



Mari Reinikainen

D-VITAMIININ MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI

D-VITAMIININ MÄÄRITYSMENETELMÄN VA- LIDOINTI

Mari Reinikainen
Opinnäytetyö
12.9.2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Koulutusohjelma	Opinnäytetyö	Sivuja	+	Liitteitä
Laboratorioalan koulutusohjelma	Opinnäytetyö	65	+	2
Suuntautumisvaihtoehto	Aika			
Bioteknologia	Syksy 2011			
Työn tilaaja	Työn tekijä			
Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, Oulun toimipiste	Mari Reinikainen			
Työn nimi				
D-vitamiinin määritysmenetelmän validointi				
Avainsanat				
D-vitamiini, immunologiset testit, validointi				

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida D-vitamiinin määritysmenetelmä, sekä ottaa se käyttöön Architect i2000_{SR} -laitteella. Määritysmenetelmä laitteella perustuu D-vitamiinin varastomuodon kalsidiolin spesifiseen sitoutumiseen vastaaineella koutattujen mikropartikkeleiden pinnalle. Sitoutumisen jälkeen detektio tapahtuu kemiluminesenssiin perustuvalla leimalla leimatun konjugaatin valonmuodostukseen sopivissa olosuhteissa.

Validointi suoritettiin mittaamalla 81 aiemmin RIA-menetelmällä määritettyä näytettä uudella CMIA-menetelmällä. Saatuja tuloksia verrattiin sopivilla tilastollisilla analyyseillä RIA-menetelmän tuloksiin. Lisäksi määritettiin menetelmän toistettavuutta mittaamalla samaa näytettä useaan kertaan.

Työ tehtiin Terveysten ja hyvinvoinnin laitoksen neuvolaserologian laboratoriolle. Työn perusteella uusi menetelmä D-vitamiinin määrittämiseen voidaan ottaa käyttöön ja tuloksia voidaan pitää luotettavina.

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ.....	3
SISÄLTÖ.....	4
1 JOHDANTO	6
2 D-VITAMIINI.....	8
2.1 D-vitamiinin yleiset ominaisuudet	8
2.2 D-vitamiinin saanti	10
2.3 D-vitamiinin saantisuositukset	11
2.4 D-vitamiinin terveysvaikutukset	13
2.5 D-vitamiinin määrittämenetelmät	15
3 IMMUNOLOGISET MÄÄRITYSMENETELMÄT	17
3.1 Vasta-aineet	17
3.1.1 Vasta-aineen rakenne	17
3.1.2 Vasta-aineryhmät	19
3.1.3 Monoklonaaliset ja polyklonaaliset vasta-aineet.....	19
3.2 Immunologisten määrittämenetelmien periaate	20
3.2.1 Saostumisreaktiot.....	21
3.2.2 Elektroforeettiset menetelmät.....	22
3.2.3 Merkkiaineisiin perustuvat menetelmät	22
4 MENETELMÄN VALIDOINTI	28
4.1 Laboratorion laatutoiminta	28
4.2 Validointi.....	29
4.3 Validoinnin parametrit.....	30
4.3.1 Mittausepävarmuus	31
4.3.2 Selektiivisyys ja spesifisyys	31
4.3.3 Mittausalue ja lineaarisuus	32
4.3.4 Toteamis- ja määrittärajat	32
4.3.5 Tarkkuuteen liittyvät parametrit	33
4.3.6 Häiriönkestävyys ja toimintavarmuus	35
4.4 Tilastolliset analyysit.....	35
4.4.1 F-testi	36
4.4.2 T-testi	36
4.4.3 Luottamusvälitarkastelu.....	37
4.4.4 Regressioanalyysi	37

4.4.5	Varianssianalyysi.....	38
4.4.6	Korrelaatio.....	38
5	D-VITAMIININ MÄÄRITTÄMINEN ARCHITECT i2000 _{SR} -LAITTEELLA.....	40
5.1	Laitetiedot ja laitteen toimintaperiaate.....	40
5.1.1	D-vitamiinin määrittäminen Architect i2000 _{SR} -laitteella.....	41
5.2	Laitteen kalibrointi.....	41
5.3	Näytteen käsittely.....	42
5.4	Näytteen analysointi.....	43
6	TULOKSET.....	45
6.1	Selektiivisyys ja spesifisyys.....	45
6.2	Häiriönkestävyys.....	45
6.3	Toteamis- ja määrittäysrajat.....	46
6.4	Lineaarisuus ja mittausalue.....	46
6.5	Toistettavuus.....	47
6.6	Menetelmävertailu.....	48
6.6.1	Regressioanalyysi.....	50
6.6.2	T-testi.....	56
6.6.3	Korrelaatio.....	57
7	YHTEENVETO.....	60
	LÄHTEET.....	62
	LIITTEET	
	Liite 1. Toistokokeen tulokset	
	Liite 2. RIA- ja CMIA-menetelmien D-vitamiinitulokset	

1 JOHDANTO

Immunologisilla määrityksillä voidaan määrittää joko vasta-aineita tai erilaisia molekyyliä, antigeenejä. Antigeeninä voi toimia mikä tahansa molekyyli, jolle voidaan muodostaa spesifistä vasta-ainetta. Immunologisia määrityksiä käytetään laaja-alaisesti eri teollisuuden aloilla kun tarvitaan herkkää menetelmää. Immunologiset määritysmenetelmät perustuvat aina vasta-aineen ja antigeenin väliseen spesifiseen reaktioon, mikä mahdollistaa erittäin pienien pitoisuuksien määrittämisen. Näillä menetelmillä voidaan tutkia näytekonsentraatioita, jotka voivat olla jopa luokkaa nmol/l. (Kumpulainen 2011.)

Opinnäytetyön tavoitteena on evaluoida, onko kemiluminesenssiin perustuva immunologinen menetelmä D-vitamiinin määrittämiseen seerumista luotettava ja toistettava verrattuna radioimmunologiseen määritykseen. Validointi suoritetaan vertaamalla Abbottin Architect i2000_{SR} -laitteella saatuja D-vitamiinipitoisuuksia aikaisemmin validoidulla radioimmunologisella menetelmällä samoista näytteistä saatuihin D-vitamiinipitoisuuksiin. Validoinnin tulosten pohjalta voidaan päättää, voidaanko Abbottin Architect i2000_{SR} -laitetta käyttää luotettavasti D-vitamiinipitoisuuksien määrittämiseen seeruminäytteistä.

Kemiallisen menetelmän validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla tutkitaan valitun menetelmän sopivuutta tarkoitukseensa. Validoinnissa tutkitaan valitun menetelmän luotettavuutta määrittämällä menetelmän lineaarisuus, poikkeama, tarkkuus ja toistettavuus. Lisäksi voidaan määrittää menetelmän selektiivisyys, spesifisyys, mittausalue, toteamis- ja määritysrajat, saanto sekä häiriökestävyys ja toimintavarmuus. Laitteen valmistaja oli validoinut jo tässä opinnäytetyössä käytettävän menetelmän, mutta tavoitteena oli varmistaa, että menetelmä toimii myös käytännössä neuvolaserologian laboratorioissa. Tällöin kaikkia yllä esitettyjä kohtia ei tarvitse käydä läpi. (Ehder 2005)

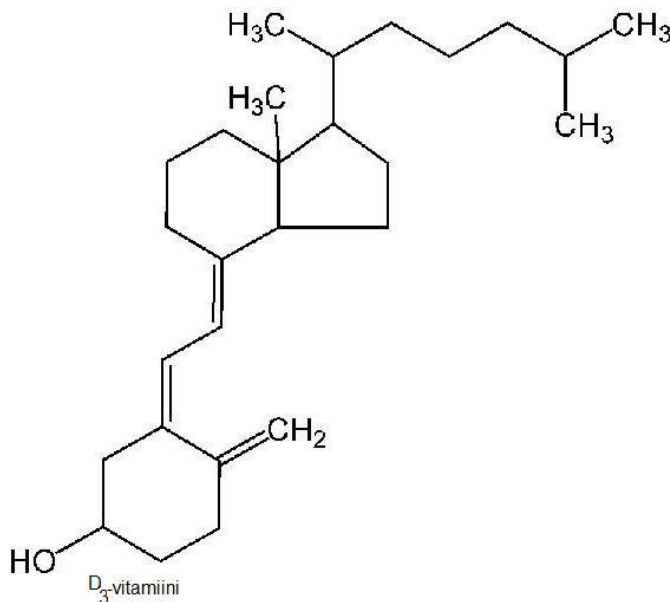
Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Oulun toimipisteen neuvolaserologian laboratorioissa. Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen tehtävänä on tutkia tapoja edistää väestön terveyttä ja hyvinvointia sekä

tapoja ehkäistä sairauksia ja vajaakuntoisuutta. Lisäksi THL kehittää uusien palvelujen järjestämismalleja, hyviä käytäntöjä sekä osaamista ja välineitä terveyden ja hyvinvoinnin edistämiseksi. Neuvolaserologian laboratorio on keskittynyt immunologisten tutkimusten suorittamiseen. Laboratorion näytteet kerätään pääasiassa raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2011, linkit Tutkimus ja kehittäminen.)

2 D-VITAMIINI

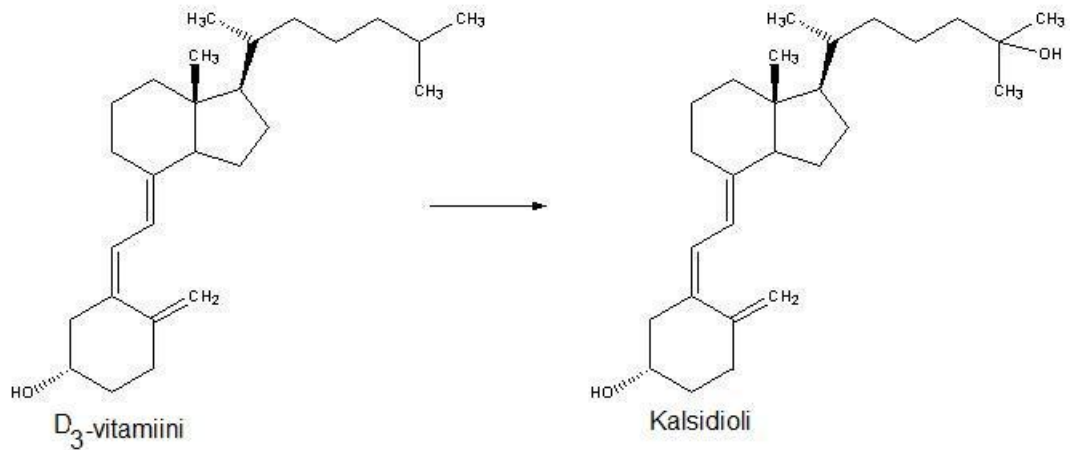
2.1 D-vitamiinin yleiset ominaisuudet

D-vitamiini on yksi elimistön tarvitsemista rasvaliukoisista vitamiineista. Vitamiinilla on klassisesti tarkoitettu sellaisia aineita, joita kehon on saatava ruokavaliosta ja joita se ei voi itse valmistaa. Tässä suhteessa D-vitamiini ei ole klassinen vitamiini, sillä sitä muodostuu kehossa auringon valon vaikutuksesta. D-vitamiinista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä D₃-vitamiinia eli kolekalsiferolia, jonka rakennekaava on kuvassa 1. (Aro, Antti 2005; Toriola, Adetunji T. 2010.)



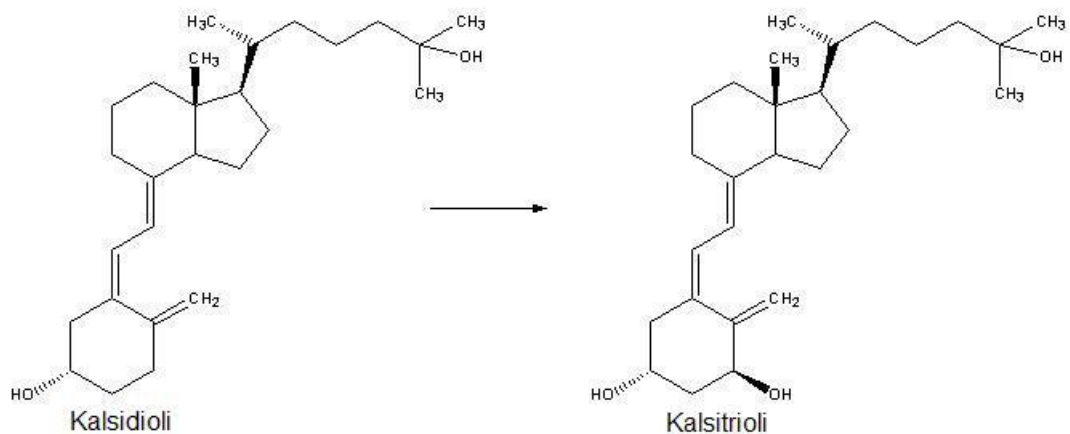
KUVA 1. D₃-vitamiini (Wikipedia. 2011, hakusana cholecalciferol)

D-vitamiineiksi lasketaan kuitenkin viisi erilaista molekyyliä, joiden perusrunko on steroidi. D-vitamiinissa steroidirunko on hajonnut avoketjuiseksi, ns. sekosteroidiksi. D₃-vitamiini ei sellaisenaan ole elimistössä aktiivinen, vaan se kulkeutuu maksaan, jossa se hydroksyloidaan 25-hydroksi-D-vitamiiniksi, eli kalsidioliksi. Muutos on esitetty kuvassa 2. (Aro, Antti 2005; Toriola, Adetunji T. 2010.)



KUVA 2. D₃-vitamiinin muutos kalsidioliksi (Wikipedia. 2011, hakusana Vitamin D)

Kalsidioli on D-vitamiinin varastomuoto, jonka pitoisuutta mittaamalla voidaan määrittää, kuinka paljon ihmisellä on D-vitamiinia elimistössään. Kalsidioli kulkeutuu maksasta munuaisiin ja hydroksyloituu siellä edelleen 1,25-hydroksi-D-vitamiiniksi, eli kalsitrioliksi. Kalsitrioli on D-vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto, joka vaikuttaa mm. kalsiumin imeytymiseen suolistosta. Kuvassa 3 on esitetty kalsidiolin muutos kalsitrioliksi. (Aro, Antti 2005; Toriola, Adetunji T. 2010.)



KUVA 3. Kalsidiolin muutos kalsitrioliksi (Wikipedia. 2011, hakusana Vitamin D)

2.2 D-vitamiinin saanti

D₃-vitamiinia muodostuu iholla auringon UVB-säteilyn vaikutuksesta. Kolesteroli muuttuu iholla 7-dehydrokolesteroliksi, joka muuttuu UVB-säteiden ansiosta D₃-vitamiinin esiasteeksi, joka taas muuttuu kehon lämmön vaikutuksesta D₃-vitamiiniksi. D-vitamiinin tuotto iholla alkaa heti ihon altistuessa UVB-säteille, mutta altistuksen jatkuessa D-vitamiinin muodostuminen lakkaa ja 7-dehydrokolesterolista muodostuu metabolisesti inaktiivisia steroleja. Auringon valon vaikutuksesta elimistössä ei voi muodostua myrkyllisiä määriä D-vitamiinia. Vaatteiden ja aurinkovoiteen käyttö ehkäisevät D-vitamiinin muodostumista iholla, kun tarvittavat UVB-säteet eivät pääse iholle. Ihon vanhetessa D-vitamiinin muodostuminen heikkenee. Myös ihon väri vaikuttaa D-vitamiinin muodostumiseen: mitä tummempi iho, sen paremmin se suojaa UVB-säteiltä ja sitä vähemmän D-vitamiinia iholla muodostuu. (Lindholm, Risto 2010; Paakkari, Ilari 2010b; Toriola, Adetunji T. 2010.)

Tutkimusten mukaan lyhyet, 5–10 minuutin mittaiset altistumiset auringonvalolle muutaman kerran viikossa riittävät elimistössä tarvittavan D-vitamiinin muodostumiseen. Kuitenkin tarvittavat aallonpituudet (290–315 nm) suodatuvat ilmakehän otsonikerroksessa, kun aurinko paistaa matalalta. Näin ollen Suomen leveysasteilla D-vitamiinia muodostuu pääasiassa vain huhtikuun ja syyskuun välisenä aikana ja silloinkin parhaiten keskipäivän aikaan. Napapiirin pohjoispuolella D-vitamiinia ei enää muodostu. (Lindholm, Risto 2010; Paakkari, Ilari 2010b; Toriola, Adetunji T. 2010.)

Auringon lisäksi D-vitamiinia saadaan luonnollisesti vain kalasta ja munankeltuaisesta. Lisäksi D₂-vitamiinia saadaan joistakin sienistä, mutta D₂-vitamiini imeytyy suolesta huonommin kuin D₃-vitamiini. Koska D-vitamiinia on vaikea saada ravinnosta, Suomessa on 2000-luvulla päätetty lisätä D-vitamiinia nestemäisiin maitovalmisteisiin sekä ravintorasvoihin. Tällä hetkellä nestemäisiin maitotuotteisiin lisätään D₃-vitamiinia 1 µg/100 ml. Levitettävään ravintorasvoihin suositellaan lisäämään 20 µg/100 g D₃-vitamiinia. D₂-vitamiinia voidaan käyttää täysin kasviperäisiin tuotteisiin. Tarvittava D-vitamiinipitoisuus saavutetaan, kun käytetään päivittäin vähintään puoli litraa

maitotuotteita sekä vitaminoituja levitteitä. Lisäksi kalaa tulisi syödä vähintään kahdesti viikossa. Kalan rasvapitoisuudella ei kuitenkaan ole merkitystä D-vitamiinin saannissa, vaan myös vähärasvaisesta kalasta voi saada paljon D-vitamiinia. Parhaita kaloja D-vitamiinin suhteen ovat lohi ja kirjolohi sekä siika, silakka, kuha ja ahven. Vähiten D-vitamiinia on tonnikalassa ja seitissä. (Kärkkäinen, Merja – Lamber-Allardt, Christel – Natri, Anna-Mari – Outila, Terhi 2003; Paakkari, Ilari 2010a; Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2010.)

2.3 D-vitamiinin saantisuositukset

Arvo Ylppö kehotti jo 20-luvulla antamaan pikkulapsille D-vitamiinilisää riisitaudin ehkäisemiseksi. D-vitamiinilisän annostusta on pienennetty useaan otteeseen tämän jälkeen. 60-luvulla annos pienennettiin puoleen alkuperäisestä suosituksesta (100 mikrogrammasta 50 mikrogrammaan) ja myöhemmin annosta on edelleen pienennetty niin, että se tällä hetkellä on 10 mikrogrammaa päivässä alle kaksivuotiailla lapsilla. Sitä vanhemmilla suositus on 7,5 mikrogrammaa päivässä lukuun ottamatta yli 60-vuotiaita ja raskaana olevia sekä imettäviä naisia, joilla suositeltu päiväannos on 10 mikrogrammaa. Lisäksi suosituksissa on poikkeuksia paljon D-vitaminoituja tuotteita, kuten maitovalmisteita, käyttäville, jolloin D-vitamiinilisä on tarpeeton. D-vitamiinin saantisuositukset on kerätty taulukkoon 1. (Mäkitie, Outi 2011; Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2010.)

TAULUKKO 1. D-vitamiinin saantisuosituksset (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2010.)

Ikä v	D-vitamiini, µg
Lapset:	
< 6 kk	-
6-11 kk	10
12–23 kk	10
2-5 v	7,5
6-9 v	7,5
Miehet:	
10–13	7,5
14–17	7,5
18–30	7,5
31–60	7,5
61–74	10
>75	10
Naiset:	
10–13	7,5
14–17	7,5
18–30	7,5
31–60	7,5
61–74	10
>75	10
Raskaana olevat	10
Imettävät	10

On arvioitu, että uudistetuista saantisuosituksista huolimatta suomalaisten D-vitamiinin saanti jää liian alhaiselle tasolle. Tutkimusten mukaan seerumin paras D-vitamiinipitoisuus olisi se, minkä auringon valo saa maksimaalisesti aikaan iholla, mikä vastaa seerumin kalsidiolipitoisuutta 90–120 nmol/l. Tähän pitoisuuteen päästään 100 mikrogramman päiväannoksella, eli nykysuosituksia tulisi nostaa kymmenkertaisiksi. Liian suurina annoksina D-vitamiini on kuitenkin myrkyllistä. D-vitamiinimyrkytyksen oireita ovat ruokahaluttomuus, laihtuminen, heikkous, sekavuus, oksentelu ja nestevajaus. Pikkulapsilla jo 100 mikrogramman päiväannos säännöllisesti nautittuna voi aiheuttaa myrkytyksen. Lisäksi D-vitamiinin on epäilty aiheuttavan IgE-välitteistä atooppista allergiaa. Tarvittavan D-vitamiinilisän määrä tulisikin määrittää henkilökohtaisesti perustuen henkilön painoon, ikään ja auringossa vietettyyn aikaan. (Hypoteesi: D-vitamiini lisää atooppista allergiaa. 2006; Paakkari, Ilari 2010a; Paakkari, Ilari 2010b.)

2.4 D-vitamiinin terveysvaikutukset

D-vitamiinilla on useita tutkittuja tehtäviä elimistössä. Sen pääasiallinen tehtävä on edesauttaa kalsiumin ja fosfaatin imeytymistä suolistosta verenkiertoon. Sen lisäksi se pitää yllä seerumin kalsiumtasapainoa yhdessä lisäkilpirauhashormonin kanssa vapauttamalla luustosta kalsiumia verenkiertoon, jos seerumin kalsiumpitoisuus on liian alhainen. Munuaisissa D-vitamiini edistää kalsiumin talteenottoa estäen sen uloserityksen virtsan mukana. (Aro, Antti 2005; Toriola, Adetunji T. 2010.)

D-vitamiinin on tiedetty estävän riisitautia jo vuosikymmenten ajan. Riisitaudilla tarkoitetaan tilaa, jossa lapsen solunulkoiseen väliaineeseen ei saostu kalsiumfosfaattia ja luun mineraalistuminen häiriintyy. D-vitamiinilla on tärkeä rooli kalsiumin imeytymisessä ja sen saostumisessa soluväliaineeseen. Riisitaudin oireita ovat luuston heikko kehitys ja kuormituksenkestävyys sekä lihasheikkous, joista seuraa luunmurtumia, luiden taipumista ja motorisen kehityksen hidastumista. Pahimmillaan riisitauti voi aiheuttaa kouristuksia veren liian alhaisen kalsiumpitoisuuden vuoksi. Aikuisilla D-vitamiinin puutos aiheuttaa riisitaudin kaltaista osteomalasiaa. Osteomalasian oireita ovat luuston

kipu, erityisesti lonkkien ja alaraajojen seudulla, luunmurtumat sekä lihasheikkous. Osteomalasiaa ei kuitenkaan tule sekoittaa osteoporoosiin. Osteoporoosissa luustosta häviää sekä mineraaleja että soluväliainetta. D-vitamiini auttaa myös osteoporoosin ehkäisyssä ja hoidossa, mutta vain suurina pitoisuuksina. Suomessa tehdyssä tutkimuksessa on osoitettu, että korkea D-vitamiinipitoisuus äidillä raskauden aikana vaikuttaa positiivisesti vauvan luuston kehitykseen. Vauvoilla, joiden äidin veren D-vitamiinipitoisuus oli suuri, oli suuremmat sääriluut ja korkeampi mineraalipitoisuus luissa. (Kaitila, Ilkka – Tuomi, Tiinamaija – Voutilainen, Raimo - Välimäki, Matti J. 2001; Lahdenne, Pekka 2010.)

D-vitamiini vaikuttaa immuunipuolustukseen. D-vitamiinireseptori välittää signaalin, jonka seurauksena solut erittävät antimikrobisia peptidejä. Antimikrobiset peptidit estävät useiden virusten, kuten influenssa-, herpes-, papilloomavirus-, sytomegalo-, HI- ja adenoviruksen toimintaa. Antimikrobisten peptidien toimiessa yhdessä ihon ja limakalvojen kanssa muiden immuunijärjestelmän osien ei tarvitse aktivoitua, jolloin virusinfektio ei pääse puhkeamaan oireelliseksi taudiksi. Tämä D-vitamiinin viruksia tuhoava vaikutus voi vaikuttaa myös influenssavirusten kausivaihteluun. Influenssavirus leviää helpoiten talviaikaan, jolloin myös D-vitamiinipitoisuus seerumissa on yleensä alhaisimmillaan. Tieteellistä näyttöä riippuvuussuhteesta ei vielä ole, mutta tutkimuksia on käynnissä. (Alitalo 2010.)

THL:n, Tampereen ja Oulun yliopiston tekemän tutkimuksen mukaan ensimmäisen elinvuoden aikana saatu D-vitamiini alensi riskiä sairastua tyypin 1 diabetekseen. Ne lapset, jotka eivät olleet saaneet D-vitamiinia ensimmäisen elinvuotensa aikana, sairastuivat kahdeksan kertaa todennäköisemmin tyypin 1 diabetekseen, kuin D-vitamiinilisää saaneet lapset. (Vauvana saatu D-vitamiini suojasi tyypin 1 diabetekselta. 2011.)

Amerikkalaisen tutkimuksen mukaan D-vitamiini voi myös pienentää syöpäriskiä. Tutkimuksessa syöpäriski pieneni 60 % niillä testihenkilöillä, jotka saivat D-vitamiinilisää. Viitteitä D-vitamiinin syöpää estävistä vaikutuksista on saatu myös muista tutkimuksista. Runsaasti auringossa olleet miehet saivat

tuivat muita myöhemmin eturauhassyöpään, ja kalsitriolin epäillään vaikuttavan syöpäsolujen kasvuun ja apoptoosiin. Myös paksusuolisyövän syntyyn D-vitamiinilla on ollut ehkäisevä vaikutus, mutta tulokset ovat olleet jossain määrin ristiriitaisia. (Aro, Antti 2005; D-vitamiinilisä voi pienentää syöpäriskiä. 2007.)

2.5 D-vitamiinin määrittymenetelmät

D-vitamiinia voidaan määrittää seerumista useilla erilaisilla menetelmillä. D-vitamiinia määritettiin vuonna 1993 radioaktiiviseen leimaan perustuvalla immunologisella menetelmällä käyttäen leimana jodi-125:tä. D-vitamiinia voidaan määrittää myös kemiluminesenssiin perustuvalla immunologisella menetelmällä. D. Laurie tutkijatovereineen on hakeneut patenttia D-vitamiinin määrittämiseen entsyymileimaan perustuvalla immunologisella menetelmällä. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010; Barnes, A.K. - Gardner, M.J. - Laurie, D. 2009; Hollis B.W. - Kamerud, J.Q. - Lorenz, J.D. - Napoli, J.L. - Selvaag, S.R. 1993.)

D-vitamiinia voidaan määrittää myös kromatografisesti. Näissä menetelmissä D-vitamiini on ensin eroteltava seerumin muista osista uuttamalla ja tausta aiheuttaa usein häiriöitä, koska seerumissa voi olla paljon aineita, jotka absorboivat samalla aallonpituusalueella kuin D-vitamiini. HPLC:lla D-vitamiinia on määritetty jo 70-luvun lopulta lähtien. Uudet menetelmät yhdistävät neste-kromatografian ja massaspektrometrin, jolloin tausta ei aiheuta niin paljon ongelmia. Myös kaasukromatografiaa on hyödynnetty D-vitamiinin määrittämisessä. (Chung, E. - Gray, D. - Van Der Gugten, G. - Ostonal, S. - Peng, X. - Pinnawala, A. - Yi, R. 2009; DeLuca H.F. - Hamstra, A.J. - Horst, R.L. - Shepard, R.M. 1978.)

D₂-vitamiinia voidaan määrittää spektrofotometrisesti suolahapon ja tetrakloorietaanin avulla. Tutkittava näyte haihdutetaan ja kuiva-aineeseen lisätään suolahappoa ja tetrakloorietaania. D₂-vitamiini reagoi suolahapon ja tetrakloorietaanin kanssa ja muodostaa vihertävän keltaisen yhdisteen, jonka absorbanssi voidaan mitata aallonpituudella 460 nm. D₂-vitamiini muodostaa

värillisen kompleksin myös käytettäessä rikkihappoa, mutta silloin A-vitamiini häiritsee määrittystä. Tällä menetelmällä ei kuitenkaan voida määrittää D₃-vitamiinia eikä kalsidiolia, jolloin ei saada selvää kuvaa seerumin D-vitamiinipitoisuudesta. (Hassan, Saad S. M. 1978.)

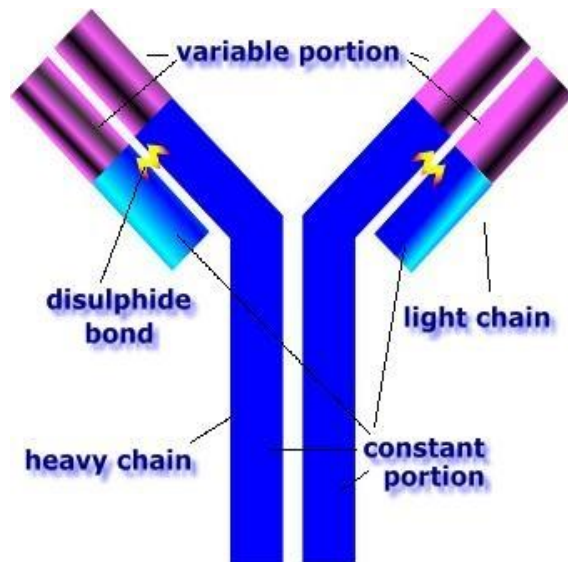
3 IMMUNOLOGISET MÄÄRITYSMENETELMÄT

3.1 Vasta-aineet

Kun jokin antigeeni, esim. proteiini tai muu rakenteeltaan monimutkainen yhdiste, tunkeutuu elimistöön, alkavat B-lymfosyytit T-lymfosyyttien avulla jakautua. B-lymfosyyttien pinnalla on antigeenille spesifisiä reseptoreita, joihin kiinnittyessään antigeeni aiheuttaa immuunireaktion käynnistymisen. Myös pienet molekyylit voivat aiheuttaa immuunireaktion, jos se on kiinnittyneenä suurempaan kantajaproteiiniin. Tällöin pientä molekyyliä kutsutaan hapteeniksi. B-lymfosyytit muuttuvat plasmasoluiksi, ja ne alkavat tuottaa humoraalisia eli liukoisia vasta-aineita. (Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti 2011; Kumpulainen, Elsa 2011a.)

3.1.1 Vasta-aineen rakenne

Vasta-ainemolekyyli on y:n mallinen: se koostuu kahdesta raskaasta ja kahdesta kevyestä polypeptidiketjusta. Raskaat ketjut ovat keskenään samanlaiset, samoin lyhyet ketjut. Lyhyet ketjut ovat kiinni raskaissa ketjuissa kovalenttisillä rikkisilloilla ja ei-kovalenttisillä sidoksilla, kuten vetysidoksilla ja ionisidoksilla. Lisäksi raskaat ketjut ovat kiinni toisissaan samalla tavalla kuin kevyet ketjut. Raskaiden ketjujen liittymiskohtaa kutsutaan sarana-alueeksi, sillä se ei ole laskostunut ja sen vuoksi se on taipuisa. Kuvassa 4 on esitetty vasta-ainemolekyylin rakenne. (Goldsby, Richard A. - Kindt, Thomas J. - Osborne, Barbara A. 2007; Hedman ym. 2011.)



KUVA 4. Vasta-ainemolekyylin rakenne (Wikipedia, hakusana Immune System)

Vasta-ainemolekyylin polypeptidiketjuja koskevat samat rakenteelliset säännöt kuin mitä tahansa proteiineja. Niillä on primäärinen rakenne, eli toisiinsa kiinnittyneet aminohapot. Sekundäärinen rakenne muodostuu aminohappoketjun laskostuessa ja kiertyessä itsensä ympäri. Sen jälkeen ketju kiertyy monimutkaisesti itsensä ympäri muodostaen tertiäärisen rakenteen. Sekundäärinen ja tertiäärinen rakenne muodostuu heikkojen vuorovaikutusten, kuten vetysidosten vuoksi. Kvaternäärinen rakenne syntyy raskaiden ja kevyiden ketjujen kiinnittyessä toisiinsa. (Kumpulainen, Elsa 2011b.)

Tietyn pituinen aminohappoketju muodostaa immunoglobuliinidomeenin, eli alueen jolla on tiettyjä ominaisuuksia. Vasta-ainemolekyylissä on useita domeeneja, vakio- sekä variaabelidomeeneja. Raskaassa ketjussa domeeneja on neljä tai viisi: yksi variaabelidomeeni ja kolme tai neljä vakiodomeenia. Kevyt ketju taas muodostuu kahdesta domeenista, vakiosta ja variaabelista. Vakiodomeenienkin rakenne kuitenkin vaihtelee eri immunoglobuliiniryhmien välillä. Vasta-aineen antigeeniä sitova kohta on kevyen ja raskaan ketjun yhteen liittyneillä variaabelialueilla. Näin ollen vasta-aineeseen voi sitoutua kaksi antigeeniä samanaikaisesti. Antigeeneissä olevaa rakennetta, johon vasta-aine kiinnittyy, kutsutaan epitoopiksi. (Goldsby ym. 2007; Hedman ym. 2011.)

3.1.2 Vasta-aineryhmät

Vasta-aineita on viittä erityyppistä: IgG, IgM, IgA, IgE, sekä IgD. IgG on yleisin seerumista löytyvä immunoglobuliini. IgG on pieni monomeeri, joka voi siirtyä sikiöön istukan kautta. IgM ei pysty läpäisemään verisuonia, sillä se muodostaa viiden yksikön pentameerin. Seerumin vasta-aineista IgM:n osuus on 5–10 %. IgM muodostuu ensimmäisenä vieraan aineen tunkeutussa kehoon ja se vastaa näin ollen nopeasta immuunipuolustuksesta. IgA:n osuus seerumin vasta-aineista on 5-15 %, mutta sitä tavataan pääasiassa limakalvoilla, joissa se muodostaa muurin elimistöön pyrkiville vieraille aineille. IgA on dimeeri, eli se muodostuu kahdesta toisiinsa liittyneestä IgA-molekyylistä. IgG-, IgM- ja IgA -vasta-aineita muodostuu imusolmukkeissa ja pernassa, ja IgA:ta muodostuu lisäksi limakalvoilla. (Goldsby ym. 2007; Kumpulainen, 2011a.)

IgE:n pitoisuus seerumissa on hyvin pieni. IgE toimii yhdessä syöttösolujen kanssa ja voimistaa paikallista tulehdusreaktiota vapauttamalla histamiinia, mikä aiheuttaa elimistössä allergisen reaktion. IgE:tä muodostuu limakalvojen alaisessa imukudoksessa. IgD:n merkitys on vielä epäselvä. Seerumin vasta-aineista sitä on alle prosentti, mutta sitä löytyy lymfosyyttien pinnalta. (Goldsby ym. 2007; Kumpulainen, 2011a.)

3.1.3 Monoklonaaliset ja polyklonaaliset vasta-aineet

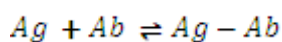
Monoklonaalisisilla vasta-aineilla tarkoitetaan sellaista vasta-ainetta, joka on muodostunut yhtä antigeeniepitooppia vastaan. Sen valmistaminen tapahtuu immunisoimalla hiiri antigeenillä, jonka jälkeen hiiren pernan vasta-ainetta muodostavat solut kerätään talteen. Nämä solut fuusioidaan myeloomasta peräisin olevien, mutatoituneiden B-solujen kanssa. Nämä myeloomasolut elävät sopivissa olosuhteissa ikuisesti. Fuusion seurauksena syntyy hybridomasoluja, jotka seuraavaksi erotellaan selektiivisten kasvatusalustojen avulla fuusioitumattomista perna- ja myeloomasoluista. Näin saadaan solulinja, joka tuottaa monoklonaalisia vasta-aineita joko suoraan viljelmään, tai istutettuina hiiren vatsaonteloon. Näin tuotettu vasta-aine on hyvin spesifinen

ja homogeeninen, sitä voidaan tuottaa rajattomasti ja se ei aiheuta ristireaktioita. (Hedman ym. 2011; Kumpulainen, 2011a.)

Polyklonaalinen vasta-aine on useiden vasta-aineiden seos, joka muodostuu antigeenin eri epitooppien tuottamista vasta-aineista. Sitä valmistetaan immunisoimalla sopiva koe-eläin, usein kani tai vuohi, antigeenillä. Koe-eläimen immuunipuolustus käynnistyy, ja sen elimistö alkaa tuottaa vasta-aineita. Yhden koe-eläimen immunisoiminen ei kuitenkaan riitä, sillä korkealaatuisia vasta-aineita tuottaa vain 10–20 % koe-eläimistä. Koe-eläimet immunisoidaan 2-4 viikon välein ensimmäisen immunisoinnin jälkeen, ja muutaman viikon kuluttua eläimestä otetaan verinäyte ja tutkitaan, onko eläin alkanut tuottaa vasta-aineita. Vaikka eläin olisi alkanut tuottaa vasta-aineita, sen immunisointia jatketaan edelleen vasta-ainetuotannon jatkamiseksi. Näin syntyneet vasta-aineet ovat heterogeenisiä ja ne voivat aiheuttaa ristireaktioita eri menetelmissä. Lisäksi vasta-aineita ei tällä menetelmällä voi tuottaa loputtomasti, vaikka saalis onkin suuri. Tämän vuoksi monoklonaalisia vasta-aineita suositaan etenkin tutkimuskäytössä. (Hedman ym. 2011; Kumpulainen, 2011a.)

3.2 Immunologisten määritysmenetelmien periaate

Immunologiset määritysmenetelmät perustuvat spesifiseen reaktioon, jossa vasta-aine sitoutuu antigeeniin "avain-lukko" -periaatteen mukaisesti. Tämä periaate on esitetty kaavassa 1, jossa Ag kuvaa antigeeniä ja Ab vastaainetta.



KAAVA 1.

Reaktiossa syntyvän sidoksen lujuutta kuvaa affiniteettivakio, joka vastaa tavallisen kemiallisen reaktion tasapainovakiota. Jokaiselle vasta-aine - antigeeniparille voidaan laskea oma affiniteettivakionsa, joka kuvaa kyseisen parin sitoutumista toisiinsa. Affiniteettivakion arvo voi vaihdella laajasti. Korkean affiniteetin omaavilla vasta-aine -antigeenipareilla se on kokoluokkaa 10^{11}

mol⁻¹ ja heikoilla pareilla taas kokoluokkaa 10⁴ - 10⁵ mol⁻¹. Affiniteettivakio lasketaan kaavan 2 avulla, jossa K_a vastaa affiniteettivakiota, [Ag] antigeenin konsentraatiota, [Ab] vasta-aineen konsentraatiota ja [Ag-Ab] syntyvän kompleksin konsentraatiota.

$$K_a = \frac{[Ag - Ab]}{[Ab][Ag]}$$

KAAVA

2.

Immunologisilla määrittämissä menetelmillä voidaan määrittää joko vasta-ainepitoisuuksia tai erilaisia antigeenejä, kuten vitamiineja, hormoneja tai lääkkeitä. Menetelmät kehitettiin tarpeeseen tutkia analyttien hyvin pieniä pitoisuuksia seerumissa, esimerkiksi D-vitamiinin pitoisuus seerumissa on n. 20–120 nmol/l. Mikään muu menetelmä ei ole tarpeeksi herkkä tällaisten pitoisuuksien mittaamiseen. Tapahtuvan reaktion detektointiin on kehitetty useita erilaisia menetelmiä, mm. erilaisia saostumisreaktioita, erilaisia merkkiaineita sekä erilaisia elektroforeettisia menetelmiä. (Goldsby ym. 2007; Kumpulainen, 2011a.)

3.2.1 Saostumisreaktiot

Agglutinaatioreaktiolla tarkoitetaan reaktiota, jossa lateksipartikkeleiden tai verisolujen pinnalla oleva antigeeni reagoi vasta-aineensa kanssa ja vasta-aine muodostaa siltoja partikkeleiden välille, jolloin syntyy liukenematon sakka. Tulokset ovat yleensä kvalitatiivisia ja tulkitaan joko negatiivisiksi tai positiivisiksi. Tällaista reaktiota kutsutaan myös epäsuoraksi agglutinaatioksi. Suorassa agglutinaatiossa vasta-aine saostaa antigeenin tai tutkittavat solut suoraan liuoksesta. Agglutinaatioreaktiota käytetään mm. veriryhmän määrittämiseen. (Kumpulainen 2011a.)

Immunodiffuusiassa saostuma muodostetaan agarille. Spesifinen vasta-aine valetaan agarin joukkoon ja siihen tehdään kaivoja antigeeneille. Antigeenit pipetoidaan kaivoihin ja agariin muodostuu rengasmaisia saostumia, jos antigeeni ja vasta-aine reagoivat keskenään. Immunodiffuusioreaktiot ovat joko

kvalitatiivisia, jolloin tulos tulkitaan sen mukaan syntyykö sakkaa vai ei, tai kvantitatiivisia. Kvantitatiiviset reaktiot vaativat tunnetun pitoisuuden omaavia antigeeniliuoksia, jotka pipetoidaan omiin kaivoihinsa. Tuntemattoman antigeeniliuoksen pitoisuus saadaan vertaamalla syntyneen saostumarenkaan pinta-alaa tunnettujen antigeeniliuosten synnyttämien saostumarenkaiden pinta-aloihin. (Kumpulainen 2011a.)

3.2.2 Elektroforeettiset menetelmät

Elektroimmunodiffuusio perustuu immunodiffuusion. Vasta-aine ja antigeeni asetetaan geelille vastakkaisiin päihin. Geeliin kytketään sähkövirta, joka ajaa vasta-aineen ja antigeenin yhteen. Vasta-aineen ja antigeenin yhdistyessä muodostuu saostuma, kuten immunodiffuusiosta. Menetelmä on huomattavasti nopeampi kuin perinteinen immunodiffuusio. (Kumpulainen 2011a.)

Rakettielektroforeesissa vasta-aine on geelissä valmiiksi. Antigeeni laitetaan kuoppaan, geeliin kytketään sähkövirta ja antigeeni ajetaan geeliin. Jos antigeeni reagoi vasta-aineen kanssa, muodostuu rakettimainen saostuma, jonka pitoisuus korreloi saostuman pituuden kanssa. Kun standardeina ajetaan tunnettuja antigeeniliuoksia, menetelmästä saadaan kvantitatiivinen. Menetelmä sopii myös pienille antigeenipitoisuuksille. (Kumpulainen 2011a.)

Immuno-elektroforeesi muistuttaa paljon elektroimmunodiffuusiota. Antigeeniliuos, esim. seerumi, pipetoidaan kuoppaan ja ajetaan sähkövirran avulla geeliin. Antigeenit kulkeutuvat geelissä kokonsa mukaisesti pienet nopeammin kuin suuret, jolloin tietyn ajan kuluttua antigeenit ovat geelillä erottuneina toisistaan. Tämän jälkeen geelille lisätään vasta-ainetta sille tarkoitettuun uraan. Antigeenit ja vasta-aine reagoivat keskenään ja muodostuu saostumakaaria. (Kumpulainen 2011a.)

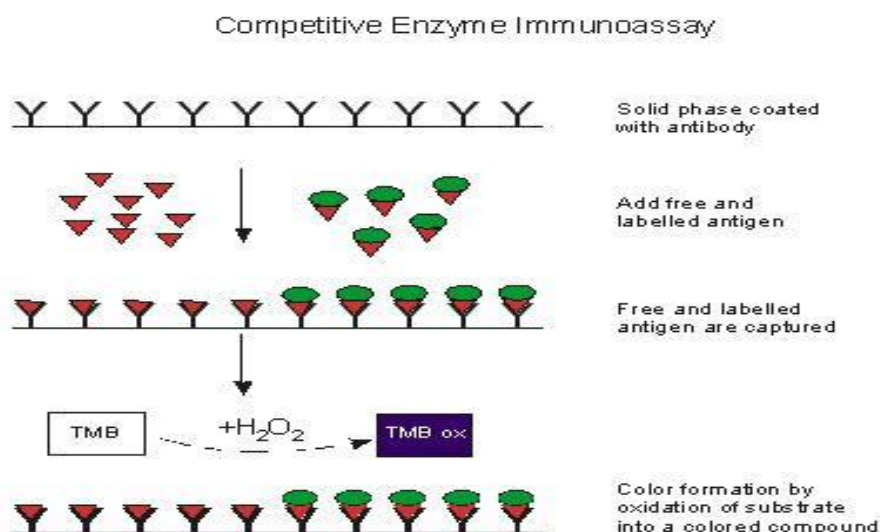
3.2.3 Merkkiaineisiin perustuvat menetelmät

Immunologisissa määritysmenetelmissä merkkiaineiden käyttö on hyvin yleistä. Erilaisia merkkiaineita on kehitetty paljon ja ne soveltuvat erilaisiin

käyttökohteisiin. Yleisimpiä merkkiaineita ovat radioaktiivisuuteen, kompleksin värinmuutokseen, fluoresenssiin tai kemiluminesenssiin perustuvat merkkiaineet. Immunoblottaus yhdistää merkkiaineet ja elektroforeesin. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)

Merkkiaineisiin perustuvat menetelmät voidaan jakaa kilpaileviin ja ei-kilpaileviin menetelmiin. Ei-kilpailevat menetelmät voidaan edelleen jakaa suoraan ja epäsuoraan menetelmään. Suoraa menetelmää kutsutaan myös "sandwich" -menetelmäksi. Reaktiot suoritetaan usein kuoppalevyillä, mutta ne voidaan tehdä myös suoraan liuoksessa. Kvantitatiivisia menetelmistä saadaan, kun ensin mitataan tunnettujen standardien pitoisuudet ja piirretään standardikuvaaja. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)

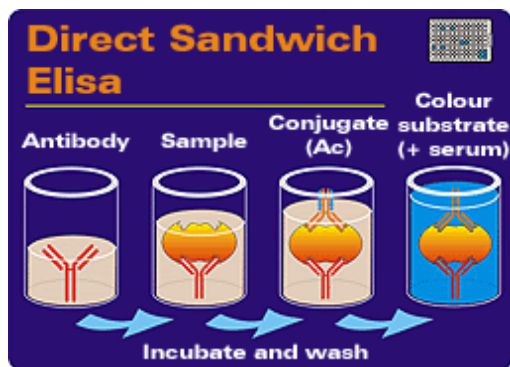
Kilpailevassa menetelmässä antigeeni kilpailee vasta-aineen sitoutumiskohdista leimatun antigeenin kanssa. Vasta-ainetta on ylimäärin näytteeseen verrattuna, jolloin osa leimatusta antigeenistäkin sitoutuu vasta-aineeseen. Sitoutumaton leimattu antigeeni poistetaan ja leiman tuottama signaali mitataan. Tulos on kääntäen verrannollinen tutkittavan antigeenin pitoisuuteen, eli mitä enemmän tutkittavaa antigeeniä on, sitä vähemmän leimattua antigeeniä vasta-aineeseen sitoutuu ja sitä pienempi signaali saadaan. Menetelmä on kuvattu kuvassa 5. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)



KUVA 5. Kilpaileva menetelmä (Goodrich, Wendy - Held, Paul. 2006.)

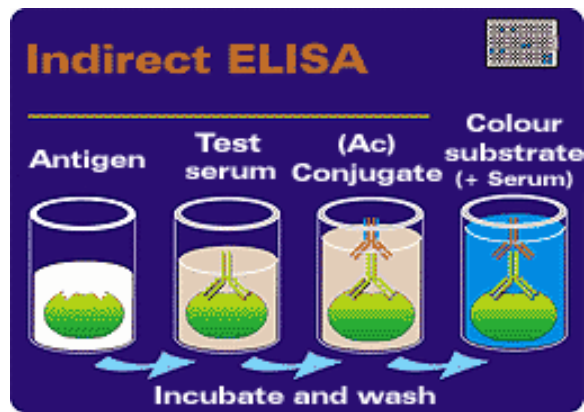
Kilpaileva menetelmä voidaan toteuttaa myös niin, että vasta-ainetta inkuboidaan tutkittavan antigeenin kanssa. Tämän jälkeen seos laitetaan kuoppaan, jonka pohjalle on kiinnitetty samaa antigeeniä. Aikaisemmin vapaaksi jäänyt vasta-aine kiinnittyy kuopan pohjalla olevaan antigeeniin, jonka jälkeen irtonainen vasta-aine, johon tutkittava antigeeni on sitoutunut, pestään pois. Sitten kuoppaan lisätään leimattua vasta-aineen vasta-ainetta ja leiman tuottama signaali mitataan. Tulos on tässäkin menetelmässä kääntäen verrannollinen tutkittavan antigeenin määrään. (Goldsby 2007.)

Suorassa eli "sandwich" -menetelmässä kuoppalevyn kaivot on päällystetty eli koutattu vasta-aineella. Tutkittava antigeeni lisätään kuoppaan ja se kiinnittyy inkuboinnin aikana pohjaan koutattuun vasta-aineeseen. Inkuboinnin jälkeen kuoppaan lisätään leimattu vasta-aine ja leiman aiheuttama signaali mitataan. Saatu tulos on suoraan verrannollinen tutkittavan antigeenin määrään. Kuvassa 6 on esitetty "sandwich" -menetelmän periaate. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)



KUVA 6. "Sandwich" -menetelmän periaate (Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J.M. 2001.)

Epäsuoralla menetelmällä tutkitaan vasta-aineen pitoisuutta. Kuoppalevyn kaivot ovat koutattu antigeenillä. Kuoppaan lisätään tutkittavaa vasta-ainetta, joka kiinnittyy antigeeniin. Inkuboinnin jälkeen kuoppaan lisätään leimattua vasta-aineen vasta-ainetta ja leiman aiheuttama signaali mitataan. Saatu tulos on tässäkin suoraan verrannollinen tutkittavan vasta-aineen pitoisuuteen. Epäsuoran menetelmän periaate on esitetty kuvassa 7. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)

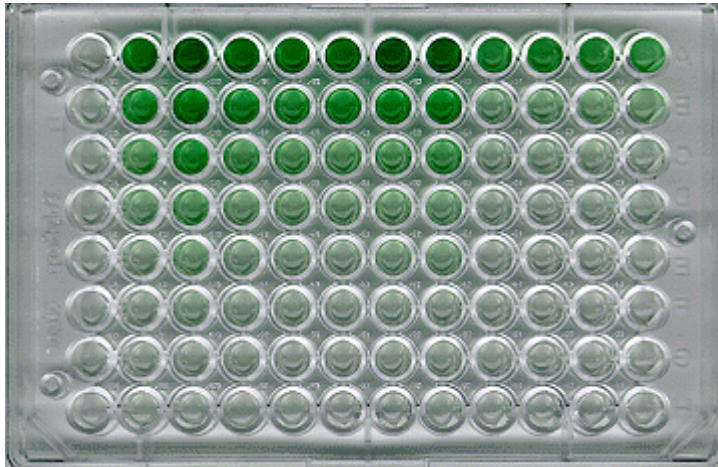


KUVA 7. Epäsuoran menetelmän periaate (Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J.M. 2001.)

Radioaktiiviset menetelmät (RIA) perustuvat radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöön. Yleisin käytetty merkkiaine on jodi-125 (^{125}I), mutta myös tritiumia (^3H) voidaan käyttää. Radioaktiivisella merkkiaineella voidaan leimata joko antigeeni tai vasta-aine, riippuen siitä millaista menetelmää kulloinkin käytetään. Radioaktiivinen menetelmä on hyvin herkkä ja spesifinen; sillä voidaan mitata jopa 1 ng/ml pitoisuuksia. Lisäksi menetelmää on helppo käyttää ja se on helppo automatisoida, jolloin kustannukset laskevat. Haittapuolia radioaktiivisissa menetelmissä ovat kalliit laitteet, ristireaktioita aiheuttavat proteiinit seerumissa sekä radioaktiivisuuden aiheuttamat haitat. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)

Kompleksin värinmuutokseen perustuvia menetelmiä kutsutaan entsyymileimatuiksi (EIA) menetelmiksi. Tässä menetelmässä vasta-aine on leimattu entsyymillä, joka reagoi värittömän substraattinsa kanssa muodostaen värillisen lopputuotteen. Reaktion lopputulos voidaan mitata spektrofotometrisesti. Sopivia entsyymejä ovat mm. alkalinen fosfataasi, piparjuuriperoksidaasi ja β -galaktosidaasi. Näillä menetelmillä voidaan määrittää analyyttiä joko kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti ja niillä päästään yhtä pieniin pitoisuuksiin kuin radioaktiivisillakin menetelmillä. Menetelmässä tarvittavat laitteet ovat edullisempia kuin radioaktiivisuuteen perustuvissa menetelmissä, eivätkä entsyymileimaan perustuvat menetelmät ole niin vaarallisia. Tunnetuin ja laajimmin käytetty entsyymileimattu menetelmä on ELISA-menetelmä (Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay). Kuvassa 8 on tyypillinen ELISA-kuoppalevy. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)



KUVA 8. ELISA-kuoppalevy (ELISA Activity. 1998.)

Fluoresenssiin (FIA) perustuvissa menetelmissä antigeeni tai vasta-aine on leimattu fluoresoivalla molekyylillä. Fluoresoivia molekyylejä ovat esim. fluoreseiini, rodamiini sekä fykoerytriini. Aikaerotteiseen fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä voidaan vähentää taustan aiheuttamia vääriä tuloksia. Korkea tausta on ongelma immunologisissa menetelmissä, sillä seerumi sisältää paljon erilaisia proteiineja, jotka voivat aiheuttaa ristireaktioita vasta-aineiden kanssa. Aikaerotteisessä fluoresenssissa antigeeni tai vasta-aine on leimattu europiumilla, jolla on pitkä puoliintumisaika. Näytettä eksitoidaan valoimpulssilla ja muodostunut fluoresenssi mitataan viiveajan jälkeen. Taustan aiheuttama fluoresenssi ei päädy mittaustuloksiin, sillä sen puoliintumisaika on paljon lyhyempi kuin europiumilla. (Goldsby 2007; Kumpulainen 2011a.)

Jotkin kemialliset reaktiot tuottavat edetessään valoa. Tätä ilmiötä kutsutaan kemiluminesenssiksi, ja sitä voidaan käyttää hyväksi immunologisissa määrittelyissä (CMIA-menetelmä). Syntynyt valo voidaan mitata valomonistinputkella. Menetelmää voidaan käyttää sekä kvalitatiivisiin että kvantitatiivisiin määrittelyihin. Kemiluminesenssiin perustuvat menetelmät ovat hyvin herkkiä, parhaimmillaan jopa 200 kertaa herkempiä kuin entsyymileimaan perustuvat

menetelmät. Kemiluminesenssiin perustuvissa menetelmissä käytetään mm. akridiinileimoja. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010; Goldsby 2007.)

Immunoblottaus tehdään kuten tavallinen western blot, mutta yleensä tutkittavien proteiinien sijaan määritetään vasta-aineita tai antigeenejä. Western blotissa näytteen proteiinit erotellaan toisistaan SDS-PAGE:n (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) avulla. Sen jälkeen proteiinit siirretään nitroselluloosakalvolle elektroforeettisesti. Tutkittavat proteiinit löydetään inkuboimalla kalvoa proteiinin spesifisen vasta-aineen kanssa. Vasta-aine on leimattu jollain sopivalla leimalla, yleensä entsyymileimalla. Kun entsyymileimattu vasta-aine on sitoutunut tutkittavaan proteiiniin, lisätään leiman substraatti, jolloin kompleksi saadaan näkyviin. (Goldsby 2007.)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

4.1 Laboratorion laatutoiminta

Hyvin toimivassa laboratoriossa on käytössä jonkinlainen laatujärjestelmä. Laatujärjestelmä takaa laboratorion tuottamien tulosten laadun, eli tilaaja voi olla varma tulosten oikeellisuudesta mittausepävarmuus huomioonottaen. Virheellinen tai epätarkka tulos voi aiheuttaa eriasteisia ongelmia, joita laatujärjestelmällä pyritään välttämään. Pahimmillaan väärä tulos voi vaikuttaa jopa ihmishenkiin tai aiheuttaa suuria taloudellisia tappioita. (Ehder, Tapio 2005; Välimäki, Ilkka 2009.)

Laatujärjestelmä on kirjattu laatukäsikirjaan, jossa kuvataan mm. organisaation rakenne, vastuiden jako, tehtäväkuvaukset, menetelmäkuvaukset ja ohjeet. Näitä näkökohtia joudutaan arviomaan laboratoriossa jatkuvasti ja niitä tulee kehittää asetettujen tavoitteiden saavuttamiseksi. Se auttaa huomaamaan virheet ja muut epäkohdat toiminnassa ja korjaamaan ne. (Hänninen, Hanna. – Ruismäki, Mia. – Seikola, Aila. – Slöör, Sari 2007; Välimäki 2009.)

Laatujärjestelmässä on kuvattu kaikkien laboratoriossa käytettyjen menetelmien menetelmäohjeet. Menetelmäohjeessa kuvataan tarkasti vaihe vaiheelta menetelmän suoritus, ja sitä tulee noudattaa joka kerta menetelmää suoritettaessa. Lisäksi laatujärjestelmään on koottu ohjeet tulosten dokumentoinnista ja arkistoinnista. Tulokset saattavat olla tarpeellisia myös myöhemmin eikä vain niiden valmistumishetkellä. Tämän takia laboratoriossa tulee varmistaa, että tulokset ovat jäljitettävissä tulevaisuudessakin. (Hänninen ym. 2007.)

Laatujärjestelmän voi virallistaa sertifioidulla tai akkreditoimalla sen. Näin laboratorio näyttää asiakkailleen luotettavalta ja uskottavalta toimijalta, joka tuottaa laadukkaita ja oikeellisia tuloksia. Joskus viranomaisten vaatimukset pakottavat laboratorion virallistamaan laatujärjestelmänsä. Sertifiointi perustuu kansainvälisiin ISO 9000 -laatujärjestelmästandardeihin. Sertifiointin myöntävät akkreditoidut sertifiointielimet, Suomessa SFS-Inspecta Sertifiointi

Oy ja Norske Veritas. Akkreditointi perustuu ISO 17000 -sarjan standardeihin. Sitä voi hakea yksittäisille laboratoriossa käytettäville menetelmille. Akkreditoinnista vastaa Suomessa Mittatekniikan keskuksen (MIKES) akkreditointipalvelu FINAS. (Välimäki 2009.)

Akkreditointi tarkoittaa sitä, että laboratorio sitoutuu noudattamaan tiettyjä toimintatapoja. Akkreditoinnissa huomioidaan mm. laboratorion dokumentointimenetelmät, laitteiden huollot ja kalibroinnit, menetelmien validointi, laboratorioden välisiin vertailumittauksiin osallistuminen sekä henkilöstön koulutus. (Hänninen ym. 2007.)

Laatujärjestelmää testataan laatuauditoinneilla. Kaikki laatujärjestelmän osa-alueet käydään läpi kerran vuodessa. Auditoinnin suorittaa ulkopuolinen auditoija, jolloin saadaan puolueettomia näkökulmia laboratorion toimintaan. Lisäksi ulkopuolinen auditoija voi antaa parannusehdotuksia huonoihin menetelmiin, joita laboratorion rutiinotoiminnassa ei huomata. Poikkeamat kirjataan ylös ja niistä laaditaan raportti, jonka avulla puutteet korjataan. Korjaustoimenpiteet tarkistetaan seuraavan auditoinnin yhteydessä. (Välimäki 2009.)

4.2 Validointi

Mittausmenetelmän validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jossa osoitetaan, onko valittu menetelmä sopiva ja pätevä aiottuun tarkoitukseen. Validointi on yleensä osa menetelmän kehittämistä, mutta se voidaan suorittaa myös jo kehitetylle menetelmälle. Validointiin kuuluvat osa-alueet ovat kuitenkin tärkeitä näkökohtia menetelmän kehitystyössä. Toimiva laatujärjestelmä vaatii menetelmän validoinnin ennen sen käyttöönottoa. (Ehder 2005.)

Validointi suoritetaan, jos kehitetään uutta menetelmää tai otetaan uusi menetelmä käyttöön laboratoriossa. Lisäksi menetelmä on hyvä validoida, jos sitä uusitaan tai se on osoittautunut epäluotettavaksi. Menetelmän tai laitteen valmistaja on usein validoinut menetelmän jo sen kehitysvaiheessa, mutta menetelmä on hyvä validoida uudelleen laboratoriossa, jossa sitä käytetään. Näin voidaan varmistaa, että menetelmä toimii varmasti ja luotettavasti myös

laboratorion olosuhteissa. Tällöin ei kuitenkaan tarvitse suorittaa aivan täydellistä validointia, vaan riittää, että keskeisimmät käyttöön liittyvät osa-alueet validoidaan. (Ehder 2005.)

Validoinnista laaditaan yleensä raportti, josta ilmenevät ainakin työn tavoite, sen toteutus sekä käytetyt välineet ja materiaalit. Raporttiin merkitään tulokset saatujen parametrien testauksesta sekä tulosten pohdinnat. Lisäksi arvioidaan mittausepävarmuutta ja häiriötekijöitä. Raportin päämääränä on todeta soveltuuko menetelmä tarkoitukseensa, vai tarvitseeko se vielä jotain lisätoimenpiteitä ennen käyttöönottoa. Menetelmäohjeeseen kirjataan validoinnin tulokset sekä laadunvarmistusmenettelyt. (Ehder 2005.)

Validointi voidaan suorittaa myös menetelmävertailun avulla. Tällöin uutta menetelmää verrataan menetelmään, jolla on aiemmin saatu luotettavia tuloksia. Menetelmä, johon uutta menetelmää verrataan, on validoitu, jolloin sen tulosten luotettavuudesta voidaan olla varmoja. Menetelmävertailu on helppo ja luotettava keino validointiin silloin, kun analyysin määrittämiseen löytyy erilaisia luotettavia menetelmiä tai kun analyysiä on määritetty aikaisemmin vanhalla menetelmällä ja uusi, mahdollisesti taloudellisempi tai nopeampi, menetelmä halutaan ottaa käyttöön. (Ehder 2005.)

Menetelmävertailu toteutetaan käytännössä niin, että uudella menetelmällä määritetään näytteitä, joiden pitoisuus on varmennettu vanhalla menetelmällä. Näytteet voidaan määrittää myös samanaikaisesti kahdella eri menetelmällä. Yleensä validointiin tarvitaan 50–100 näytettä, mutta validoinnin laajuudesta riippuen myös pienempi näytemäärä voi olla riittävä. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.3 Validoinnin parametrit

Validoinnin tulokset ilmaistaan erilaisten parametrien avulla. Validointiin kuuluu menetelmän selektiivisyyden, spesifisyyden, lineaarisuuden, mittausalueen, toteamisrajan, määritysrajan, poikkeaman (engl. bias), saannon, häiriökestävyyden, toimintavarmuuden, tarkkuuden, toistettavuuden,

uusittavuuden sekä mittausepävarmuuden tutkiminen, mikäli ne ovat valitun menetelmän kannalta olennaisia. Lisäksi tuloksista voidaan tehdä erilaisia tilastollisia analyysejä tarpeen mukaan. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.3.1 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus ilmoittaa rajat, joiden sisällä todellinen mittaustulos on valitulla todennäköisyydellä. Se kuvaa siis mittaustulosten vaihtelua ja se ilmoitetaan virherajojen avulla. Kaavassa 3 on esimerkki mittausepävarmuuden esitystavasta D-vitamiinimäärityksestä, jossa saatu tulos on 42 nmol/ml ja keskihajonta 0,50 nmol/l.

$$42 \pm 0,50 \frac{\text{nmol}}{\text{l}}$$

KAAVA 3.

Mittausepävarmuutta tarvitaan arvioitaessa tulosten luotettavuutta, vertailtaessa tuloksia ja menetelmiä, johtopäätöksiä tehtäessä sekä vertailtaessa tuloksia ohje- tai raja-arvoihin. Se ilmoitetaan yleensä suhteellisena keskihajontana tai sen laskennallisena kerrannaisena. Mittausepävarmuus voidaan määrittää myös määrittämällä yksittäisten työvaiheiden epävarmuudet ja yhdistämällä niistä saadut tulokset kokonaismittausepävarmuudeksi. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Epävarmuutta mittaukseen aiheuttaa mm. näytteenotto, näytteen kunto ja kontaminaatio, käytettyjen laitteiden ja reagenssien epävarmuus, häiriöt mittauksessa, tulosten tulkinta sekä inhimilliset tekijät. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.3.2 Selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tutkittava analytti seoksesta, jossa on myös muita mahdollisesti häiritseviä aineita. Jos menetelmä on täysin selektiivinen, sanotaan sitä spesifiseksi menetelmäksi. Spesifiset menetelmät ovat harvinaisia. Selektiivisyyttä tutkimalla varmistetaan menetelmän kyky mitata vain haluttua analyttiä. Selektiivisyyttä voi-

daan tutkia puhtaitten aineiden ja niistä tehtyjen tunnettujen seosten avulla. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.3.3 Mittausalue ja lineaarisuus

Menetelmän mittausalueella tarkoitetaan sitä tutkittavan aineen pitoisuusaluetta, jossa mittausvirhe pysyy annettujen rajojen sisällä. Menetelmän lineaarisuus tarkoittaa sitä, korreloiko saatu tulos määritettävän aineen todellisen pitoisuuden kanssa. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Lineaarisuus määritetään tunnettujen standardiliuosten avulla, ja tuloksista piirretään standardisuora. Standardisuora on ns. regressiosuora, eli se saadaan pienimmän neliösumman menetelmällä. Standardiliuosten pitoisuudet kattavat koko käytettävän mittausalueen. Suorasta voidaan silmämääräisesti määrittää lineaarinen alue. Joissain tapauksissa tuloksia voidaan ekstrapoloida, eli määrittää pitoisuus lineaarisen alueen ulkopuolelta. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.3.4 Toteamis- ja määrittämissrajat

Toteamisraja (englanniksi limit of detection, LOD) on määritettävän aineen pienin pitoisuus, joka antaa merkittävästi korkeamman signaalin kuin nollanäyte. Toteamisraja voidaan määrittää kaavalla 4, jolla saadaan toteamisraja 95 % todennäköisyydellä.

$$\text{Toteamisraja} = \text{nollanäytteen keskiarvo} + 3 \times (\text{nollanäytteiden keskihajonta})$$

KAAVA 4.

Määrittämissraja (englanniksi limit of quantitation, LOQ) on määritettävän aineen pienin pitoisuus, joka voidaan kvantitatiivisesti luotettavasti määrittää. Se on usein 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. Yleensä se on kalibrointikäyrän alhaisin piste nollaa lukuun ottamatta. Sitä ei voida määrittää ekstrapoloimalla kalibraatiosuoraa. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Menetelmän herkkyydellä tarkoitetaan pienintä eroa analyytin pitoisuudessa, mikä antaa havaittavan muutoksen menetelmän vasteessa. Herkkyys voidaan määrittää kalibrointikäyrän kulmakertoimen avulla. (Välimäki 2009.)

4.3.5 Tarkkuuteen liittyvät parametrit

Poikkeamalla tarkoitetaan mittauslaitteen systemaattista virhettä, eli tuloksen ja todellisen arvon eroa. Systemaattinen virhe (englanniksi bias) voi johtua esimerkiksi tuloksen väärästä lukemisesta, laitteen vääristä säädöistä tai huonosta kunnosta. Poikkeama ilmoitetaan yleensä prosentteina ja se voi vaihdella eri analyyttien välillä. Poikkeama voidaan jättää huomioimatta, mikäli se ei ole merkittävä yhdistettyyn epävarmuuteen nähden. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Menetelmälle voidaan laskea myös systemaattinen kokonaisvirhe B kaavan 5 avulla, jossa x on mittaustulosten keskiarvo ja T teoreettinen tai standardimenetelmällä määritetty arvo.

$$B = x - T \quad \text{KAAVA 5.}$$

Kaavassa 6 kokonaisvirhe on esitetty prosentteina.

$$B (\%) = \frac{x - T}{T \times 100} \quad \text{KAAVA 6.}$$

Mittauksen tarkkuudella tarkoitetaan mittaustuloksen ja tosiarvon yhteensovittuvuutta, eli onko tulos sama kuin tosiarvo. Sillä voidaan tutkia sekä satunnais- että systemaattista virhettä. Täsmällisyys ilmoitetaan suhteellisena keskihajontana, joka voidaan laskea kaavan 7 avulla. Kaavassa 7 suhteellinen keskihajonta on V, keskihajonta s ja keskiarvo x.

$$V = \frac{s}{x} \times 100 \% \quad \text{KAAVA 7.}$$

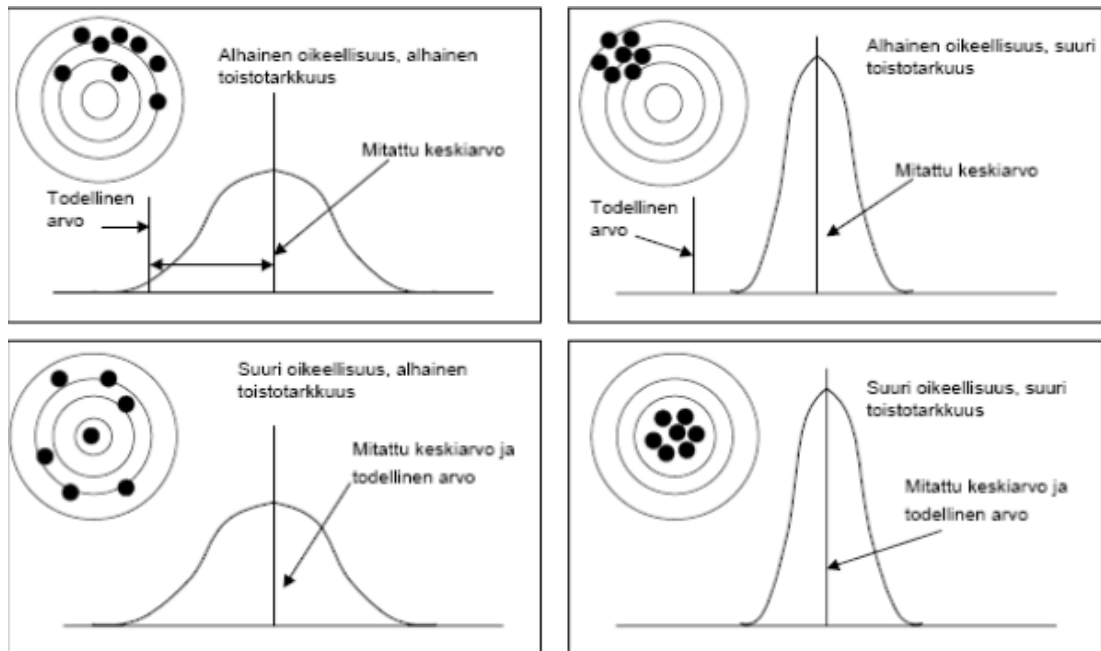
Mittauksen oikeellisuudella tarkoitetaan sitä, onko tulos ja tosiarvo samat. Sillä voidaan tutkia vain systemaattista virhettä. Oikeellisuus määritetään vertaamalla saatuja tuloksia referenssiarvoihin, jotka on saatu tunnetun menetelmän avulla. Oikeellisuutta voidaan tutkia myös laboratorioiden välisillä vertailumittauksilla. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Toistettavuudella tarkoitetaan sitä, saadaanko useilla mittauksilla sama tulos. Toistettavuus määritetään mittaamalla lyhyen ajan sisällä sama näyte useaan kertaan. Toistettavuus olisi hyvä määrittää erilaisten näytteen avulla. Näytesarjojen sisäisen vaihtelun tulisi olla pienempi kuin näytesarjojen välinen vaihtelu, mutta näytesarjojen välisenkin vaihtelun tulisi olla pientä. Vaihtelua voi aiheuttaa mm. lämpötila, säilyvyys ja homogeenisuus. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Menetelmän uusittavuudella tarkoitetaan sitä, saadaanko samasta näytteestä sama tulos käytettäessä samaa menetelmää mutta eri laboratoriota ja laitetta. Sisäistä uusittavuutta mitataan määrittämällä samaa näytettä pitkän ajan kuluessa. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Menetelmän saannolla tarkoitetaan menetelmän tehoa havaita tutkittavan aineen kokonaismäärä. Saanto ilmoitetaan yleensä prosentteina. Saanto voidaan laskea vertaamalla tulosta saannoltaan tunnetun menetelmän tuloksiin, sertifioidun menetelmän tuloksiin tai tunnettujen lisäysten avulla. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

Kuvassa 9 on esitetty menetelmän toistotarkkuus, tarkkuus ja oikeellisuus.



KUVA 9. Menetelmän, toistotarkkuus, tarkkuus ja oikeellisuus (Välimäki 2009.)

4.3.6 Häiriönkestävyys ja toimintavarmuus

Häiriönkestävyydellä ja toimintavarmuudella kuvataan menetelmän kykyä toimia luotettavasti, vaikka olosuhteet muuttuisivat hieman. Olosuhteet voivat muuttua esimerkiksi reagenssierien, laboratorion lämpötilan, määrittäjän suorittavan henkilön, ilmanpaineen yms. tekijöiden muuttuessa. Häiriönkestävyyttä ja toimintavarmuutta voidaan testata muuttamalla olosuhteita, ja merkittävästi vaikuttavat muutokset raportoidaan menetelmäohjeissa. (Ehder 2005; Välimäki 2009.)

4.4 Tilastolliset analyysit

Tilastollisten analyysien tuottamat tulokset auttavat tekemään johtopäätöksiä saaduista mittaustuloksista. Lisäksi analyysien avulla voidaan määrittää johtopäätöksen riskitaso, eli millä todennäköisyydellä tehty johtopäätös on oikea. Yksisuuntaisia testejä käytetään, kun tiedetään onko poikkeama positiivinen vai negatiivinen. Jos tätä ei tiedetä, tehdään testi kaksisuuntaisena.

Tilastollista analyysiä tehtäessä on ensiksi valittava aineistoon sopiva analyysi. Sen jälkeen asetetaan nollahypoteesi, eli mietitään mihin kysymykseen analyysillä yritetään vastata. Lisäksi on valittava millä merkitsevyystasolla analyysi suoritetaan. Sitten suoritetaan itse analyysi ja verrataan saatuja suureita taulukkoarvoihin, joiden perusteella päätetään hyväksytäänkö nollahypoteesi. Tilastolliset analyysit suoritetaan nykyään taulukkolaskentaohjelman, esim. MS Excelin, avulla. (Välimäki 2009.)

4.4.1 F-testi

F-testin avulla selvitetään, onko kahden tulosjoukon eli populaation varianssit yhtä suuret. Nollahypoteesi on siis se, että varianssit ovat yhtä suuret. F-arvo lasketaan, ja sitä verrataan F-tilaukon kriittiseen F-arvoon. Jos laskennallinen F-arvo on suurempi kuin kriittinen F-arvo, nollahypoteesi hylätään, eli populaatioiden varianssit ovat erisuuret. (Välimäki 2009.)

F-testiä käytetään menetelmien toistotarkkuuksien määrittämiseen. Yksisuuntaisella testillä testataan, onko menetelmän A toistotarkkuus parempi kuin menetelmän B. Kaksisuuntaisella F-testillä testataan, onko menetelmien A ja B toistotarkkuuksissa eroja. (Välimäki 2009.)

4.4.2 T-testi

T-testillä selvitetään, eroaako mittaustulosten keskiarvo tunnetusta arvosta tai toisen menetelmän mittaustulosten keskiarvosta. Yhden keskiarvon testauksessa tulosten keskiarvoa verrataan oikeaan arvoon. Näin saadaan laskennallinen t-arvo jota verrataan t-tilaukon kriittiseen t-arvoon. Jos laskennallinen t-arvo on suurempi kuin kriittinen t-arvo, nolla hypoteesi hylätään, eli keskiarvo ei ole sama kuin oikea arvo. (Välimäki 2009.)

Kahden keskiarvon testauksessa kahden eri menetelmän keskiarvoja verrataan toisiinsa. Sen avulla voidaan verrata esimerkiksi kahdella eri menetelmällä mitattuja pitoisuuksia tai ulkoisella kalibroinnilla ja lisäysmenetelmällä mitattuja pitoisuuksia. Laskennallinen t-arvo lasketaan, ja sitä verrataan t-

taulukon kriittiseen t-arvoon, kuten yhden keskiarvon t-testissäkin. (Välimäki 2009.)

Parillisella t-testillä verrataan kahden näytesarjan tuloksia toisiinsa. Sillä voidaan verrata esimerkiksi kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia toisiinsa tai kahden eri tekijän saamia tuloksia toisiinsa. T-arvo lasketaan ja sitä verrataan kriittiseen t-arvoon, kuten yksisuuntaisissa t-testeissä. T-testi ei sovellu sellaisten menetelmien vertailuun, jossa näytteen pitoisuus vaihtelee laajasti, sillä se ei ota huomioon konsentraatiosta riippuvia virheitä. Tällöin on käytettävä regressioanalyysiä. (Välimäki 2009.)

4.4.3 Luottamusvälitarkastelu

Luottamusvälitarkastelu on periaatteessa kaksisuuntainen t-testi. Sen avulla määritetään väli, jossa tulos valitulla todennäköisyydellä on. Luottamusväli saadaan kaavan 8 avulla.

$$\mu = x \pm (t_{0,05(v)}) \times \frac{S_N}{\sqrt{n}}$$

KAAVA 8.

Kaavassa 8 μ vastaa todellista arvoa, x keskiarvoa, $t_{0,05(v)}$ kaksisuuntaisen t-jakauman arvoa (95 % luottamustasolla), kun vapausasteiden lukumäärä on $v=n-1$, S_N näytteiden keskihajontaa ja n rinnakkaismääritysten lukumäärää. (Välimäki 2009.)

4.4.4 Regressioanalyysi

Regressioanalyysiä käytetään vertaamaan kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia keskenään. Regressioanalyysissä toistotarkempi menetelmä asetetaan koordinaatiston x-akselille ja tulosten perusteella lasketaan pienimmän neliösumman menetelmällä regressiosuoran yhtälö, joka on esitetty kaavassa 9.

$$y = b + ax$$

KAAVA 9.

Jos menetelmät antavat täsmälleen samoja tuloksia, suoran kulmakerroin a on 1 ja y-akselin leikkauspiste 0. Yhtälön kertoimien luotettavuutta arvioidaan merkitsevyytsteillä. Jos kulmakerroin ja y-akselin leikkauspiste eivät eroa merkittävästi odotusarvoista, menetelmät antavat samoja tuloksia. (Välimäki 2009.)

4.4.5 Varianssianalyysi

Varianssianalyysillä voidaan verrata useita keskiarvoja keskenään. Sitä tarvitaan esimerkiksi useiden laboratorioden saamien tulosten vertailuun tai useilla menetelmillä saatujen keskiarvojen vertailuun. Varianssianalyysi kertoo systemaattisten ja satunnaisvirheiden osuuden havaitusta vaihtelusta. Kokonaisvaihtelu jaetaan näyteryhmien sisäiseen ja väliseen vaihteluun. (Välimäki 2009.)

Yksisuuntaista varianssianalyysiä käytetään, kun halutaan selvittää henkilön, laitteen, menetelmän tai laboratorion osuutta kokonaisvaihtelussa. Esimerkiksi laboratorioden välisessä vertailututkimuksessa menetelmän toistuvuus saadaan laskettua sisäisestä varianssista ja menetelmän uusittavuus laske-
malla laboratorioden sisäinen ja välinen varianssi yhteen. (Välimäki 2009.)

4.4.6 Korrelaatio

Kahdella eri menetelmällä mitattuja tuloksia voidaan verrata myös korrelaation avulla. Tällöin kuvaajaan piirretään pisteparvi, eli ne pisteet, jotka on saatu tuloksiksi. Toisen menetelmän tulokset asetetaan x-akselille ja toisen menetelmän tulokset y-akselille. Jos pisteiden kautta tai niiden lähetyviltä voidaan piirtää suora, ovat tulokset toisistaan lineaarisesti riippuvia. (Tyni, Jussi 2009.)

Korrelaatiokerroin kuvaa lineaarisen riippuvuuden voimakkuutta. Korrelaatiokertoimella tarkoitetaan yleensä Pearsonin korrelaatiokerrointa. Se saa tuloksia, jotka ovat välillä $-1 \leq |r| \leq 1$. Mitä lähempänä arvo on nollaa, sitä heikompi korrelaatio tuloksilla on. Riippuvuutta ei pidetä merkityksellisenä, mikäli korrelaatio on $< 0,5$. Jos korrelaatio on $0,6 < |r| < 0,8$, pidetään sitä

merkityksellisenä ja jos se on $> 0,8$, pidetään sitä voimakkaana. (Tyni, Jussi 2009.)

5 D-VITAMIININ MÄÄRITTÄMINEN ARCHITECT i2000_{SR}-LAITTEELLA

5.1 Laitetiedot ja laitteen toimintaperiaate

D-vitamiini määritettiin Abbottin Architect i2000_{SR} -laitteella. Laitteen toiminta perustuu immunologiseen määritysmenetelmään, jossa käytetään kemiluminoivaa leimaa. Näyte sekoitetaan vasta-aineella koutattujen mikropartikkeleiden kanssa kyvetissä. Mikropartikkeleiden vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti näytteessä olevaan antigeeniin. Sitoutumisen jälkeen mikropartikkelit vedetään magneetin avulla kyvetin seinämään ja kyvetin sisältö pestään niin, että siihen jää vain mikropartikkelit ja niihin kiinnittyneet antigeenit. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

Pesun jälkeen kyvetiin lisätään konjugaatti. Konjugaatti toimii myös antigeeninä mikropartikkeleiden vasta-aineelle. Konjugaatti on leimattu kemiluminesenssileimalla, akridiiniesterillä. Konjugaatin annetaan sitoutua mikropartikkeleiden vapaisiin vasta-aineisiin, eli niihin vasta-aineisiin, joihin näytteen antigeeniä ei riittänyt. Konjugaattia lisätään aina ylimäärin, jotta kaikki mikropartikkeleiden vasta-aineet saavat parin. Konjugaatin annetaan sitoutua vasta-aineeseen ja sen jälkeen kyvetti pestään kuten edellä. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

Seuraavaksi kyvetiin lisätään Pre-Trigger -liuos, joka on vetyperoksidia. Lievästi happamana Pre-Trigger denaturoi proteiinit ja irrottaa akridiinileiman konjugaatista. Pre-Triggerin lisäyksen jälkeen mikropartikkelit vedetään kyvetin seinämille magneetin avulla, jotta ne eivät häiritse valonmuodostusta. Sitten kyvetiin lisätään Trigger-liuos, joka on natriumhydroksidia. Voimakkaasti emäksinen natriumhydroksidi virittää akridiinileiman. Leiman viritystila purkautuu nopeasti ja muodostuva valo mitataan valomonistinputkella. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

5.1.1 D-vitamiinin määrittäminen Architect i2000_{SR} -laitteella

D-vitamiinin määrittäminen on yksivaiheinen. Näyte ja esikäsittelyaineena käytettävä 8-aniliini-1-naftaleenisulfonihappo yhdistetään, ja seosta inkuboidaan seitsemän minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen seokseen lisätään laimentimeksi EDTA-liuoksen ja asetaattipuskurin seosta sekä mikropartikkelit. Mikropartikkelit on koutattu polyklonaalisella lampaissa tuotetulla anti-D-vitamiinivasta-aineella. Mikropartikkeleiden lisäyksen jälkeen seosta sekoitetaan ja inkuboidaan 18 minuutin ajan. Inkubaation aikana kalsidioli, eli 25-OH-D-vitamiini, sitoutuu mikropartikkeleiden D-vitamiinivasta-aineeseen. (25-OH Vitamin D. 2010.)

D-vitamiinin sitouduttua mikropartikkeleihin seos pestään ja seokseen lisätään konjugaattia. Konjugaattina käytetään hiirissä tuotettua monoklonaalista akridiinileimattua biotinyloitua D-vitamiini-anti-biotiini -vasta-ainetta. Konjugaatti sitoutuu mikropartikkeleiden vapaiksi jääneisiin vasta-aineisiin. Konjugaatin lisäyksen jälkeen seosta taas sekoitetaan ja inkuboidaan neljän minuutin ajan. (25-OH Vitamin D. 2010.)

Sitten seos pestään ja seokseen lisätään Pre-Trigger -liuos, seosta sekoitetaan ja siitä mitataan taustavalo. Sitten lisätään Trigger-liuos ja mitataan luminesenssi. Tulos saadaan RLU:ina eli suhteellisina valoyksikköinä (Relative Light Unit). Saatua RLU-arvoa on kääntäen verrannollinen D-vitamiinipitoisuuteen, sillä RLU-arvo kuvastaa niitä paikkoja mikropartikkeleissa, joihin D-vitamiini ei sitoutunut. Laitte laskee automaattisesti tuloksen myös yksikössä ng/ml. (25-OH Vitamin D. 2010.)

5.2 Laitteen kalibrointi

Laitte on kalibroitava aina, kun laitteeseen lisätään sellaista reagenssierää, jolla ei ole aikaisemmin määrittämiä tehty. Näin ollen uutta määrittäystä aloitettaessa laite on kalibroitava. Kalibrointi aloitettiin laittamalla laitteen reagenssitaruselin analyysissä tarvittavat reagenssit. Laitte kertoo reagenssien lisäyksen jälkeen, mitkä reagenssit on kalibroitava, tässä tapauksessa D-

vitamiinin analysoimisessa tarvittavat reagenssit. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

Reagenssit kalibroidaan laitevalmistajan toimittamilla kalibraattoriliuoksilla. Koneeseen asetettiin tilaus tarvittavista kalibraattoreista, minkä jälkeen kone kertoi, kuinka paljon kutakin kalibraattoria tarvitaan kalibrointia varten. Tarvittava määrä kalibraattoria tiputettiin tippapullosta näytekuppiin, jokaista kalibraattoria omaan kuppiinsa. Tarvittava määrä kalibraattoria saadaan, kun tiedetään että yksi tippa tippapullossa vastaa noin 50:tä mikrolitraa. Kun D-vitamiinin kalibraattoria tarvitaan 70 mikrolitraa, tippapullosta tiputetaan siis näytekuppiin 2 tippaa kalibraattoria. Varmuuden vuoksi lisättiin vielä yksi tippa, jotta kalibraattori varmasti riittää testin suorittamiseen. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

Tämän jälkeen laite suorittaa kalibraation automaattisesti, ja antaa sen tulokset tulosteena. Jos kalibraatio on onnistunut, voidaan jatkaa analyysin suorittamisessa seuraavaan vaiheeseen. Jos kalibraatio taas epäonnistuu, on se suoritettava uudestaan samalla tavalla kuin aikaisemminkin. Jos kalibraatio ei vieläkään onnistu on otettava yhteyttä laitevalmistajaan mahdollisen viallisen reagenssi- tai kalibraattorierän tarkistamiseksi tai laitteen toimintakunnon varmistamiseksi. (Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010.)

5.3 Näytteen käsittely

Näytteenä voidaan käyttää verinäytteitä tai pakastettuja seeruminäytteitä. Verinäytteistä on ensin eroteltava seerumi ja verisolut. Seerumi saadaan erillisen sentrifugoimalla näytteitä kymmenen minuutin ajan 4000 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen seerumi kaadetaan erilliseen putkeen ja jäljelle jääneet verisolut voidaan heittää pois. Pakastetut seerumit sulatetaan ja sekoitetaan kääntelemällä putkia kymmenen kertaa ylösalaisin ja sen jälkeen vorteksoimalla n. 30 sekunnin ajan.

5.4 Näytteen analysointi

Näytteiden analysointi aloitetaan kontrollien analysoinnilla. Kontrollit ovat laitevalmistajan toimittamia liuoksia, jotka sisältävät tietyn pitoisuuden tutkittavaa analyyyttiä. Kontrollien avulla seurataan laitteen toimintakuntoa. Kontrollien on pysyttävä tiettyjen viitearvojen sisällä, jotta tiedetään, että laite suorittaa analyysin oikein ja saadut tulokset ovat luotettavia. Kontrollitulokset ovat voimassa 24 tuntia niiden ajosta.

Kontrollit ajetaan samaan tapaan kuin kalibraattoritkin. Koneeseen asetettiin tilaus tarvittavista kontrolleista, minkä jälkeen koneesta saatiin tuloste, josta näkee kuinka paljon kutakin kontrollia tarvitaan. Kontrollit toimitetaan tippapulloissa, joista tiputetaan tarvittava määrä tippoja näytekuppiin. Yksi tippa vastaa viittäkymmentä mikrolitraa, joten kun D-vitamiinianalyysiin tarvitaan 60 mikrolitraa kontrollia, tiputettiin näytekuppiin kaksi tippaa kontrollia. Näin saatiin samalla sopivasti ylimäärin kontrollia, jotta ajo varmasti onnistuu.

Jos kontrollit ovat kunnossa, voidaan aloittaa varsinaisten näytteiden analysointi. Jos taas kontrollit ovat rajojen ulkopuolella, tulee ne ajaa uudelleen. Jos kontrollit eivät ole rajojen sisäpuolella uusinta-ajon jälkeenkään, on otettava yhteyttä laitevalmistajaan mahdollisen viallisen kontrollierän tarkistamiseksi ja laitteen toimintakunnon varmistamiseksi.

Kun kontrollit ovat kunnossa, voidaan aloittaa itse analyysi. Laitteeseen asetettiin tilaus uudesta potilasnäytteestä. Näytteet tunnustetaan viivakoodin avulla, tai jos viivakoodia ei ole, tilaukseen voidaan asettaa käsin tunnistetiedot näytteille. Näytteet asetettiin sopivissa putkissa laitteen näytetelineisiin, joihin mahtuu kerrallaan viisi näytettä. Koska näytteitä oli yli viisi telineellistä, asetettiin ne tarjottimelle. Tarjottimet asetettiin laitteeseen niille varattuihin rutiininäytteitä varten suunniteltuihin paikkoihin.

Yksittäiset telineet voidaan asettaa myös ns. STAT-paikoille, josta ne ajetaan ensimmäiseksi muista laitteessa olevista telineistä huolimatta. STAT-paikkoja voidaan käyttää, kun halutaan nopeasti tulos yksittäisistä näytteistä.

Lisäksi STAT-paikkoja on hyvä käyttää silloin, kun näytteen ajo ei jostain syystä ole onnistunut rutiinipaikalta. Näytteen ajo voi epäonnistua muun muassa jos näytepipettori ei saa näytettä pipetoitua vaikkapa ilmakuplan vuoksi, tai reagenssipipettori ei saa reagensseja pipetoitua jostain syystä.

6 TULOKSET

6.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisyyttä ja spesifisyyttä ei tutkittu tätä validointia suoritettaessa. Abbott on määrittänyt selektiivisyyden ja spesifisyyden menetelmän kehitysvaiheessa. Selektiivisyyttä on tutkittu lisäämällä tunnettuun kalsidiolipitoisuuteen testissä mahdollisesti epäspesifisesti sitoutuvia aineita. Tulosten mukaan D₃-vitamiini ja D₂-vitamiini eivät aiheuttaneet epäspesifistä sitoutumista, mutta 25-OH-D₂-vitamiini sitoutui jonkin verran. Lisäksi epäspesifistä sitoutumista aiheuttivat erilailla hapettuneet D₃-vitamiinijohdannaiset. (25-OH Vitamin D. 2010.)

Tässä tutkimuksessa seerumissa ei pitäisi olla tällaisia epäspesifisesti sitoutuvia yhdisteitä, joten voidaan olettaa, että saadut RLU-arvot johtuivat ainoastaan tutkitusta kalsidiolista.

6.2 Häiriönkestävyys

Häiriönkestävyyttä ei tutkittu tätä opinnäytetyötä suoritettaessa. Abbott on tutkinut mahdollisia häiriölähteitä menetelmän kehitysvaiheessa. Häiriöitä mittaukseen tulee pääasiassa häiritsevistä aineista tutkittavassa seerumissa. Häiriötä aiheuttavat mm. hemoglobiini, bilirubiini, triglyseridit, proteiinit ja punasolut. Tämän vuoksi punasolut erotetaan seerumista ja voimakkaasti hemolysoituneita näytteitä ei mitata. Triglyseridit, eli rasvat, voidaan poistaa seerumin pinnalta kaapimalla ne esimerkiksi puutikulla. Joitain häiritseviä proteiineja voidaan saostaa pois seerumista. (25-OH Vitamin D. 2010.)

Tämän tutkimuksen näytteet olivat hyväkuntoisia, niissä ei ollut havaittavissa hemolyyysiä eikä rasvoja. Näytteet olivat pääasiassa 90-luvun loppupuolelta ja säilytetty pakastettuina. Näytteiden pitkäaikainen pakastaminen saattaa vaikuttaa näytteiden laatuun. Näytteiden kalsidiolipitoisuus on voinut laskea,

sillä se hajoaa valon vaikutuksesta. Näytteitä on säilytetty valolta suojattuna, mutta analyysivaiheessa ne altistuvat jonkin verran valolle.

6.3 Toteamis- ja määrittysrajat

Toteamis- ja määrittysrajoja ei tutkittu tätä validointia suoritettaessa. Abbott on määrittänyt toteamis- ja määrittysrajat menetelmän kehitysvaiheessa. Toteamisrajaksi Abbott antaa 3,1 ng/ml ja määrittysrajaksi 8,0 ng/ml. Tämä on voinut vaikuttaa tuloksiin, sillä matalimmat D-vitamiinipitoisuudet tutkituissa näytteissä olivat alle määrittysrajan. Tulokset, jotka ovat määrittysrajan alapuolella, eivät ole luotettavia. Matalimmat tulokset olivat pääasiassa talviaikaan otetuissa näytteissä. Tämä on odotettua, sillä D-vitamiinipitoisuus laskee talviaikaan auringonvalon vähentyessä. (25-OH Vitamin D. 2010.)

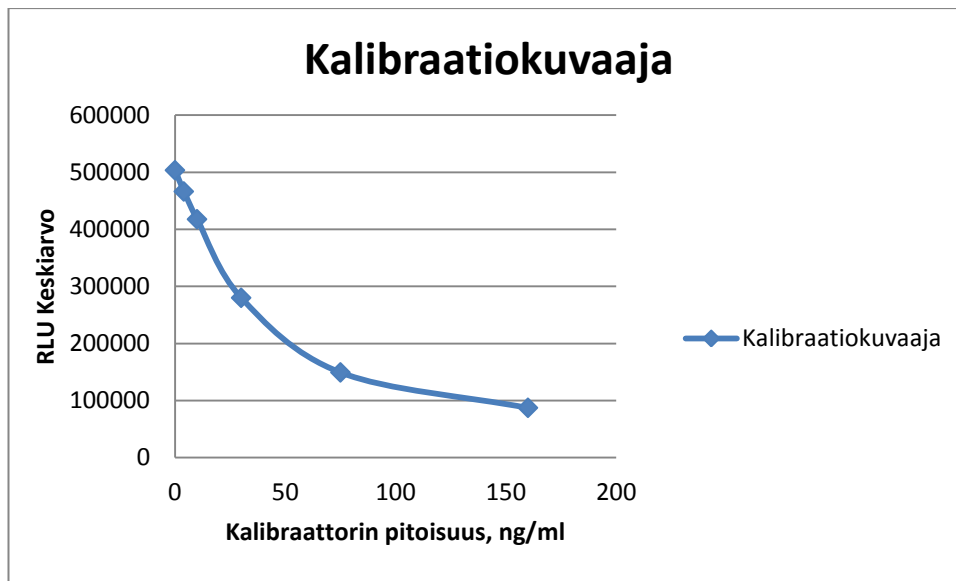
6.4 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuus ja mittausalue määritettiin Abbottin toimittamien kalibraattoreiden avulla. Kalibraattorit ajettiin ohjeen mukaan ja saatujen RLU-arvojen perusteella piirrettiin kalibraatiosuora. Saadut RLU-arvot ovat taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Kalibraation tulokset

Kalibraattori	pitoisuus, ng/ml	RLU 1	RLU 2	RLU keskiarvo
A	0	507524	499254	503389
B	4	467890	464530	466210
C	10	421888	413183	417536
D	30	280109	279768	279939
E	75	149535	149015	149275
F	160	87568	86975	87272

Kalibraattoreista tehtiin kaksi toistoa, joiden keskiarvon perusteella on piirretty kalibraatiokuvaaja. Kalibraatiokuvaaja on kuvassa 10.



KUVA 10. Kalibraatiokuvaaja

Kalibraatiokuvaajasta huomataan, että se ei ole lineaarinen. Koska saadut RLU-arvot ovat kääntäen verrannollisia kalibraattorin D-vitamiinipitoisuuteen, kuvaajan ei tulisikaan olla suora vaan ns. spline-funktion muotoinen. Matemaattisin keinoin kuvaaja voidaan muuttaa lineaariseksi. Laite laskee automaattisesti tulokset tämän spline-funktion avulla. Saatu funktio on hyvä, sillä laite ei hyväksy viallisia tuloksia, vaan pyytää toistamaan kalibraation.

Kaiken kaikkiaan mittausalue on lineaarinen heikoimman ja väkevimmän kalibraattorin välillä.. Käytettävissä oleva mittausalue on siis määrittäjähuomioiden 8,0–160 ng/ml. Näytteiden tulokset pysyvät melko hyvin mittausalueella, mutta osa tuloksista on määrittäjärajan alapuolella, eli näin ollen ne eivät ole mittausalueella.

6.5 Toistettavuus

Toistettavuutta tutkittiin mittaamalla kymmenen kertaa sama näyte. Saadut tulokset löytyvät liitteestä 2. Taulukoon 3 on laskettu tuloksista keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 3. Keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta

Keskiarvo	8,73
Keskihajonta	0,50
Suhteellinen keskihajonta, %	5,75

Menetelmän täsmällisyyttä kuvataan suhteellisella keskihajonnalla. Menetelmää pidetään täsmällisenä, jos suhteellinen keskihajonta on alle 5 %. Yleensä erilaisissa testeissä käytetään 95 %:n luottamustasoa, jolloin hajonta ei saisi olla yli 5 prosentin. Tässä työssä suhteellinen keskihajonta oli 5,75 %, mikä on suhteellisen hyvä tulos. Tulos voisi parantua mittamaalla näytettä, jonka D-vitamiinipitoisuus olisi vähän suurempi. Tässä kokeessa mitattu pitoisuus oli niin lähellä määritysrajaa, että tuloksissa voi olla sen vuoksi vaihtelua.

Keskiarvon ja keskihajonnan avulla voidaan laskea luottamusvälit, eli millä välillä tulos on 95 %:n todennäköisyydellä. Luottamusväli on laskettu kaavalla 10.

$$\mu = \bar{x} \pm (t_{0,05(n)}) \times \frac{S_N}{\sqrt{n}} = 8,73 \pm 2,262 \times \frac{0,50}{\sqrt{10}} = 8,73 \pm 0,36 \quad \text{KAAVA 10.}$$

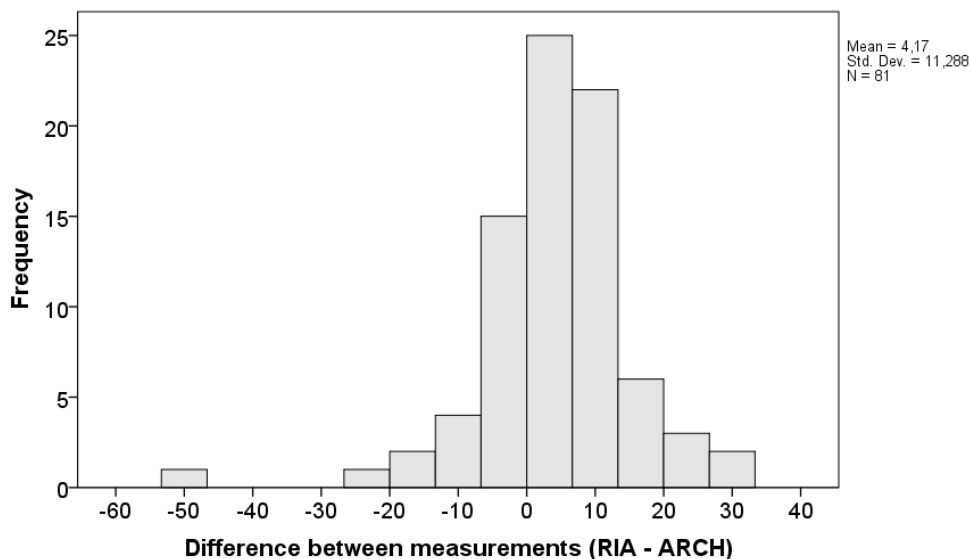
Luottamusvälianalyysin mukaan kalsidiolin pitoisuus toistokokeessa käytetyssä näytteessä 95 %:n todennäköisyydellä on $8,73 \pm 0,36$ ng/ml.

6.6 Menetelmävertailu

Abbottin kemiluminesenssiin (CMIA) perustuvalla menetelmällä saatuja D-vitamiinituloksia verrattiin radioimmunologisella (RIA) menetelmällä saatuihin D-vitamiinituloksiin. Menetelmiä verrattiin regressioanalyysin, t-testin ja korrelaation tutkimisen avulla. Vertailua varten analysoitiin 81 näytettä, joiden D-vitamiinipitoisuus oli aikaisemmin määritetty RIA-menetelmällä.

RIA-tulokset ovat muodossa nmol/ml. Architect i2000_{SR} -laite antaa kuitenkin tulokset muodossa ng/ml. Nämä tulokset voidaan muuttaa muotoon nmol/ml kertomalla ne muutoskerroimella 2,496. Tämä muutoskerroin saadaan laskettua kalsidiolin moolimassan avulla, mutta työssä käytettiin muutoskerrointa, joka saatiin suoraan Abbottilta. Liitteeseen 3 on laskettu kalsidiolin pitoisuus nmol/ml.

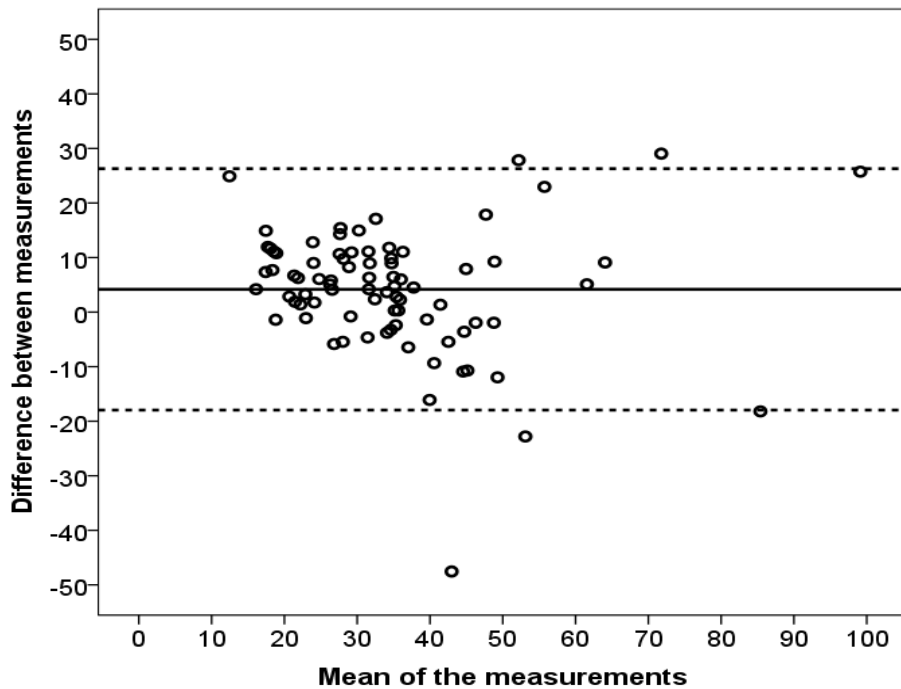
RIA-menetelmässä näytteet pipetoidaan käsin näytekauvoihin. Tämä voi aiheuttaa satunnaisia virheitä, sillä ihmisen työskentely ei ole koskaan täysin virheetöntä. RIA-menetelmällä D-vitamiinia tutkittaessa ei ole samasta näytteestä tehty useampia toistoja, mikä vähentäisi inhimillisten virheiden määrää. Lisäksi RIA-menetelmä mittaa D₃-vitamiinin lisäksi seerumin D₂-vitamiinitasoa. Tämän vuoksi RIA-menetelmän tulokset ovat suuremmat kuin CMIA-menetelmän tulokset. Tämä ero on esitetty kuvassa 11.



KUVA 11. Menetelmien välisten tulosten erotus.

X-akselilla on ero menetelmien välillä, eli RIA-tuloksesta vähennetty CMIA-tulos. Y-akselilla on saatujen erotusten määrä. Kuvasta nähdään, että erotukset painottuvat positiiviselle puolelle, eli RIA-menetelmällä saadaan suurempia tuloksia kuin CMIA-menetelmällä.

Kuvassa 12 on esitetty tulosten vaihtelu ja sallitut vaihteluvälit. Y-akselilla on ero eri menetelmillä saatujen näytteiden välillä (RIA-tulos – CMIA-tulos) ja x-akselilla mittausten keskiarvo. Kuvaajan jakava yhtenäinen viiva kuvaa bias-prosenttia ja katkoviivat 95 %:n luottamustasolla annettua vaihteluväliä, jossa tulosten tulisi olla.



KUVA 12. Sallittu vaihteluväli 95 %:n luottamustasolla.

Kuvasta nähdään, että suurin osa tuloksista on vaihteluvälin sisäpuolella. Muutama yksittäinen näyte on vaihteluvälin ulkopuolella, ja voidaan olettaa, että näiden näytteiden käsittelyssä on sattunut satunnainen virhe.

6.6.1 Regressioanalyysi

Kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia voidaan verrata toisiinsa regressioanalyysillä. Regressioanalyysi tehtiin Microsoft Office Excel -ohjelmalla luottamustasolla 95 %. Regressioanalyysin tulokset on esitetty taulukossa 4. Näissä tuloksissa on mukana kaikkien analysoitujen näytteiden tulokset, myös niiden joiden D-vitamiinipitoisuus oli alle määritysrajan.

TAULUKKO 4. Regressioanalyysi

YHTEENVETO TULOSTUS

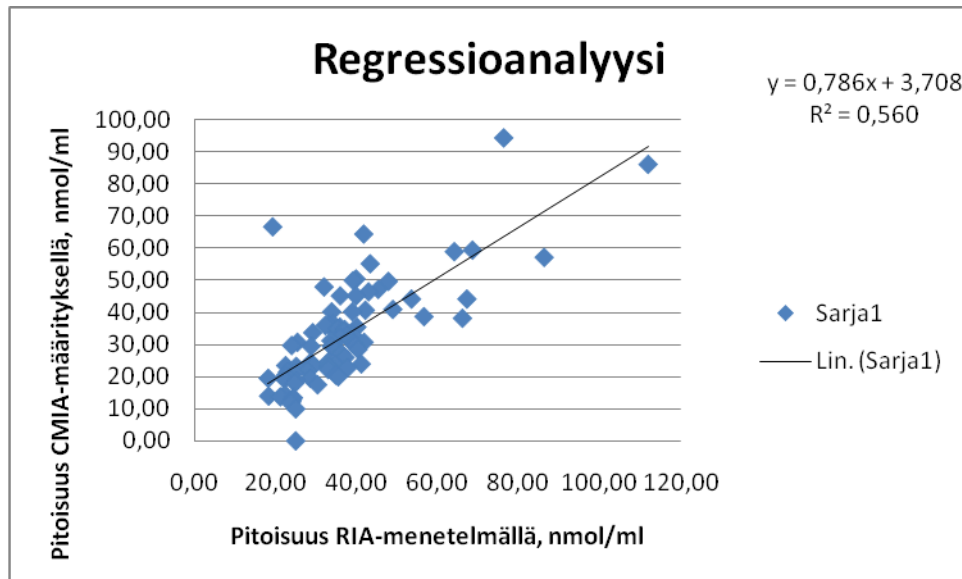
<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroin R	0,748847
Korrelaatiokerroin	0,560772
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,555212
Keskivirhe	10,33951
Havainnot	81

ANOVA

	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	10782,59	10782,58952	100,861	9,1098E-16
Jäännös	79	8445,526	106,9053928		
Yhteensä	80	19228,116			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>
Leikkauspiste	13,56671	2,5925266	5,233006027	1,34E-06
Muuttuja X 1	0,712895	0,0709845	10,04295992	9,11E-16
	<i>Alin 95 %</i>	<i>Ylin 95 %</i>	<i>Alin 95,0 %</i>	<i>Ylin 95,0 %</i>
Leikkauspiste	8,406412	18,727002	8,406412333	18,727
Muuttuja X 1	0,571604	0,8541858	0,571603535	0,854186

Regressiosta voidaan piirtää kuvaaja, jossa luotettavamman menetelmän tulokset ovat x-akselilla ja vertailtavan menetelmän tulokset y-akselilla. Tämä kuvaaja on esitetty kuvassa 13.

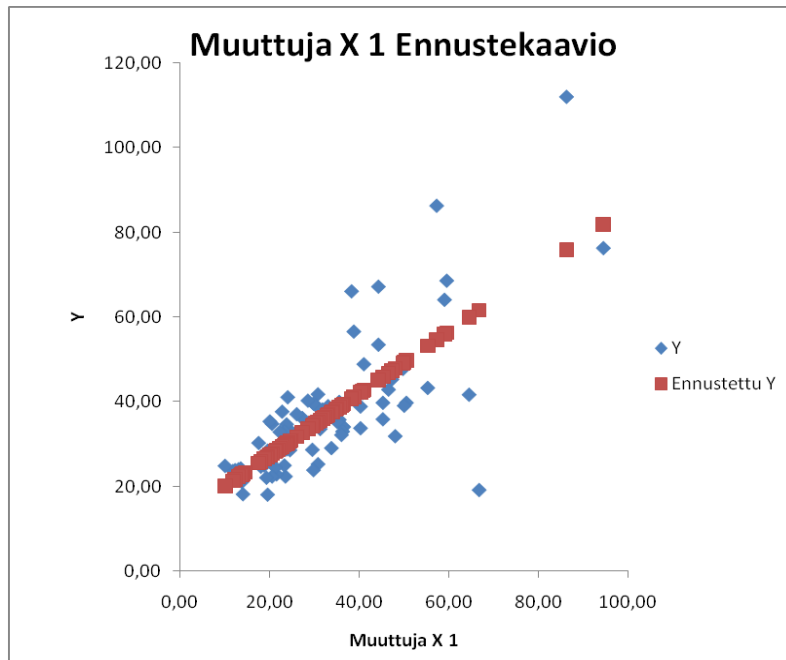


KUVA 13. Regressio

Regressioanalyysin tuloksista nähdään, että regressiosuoran selitysaste on 0,5608, eli malli pystyy selittämään 56 % tulosten vaihtelusta. Jos menetelmät vastaisivat täydellisesti toisiaan, selitysaste olisi 1. Näin ollen selitysaste jää melko vaatimattomaksi.

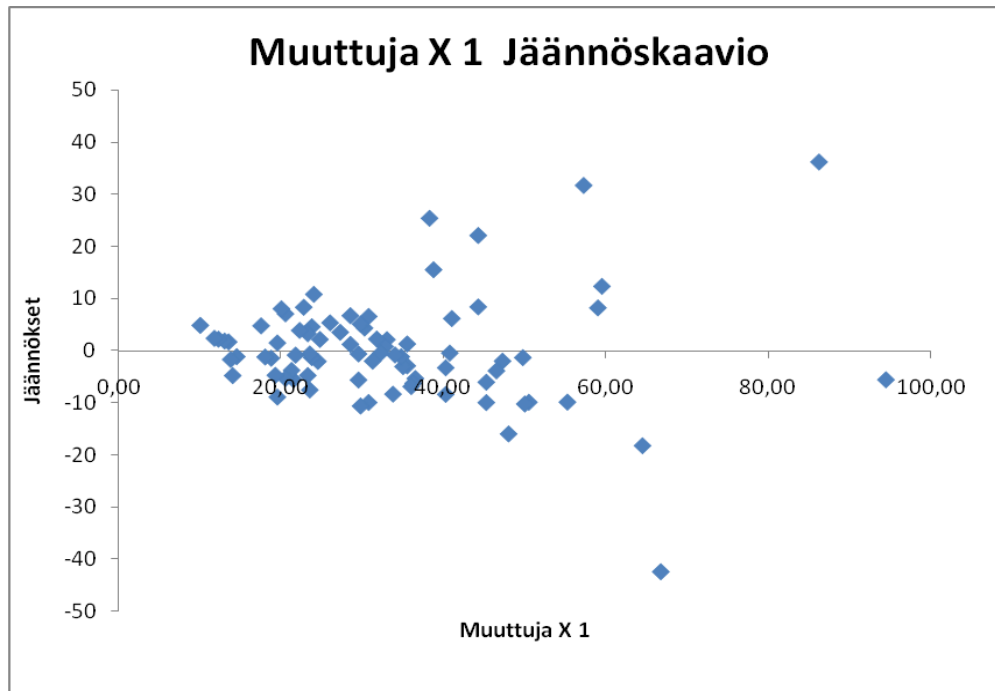
Tuloksista nähdään, että kulmakerroin 95 %:n todennäköisyydellä on välillä 0,57 – 0,85 ja y-akselin leikkauspiste 8,41 – 18,73. Jos menetelmät antaisivat täysin samoja tuloksia, kulmakerroin olisi 1 ja y-akselin leikkauspiste 0. Tässä tapauksessa siis kulmakerroin on melko lähellä yhtä, mutta y-akselin leikkauspiste ei ole lähellä nollaa.

Ennustekaaviosta nähdään, mitä tuloksia menetelmällä olisi pitänyt saada ja mitä tuloksia sillä todellisuudessa saatiin. Ennustekaavio on kuvassa 14. Kaaviosta nähdään, että tulokset ovat molemmin puolin ennustekuvaajaa, joten menetelmä ei anna systemaattisesti joko liian suuria tai liian pieniä tuloksia. Muutama piste on kaukana ennustetusta, mutta pääasiassa tulokset ovat lähellä ennustettua tulosta. Koska paljon ennustetusta tuloksesta heittäviä tuloksia on niin vähän, voidaan olettaa, että niiden näytteiden käsittelyssä on tapahtunut jokin virhe.



KUVA 14. Ennustekaavio

Mallin ennustamien ja havaittujen pitoisuuksien erotukset (residuaalit) nähdään jäännöskaaviosta. Jäännöskaavio on kuvassa 15. Jäännöskaaviosta nähdään, että arvot ovat jakautuneet melko tasaisesti nollatason kummallekin puolelle. Tämä tarkoittaa, että malli on hyvä ja residuaaleilla ei ole koncentraatiiriippuvuutta.



KUVA 15. Jännöskaavio

Tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että osa tuloksista oli alle määritysrajan. Lisäksi kolme tulosta heitti ennustetuista tuloksista niin paljon, että voidaan olettaa, että niiden käsittelyssä on tapahtunut virhe joko RIA- tai CMIA-määrityksessä. Taulukkoon 5 on laskettu uudet regressiotulokset niin, että näytteet, joiden D-vitamiinipitoisuus on alle määritysrajan sekä kolme mahdollisesti virheellistä näytettä on jätetty pois laskuista.

TAULUKKO 5. Uusi regressioanalyysi

YHTEENVETO TULOS- TUS

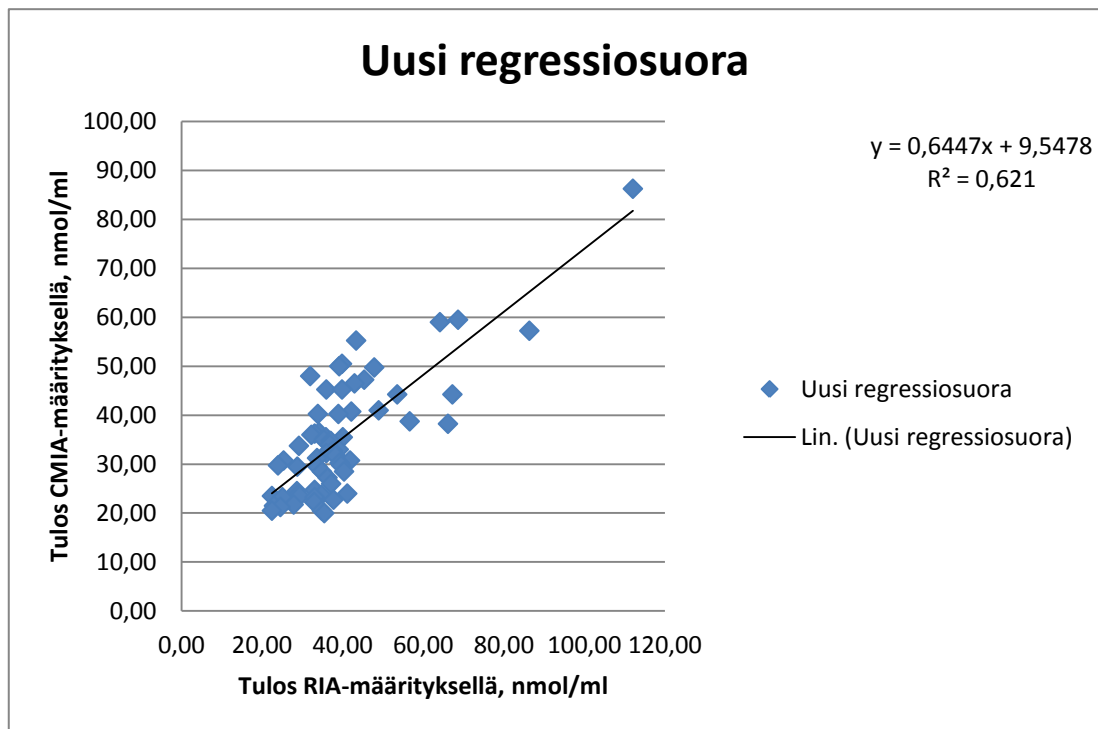
<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroin R	0,788042
Korrelaatiokerroin	0,62101
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,614797
Keskivirhe	9,368162
Havainnot	63

ANOVA					
	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	8772,204	8772,204037	99,95394	1,79885E-14
Jäännös	61	5353,5102	87,7624631		
Yhteensä	62	14125,714			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>
Leikkauspiste	5,820735	3,5811728	1,625371097	0,10924
Muuttuja X 1	0,963181	0,0963403	9,997696772	1,8E-14

	<i>Alin 95%</i>	<i>Ylin 95%</i>	<i>Alin 95,0%</i>	<i>Ylin 95,0%</i>
Leikkauspiste	-1,34026	12,981732	1,340262781	12,98173
Muuttuja X 1	0,770537	1,1558256	0,770536873	1,155826

Uuden regressioanalyysin tuloksista nähdään, että tässä regressiosuoran selitysaste on 0,6210, eli malli pystyy selittämään 62 % tulosten vaihtelusta. Selitysaste parani, kun virheelliseksi oletetut tulokset jätettiin pois, mutta ei vielä kukaan ole erittäin hyvä. Uuden regressiosuoran kulmakerroin 95 %:n todennäköisyydellä on välillä 0,77-1,15 ja y-akselin leikkauspiste 1,34-12,98. Nämäkin tulokset paranivat paljon, kun virheelliseksi oletetut tulokset jätettiin pois laskuista. Uusi regressiosuora on kuvassa 16.



KUVA 16. Uusi regressiosuora

6.6.2 T-testi

Myös parillisella t-testillä voidaan verrata kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia, mutta se ei ota huomioon konsentraatiosta riippuvia virheitä. Tässä validoinnissa kalsidiolin konsentraatio vaihtelee laajasti näytteiden välillä, joten parillinen t-testi ei anna kovin luotettavia tuloksia. Myös t-testi tehtiin Excel-ohjelmalla, ja sen tulokset löytyvät taulukosta 6.

TAULUKKO 6. T-testi

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille

	Muuttuja	
	1	Muuttuja 2
Keskiarvo	37,0575	33,15
Varianssi	241,546	254,823734
Havainnot	80	80
Pearsonin korrelaatio	0,751395	
Arvioitu keskiarvojen ero va	0	79
t Tunnusluvut	3,144501	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,001172	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,664371	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,002345	
t-kriittinen kaksisuuntainen	1,99045	

T-testin tuloksista nähdään, että t-arvot ovat paljon pienempiä, kuin t-kriittisen arvot. Tämän perusteella voidaan siis olettaa, että menetelmien keskiarvot ovat samat. Regressioanalyysissä todettiin, että residuaalit olivat hyvät, ja tuloksilla ei ollut konsentraatiosta johtuvaa vaihtelua, jolloin t-testin tuloksia voidaan pitää varsin luotettavina.

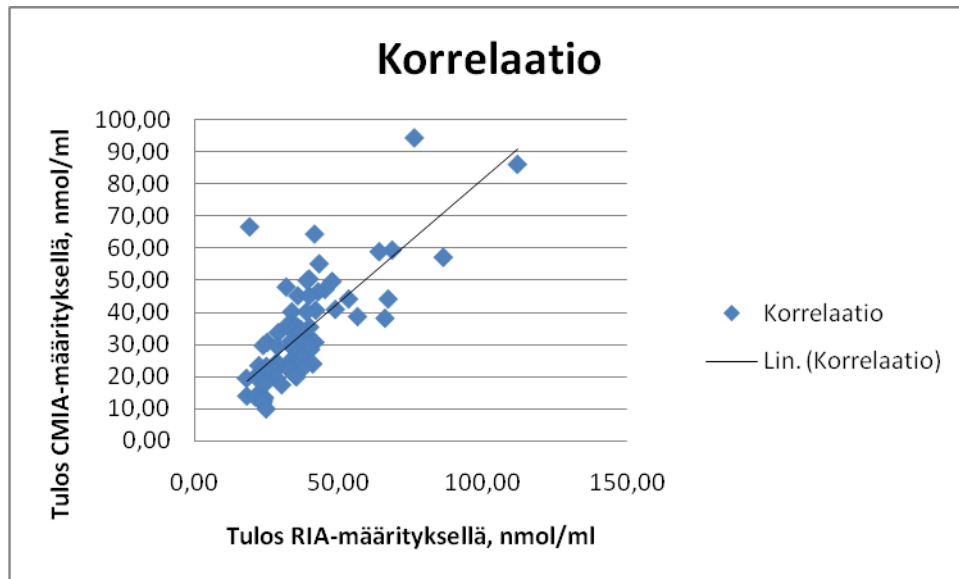
6.6.3 Korrelaatio

Korrelaatiota tutkittiin Excel-ohjelmalla ja tulokset löytyvät taulukosta 7. Korrelaatiokerroimeksi saatiin 0,75. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on yhtä, sitä enemmän eri menetelmien tulokset yhtenevät. Tätä korrelaatiokerrointa pidetään merkityksellisenä, eli menetelmien tulosten välillä on lineaarista korrelaatiota.

TAULUKKO 7. Korrelaatio

Korrelaatio		
	Sarake 1	Sarake 2
Sarake 1	1	
Sarake 2	0,751395	1

Kuvassa 16 on korrelaation pisteparvi piirrettynä kaavioon, ja siihen on lisätty pisteiden lähetyviltä kulkeva suora. Kuvaajasta nähdään, että tulokset ovat suoran lähetyvillä varsinkin mittausalueen keskivaiheilla. Muutama yksittäinen tulos on kaukana suorasta.



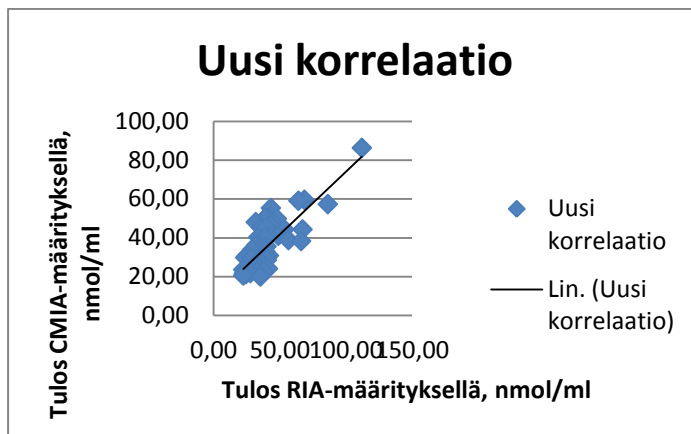
KUVA 16. Korrelaatio

Korrelaatiokin on laskettu uudelleen niin, että näytteet, joiden D-vitamiinipitoisuus on alle määritysrajan sekä kolme mahdollisesti virheellistä näytettä on jätetty pois laskuista. Taulukossa 8 on uuden korrelaation tulokset. Uudeksi korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,78, eli se parani jonkin verran, kun oletettavasti virheelliset tulokset jätettiin pois.

TAULUKKO 8. Uusi korrelaatio

Korrelaatio		
	<i>Sarake 1</i>	<i>Sarake 2</i>
<i>Sarake 1</i>	1	
<i>Sarake 2</i>	0,788042	1

Kuvassa 17 on esitetty uuden korrelaation pisteparvi. Kuvasta nähdään, että pisteet asettuvat paremmin lineaarisen korrelaation suoran läheisyyteen, eli tulokset ovat paremmat.



KUVA 17. Uusi korrelaatio

7 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli validoida D-vitamiinin määritysmenetelmä, sekä ottaa se käyttöön Architect i2000_{SR} -laitteella. Määritysmenetelmä laitteella perustuu D-vitamiinin varastomuodon kalsidiolin spesifiseen sitoutumiseen vasta-aineella koutattujen mikropartikkeleiden pinnalle. Sitoutumisen jälkeen detektio tapahtuu kemiluminesenssiin perustuvalla leimalla leimatun konjugaatin valonmuodostukseen sopivissa olosuhteissa. Työ tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen neuvolaserologian laboratoriolle.

Työtä varten analysoitiin 81 näytettä Architect i2000_{SR} -laitteella ja verrattiin saatuja tuloksia aikaisemmin samoista näytteistä RIA-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tuloksia tarkastellessa huomattiin, että CMIA-menetelmä antaa hieman matalampia tuloksia kuin RIA-menetelmä. Tämä johtuu siitä, että RIA-menetelmä mittaa seerumin D₃- ja D₂-vitamiinipitoisuutta ja CMIA-menetelmä vain kalsidiolipitoisuutta. Näin ollen menetelmät mittavat seerumin D-vitamiinitason hieman eri tavalla, jolloin voidaan olettaa, että tulokset eroavat toisistaan hieman.

Ensimmäisen regressioanalyysin tulokset eivät olleet kovin hyvät. Tulokset paranivat, kun saatujen tulosten joukosta poistettiin määritysrajan alapuolella olevat tulokset sekä virheellisiksi oletetut tulokset. Samoin korrelaatio parani jonkin verran näillä korjatuilla tuloksilla. T-testin tulos oli lisäksi kunnollinen, joten kaiken kaikkiaan voidaan päätellä, että menetelmät antavat kohtuullisen samoja tuloksia.

Toistokokeen tulokset olivat hyvät, joten määrittäksessä ei ollut suurta sisäistä vaihtelua. Lisäksi voidaan olettaa, että näytteiden D-vitamiinipitoisuus ei ollut laskenut säilytyksen aikana, sillä se olisi näkynyt systemaattisesti reilusti alentuneina tuloksina.

Ongelman määrittäykseen aiheutti se, että osassa näytteistä D-vitamiinipitoisuus oli alle määritysrajan. Tämän vuoksi näiden näytteiden tulokset eivät ole luotettavia CMIA-menetelmällä mitattuina. Toistokokeen tu-

loksetkin voisivat parantua mittaamalla sellaista näytettä, jonka D-vitamiinipitoisuus olisi määrittämisalueen keskivaiheilla.

Biologisten näytteiden määrittäminen ei ole koskaan niin tarkkaa kuin epäorganisten näytteiden määrittäminen. Biologiset näytteet ovat yleensä hyvin monimutkaisessa matriksissa, mikä voi aiheuttaa erilaisia häiriöitä määrittämisessä. Ihmisen seerumi sisältää vaihtelevasti monenlaisia monimutkaisia molekyylejä, jotka voivat vaikuttaa erilaisilla eri menetelmissä. Lisäksi vastaaineet ja antigeenit eivät aina sitoudu täydellisesti, vaikka olosuhteet olisivat stabiilit. Näin ollen tulokset olivat kohtuullisen hyviä.

Näytteiden tulokset ovat pääasiassa sallitun vaihteluvälin sisäpuolella, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Menetelmä voidaan näiden tulosten perusteella ottaa käyttöön laboratoriossa.

LÄHTEET

Architect i2000_{SR} -koulutusmateriaali. 2010. Abbott Laboratories.

Alitalo, Antti 2010. Ihmisen infektiopuolustus voi tehostua D-vitamiinista. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 10/2010. S. 1127–1134.

Aro, Antti 2005. D-vitamiini – monivaikutteinen hormoni. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 16/2005. S. 1749–1754.

Barnes, A.K. - Gardner, M.J. - Laurie, D. 2009. Determination of vitamin D metabolite and displacement from plasma or serum binding proteins. Saatavissa: <http://www.freepatentsonline.com/7482162.html>. Hakupäivä 13.10.2011.

Barrett, Hugh R. - Bolitho, Paul - Chan, Dick C. - Dwyer, Kevin P. - Nguyen, Minh N. - Watts, Gerald F. 2006. Use of Intralipid for kinetic analysis of HDL apoC-III: evidence for a homogeneous kinetic pool of apoC-III in plasma. Saatavissa: <http://www.jlr.org/content/47/6/1274.full>. Hakupäivä 6.10.2011.

Chung, E. - Gray, D. - Van Der Gugten, G. - Ostonal, S. - Peng, X. - Pinna-wala, A. - Yi, R. 2009. LC–MS/MS method for the determination of Vitamin D₃ in human plasma. Saatavissa: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Analytical/LCndashMSMS-method-for-the-determination-of-Vitami/ArticleStandard/Article/detail/583925>. Hakupäivä 13.10.2011.

D-vitamiini on maailmanlaajuinen ongelma osteoporoosissa. 2006. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 20/2006. S. 2442.

D-vitamiinilisä voi pienentää syöpäriskiä. 2007. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 17/2007. S. 2062.

DeLuca H.F. - Hamstra, A.J. - Horst, R.L. - Shepard, R.M. 1978. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1161234/>. Hakupäivä 13.10.2011.

Ehder, Tapio 2005. Kemia metrologian opas. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. Saatavissa: http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf. Hakupäivä 26.9.2011. S. 18–38.

ELISA Activity. 1998. The University of Arizona. Saatavissa: http://www.biology.arizona.edu/immunology/activities/elisa/elisa_intro.html. Hakupäivä 10.10.2011.

Goldsby, Richard A. - Kindt, Thomas J. - Osborne, Barbara A. 2007. Kuby. Immunology, sixth edition. New York: W.H. Freeman and Company. S. 76-106, 145-164.

Goodrich, Wendy - Held, Paul. 2006. Histamine Analysis in Wine Samples Using the Microplate Format. Saatavissa: <http://www.biotek.com/resources/articles/histamine-microplate-format.html>. Hakupäivä 11.10.2011.

Hassan, Saad S. M. 1978. Spectrophotometric determination of vitamin D₂ (calciferol) by reaction with HCl and tetrachloroethane. Saatavissa: <http://www.springerlink.com/content/x421h534330l0816/>. Hakupäivä 13.10.2011.

Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti 2011. Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Porvoo: Duodecim. S. 101-113.

Hollis B.W. - Kamerud, J.Q. - Lorenz, J.D. - Napoli, J.L. - Selvaag, S.R. 1993. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ¹²⁵I-labeled tracer. Saatavissa:

<http://www.clinchem.org/cgi/content/abstract/39/3/529>.

Hakupäivä

13.10.2011.

Hypoteesi: D-vitamiini lisää atooppista allergiaa. 2006. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 24/2006. S. 2966.

Hänninen, Hanna. – Ruismäki, Mia. – Seikola, Aila. – Slöör, Sari 2007. Laboratoriotyön perusteet. Helsinki: Edita Prima Oy. S. 8–25.

Kaitila, Ilkka – Tuomi, Tiinamaija – Voutilainen, Raimo - Välimäki, Matti J. 2001. Lasten riisitaudista aikuisten osteomalasiaan. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 21/2001. S. 2171–2180.

Kumpulainen, Elsa 2011a. T460503 Immunologia 3 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2011. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Kumpulainen, Elsa 2011b. T430207 Biokemia 2 7 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2011. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Kärkkäinen, Merja – Lamber-Allardt, Christel – Natri, Anna-Mari – Outila, Terhi 2003. Suomalaisten D-vitamiini -tilanteen kohentaminen: auringosta, ruoasta vai purkista? Suomen Lääkärilehti nro 9/2003. S. 1055–1056.

Lahdenne, Pekka 2010. Äidin D-vitamiinistatus ja vastasyntyneen luusto. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 10/2010. S. 1123.

Lindholm, Risto 2010. Vitamiinikirja. Ruoka vitamiinien ja hivenaineiden lähteenä. Vantaa: Moreeni. S. 60–65.

Mäkitie, Outi 2011. Muuttuiko mikään uusien D-vitamiinisuositusten myötä? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 12/2011. S. 1181–1183.

Paakkari, Ilari 2010a. D-vitamiini – aurinkohormoni. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim nro 10/2010. S. 1107–1108.

Paakkari, Ilari 2010b. D-vitamiini. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01044&p_haku=D-vitamiini. Hakupäivä 21.9.2011.

Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, J.M. 2001. How are immunoglobulin studied? Saatavissa: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmun/quinto1.htm>. Hakupäivä 11.10.2011.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, 2011. Saatavissa: www.thl.fi. Hakupäivä 26.9.2011.

Toriola, Adetunji T. 2010. Epidemiological Study of the Role of Vitamin D in the Aetiology of Ovarian Cancer. Helsinki: University print. S. 28–40.

Tyni, Jussi 2009. T54005 Matematiikka 5 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2009. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2010. D-vitamiinityöryhmän raportti. Saatavissa: <http://www.evira.fi/attachments/vrn/d-vitamiiniraportti2010.pdf>. Hakupäivä 21.9.2011.

Vauvana saatu D-vitamiini suojaasi tyypin 1 diabetekselta. 2011. Suomen Lääkärilehti nro 46/2011. S. 4721.

Välimäki, Ilkka. 2009. T440203 Laboratorion laatutoiminta, 3 op. Opintojakson luentomateriaali 2009. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

25-OH Vitamin D. 2010. Package insert. Abbott Laboratories.

Näyttenumero	CMIA- tulos, ng/ml
99SY57307	8,6
99SY57307	8,2
99SY57307	8,7
99SY57307	8,8
99SY57307	9,8
99SY57307	8,5
99SY57307	8,2
99SY57307	8,3
99SY57307	9,2
99SY57307	9

Liite 1.

Näytenumero	Tulos RIA- määrityksellä, nmol/ml	Tulos CMIA- määrityksellä, ng/ml	Tulos CMIA- määrityksellä, nmol/ml	Ottopvm
90SY46677	76,30	37,8	94,50	31.8.
99SY36138	112,00	34,5	86,25	11.8.
99SY36033	19,20	26,7	66,75	9.8.
98SY02902	41,70	25,8	64,50	9.1.
99SY43646	68,60	23,8	59,50	24.9.
97SY44922	64,10	23,6	59,00	25.9.
97SY34672	86,30	22,9	57,25	29.7.
99SY42749	43,30	22,1	55,25	17.9.
97SY53568	39,80	20,2	50,50	17.11.
90SY59110	39,10	20,0	50,00	1.11.
88SY52960	47,80	19,9	49,75	13.10.
97SY49171	31,90	19,2	48,00	23.10.
97SY53609	45,30	18,9	47,25	19.11.
90SY38669	42,90	18,6	46,50	24.7.
88SY44887	35,90	18,1	45,25	25.8.
99SY32362	39,80	18,1	45,25	21.7.
90SY31689	53,50	17,7	44,25	13.6.
97SY19308	67,20	17,7	44,25	21.4.
98SY38137	48,90	16,4	41,00	19.8.
99SY29842	42,10	16,3	40,75	2.7.
90SY08275	33,80	16,1	40,25	7.2.
97SY56441	38,90	16,1	40,25	28.11.
99SY35413	56,60	15,5	38,75	9.8.
97SY24767	66,10	15,3	38,25	23.5.
97SY49295	34,10	14,6	36,50	27.10.
98SY39706	33,00	14,5	36,25	31.8.
98SY05362	32,20	14,4	36,00	27.1.
97SY56828	40,00	14,2	35,50	10.12.
98SY59644	35,80	14,2	35,50	18.12.
98SY51195	35,30	14,0	35,00	5.11.
98SY00216	37,00	13,9	34,75	5.1.
97SY51635	36,80	13,6	34,00	7.11.
99SY39184	29,10	13,5	33,75	30.8.
92SY02983	39,00	13,2	33,00	10.1.
89SY09922	37,50	13,1	32,75	16.2.
98SY49373	35,90	12,9	32,25	27.10.
92SY07132	38,20	12,7	31,75	30.1.
97SY54842	33,60	12,5	31,25	27.11.
91SY07750	25,30	12,3	30,75	4.2.
98SY36834	41,80	12,3	30,75	17.8.

Näytenumero	Tulos RIA- määrityksellä, nmol/ml	Tulos CMIA- määrityksellä, ng/ml	Tulos CMIA- määrityksellä, nmol/ml	Ottopvm
97SY50826	39,20	12,1	30,25	3.11.
91SY27603	23,90	11,9	29,75	23.5.
97SY58647	39,60	11,9	29,75	10.12.
97SY14980	33,70	11,8	29,50	18.3.
97SY47029	28,70	11,8	29,50	10.10.
92SY37251	34,80	11,4	28,50	15.7.
99SY09359	40,30	11,4	28,50	24.2.
98SY16338	36,20	10,9	27,25	31.3.
99SY14744	37,10	10,4	26,00	25.3.
98SY32116	33,00	9,9	24,75	13.7.
91SY47169	28,60	9,8	24,50	4.9.
97SY43256	41,10	9,6	24,00	17.9.
97SY53729	28,80	9,5	23,75	19.11.
99SY42242	34,70	9,5	23,75	15.9.
92SY62726	22,40	9,4	23,50	18.11.
97SY20353	29,30	9,4	23,50	23.4.
91SY06946	25,00	9,3	23,25	29.1.
91SY65554	33,00	9,3	23,25	11.12.
97SY22166	37,70	9,1	22,75	7.5.
99SY17433	32,90	8,9	22,25	13.4.
91SY06900	27,80	8,7	21,75	30.1.
92SY24446	22,90	8,6	21,50	6.5.
98SY12838	24,50	8,5	21,25	12.3.
99SY57307	34,80	8,2	20,50	14.12.
99SY58612	22,40	8,2	20,50	23.12.
98SY50889	35,40	8,0	20,00	5.11.
89SY07853	18,10	7,8	19,50	6.2.
97SY54728	28,50	7,8	19,50	25.11.
98SY54670	22,10	7,7	19,25	25.11.
98SY06317	25,00	7,5	18,75	28.1.
98SY43313	24,70	7,2	18,00	22.9.
97SY21037	30,30	7,0	17,50	28.4.
99SY22218	22,20	5,8	14,50	18.5.
97SY33922	18,20	5,6	14,00	23.7.
97SY13738	21,10	5,5	13,75	11.3.
99SY16572	24,30	5,4	13,50	9.4.
98SY03465	24,10	5,2	13,00	20.1.
90SY66333	23,90	4,9	12,25	11.12.
98SY09556	23,70	4,7	11,75	19.2.
99SY21144	24,90	4,0	10,00	11.5.
98SY59138	24,90	0,0	0,00	21.12.