

Krista Saarinen

In House Immunospot –menetelmän  
detektiotavan kehittämiprojekti

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.4.2018

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Saarinen Krista In-House Immunospot –menetelmän detektiotavan kehittämisprojekti  24 sivua + 3 liitettä 17.04.2018
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaaja(t)	Laboraattori Sanna Edelman, Iho- ja Allergiasairaala Lehtori Reetta Sihvonen, Metropolia
<p>HYKS:n Iho- ja allergiasairaalan allergeenilaboratoriolla on ainoana Suomessa käytössä Immunospot-tutkimus, jolla voidaan osoittaa potilaan IgE-välitteinen herkistyminen potilaan omalle allergeeninäytteelle. IgE-välitteisessä allergiassa allergeeni on usein proteiini, johon IgE sitoutuu aiheuttaen allergisen reaktion, jonka oireet voivat olla moninaisia ja vaihdella lievistä paikallisoireista jopa anafylaksiaan.</p> <p>Opinnäytetyö on osa menetelmän detektiotavan kehittämisprojektiä, jonka tarkoituksena on selvittää, saadaanko kemiluminesenssi- tai fluoresenssimenetelmällä saman tasoisia tai jopa parempia tuloksia kuin tällä hetkellä käytössä olevalla radiologisella menetelmällä. Menetelmävaihdoksella saavutettaisiin taloudellista hyötyä ja analyysiin käytettävä aika lyhenisi samalla kun tuloksen vastausaika potilaalle lyhenisi. Opinnäytetyössä suoritettiin Immunospot-tutkimus viidellä maapähkinäpositiivisilla seerumipoolilla, joiden IgE pitoisuus tiedettiin. Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmiin käytettiin koivuseerumin laimennoksia, joiden IgE pitoisuus tiedettiin ja jotka olivat samaa tasoa kuin maapähkinäpoolien.</p> <p>Tuloksista voitiin havaita, että uudet menetelmät ovat tulevaisuudessa mahdollisia toteuttaa mutta vaativat optimointia ennen diagnostista käyttöönottoa. Radioaktiiviseen mittaamiseen perustuvalla Immunospot-tutkimuksella saatiin tuloksia, jotka vastasivat tiedettyjä IgE pitoisuuksia. Sen sijaan kemiluminesenssi- tai fluoresenssimenetelmillä ei saatu tässä työssä tehdyissä tutkimuksissa luotettavia tuloksia.</p> <p>Opinnäytetyö on toteutettu yhteistyössä HYKS:n Iho- ja allergiasairaalan allergeenilaboratorion kanssa.</p>	
Avainsanat	Allergia, allergiadiagnostiikka, immunologia, immunospot, spesifinen IgE

Author(s) Title	Saarinen Krista Enhanced detection of the in-house Immunospot IgE diagnostics
Number of Pages Date	24 pages + 3 appendices 17 April 2018
Degree	Bachelor of Health Care (Biomedical Laboratory Science)
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Sanna Edelman, Laboratory Supervisor, Skin and allergyhospital Reetta Sihvonen, Senior Lecturer, Metropolia
<p>Allergen Laboratory in the Skin and Allergy Hospital, Helsinki University Central Hospital is the only service laboratory offering a custom in vitro IgE diagnostic method Immunospot in Finland. Immunospot can be used to identify IgE mediated sensitization to a patient's own allergen sample. Allergens are usually proteins that bind IgE on the surface of the effector cells to activate an allergic response. Symptoms can be manifold and changing from mild local symptoms to anaphylaxis.</p> <p>This thesis is part of a development project aiming at enhanced detection of the in-house Immunospot method. The aim was to resolve whether we get same results with chemiluminescence or fluorescence method than the radiology method currently in use. The change of method can result in monetary gain and quicker analysis time. At the same we can get the results faster to the patients. In this thesis we executed Immunospot detections with five peanut positive serum pools which known IgE amounts. Five different birch pollen positive serum dilutions were chosen to be used in chemiluminescence- and fluorescence methods which known IgE amounts at the same level as peanut serum pools.</p> <p>The results show that both chemiluminescence- and fluorescence methods are possible in the future but need optimization before diagnostic use. The results gained with Immunospot matched with commercial IgE measurements. Instead, the chemiluminescence- and fluorescence methods didn't result in trustworthy outcome.</p> <p>Thesis is done in co-operation with Skin and Allergy Hospital's Allergen Laboratory.</p>	
Keywords	Allergy, allergydiagnostics, immunology, immunospot, specific IgE

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus	2
3	Allergia	3
4	Opinnäytetyön menetelmät	7
5	Työn toteutus	10
5.1	Immunospot-tutkimuksen toteutus	11
5.2	Tutkimuksen suorittaminen kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmällä	12
6	Tulokset	13
6.1	Immunospot-tutkimuksen tulokset	13
6.2	Tulokset kemiluminesenssimenetelmällä	14
6.3	Tulokset fluoresenssimenetelmällä	16
6.4	Epäspesifisen sitoutumisen osoittaminen fluoresenssimenetelmässä	17
7	Pohdinta	18
8	Eettisyys	20
	Lähteet	21
	Liitteet	
	Liite 1. Kuva Immunospot-tutkimuksesta	
	Liite 2. Kuva nitroselluloosakalvoista kemiluminesenssimenetelmällä	
	Liite 3. Kuva nitroselluloosakalvoista fluoresenssimenetelmällä	

## 1 Johdanto

Allergiat ovat nykyään Suomessa hyvin yleisiä. Viimeisempien tutkimuksien mukaan noin joka neljännellä aikuisella on allergisia oireita. Kouluikäisistä jopa 40 prosenttia on herkistynyt ympäristön allergeeneille. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2014.) 1950-luvulta lähtien atooppisten allergioiden yleistyminen on ollut kasvussa ja taipumus niihin on osittain perinnöllistä (Hannuksela 2012).

Opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä HYKS:n Iho- ja allergiasairaalan allergeenilaboratorion kanssa. Allergeenilaboratoriolla on ainoana Suomessa käytettävissä Immunospot-tutkimus, jolla voidaan mitata spesifisen Immunoglobuliini E:n (IgE) sitoutumista potilaan seerumissa. Menetelmä on niin sanottu in-house eli organisaation sisällä kehitetty menetelmä. (HUS 2018.) Immunospot-menetelmällä voidaan tunnistaa potilaan omasta allergeeninäytteestä allergeenilähde, kun kyseessä on IgE-välitteinen allergia. Immunospot-tutkimuksen ero kaupallisiin menetelmiin on, että tutkittava allergeeni voidaan valita vapaasti ja tarvittaessa voidaan tutkia potilaan itse toimittamia näytteitä mahdollisesta allergisen reaktion aiheuttajasta. (Mäkinen-Kiljunen 2008: 1237–1239.) Allergeenin sitoutuminen syöttösolujen tai basofiilien pinnalle sitoutuneisiin spesifisiin IgE vasta-aineisiin aiheuttaa allergisen yliherkkyysoireiden, jonka oireet ovat moninaiset ja voivat vaihdella lievistä paikallisoireista jopa henkeä uhkaaviin sydämen rytmihäiriöihin ja verenpaineen laskuun (Hannuksela 2012; Hannuksela-Svahn 2014).

Opinnäytetyö on osa Immunospot-menetelmän detektioivan kehittämissuunnitelmaa, jossa pyrittiin selvittämään, onko kemiluminesenssiin tai fluoresenssiin pohjautuva menetelmä parempi kuin tällä hetkellä käytössä oleva menetelmä. Nykyisellään menetelmä on radiologinen mittaus, jossa käytettävä sekundäärivasta-aine on leimattu radioaktiivisella <sup>125</sup>Jodilla. Radiologisesta menetelmästä pyritään kuitenkin luopumaan säteilevän vasta-aineen vuoksi ja vanhan laitekannan vuoksi. Lisäksi reagenssit menetelmässä ovat kalliita ja analyysiaika pitkä. Opinnäytetyössä testattiin kemiluminesenssilla ja fluoresenssilla leimattua sekundäärivasta-ainetta ja pyrittiin löytämään sekundäärivasta-aineelle sopiva laimennossuhde sekä signaalinvahvuus mittaukselle, jotta menetelmä sopisi diagnostiseen käyttöön. Mikäli radioaktiivinen leima voitaisiin korvata fluoresenssi- tai kemiluminesenssileimalla, saavutettaisiin taloudellista hyötyä ja käytettävää

analyysiaikaa voitaisiin lyhentää. Tärkeintä kuitenkin on, että vastausaika potilaalle lyhenee samalla, jolloin potilaan diagnosointi ja hoidon saanti nopeutuu.

## 2 Opinnäytetyön tarkoitus

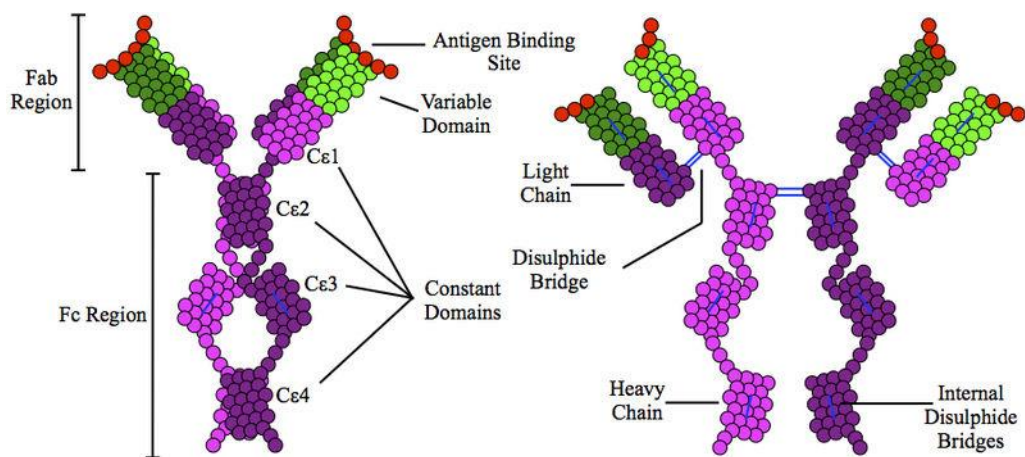
Allergeenilaboratorion tavoitteena on päästä radioaktiivisen leiman käytöstä eroon seerumin spesifisen IgE:n mittaamisessa. Radioaktiivisen <sup>125</sup>Jodin puoliintumisaika on 59,4 päivää (International Atomic Energy Agency 2017). Leiman vaihdossa tavoitellaan sekä taloudellisuutta että työajan säästöä. Lisäksi kemiluminesenssi- ja fluoresenssireagensseissa ei puoliintumisaikaa ole, ja niiden säilyvyys on huomattavasti pidempi. Reagensseja myös kuluu vähemmän kuin radioaktiivista vasta-ainetta, mikäli analyysissä voidaan käyttää suurempaa laimennosta. Tavoitteena on saada sIgE:n mittauksen herkkyys tasolle 0,35 kU/l, jolloin se voidaan hyväksyä diagnostiseen käyttöön. Merkittävin hyöty on kuitenkin potilaalle, sillä analyysiajan lyhentyessä vastausaika potilaalle myös lyhenee, joka nopeuttaa diagnoosin sekä hoidon saantia. Allergian hoidossa pyritään välttämään turhia kieltoja ja ruoka-aineiden välttämistä, joita nopeampi vastausaika ennaltaehkäisee (Allergia- ja astmaliitto 2018). Toisaalta vastauksella voidaan myös vahvistaa allergia, joka on ollut epäselvä, jolloin jatkossa voidaan välttää kyseistä ainetta ja näin ollen myös välttyä voimakkailta allergisilta oireilta. Työperäisiä allergioita selvittäessä vastausaika on potilaalle tärkeä, jotta allergiset oireet voidaan todeta johtuvan työolosuhteista, ja altistusta työssä voidaan lopettaa tai vähentää esimerkiksi työtehtävien vaihdolla tai työnkuvan muutoksella (Työterveyslaitos 2018).

Opinnäytetyön tutkimuskysymykset olivat seuraavat:

- Voiko analyysissä tällä hetkellä käytettävän <sup>125</sup>Jodileiman sijasta käyttää kemiluminesenssi- tai fluoresenssileimaan pohjautuvaa mittausmenetelmää?
- Saadaanko kemiluminesenssi- tai fluoresenssimenetelmässä samantasoisia tai parempia tuloksia kuin radiologisella menetelmällä?
- Minkälaisen vasta-ainelaimennoksen kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmät vaatisivat toimiakseen?

### 3 Allergia

Allergia on tila, jossa elimistössä on joko vasta-aineita tai herkistyneitä T-soluja allergeeniä eli allergian aiheuttajaa kohtaan. Allergia jaetaan hitaisiin ja nopeisiin allergioihin. (Hannuksella 2012.) Allergeeni on useimmiten proteiini, johon IgE sitoutuu aiheuttaen allergisen reaktion (Kukkonen – Pelkonen – Mäkinen-Kiljunen - Mäkelä 2015: 407). IgE löydettiin 1960-luvulla ja sillä on samanlainen perusrakenne kuin muillakin Ig-luokan vasta-aineilla, eli sillä on kaksi raskasta ja kaksi kevyttä ketjua (Johansson 2011: 173-174). Tämän lisäksi IgE:llä on ulospäin osoittavat Fab- ja Fc-osat (Kuvio 1). Fab-osa sitoutuu antigeneihin ja solut sitoutuvat Fc-osaan (Jokiranta – Seppälä 2011; Hannuksela – Savolainen – Terho – Viander 1999: 68.) IgE:n pitoisuus veren seerumissa on huomattavasti pienempi verrattuna muihin vasta-aineluokkiin ja se pystyy aktivoimaan basofiileja ja syöttösoluja (Jokiranta & Seppälä 2011). Allergeenilähde, joka aiheuttaa allergian voi olla esimerkiksi ruoka, juoma, hiukkanen, eläin tai kemikaali. Allergeenikomponentilla tarkoitetaan yksittäisiä proteiineja tai glykoproteiineja, joita allergeenilähde sisältää. Yksi ja sama allergeenilähde voi sisältää useita eri allergeenikomponentteja, jotka eroavat ominaisuuksiltaan. (Kukkonen 2015: 68.)



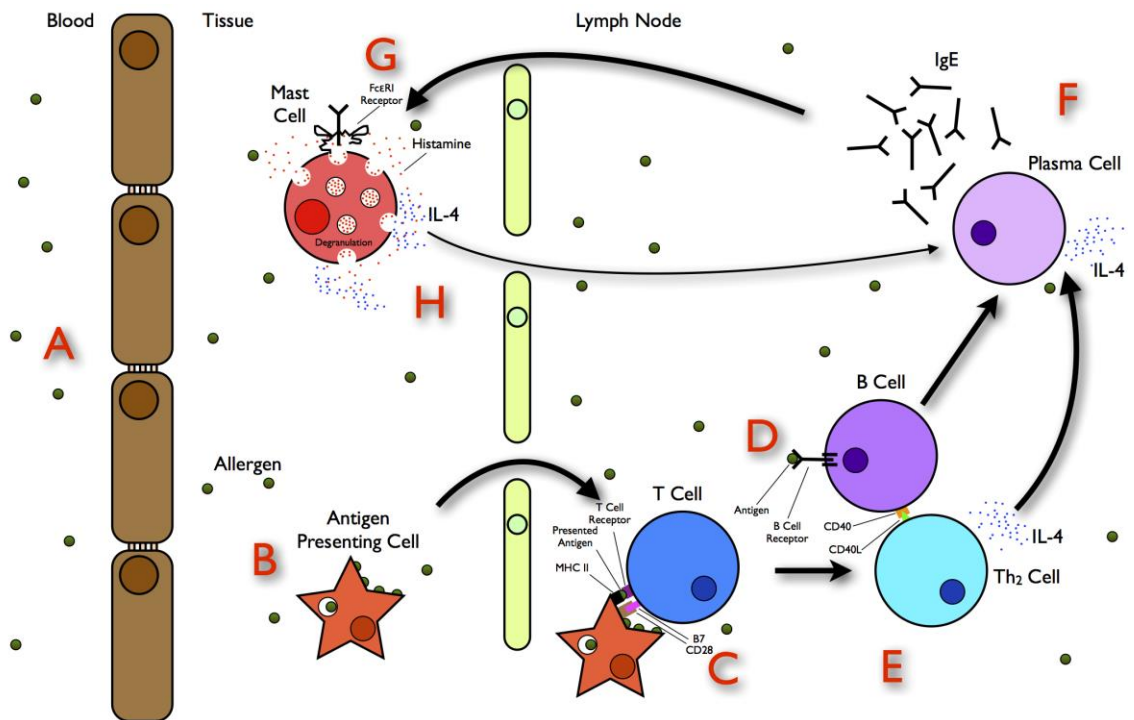
Kuvio 1. Immunoglobuliinin perusrakenne. Fab-osaan sitoutuu vasta-aine ja solu puolestaan sitoutuu Fc-osan alaosaan. (Kuvälähde: Wikipedia 2018.)

Atooppinen allergia on parhaiten tunnettu allergian muoto, jossa reaktiot ovat nopeita. Tällaista allergiaa voidaan kutsua myös nopeaksi, välittömäksi tai IgE-välitteiseksi

allergiaksi. (Haahtela-Hannuksela-Mäkelä-Terho 2007: 32.) Coombs ja Gell jaottelivat allergiset yliherkkyyksireaktion niiden patofysiologisuuden perusteella neljään eri päätyyppiin 1960-luvulla (Descotes – Choquet-Kastylevsky 2001: 43-49). Atooppisen allergian reaktio on tyyppiä I tarkoittaen välitöntä tai jopa anafylaktista reaktiota (Haahtela-Hannuksela-Mäkelä-Terho 2007: 40-41).

Allergisen reaktion syntymekanismi on monimutkainen, eikä kaikkien mekanismien tarkoitusta vielä täysin tunneta. Allergian kehittymisessä on kolme vaihetta, jotka ovat herkistyminen (kuvio 2, kohdat A-F), välitön allerginen reaktio (kuvio 2, G-kohta) ja kroonistuminen. Herkistymisvaiheessa alkaa IgE-vasta-aineiden tuotanto ja Th2-vasteen muodostuminen, kun limakalvolla tai iholla oleva allergeeni kohtaa antigeeniä esittelevän solun (APC). APC-solu ottaa antigeenin sisälleen, kuljettaa sen imusolmukkeeseen ja käsittelee sen muotoon, jolla se voidaan esitellä T-soluille. (Virtanen & Savolainen 2011a; Hannuksela - Savolainen - Terho – Viander 1999: 57-58.) Esittely T-soluille tapahtuu MHC II-molekyylin avulla. MHC II-molekyylin tehtävänä on sitoa peptidifragmentteja, jotka ovat syntyneet antigeenin pilkkoutumisesta ja kuljettaa ne antigeeniä esittelevän solun pinnalle. MHC II luokkaan kuuluvia proteiineja ilmenetään pääasiassa dendriittisoluisissa, makrofageissa ja B-soluissa, sillä ne ovat vuorovaikutuksessa auttaja-T-solun kanssa. (Solunetti 2006.) MHC II on APC-solun pinnalla ja tarjoaa antigeenin T-solureseptorille (TCR) tunnistettavaksi, josta käynnistyy T-solujen aktivaatio. Aktivaation käynnistyminen vaatii APC- ja T-solun kosketuksen keskenään, jossa mukana ovat antigeeni, TCR, CD3- ja CD4- molekyylit sekä adheesiomolekyylit. TCR tunnistaa antigeenin CD3- ja CD4-molekyyliden avulla samalla kun adheesiomolekyylit vahvistavat kosketusta. Adheesiomolekyylit ovat vastapareina siten, että APC-solun pinnalla ovat CD86, LFA-3 ja ICAM-1, CD22 ja T-solujen pinnalla ovat CD28, CD2, CD45R ja LFA-1. Adheesiomolekyyliden kautta syntyy niin sanottu toinen signaali, joka on välttämätön T-solujen aktivaatiolle. Ilman kyseistä signaalia T-solujen aktivaatio ei etene antigeenin esittelyä pidemmälle. (Haahtela – Hannuksela – Mäkelä - Terho 2007: 40, Hannuksela - Savolainen - Terho – Viander 1999: 57-58.)





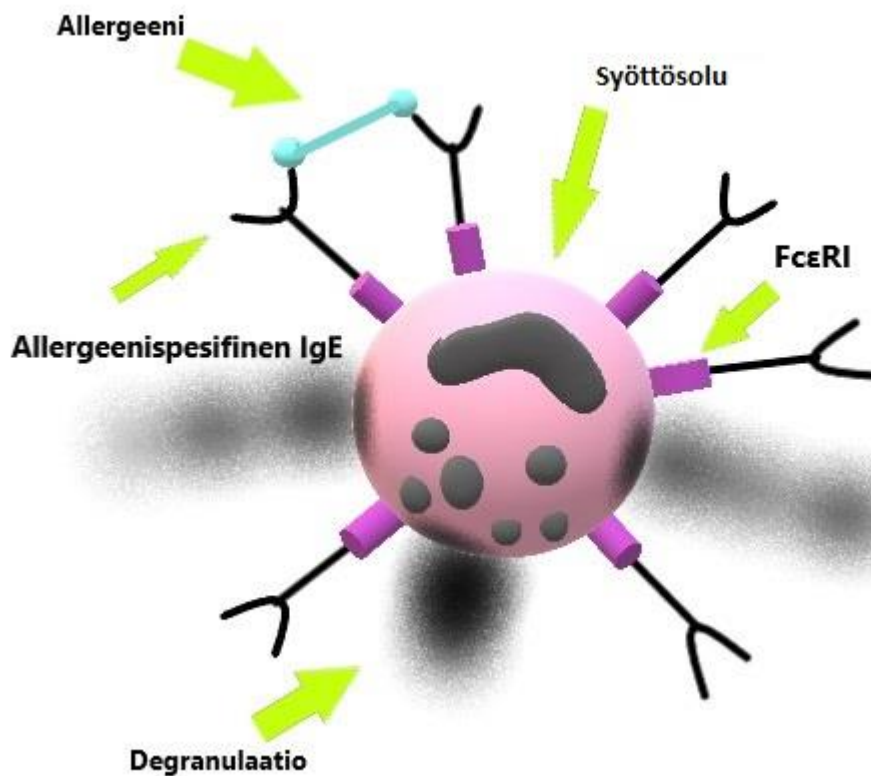
Kuvio 2. Allerginen herkistyminen sekä allergisen reaktion synty. Allergeeni on päätynyt elimistöön (kohta A) ja kohtaa APC-solun (kohta B). T-solun aktivaatio alkaa (kohta C), jolloin kypsyy Th2-soluja, jotka aktivoivat B-solut IgE:tä tuottaviksi plasmasoluiksi samalla erittäen IL-4:ää (kohdat D-F). IgE-vasta-aineet tarttuvat syöttösolun reseptoreihin, jotka spesifisen allergeenin läsnä ollessa ristisilloittuvat ja käynnistävät degranulaation, mikä johtaa allergisten oireiden ilmaantumiseen (kohdat G-H) (Kuvälähde: Wikimedia Commons 2016)

Naiivien T –auttajasolujen (Th) kypsymistä toiminnallisiksi T –auttaja 2 (Th2) soluiksi stimuloi lisäksi interleukiini 4 (IL-4), jonka avulla aktivoituneet T-solut ilmentävät GATA-3 transkriptiotekijää, joka taas puolestaan käynnistää interleukiinien IL-4:n, IL-5:n, IL-10:n ja IL-13:n tuotannon. Interleukiinit aktivoivat B-soluja erilaistumaan, lisäävät vastaainetuotantoa ja lisäävät syöttösolujen ja eosinofiilien tuotantoa luuytimessä. (Arstila 2011a.)

Th2-solut muuttavat B-solut IgE:tä tuottaviksi plasmasoluiksi IL-4- ja IL-13-sytokiinien sekä CD40-ligandin (CD40L) avulla (Hannuksela – Savolainen – Terho Viander 1999: 60). B-solu on itse samalla antigeeniä esittelevä solu, jolloin allergeeni sitoutuu B-solureseptoriin, joka kuljettaa allergeenin B-solun sisälle. Tämän jälkeen allergeeni pilkkotaan ja siitä syntyneet peptidit sitoutuvat MHC II-molekyylisiin, jolloin muodostuu MHC-peptidikompleksi. Syntynyt kompleksi siirtyy takaisin B-solun pinnalle odottamaan aktivoitunutta T-solua eli Th2-solua. Th2-solu erittämät IL-4 ja IL-13 sytokiinit stimuloivat B-soluja ja näin ollen kykeneväy lisäämään vastaainetuotantoa ohjaamalla

luokanvaihtoa CD40-ligandin (CD40L) avulla muun muassa IgE:ksi. Tästä seuraa, että IgE-molekyylit tarttuvat syöttösolujen ja basofiilien korkean affiniteetin FcεRI IgE-reseptoreihin. (Arstila 2011a; Arstila 2011b; Virtanen – Savolainen 2011; Virtanen – Savolainen 2011b; Virtanen – Savolainen 2011c; Miettinen – Vaarala 2011.)

Välitön allerginen reaktio syntyy, kun allergeenia joutuu seuraavan kerran elimistöön. Tällöin allergeeni kohtaa syöttösolun, joita sijaitsee nenän ja keuhkoputkien limakalvoilla sekä iholla. Allergeenin spesifiset IgE-vasta-aineet sitoutuvat syöttösolun pinnalla oleviin IgE-reseptoreihin. Kun syöttösolun pinnalla on riittävän tiheästi näitä spesifisiä IgE-vasta-aineita, allergeeni kykenee kiinnittymään kahteen vierekkäiseen IgE-molekyyliin, jolloin soluaktivaatio alkaa, solunsisäinen  $Ca^{+2}$ -taso nousee ja seurauksena on degranulaatio. Tällöin syöttösolun jyväset tyhjenevät solun ulkopuolelle ja jyväsistä vapautuu histamiinia, hepariinia, entsyymejä, TNF- $\alpha$ :ta sekä eosinofiileille ja neutrofiileille kemotaktisia aineita eli niin kutsuttuja välittäjäaineita (Kuvio 4). Välittäjäaineiden myötä verisuonten läpäisevyys lisääntyy, ilmaantuu kudosten ja kurkunpään turvotusta sekä akuuttia vähentynyttä hapensaantia tai keuhkolaajentumaa, limakalvojen limaneritys lisääntyy ja keuhkoputkien sileä lihaksisto supistuu. Seurauksena on yksilöllisiä ja moninaisia oireita, kuten ihon kutina, nokkosihottuma (urtikaria), allerginen nuha, silmätulehdus tai astma, atooppinen ihottuma, vatsavaivat tai pahimmillaan anafylaktinen sokki, jolloin verenpaine romahtaa. Tällaista allergista reaktiota kutsutaan IgE-välitteiseksi, nopeaksi, välittömäksi tai atooppiseksi allergiaksi. (Hannuksela 2012; Virtanen – Savolainen 2011c; Miettinen – Vaarala 2011.)



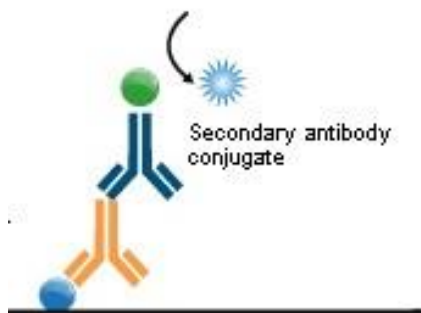
Kuvio 3. Allergisen reaktion synty. IgE on sitoutunut syöttösoluun Fc-osan avulla. IgE:lle spesifinen allergeeni kiinnittyy kahteen vierekkäiseen IgE-molekyylin. Kun allergeeneja on kiinnittynyt syöttösoluihin riittävän tiheästi, soluaktivaatio alkaa, josta seuraa syöttösolun jyvästen tyhjeneminen solun ulkopuolelle eli degranulaatio. Degranulaatiossa elimistöön vapautuu välittäjäaineita, jotka aiheuttavat allergiset oireet. (Kuva: Krista Saarinen)

#### 4 Opinnäytetyön menetelmät

Kaupallisista menetelmistä löytyy vasta-ainetutkimuksia yli 500:lle allergeenille. Kun kyseessä on harvinainen tai potilaskohtainen IgE-välitteinen allergia, ei aina kaupallisista menetelmistä löydy allergeenia, jota halutaan tutkia. Tällöin potilaskohtaista herkistymistä voidaan tutkia Immunospot-menetelmällä (S-Ig-Et). Menetelmän periaate on sama kuin kaupallisissa IgE-tutkimuksissa, mutta allergeeniraaka-aine voidaan valita vapaasti. (Mäkinen-Kiljunen 2008: 1238-1239.) Näytteeksi kelpaa potilaan oma seerumi tai näyte epäillystä allergian aiheuttajasta, kuten esimerkiksi hilse, pöly tai ruoka-aine (Hannuksela – Mäkinen-Kiljunen 2007: 1961).

Immunospot-tutkimus on RIA (radioimmunoassay) -menetelmällä tehtävä tutkimus, jossa antigeeniin eli allergeeniin sitoutuu primääri vasta-aine, joka on potilaan seerumin

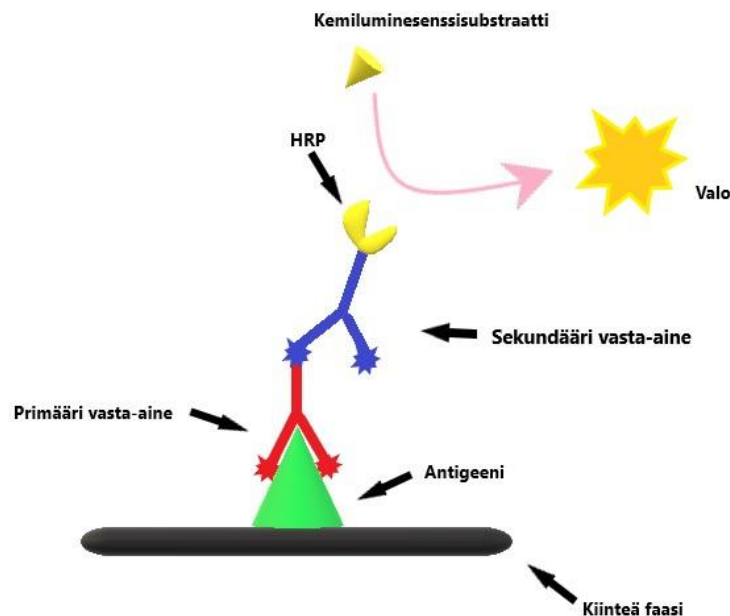
IgE. Antigeeni-primäärivasta-aine-kompleksiin sitoutetaan vielä sekundäärivasta-aine, joka on  $^{125}\text{J}$ odilla konjugoitu anti-humaani IgE. RIA-menetelmä on periaatteeltaan samankaltainen kuin ELISA (Enzyme linked immunosorben assay) -menetelmä. Molemmilla menetelmillä voidaan tunnistaa esimerkiksi peptidejä, proteiineja, vasta-aineita ja hormoneja. Molemmissa menetelmissä antigeeni täytyy immobilisoida eli tehdä liikkumattomaksi esimerkiksi kuoppalevyn pohjalle tai nitroselluloosakalvoon, jonka jälkeen lisätään primääri- ja sekundäärivasta-aine. (ThermoFisher 2018a; Zaidi – Kamal 1993: 264-267.) Molemmissa menetelmissä on mahdollista käyttää suoraa (direct), epäsuoraa (indirect) tai sandwich-menetelmää (ThermoFisher 2008b; Zaidi – Kamal 1993: 264-267). Immunospot-tutkimuksessa käytettävä menetelmä on epäsuora (Kuvio 5) ja siinä on kaksi sitoutumisvaihetta. Ensin antigeeni immobilisoidaan nitroselluloosakalvolle. Tämän jälkeen estetään epäspesifinen sitoutuminen kalvolle blokkiliuoksen avulla. Blokkausvaiheen jälkeen lisätään primääri vasta-aine, jota inkuboidaan ja tämän jälkeen lisätään sekundääri vasta-aine, jota myös inkuboidaan. Vasta-aineiden lisäysten välissä sekä ennen kuvantamisen jälkeen suoritetaan pesut, jotta sitoutumaton aines kuoppalevyltä tai nitroselluloosa kalvoilta saadaan pois. (Sino Biological Inc. 2018.)



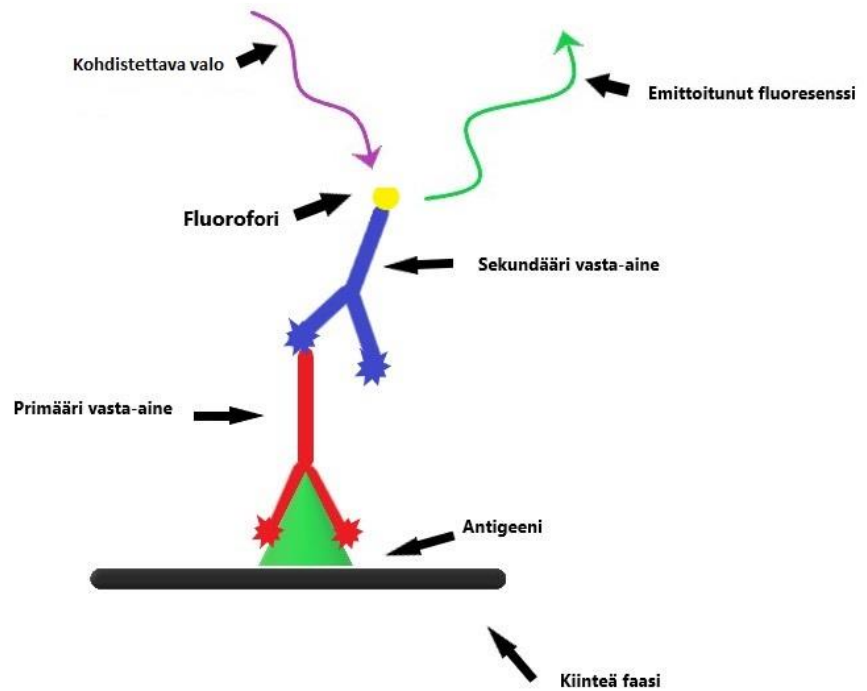
Kuvio 4. Epäsuora (indirect) menetelmä. Alimpana antigeeni on immobilisotuna kalvolle tai kuoppalevylle, jonka päälle lisätään primääri vasta-aine. Primääri vasta-aineen päälle lisätään konjugoitu sekundäärivasta-aine. Sekundäärivasta-aine on usein konjugoitu radioaktiivista, kemiluminesenssi- tai fluoresenssimittausta varten.(Kuvälähde: Wikimedia Commons 2016. Muokattu kuva.)

Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmien edut ovat määrityksen korkea herkkyys, isompi dynaaminen mittausalue ja halvempi hinta. Lisäksi määrittäminen on turvallista suhteessa radioaktiiviseen menetelmään ja tulokset saadaan nopeasti. Erityisesti kemiluminesenssimenetelmä on tullut suosituksi erityisesti Western Blottingissa.

Western blottingilla voidaan erotella ja tunnistaa proteiineja geelielektroforeesin avulla erottelamalla ne. Elektroforeesin geelillä erottuneet proteiinit siirretään nitroselluloosa- tai PVDF-kalvolle, jonka jälkeen voidaan samalla tavalla lisätä primääri ja sekundääri vasta-aine kuten Immunospot-tutkimuksessa. (Elbaggari – McDonald -Albuero – Martin 2008: 1). Kemiluminesenssi on kemiallinen reaktio, jossa energia vapautuu valon muodossa (kuvio 6). Reaktiossa katalyyttinä toimii entsyymi, kun luminolia hapetetaan vetyperoksidin avulla. Usein käytetty entsyymi on HRP (Horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi) tai alkaliininen fosfataasi (AP). (Elbaggari ym: 1; Lihua ym. 2015: 2.) Fluoresenssissa näkyvä valo syntyy fluoroforimolekyylin avulla. Fluoresenssissa kyse on emissiosta, jolloin fluoroforin molekyylit absorboivat fotonin, joka virittyy (kuvio 7). Tämän jälkeen viritystilä purkautuu ja aallonpituus muuttuu suuremmaksi, josta seurauksena havaitaan valoa. (Basic Concepts in Fluorescence 2015.)



Kuvio 5. Kemiluminesenssimenetelmän periaate. Antigeeni on kiinnitettyä kiinteään faasiin, eli nitroselluloosa- tai PVDF-kalvoon. Antigeeniin sitoutuu primääri vasta-aine. Antigeeni-primääri vasta-aine-kompleksiin lisätään sekundääri vasta-aine, joka sisältää HRP:n tai alkaliinisen fosfataasin. Kemiluminesenssi näkyvä valo eli mitattava signaali saadaan substraatin avulla, joka kiinnittyy HRP:hen tai alkaliiniseen fosfataasiin. (Kuva: Krista Saarinen)



Kuvio 6. Fluoresenssimenetelmän periaate. Antigeeni on kiinnitettyä kiinteään faasiin, eli nitroselluloosa- tai PVDF-kalvoon. Antigeeniin sitoutuu primääri vasta-aine. Antigeeni-primäärivasta-aine-kompleksiin lisätään sekundääri vasta-aine, joka sisältää fluorofori. Näkyvä valo saadaan kohdistamalla kompleksiin valoa tietyllä aallonpituudella, jolloin fluorofori virittyy. Viritystilän purkautuessa eli emittoituessa syntyy näkyvää valoa. (Krista Saarinen)

Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmissä syntyvä signaali voidaan havaita CCD (charge-coupled device) -kameralla, joka mahdollistaa nykyisen digitaalisen kuvauksen (The Royal Swedish Academy of Sciences 2009: 9). Markkinoilla on tällä hetkellä useammalla valmistajalla tarjolla kuvantamislaitteita, jotka mahdollistavat elektrofooresigeelien sekä PVDF- tai nitroselluloosakalvon kuvantamisen kemiluminesenssi- tai fluoresenssimenetelmällä. Opinnäytetyössä kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmiä varten oli koekäytössä Bio-Radin ChemiDoc™ MP – kuvantamislaitte, joka mahdollistaa molemmat detektiotavat. Mittausaika vaihtelee 10-200 sekunnin väliltä. (Bio-Rad 2018)

## 5 Työn toteutus

Tutkimuksessa oli viisi pitoisuudeltaan eritasoista kontrolliseerumia (Taulukko 1). Seerumit olivat pooleja, jotka oli etukäteen valmistettu allergenilaboratorion kontrollinäytteistä ja niiden spesifinen IgE-pitoisuus maapähkinää kohtaan tiedettiin.

Allergeeninäyte oli laboratorion itse valmistama maapähkinäuute vuodelta 2015, jonka pitoisuus oli 1:4 w/v (weight per volume). Maapähkinäuutteesta tehtiin laimennossarja suhteessa 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Vertailupohja detektiotavalle muodostettiin tekemällä ensin Immunospot-tutkimus maapähkinäpooleille, johon sitten fluoresenssi- ja kemiluminesenssimenetelmää voitiin verrata.

Taulukko 1. Käytetyt maapähkinäseerumipoolit ja niiden pitoisuudet

Seerumi	IgE pitoisuus (kU/l)
Maapähkinäpooli 1	0,35
Maapähkinäpooli 2	0,96
Maapähkinäpooli 3	2,20
Maapähkinäpooli 4	6,76
Maapähkinäpooli 5	16,75

Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmään siirryttäessä allergeeni jouduttiin kuitenkin vaihtamaan koivuun maapähkinäseerumeiden riittämättömyyden vuoksi. Seeruminäytteiksi pyrittiin valitsemaan koivukontrolliseerumeita, joiden pitoisuus olisi hyvin lähellä maapähkinäseerumeiden pitoisuutta (Taulukko 2). Allergeeninä käytettiin kaupallista koivu-uutetta, jota käytetään myös ihon Prick-testeissä.

Taulukko 2. Käytetyt koivuseerumit ja niiden pitoisuudet

Seerumi	IgE pitoisuus (kU/l)
Koivuseerumi 1	15,4
Koivuseerumi 2	5,1
Koivuseerumi 3	1,24
Koivuseerumi 4	0,625
Koivuseerumi 5	0,31

### 5.1 Immunospot-tutkimuksen toteutus

Tutkimuksessa kutakin maapähkinäuutelaimennosta pipetoitiin kuudelle nitroselluloosakalvoille rinnakkaisina, joista yksi oli kielteinen kontrolli. Lisäksi pipetoitiin omalle levyllään standardit, jotka olivat kaupallista humaani-IgE:tä.

Nitroselluloosakalvojen annettiin kuivua. Epäspesifinen sitoutuminen levyihin estettiin block-liuoksella, jonka tarkoitus oli parantaa analyysiherkkyyttä ja vähentää

taustasignaalia (ThermoFisher 2018c). Kalvoja inkuboitiin primäärivasta-aineessa eli maapähkinäpooleissa yön yli, jolloin seerumeissa olevat maapähkinän vasta-aineet kiinnittyivät maapähkinäpuutteen allergeeneihin. Kielteisenä kontrollina käytettiin niin kutsuttua normaaliseerumia, joka oli Suomen punaiselta ristiltä saatu yksittäisen luovuttajan plasma, jossa ei tutkitusti ollut vasta-aineita koivulle tai maapähkinälle.

Seuraavana päivänä kalvot pestiin kaupallisella pesuliuksella, jotta ylimääräinen sitoutumaton primäärivasta-aine saatiin pois. Tämän jälkeen kalvoja inkuboitiin yön kaupallisessa anti-humaani IgE:ssä, joka sisältää <sup>125</sup>Jodi-leiman. Tällöin jodi-konjugoitu sekundäärivasta-aine sitoutui primääri vasta-aineeseen. Lisäksi pipetoitiin oma kontrollilevy, johon tuli anti-humaani IgE:stä laimennossarja. Kalvot pestiin jälleen samalla tavalla kuten aiemminkin primäärivasta-aineen inkuboinnin jälkeen, jotta sitoutumaton anti-humaani IgE saatiin pois.

Kalvot kuivatettiin huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne aseteltiin niin kutsuttuun kasettiin kuvantamislevyn kanssa. Kasetin annettiin olla 10 päivää, jonka jälkeen kuvantamislevy kuvannettiin Fujifilm FLA 3000 -laitteella, jolloin levyistä saatiin digitaalinen kuva.

## 5.2 Tutkimuksen suorittaminen kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmällä

Kemiluminesenssi ja fluoresenssimenetelmässä työvaiheet olivat samat kuin Immunospot-tutkimuksessa. Kemiluminesenssimittauksen työvaiheissa oli kuitenkin huomioitava alusta alkaen käytettävien reagenssien osalta se, että ne eivät sisällä natriumatsidia. Natriumatsidi on anti-mikrobinen aine, jonka tarkoitus on estää mikrobien kasvu reagenssissa mutta samalla se voi häiritä kemiluminesenssireaktiota (Abcam 2018a.) Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmissä primäärivasta-aineen inkubaatioaika lyhennettiin kahteen tuntiin. Molemmissa menetelmissä sekundäärivasta-ainetta inkuboitiin tunnin ajan reagenssin käyttöohjeiden mukaisesti. Sekundääri vasta-aineessa käytettiin 1:4000 laimennosta, joka perustui projektin aikaisempiin kokeiluihin. Menetelmät erosivat toisistaan substraatin lisäysvaiheessa. Kemiluminesenssimenetelmässä substraatin inkubaatioaika oli käyttöohjeiden mukaan viisi minuuttia. Fluoresenssissa puolestaan jouduttiin käyttämään epäsuoraa fluoresenssideteksiota, sillä kaupallista uuden sukupolven fluoroforilla konjugoitua anti-humaani IgE vasta-ainetta ei ollut saatavilla. Sekundäärivasta-aineena käytettiin tämän vuoksi biotiini-konjugoitua anti-humaani IgE-vasta-ainetta, jonka detektiossa hyödynnettiin streptavidini-IRDye® molekyyliä. Sekä sekundäärivasta-ainetta että



streptavidiini-IR-Dye molekyyliä inkuboitii 30 minuuttia käyttöohjeiden mukaisesti ennen viimeisiä pesuja, jonka jälkeen levyt kuvannettiin BioRadin ChemiDoc™MP -kuvantamislaitteella.

## 6 Tulokset

Tulosten laskennassa käytettiin apuna AIDA Image Analysis -kuvanmuokkausohjelmaa. Kuvanmuokkausohjelmalla merkittiin näytealueet, joista ohjelma laski merkityn alueen värin voimakkuuden ja koosti niistä Excel-taulukon. Lopullinen pitoisuus saatiin vähentämällä näytteen väri-intensiteetistä normaaliseerumin väri-intensiteetti, sillä normaaliseerumi oli kielteinen kontrolli. Lisäksi levyille lisättiin blanc- eli nollanäyte, jonka tarkoitus oli vähentää tausta pois tuloksia laskiessa. Tämän jälkeen IgE-pitoisuus laskettiin muodossa ng/ml jakamalla näytteen väri-intensiteetti, josta normaaliseerumi oli vähennetty, seerumin tilavuudella. IgE-pitoisuus saatiin muotoon kU/l jakamalla ng/ml -pitoisuus 2,44:llä sillä 1 kU/l vastaa 2,44 ng/ml IgE:tä.

### 6.1 Immunospot-tutkimuksen tulokset

Immunospotista saatua kuvaa (liite 1) tarkastellessa voidaan huomata, että maapähkinäpooleissa värin intensiteetti lisääntyy ensimmäisestä poolista viimeistä kohden kuten pitääkin, sillä maapähkinäpooli 1 on pitoisuudeltaan pienin, kun taas maapähkinäpooli 5 on suurin. Kuvaa muokatessa ei havaittu, että näytteet olisivat koskettaneet toisiaan. Näytteistä laskettu pitoisuus oli myös hyvin lähellä sitä mitä tiedetty pitoisuus oli, joten analyysiä voidaan pitää onnistuneena. Tuloksista voidaan havaita, että 1:1 laimennoksella saatiin lähes sama pitoisuus, mitä tiedetty IgE pitoisuus oli (taulukko 3).

Taulukko 3. Immunospot-tutkimuksen tulokset.

Näyte	Laimennos	Pitoisuus kU/l
Maapähkinäpooli 1	1:1	0,44
	1:2	0,45
	1:4	0,34
	1:8	0,14
	1:16	0,20
	1:32	0,12
Maapähkinäpooli 2	1:1	0,81
	1:2	0,59
	1:4	0,47
	1:8	0,20
	1:16	0,18
	1:32	0,24
Maapähkinäpooli 3	1:1	2,4
	1:2	1,9
	1:4	1,33
	1:8	0,78
	1:16	0,63
	1:32	0,55
Maapähkinäpooli 4	1:1	4,1
	1:2	3,2
	1:4	2,5
	1:8	1,61
	1:16	1,02
	1:32	1,02
Maapähkinäpooli 5	1:1	11,3
	1:2	6,63
	1:4	6,30
	1:8	3,54
	1:16	2,59
	1:32	1,62

## 6.2 Tulokset kemiluminesenssimenetelmällä

Kemiluminesenssimenetelmässä näytteiden sitoutuminen oli hyvin satunnaista (liite 2), eikä niissä voinut havaita samanlaista järjestelmällistä värin voimakkuuden muutosta

kuten Immunospot-tutkimuksessa. Kemiluminesenssimenetelmän tulokset ovat esitetty taulukossa 4 ja niistä havaittiin, että saadut tulokset eivät täsmänneet aikaisemmin todennettujen pitoisuuksien kanssa.

Taulukko 4. Kemiluminesenssimenetelmän tulokset.

<b>Näyte</b>	<b>Laimennos</b>	<b>Pitoisuus kU/l</b>
Koivuseerumi 1	1:1	62,28
	1:2	14,90
	1:4	5,93
	1:8	46,5
	1:16	14,29
	1:32	-0,81
Koivuseerumi 2	1:1	28,07
	1:2	12,80
	1:4	8,17
	1:8	26,18
	1:16	5,02
	1:32	1,66
Koivuseerumi 3	1:1	53,46
	1:2	28,02
	1:4	9,86
	1:8	46,77
	1:16	17,08
	1:32	-1,05
Koivuseerumi 4	1:1	105,56
	1:2	58,35
	1:4	41,24
	1:8	98,79
	1:16	98,79
	1:32	41,70
Koivuseerumi 5	1:1	95,38
	1:2	37,23
	1:4	21,21
	1:8	110,49
	1:16	49,00
	1:32	25,03

### 6.3 Tulokset fluoresenssimenetelmällä

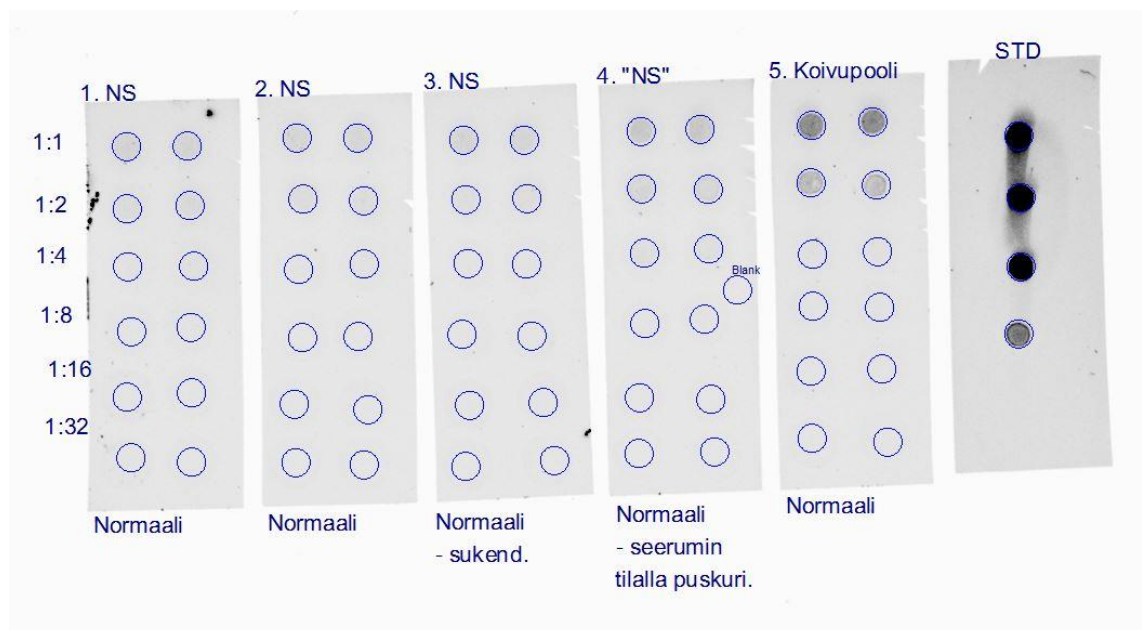
Fluoresenssimenetelmässä värin voimakkuuden muutos oli järjestelmällistä vaikkakin intensiteetit eivät olleet kovin voimakkaita (liite 3). Fluoresenssimenetelmän tulokset ovat esitettyinä taulukossa 5. Tuloksissa havaitaan sama kuin kemiluminesenssimenetelmässä eli ne eivät täsmää aikaisemmin todettujen pitoisuuden kanssa ja osa tuloksista on jopa negatiivisia lukemia. Lisäksi havaittiin epäspesifistä sitoutumista, jota tarkastellaan seuraavassa kappaleessa tarkemmin.

Taulukko 5. Fluoresenssimenetelmän tulokset.

Näyte	Laimennos	Pitoisuus kU/l
Koivuseerumi 1	1:1	9,91
	1:2	-7,53
	1:4	-9,38
	1:8	6,39
	1:16	-7,42
	1:32	-11,56
Koivuseerumi 2	1:1	-2,58
	1:2	-10,40
	1:4	-10,92
	1:8	-6,94
	1:16	-10,78
	1:32	-12,87
Koivuseerumi 3	1:1	-10,07
	1:2	-11,08
	1:4	-11,28
	1:8	-10,72
	1:16	-11,95
	1:32	-13,00
Koivuseerumi 4	1:1	-11,01
	1:2	-11,96
	1:4	-11,92
	1:8	-9,87
	1:16	-11,60
	1:32	-13,26
Koivuseerumi 5	1:1	-8,68
	1:2	-10,58
	1:4	-11,02
	1:8	-9,34
	1:16	-11,60
	1:32	26,25

#### 6.4 Epäspesifisen sitoutumisen osoittaminen fluoresenssimenetelmässä

Epäloogisia tuloksia fluoresenssimenetelmässä lähdettiin selvittämään erillisellä kokeella, jolla epäspesifinen sitoutuminen saatiin todettua. Erillisessä kokeessa (kuvio 9) koivuallergeenia pipetoitiin rinnakkaisina laimennoksina viidelle eri levyille. Kahdella ensimmäisellä levyllä on normaalisti kaikki reagenssit eli koivuallergeeni, primäärivasta-aine, biotiinikonjugoitu sekundäärivasta-aine sekä streptavidini-IRDye®. Kolmannella levyllä on allergeeni, primäärivasta-aine sekä IRDye®, mutta jossa sekundäärivasta-aine on korvattu pelkällä puskurilla. Neljäs levy sisältää koivuallergeenin, sekundäärivasta-aineen ja IRDye®:n, mutta primäärivasta-aine on korvattu puskurilla. Viidennellä levyllä on allergeeni, koivupositivinen primäärivasta-aine sekä sekundäärivasta-aine. Epäspesifinen sitoutuminen osoittautuu sillä, että kolmannella levyllä, jossa primäärivasta-aine on korvattu puskuriliuoksella, tapahtuu sitoutumista. Sitoutumista ei kuitenkaan pitäisi tapahtua, kun primääri vasta-aine on korvattu puskurilla. Samanlaista testiä ei kemiluminesenssimenetelmällä ollut tarpeen tehdä, koska epäspesifistä taustaa ei mittauksissa havaittu.



Kuvio 7. Epäspesifisen sitoutumisen osoittaminen. Ensimmäiset kaksi levyä sisältävät kaikki reagenssit eli allergeenin, primäärivasta-aineen eli seerumin, joka on kielteinen koivulle, sekundäärivasta-aineen ja streptavidini-IRDye®:n. Kolmas levy sisältää

allergeenin, primäärivasta-aineen sekä streptavidini-IRDye®:n. Neljännellä levyllä on koivuallergeeni, sekundäärivasta-aine ja streptavidini-IRDye® mutta primäärivasta-aine on korvattu puskurilla. Viidennellä levyllä on allergeeni, koivupositiivinen primäärivasta-aine sekä sekundääri vasta-aine. Viimeinen levy sisältää kaupallisen humaani IgE -standardin. Epäspesifinen sitoutuminen voidaan todeta kolmannelta levyltä, jossa tapahtuu sitoutumista huolimatta siitä, että primäärivasta-aine on korvattu puskurilla.

## 7 Pohdinta

Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmillä ei saatu tuloksia, jotka olisivat olleet riittävän sensitiivisiä ja spesifisiä sekä riittävän lähellä aikaisemmin todettuja IgE-pitoisuuksia. Immunospotissa hyvä IgE-sitoutumistulos saatiin laimentamattomalla allergeeniuutteella, kun taas kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmissä ei ollut selkeää laimennosta, jolla olisi saatu todettua IgE-tasoa vastaava tulos. Tietyillä laimennoksilla saatiin samantasoisia tuloksia, mutta kyse voi olla vain sattumanvaraisuudesta. Useat kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmällä saadut tulokset olivat jopa negatiivisia lukemia, joka voi johtua sekundääri vasta-aineen sitoutumisesta normaalseerumiin, jonka tulisi olla kielteinen kontrolli. Sekundäärivasta-aineen sitoutuessa kielteiseen kontrolliin tulokset vääristyvät, sillä sitoutumista ei tulisi tapahtua. Selkeää syytä normaalseerumin sitoutumiselle ei löytynyt, mutta kyseessä voi olla, että sekundäärivasta-aine ei ole täysin spesifinen IgE:lle, vaan sitoo lisäksi esimerkiksi IgG:tä, jota on myös veressä (Kantele – Vaarala 2011). Fluoresenssimenetelmässä ideaalitalanne olisi, että käytössä olisi suoraan sekundäärivasta-aineeseen konjugoitu fluorofori, eikä biotiini streptavidinin kautta kierretty menetelmä. Tällaista sekundäärivasta-ainetta ei kuitenkaan ollut kaupallisesti saatavilla, mutta tulevaisuudessa sen pitäisi olla mahdollista, kun uuden sukupolven fluoroforikonjugaatit yleistyvät. Tällä hetkellä saatavia sekundäärivasta-aineita, joihin fluorofori on konjugoitu ei tässä opinnäytetyössä kokeiltu niiden helposti heikkenevän signaalin vuoksi. IRDye®:n etuna on se, että se säilyy jopa vuoden mitattavissa, joten kuvantamista voi siirtää tarpeen mukaan myöhemmäksi (Abcam 2017b).

Työn toteutuksessa oli monia haasteita, jotka vaikuttivat lopputulokseen. Ensimmäiseksi haasteeksi muodostui nitroselluloosalevyillä oleva tausta, joka teki tulosten laskennasta mahdotonta. Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmiä kokeiltiin pienimmällä mahdollisella nitroselluloosalevyllä (2,4 cm x 2,4 cm), jolloin kalvoille muodostui voimakasta taustaa. Kalvojen ja pesuastioiden kokoa vaihdettiin, jolloin ongelma poistui, joten mitä ilmeisemmin analyysia ei tulevaisuudessa voi suorittaa pienimmällä

nitroselluloosakalvolla, joka on neliön muotoinen kuten myöskin pesuastia. Taustaa oli myös toisinaan isoimmilla suorakaiteen muotoisilla levyillä, joten taustan poistaminen tulee olemaan yksi optimoinnin kohde. Lisäksi tulee löytää täysin IgE:lle spesifinen sekundääri vasta-aine, jotta epäspesifinen sitoutuminen saataisiin poistettua. Myös primääri- ja sekundäärivasta-aineen inkubointiaika voi olla yksi optimoinnin kohde. Tässä työssä havaittiin, että yön yli inkuboinnin sijasta pari tuntia riittää, joten myös vasta-aineiden minimi-inkubointiaikaa voisi tarkastella .

Kaikissa kolmessa menetelmässä työvaiheet olivat samat sekundäärivasta-aineen lisäykseen saakka. Radiologisessa menetelmässä sekundäärivasta-aineen inkubointiaika oli yön yli, kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmässä puoli tuntia. Kemiluminesenssimenetelmässä vasta-aineen inkuboinnin jälkeen lisättiin vielä HRP-konjugaatti viiden minuutin ajaksi. Fluoresenssimenetelmässä lisättiin sekundääri vasta-aineen jälkeen vielä streptavidini-IRDye® molekyyli puoleksi tunniksi. Kemiluminesenssi ja fluoresenssimenetelmät ovat valolle herkkiä ja vaativat hämärässä työskentelyä, joka voi luoda tilan puolesta haasteita. Tämän lisäksi kemiluminesenssimenetelmässä hankalaksi osoittautui kuvantaminen, joka tulee tehdä, kun nitroselluloosakalvot ovat vielä märkiä. Märkien kalvojen käsittelyssä on riskinä kalvojen repeäminen ja ilmakuplien muodostuminen, kun levyjä asennetaan kahden muovikalvon väliin kuvantamista varten. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että levyjen asettelu pitäisi onnistua yhdellä kerralla, koska potilaan seerumia voi olla käytössä niin vähän, että se ei riitä uusinta-analyysiin. Fluoresenssimenetelmän etu oli se, että levyjen kuvantamisen pystyi tekemään kuivana. Kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmillä saatiin analyysiaika supistettua yhteen päivään. Fluoresenssimenetelmä on kemiluminesenssimenetelmää hieman pidempi ja vei täsmälleen kahdeksan tuntia mutta IRDye®:n ansioista kuvantamisen voi jättää seuraavaan aamuun, jolloin analyysiaika soveltuu normaaliin työaikaan. Kemiluminesenssimenetelmässä kuvantamisen ehti myös tehdä yhden työpäivän aikana.

Menetelmien testauksesta voidaan todeta, että kemiluminesenssi- ja fluoresenssimenetelmät ovat mahdollisia tulevaisuudessa mutta vaativat edelleen optimointia, jotta ne voitaisiin käyttää diagnostiseen käyttöön. Tällä hetkellä menetelmistä luotettavin on nykyinen radiologinen menetelmä, joka tulisi säilyttää siihen saakka, kunnes päätetään, että otetaanko käyttöön kemiluminesenssi- vai fluoresenssimenetelmä ja se saadaan optimoitua.

## 8 Eettisyys

Etiikalla tarkoitetaan oppia hyvästä, pahasta, oikeasta, väärästä. (Tieteen Termipankki 2016.) Etiikka muodostuu arvoista, ihanteista ja periaatteista. Etiikka ohjaa ihmisiä tekemään valintoja sekä arvioimaan omaa sekä toisten toimintaa ja niiden perusteita. (ETENE 2001)

Terveydenhuoltoalalla eettiset kysymykset ovat toiminnan perusta ja ohjaavat jokapäiväistä toimintaa. Eri ammattiryhmien eettisen ohjeet perustuvat yhteisiin arvoihin huolimatta siitä, että ne painottuvat eri tavoin. Keskeisenä kuitenkin ovat ihmisarvon ja itsemääräämisoikeuden kunnioittaminen, ihmiselämän suojelu sekä terveyden edistäminen. Hoidon edellytetään aina pohjautuvan tieteellisesti tutkittuun tieteen tietoon. (ETENE 2001)

Bioanalyytikon työtä ohjaavat Suomen bioanalytikkoliiton eettiset ohjeet. Eettiset ohjeet sisältävät terveydenhuollon yhteiset eettiset periaatteet, johon kuuluvat oikeus hyvään hoitoon, ihmisarvon kunnioitus, itsemääräämisoikeus, oikeudenmukaisuus, hyvä ammattitaito ja hyvinvointia edistävä ilmapiiri sekä yhteistyö ja keskinäinen arvonto. Tämän lisäksi eettiset ohjeet sisältävät kliinisen laboratoriotyön eettiset periaatteet, jotka ovat velvollisuudet potilaalle tai asiakkaalle, ammattikunnalle ja yhteiskunnalle. (Suomen bioanalytikkoliitto 2017.)

Tieteellistä tutkimusta ohjaa hyvä tieteellinen käytäntö, jonka keskeisiä asioita ovat rehellisyys, yleinen huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa, esittämisessä sekä tutkimuksen ja sen tulosten arvioinnissa. Hyvän tieteellisen käytännön mukaan tutkimuksessa sovelletaan tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Opinnäytetyössä otettiin huomioon terveydenhuoltoalan etiikka, Suomen bioanalytikkoliiton eettiset ohjeet sekä hyvä tieteellinen käytäntö. Metropolia Ammattikorkeakoulun sekä Iho- ja allergeenilaboratorion välille solmittiin sopimus opintoihin liittyvästä projektista. Tämän lisäksi haettiin tutkimuslupa HUS:lta, joka myönnettiin joulukuussa 2017. Opinnäytetyö ei edellyttänyt eettistä ennakoarviointia.



Opinnäytetyössä ei oltu tekemisissä potilaiden kanssa tai käsitelty potilasnäytteitä. Opinnäytetyön tutkimusosio toteutettiin huomioiden Suomen bioanalytikkoliiton eettisen ohjeet kliinisen laboratoriotyön osalta, jonka perustana ovat EN ISO 15189:2013 standardi. Opinnäytetyössä saadut tulokset ovat esitetty sellaisenaan kuin ne on saatu ja lähteisiin on viitattu asianmukaisella tavalla ilman plagiointia. Opinnäytetyössä on pyritty rehellisyyteen sekä läpinäkyvyyteen. Työskentelyssä sekä kirjallisessa osiossa on pyritty toimimaan huolellisesti sekä tarkasti.

## Lähteet

Abcam 2018a. Antibody storage guide. Verkkodokumentti. < [www.abcam.com/protocols/antibody-storage-guide](http://www.abcam.com/protocols/antibody-storage-guide)>. Luettu 3.4.2018.

Abcam 2018b. IRDye® conjugated secondary antibodies. Verkkodokumentti. < [www.abcam.com/secondary-antibodies/irdye-conjugated-secondary-antibodies](http://www.abcam.com/secondary-antibodies/irdye-conjugated-secondary-antibodies)>. Luettu 22.3.2018.

Allergia- ja astmaliitto 2018. Allergisen ruokavalio. Verkkodokumentti. < <https://www.allergia.fi/allergiat/ruokayliherkkyys/allergisen-ruokavalio/>>. Luettu 13.4.2018.

Arstila, Petteri 2011a. Auttaja-T-solujen funktionaaliset alaluokat. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti.

Arstila, Petteri 2011b. T-solujen aktivaatio. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti.

Basic Concepts in Fluorescence 2015. Verkkodokumentti. < <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>>. Luettu 13.4.2018.

Bio-Rad 2018. ChemiDoc™ MP Imaging System. Verkkodokumentti. < [www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6873.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6873.pdf) >. Luettu 5.4.2018.

Descote, Jacques – Choquet-Kastylevsky Geneviève 2001. Gell and Coombs's classification: is it still a valid? Toxicology volume 158. Issues 1-2. 43-49.

Elbaggari, Ahmed – McDonald, Kevin – Albuero, Anthony – Martin, Charles 2008. Imaging of Chemiluminescent Western Blots: Comparison of Digital Imaging and X-ray Film- Verkkodokumentti. <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5809.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5809.pdf)>. Luettu 5.4.2018

Haahtela, Tari – Hannuksela, Matti – Mäkelä, Mika – Terho, Erkki O. 2007. Allergia. Duodecim. Toimitettu teos. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.

Hannuksela, Matti 2012. Allergiat. Duodecim Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00561](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00561)>. Luettu 7.12.2017.

Hannuksela, Matti – Mäkinen-Kiljunen, Soili 2007. Ristiin reagoivat ruoka-allergeenit. Duodecim vol. 123 no. 16. 1955-1962. Katsausartikkeli.

Hannuksela, Matti – Savolainen, Johannes – Terho, Erkki O. – Viander, Markku. Allergian perusmekanismit. Teoksessa Haahtela, Tari – Hannuksela, Matti – Terho, Erkki O. 1999 (toim.): Allergologia. Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.

Hannuksela-Svahn, Anna 2014. Anafylaktinen reaktio (äkillinen yliherkkyyssreaktio). Duodecim Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00201](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00201)>. Luettu 23.3.2018.

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri (HUS) 2018. Allergeenilaboratorio verkkodokumentti. <[www.hus.fi/sairaanhoito/sairaalat/iho-ja-allergiasairaala/Allergiatutkimuskeskus/Sivut/Allergeenilaboratorio.aspx](http://www.hus.fi/sairaanhoito/sairaalat/iho-ja-allergiasairaala/Allergiatutkimuskeskus/Sivut/Allergeenilaboratorio.aspx)>. Luettu 2.4.2018.

Johansson, S.G.O 2011. The History of IgE: From discovery to 2010. Current Allergy and Asthma Reports 11 (6). 173-177.

Jokiranta, Sakari – Seppälä, Ilkka J.T 2011. Vasta-aineiden rakenteen ja toiminnan perusteet. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Immunologia. Saatavilla myös sähköisesti.

Kantele, Anu – Vaarala, Outi 2011. Limakalvojen vasta-ainevälitteinen immuunipuolustus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Immunologia. Saatavilla myös sähköisesti.

Kukkonen, Anna Kaarina 2015. Allergeenikomponentit IgE-välitteisen allergian diagnostiikassa. Moodi 2/2015. 68-69.

Kukkonen, Anna Kaarina – Pelkonen, Anna – Mäkinen-Kiljunen, Soili – Mäkelä, Mika 2015. Komponenttitutkimukset parantavat allergioiden diagnostiikkaa. Lääkärilehti 7/2015. Vuosikerta 70. Sivut 407-411.

Lihua, Yang – Maojun, Jin – Pengfei Du – Ge, Chen – Chan, Zhang – Jian, Wang – Fen, Jin – Hua, Shao – Yongxin, She – Shanshan, Wang – Lufei, Zheng – Jing, Wang 2015. Study on Enchanment Principle and Stabilization for the Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP Chemiluminescence System.

Miettinen, Aaro – Vaarala, Outi 2011. Tyypin I kudosaivaurio: IgE-välitteinen välitön yliherkkyys. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Duodecim. Saatavilla sähköisesti.

Mäkinen-Kiljunen, Soili 2008. Laboratoriotutkimukset apuna allergeenien selvittelyssä. Duodecim 124 (11). 1237-1245.

Sino Biological Inc 2018. Indirect ELISA, conventional but efficient. Elisa encyclopedia. Verkkodokumentti. < [www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa](http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa)>. Luettu 3.4.2018.

Solunetti 2006. MHC-proteiinit. Verkkodokumentti. < [www.solunetti.fi/fi/histologia/mhc-proteiinit/2/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/mhc-proteiinit/2/)>. Luettu 2.4.2018.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2014. Astman ja allergioiden yleisyys. Verkkodokumentti. < <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/astma-ja-allergiat/astman-ja-allergioiden-yleisyys>>. Päivitetty 1.1.2014. Luettu 20.3.2018

ThermoFisher 2018a. Overview of ELISA. Verkkodokumentti. < <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>>. Luettu 5.4.2018.

ThermoFisher 2018b. ELISA formats Verkkodokumentti. < <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>>. Luettu 5.4.2018.

ThermoFisher 2018c. Blocking Buffers for ELISA. Verkkodokumentti. < <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/elisa/elisa-reagents-buffers/blocking-buffers-elisa.html>>. Luettu 5.4.2018.

Tieteen Termipankki 2016. Etiikka. Verkkodokumentti. < <http://tieteentermipankki.fi/wiki/Filosofia:etiikka>>. Luettu 14.4.2018-

The Royal Swedish Academy of Sciences 2009. Two revolutionary optical technologies. Scientific background on the Nobel Prize in physics. Verkkodokumentti. < [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/2009/advanced-physicsprize2009.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2009/advanced-physicsprize2009.pdf) >. Luettu 4.10.2017.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö. Verkkodokumentti. < [www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanto](http://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanto)>. Luettu 5.4.2018.

International Atomic Energy Agency 2015. Live Chart of Nuclides. Nuclear structure and decay data. International Verkkodokumentti. <<https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>>. Luettu 1.10.2017.

Suomen bioanalytikkoliitto 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Verkkodokumentti. <[https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet\\_FI\\_print\\_2017.pdf](https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf)>. Luettu 14.4.2018.

Työterveyslaitos 2018. Allerginen nuha. Verkkodokumentti. < <https://www.ttl.fi/tyontekija/ammattitaudit/allerginen-nuha/>>. Luettu 13.4.2018.

Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelu kunta (ETENE) 2001. Terveydenhuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet. Saatavilla sähköisesti. <<http://etene.fi/documents/1429646/1559098/ETENE-julkaisuja+1+Terveydenhuollon+yhteinen+arvopohja%2C+yhteiset+tavoitteet+ja+periaatteet.pdf/4de20e99-c65a-4002-9e98-79a4941b4468/ETENE-julkaisuja+1+Terveydenhuollon+yhteinen+arvopohja%2C+yhteiset+tavoitteet+ja+periaatteet.pdf>>. Luettu 14.4.2018.

Virtanen, Tuomas – Savolainen, Johannes 2011a. Mitä on allergia? Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti.

Virtanen, Tuomas - Savolainen, Johannes 2011b. IgE-tuotannon säätelystä. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Duodecim. Saatavilla myös sähköisesti.

Virtanen, Tuomas - Savolainen, Johannes 2011c. Allerginen tulehdus. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti: Immunologia. Helsinki. Saatavilla myös sähköisesti.

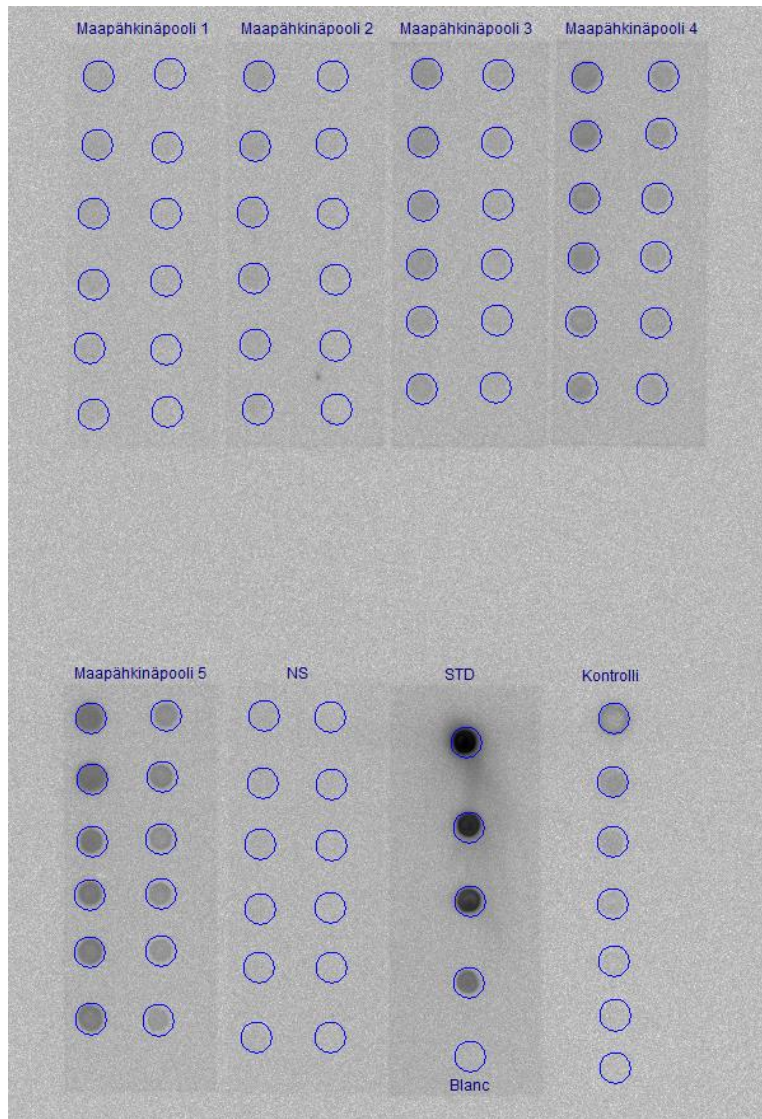
Wikimedia Commons 2016. Elisa Tipus. Muokattu kuva. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Elisa\\_tipus.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Elisa_tipus.gif)>. Otettu käyttöön 3.4.2018.

Wikimedia Commons 2018. The Allergy pathway. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The\\_Allergy\\_Pathway.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_Allergy_Pathway.jpg)>. Otettu käyttöön 2.4.2018.

Wikipedia 2018. The Structure of the IgE Antibody. <[https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin\\_E#/media/File:IgE.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_E#/media/File:IgE.jpg)>. Otettu käyttöön 2.4.2018

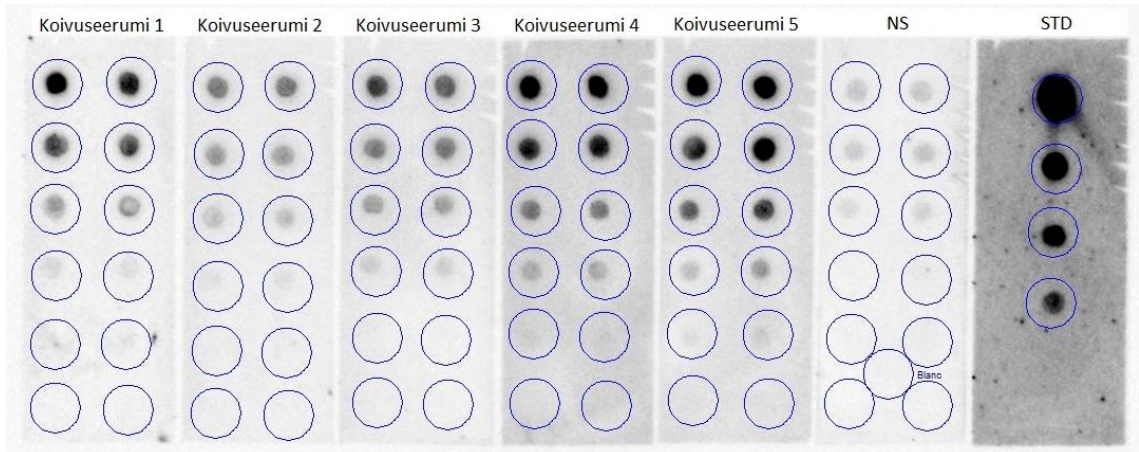
Zaidi, Perveen – Shahid Kamal 1993. Raciloimmunoassay: Principle and Technique. s. 264-267.

## LIITE 1. Kuva Immunospot-tutkimuksesta



Liite 1. Kuvassa ylhäällä vasemmalta oikealle maapähkinäpoolit 1-4. Alhaalla vasemmalta oikealle maapähkinäpooli 5, kielteinen kontrolli, kaupallinen humaanin IgE -standardi sekä sekundäärivasta-aineen kontrolli. Maapähkinäpöleissa ja kielteisessä kontrollissa yhdellä rivillä aina rinnakkaiset näytteet, jotka laimenevat alaspäin suhteessa 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32.. Blanc-näytteen tarkoituksena on vähentää tausta pois tuloksia laskiessa. (Kuva: Krista Saarinen)

## LIITE 2. Kuva nitroselluloosakalvoista kemiluminesenssimenetelmällä



Liite. Koivuspesifisen IgE:n määrittäminen kemiluminesenssimenetelmällä. Vasemmalta oikealla pitoisuudet 15,4, 5,1, 1,24, 0,625, 0,31 kU/l, jonka jälkeen tulee kielteinen kontrolli ja kaupallinen humaani IgE -standardi. Koivuseerumeissa ja kielteisessä kontrollissa yhdellä rivillä aina rinnakkaiset näytteet, jotka laimenevat alaspäin suhteessa 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Blanc-näytteen tarkoituksena on vähentää tausta pois tuloksia laskiessa. (Kuva: Krista Saarinen)

### LIITE 3. Kuva nitroselluloosakalvoista fluoresenssimenetelmällä



Liite 3. Koivuspesifisen IgE:n määrittäminen fluoresenssimenetelmällä. Vasemmalta oikealla pitoisuudet 15,4, 5,1, 1,24, 0,625, 0,31 kU/l, jonka jälkeen tulee kielteinen kontrolli ja kaupallinen humaanin IgE -standardi. Koivuseerumeissa ja kielteisessä kontrollissa yhdellä rivillä aina rinnakkaiset näytteet, jotka laimenevat alaspäin suhteessa 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Blanc-näytteen tarkoituksena on vähentää tausta pois tuloksia laskiessa. (Kuva: Krista Saarine)