodossa. Kun nämä sekoittuvat keskenään ja reaktio käynnistyy, syntyy liukenemattomia immunokomplekseja eli yhteen liittyneitä vasta-aine-antigeenimolekyylejä. Presipitaatti eli sakka syntyy, kun nämä immunokompleksit muodostavat isompia partikkeleita sitoutumalla ristiin. Presipitaatin määrään vaikuttaa vasta-aineen määrällinen suhde antigeeniin. (Marmer & Hurtubis 1996, 366.) Immunopresipitaattikäyrä kuvaa, kuinka suuri määrä presipitaattia syntyy eri antigeenimäärästä, kun vasta-aineen määrä on vakio. Kuvaaja on menetelmäkohtainen.



KUVA 6. Heidelberger-Kendall-käyrä (Berzofsky, J., Berkower, I. & Epstein, S. 2003)

Käyrä voidaan jakaa kolmeen osaan. Ensimmäisessä vaiheessa vasta-ainetta, ja siten sitoutumiskohtia, on ylimäärä. Presipitaatin määrä kasvaa, kun antigeenia sitoutuu yhä enemmän vapaina oleviin sitoutumiskohtiin. (Tulip Diagnostics Ltd n.d., 15.) Nefelometrillä mitattaessa tämä ilmenee havaitun valon sironnan määrän kasvuna.

Toisessa vaiheessa reaktioseoksessa ei enää ole vapaata vasta-ainetta, eikä antigeenia. Tilaa kutsutaan saturaatioalueeksi, jossa vasta-aineen kaikki sitovat paikat ovat täytetty antigeenilla. Reaktio on silloin tasapainotilanteessa. Presipitaattia ei muodostu lisää, mutta immunokompleksit pystyvät vielä kiinnittymään isommiksi partikkeleiksi. (Ullman 2013, 67.)

Kolmas vaihe kuvaa tilannetta, jossa antigeenikonsentraatio on suuri. Vasta-aineen määrään verrattuna antigeeniyylimäärä on korkea. Kaikki vasta-aineen sitoutumiskohtat ovat nyt ylikuormitettuja. Tämä estää presipitaatin syntymisen. Supernatantissa eli ympäröivässä nesteessä on runsaasti liukoisia immunokomplekseja. Syntyy vain pieniä presipitaattihiukkasia, jotka eivät pysty tekemään keskenään ristikkäisiä sidoksia.

Nefelometriassa tässä tapauksessa sironneen valon määrä laskee antigeenikonsentraation kasvaessa. Syntyy vääriä mittaustuloksia - liian matalia tai lähes nolla-tuloksia. Ilmiötä kutsutaan prozone- tai hook-efektiksi. (Tulip Diagnostics Ltd n.d., 16; Berzofsky, Berkower & Epstein 2003.)

Suuren annoksen hook-efekti (eng. high-dose hook effect) esiintyy enimmäkseen yksivaiheisessa immunometrisessä määrittäyksessä ("sandwich"), mikä vähentää signaalia analyytin erittäin suurella pitoisuudella (Fernando & Wilson 1992). Immunoanalyyseissä näyte voi sisältää erittäin suuret analyyttipitoisuudet, kuten ferriitti, kasvuhormoni, hCG, tuumoramerkit tai CRP-määrittäyksissä. Antigeeni-vasta-ainereaktiot tapahtuvat antigeeniyliäärässä ja saattavat siten johtaa virheellisesti matalaan tulokseen, mikä voi aiheuttaa mahdollisesti virheellisen diagnoosin. (Cole, Shahabi, Bulter & Mitchell 2001.)

Edellä mainittu ilmiö voidaan välttää lisäämällä reagensseina käytettävien vasta-aineiden määrää ja vähentämällä näytteen määrää laimennuksella (Cole ym. 2001). Kliinisissä laboratorioissa näytteen laimentamisesta tuli yleinen käytäntö, koska erityisesti patologiset näytteet tutkitaan uudelleen useilla laimennuksilla tuloksen tarkistusta varten.

Nefelometrisen mittauksen tulee tapahtua vasta-aineyliäärän läsnäollessa. Reaktioon lisätään polymeerejä tai hydrofiilistä aineita, jotta immunokompleksien muodostuminen nopeutuisi. Käytetty polymeeri on polyetyyliyglykoli eli PEG, jonka molekyylipaino on 8000Da. Aineet vähentävät proteiinimolekyylien liukoisuutta sekä saattavat vasta-ainemolekyylit ja antigeenin lähelle toisiaan. Näin ilmennetään vasta-aineyliääräaluetta immunopresipitaattikäyrässä. Laajennus mahdollistaa suurempien antigeenipitoisuuksien mittaamisen ilman laimentamista. (Marmer & Hurtubis 1996, 372.)

Määrittäyksissä mahdollisesti esiintyviä häiriöitä voidaan ehkäistä muun muassa vasta-aineiden ja merkkiaineiden tarkalla valinnalla, puskurin optimoinnilla sekä käyttämällä reagensseja, joiden epäspesifinen sitoutuminen on todella pieni marginaalista. Puskuriliuksilla vaikutetaan eri määriin näytteessä olevien proteiinien mahdollisesti aiheuttamiin virheisiin ja epäspesifisiä sitoutumisia voidaan yrittää estää hyödyntämällä vasta-aineita, joista uupuu varsinkin komplementtia sitova Fc-osa. (Gosling 1990.)

3 NEFELOMETRIA JA MININEPHPLUS™

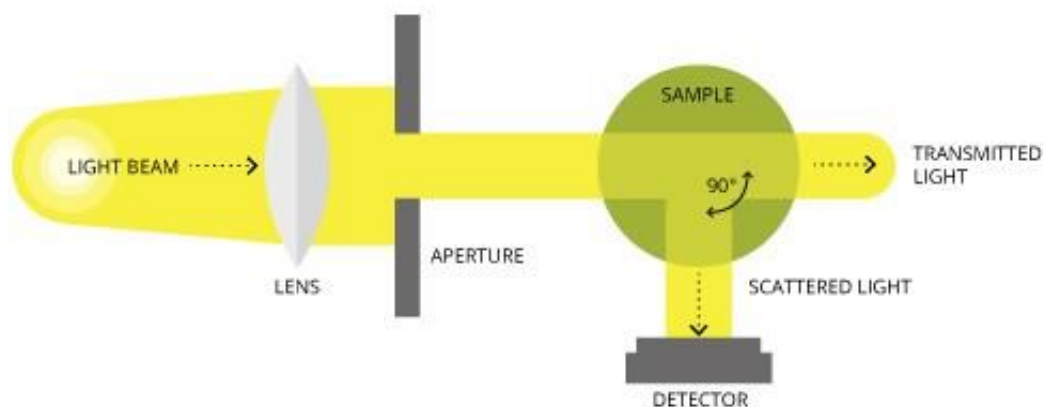
3.1 Nefelometrian periaatteet ja kliininen käyttö

Nefelometria on tutkimus- ja analyysimenetelmä, joka mittaa sen valon intensiteettiä, joka siroutuu aineen partikkeleista. Tämän periaatteen perusteella määritetään aineen (näytteen) sameus. Nefelometriä menetelmänä voidaan käyttää näytteen tai erilasten liuosten sisältämien erikokoisten partikkelien konsentraation mittauksessa. Tavallisimmin näytteistä tai liuoksista havaitaan mahdollisia muodostuneita antigeeni-vasta-ainekomplekseja sekä kudostunneen eri proteiineja. (Kricka ym. 2008, 162.)

Nefelometrisessä mittauksessa mitataan antigeenien ja vasta-aineiden reaktion etenemistä käytetään sironneen valon mittausta. Liuoksessa olevat immunokompleksit muodostavat presipitaatteja eli sakkaa. Presipitaatti on nesteessä oleva liuksesta saostunut kiinteä, yleensä vaikeasti liukeneva tai liukenematon aine (Tietosanakirja 1916, 554).

Nefelometrisessä mittauksessa yhdensuuntainen valonsäde ohjataan tutkittavia partikkeleita sisältävän liuoksen läpi. Osa valosta, joka osuu partikkeleihin, absorboituu, heijastuu, siroaa tai menee liuoksen lävitse. Nefelometria perustuu näytteen partikkeleista sironneen valon mittaamiseen. Siroavan valon detektio voi tapahtua 90°, 70° tai 37° kulmassa riippuen siitä, missä suunnassa suurin osa valonsäteestä siroaa. (Khouja 2010.)

Mittauksessa tarvitaan hyvin vahva valonlähde ja herkkää fotodetektoria, joka tunnistaa sironneen valon säteet. Koska immunokompleksilla on taipumus taittaa valoa enemmän eteenpäin kuin sivulle, fotodetektorit on sijoitettu 90° kulmaan (kuva 7). Mitattava näyte on hyvin laimea, jotta minimoidaan valon takaisin heijastuma ja sen absorboituminen mitattavaan aineeseen. Suorassa linjassa valonlähteeseen nähden oleva detektorit mittaa herkästi häiritsevää taustaa eli taustahälyä. (Marmer & Hurtubis 1996, 372.)



KUVA 7. Nefelometrin toimintaperiaate (Fondriest Environmental n.d.)

Turbidimetrisessä menetelmässä valon määrä, joka läpäisee liuoksen, laskee, kun saostuman määrä kasvaa. Koska sironneen valon määrä on paljon suurempi kuin läpäisevän valon määrä, nefelometria antaa suuremman herkkyuden mittauksissa kuin turbidimetria, joka perustuu liuoksen läpäisseen valon mittaamiseen. (Khouja 2010.)

Valon sironta käyttäytyy erilaisin tavoin ja siihen voi vaikuttaa muun muassa valon aallonpituus ja näytteessä olevien partikkelien koot. Partikkelin koon mittaamiseen hyödynnetään valon siroamista eri kokoisista partikkeleista. (Rocks 1998; Åkerman & Jokela 2010.) Pienistä partikkeleista siroavan valon intensiteetti on pieni ja partikkelikoon kasvaessa siroavan valon intensiteetti kasvaa.

Sironneen valon mitattu intensiteetti riippuu monista erilaisista tekijöistä, kuten valonlähteen aallonpituudesta, siroavien hiukkasten koosta, poikkeaman kulmasta sekä siroavien hiukkasten pitoisuudesta. Valo siroaa paljon tehokkaammin, jos siroavien partikkelien koko on melkein sama, kuin valonlähteen aallonpituus. Partikkelit, jotka ovat pienempiä, kuin siroavan valon aallonpituus, huonontaa mittaustuloksen luotettavuutta, eli sironta paranee, kun partikkelien koko lähenee valonsäteiden kokoa. (Marmer & Hurtubis 1996, 368.)

Laboratio-olosuhteissa nefelometrinen menetelmä voidaan automatisoida niin, että se saadaan kytkettyä automaattioradan osaksi omana mittaussyksikkönä. Nefelometrisia analysaattoreita käytetäänkin useimmiten yksittäisinä laitteina turbidimetrisen menetelmään verrattuna. Turbidimetriset määrittelyt voidaan mitata samalla

spektrofotometrillä, jolla mitataan kolorimetrisiä ja kineettisiä mittauksia ja laite on helppo yhdistää erilaisiin automaattiratoihin. (Khouja 2010.)

Nefelometriä käytetään laajalti mitattaessa proteiinien tai partikkelien pitoisuuksia näytteestä. Reaktiossa tapahtuu antigeeni-vasta-ainereaktio. Mahdolliset proteiinit tai partikkelit sekä niille spesifiset vasta-aineet reagoivat liuoksessa muodostaen yhdessä komplekseja. Nämä immunokompleksit siroavat valoa enemmän kuin kyseiset molekyylit tai partikkelit ilman kompleksin muodostusta tai yksittäisinä partikkeleina. (Rocks 1998.)

Menetelmällä määritetään yleensä yksittäisten seerumin proteiinien pitoisuuksia, kuten haptoglobiinin, transferrinin, I-antitrypsiiniä ja virtsan albumiinia. Tällöin käytetään kullekin analyysille spesifisiä vasta-aineita, sillä menetelmällä pystytään mittaamaan näytteen sisältämien molekyylien koot ja määrät. (Khouja 2010.) Menetelmää hyödynnetään mm. virtsan, seerumin tai selkäydinnesteen proteiinien tai partikkelien mittauksessa.

Nefelometriä käytetään mm. CRP:n eli ns. akuutin vaiheen C-reaktiivisen proteiinin mittaamisessa. Laitteiden mittaalueet ovat tulehduksellisia tiloja ajatellen niin alhaisia, että näytettä joudutaan laimentamaan hyvin paljon. Määritys tehdään yleensä immunoturbidometrisesti tai leimana käytetyn konjugaatin värin voimakkuuden mittauksena. CRP:tä esiintyy terveelläkin ihmisellä ja pienissäkin tulehdustiloissa sen pitoisuus veressä nousee runsaasti. Mittauksessa näytteet laimennetaan yleensä suhteessa 1:40 ja patologiset näytteet joudutaan usein jatkolaimentamaan. CRP on näin ollen erinomainen analyytin opetuskäyttöön. (MININEPH™ tuote-esite 2014.)

CRP-tutkimusta eli tulehdusarvon mittaamista tehdään myös vierianalyytisesti eli niin sanotulla POC (eng. point-of-care) menetelmillä, jotka ovat riittävän tarkkoja ja paljon nopeampia menetelmiä. Vieritesti on niin sanotusti pikatestinä käytettävä laboratoriotutkimus, jonka avulla tulokset saadaan nopeasti sairauksien diagnostiikkaa tai hoidon seuranta varten. (Nichols 2013, 455–456.)

QuikRead go -vierilaite C-reaktiivisten proteiinien mitattaamiseen toimii immunoturbidometrisesti. Kaikki tarvittavat reagenssit ovat valmiina mittaukseen

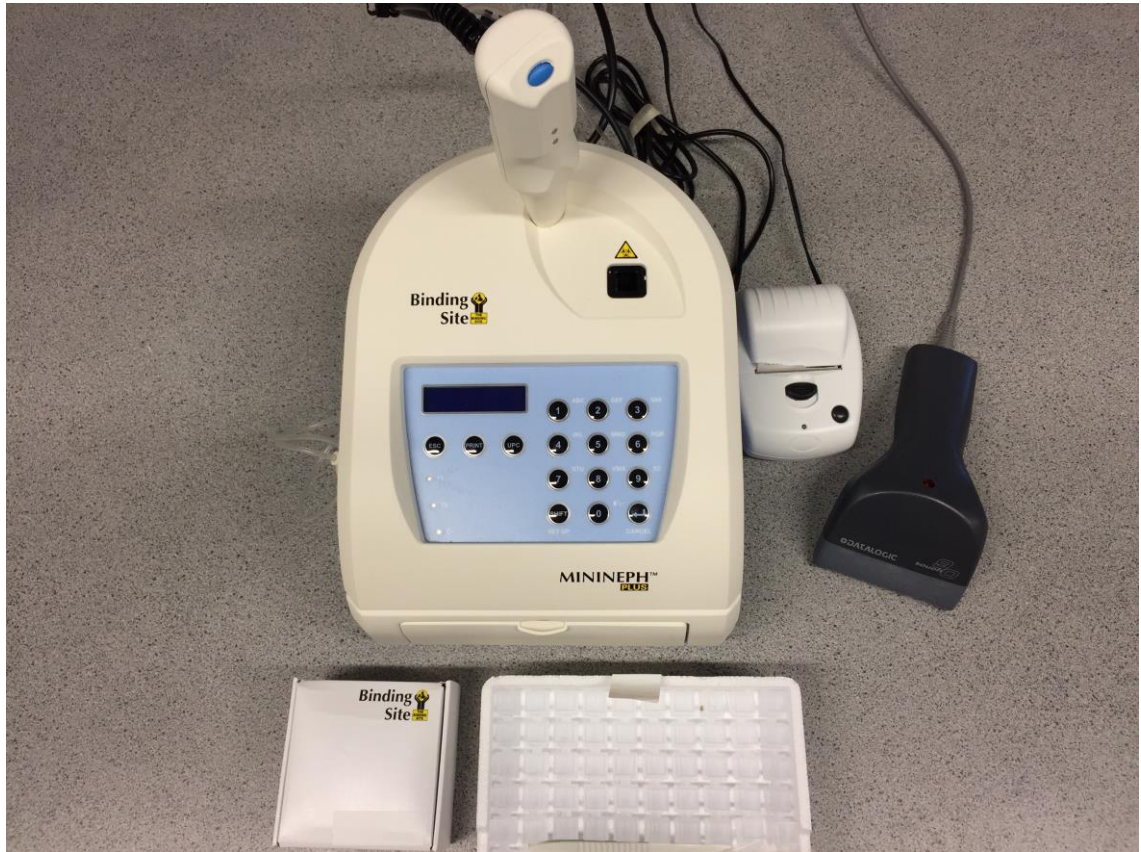
tarkoitetuissa kyveteissä, joihin lisätään tietty määrä näytettä ohjeen mukaan. Näytemuotona voidaan käyttää plasmaa, seerumia tai kokoverta. Tällaiset laitteet on suunniteltu perusterveydenhuollon käyttöön muun muassa lääkärin vastaanotolla diagnoosin tukena ja hoidon seurannassa. Nopeasti saatava CRP arvo voi esimerkiksi auttaa terveydenhuollon ammattilaisia erottamaan bakteeri- ja virusinfektiot toisistaan ja määräämään antibioottihoitoa järkevästi. (Orion Diagnostica n.d.)

Yksi tärkeimmistä nefelometriä käyttäen on monoklonaalisten gammopatioiden diagnostiikka mukaan lukien multippeli myelooma, joka on verisyöpiin lukeutuva luuytimen syöpäsairaus. Kliinisessä laboratoriossa voidaan tehdä immunoglobuliinien (muun muassa IgG, IgE, IgM, IgA) määrittämiä seerumista ja muistakin biologisista nesteistä. Immunoglobuliinit koostuvat toisiinsa kytkeytyneistä kahdesta raskasketjusta ja kahdesta kevyetketjusta. Immunoglobuliinit luokitellaan erilaisiin isotyyppeihin raskasketjutyypin mukaisesti muun muassa IgA, IgG, IgM, IgD ja IgE:hen. Kaikissa isotyypeissä kevyetketjuja on kahta eri tyyppiä, kappa (k) ja lambda (l). Monoklonaaliset gammopatiat, kuten IgG-myelooma, näkyvät vain yhden vasta-ainemolekyylin tuotannon kasvuna. (Nordlab ohjekirja 2017.)

MININEPHPLUSTM -nefelometrin määrittämisvalikoimaan kuuluu muun muassa seerumista tehtävä niin sanottu Freelite-määrittäminen, jossa hyödynnetään polyklonaalisten vasta-aineiden immunologista reaktiivisuutta (The Binding Site 2017b). Määrittäminen tukee monoklonaalisen gammopatian diagnosointia sekä hoidon vasten arviointia.

3.2 MININEPHPLUSTM -analysaattorin ominaisuudet

MININEPHPLUSTM (kuva 8) on kompakti puoliautomaattinen nefelometri, joka mahdollistaa laboratorion tarjoavan kustannustehokkaan palvelun alemman pitoisuuden proteiinimäärittämiselle. Laite on tarkoitettu proteiinien pitoisuuksien määrittämiseen näytteistä kliinistä käyttöä varten. Näytteenä voi olla seerumi tai virtsa. MININEPHPLUSTM mittaa antigeeni-vasta-ainekomplekseista siroavaa valoa proteiinien pitoisuuksien määrittämiseksi. Se suorittaa päätepistemittauksen, jossa reagenssin ja analyytin välisten reaktioiden annetaan kulua loppuun ennen mittauksen aloitusta. (MININEPHPLUSTM ohjekirja n.d.)



KUVA 8. Tampereen ammattikorkeakoulun MININEPHPLUS™ -nefelometri

Valolähde on diodilaseri, joka säteilee 670 nm aallonpituudella. Fokusoitu valo läpäisee kyvetin, joka sisältää oikein laimennettua näyteseosta. Sironnut valo detektoidaan fotodiodilla ja se on suoraan verrannollinen muodostuneiden antigeeni-vatsa-ainekompleksien määrään. Jokaisessa määrittäksessä siroavaa valoa mitataan ensin immunologisen reaktion alkuvaiheessa ja toisen kerran tiettyä ajankohtana. Analyytin konsentraatio lasketaan käyttämällä näiden kahden määrittäksen välistä eroa. (MININEPHPLUS™ ohjekirja n.d.)

MININEPHPLUS™ -analysoittorin määrittäysvalikossa on laaja valikoima määrittäksiä, mukaan lukien immunoglobuliinit, kuten IgG, IgA, IgM, niiden alaluokat, komplementit ja spesifiset proteiinimäärittäykset, kuten albumiini, α 1-antitrypsiini, B2-microglobuliini, C-reaktiivinen proteiini, haptoglobiini, prealbumiini, transferrini ym. (The Binding Site 2017a.) Tässä opinnäytetyön tuotoksessa eli opetusvideossa mitataan C-reaktiivisen proteiinin pitoisuudet, joka on maksan syntetisoima akuutin tulehduksen proteiini.

MININEPHPLUS™ pystyy toimimaan kahdessa lämpötilassa, 30°C ja 45°C, mikä mahdollistaa myös muiden määritysten suorittamisen, jotka edellyttävät korkeampaa lämpötilaa, kuten Freelite. Freelite-määrittäminen koostuu kahdesta herkästä ja spesifisestä immunodiagnostisesta testistä kappa (κ) ja lambda (λ) vapaiden kevyiden ketjujen mittaamiseksi. Kvantitatiivisesti mitattuja seerumin kappa- ja lambda-vapaita kevyitä ketjuja voidaan käyttää monoklonaalisten gammopatioiden ennusteessa ja seurannassa. (The Binding Site 2017d.)

Freelite on lateksi-tehostettu immuunimäärittäminen, joka perustuu polyklonaalisen antiseerumin käyttöön. Menetelmässä käytetään lateksipartikkeleita, jotka ovat päällystettyjä affiniteettipuhdistetuilla polyklonaalisilla vasta-aineilla, mikä varmistaa mahdollisimman monenlaisten vapaiden kevytketjujen tunnistaminen. Määrittäminen on tarjolla sekä nefelometriset, että turbidimetriset reagenssipakkaukset spesifisiin kappa- ja lambda-vapaiden kevytketjujen mittauksiin. (The Binding Site 2017d.)

3.3 Laitteen osat, reagenssit ja tarvikkeet

MININEPHPLUS™ peruspakkaukseen sisältyy analysaattori, sähköinen pipetti, jäteastia, viivakoodinlukija, tulostin sekä käyttöohje. Lisävarustepakkaus sisältää mittauskyvetit, näytelaimentimet, puskuriliuokset ja sekoitussauvat. Jääkaappilämpötilassa (2-8°C) säilytettävään reagenssipakkaukseen kuuluu antiseerumit, kontrollit sekä magneetikortti. Puskuriliuokset sekä näytelaimentimet säilytetään huoneenlämmössä (18-22°C). Kaikki MININEPHPLUS™ -kitit sisältävät korkean ja matalan tason kontrollit sekä magneetikortin, joka sisältää eräkohtaisen kalibroitikäyrän ja määrittämissparametrit. (MININEPH™ tuote-esite 2014.)

MININEPHPLUS™ on suhteellisen helppokäyttöinen mittauslaite, koska laite kykenee avustamaan tekijää testien suorituksessa näytölle tulevien ohjeiden avulla. Kone sisältää integroidun elektronisen pipetin, joka on tehty hyvää ergonomiaa ajatellen. Koneen ohjelmistoon kuuluu myös Fail-safe-assay-start-mekanismi, joka suojaa konetta tuhlaamasta kalliita reagensseja. (The Binding Site 2017c.)

Nefelometrinen määrittäminen alkaa, kun pipetti aktivoidaan eli nostetaan pois paikaltaan, vähentäen mahdollisuutta kontaminaatiolle ja siitä johtuvien reagenssien

tunnistusvirheitä, mikä säästää aikaa ja reagensseja sekä samalla lisää luottamusta tuloksiin. Sähköinen pipetti pystyy ohjeistamaan tekijää reagenssien pipetoinnissa antamalla tarkat ohjeet, jotka näkyvät laitteen näytöllä. Siinä vaiheessa, kun tarvittavat reagenssit lisätään näytettä sisältävän kyvetiin, pipetti tekee ilmavälin puskuriliuoksen ja antiseerumin välille estäen niiden ennenaikaisen reaktion. Määrittäminen alkaa automaattisesti sen jälkeen, kun sähköpipetti tyhjenee kyvetiin. Tällainen toiminta puolestaan parantaa tulosten tarkkuutta ja huolellisuutta. (The Binding Site 2017d.)

Reagenssipakkaukseen kuuluvat aineet käsitellään aina ohjeiden ja suositusten mukaisesti, jotta mittausten toistettavuus sekä laadun taso pysyisi samana. Esimerkiksi kuivareagenssien, kuten antiseerumi eli MININEPH Human CRP Reagent, tarkka laimentaminen ja seisottaminen tietyn ajan sekä reagenssien oikea lämpötila ovat tärkeitä tekijöitä huomioida. Antiseerumi on anti-humaani CRP vasta-ainereagenssi, joka koostuu monospesifisillä vasta-ainemolekyylillä päällystetyistä polystyreeni-mikropartikkeleista eli ns. latex-partikkeleista. Se toimitetaan kylmäreagenssina, joka sisältää 0,099% natriumatsidia, 0,1% EACA:ta, 0,01% bentsamidiinia ja 0,05% ProClin-säilöntäainetta. Antiseerumireagenssi palautetaan nestemäiseksi liuottamalla se 1,0 ml tislattulla vedellä, jonka jälkeen sen annetaan seistä 30 minuuttia ennen käyttöä. (MININEPH™ tuote-esite 2014.)

Antiseerumia käsiteltäessä tarvittava määrä reagenssia tulee annostella erilliseen putkeen, ettei alkuperäinen pullo kontaminoidu. Antiseerumit ovat kalliita ja kittikohtaisia reagensseja, eikä niitä voi hankkia erikseen. Yksi vasta-ainetta sisältävä reagenssipullo (1 ml) riittää 25 määrittäykseen eli 40 ul per mittaus. (MININEPH™ tuote-esite 2014.) Tästä syystä reagenssien pipetointiin suositellaan käänteinen menetelmä, joka mahdollistaa tarkan nesteiden annostelun ilman hukkaa.

Reagenssipakettiin kuuluu myös mittausseosta stabiloiva puskuriliuos eli MININEPH CRP Buffer, jota käytetään vain saman erän CRP-reagenssien kanssa. Yhden pullon tilavuus on 25 ml, johon sisältyy 0,099% natriumatsidia säilöntäaineena ja jota kulutetaan 400 ul yhtä mittausta kohti. Laitteen toimivuuden ylläpitämiseen käytetään myös erikseen hankittava ns. On-Board Buffer eli mittarin letkujen huuhteluun käytettävä pesupuskuri. Sitä tarvitaan mm. Prime-vaiheessa eli silloin, kun laite saadaan käyttökuntoon

huuhtelemalla letkuja ja poistamalla niistä ilmakuplia, jonka jälkeen On-Board puskuri valuu takaosassa olevaan jäteastiaan. (MININEPH™ tuote-esite 2014.)

Laitteen kalibrointiin käytetään eräkohtaisia magneetikortteja (MININEPH CRP Swipe Card), johon on koodattu yksityiskohtaisia tietoja reaktiokäyristä. Ne ovat reagenssieräkohtaisia ja korttia on käytettävä vain saman erän yhteydessä. Kaikkiin reagenssipakkauksiin sisältyy myös eräkohtaisia korkean ja matalan tason kontrolleja (MININEPH Human CRP Hight and Low Controls). Kontrollit ovat kylmäkuivattuja reagensseja, jotka koostuvat ihmisen normaalista hyytymisverestä saadusta seerumista. Ennen työn aloitusta kontrollit laimennetaan 0,5 ml:llä tislattua vettä ja annetaan seistä 15 minuuttia. Kontrollireagenssit sisältävät 0,099% natriumatsidia, 0,1% EACA:ta ja 0,01% bentsamidiinia säilöntäaineena. CRP:n pitoisuuksien hyväksyttävät alueet ilmoitetaan pakkaukseen kuuluvassa laaduntarkkailuohjeessa. (MININEPH™ tuote-esite 2014.)

4 OPETUSMATERIAALIN TUOTTAMINEN OPINNÄYTETYÖNÄ

4.1 Toiminnallinen opinnäytetyö

Toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää ammattilista toimintaa työelämässä sen ohjeistamisen, järjestämisen tai järjeistämisen avulla. Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena on luoda toiminnallinen tuotos, joka voi olla esimerkiksi ohjevihko, opas, oppimateriaali tai video. Lisäksi tavoitteeksi asetetaan yleensä se, että tuotoksen tulee olla uusi ja aikaisempaa parempi sekä sisältää uutta tietoa. (Salonen 2013, 7.) Ongelman ratkaiseminen, jonkin prosessin kuvaaminen ja sen vaiheiden analysointi tai alan käytäntöjen kehittäminen ovat yleisimpiä toiminnallisen opinnäytetyön kohteita.

Toiminnallinen opinnäytetyö on kokonaisuus, joka koostuu kahdesta osasta: toiminnallisesta osuudesta eli tuotoksesta ja opinnäytetyöraportista eli opinnäytetyöprosessia kuvailevasta kirjallisesta osuudesta, joka sisältää tehdyn työn dokumentoinnin ja arvioinnin tutkimusviestinnän vaatimusten mukaan. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotos pohjautuu aina teoreettiseen ammatilliseen tietoon ja sen tuntemukseen, ja siten toiminnallinen opinnäytetyöraportti sisältää aina myös niin sanotun teoreettisen viitekehysosuuden. (Vilka & Airaksinen 2003.)

Toiminnallisen opinnäytetyön raportti on kokonaiskuvaus työn prosessista ja etenemisestä, tekijän omasta oppimisesta, työn tuloksista ja johtopäätöksistä. Jotta raportti olisi helposti luettava, tekijän tulee panostaa sen sisällön selkeyteen ja konkreettisuuteen. (Salonen 2013, 23–24.) Tekstin havainnollistamiseen voidaan myös käyttää kuvia, kaavioita ja taulukoita niin, että se tukee ja selkeyttää sisältöä.

Yksi olennaisimmista osista toiminnallisen opinnäytetyön raportissa on tekijän oman tekemisen ja oppimisen analysointi sekä arviointi. Tekijän on pystyttävä perustelemaan tehtyjä valintojaan ja päätöksiään, sekä kuvaamaan mahdollisia muutoksia työn suunnitelmassa ja etenemisessä. Lisäksi opinnäytetyön tekemisen ja arvioinnin aikana tekijän on osattava avoimesti vastaanottaa rakentavaa palautetta sekä hyödyntää sitä tavoitteiden saavuttamiseksi.

4.2 Video opetusmateriaalina

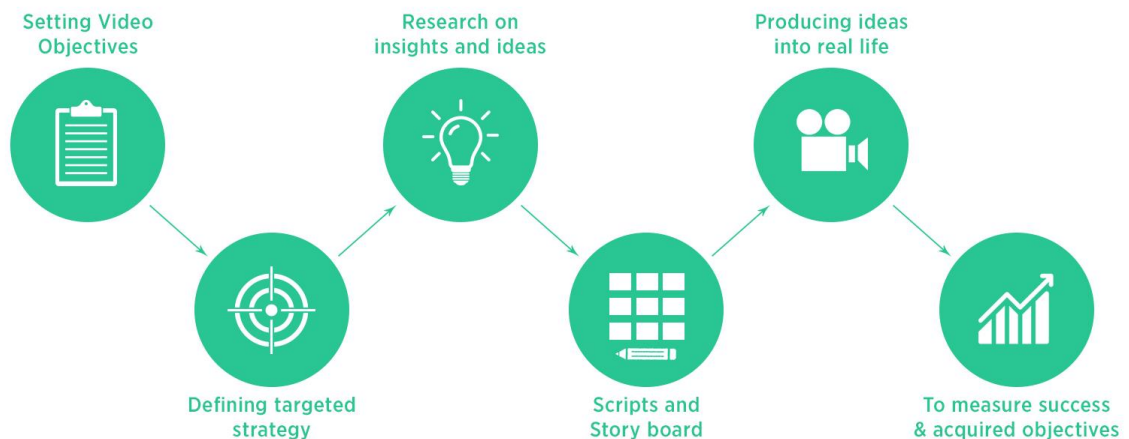
Ihmiset oppivat asioita monilla eri tavoilla. Oppimistapoja jaetaan karkeasti kolmeen pääluokkaan, jotka ovat visuaalinen, auditiivinen ja kinesteettinen. Visuaalinen oppija oppii asioita havainnoimalla, tarkastelemalla ympäristöään ja lukemalla. Hän huomioi miltä asiat näyttävät ja hänelle parhain tapa havainnollistaa asioita on kuvin ja hyvin kuvailtuna. Oppimistyyli on näkeminen ja katseleminen. Auditiivinen oppija oppii kuuntelemalla. Hänellä on muun muassa kielten opiskelussa etu, sillä puhuttua kieltä kuulee yleensä useimmiten. Auditiiviselle oppijalle oppimisen apuna toimii hyvin muun muassa elokuvat ja lyhyet videot. Kinesteettinen oppija oppii tunnuksella asioita. Oppiminen tapahtuu siis kokemalla ja tekemällä käytännössä asioita. Oppiminen on siis paljolti fyysisesti suuntautunutta. Hänelle oppimisympäristön viihtyisyys ja miellyttävä tunnelma ovat oppimisprosessissa tärkeitä. Kokemukset ja tunnelma luokkatilassa on sellaiselle opiskelijalle tärkeää. (Peda-kouluverkko n.d.)

Richard Mayerin (2005, 135) mukaan ihmiset pystyvät oppimaan asioita syvemmin sanoista ja kuvista, kuin pelkästään sanoista. Sanoilla Mayer tarkoittaa kirjoitettua tai puhuttua tekstiä, ja kuvilla taas tarkoitetaan grafiikkaa, valokuvia, animaatioita tai videota. Tutkimuksessaan oletetaan, että multimediaoppimisen kannalta ihminen vastaanottaa tietoja kahdella kanavalla - visuaalisesti ja auditiivisesti. Ne voivat toimia erikseen ja kun ne yhdistetään, ne vahvistavat toisiaan sekä näin saavat aikaan parempia oppimistuloksia. (Mayer 2005, 31, 135.)

Videon hyödyntämisellä opetuksessa on paljon etuja, joista osa pystyy tukemaan oppimista muun muassa isossa ryhmässä. Hyvä puoli videomateriaaleissa on esimerkiksi se, että ne ovat aina opiskelijoiden käytävissä. Kun videota käytetään opetusmateriaalina, oppija voi aina palata siihen kohtaan esimerkiksi mikä jäi epäselväksi ja kerrata itsenäisesti materiaalia. Täten opettajan ei tarvitse käyttää ylimääräistä aikaa teorian uudelleen selittämiseen erillisille opiskelijoille. Lisäksi videon avulla pystytään välittämään sellaista tietoa, mitä ei välttämättä voi kuvailla sanoin riittävän ymmärtävästi ja tarkasti. Suurin osa opetusalan ammattilaisista myöntää, että video on elävä ja viihdyttävä tapa kannustaa oppijan kiinnostusta ja välittää haluttu tieto. (Lautkankare 2014, 4–5.)

Kun puhutaan opetusvideoista, voidaan korostaa muutamia keskeisiä vaatimuksia, jotka on täytettävä, jotta video onnistuu tehokkaasti sen ensisijaisen tarkoituksen toteuttamisessa. Ensinnäkin tekijän tulee miettiä, miten video tuotetaan; hyvälaatuinen video on elintärkeä ja voi vaikuttaa suuresti siihen tapaan, jolla katsoja käsittää viestin. Lisäksi ennen videon luomista on otettava huomioon kohderyhmän luonne ja ominaisuudet. (Pappas 2013.) Tärkeitä tekijöitä ovat muun muassa katsojien ikä, koulutus ja muut vaikuttavat tekijät.

Ennen kuin opetusvideon luominen aloitetaan, tekijän on mietittävää katsojien kiinnostusta aiheesta. Mitä spesifisempi ja vieraampi katsojille videon aihe on, sitä enemmän se vaatii resursseja sen tekemiseen ja suunnitteluun sekä myös enemmän hyötyä siitä on sellaisen aiheen oppimisen kannalta. (Hakkarainen & Kumpulainen 2011, 8–9) Kuva 9. havainnollistaa prosessin etenemisen tavoitteiden asettamisesta onnistuneeseen ja arvioituun tuotokseen.



KUVA 9. Videon tekemisen prosessin eteneminen (Hire Live Support Inc. 2009–2018)

Seuraavaksi tekijän tulee miettiä videon kestoa. Video on pidettävä mahdollisuuksien mukaan lyhyenä ja sen tulee sisältää riittävä, mutta järkevä määrä tietoja. Opetusvideoiden kesto saattaa suuresti vaihdella tieteenalasta sekä aiheesta riippuen, mutta yleensä 5-7 minuuttia ovat tarpeeksi. Lyhyt video on helpompi katsella, selata ja katsoa uudelleen. Liian pitkät videot saattavat heikentää katsojien huomiota sekä mielenkiintoa ja tehdä katsojista passiivisempia tai jopa estää heidän oppimisprosessinsa. (Pappas 2013.)

Viimeiseksi videon tekijän tulee suunnitella sisällön muodot. Oppimistapoja ja -tekniikoita on erilaisia ja siksi videossa tulisi esiintyä erityisiä keinoja erityyppisille oppijoille: esimerkiksi tekstin vahvistus niin sanottu, visuaalisille oppijoille, selkeä puhe niille, jotka oppivat parhaiten kuuntelemalla ja tekstitys muille kuin äidinkielisille. (Hakkarainen & Kumpulainen 2011, 10–11.)

Videon tekeminen on yleensä työlästä ja käy helposti aloittelevan editoijan voimille. Tekijän on hyvä tietää kuvaamisen lisäksi, miten raakaa videomateriaalia editoidaan ja leikataan. Sen vuoksi onkin hyvä, että videon teossa panostetaan ja nähdään riittävästi vaivaa hyvän laadun saavuttamiseksi annetuilla työkaluilla. Yksi tärkeimmistä asioista, mitä videon tekeminen yleensä vaatii aloittelevalta tekijältä, on kiinnostus sekä halu opetella, kuinka materiaalia tehdään laadukkaasti. Videomateriaali, joka toimii samalla myös oppimateriaalina ja jonka tekee opiskelijat, soveltuu hyvin heidän videointiosaamisen kehittämiseen. (Ailio 2015, 4.)

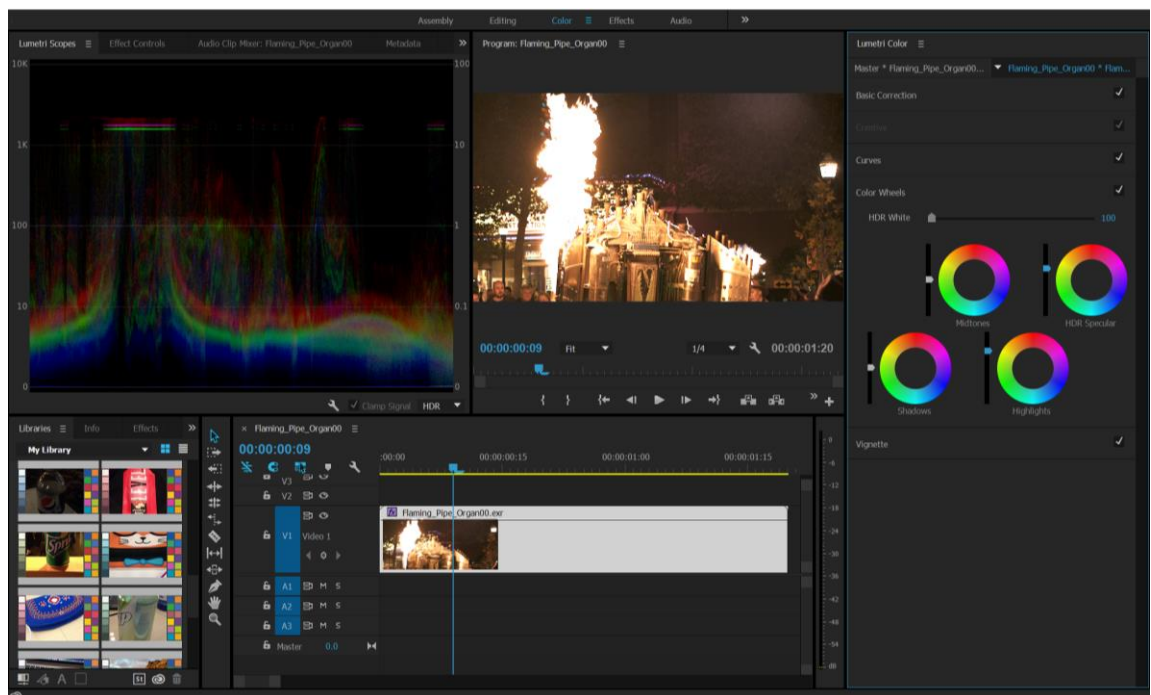
Ennakkosuunnitteluun kuuluu ehdottomasti myös käsikirjoitus, joka toimii hyvänä muistilappuna, jotta eri kuvausvaiheissa muistetaan kaikki mitä on suunniteltu. Käsikirjoitus on myös tietyissä asioissa dokumentti, jonka kommentoiminen ja loppuun saakka hiominen yhteistyökumppanien tai opettajan kanssa, varmistaa videon olevan julkaisukelpoinen. Käsikirjoitus toimii myös selvänä sopimuspaperina videon tilaajan ja tekijän välillä, että materiaali tulee tehtyä valmiiksi saakka. On siis hyvin tärkeää, että käsikirjoitus tehdään huolellisesti ja siinä ei ole yhtään epäselvää kohtaa. (Friedmann 2010, 1–2.) Kuvattua videota on yleensä lähes mahdoton muokata, siksi on olennaista suunnitella kuvausprosessi mahdollisimman tarkasti.

Seuraavaksi, huolellisen suunnittelun ja käsikirjoituksen laadinnan jälkeen, aloitetaan kuvausvaihe. Siinä on syytä kerätä materiaalia niin, että varmistetaan editointivaiheessa koottavan materiaalin onnistuminen. Kuvausvaihe vaatii tekijöiltä yleensä paljon aikaa, malttia ja jaksamista noudattaa jo valmiiksi suunniteltua kohtausten järjestystä ja äänityksen tallentamista. On hyvä muistaa, että kuvatessa jättää tilaa leikkauksen sujuvuuden kannalta. Tapauksessa, kun kuvaajalla ei ole valmista suunnitelmaa, on mahdollista, että kuvattava materiaali jää liian vähäiseksi tai siinä ei ole huomioitu leikkausrajaa. (Lautkankare 2014, 5, 23.)

Editoinnissa eli leikkausvaiheessa videomateriaalia karsitaan ja koostetaan siten, että siitä tulee toimiva kokonaisuus, joka edistää asiasisältöä, tunteita ja katsojan toimintaan vaikuttamista. Tämä on yleensä se vaihe, johon voi mennä eniten aikaa, kun halutaan tehdä huolellista työtä. Mahdolliset toiminnallinen kuva, puheääni, taustamusiikki, valokuvat ja grafiikat antavat katsojalle monikanavaisen sekä eri aisteja stimuloivan kokonaisuuden. Kun työ alkaa olla valmista, on hyvä tarkastaa materiaali teknisesti ja ilmaisullisesti siten, että kuvien värisävyt ja äänentaso pysyisi mahdollisimman yhdenmukaisena. Lopussa työtä hiotaan vielä siten, että myös mahdolliset fontit ja logot tulee ohjeiden mukaan esille. (Hakkarainen & Kumpulainen 2011, 58–59.)

Videota julkaistaessa on hyvä olla selvitettyinä millaiseen palveluun video julkaistaan. Videon julkaisupaikka voi olla mm. Youtube-videopalvelu, jossa video on kaikkien halukkaiden tai linkin eli verkko-osoitteen kautta saatavilla. Vaihtoehtoisesti se voidaan julkaista jollekin muulle sivustolle, jossa on rajoitettu käyttöoikeus videoon.

Yleisesti käytetty editointiohjelma, joka on käyttöominaisuksiltaan hyvin aloittelijaystävällinen, on Adobe Premiere Pro CC-ohjelmisto (kuva 10). Ohjelmistoon on Internetissä useita erilaisia ohjeita, videollisia sekä kirjallisia, jotka neuvovat aloittelijaa editoinnin saloihin. (Ailio 2015, 7.)



KUVA 10. Adobe Premiere Pro CC videoeditointiohjelmisto (Mooney 2015)

Adobe Audition Pro CC on hyödyllinen ohjelma, sillä editointivaiheessa se helpottaa ääniraitojen laadun parantamista, lisäämistä ja leikkaamista videoon. Ohjelmalle löytyy ohjevideoita helposti Internetistä. Näiden videoiden katselu ennen varsinaista editointia sekä sen aikana auttavat käyttäjää ymmärtämään ohjelman pääperiaatteet ja mahdollisuudet. Ohjelma on helppokäyttöinen myös harjoittelevalle editoijalle.

Videomateriaali ja sen sisältö on hyödyllistä testata tarkkaan valitulla testiryhmällä, joka arvioi tuotoksen. Palautteen avulla tekijät pystyvät korjaamaan ja muokkaamaan videota enemmän odotuksia vastaavaksi. Testiryhmän valinnassa tulee ottaa huomioon muun muassa seuraavat kriteerit: katsojien koulutus, videon tarkoitus, ikä ja sukupuoli. Pääideana on se, että testityhmä mahdollisimman hyvin edustaa tulevia oppimateriaalin käyttäjiä.

5 OPINNÄYTETYÖN PROSESSI

5.1 Työn toteutus

Opinnäytetyön suunnittelu alkoi keväällä 2017. Valitsimme toiminnallisen opinnäytetyön kyseisestä aiheesta, koska nefelometria vaikutti mielenkiintoiselta aiheelta ja videollisen ohjeen kuvaaminen tuntui kiinnostavalta haasteelta. Toimeksiantajana toimii Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutus. Työn idea lähti nimenomaan siitä, että minkä tyyppinen tuotos pystyy täyttämään opetukselliset tavoitteet. Lisäksi sen tuli olla tarkoituksenmukainen ja sopiva opetusmateriaaliksi. Näitä seikkoja pohdittiin sekä oppilaitoksen että opiskelijoiden näkökulmasta.

Suunnittelussa laadimme tulevat työn vaiheet järjestykseen niin, että opiskeluvuoden aikataulus ja muut mahdollisesti opinnäytetyötä hidastavat tekijät saataisiin huomioiduksi mahdollisimman hyvin. Siitä syystä videon tekeminen sijoitettiin syksyyn 2018, koska meillä oli mahdollisuus kuvata ja editoida video oman aikataulumme mukaan sekä korjata sitä tarvittaessa. Taulukossa 2 näkyy viitteellinen aikataulu-suunnitelma.

Aika	Vaihe
Syksy 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Käsikirjoitus ja suunnittelu.
Syksy-Talvi 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Videon runko ja kuvaus.
Talvi 2017-2018	<ul style="list-style-type: none"> • Puheen äänittäminen. • Videon editointia. • Teoreettisen tiedon keruu ja laadinta.
Kevät 2018	<ul style="list-style-type: none"> • Videon editointia ja raportin laadinta valmiiksi. • Esittäminen ohjaajalle.
Syksy 2018	<ul style="list-style-type: none"> • Virallinen esittäminen.

TAULUKKO 2. Tuotoksen toteuttamisen vaiheet

Teimme opinnäytetyön kuvausta varten hyvin yksityiskohtaisen käsikirjoituksen, jossa pohdimme tarvittavan kuvausjärjestyksen osa-alueet huolellisesti lävitse. Tarkastellessamme käsikirjoituksen alkuperäistä raakaversiota, huomasimme joidenkin

osa-alueiden jääneen liian pinnalliselle tasolle, eivätkä ne siten olisi välttämättä avannut asiasisältöä katsojalle. Laadimme käsikirjoituksen valmiiksi sekä suoritimme sen tarkistuksen. Varasimme videokuvauksen aloitusta varten tarvittavat materiaalit sekä tarvikkeet valmiiksi. Valitsimme kuvausajankohdan kaikille osapuolille sopivaksi. Lopulliseen käsikirjoitukseen korjasimme suurimman osan epäkohdista niin, että videointi onnistui ilman ongelmia. Kuvausten aloitus sujui muutaman harjoittelukerran jälkeen hyvin ja jokainen kohtaus saatiin kuvattua sujuvasti. Videon aloituksessa ja lopetuksessa käytimme toista kameraa, sillä alkuperäinen kamera ei ollut enää käytettävissämme. Se ei ole kuitenkaan teknisesti vaikuttanut kuvan laatuun.

Opinnäytetyön video kuvattiin kahdella erillisellä kerralla. Ensimmäisellä kerralla kuvasimme MININEPHPLUSTM -nefelometrin mittauksen etenemisprosessin ja toisella kerralla menetelmässä käytettyjen immunokompleksien piirron taululle sekä aloitus- ja lopetuspuheet. Äänitimme ensimmäisen videoinnin mikrofonilla, jonka kyky rekisteröidä ääntä vaihteli. Tämän vuoksi äänityksen laatu oli vaihteleva, joten äänitimme loput toisella mikrofonilla. Tällöin äänitteen laatua saatiin hiukan tasaantumaan, mutta ongelmat eivät hävinneet kokonaan.

Pyysimme arviota videon laadusta ja toimivuudesta bioanalytikkokoulutuksen toisen vuoden opiskelijaryhmältä, joka olikin opetusvideon kohderyhmä. Saimme palautteen alkuperäisen äänitteen laadusta. Palautteen perusteella päätettiin äänittämään video uudelleen erilaisella mikrofonilla, mutta laatu oli edelleen epätydyttävä. Ratkaisuna päätimme ottaa yhteyttä Mediapolikseen, joka sijaitsee Tampereen Tohlopissa. Sieltä saimme vastauksen media-opettajalta, joka lupasi järjestää meille opiskelijan avustamaan meitä äänityksissä. Studio oli rakenteeltaan ammatillinen ja Mediapoliksien opiskelija osasi avustaa meitä hyvin äänityksessä sekä arvioi saadun äänitysten laatua. Käytimme uutta studiossa tehtyä hyvälaatuista äänitystä lopullisessa tuotoksessa.

Opetusvideo editoitiin Adobe Premiere Pro CS 2017 -ohjelmalla ja se siirrettiin omalle Youtube-kanavalle esittämistä ja lopuksi Tampereen ammattikorkeakoululle luovutusta varten. Kyseinen ohjelma on ollut käytettävissä Tampereen ammattikorkeakoulun kirjaston tietokoneissa ja siksi on ollut tärkeä editoida video valmiiksi ennen kuin ryhmämme siirtyi harjoittelupaikkoihin.

Videon ensimmäinen versio valmistui joulukuun puolessa välissä, mutta palautteen sekä uudelleenäänityksen ja -editoinnin jälkeen se saatiin hyvään muotoon myöhemmin kesän aikana. Harjoittelut kliinisen laboratorion eri erikoisaloilla eivät merkittävästi vaikuttaneet opinnäytetyön etenemiseen, koska se oli huomioitu aikataulutuksessa. Olimme päättäneet etukäteen, että harjoittelun aikana keräisimme ja analysoisimme tietoa immunologisista tutkimuksista sekä MININEPHPLUSTM -nefelometrista, jotta työskentely olisi tehokkaampaa, kun harjoittelu olisi ohitse.

Harjoittelun loputtua aloitimme opinnäytetyön kirjallisen osuuden tekemisen ja materiaalin kokoamisen. Lähtökohtana opinnäytetyön prosessin etenemiselle oli, että jaoimme työn huomioiden kummankin tekijän osaamiset sekä toiveet. Molemmat tekijät tutustuivat aiheisiin, jotka eivät olleet entuudestaan tuttuja tai osaamisen taso ei ollut riittävän kattava. Näin varmistimme opinnäytetyön prosessissa, että kummallakin tekijällä on samantasoiset valmiudet opinnäytetyön tekemiseen.

Opinnäytetyöraportin runko vaihteli työn edetessä, koska tuloksesta haluttiin saavuttaa mahdollisimman looginen ja kattava raportin sisältö. Työn raportoinnissa noudatettiin TAMK:in raportointiohjeita. Raportti sisältää opinnäytetyön kokonaisuuden: kansilehti, tiivistelmä suomeksi sekä englanniksi, sisällysluettelo, erityissanasto, johdanto-osa, teoreettinen osa, toteutusosa (menetelmät, aineistonkeruu ja aineiston analyysi), tuotos (video), pohdinta (tuloksen tarkastelua, opinnäytetyön eettisyys, luotettavuus, johtopäätökset ja kehittämissuhteet), lähteet ja liitteet.

5.2 Tuotoksen laadun arviointi

Opetusvideon ensimmäinen versio, joka oli editoitu lopulliseen muotoonsa, lähetettiin linkkinä ohjaavalle opettajalle sähköpostin kautta arvioitavaksi. Opettaja katsoi ja arvioi videon. Saadun palauteen pohjalta korjasimme virhetietoa, jotka olisivat johtaneet mahdollisiin laimennos- ja mittausvirheisiin. Lisäsimme myös muutaman kuvan reagenssipulloista havainnollistamaan työtä paremmin. Tämän lisäksi kysyimme opettajan mielipidettä videon äänestä. Korjasimme videota annettujen ohjeiden mukaisesti ja arvioimme työtä itsenäisesti vielä kerran ennen kuin päätimme esitellä videon valitsemallemme kohderyhmälle, joka oli saman koulutuksen nuorempi vuosiryhmä.

Videon ensimmäisen version editointi oli mennyt suunnitelman mukaan ja kevään aikana laadittiin videolle arviointilomake, jonka avulla oli tarkoitus saada kohderyhmän opiskelijoista palautetta. Lomake koostui numeerisista arvosanoista sekä vapaaehtoisista kommentteista. Opiskelijat katsoivat ja arvioivat opinnäytetyömme videomateriaalin ja antoivat mielipiteensä erilliseen kommenttikenttään. Arviointilomake (Liite 2) koostui numeraalisesta taulukosta (taulukko 3), erillisestä kokonaisarvosanasta sekä kommenttikentästä. Arvioinnit ja kommentit keräsimme nimettöminä.

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	5

TAULUKKO 3. Arviointilomakkeen numeraalinen taulukko

Analysoimme saamamme materiaalin tilastollisesti laskemalla kohderyhmän antamien arvosanojen keskiarvon sekä lukemalla kirjalliset kommentit. Tulokset laadittiin alla olevaan taulukkoon (taulukko 4), josta olimme voineet konkreettisesti havainnoida annetun palautteen.

Sisältö vastaa tehtävänantoa, kohdasta saimme arvosanaksi	4.4
Tietoa oli riittävästi, kohdasta saimme arvosanaksi	4.0
Selitykset olivat selkeitä, kohdasta saimme arvosanaksi	2.9
Videon katsomisen mieluisuus, kohdasta saimme arvosanaksi	3.7
Kokonaisarvosana	3.6

TAULUKKO 4. Tilastollinen keskiarvotaulukko

Opiskelijoiden kommentit olivat kriittisiä sekä asianmukaisia. He antoivat palautetta muun muassa videon äänenlaadusta, sisällöstä ja teknisestä toteutuksesta. Otimme tähän muutaman yleisesti esiintyvän kommentin:

”Suurimmaksi osaksi pysyi hyvin perillä mitä videolla käytiin läpi.”

”Äänenlaatu vaihtelevaa ja artikulointi välillä huonoa, joten oli välillä vaikea saada selvää. Hyviä lisäefektejä ja kiva musiikki.”

”Osa ohjeista sanottiin mielestäni liian nopeasti, mutta videota seuraamalla pysyi hyvin mukana. Video oli kuvattu hyvästä kulmasta, koska työvaiheet näkyivät koko ajan selvästi, eikä bioanalyytikon kädet estäneet näkemistä. Musiikki sopi videoon, eikä se häirinnyt keskittymistä.”

Kohderyhmän antamasta palautteesta kävi ilmi sama asia, jota olimme miettineet videon ensimmäisen editointivaiheen aikana. Palaute koski suurimmaksi osaksi videossa olevaa audioraitaa, jonka testiryhmä kuvaili olevan laadultaan ja selkeydeltään parannusta tarvitseva. Keskustelimme äänitteestä myös ohjaavan opettajamme kanssa ja päädyimme äänittämään videon uudelleen. Lisäksi korjaavana toimenpiteenä lisäsimme videoon tekstitykset, jotka auttavat selkeyttämään puheen antamaa viestiä. Näin pyrimme myös yhdistämään eri oppimistapoja, jotta video soveltuisi paremmin opetuskäyttöön. Muuten videomme sai positiivista palautetta sekä kohderyhmältä että ohjaavalta opettajalta.

6 POHDINTA

Toiminnallisen opinnäytetyön tekeminen vaatii usein sellaista osaamista, mitä ei yleensä käytetä tai opiskella opiskelujen aikana. Tämän opinnäytetyön tuotoksena syntyi opetusvideo, jota voidaan hyödyntää bioanalytiikan koulutuksessa. Ohjeellisen videon tekeminen käytännössä vie aikaa suunnitteluun ja toteuttamiseen sekä edellyttää tekijöiltä kiinnostusta ja erikoisosaamista.

Opinnäytetyömme tarkoitus ja tavoitteet tuli toteutettua vaihe vaiheelta, jolloin jouduimme perusteellisesti miettimään suunnitteluun ja tekemiseen liittyviä asioita sekä korjaamaan niitä hyvän tuloksen saavuttamiseksi. Omana tavoitteenamme oli perehtyminen aiheeseen ja meidän keräämien tietojen soveltaminen tuotoksen eli videon luomisessa sekä raportin laatimisessa. Yleisesti ottaen työtä oli miellyttävää tehdä, sillä olimme kiinnostuneet kliinisen kemian menetelmistä. Otimme mielellämme tämän aiheen opinnäytetyöaiheeksi myös siitä syystä, että opetusvideon luominen vaikutti kiinnostavalta haasteelta.

Opinnäytetyön prosessin aikana pyrimme analysoimaan saavutettuja tuloksia ja tekemään tarvittavat korjaukset opettajan sekä kohderyhmän antamilla suosituksilla. Tuotoksena olevan videon kohdalla tavoite oli sisällön lisäksi hyvä laatu ja siksi päätimme esitellä sen valitulle kohderyhmällemme sekä kerätä palautetta. Laadimme kohderyhmälle arviointilomakkeen, joka se arvioi työmme sekä numeraalisesti että kirjallisesti antamalla vapaamuotoiset kommentit.

Opinnäytetyön tekoprosessi oli pitkä ja siinä esiintyi monia erilaisia ongelmakohtia, joihin emme olleet täysin ennalta varautuneet. Työn alkuvaihe sujui lähes ongelmitta, kun aloimme suorittamaan työvaiheita sovitun ja yhdessä laaditun aikataulun mukaisesti. Opinnäytetyön videomateriaali saatiin kuvattua aikataulun mukaisesti, mutta äänityksen suhteen tehtiin tarvittavaa lisätyötä hyvän laadun saavuttamiseksi.

Työn suunniteltuun aikatauluun tuli muutoksia kevään aikana. Opinnäytetyön raportin kirjoittaminen saatiin aloitettua myöhään keväällä, maaliskuun-huhtikuun aikana sekä suurin osa korjauksista ja parannuksista siirrettiin kesän ajaksi.

Muita haasteita prosessissa oli tekstin tuottaminen sekä sen oikeinkirjoitus. Apuna käytettiin saatavilla olevia opinnäytetyön kirjoittamisohjeita sekä ohjaavan opettajan suosituksia. Haasteena kesäaikana esiintyi myös aikataulujen yhtensovittaminen. Miettiessämme, mitä opinnäytetyön prosessissa olisi voinut tehdä toisin, olisimme voineet täysin alusta käyttää äänitykseen koulun käytössä olevaa äänitysstudiota. Lisäksi olisi pitänyt suunnitella raportin kirjoittaminen tarkemmaksi, jotta pysyisimme aikataulussa paremmin.

Opinnäytetyön toimeksiantaja oli Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutus. Opetusvideo tehtiin opetusmateriaaliksi kliinisen kemian harjoitustunneille nefelometrin käytön opastukseen. Tuotos on julkaistu Youtube -kanavalla ja luovutettu toimeksiantajalle linkin eli verkko-osoitteen kautta saatavaksi rajoitetusti vain koulun käyttöön.

Opinnäytetyön raportoinnissa käytimme erilaisia lähdetietoja, jotka olivat monipuolisia ja mahdollisimman luotettavia. Suomenkielistä materiaalia aiheesta löytyy rajoitetusti ja kansainvälinen kirjallisuus on pääosin 1990-luvulta. Luotettavuutta varmistimme tarkistamalla kirjojen tai artikkelien alkuperäisten lähteiden oikeellisuutta. Opinnäytetyössä käyttämämme lähteet olivat sekä suomen että englannin kielellä, joista jouduimme käyttämään enemmän englanninkielisiä lähdesivustoja ja kirjamateriaalia. Syynä oli se, että nefelometrissa sekä MININEPHPLUSTM -laitteesta ei löydy suomenkielellä riittävästi hyödynnettävää tietoa. Merkitsimme käyttämämme lainaukset ja referoinnit suositusten mukaisesti, jotta tekijänoikeuksia ei rikottaisi.

Opinnäytetyö syvensi tekijöiden tietämystä nefelometrin erilaisista käyttötarkoituksista ja ominaisuuksista. Siinä esiintyi myös uusi näkökulma, kuinka moninaisesti laitetta voidaan hyödyntää bioanalytikkokoulutuksen ulkopuolella, sillä koulutuksen harjoitustunneilla pääsee tekemään vain tiettyjä tutkimuksia.

Opinnäytetyön tuotoksen eli opetusvideon käyttöönoton jälkeen olisi hyvä kerätä palautetta opiskelijoilta, jotka ovat käyttäneet sitä opiskeluissaan. Palautteen perusteella olisi mahdollista tehdä johtopäätöksiä opetusvideon käytännön hyödyistä. Mahdollisia lisätutkimuksia ja jatkoaiheita voisivat olla muidenkin kliinisen kemian analysaattoreiden videollisten käyttöohjeiden laatiminen, kuten esimerkiksi kliinisen kemian analysaattorin

Konelab 20i. Jatkoaiheena voi olla myös tutkimus siitä, miten nefelometrillä voitaisiin tehdä helppokäyttöisempi tai miten se saataisiin liitettyä automaattilinjastolle optimaallisemmin.

LÄHTEET

Ailio, J. 2015. Vähän parempi video. Turun Ammattikorkeakoulu. Luettu 20.5.2018.
<http://julkaisut.turkuamk.fi/isbn9789522165831.pdf>

AMS Biotechnology Ltd. 2013. Luettu 3.6.2018. <http://www.amsbio.com/secondary-antibodies.aspx>

Aryal, S. 2018. C-Reactive Protein (CRP) Test Principle, Uses, Procedure and Result Interpretation. Päivitetty 12.6.2018. Luettu 17.7.2018. <https://microbiologyinfo.com/c-reactive-protein-crp-test-principle-uses-procedure-and-result-interpretation/>

Batty, I. 1976. Immunological Reagents. Bull World Health Organ.

Berzofsky, J., Berkower, I. & Epstein, S. 2003. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies: Quantitative Precipitin. Fundamental Immunology. 5. painos. Lippincott Williams & Wilkins. Luettu 6.6.2018.
[http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/FundamentalImmunology/ramiCOM-MAND=applyStylesheet\(interface.xsl,pau@CH004S0501.pub\)&p_userid=pau.html](http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/FundamentalImmunology/ramiCOM-MAND=applyStylesheet(interface.xsl,pau@CH004S0501.pub)&p_userid=pau.html)

Bhagavan, N.V. 2002. Medical Biochemistry. 4. painos. Harcourt/Academic Press, 819–820.

Castren, J. 1916. Tietosanakirja. 8. osa. Ribot-Stambul. Luettu 24.8.2018.
<https://www.antikvaari.fi/naytatuote.asp?id=1175793>

Cole, L.A., Shahabi, S., Butler, S.A., Mitchell, H., Newlands, E.S., Behrman, H.R. & Verrill, H.L. 2001. Utility of commonly used commercial human chorionic gonadotropin immunoassays in the diagnosis and management of trophoblastic diseases. Clinical Chemistry (47), 308–315.

Creative Diagnostics. 2018. Polyclonal vs. Monoclonal Antibodies. Luettu 15.5.18.
<https://www.creative-diagnostics.com/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies.htm>

Cummings, B. 2001. Human Anatomy & Physiology. Addison Wesley Longman, Inc.

Diagnostic Automation. 2015. CRP Latex Test Kit (Serology test). Luettu 20.5.18.
[http://www.rapidtest.com/mobile/product_detail.php?i=CRP-Latex-Test-Kit-\(Serologytest\)&id=571&cat=93](http://www.rapidtest.com/mobile/product_detail.php?i=CRP-Latex-Test-Kit-(Serologytest)&id=571&cat=93)

Feldkamp, G. & Carey, J. 1996. Immune Function and Antibody Structure. Teoksessa Diamandis, E & Christopoulos, T. (ed.). San Diego, California: Academic Press (17), 5–24.

Fernando, S.A. & Wilson, G.S. 1992. Studies on the hook effect in the one-step immunoassay. *Immunol. Methods* (151), 47–66.

Fondriest Environmental Inc. N.d. Measuring Turbidity, TSS, and Water Clarity.
Luettu 28.4.2018

<https://www.fondriest.com/environmental-measurements/equipment/measuring-water-quality/turbidity-sensors-meters-and-methods/>

Freitas, R. 2017. How does nephelometric turbidity measurement work. Luettu 3.4.2018.
<https://visaya.solutions/article/wishiknew-nephelometric-turbidity-measurement/>

Friedmann, A. 2010. Writing for Visual Media. 3. painos. Luettu 17.10.2018.

Gosling, J. P. 1990. A decade of development in immunoassay methodology. *Clinical Chemistry* 36 (8), 1408–1427.

Hakkarainen, P. & Kumpulainen, K. (toim.) 2011. Liikkuva kuva – muuttuva opetus ja oppiminen. Kokkola. Luettu 15.10.2018.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York: Cold Spring Harbor.

Helmenstine, A.M. 2018. How to Make Tris Buffer Solution. Luettu 17.5.2018.
<https://www.thoughtco.com/how-to-make-tris-buffer-solution-603668>

Hire Live Support Inc. N.d. Our video making process. Luettu 3.4.2018.
<https://www.hirelivesupport.com/services/video-animation?price=500-kuva>

Howanitz, P.J. & Howanitz, J.H. 1997. Quality Assurance. Teoksessa Rose, N., Macario, E., Folds, J., Lane, H.C. & Nakamura, R.M. (ed.) Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5. painos. Washington D.C.: ASM Press, 1185.

International Labmate Ltd. 2014. What Are Buffers & Why Are They Important? Luettu 5.3.2018.
<https://www.chromatographytoday.com/news/industrial-news/39/breaking-news/what-are-buffers-amp-why-are-they-important/32345>

Jensen, E. C. 2012. The Basics of Western blotting. The anatomical record. Wiley Online Library, 369–371. Luettu 6.6.2018.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.22424/pdf>

Peda-kouluverkko. Oppimistyyli. Luettu 4.4.2018. <https://peda.net/kangasala/pikkolan-koulu/opo/oppilaanohjaus/op/oppimistyyli>

Plotz, C. M. & Singer, M. J. 1956. The Latex Fixation Test. New York: American Journal of Medicine 21(6), 893.

Kasahara, Y. 1997. Agglutination Immunoassays. Teoksessa Rose, N., Macario, E., Folds, J., Lane, H.C. & Nakamura, R.M. (ed.) Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5. painos. Washington D.C.: ASM Press, 10–11.

Khouja, H. 2010. Turbidimetry & Nephelometry. Luettu 4.4.2018.
<https://www.kau.edu.sa/Files/0013791/Subjects/Turbidimetry%20and%20Nephelometry.pdf>

Kricka, L.J., Phil, D., Chem, C. & Path, C. 2008. Principles of Immunochemical Techniques. Teoksessa Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (ed.). Fundamentals of Clinical Chemistry. 6. painos. USA: Saunders Elsevier, 156–157.

Lautkankare, R. 2014. Videon mahdollisuudet opetuskäytössä. Tampere: Juvenes Print Oy. Luettu: 19.10.2018.

Liddell, E. 2013. Antibodies. Teoksessa Wild, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Oxford: Elsevier, 248–249.

Marmer, D. & Hurtubise, P. 1996. Nefelometric and Turbidometric Immunoassay. Teoksessa Diamandis, E & Christopoulos, T. (ed.). San Diego, California: Academic Press, 366–376.

Mayer, G. 2017. Immunoglobulins: Antigen-Antibody Reactions. Päivitetty 14.9.2017. <http://www.microbiologybook.org/mayer/ab-ag-rx.htm>

Mayer, R. 2005. *The Cambridge Handbook of Multimedia Learning*. New York: Cambridge University Press.

Meulenberg, E. 2012. Antibodies Applications and New Development. Bentham Science Publishers - ProQuest Ebook Central, 58–67. Luettu 17.7.2018. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/tamperepoly-ebooks/detail.action?docID=976637>

Miller, L.E. 2017. Immunization and Vaccines. Teoksessa Stevens, C. D. & Miller, L.E. *Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective* 4. painos. Philadelphia: F.A. Davis Company, 469.

MININEPHPLUS™ ohjekirja. N.d. The Binding Site Group Ltd. Luettu 10.4.2018

MININEPH™ tuote-esite. 2014. MININEPH™ HUMAN C – REACTIVE PROTEIN KIT. <http://npt.ir/uploads/ZK044.L.R.pdf>

Mooney, A. 2015. Adobe Creative Cloud. Luettu 5.8.2018. <https://blogs.adobe.com/creativecloud/premiere-pro-cc-ibc/>

Newman, D., Henneberry, H. & Price, C. 1992. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* (29), 22–42. Luettu 17.8.2018.

<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/000456329202900104>

Nichols, J.H. 2013. Point-of-Care Testing. Teoksessa Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Oxford: Elsevier, 455–456.

Nordlab. Immunoglobuliini. Päivitetty 15.12.2017. Luettu: 15.5.2018.
<http://oyslab.fi/ohjekirja/1666.html>

Oliver, J. 2018. *Antibody Applications*. United States: Wayne State University. Luettu 6.4.2018. <https://www.labome.com/method/Antibody-Applications.html>

Orion Diagnostica Oy. N.d. QuikRead go CRP. Luettu 7.4.2018.
<http://www.oriondiagnostica.fi/tuotteet/QuikRead-go/QuikRead-CRP/>

Pacific Immunology. 2018. What is an Antibody? Luettu 15.5.2018.
<https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/what-is-an-antibody/>

Pappas, C. 2013. Video As A Learning Tool: A Mixed Blessing? Luettu 4.4.2018.
<https://elearningindustry.com/video-as-a-learning-tool-a-mixed-blessing>

POC-testi. 2014. Terveyskirjasto. Duodecim: Verkkodokumentti. Luettu 20.3.2018.

Rice University. 2012. *Biology*. OpenStax College. Päivitetty 27.5.2016. Luettu 6.9.2018. https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@10.53:fVAf83sY@11/Preface-to-Biology

Rocks, B.F. 1998. Ultraviolet and visible spectrophotometry, fluorimetry, nephelometry and turbidimetry. Teoksessa Teoksessa J. Crocker ja D. Burnett. *The Science of Laboratory Diagnosis*. Oxford: Isis Medical Media, 419–428.

Salonen, K. 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Tampere: Juvenes Print Oy. Luettu 19.10.2018.

Stevens, C. D. 2010. Precipitation Reactions. Teoksessa Stevens, C. D. (ed.) Clinical immunology and Serology: A Laboratory Perspective 3. painos. Philadelphia: F.A. Davis Company, 123–126.

Stevens, C. D. 2017a. Antibody Structure and Function. Teoksessa Stevens, C. D. & Miller, L.E. Clinical immunology and Serology: A Laboratory Perspective 4. painos. Philadelphia: F.A. Davis Company, 62–63.

Stevens, C. D. 2017b. Precipitation and Agglutination Reactions. Teoksessa Stevens, C. D. & Miller, L.E. Clinical immunology and Serology: A Laboratory Perspective 4. painos. Philadelphia: F.A. Davis Company, 141–150.

The Binding Site Group Ltd. 2017a. Assay Menu. Luettu 17.3.2018.
<https://www.bindingsite.com/en/discover/clinical-chemistry/mininephplus/assay-menu?disclaimer=1>

The Binding Site Group Ltd. 2017b. Monoclonal Proteins. Luettu 25.5.2018.
<https://www.bindingsite.com/en/discover/freelite-and-hevylite/hevylite/laboratory-information/a-laboratory-overview>

The Binding Site Group Ltd. 2017c. Key Benefits. Luettu 25.5.2018.
<https://www.bindingsite.com/en/discover/clinical-chemistry/mininephplus/key-benefits>

The Binding Site Group Ltd. 2017d. Freelite Overview. Luettu 15.5.2018.
<https://www.bindingsite.com/en/discover/freelite-and-hevylite/freelite/laboratory-information/a-laboratory-overview>

ThermoFisher Scientific. N.d. Immunoglobulin Structure and Classes. Luettu 17.4.2018.
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html>

Tulip Diagnostics Ltd. N.d. Technical Series: Turbidimetry. Luettu 15.8.2018.
http://www.tulipgroup.com/Common_New/Tech_Pubs_PDF/TurbidTech.pdf

Ullman, E.F. 2013. Homogenous Immunoassays. Teoksessa Wild, D. (toim.) The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford: Elsevier, 67.

Van Lente, F. 1997. Light-Scattering Immunoassays. Teoksessa Rose, N., Macario, E., Folds, J., Lane, H.C. & Nakamura, R.M. (ed.) Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5. painos. Washington D.C.: ASM Press, 13.

Vilkka, H. ja Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Windermere, A. N.d. Demand Media. What Is the Importance of Video Tutorials to Students? Luettu: 7.6.2018. <http://work.chron.com/importance-video-tutorials-students-16633.html>

Åkerman K. & Jokela H. 2010. Fotometria. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Kandidaattikustannus Oy, 54–58.

LIITTEET

Liite 1. Opetusvideon käsikirjoitus

1 (4)

NEFELOMETRIN KÄSIKIRJOITUS

- Aloitus:
 - Esittelemme itsemme ja nefelometrin
 - A: Olemme TAMK:in Bioanalytikkokoulutuksen 15 ba ryhmästä. Meidän opparin aiheena on videollinen ohje nefelometrin käytöstä. Hei, olen Alina, minä näytän teille miten nefelometriä käytetään.
 - J: Hei, olen Jannika ja minä kuvaan ja selostan miten nefelometriä käytetään.
 - A: Olemme Bioanalytikko-opiskelijoita ja teimme tämän videon teitä varten, jotta opisitte helpommin käyttämään Nefelometriä. (Alina ja Jannika osoittavat Mininephiä)
- Menetelmä:
 - J: Minineph analysoi vasta-aineen ja antigeenin välistä reaktiota. Antigeeni on proteiini, jolle on spesifinen vasta-aine, joka kiinnittyy siihen. Analyysi, joka mittaa tällaista reaktiota, kutsutaan Immunoanalyysiksi.
 - A: (Kuva kulmaan Y) Vasta-aine on proteiini, joka koostuu kahdesta identtisestä liittymäkohdasta. Jokaisen vasta-aineen liittymäkohta on spesifinen tietyille antigeenille. Yhdessä nämä voivat muodostaa immuno-complexeja.
 - J: Immunoanalyysissa mittaamme näiden prosessien etenmistä käyttäen nefelometriä eli valon sirronnan mittaamista.
- Laitteen osat:
 - J: Tässä ovat analysaattorin:
 - Näppäimistö ja Näyttö
 - Kyvetti
 - Pipetti ja pipetin nappula 😊

- Puskurin ja ajopuskurin laatikko
 - Magneetikortin lukija/Tulostin
 - Viivakoodinlukija
- J: ESC, joka löytyy koneen näppäimistöä, palauttaa ohjelman alkutilaan, eli jos tarvitsee pysäyttää mittaus, mennään ESC ja päästää aloitusruutuun, jolloin annetaan kemian numero, tarkistetaan slottinnumero ja päästään aloittamaan reagenssin annostelu. Nuoli vasemmalle Cancel on ns. enter näppäin, jolla siirrytään seuraavaan vaiheeseen ohjelmassa ja näytölle tulee uudet ohjeet.

- Mitä reagenssejä tarvitset ja miksi, kun aloitat työskentelyn:

- J: Esittelemme teille nyt tarvitsemanne reagenssit, jotka säilytetään jääkaapista.

- Alina näyttää eritellen tarvittavat reagenssit ja puskurit.
 - Tässä ovat:
 - - CRP BUFFER
 - - Antiseerumi 2 kappaletta
 - High Control
 - Low Control
 - Magneetikortti

- Mitä tarvitset aloitukseen?

- Kaikki esivalmisteluista ja välineistä
 - Ennen työn aloitusta laimennetaan antiseerumit ja kontrollit, jotka ovat kuivareagensseja, tislattua ohjeen mukaan ja seisotetaan 15-30 minuuttia pöydällä. Antiseerumit kalliita ja kittikohtaisia, niitä ei voi hankkia erikseen. Reagenssikin tehdaskalibroinnissa on käytetty juuri samaa antiseerumierää.
 - Antiseerumi täytyy annostella erilliseen, pienempään näyteastiaan, jotta alkuperäinen näyte ei kontaminoidu tai kaadu. Antiseerumia on vain 1ml ja sen tulee riittää 25 määrytykseen.

- Lasikvyetit ja pinsetit, joilla otetaan sekoitussauvoja purkista.
- Otetaan 1ml ja 200ul pipettejä ja niihin sopivia kärkiä
- Tarvittava määrä koeputkia näytteiden laimennosta varten ja puskuria varten.

- J: Puskuri otetaan erilliseen koeputkeen, sillä emme halua kontaminoida sitä.

- Suoritus: Ennen työn aloitusta vaihda on board puskurit uusiin ja varmista, että liuosta on riittämiin. Tarkista myös ja tarvittaessa tyhjennä jätepullo.

1. Koneen puskurien vaihto ja jätepullon tyhjennys/tarkistus.
2. Laita nefelometrinen ja tulostimen pistoke seinään. (ei välttämättä seinään seinään)
3. Kone päälle virtakytkimestä.
4. Seuraa koneen näytölle ilmestyviä olevia ohjeita: Aja prime yhden kerran, syötä chemistry number XX, tarkista slotti numero, lue magneetikortti. Syötä näytenumero, tarkista laimennoskerroin ja ei muuta kun töihin!
5. Laimenna näytteet valmiiksi koeputkeen 20ul näytettä + 780ul diluenttia
6. Laitetaan käyttöreagenssit erillisiin näyteastioihin käden ulottuville sijoille, että niitä on helppo käyttää. Selkeät merkinnät putkien kylkiin, että missä putkessa on mitäkin.
7. Esin ajetaan normaali ja patologinen kontrollinäytteet. Ensimmäinen otetaan pinseteillä sekoitussauva kyvetiin ja otetaan pipetillä 20ul kontrollia kyvetiin ja laitetaan se koneessa olevaan mittausaukkoon.
8. Pipetoi sähköpipetillä puskuria, ilmaväli, antiseerumi ja lisätään kyvetiin.
 - J: Sähköpipetin nappi toimii myös Start-näppäimenä. Vältä painamista pohjassa imemisvaiheissa. Kun kaikki on valmiina ja lisäät pipetoimasi reagenssit, paina tällöin nappi kerran pohjaan. Analysointi alkaa automaattisesti.
 - ! Heti reagenssien lisäyksen jälkeen, siirrä pipetti välittömästi säilytyspisteeseen, jotta pipetin huuhtelupuskurit valuvat jäteastiaan eikä mittauskyvetiin.

9. Kone tulkitsee näytteen ja tulostaa tuloksen. Tämän jälkeen kyvetin voi ottaa pois ja kone kysyy seuraavaa näytettä. Toinenkin kontrolli ja potilasnäytteet ajetaan näin.

10. Seuraavaksi aloitetaan potilaan näytteen analyysi, kun esivalmistelut on tehty. Laimenna näytteet valmiiksi koeputkeen 20ul + 780ul

11. Otetaan pipetillä 20ul laimennettua näytettä kyvetiin ja laitetaan se koneessa olevaan mittausaukkoon.

12. Pipetoi sähköpipetillä puskuria - ilmäväli - antiseerumi ja lisäään kaikki kyvetiin. Eli toimitaan samalla tavalla kuin kontrollin kohdalla.

- Työn lopetus:

- Painetaan ESC, pyydetään uudestaan primeajo, jotta voidaan puhdistaa putket liuoksesta, vaihdetaan pullot tyhjiin pulloihin ja tehdään uudestaan. Täten varmistutaan ettei koneen putkistoon muodostu kiteitä, jotka saattaisivat vaikuttaa näytteiden tulkintaan.

Liite 2. Arviointilomakkeet

1(3)

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.-18
Ryhmä: 1669

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	5

Minkä numeron annat (0-5): 4

Muut kommentit:
- Ei ollut liian pitkä, vaan mielenkiinto säilyi koko videon ajan.

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.2018
Ryhmä: 16BA

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	5

Minkä numeron annat (0-5): 4

Muut kommentit:
Puhe voisi olla hieman selkeämpää ja tarkkoja lauseiden välillä
kiva taustamusiikki

2(3)

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.2018

Ryhmä: 16BA

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	<u>5</u>
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	<u>5</u>
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	<u>4</u>	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	<u>4</u>	5

Minkä numeron annat (0-5): 4

Muut kommentit: Äänen taso ja nopeus vaihtelevat. Hankalaitta tekstin kuulemista / ymmärtämistä.

Voisiko videoon lisätä tehtäytystä, jollain edellisen kommentin ei häiritse videon katsomista?

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.2018

Ryhmä: 16BA

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	<u>4</u>	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	<u>4</u>	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	<u>3</u>	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	<u>5</u>

Minkä numeron annat (0-5): 4

Muut kommentit: Osa ohjeista sanottiin mielestäni liian nopeasti, mutta videota seurattamalla pysyi hyvin mukana.

Video oli kuvattu hyvästä kulmasta, koska työvaiheet näkyvät koko ajan selvästi, eikä bioanalyttikan käsitteet estäneet näkemistä.

Musiikki sopi videon ~~kuulostukseen~~, eikä se häirinnyt keskittymistä.

3(3)

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.2018

Ryhmä: 16BA

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	5

Minkä numeron annat (0-5): 4 tai 3

Muut kommentit: äänen laatu vaihtelevaa, väällä selitykset liian nopeita ja sekavia, voisi olla tasalaatuisempia, jos en olisi ennen nefeloa käyttänyt, joutuisin katsoon useampaan kertaan

Nefelometriopetusvideo-opinnäytetyön arviointilomake

Päivämäärä: 6.3.2018

Ryhmä: 16BA

Ympyröi vastauksesi

	Huono	Melko huono	Ihan ok	Hyvä	Tosi hyvä
Sisältö vastaa tehtävänantoa	1	2	3	4	5
Tietoa oli riittävästi	1	2	3	4	5
Selitykset olivat selkeitä	1	2	3	4	5
Videon katsomisen mieluisuus	1	2	3	4	5

Minkä numeron annat (0-5): 4

Muut kommentit: —