

Milja Kivijärvi, Milja Korhonen ja Saimi Ristimella

**SLS-MENETELMÄN JA THE HEMOGLOBIN ASSAY KITIN SOVELTUVUUDEN
TESTAUS HEMOGLOBIININ MÄÄRITTÄMISEEN SYLJESTÄ**

Kvantitatiivinen tutkimus

SLS-MENETELMÄN JA THE HEMOGLOBIN ASSAY KITIN SOVELTUVUUDEN TESTAUS HEMOGLOBIININ MÄÄRITTÄMISEEN SYLJESTÄ

Kvantitatiivinen tutkimus

Milja Kivijärvi, Milja Korhonen ja Saimi
Ristimella
Opinnäytetyö
Syksy 2018
Bioanalytiikka
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikka

Tekijät: Milja Kivijärvi, Milja Korhonen ja Saimi Ristimella

Opinnäytetyön nimi: SLS-menetelmän ja The Hemoglobinin Assay kitin soveltuvuuden testaus he-
moglobiinin määrittämiseen syljestä

Työn ohjaaja: Mika Paldanius

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2018

Sivumäärä: 37 + 5

Tutkijat ennustavat sylkinäytteen nousevan verinäytteen rinnalle sen helppouden ja hyödyllisyyden ansiosta. Sylkinäytteestä löytyy samoja proteiineja, kuin verestä, ja siitä voidaan tutkia myös hormoneja, vasta-aineita, sekä muita rutiinina veren seerumista tutkittavia molekulaarisia komponentteja. Yksi näistä tutkittavista proteiineista on hemoglobiini. Veren, eli myös hemoglobiinin, löytymisen syljestä voi kertoa esimerkiksi ientulehduksesta. Koska veren määrää syljestä ei voi suoraan määrittää, on analytyiksi valittava jokin veren komponentti, kuten hemoglobiini. Opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona ja tarkoituksena oli löytää menetelmä, jolla hemoglobiinin määrää syljessä voitaisiin mitata mahdollisimman tarkasti. Tutkittaviksi menetelmäksi valittiin Sysmex-analysaattorin käytämä SLS-menetelmä ja Sigma-Aldrichin The Hemoglobinin Assay kit.

Tavoitteena oli selvittää, sopiiko SLS-menetelmä hemoglobiinin määrittämiseen syljestä, sekä verrata sen ominaisuuksia The Hemoglobinin Assay kittiin. Tarkoituksena oli saada selville menetelmien soveltuvuus sylkinäytteen analysoimiseen ja testata menetelmien herkkyyttä matalien hemoglobiinin konsentraatioiden suhteen. Tavoitteena oli tuottaa yritykselle tutkimustietoa kolorimetristen menetelmien käytöstä sylkinäytteen analysoimiseen.

Tutkimuksessa analysoitiin veteen liuotettua kaupallista hemoglobiinia, kokoveri- ja sylkinäytteitä, ja niistä saatuja tuloksia verrattiin keskenään.

Tutkimustulostemme mukaan SLS-menetelmällä voidaan mitata sylkinäytteitä. Kuitenkin sen herkkyys ei riitä pienten hemoglobiinin konsentraatioiden mittaamiseen ja syljen matriisivaikutus häiritsee mittausta. The Hemoglobinin Assay on herkempi, kuin SLS-menetelmä, mikä tekee siitä paremman menetelmän sylkinäytteen mittaamiseen.

Asiasanat: Sylki, hemoglobiini, SLS-menetelmä, The Hemoglobinin Assay kit, Sysmex-analysaattori, kolorimetrisen menetelmä

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Biomedical laboratory science

Authors: Milja Kivijärvi, Milja Korhonen and Saimi Ristimella

Title of thesis: Testing the suitability of the SLS-method and The Hemoglobin Assay kit for determination of hemoglobin levels in saliva

Supervisor: Mika Paldanius

Term and year when the thesis was submitted:

Number of pages: 37 + 5

Autumn 2018

Researchers predict that the saliva sample will generalize along with blood sample because of its beneficial and easy features. Saliva contains some of the same proteins as blood. Some of the hormones, anti-bodies and other molecular components that are regularly detected from blood serum can be detected from saliva. One of these proteins is hemoglobin. Finding blood, ergo hemoglobin, can be sign from gingivitis. Because level of blood can't be directly detected from saliva, one component of blood must be chosen to be the analyte. The point of this thesis was to find a method that can be used to define the levels of hemoglobin from saliva sample as exact as possible. The SLS-method used by Sysmex-analyzer and The Hemoglobin Assay kit of Sigma-Aldrich were chosen as examinee methods.

The objective of the research was to find out if the SLS-method is suitable for defining the concentration of saliva hemoglobin levels and compare the features of SLS-method to features of The Hemoglobin Assay kit. The aim was to find out how suitable methods are for detecting hemoglobin levels of saliva samples and check the sensitivity of methods to use in detecting low concentration of hemoglobin from saliva sample. The objective of the study was to produce research data about using colorimetric methods to detect hemoglobin level in saliva.

Results from Sysmex-analyzer, spectrophotometer and ELISA-multichannel spectrophotometer were used as a research material. Commercial hemoglobin dissolved in water, blood and saliva were used as specimens in the study. The results from these were compared.

According to the study SLS-method can be used to detect hemoglobin levels of saliva. However, the sensitivity of the SLS-method is not good enough, so the small levels of hemoglobin can't be analyzed with it. The SLS-method was also more disturb by the impact of matrix of the saliva. The sensitivity of The Hemoglobin Assay kit is more accurate and so it's more suitable for detecting the hemoglobin levels of saliva.

Keywords: Hemoglobin, saliva, SLS-method, The Hemoglobin Assay kit, Sysmex-analyzer, colorimetric method

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	SYLKI	7
2.1	Sykinäytteiden keräys.....	8
2.2	Sykinäytteen analysoiminen	9
3	HEMOGLOBIINI	11
3.1	Hemoglobiini syljessä.....	11
4	TUTKIMUSMENETELMÄT	12
4.1	Sysmex-analysaattori	12
4.2	SLS-menetelmä.....	12
4.3	SLS-menetelmään käytettävät reagenssit.....	13
4.4	The Hemoglobin Assay kit.....	13
5	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	15
6	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS.....	16
6.1	Tutkimusnäytteet.....	16
6.2	Menetelmien toimivuuksien testaus.....	17
6.3	Menetelmien herkkyysien testaus.....	17
6.4	Syljen matriisivaikutus tutkimuksessa.....	18
6.5	Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi	19
7	TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY	20
7.1	SLS-menetelmän toimivuus.....	20
7.2	The Hemoglobin Assay kitin toimivuus	21
7.3	Menetelmien herkkyysien testaus.....	22
7.4	Menetelmien vertailu	23
7.4.1	Kaupallisen hemoglobiinin ja kokoveren vertailu tuloksissa	23
7.4.2	Syljen matriisivaikutus.....	27
7.5	Johtopäätökset.....	30
7.5.1	SLS-menetelmän sopivuus sykinäytteen mittaukseen	30
7.5.2	Menetelmien vertailu	30
8	POHDINTA	32
8.1	Mahdolliset mittausvirheet ja haasteet.....	33
	LÄHTEET.....	35
	LIITTEET	38

1 JOHDANTO

Tilaustyönä tehdyssä opinnäytetyössä tarkoituksena oli löytää menetelmä, jolla voidaan mitata veren määrää syljestä. Veren määrää itsessään ei voi mitata, joten verestä täytyy valita jokin komponentti, jonka avulla veren määrää voidaan selvittää. Määritettäväksi komponentiksi valittiin hemoglobiini, sillä suurin osa veren punasoluista koostuu hemoglobiinista. Tutkimusmenetelmäksi valikoitui Sysmex verenkuvan analysaattorin käyttämä SLS-menetelmä, joka suoritettiin spektrofotometrin avulla. Tarkoituksenamme oli tuottaa tutkimusmateriaalia opinnäytetyön tilaajan käyttöön.

Kvantitatiivisessa tutkimuksessamme selvitetään SLS-menetelmän ja Sigma-Aldrichin yhtiön The Hemoglobin Assay kitin soveltuvuutta ja menetelmien ominaisuuksia hemoglobiinin mittaukseen sylkinäytteestä. Vertasimme molempien menetelmien soveltuvuutta sylkinäytteen analysoimiseen, sillä kumpaakaan menetelmää ei ole validoitu sylkinäytteen tutkimiseen. Tavoitteenamme oli myös testata menetelmien herkkyyttä matalien hemoglobiinipitoisuuksien suhteen ja päästä mahdollisimman alhaisiin määritettäviin pitoisuuksiin. Määritimme tutkittaville näytteille tavoitearvot ja vertasimme tuloksia niihin. Selvitimme syljen matriisivaikutusta kyseisten mittausmenetelmien suhteen. Tutkimismateriaalinamme toimivat sylki- ja verinäytteet, sekä veteen liuotettu kaupallinen hemoglobiini.

Henkilökohtainen tavoitteemme oli kehittää ammattitaitoamme menetelmätestauksessa ja näytteiden analysoinnissa, sekä kehittää itsenäistä tutkimustyön toteuttamista. Tarkoituksenamme oli tuottaa tutkimusmateriaalia opinnäytetyön tilaajan käyttöön. Tavoitteenamme oli myös tuottaa tietoa hemoglobiinin mittauksesta syljestä ja syljestä näytemateriaalina. Aihe on ajankohtainen, sillä vastaavanlaista tutkimustietoa löytyy vähän, varsinkin suomeksi, ja sylkinäytteen suosio verinäytteen rinnalla kasvaa.

Opinnäytetyötämme ohjasivat lehtori Paula Reponen, erikoistutkija Marja Nissinen, projektisuunnittelija Niina Torniainen ja yliopettaja Mika Paldanius. Opinnäytetyöprosessin apuna olivat myös vertaisarvioijat.

2 SYLKI

Sylki koostuu pääosin vedestä, joka sisältää erilaisia epäorgaanisia suoloja (esimerkiksi kalsium, fosfaatti ja fluori), pieniä määriä proteiineja eli valkuaisaineita ja hiukan lipidejä eli rasva-aineita. Syljessä ei siis luonnostaan ole verta, eikä tällöin myöskään hemoglobiinia. Vuorokauden aikana sylkirauhaset erittävät noin 0,5-1 litraa sylkeä. Pääosa syljestä erittyy suurista sylkirauhasista. Suuria sylkirauhasia on kolme paria. Korvan edessä sijaitsevat korvasylkirauhaset eli parotisrauhaset, suun pohjassa leuanalussylkirauhaset eli submandibulaarirauhaset ja kielenalussylkirauhaset eli sublinguaalirauhaset. Pieniä sylkirauhasia on kaikkialla ylähengitysteiden limakalvojen alueella, eniten suulaessa ja alahuulen sisäpinnalla. Pienet sylkirauhaset, kuten myös kielen- ja leuanalussylkirauhaset toimivat jatkuvasti kostuttaen suuta ja liukastaen kieltä, kun taas korvasylkirauhaset erittävät sylkeä runsaammin vasta ruokailtaessa. (Honkala 2015, viitattu 17.9.2018.)

Sylki kostuttaa suuontelon limakalvoja, tuhoaa bakteereita ja neutraloi suuontelon happamuutta ruokailun jälkeen. Osa sylkirauhasten soluista tuottaa vetistä sylkeä ja osa limaista sylkeä. Syljen eritystä säätelee autonominen hermasto. Autonominen hermasto sopeuttaa elimistön toimimaan eri tilanteissa. Nimensä mukaisesti autonominen hermasto toimii automaattisesti ja tahdosta riippumatta. Se ei kuitenkaan ole täysin itsenäinen, vaan sen toimintaa säätelee väliaivoissa sijaitseva hypothalamus. Autonominen hermasto jaetaan parasympaattiseen ja sympaattiseen hermostoon. Parasympaattinen hermasto on lepotilan hermasto. Se hillitsee verenkiertoelimistön toimintaa muun muassa laskemalla sykettä ja verenpainetta. Parasympaattinen hermasto lisää vetisen, eli seroosin syljen eritystä. Vetinen sylki sisältää hiilihydraatteja pilkkovaa amylaasientsyymiä. Sympaattinen hermasto on aktiivisen kehon hermasto. Se toimii esimerkiksi urheilusuorituksen aikana, tai silloin kun ihminen on peloissaan. Sympaattinen hermasto säätelee verenpainetta ja kehon sisäistä lämpötilaa. Se saa aikaan limaisen syljen erityksen. Limainen sylki helpottaa ruoan nielemistä. Sylkinäytteen koostumus siis vaihtelee huomattavan paljon riippuen eritykseen vaikuttavista tekijöistä ja mahdollisesti myös vuorokaudenajasta ja tämän takia näytteenotto tulee olla mahdollisimman tarkoin vakioitua. (Vierimaa & Laurila 2014, 152, 279-282.)

2.1 Sylkinäytteiden keräys

Sylkinäytteen keräämiseen on erilaisia tapoja ja usein asiakkaalle annetaan valmis paketti, jolla sylkinäyte kerätään. Sylkinäytepakkauksia valmistava Salimetrics suosittelee Passive Drool-tekniikkaa, koska se on edullinen, näytteen puhtaus on korkea ja tekniikalla annettua näytettä voidaan ajaa useimmilla analysointilaitteilla. Monien tutkimusten mukaan Passive Drool-tekniikka on syljen keräykseen ja tutkimukseen paras mahdollinen tapa, sillä sen avulla voidaan kerätä kaikkein laadukkaimmat ja puhtaimmat näytteet. Passive Drool-tekniikassa syljen annetaan kertyä suuhun ja valutetaan sylki Salimetricsin kehittämään näytepakkaukseen. Näytepakkauksessa on suukappale ja näyteputki. Ne kaksi yhdistetään ja huulet asetetaan suukappaleen ympärille tiiviisti. Suuhun kertyneen syljen annetaan valua suukappaleen kautta putkeen. Jos Passive Drool-tekniikka ei onnistu, suosittelee Salimetrics SalivaBio Oral Swab-tekniikkaa, jossa asiakas laittaa suuhunsa vanutukon ja antaa vanutukon vettyä syljestä. (Salimetrics® 2018, viitattu 17.9.2018.)

Japanilaisessa tutkimuksessa vuodelta 2016 sylkinäytteet kerättiin hyödyntämällä purukumia. Purukumin tarkoitus on lisätä syljen muodostumista suussa. Testattaville henkilöille annettiin purukumia, joka oli standardoidun kokoinen, hajuton ja mauton. Koehenkilöt purivat purukumia viisi minuuttia, jonka jälkeen suuhun kertynyt sylkinäyte kerättiin talteen. (Yamada, Okada, Murata, Uetani, Kotoh, Nishitsuji, Yabuki, Fukuzawa, Yoshino, Kubo, Abe, One, Nagai, Yajima, Nomura, Hanada, 2016, viitattu 2.12.2018)

Eräissä korealaisessa tutkimuksessa vuodelta 2016 käytettiin purukumin sijasta mautonta parafinia, jota koehenkilöt purivat suussaan ensin minuutin ajan, jonka jälkeen he nielaisivat suuhun kertyneen syljen. Sen jälkeen he jatkoivat parafiinin puremista viiden minuutin ajan, jonka jälkeen suuhun kertynyt sylki kerättiin talteen. Sylkinäytteen keräys suoritettiin, kun oli kulunut vähintään tunti syömisestä, tupakoinnista, hampaiden pesusta ja juomisesta. (Maeng, Kim, Jung, Jung, Kim, Kim, 2016, viitattu 1.12.2018)

Huslabin syljen kortisoli-tutkimuksessa ohjeistetaan asiakasta välttämään syömistä ja hampaiden pesua yksi tunti ennen näytteenottoa. Syljen erityistä lisääviä aineita ei saa käyttää. Suu voidaan huuhdella puhtaalla vedellä ennen sylkinäytteen keräystä. Huslabin ohjeessa sylkinäyte kerätään vanutukon avulla. Vanutukon annetaan olla suussa ja kerätä itsensä täyteen sylkeä, jonka jälkeen se suljetaan näyteputkeen. (Huslab 2017, viitattu 17.9.2018.)

Opinnäytetyöhön kerätyt sylkinäytteet on kerätty Marja Nissisen ja Niina Torniaisen kehittämällä ohjeella (LIITE 1.). Ohjeen mukaan syljen annetaan kertyä suuhun yhden minuutin ajan ja nielaitaan. Tämän jälkeen syljen annetaan kertyä suuhun viiden minuutin ajan, josta viimeiset 30 sekuntia kertynyttä sylkeä purskutellaan ympäri suuta ja ikeniä. Kertynyt sylki syljetään kannelliseen putkeen.

2.2 Sylkinäytteen analysoiminen

Ennustetaan, että syljen analysoiminen tulee yleistymään ja nousemaan verinäytteen analysoimisen rinnalle, sillä siitä voidaan tutkia monia samoja asioita kuin verestä. Sylkinäytteen ottamista pidetään turvallisempana, helpompana ja halvempaan keinona, kuin verikokeen ottamista, varsinkin lapsilta ja vanhuksilta. Syljestä voidaan tehdä erilaisia määrytyksiä raskaudesta erilaisiin kemikaaleihin, kuten alkoholiin. Siitä voidaan havaita myös useita eri proteiineja, kuten hemoglobiinia. Syljestä on onnistuttu havaitsemaan 102 proteiinia, joista 67 on samoja, joita veren seerumissa esiintyy. Sylki sisältää myös hormoneja, vasta-aineita ja muita molekulaarisia komponentteja, joita mitataan myös rutiinina verestä. Sylkinäyte on helppo kerätä, eikä sen keräämiseen liity samoja riskejä, kuin verinäytteenottoon. (Tiwari, 2011, viitattu 2.12.2018)

Hemoglobiinin mittauksesta syljestä löytyy useita tutkimuksia. Yleensä mittausta käytetään ientulehduksen diagnostiikkaan. Hemoglobiinin määrää syljessä voidaan pitää veren määrän mittarina, koska suurin osa verestä on punasoluja, jotka koostuvat pääosin hemoglobiinista. Hemoglobiinin mittaukseen syljestä on monia tapoja. Voidaan käyttää esimerkiksi vasta-aineisiin perustuvia menetelmiä tai mitata itse hemoglobiiniproteiinia kolorimetrisesti. (Happonen, Holopainen, Sariola, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen & Venäläinen 2012. 66; Eskelinen 2016; Dutta & Goodsell 2003, viitattu 17.9.2018)

Tutkimuksessamme käytetyt menetelmät, SLS-menetelmä ja The Hemoglobin Assay kit, ovat molemmat kolometrisiä, eli niissä mitataan tietyllä aallonpituudella hemoglobiinille kemiallisessa reaktiossa muodostunutta värillistä komponenttia. Kumpaakaan menetelmää ei ole validoitu syljen analysoimiseen. SLS-menetelmää hemoglobiinin määrittämiseen käyttävä Sysmex-analysointilaitteisto voidaan myös vakioida kokoveren lisäksi mittaamaan pleura-, askiitti-, aivo-selkäydin- ja nivelnesteitä.

The Hemoglobin Assay kitillä voidaan mitata hemoglobiinin määrää kokoveressä, plasmassa, seerumissa ja virtsassa. Sysmex ilmoittaa mittausalueen alarajaksi 0 g/L ja The Hemoglobin Assay kitin alarajaksi on määritetty 0,009 mg/ml. Molemmat menetelmät ovat kolorimetrisiä, eli ne mittaavat hemoglobiiniproteiinista muokatun värillisen yhdisteen absorbanssia tietyllä aallonpituudella. SLS-menetelmässä käytetään aallonpituutta 555nm ja The Hemoglobin Assay kitissä 400nm. Tutkimuksessamme testaamme sylkinäytteen soveltuvuutta molemmille menetelmille ja yritämme saada mahdollisimman pieniä hemoglobiinimääriä mitattua. (Sysmex Corporation 2014, viitattu 4.10.2018; Sigma-Aldrich 2018, viitattu 3.10.2018)

3 HEMOGLOBIINI

Hemoglobiini eli verenpuna on pallomainen, halkaisijaltaan noin 5,5nm kokoinen, happea sitova proteiini veren punasoluissa. Se sitoo happea veren kiertäessä keuhkoissa ja luovuttaa sitä muissa kudoksissa. Hemoglobiini kuljettaa myös hieman hiilidioksidia kudoksista pois. Hemoglobiinin mitausta käytetään yleisesti anemian diagnosoimisessa ja tukena muiden tautien selvittelyssä. Hemoglobiiniarvo on alentunut anemioissa, jotka voivat syntyä monella tapaa. Punasolujen proteiineista noin 95% on hemoglobiinia. (Happonen, Holopainen, Sariola, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen & Venäläinen 2012. 66; Eskelinen 2016; Dutta & Goodsell 2003, viitattu 17.9.2018.)

Hemoglobiinimolekyylit rakentuu globiiniproteiineista, joka on muodostunut neljästä aminohappoketjusta ja neljästä hemiryhmästä, joissa jokaisessa on keskellä rauta-atomi. Jokainen rauta-atomi pystyy sitomaan yhden happimolekyylin. Hemoglobiinin väri riippuu siihen sitoutuneiden happimolekyylien määrästä. Hemoglobiini on sitä punaisempaa mitä enemmän siihen on sitoutunut happea. (Happonen, Holopainen, Sariola, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen & Venäläinen 2012. 66.)

3.1 Hemoglobiini syljessä

lentulehdus on tila, joka syntyy plakin, eli bakteeripeitteiden, kertyessä hampaiden pinnalle ja ienrajaan. Bakteeripeitteet ärsyttävät ienkudosta ja aiheuttavat sen tulehtumisen. lentulehdus on ien-, eli kiinnityskudossairauksien varhaismuoto. lentulehduksessa veri pakkautuu ikeniin aiheuttaen niiden turpoamisen ja punoituksen. Ien vuotaa tästä syystä herkästi verta. Hampaiden puhdistuksen yhteydessä verta vuotavat ikenet ovat merkki ientulehduksesta. (Könönen 2016; Hiiri 2015, viitattu 10.9.2018.)

Terveen ihmisen ikenet eivät vuoda verta. Mitatessa veren määrää syljessä, on hemoglobiinin mittaaminen perusteltua, sillä suurin osa punasoluista on hemoglobiinia ja se säilyy punasoluja paremmin, sekä kestää esimerkiksi pakastamisen, mikä on sylkinäytteiden käsittelylle olennainen osa viskositeetin poistamiseksi (Salimetrics 2018, viitattu 11.10.2018).

4 TUTKIMUSMENETELMÄT

4.1 Sysmex-analysaattori

Sysmex on hematologian laboratorioiden käyttämä analysaattori, jonka avulla saadaan tulokset verenkuva-analyysiin. Verenkuva on terveydenhuollon käytetyimpiä laboratoriotutkimuksia Suomessa. Sysmex-verensoluautomaattia käytetään mittaamaan verensolujen; erytrosyyttien ja trombosyyttien määrää ja kokoa, sekä leukosyyttien määrää ja niiden erittelylaskentaa. Erytrosyyteistä eli punasoluista voidaan analysoida myös niiden koko (MCV), koon vaihtelu (RDW) sekä solujen hemoglobiinipitoisuus (Hb). Laskennallisia arvoja ovat punasolujen keskimassa (E-MCH), punasolujen keskikonsentraatio (MCHC) ja hematokriitti (B-Hkr). (Helin 2016, viitattu 4.10.2018).

Sysmex-analysaattori on helppokäyttöinen ja se antaa tulosteessa sirontagrammin ja kolme histogrammia. Sirontagrammissa veren leukosyytit on eroteltu niiden koon ja värjäytyvyyden mukaan käyttämällä virtaussytometriaa. Histogrammiin on lajiteltu erytrosyytit, leukosyytit sekä trombosyytit niiden koon mukaan. (Sysmex Corporation 2014, viitattu 4.10.2018.)

4.2 SLS-menetelmä

Hemoglobiinimittauksessa käytetään usein kolorimetristä ja syanidivapaata SLS-hemoglobiini-määritysmenetelmää, jossa SLS-hemoglobiinia mitataan. SLS-reagenssin koostumus sisältää hydrofiilisen ja hydrofobisen ryhmän. Cellpack-reagenssilla laimennettuun näytteeseen lisätään Sulfolyser-reagenssia, joka hajottaa leukosyytit ja erytrosyytit näytteestä, jolloin hemoglobiini vapautuu. Sulfolyser aloittaa myös hemoglobiinimolekyylin muokkauksen, jolloin hydrofiilinen osa reagenssista hapettaa hemi-ryhmän sitoutumalla siihen muodostaen SLS-hemoglobiinia. Lopullinen tuote on värjätty yhdistelmä, joka voidaan analysoida fotometrisellä menetelmällä mitaten diluentin, eli Cellpack-reagenssin, johon näyte on laimennettu, ja näytteen välistä absorbanssieroa fotometrillä. (Sysmex-Europe 2018, viitattu 4.10.2018.)

Sysmex-analysaattori käyttää SLS-menetelmää hemoglobiinin mittaamiseen. Analysaattori laimentaa 4µl kokoverinäytettä 2ml:an Cellpack-liuosta. Tämän jälkeen, kun Sysmex-analysaattori

on mitannut erytrosyyttien ja trombosyyttien määrän, näytteeseen lisätään 0.5ml Sulfolyser-reagenssia, joka hajottaa leukosyytit ja erytrosyytit näytteestä. Seuraavaksi laite aloittaa hemoglobiinimolekyylin muokkauksen, jolloin hydrofiilinen osa reagenssia hapettaa hemi-ryhmän sitoutumalla siihen muodostaen SLS-hemoglobiinia. Lopullinen tuote on vakaa ja värjätty yhdistelmä. Muodostuvaa SLS-hemoglobiinia analysaattori mittaa kolorimetrisesti aallonpituudella 555nm. (Sysmex-europe 2018, viitattu 4.10.2018.)

4.3 SLS-menetelmään käytettävät reagenssit

Cellpack-reagenssia käytetään kokoveren laimentimena Sysmex -analysointilaitteissa ja se ostetaan käyttövalmiina. Cellpack sisältää natriumkloridia 0,64%, boorihappoa 0,10%, natriumtetraboraattia 0,02% ja EDTA 2K:ta 0,02%. (Sysmex 2015, viitattu 5.10.2018.)

Sulfolyser-reagenssia käytetään hemoglobiinimäärityksessä Sysmex analysointilaitteissa ja se on käyttövalmis reagenssi. Se koostuu syanidivapaasta Natrium-Lauryl-Sulfaatista (0,17%), joka hajottaa erytrosyytit sekä muodostaa hemoglobiinista värjätyä hemiryhmän. (Sysmex 2016, viitattu 5.10.2018.)

4.4 The Hemoglobin Assay kit

Toiseksi menetelmäksemme saimme yritykseltä Sigma-Aldrich-yhtiön The Hemoglobin Assay kitin. Se tarjoaa yksinkertaisen ja suoran menetelmän mitata hemoglobiinia useista eri näytemuodoista, kuten veri, plasma ja virtsa. Tässä menetelmässä määrittäminen perustuu edistyneeseen Triton/NaOH-menetelmään, jossa hemoglobiini muunnetaan kolorimetriseksi tuotteeksi, jota on mahdollista mitata aallonpituudella 400nm. Tämän menetelmän lineaarinen mittausalue 96-kaivoisella kuoppalevyllä on valmistajan mukaan 0.009-2 mg/ml. Näytetilavuus yhteensä on 250µl, josta 50µl on tutkittavaa näytettä ja 200µl reagenssia. Kitissä on mukana kalibraattoriliuos, jonka ohjeen mukainen laimennos vastaa konsentraatioltaan 1mg/ml. (Sigma-Aldrich 2018, viitattu 3.10.2018.)

Kitin näytteiden analysoinnissa käytetään fotometristä ELISA-kuoppalevylukijaa. Näytteet ja reagenssit pipetoidaan suoraan kuoppalevylle ja inkuboidaan 5 minuuttia huoneenlämmössä. Näytteen absorbanssi mitataan 405 nm aallonpituudella ELISA-kuoppalevylukijalla. Kokoverta analysoitaessa veri täytyy laimentaa, mutta plasmaa, seerumia ja virtsaa saa käyttää ilman laimentamista ja näin toimitaan myös sylkinäytettä analysoitaessa. Näytettä ja reagensseja pipetoidaan kuoppalevylle ja näytteiden absorbanssi mitataan aallonpituudella 400nm. Sylki analysoidaan samalla tavoin kuin muutkin näytemuodot. (Sigma-Aldrich 2018, viitattu 3.10.2018.)

5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Tutkimusongelmat johdetaan oman työn teoreettisesta viitekehystä. Tutkimusongelmat ovat kysymyksiä, joihin tutkimuksella pyritään vastaamaan (Soininen 1995, 64).

Tutkimusongelmat ovat:

1. Selvittää, onko SLS-menetelmä sopiva hemoglobiinikonsentraation määrittämiseksi sylkinäytteestä,
2. Vertailla hemoglobiinin mittauksessa käytettyyn SLS-menetelmän ja The Hemoglobin Assay kitin ominaisuuksia keskenään.

Tutkimuksemme tavoitteena oli selvittää, onko Sysmex-analysaattorin käyttämä SLS-menetelmä ominaisuuksiltaan sopiva hemoglobiinin mittaamiseen sylkinäytteestä. Tutkimuksessa SLS-menetelmän ominaisuuksia verrattiin Sigma-Aldrich The Hemoglobin Assay kitin ominaisuuksiin. Menetelmien vertailtavia ominaisuuksia olivat kyky mitata hemoglobiinia verestä, kaupallisesta hemoglobiinista valmistetusta liuksesta ja syljestä. Tarkoituksena oli selvittää myös menetelmän herkkyyttä mittausalueen alarajoilla, sekä yleinen menetelmän suoritettavuus. Tutkimuksen tavoitteena oli määritellä menetelmien mahdollisuudet sylkinäytteen analysointia varten, sekä havainnoida menetelmien käytettävyyttä. Näiden tulosten pohjalta tutkimuksella pyritään selvittämään SLS-menetelmän ominaisuuksien sopivuus ja vertailla sitä Sigma-Aldrichin The Hemoglobin Assay kitin ominaisuuksiin.

6 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Tutkimus aloitettiin selvittämällä, voiko spektrometriä käyttää SLS-menetelmän toteuttamiseen. Tutkimuksessa käytetyn The Hemoglobiin Assay kitin reagenssien toimivuus testattiin myös. Kun menetelmät oltiin todettu toimiviksi, lähdettiin selvittämään kuinka herkkiä menetelmät ovat. Herkkyydet määriteltiin tekemällä mittauksia useilla erivahvuisilla konsentraatioilla, jolloin voitiin päätellä milloin tulokset eivät enää ole lineaarisia. Tämän jälkeen selvitettiin menetelmien toimivuutta sylkinäytteellä hyödyntämällä herkkyysmittauksista saatuja tuloksia. Sylkinäytettä käsiteltiin samoin kuin verilaimennoksia ja kaupallisen hemoglobiinin laimennoksia. Syljen matriisivaikutuksen aiheuttamia muutoksia verrattiin aiempiin mittauksiin. Suoritetuilla mittauksilla pyrittiin tuottamaan tietoa, josta saadaan selville, sopiiko SLS-menetelmä ominaisuuksiltaan syljen hemoglobiinin määrittämiseen. Tuotetun tiedon pohjalta SLS-menetelmän ominaisuuksia verrattiin The Hemoglobiin Assay kitin ominaisuuksiin. Kaikki tutkimuksessa käytetyt välineet ovat Oulun ammattikorkeakoulun.

6.1 Tutkimusnäytteet

Tutkimuksessa käytettiin kokoveri- ja sylkinäytteitä, sekä veteen liuotettua kaupallista hemoglobiinia. Veri- ja sylkinäytteet otettiin tutkimuksen suorittajilta. Verinäytteet otettiin vakioidun suoniverinäytteenotto-ohjeen mukaisesti. Sylkinäytteissä hyödynnettiin Marja Nissisen ja Niina Torniaisen kehittämää sylkinäytteenotto-ohjetta (*LIITE 3*). Kaikki tutkimuksessa hyödynnetyt veri- ja sylkinäytteet otettiin samalla tavalla, jotta voitiin taata niiden vertailukelpoisuus.

Tutkimuksessa käytetty kaupallinen hemoglobiiniiliuos on valmistettu liuottamalla se haluttuun määrään vettä, jotta saadaan haluttu konsentraatio. Mittauksissa käytetyt sylkinäytteet on valmistettu lisäämällä niihin mahdollisimman väkevää kaupallista hemoglobiiniiliuosta tietyn hemoglobiini-konsentraation saavuttamiseksi.

Tutkimuksessa käytetyt sylkinäytteet otettiin sylkinäyteastian, jotka saatiin Oulun ammattikorkeakoululta. Ennen näytteenottoa pidettiin vähintään tunnin tauon ruokailemisesta, mahdollisten ruokakontaminaatioiden välttämiseksi. Näytteenotto aloitettiin huuhtelemalla suu hanavedellä. Huuhtelun jälkeen syljen annettiin kertyä suuhun yhden minuutin ajan. Suuhun minuutin aikana kertynyt

sylki nielaistiin tai syljettiin pois. Tämän jälkeen syljen annettiin kertyä suuhun 5 minuutin ajan. Syljen kerryttämisestä viimeiset 30 sekuntia sylkeä purskuteltiin ikeniä vasten. Sylki valutettiin näyteastian pohjalle sisemmän putken pohjassa olevan reiän läpi. Näin syljen vaahtoamista saatiin vähennettyä. Tämän jälkeen näytteet pakastettiin, jotta sylki olisi helpompaa analysoida. Näytteet sulatettiin huoneenlämmössä ennen analysointia.

6.2 Menetelmien toimivuuksien testaus

SLS-menetelmän toimivuus testattiin vertaamalla spektrofotometrillä mitattuja tuloksia Sysmex-analysaattorista saatuihin tuloksiin. SLS-menetelmän toimivuuden testaus toteutettiin mittaussuunnitelman mukaisesti (*LIITE 1.*). Analysoitavat näytteet olivat kaupallisesta hemoglobiinista valmistetut liuokset 20 mg/ml ja kaksi eri kokoverinäytettä.

ELISA-kuoppalevykijalla The Hemoglobin Assay kitillä saatuja tuloksia vertasimme sekä Sysmex-analysaattorin antamaan tulokseen, että SLS-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Näin pystyttiin vertailemaan kaikista kolmesta analyysistä saatuja tuloksia luotettavasti. The Hemoglobin Assay kitin testaus suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (liite 2.). Koska The Hemoglobin Assay kitin mittausalue on 0,009-2 mg/ml näytteet laimennettiin 1:10. Verinäytteet laimennettiin veteen ja sylkinäytteet sylkeen. Laimennos otettiin huomioon muuttaessa absorbanssia hemoglobiinikonsentraatioksi valmistajan laskukaavan avulla (*LIITE 2.*). The Hemoglobin Assay kitin toimivuus testattiin kaupallisesta hemoglobiinista valmistetuilla liuoksilla, joiden konsentraatiot olivat 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml ja 20 mg/ml.

6.3 Menetelmien herkkyysien testaus

Molempien menetelmien herkkyudet pyrittiin selvittämään valmistamalla eri vahvuisia konsentraatioita veteen liuotetusta kaupallisesta hemoglobiinista ja kokoverestä. Molemmille menetelmille tehtiin liuokset 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml 15 mg/ml ja 20 mg/ml kaupallisesta

hemoglobiinista. Lisäksi The Hemoglobin Assay kitin herkkyysrajoja testattiin myös kaupallisen hemoglobiinin laimennoksilla 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml ja 0,1 mg/ml, koska kitin herkkyys tulisi olla suurempi kuin SLS-menetelmän. SLS-menetelmällä ei tehty kyseisiä laimennoksia, sillä se ei antanut luotettavia tuloksia suuremmissa konsentraatioissa.

Sigma-Aldrichin The Hemoglobin Assay kitin herkkyysmittaukset toteutettiin kitin valmistajan ohjeiden mukaisesti (*LIITE 2.*). Näytteet laimennettiin suhteessa 1:10, koska niiden laimentamaton pitoisuus ylitti kitin mittausalueen, 0,009-2 mg/ml. Laimennos otettiin huomioon muutettaessa absorbanssiarvoa konsentraatioksi. SLS-menetelmän herkkyys testaus toteutettiin mittaussuunnitelman mukaan (*LIITE 1.*).

6.4 Syljen matriisivaikutus tutkimuksessa

Matriisivaikutus tarkoittaa efektiä, jossa näytteen komponentit häiritsevät analyysin mittausta näytteestä (Dolan, 2013, viitattu 1.12.2018). Tutkimuksessa testattiin sylkinäytteen matriisivaikutus liuottamalla kaupallista hemoglobiinia ja kokoverta sylkinäytteisiin. Molemmilla menetelmillä tehtiin mittaukset sylkinäytteeseen laimennetulla kaupallisella hemoglobiinilla ja sylkinäytteeseen laimennetulla kokoverellä. Näitä laimennoksia tehtiin kummastakin näytemuodosta neljä, niin että ne sisältyivät molempien menetelmien luotettavalle mittausalueelle. Menetelmien toimivuus sylkinäytteen analysoimisessa testattiin siis sekä sylkeen laimennetulla hemoglobiinilla, että sylkeen laimennetulla kokoverellä, joista kummastakin tehtiin konsentraatiot 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml ja 20 mg/ml. Jokaisesta laimennoksesta tehtiin rinnakkaiset näytteet. Useammalla mittauksella tuloksiin saatiin toistettavuutta ja selvitettiin syljen vaikutusta tuloksiin monipuolisemmin. Sylkinäytteet mitattiin kuten aiemmissa mittauksissa mitatut näytteet. SLS-menetelmällä sylkinäytteet mitattiin mittaussuunnitelman mukaan (*LIITE 1.*).

The Hemoglobin Assay kitillä suuria hemoglobiinkonsentraatioita ei voida suoraan mitata, vaan ne ensin laimennetaan näytteen konsentraatiosta riippuen. Koska mitattavien sylkinäytteiden konsentraatiot ovat niin suuria, ettei niitä voida mitata suoraan laimentamattomasta näytteestä, täytyi sylkinäytteet laimentaa. Sylkinäytteet laimennettiin, kuten Sigma-Aldrich The Hemoglobin Assay kitin aiemmissa mittauksissa mitatut näytteet on laimennettu, eli suhteessa 1:10. Laimennos otettiin

huomioon absorbanssiarvoa muutettaessa hemoglobiinikonsentraatioksi (*LIITE 2.*). Sylkitutkimuksissa näyte laimennettiin veden sijasta sylkeen.

6.5 Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi

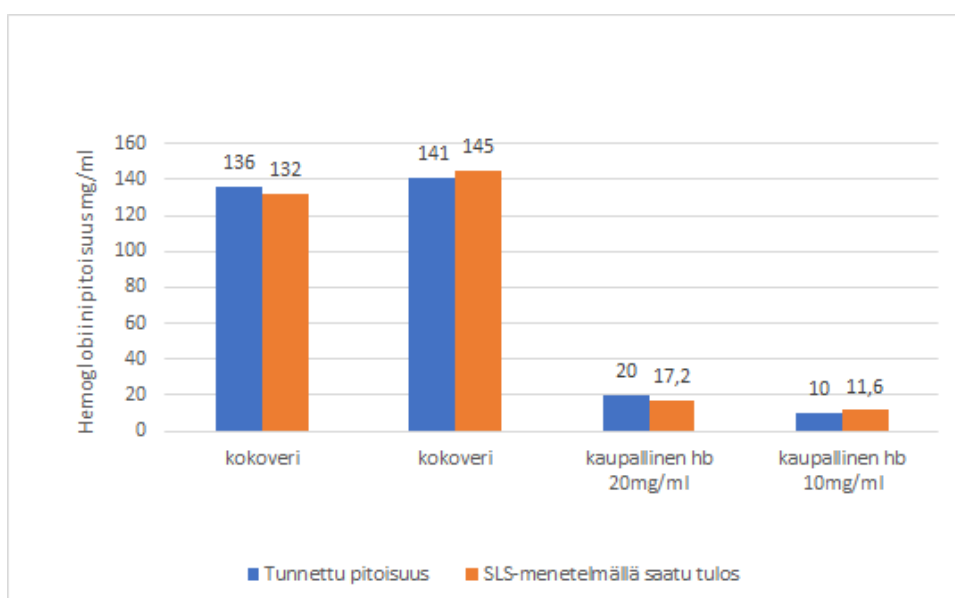
Tutkimusaineistona opinnäytetyössä käytettiin mittauksista saatuja kvantitatiivisia tuloksia. Tuloksemme koostuivat lähinnä spektrofotometrillä ja ELISA-kuoppalevynlukijalla saaduista absorbanseista, jotka muutettiin helpommin ymmärrettäviksi konsentraatioarvoiksi. Tulokset kirjattiin taulukoihin ja niiden pohjalta tehtiin kuvaajia helpottamaan tulosten luettavuutta ja selkeyttämään niitä. Tulokset kirjattiin Microsoft Office Excel -taulukointiohjelmaan, jossa tuloksista tehtiin kuvaajia helpottamaan luettavuutta. Saatujen tulosten perusteella pystyttiin tekemään johtopäätöksiä menetelmien toimivuudesta, mittausalueista ja vertailemaan menetelmien ominaisuuksia.

7 TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

7.1 SLS-menetelmän toimivuus

SLS-menetelmän toimivuuden toteamiseksi mittasimme kahden verinäytteen hemoglobiinipitoisuuden aluksi Sysmex-analysaattorilla ja sen jälkeen SLS-menetelmän avulla. Teimme myös kaupallisesta hemoglobiinista konsentraatioiltaan 10 mg/ml ja 20 mg/ml olevat liuokset, joiden konsentraatiot mittasimme SLS-menetelmän avulla. Näitä tuloksia vertailtiin keskenään.

KAAVIO 1. SLS-menetelmän toimivuus



Kaaviossa 1 kokoverianalyysien kohdalla näkyy sinisillä pylväillä ilmaistuna Sysmex-analysaattorilla saatu hemoglobiinitulos, joka toimii tavoitearvona. Oransseilla pylväillä ilmoitetaan SLS-menetelmällä saatu tulos. Kaupallisen hemoglobiinin kohdalla sinisellä palkilla ilmaistaan tavoitearvona, joissa kaupallinen hemoglobiini on liuotettu veteen siten, että on päästy tavoitteessa olevaan konsentraatioon. Oransseilla palkeilla kaupallisten hemoglobiinien kohdalla ilmoitetaan SLS-menetelmällä saatu tulos.

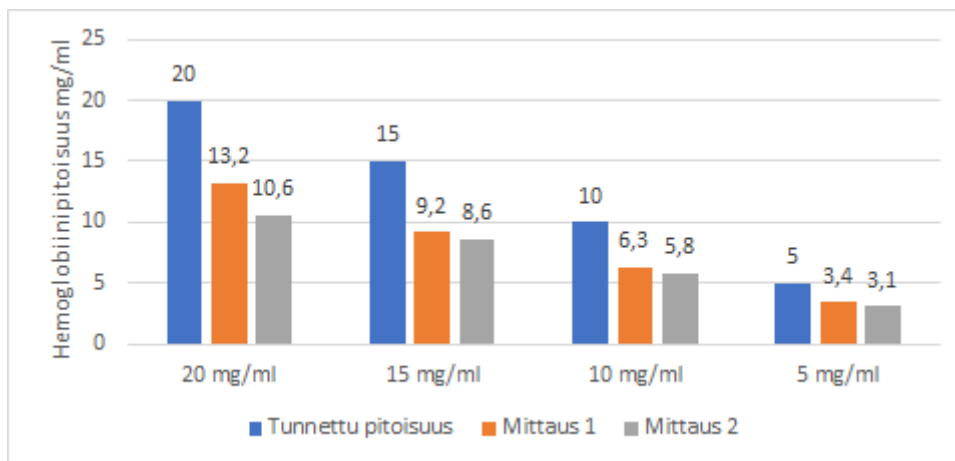
Kaavion 1 perusteella SLS-menetelmällä saadut tulokset eivät eroa enempää kuin ± 4 mg/ml. Sysmex-analysaattorin virhemarginaali on ± 6 mg/ml, joten kaavion 1 perusteella SLS-menetelmällä saadut tulokset ovat tuon virhemarginaalin sisäpuolella ja tällöin hyväksyttäviä. Sysmex-analysaat-

tori käyttää SLS-menetelmää hemoglobiinin määrittämiseen, joten voidaan olettaa virhemarginaalin olevan sama SLS-menetelmässä kuin Sysmex-verenkuva-analysaattorissa. Edellä mainittujen johtopäätösten perusteella voidaan todeta, että menetelmä toimii.

7.2 The Hemoglobin Assay kitin toimivuus

Hemoglobiinin määrittämiseen käytettävän kitin toimivuus testattiin tekemällä eri vahvuisia liuoksia kaupallisesta hemoglobiinista ja vedestä. Liuoksen konsentraatio mitattiin ELISA-kuoppalevyllä ja tuloksista pääteltiin The Hemoglobin Assay kitin toimivuus. Käytetyiksi konsentraatioiksi valittiin 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml ja 20 mg/ml, jotta tuloksia pystytään mahdollisimman hyvin vertailemaan SLS-menetelmästä saatuihin tuloksiin.

KAAVIO 2. The Hemoglobin Assay kitin toimivuus



Kaaviossa 2 sinisillä pylväillä tarkoitetaan tavoitearvoa, eli tiedossa olevien kaupallisten hemoglobiini liuosten konsentraatioita. Oransseilla pylväillä kaavioon on merkattu ensimmäisellä mittauskerralla The Hemoglobin Assay kitillä saatu konsentraatioarvo. Harmaalla kaaviossa on merkitty toisella mittauskerralla saatujen tulosten konsentraatio.

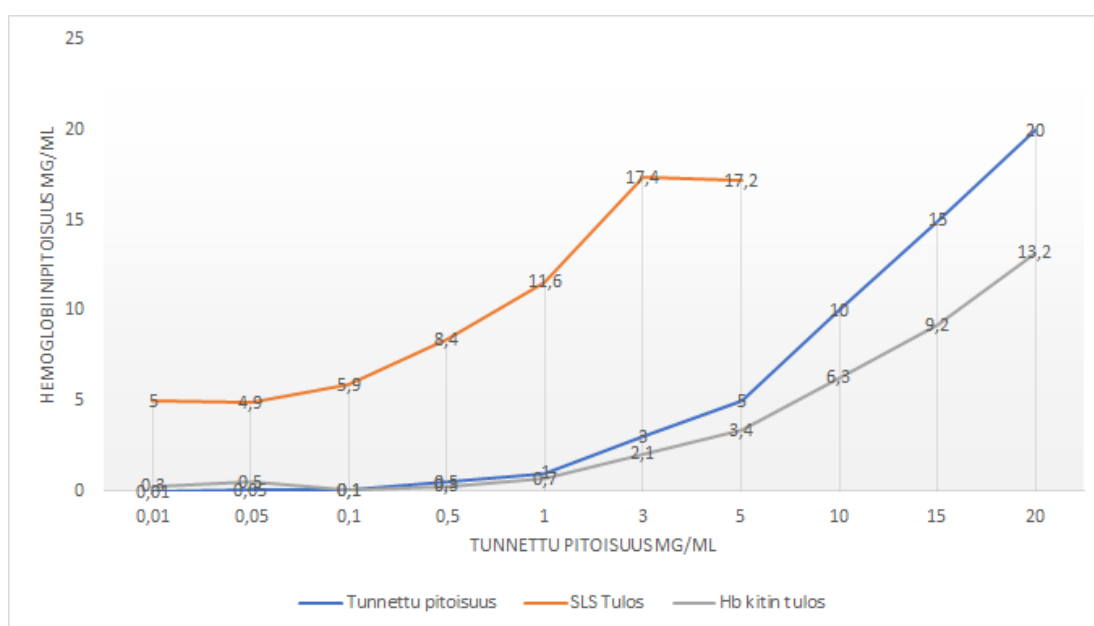
Kaaviosta 2 voidaan päätellä, että The Hemoglobin Assay kitin antaa parempia tuloksia pienemmillä konsentraatioilla (5 mg/ml liuoksessa ero maksimissaan $\pm 1,9$ ja 20 mg/ml liuoksessa $\pm 9,4$). Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että kaupallista hemoglobiinia liukenee veteen maksimissaan 20 mg/ml, joten kaikki hemoglobiini ei välttämättä ollut täysin liuennut. Tuloksista voidaan päätellä,

että käytössämme olevat reagenssit ovat toimivia. Menetelmä on osoitettu toimivaksi, mutta sen määritysrajoiksi on ilmoitettu 0,009-2 mg/ml, joten 1:10 laimennettu 20 mg/ml näyte on siltikin alueen ylärajalla, eikä tällöin anna välttämättä täysin oikeellisia tuloksia.

7.3 Menetelmien herkkyysien testaus

Menetelmien herkkyksiä on testattu valmistamalla kaupallisesta hemoglobiinista laimennokset 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml ja 20 mg/ml, jotka testattiin molemmilla menetelmillä. The Hemoglobin Assay kitillä testattiin myös kaupallisen hemoglobiinin laimennokset 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml ja 0,1 mg/ml.

KAAVIO 3. SLS-menetelmän ja The Hemoglobin Assay kitin herkkyudet



Kaaviossa 3 havainnoidaan SLS-menetelmän ja The Hemoglobin Assay kitin herkkyksiä. Kyseisessä kaaviossa sinisellä käyrällä kuvataan tavoitearvoja, jotka on saatu tekemällä tietyn konsentraation liuoksia kaupallisesta hemoglobiinista. Nämä konsentraatiot ovat merkitty kaavioon numeroilla. Oranssi käyrä kaaviossa havainnoi SLS-menetelmällä mitattujen kaupallisen hemoglobiini-näytteiden tuloksia. Harmaa käyrä kaaviossa kuvaa puolestaan The Hemoglobin Assay kitin antamia tuloksia kaupallisista hemoglobiinilaimennoksista. Kaaviosta selviää miten menetelmien tulokset asettuvat suhteessa tavoitearvoihin.

Kun verrataan harmaan ja oranssin käyrän asettumista siniseen tavoitekäyrään nähden, huomataan, että SLS-menetelmä on tarkempi suuremmissa konsentraatioissa. Tämä voidaan huomata siitä, kuinka oranssi käyrä myötäilee sinistä tavoitekäyrää suuremmissa konsentraatioissa, kun taas pienemmissä pitoisuuksissa se jää sinisen tavoitekäyrän yläpuolelle. Yläpuolelle jäävä tavoitekäyrä kertoo mittaustulosten olleen tavoitteita suurempia. Tästä voidaan päätellä mittausherkkyden päättyvän noin 5-10 mg/ml konsentraation välille. Tämä voidaan huomata oranssin käyrän laskun loppumisesta pienempien konsentraatioiden kohdalla.

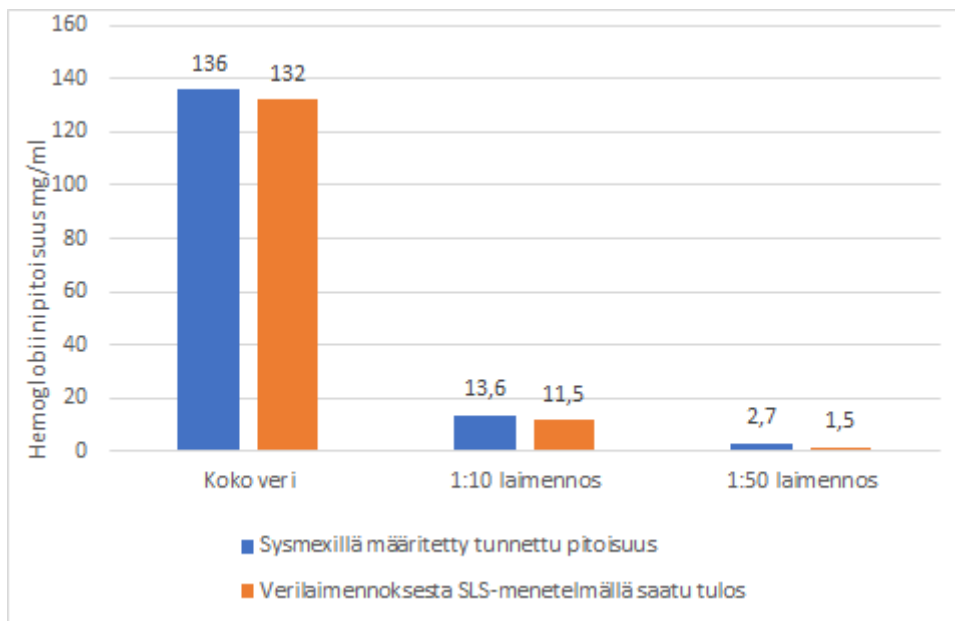
Toisin kuin SLS-menetelmä, The Hemoglobin Assay kitti on tarkempi pienemmissä konsentraatioissa. Harmaa käyrä kulkee tavoitekäyrän alapuolella konsentraatioissa 10-20 mg/ml, mutta asettuu yhdenmukaisemmin tavoitekäyrään nähden pienemmissä konsentraatioissa, kuten 10 mg/ml. Kuvaajasta voidaan siis päätellä SLS-menetelmän toimivan tarkemmin suuremmissa pitoisuuksissa, kun taas The Hemoglobin Assay kit toimii tarkemmin pienemmissä konsentraatioissa, eli on menetelmistä herkempi.

7.4 Menetelmien vertailu

7.4.1 Kaupallisen hemoglobiinin ja kokoveren vertailu tuloksissa

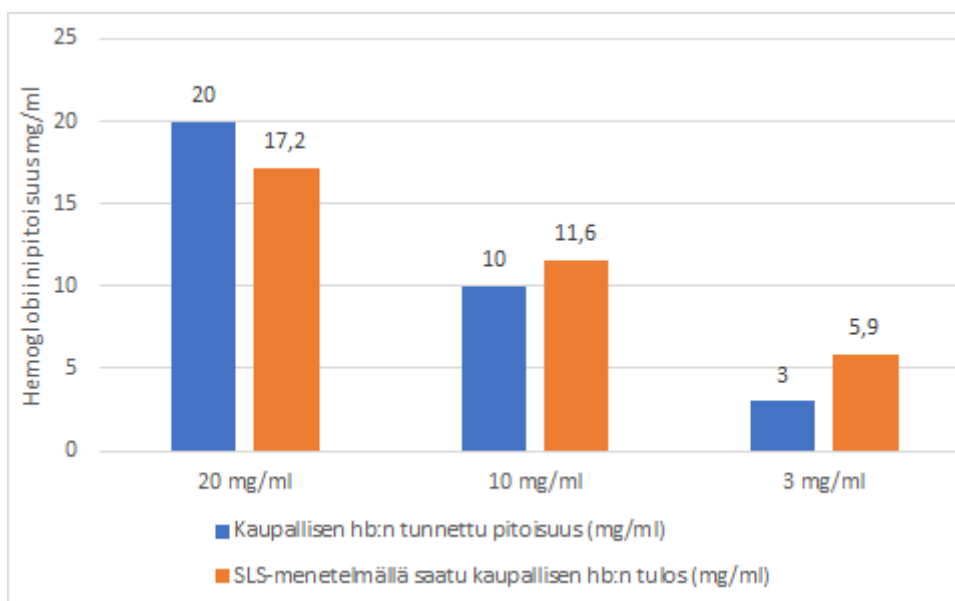
Kaavioissa 4 ja 5 on havainnollistettu miten kaupallisen hemoglobiinin ja veren antamien laimennosten tulokset eroavat niille asetetusta tavoitteesta SLS-menetelmällä.

KAAVIO 4. SLS-menetelmällä saatuja mittaustuloksia verilaimennoksista



Kaaviossa 4 on eritelty kokoveren, 1:50- ja 1:10-laimennoksen tulosten taso niiden tavoitearvoon nähden. Kuvaajassa siniset pylväät kuvaavat tavoitearvoa. Kokoveren tavoitearvo on verinäytteestä Sysmex-analysaattorilla saatu hemoglobiinitulos. Laimennosten 1:50 ja 1:10 tavoitearvot on saatu laskennallisesti kokoveren Sysmex-analysaattorilla saadusta hemoglobiinituloksesta. Oranssit pylväät taulukossa kuvaavat SLS-menetelmällä saatua tulosta.

KAAVIO 5. SLS-menetelmällä saatuja mittaustuloksia kaupallisen hemoglobiinin laimennoksista



Kaaviossa 5 on havainnollistettu kaupallisen hemoglobiinin laimennoksista saatuja tuloksia ja mitaustavoitteita. Mittaustavoitteet ovat kuvaajassa siniset pylväät ja SLS-menetelmällä saadut tulokset ovat oransseja pylväitä. Kaupallisen hemoglobiinin tavoitearvona toimii kaupallisesta hemoglobiinista tehdyn liuoksen konsentraatio.

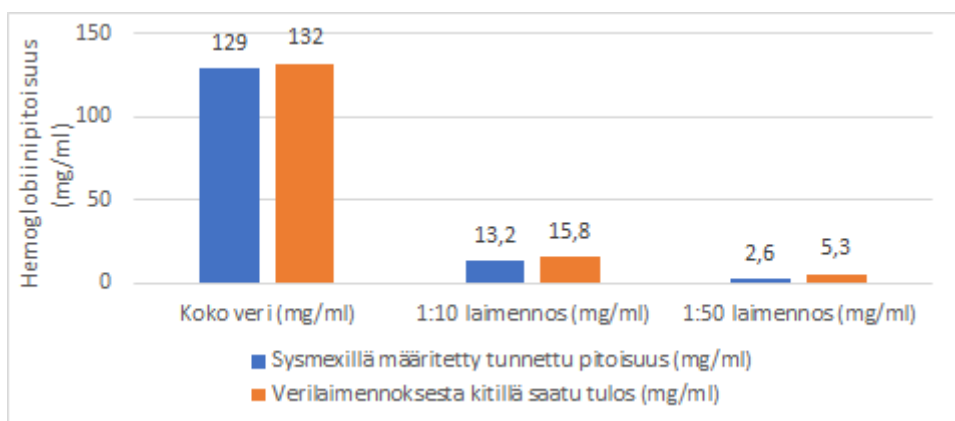
TAULUKKO 1. Mittausten virheprosentit SLS-menetelmällä (%)

Verilaimennostulokset	%	Kaupallisen hemoglobiinin laimennostulokset	%
Kokoveri	2,9 %	20 mg/ml	14 %
1:10 verilaimennos	15,4 %	10 mg/ml	16 %
1:50 verilaimennos	44,4 %	3 mg/ml	96,7 %

Taulukossa 1 on kirjattu ylös SLS-menetelmällä saaduista tuloksista laskettuja virheprosentteja, jonka avulla voidaan vertailla verilaimennoksista ja kaupallisesta hemoglobiinista saatuja tuloksia. Virheprosentilla pyritään havainnollistamaan virheen osuutta tuloksesta. Taulukon 1 virheprosentteista voidaan päätellä, että verestä tehdyt näytteet antavat SLS-menetelmällä tarkempia tuloksia. Virheprosentit ovat kokoverinäytteissä pienempiä, kuin kaupallisen hemoglobiinin näytteissä. Myös pylväsdiagrammeista kokoverinäytteiden pylväät pääsevät lähemmäksi tavoitepylvästä. Virheprosentteista saadut tulokset myös tukevat SLS-menetelmän herkkyyttä, jonka todettiin päättyvät noin 10 mg/ml tuloksiin kuvaajassa 4. Mittauksissa kokoveri antoi tarkempia tuloksia, kuin kaupallinen hemoglobiini, koska kaupallinen hemoglobiini oli vaikea saada liukenemaan veteen ja se aiheutti joihinkin tuloksiin virhettä.

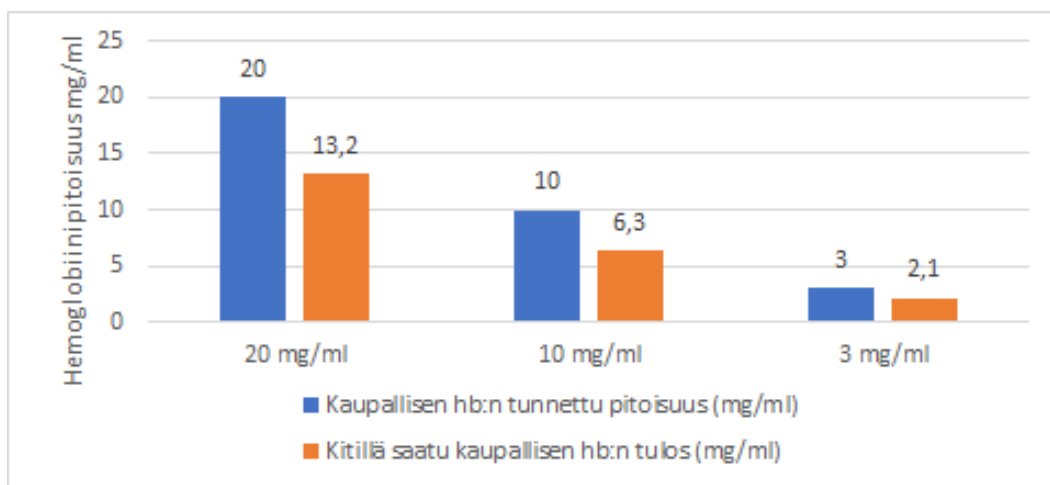
Kaavioissa 6 ja 7 on havainnollistettu miten kaupallisen hemoglobiinin ja veren antamien laimennosten tulokset eroavat tunnetusta arvosta The Hemoglobin Assay kitillä mitattuna.

KAAVIO 6. The Hemoglobin Assay kitillä verilaimennoksista



Kaaviossa 6 kokoverta on mitattu ensin laimentamattomana, sen jälkeen laimennoksilla 1:50 ja 1:10. Kaaviossa sininen pylväs kuvaa tavoitearvoa ja oranssi pylväs mittauksesta saatua tulosta. Tavoitearvo on Sysmex-analysaattorilla saatu veren hemoglobiinkonsentraatitulos, josta on laskennallisesti saatu tavoitearvot laimennoksille 1:50 ja 1:10.

KAAVIO 7. The Hemoglobin Assay kitillä saatuja mittaustuloksia kaupallisen hemoglobiinin laimennoksista



Kaaviossa 7 Havainnollistetaan The Hemoglobin Assay kitillä saatuja tuloksia kaupallisen hemoglobiinin liuoksista. Siniset pylväät kaaviossa kuvaavat tavoitearvoa. Kaupallisen hemoglobiinin tavoitearvona toimii kaupallisesta hemoglobiinista tehdyn liuoksen konsentraatio. Oranssit pylväät kaaviossa havainnollistavat The Hemoglobin Assay kitillä saatua mittaustulosta.

TAULUKKO 2. Mittausten virheprosentit hemoglobiinin määrittämiselle kitillä (%)

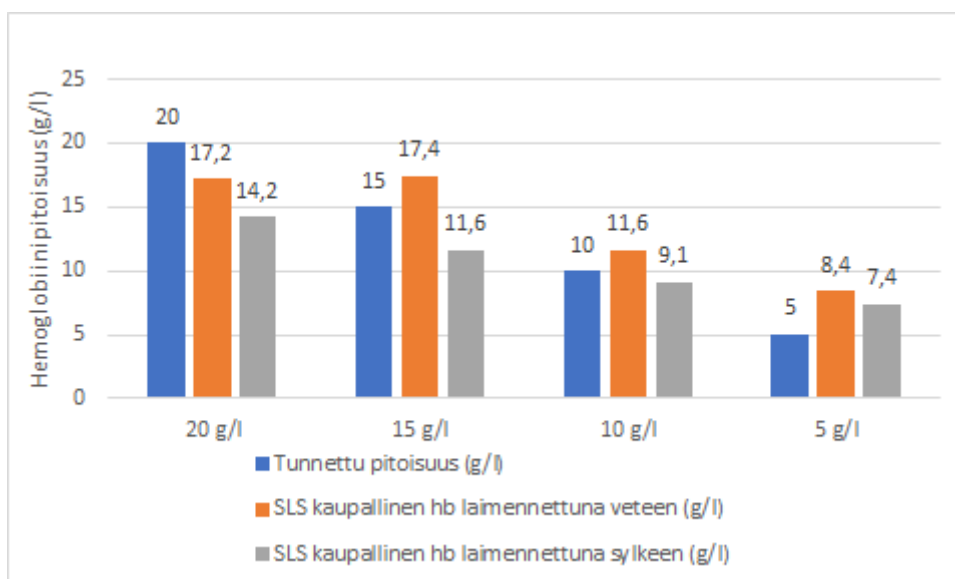
Verilaimennokset	%	Kaupallisen hemoglobiinin laimennokset	%
Kokoveri	2,3 %	20 mg/ml	34 %
1:10	19,7 %	10 mg/ml	37 %
1:50	103,8 %	3 mg/ml	30 %

Taulukossa 2 on kirjattu ylös The Hemoglobin Assay kitillä saaduista tuloksista laskettuja virheprosentteja kahdesta rinnakkaisesta mittauksesta. Verrataan eroja verilaimennoksilla ja kaupallisella hemoglobiinilla tehdyillä mittauksilla. Virheprosentilla pyritään havainnollistamaan virheen osuutta tuloksesta. Taulukon 2 virheprosentteista voidaan päätellä, että verilaimennoksista saadaan tarkempia tuloksia The Hemoglobin Assay kitillä, sillä verilaimennosten virheprosentit ovat pienempiä, kuin kaupallisesta hemoglobiinista valmistettujen liuosten virheprosentit. Myös kaavioista 6 ja 7 voidaan huomata, että verilaimennoksilla tehdyillä mittauksilla päästiin lähemmäs tavoitearvoa.

7.4.2 Syljen matriisivaikutus

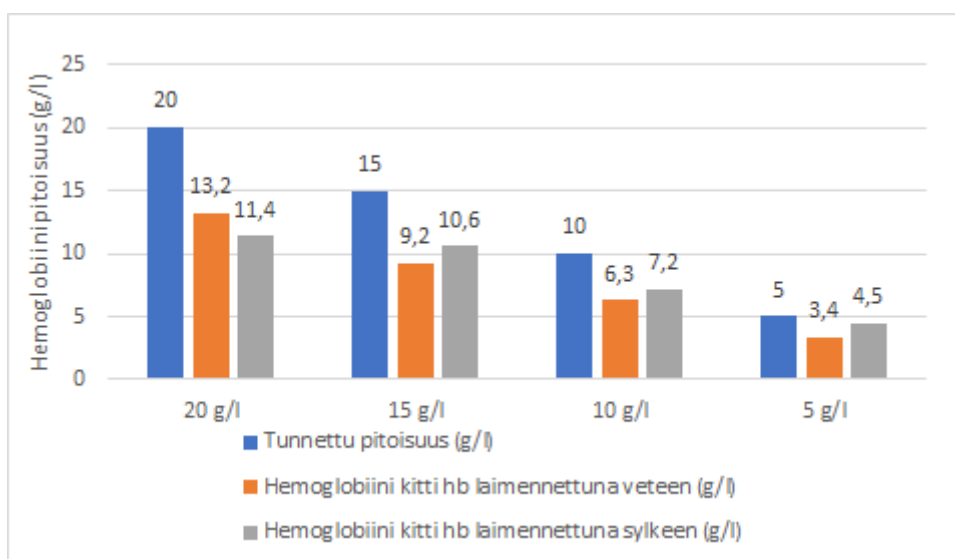
Syljen matriisivaikutusta näytteiden analysointiin tutkittiin valmistamalla kaupallisesta hemoglobiinista laimennokset 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml ja 20 mg/ml sekä veteen, että sylkeen. Nämä kaupallisen hemoglobiinin sylki- ja vesilaimennokset analysoitiin molemmilla menetelmillä. Näin tuloksista saatiin vertailukelpoisia ja syljen matriisivaikutusta pystyttiin tarkastelemaan molemmilla menetelmillä.

KAAVIO 8. SLS-menetelmällä syljen matriisivaikutuksen vertailu



Kaaviossa 8 kuvataan sylkinäytteen vaikutusta mittaustulokseen SLS-menetelmässä. Kaupallista hemoglobiinia liuotettiin sylkeen ja veteen. Tavoitearvoja kuvaavat siniset pylväät. Tavoitearvona toimii kaupallisesta hemoglobiinista tehdyn liuoksen konsentraatio. Veteen laimennettuja kaupallisen hemoglobiinin laimennoksia kuvaavat oranssit pylväät. Sylkeen laimennettua kaupallisia hemoglobiini laimennoksia kuvaavat harmaat pylväät.

KAAVIO 9. The Hemoglobin Assay kitillä syljen matriisivaikutuksen vertailu



Kaaviossa 9 kuvataan sylkinäytteen vaikutusta mittaustuloksiin The Hemoglobin Assay kitin mitauksissa. Kaupallista hemoglobiinia liuotettiin sylkeen ja veteen. Tavoitearvoja kuvaavat siniset pylväät. Tavoitearvona toimii kaupallisesta hemoglobiinista tehdyn liuoksen konsentraatio. Veteen laimennettuja kaupallisen hemoglobiinin laimennoksia kuvaavat oranssit pylväät. Sylkeen laimennettua kaupallisia hemoglobiini laimennoksia kuvaavat harmaat pylväät.

Kaaviosta 8 ja 9 voidaan päätellä, että syljen matriisivaikutus on vahvempi SLS-menetelmällä. Tämä voidaan huomata siitä, että sylkinäytteet antavat SLS-menetelmällä aina heikomman tuloksen, kuin veteen laimennettu kaupallinen hemoglobiini. The Hemoglobin Assay kitillä sylkinäytteistä saaduissa tuloksissa ei ole huomattavissa samaa sylkinäytteen vaikutusta.

TAULUKKO 3. Syljen matriisin vaikutuksen mittaustulosten virheprosentti (%)

SLS-Menetelmä			The Hemoglobin Assay kit	
	Vesi (%)	Sylki (%)	Vesi (%)	Sylki (%)
20 mg/ml	14,0 %	29,0 %	34,0 %	43,0 %
15 mg/ml	16,0 %	22,7 %	38,7 %	29,3 %
10 mg/ml	16,0 %	9,0 %	37,0 %	28,0 %
5 mg/ml	68,0 %	48,0 %	32,0 %	10,0 %

Taulukossa 3 näkyy syljen matriisivaikutus virheprosentteina, eli saaduista mittaustuloksista on laskettu, kuinka paljon ne prosentteina eroavat tavoitearvoista. Taulukossa vertaillaan kahden rinnakkaisen mittauskerran tuloksia. SLS-menetelmä -otsikon alapuolella näkyy prosentteina sekä veteen liuotetun hemoglobiinin että sylkeen laimennetun hemoglobiinin virheprosentit SLS-menetelmällä mitattuna. Vieressä kohdassa, The Hemoglobin Assay kit -otsikon alapuolella, nähdään veteen laimennetun hemoglobiinin ja sylkeen laimennetun hemoglobiinin virheprosentit The Hemoglobin Assay kitistä saaduista tuloksista. Taulukosta voidaan päätellä syljen vaikuttavan SLS-menetelmän mittaustarkkuuteen enemmän kuin The Hemoglobin Assay kitin, sillä SLS-menetelmän virheprosentit nousevat huomattavasti, kun näytemuotona käytetään sylkeä.

7.5 Johtopäätökset

7.5.1 SLS-menetelmän sopivuus sylkinäytteen mittaukseen

Tuloksista voidaan päätellä, että SLS-menetelmällä voidaan mitata hemoglobiinia syljestä. Menetelmä ei kuitenkaan osoittautunut sopivaksi tähän tarkoitukseen, sillä SLS-menetelmä ei ole tarpeeksi herkkä. Menetelmällä ei mittausten mukaan voi luotettavasti mitata alle 10 mg/ml pitoisuuksia. Tämä herkkyys ei riitä hemoglobiinin mittaukseen syljestä, ellei hemoglobiinia ole syljessä runsaasti. Sysmex-analysaattorin mittausvirheen ollessa ± 6 mg/ml, voidaan olettaa, ettei SLS-menetelmällä päästäkään niin mataliin hemoglobiinkonsentraatioihin, kuin olisi alun perin haluttu.

7.5.2 Menetelmien vertailu

Tutkimuksessa pyrittiin tuottamaan tietoa, jonka avulla pystytään vertailemaan SLS-menetelmää ja The Hemoglobin Assay kitin toimivuutta sylkinäytteen hemoglobiinkonsentraation määrittämiseksi. Tutkimustuloksista voidaan huomata, että The Hemoglobin Assay kit on SLS-menetelmää herkempi. SLS-menetelmä ei mitannut alle 10 mg/ml pitoisuuksia luotettavasti. Tämä ilmenee SLS-menetelmän tuloksista lasketuista virheprosentista taulukossa 1, sekä herkkyys testauksen tuloksista laaditussa kaaviosta 3. The Hemoglobin Assay kit antaa tuloksia vielä mitattaessa 0,01 mg/ml konsentraatiossa (KAAVIO 3). The Hemoglobin Assay kit toimii valmistajan ilmoittamalla alarajalla 0,009 mg/ml. Suurempi herkkyys tekee The Hemoglobin Assay kitistä sopivamman menetelmän syljen verimäärän mittaamiselle.

Molempien mittausten tuloksista voidaan päätellä, että ne ovat kyseisessä mittauksessa toimineet tarkemmin kokoverellä, kuin kaupallisella hemoglobiinilla. Tämä käy ilmi kaavioista 4 - 7, joissa havainnollistetaan kaupallisen hemoglobiinin ja verinäytteiden tulosten suhdetta niiden tavoitearvoon. Lisäksi tämä ilmenee myös taulukosta 1 ja 2, joista huomataan, että kokoverimittausten virheprosentit ovat alhaisemmat, kuin kaupallisella hemoglobiinilla suoritettujen mittausten virheprosentit. Kaupallisen hemoglobiinin käyttöä vaikeutti sen huono liukeneminen veteen, jolloin mitaustuloksissa ilmeni virheitä.

Syljen matriisivaikutus pystyttiin huomaamaan SLS-menetelmän tuloksista selkeämmin, kuin The Hemoglobin Assay kitin tuloksista. Tämä voidaan päätellä kaavioista 8 ja 9, joista käy ilmi, että

sylkinäytteet antavat heikomman tuloksen kaikissa SLS-menetelmällä tehdyissä mittauksissa, toisin kuin The Hemoglobin Assay, jonka tuloksia sylki ei heikennä samalla tavalla. Taulukko 3:n perusteella voidaan todeta syljen aiheuttavan tuloksiin epätarkkuutta, sillä virheprosentteista nähdään syljen suurentavan virheen määrää, etenkin SLS-menetelmällä.

8 POHDINTA

Koemme tavoitteemme täyttyneen SLS-menetelmän sopivuuden sylkinäytteen analysoimiseen ja menetelmien vertaamisen osalta. Olisimme kuitenkin toivoneet, pääsevämme molemmilla menetelmillä alhaisempiin hemoglobiinipitoisuuksiin. Tutkimuksen tilaaja olisi toivonut, että SLS-menetelmällä olisi saatu mitattua pienempiä hemoglobiinikonsentraatioita. Onnistuimme kuitenkin tuottaa heille hyödyllistä tietoa kolorimetristen menetelmien käyttämisestä hemoglobiinin mittauksessa. Olemme tyytyväisiä siitä, että saimme molemmat menetelmät toimimaan ja tuotettua uutta tutkimustietoa. Varsinkin SLS-menetelmän siirtäminen spektrofotometrillä tehtäväksi onnistui mielestämme erittäin hyvin. SLS-menetelmän todettiin toimivan samoilla herkkyksillä kuin Sysmex-analysaattorissa. Mittausvirheen ollessa ± 6 mg/ml, totesimme ettei menetelmällä voi mitata luotetavasti alle 10 mg/ml pitoisuuksia.

Menetelmiä verratessa totesimme, että The Hemoglobin Assay kit on menetelmistä sopivampi hemoglobiinin määrittämiseksi syljestä. Sen herkkyys oli suurempi kuin SLS-menetelmässä, eikä syljen matriisivaikutus häirinyt sillä mitatessa yhtä paljon, kuin SLS-menetelmässä. Mittaukset osoittivat, että syljen matriisivaikutus on huomattava SLS-menetelmällä mitatessa. Syljen tulosta vaihteleva vaikutus oli nähtävissä mittaustuloksista. Sylki tuotti välillä vaikeuksia myös näyttemateriaalina limaisuutensa vuoksi.

Pyrimme parantamaan tutkimuksen luotettavuutta suunnittelemassa jokaisen tutkimuksen vaiheen huolellisesti. Näytteitä analysoitaessa työskentelimme aseptisesti kontaminaatioiden välttämiseksi. Käytimme kalibroituja pipettejä päästäksemme tarkkoihin pipetointituloksiin. Tulosten luotettavuus varmistettiin rinnakkaismäärittäyksillä ja mittauksien toistamisella.

Tutkimusta voisi jatkaa tekemällä lisää toistoja tutkimuksemme mittauksista, jolloin johtopäätöksiä voidaan tehdä varmemmin ja tuloksiin saataisiin lisää luotettavuutta. Lisätutkimusta aiheesta voisi tehdä ottamalla SLS-menetelmän ja The Hemoglobin Assay kitin rinnalle muitakin menetelmiä. Molemmat käyttämämme menetelmät olivat kolorimetrisiä, joten jonkin muunlaisen menetelmäperiaatteen testaaminen olisi hyödyllistä. Jos jatkaisimme tutkimusta, voisi seuraava askel olla vasta-aineisiin perustuvan mittauksen testaaminen. Joissakin Sysmex-analysaattoreissa on myös Body fluid-ominaisuus, jolla voidaan mitata matalia punasoluarvoja esimerkiksi pleura- ja selkäydinnes-

teestä. Näissä näytemuodoissa ei terveellä henkilöllä ole punasoluja. Tätä ominaisuutta, joka laskee punasolut, voisi mahdollisesti hyödyntää syljen veren määrittämisessä pienienkin verimäärien löytymiseksi.

Henkilökohtaisena tavoitteenamme oli kehittää ammattitaitoamme menetelmätestauksessa ja näytteiden analysoimisessa, sekä kehittää itsenäistä tutkimustyön toteuttamista. Tavoitteenamme oli myös tuottaa tietoa hemoglobiinin mittauksesta syljestä, sekä syljestä näytemateriaalina. Koimme päässeemme tavoitteisiimme. Tietotaitomme on kehittynyt huomattavasti menetelmätestauksen ja sen vaiheiden osalta. Oli hienoa päästä käyttämään myös omaa luovuuttaan tutkimustyössä vastaan tulleiden ongelmien ja pulmien ratkomisessa. Kaikille opinnäytetyön tekijöille tutkimustyön tekeminen oli uusi kokemus. Koimme, että tutkimusprosessimme oli mielenkiintoista ja hyödyllistä bioanalytiikan ammattiosaamisen kehittymiselle. Bioanalytiikan työssä voimme kohdata menetelmätestausta, josta tiedämme nyt paljon enemmän. Opinnäytetyön tekeminen edisti ammatillista kasvuamme ja uskomme hyötyvämmä siitä tulevaisuudessa. Sen tekeminen oli meille opettavainen kokemus, vaikka välillä koimme prosessin hankalaksi, esimerkiksi tulosten käsittely tuotti meille haasteita. Lopputulokseen olemme kuitenkin tyytyväisiä.

8.1 Mahdolliset mittausvirheet ja haasteet

Laboratoriotyötä tehdessä täytyy osata kyseenalaistaa oma tekemisensä ja pystyä erittelemään virhelähteitä. Mittausvirhe tarkoittaa tieteellisessä tutkimuksessa havainnoitavan suureen todellisen arvon ja mitatun arvon eroa, eli mittaustuloksen ja oikean arvon erotusta. (Jyväskylän yliopisto; Fysiikan laitos, 2018, viitattu 3.12.2018)

Laboratoriossa työskennellessämme pyrimme etukäteen kartoittamaan mahdolliset mittausvirheiden lähteet, välttämään niitä ja näin parantamaan tutkimuksemme luotettavuutta. Mittaustuloksia tarkastellessamme pystyimme selvästi osoittamaan muutamien tulosten virheellisyyden. Ne eivät olleet lineaarisia muiden mittaustulosten kanssa, eivätkä vastanneet hemoglobiinkonsentraatioltaan haluttua arvoa. Tarkastellessamme työprosessia, löysimme syitä, jotka saattoivat johtaa mittaustulosten syntymiseen. Jälkikäteen on kuitenkin mahdotonta tarkkaan sanoa, mikä aiheutti mittaustulosten virheen.

Käytimme tutkimuksessamme Oulun ammattikorkeakoulun välineitä. Sysmex-analysaattorin käyttö oli olennaisessa osassa tutkimuksiamme, koska analysoimme sillä kokoveren, jonka tulos toimi vertailu- ja tavoitearvona. Sysmex-analysaattorin kontrollit ja jotkin reagensseista olivat vanhentuneita, joka saattoi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen. Reagenssit olivat noin kaksi kuukautta ennen käyttöä vanhentuneita. Reagensseja oli kuitenkin säilytetty oikein ja ne olivat käyttöhetkellä avaamattomia. Sylki- ja verinäytteiden mittaukset spektrofotometrillä tehtiin myös käyttäen vanhentuneita reagensseja hävikin minimoimiseksi. Reagenssit olivat suoraan käytöstä poistettuja.

Muita mahdollisia virhelähteitä voivat olla mahdolliset pipetointi- ja laskuvirheet. Myös kaupallisen hemoglobiinin käyttö aiheutti ajoittain vaikeuksia. Halusimme minimoida veden määrän sylkinäytteessä, joten kaupallista hemoglobiinia täytyi liuottaa mahdollisimman pieneen määrään vettä. Sen liukoisuus veteen on 20 mg/ml, mutta liuotimme huomattavasti suurempia konsentraatioita sylkinäytteen valmistuksessa. Tämä johti kaupallisen hemoglobiinin huonoon liukenevuuteen, mikä saattoi aiheuttaa liukenemattomia hemoglobiinipalasia liukseen. Koska menetelmä on kolorimetrisen, saattaa tämä aiheuttaa sen, että juuri mittauskohdassa, josta absorbanssi on mitattu, on ollut häiritsevä liukenematon palanen.

Totesimme myös, että sylki on näytemateriaalina haastava. Eri henkilöiltä otetut sylkinäytteet voivat olla koostumukseltaan erilaisia, mikä voi aiheuttaa haasteita näytteen käsittelylle ja analysoimiselle. Syljen matriisivaikutus näkyi erityisesti SLS-menetelmän mittaustuloksissa, joissa sylki heikensi mittauksen herkkyyttä. Totesimme siis syljen materiaalina ”vaimentavan” mittaustuloksia.

LÄHTEET

Dolan, J. 2013. The Importance of the Sample Matrix, LCGC Solutions for separation scientists. Viitattu 1.12.2018.

<http://www.chromatographyonline.com/importance-sample-matrix-0>

Dutta, S. & Goodsell, D. 2003. Hemoglobini. Educational portal of PDB. Viitattu 17.9.2018, <https://pdb101.rcsb.org/motm/41>.

Eskelinen, S. 2016. Hemoglobiini (B-Hb). Terveyskirjasto Duodecim. Viitattu 17.9.2018, http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03031.

Helin, T. 2016. Hematologisia esimerkitapauksia laboratoriotutkimusten käytöstä. Helsingin yliopisto ja Huslab. Helsingin yliopisto ja Huslab. Helsingin yliopisto ja Huslab. Viitattu 4.10.2018, https://courses.helsinki.fi/sites/default/files/course-material/4455099/Hematologiset%20laboratoriotutkimukset_s2016_TH.pdf.

Hiiri, A. 2015. Ientulehdus (gingiviitti). Terve suu. Terveyskirjasto Duodecim. Artikkelitunnus: trv00106 (014.010). Viitattu 10.9.2018, <http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/shk/koti>.

Honkala, S. 2015. Sylki ja sylkirauhaset. Terveyskirjasto Duodecim. Viitattu 17.9.2018, https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=trv00009.

Huslab 2018. Syljen kortisolinäytteen keräys. Viitattu 17.9.2018, https://huslab.fi/ohjekirjan_liitteet/potilasohjeet/7_muut/syljen_kortisolinaytteen_kerays.pdf.

Jyväskylän yliopisto; Fysiikan laitos. 2018. Mittausvirheistä. Viitattu 3.12.2018

<https://www.jyu.fi/science/fi/fysiikka/opiskelu/tyoosasto/mittausvirheista>

Kairisto V, Grönroos P, Loikkanen M, Savolainen E, Punnonen K, Syrjälä M, Rajamäki A, 2003, 51-51/2003. 5147-5153. Viitattu 24.9.2018.

<https://www.laakarilehti.fi/tieteessa/alkuperaistutkimukset/perusverenkuva-uudet-suomalaiset-viitearvot/>.

Könönen, E. 2016. Tietoa potilaalle: ientulehdus (gingiviitti). Terveysportti Duodecim. Artikkelitunnus: dlk00714 (004.714). Viitattu 10.9.2018, <http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/tod/koti>.

Maeng, Y., Kim, B., Jung, H., Jung, U., Kim, H., Kim, B. Diagnostic accuracy of a combination of salivary hemoglobin levels, self-report questionnaires, and age in periodontitis screening. 2016.

Salimetrics®. 2018. Saliva collection handbook; Passive drool. Viitattu 17.9.2018, <https://www.salimetrics.com/saliva-collection-handbook/#passive-drool-saliva-collection>.

Salimetrics. 2018. Saliva collection handbook; Preparing saliva samples for analysis. Viitattu 11.10, <https://www.salimetrics.com/saliva-collection-handbook/#preparing-saliva-samples-for-analysis>

Sigma-aldrich. 2018. Hemoglobin Assay Kit. Viitattu 3.10.2018, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak115?lang=fi®ion=FI>.

Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turun yliopiston täydennyskoulutuskeskus.

Sotkas, P., Tenhunen, A., Tihtarinen-Ulmanen, M. & Venäläinen, J. 2012. BIOS 4: Ihmisen biologia. Sanoma Pro.

Suomen hammaslääkäriliitto. 2018. Hampaiden ja suun sairaudet: Gingiviitti - ientulehdus. Viitattu 10.9.2018, <https://www.hammaslaakariliitto.fi/fi/suunterveys/suun-sairaudet-ja-tapaturmat/hampaiden-ja-suun-sairaudet/gingiviitti-ientulehdus>.

Sysmex. 2015. Safety data sheet: Cellpack. Viitattu 5.10.2018, [https://www.sysmex.com/us/en/Company/QualityCompliance/MSDS/Cellpack%20DST%20F-7052Z%20\(4-2015\).pdf](https://www.sysmex.com/us/en/Company/QualityCompliance/MSDS/Cellpack%20DST%20F-7052Z%20(4-2015).pdf).

Sysmex. 2016. Safety data sheet: Sulfolyser. Viitattu 5.10.2018, [https://www.sysmex.com/us/en/Company/QualityCompliance/MSDS/Sulfolyser%20F-7052AZ%20\(3-2016\).pdf](https://www.sysmex.com/us/en/Company/QualityCompliance/MSDS/Sulfolyser%20F-7052AZ%20(3-2016).pdf).

Sysmex-europe. 2018. SLS-detection method. Viitattu 4.10.2018, <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/sls-detection-method.html>.

Sysmex Corporation. 2014. The 11th Technology Presentation. Viitattu 4.10.2018, <http://www.sysmex.co.jp/en/ir/library/presentations/docs/140314gijyutsu.pdf>.

Tiwari, M. Science behind human saliva. NCBI: US National Library of Medicine. 2011. Viitattu 2.11.2018

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312700/>

Vilkka H, 2007. Tutki ja mittaa. Helsinki: Tammi. Viitattu 1.10.2018, <http://hanna.vilkka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>.

Vierimaa, H. & Laurila, M. 2014. Keho: Anatomia ja fysiologia. Sanoma Pro.

Yamada, H., Okada, A., Murata, T., Uetani, K., Kotoh, M., Nishitsuji, N., Yabuki, Y., Fukuzawa, Y., Yoshino, H., Kubo, K., Abe, M., One, T., Nagai, H., Yajima, M., Nomura, Y., Nobuhiro Hanada, N. Prevalence of blood contamination in adult saliva and quantitative measurement of salivary hemoglobin level by using an anti-human hemoglobin monoclonal antibody. 2016.

LIITTEET

MITTAUSSUUNNITELMA

LIITE 1.

Tämä mittaussuunnitelma on tehty ohjeeksi SLS-menetelmän suorittamista spektrofotometrillä. SLS-menetelmä on Sysmex-analysaattorin käyttämä kolorimetrinen hemoglobiininmääritysmenetelmä, joka voidaan suorittaa spektrofotometrin avulla ilman Sysmex-analysaattoria.

Tutkimuksessamme tehdyt SLS-menetelmämittaukset on toteutettu tämän mittaussuunnitelman mukaisesti mitaten eri näytemuotoja. Mittauksia tehdessä, täytyy huomioida, että näytteitä on aina vähintään kaksi, joista toisen näytteen konsentraatio on tiedossa. Tämä näyte toimii ns. standardina. Näytettä, jonka konsentraatio tiedetään, hyödynnetään absorbanssien muuttamisessa konsentraatioiksi, jolloin näyte toimii standardina.

Tarvikkeet:

- Sysmex-analysaattori
- Spektrofotometri ja sen mittauskyvetit
- Pipetti (tilavuus 0,5µl- 10µl)
- Pipetti (tilavuus 10µl-100µl)
- Pipetti (tilavuus 100µl-1000µl)
- Pasteur-pipettejä
- Reagenssit: Cellpack, Sulfolyser
- Ultrapuhdasta vettä
- Puhtaita muoviputkia näytteiden valmistamiseksi (tilavuus vähintään 5ml)
- EDTA-verta
- Verinäytteenottovälineet (neula, staasi, ihonpuhdistusaine ja -laput, teippi)

Spektrofotometri nollataan Cellpack-reagenssilla, jota käytetään näytteen laimennokseen. Aallonpituudeksi asetetaan SLS-hemoglobiinille spesifinen 555 nm. Kun spektrofotometrin asetukset on saatu säädettyä, aloitetaan näytteiden valmistelu mittausta varten.

Mahdolliset verinäytteet voidaan laimentaa Cellpack-liuokseen.

Näytteet valmistellaan SLS-menetelmän vaatimalla tavalla (KAAVA 1). Näyte valmistellaan muoviputkeen. Näytteen valmistelu mittausta varten aloitetaan pipetoimalla 4 ml Cellpack-reagenssia muoviputkeen. Cellpack-reagenssiin lisätään 8 µl näytettä. Juuri ennen mittausta näytteeseen lisätään Sulfolyser-reagenssi.

KAAVA 1

4 ml Cellpack-reagenssia + 8 µl näytettä + 1 ml Sulfolyser-reagenssia

Kun näyte on valmisteltu, se sekoitetaan vortexilla nopeasti ja pipetoidaan pasteur-pipetillä mitauskyvetiin. Kyvetti asetetaan spektrofotometriin ja näytteen absorbanssi mitataan. Näytteiden välissä kyvetti huuhdellaan ultrapuhtaalla vedellä. Kun näytteiden absorbanssi on saatu mitattua, voidaan laskea hemoglobiinin määrä näytteessä hyödyntämällä laskukaavaa (KAAVA 2).

KAAVA 2

$(A_{\text{näyte}} / A_{\text{standardi}}) \times C_{\text{standardi}} = g/l$

A näyte = Näytteen absorbanssi (, josta vähennetty nollanäytteen absorbanssi)

A standardi = Standardin absorbanssi (, josta vähennetty nollanäytteen absorbanssi)

C standardi = Standardin konsentraatio

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA
 Tel: (800) 551-3511 (314) 771-4371 Fax: (314) 529-4050 (314) 771-4371
 e-mail: orders@sigmaaldrich.com sigma@sigmaaldrich.com

Product Information

Hemoglobin Assay Kit

Catalog Number **MAK115**

Storage Temperature 2–8 °C

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

Hemoglobin (Hb) is an iron-containing metalloprotein that serves as the primary means of oxygen transport in vertebrates. Hemoglobin is primarily found in red blood cells where it makes up to 97% of the cell's dry content. Hemoglobin can also be found in other tissues where it serves as an antioxidant. Alterations in blood hemoglobin levels occurs in many diseases such as anemia and polycythemia.

The Hemoglobin Assay kit provides a simple and direct procedure for measuring hemoglobin levels in a variety of samples such as blood, serum, plasma, and urine. This assay is based on the improved Triton[®]/NaOH method in which hemoglobin is converted to a colorimetric product measured at 400 nm. This assay has a linear detection range between 0.9–200 mg/dL in the 96 well plate assay.

Components

The kit is sufficient for 250 assays in 96 well plates.

Reagent	50 mL
Catalog Number MAK115A	
Calibrator	10 mL
Catalog Number MAK115B	

Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- Spectrophotometric multiwell plate reader
- 96 well flat-bottom plate – It is recommended to use clear plates for colorimetric assays.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

This kit is shipped at room temperature. Storage at 2–8 °C, protected from light, is recommended.

Procedure

Sample Preparation

Serum, plasma, and urine sample can be assayed directly.

Blood samples should be diluted 100-fold in water.

Assay Reaction

1. Add 50 μ L of water (Blank) and 50 μ L of the Calibrator into wells of a clear bottom 96 well plate. Add 200 μ L of water into the Blank and Calibrator. The diluted calibrator is equivalent to 100 mg/dL hemoglobin.
2. Transfer 50 μ L of samples into wells. Add 200 μ L of Reagent to sample wells and tap plate lightly to mix.
3. Incubate 5 minutes at room temperature.
4. Measure the absorbance at 400 nm (A_{400}).

Note: This procedure can be adapted for use in cuvettes. Transfer 100 μ L of sample and 1,000 μ L of Reagent into a cuvette and tap lightly to mix. Measure the absorbance at A_{400} . Transfer 100 μ L of Calibrator and 1,000 μ L of water to a cuvette. Measure the absorbance A_{400} . Blank by reading the A_{400} of water.

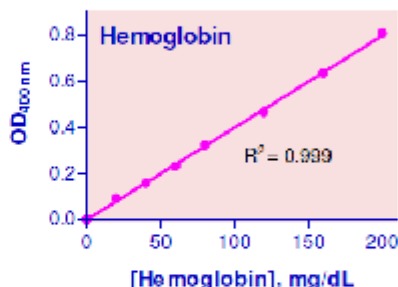
Calculations

Concentration of Hemoglobin

$$= \frac{(A_{400, \text{sample}}) - (A_{400, \text{blank}})}{(A_{400, \text{calibrator}}) - (A_{400, \text{blank}})} \times 100 \text{ mg/dL} \times \text{df}$$

100 mg/dL = concentration of the diluted calibrator
 df = dilution factor (for example, 100 for the blood samples)

Conversion factors for Hemoglobin:

1 mg/dL = 0.156 μ M, 0.001%, or 10 ppm.

Standard Curve with Freshly Prepared Hemoglobin
 in 96-well plate assay

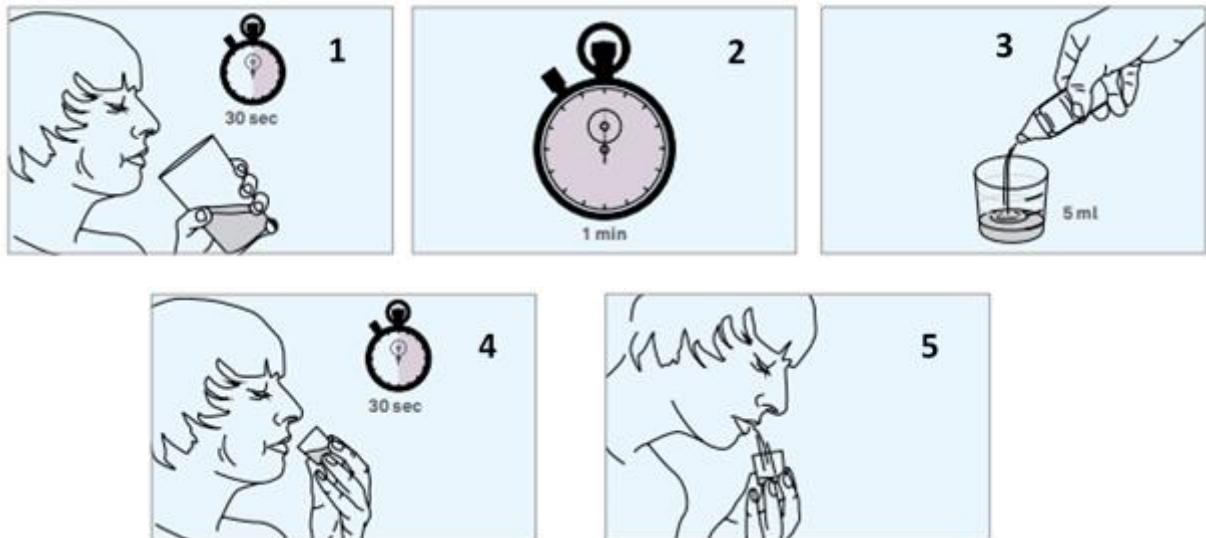
Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Suggested Solution
Assay not working	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For colorimetric assays, use clear plates
Samples with erratic readings	Presence of interfering substance in the sample	If possible, dilute sample further
	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings

LS,MAM 11/13-1

LIITE 3.

Näytteenotto-ohje sylki- ja suuhuhdenäytettä varten



Suuhuhdenäyte:

1. Huuhtelee suu aluksi vesijohtovedellä. Purskuttelee vettä 30 sek ajan ja sylje se sitten altaaseen.
2. Odota 1 min
3. 5 ml vesipullo tyhjenetään mittakuppiin.
4. Huuhtelee suuta huolellisesti 5 ml:llä vettä 30 sek ajan. Liikuttaa nestettä erityisesti ikenissä, ei kurkussa.
5. Sylje koko suussa oleva nestemäärä takaisin mittaan.
6. Anna mitta näytteen testaajalle.

Sylkinäyte:

1. Odota 1 min.
2. Sylje tai nielaise suuhun kertynyt sylki pois.
3. Anna syljen kertyä suuhun 5 min ajan, viimeisen 30 sek aikana liikuta/purskuta sylkeä suussa (ikenissä).
4. Sylje sylki punakantiseen purkkiin.
5. Anna purkki näytteen testaajalle