



Jenna Koivula ja Emma Saari

Seerumin Inhibiini B-tutkimuksen verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

14.4.2023

Tekijät	Jenna Koivula & Emma Saari
Otsikko	Seerumin Inhibiini B-tutkimuksen verifiointi
Sivumäärä	41 sivua + 2 liitettä
Aika	14.4.2023
Tutkinto	Bioanalytiikka
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Jaana Anttila Erikoistuva kemisti Jenny Kiviaho Ylikemisti Outi Itkonen
<p>Opinnäytetyö toteutettiin HUS Diagnostiikkakeskuksen Erikoiskemialle. Työtä aloitettaessa HUS alihankki seerumin inhibiini B-tutkimuksen Synlab alihankintalaboratoriosta. Tavoitteena oli verifioida seerumin inhibiini B-tutkimuksen menetelmä ja ottaa se käyttöön Erikoiskemian omaan tuotantoon. Tämän lisäksi tarkoituksena oli kuvata inhibiini B-tutkimuksen taustaa ja tarkoitusta, sekä avata siinä käytettävää ELISA-menetelmää. Verifiointi voidaan tehdä, jos menetelmälle on jo aiemmin tehty validointi tai siitä on kertynyt paljon käytökemusta. Verifiointilla osoitetaan menetelmän toimiminen siihen tarkoitettuun käyttötarkoitukseen.</p> <p>Inhibiinit ovat glykoproteiinihormoneja, joita erittyy naisilla munasarjojen granuloosoluista ja miehillä kivesten Sertolin soluista. Inhibiinejä käytetään monien sairauksien diagnostiikassa ja hoidon seurannassa. Ne ohjaavat myös omalta osaltaan sukurauhasten toimintaa säätelemällä follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH). Inhibiini B:n pitoisuuteen vaikuttavat ikä ja sukupuoli. Seerumin Inhibiini B –tutkimuksen analysointiin käytettiin Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) menetelmää. Sitä voidaan käyttää osoittamaan myös hyvin pieniä antigeenimääriä näytteestä, esimerkiksi peptidejä tai proteiineja. Pitoisuuden mittaaminen perustuu immunologiseen antigeeni-vasta-ainereaktioon, ja entsyymivälitteiseen värinmuutokseen, joiden avulla voidaan määrittää antigeenin pitoisuus tutkitavasta näytteestä.</p> <p>Sarjan sisäinen variaatiokerroin ja sarjan välinen variaatiokerroin laskettiin Dahlbergin kaavalla. Näillä arvioitiin verifioitavan tutkimuksen toistuvuutta. Laatutavoitteeksi oli asetettu enintään 10 % variaatio. Sarjojen välinen toistuvuus tutkittiin analysoimalla kitin mukana tulleita laadunohjausnäytteitä - kontrolli I (matala arvo) ja II (korkea arvo). Variaatiokertoimiksi tuli 6 % ja 0,8 %. Sarjan sisäiseksi variaatioksi saatiin 4,6 % laskemalla parinäytteiden variaatioprosentti ja niistä keskiarvo. Tulokset olivat alle asetetun 10 % laatutavoitteen, joten ne olivat hyväksyttävissä.</p> <p>Vertailimme HUSin analysaattorilla saatuja tuloksia Synlabissa saatuihin tuloksiin (n=91) Bland-Altman sekä Passing-Bablok-analyysissä. Passing-Bablok-regressioanalyysillä saatiin suoran yhtälöksi y (Erikoiskemian tulos) = $1,007x$ (Synlabin tulos) - $3,482$. Yhtälön suoran kulmakerroin on lähes yksi, joten menetelmien välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Bland-Altmanin analyysillä selvitettiin menetelmän absoluuttista ja suhteellista eroa. Absoluuttisen Bland-Altmanin tulos oli 4 ng/l eli tulokset eroavat keskimäärin 4 ng/l. Suhteellisen Bland-Altmanin menetelmien keskimääräinen ero oli puolestaan 9,3 %. Tulokista päätellen tutkimusta voidaan pitää luotettavana ja toistettavana. Inhibiini B tutkimus voitiin ottaa luotettavasti käyttöön Erikoiskemialla.</p>	
Avainsanat	Inhibiini B, ELISA, Verifiointi

Author	Jenna Koivula & Emma Saari
Title	The verification of the inhibin B
Number of Pages	41 pages + 2 appendices
Date	14.4.2023
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Jaana Anttila, Senior Lecturer Jenny Kiviaho, Specialist Chemist Outi Itkonen, Chief Clinical Chemist
<p>The thesis was carried out for the Laboratory of Endocrinology and Metabolism of the HUS Diagnostics Center. The aim was to verify an inhibin B assay and to find out if it could be introduced for production. In addition, the purpose was to describe the background and purpose of the inhibin B measurements and to open the ELISA technology used in it. Verification can be done if the method has already been validated or has a lot of user experience. Verification demonstrates the function of the method for its intended use.</p> <p>Inhibins are glycoproteins excreted from the ovarian granulosa cells in women and from Sertoli cells of testis in men. Inhibin B is used in diagnostic and treatment of many diseases. They also contribute to the functioning of the glands by regulating follicle stimulating hormone (FSH). Inhibin B concentration is affected by age and sex. Serum inhibin B in this study was analyzed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It is used to indicate very small amounts of antigens such as hormones, or proteins from a sample. The measurement is based on immunological antibody reactions and enzyme-mediated color change to detect the desired concentration from a particular sample.</p> <p>Intra-assay and inter-assay variation coefficients (CV) were calculated, to evaluate repeatability of the assay. A CV of 10% was set as a quality target for verification. The CV between the assays was obtained by repeated analysis of quality control samples - control I (low value) and II (high value) included in the ELISA kit. The variation was 6% and 0,8%. The intra-assay variation was 4,6 % by calculating the variation the average of pair samples i.e., the Dahlberg equation. The results were within the set 10% quality target, so they were acceptable.</p> <p>In the Bland-Altman and the Passing-Bablok analysis, we compared the results obtained at HUS with the results obtained in Synlab (n=91). The slope of the fitting line in Passing-Bablok-regression is very close to one, so the results do not differ markedly. The Passing-Bablok-regression analysis gave the equation $y = 1,077x - 3,482$. Bland Altman plot explored the absolute and relative difference between the methods. The Bland-Altman analysis revealed that the results by HUS and by Synlab differ on average by 4 ng/l. Average difference between the relative Bland-Altman methods was 9,3 %. Considering the results, ELISA for serum inhibin B is suitable for the intended use. Inhibin B can be included reliably for the laboratory's production.</p>	
Keywords	Inhibin B, ELISA, Verification

Sisällys

1	Johdanto.....	1
2	Validointi ja verifiointi	2
2.1	Verifiointisuunnitelma	2
2.2	ISO Standardit.....	3
3	Inhibiini B ja sen tutkiminen	4
3.1	Inhibiini B:n tausta	4
3.2	Inhibiini B tytöillä ja naisilla	5
3.3	Inhibiini B pojilla ja miehillä.....	7
3.4	ELISA-menetelmä	9
3.5	Inhibiini B ELISA-menetelmä.....	10
3.6	Dynex DS2.....	12
4	Opinnäytetyön tavoitteet, tarkoitus ja tutkimuskysymys.....	13
5	Opinnäytetyön menetelmät	13
5.1	Menetelmälliset lähtökohdat	13
5.2	Aineiston keruu ja keruumenetelmä	14
5.3	Toimintaympäristö, kohderyhmä, hyödynsaajat.....	14
5.4	Toiminnan etenemisen kuvaus	14
5.5	Aineiston analysointimenetelmä	16
5.6	Luvat ja tietosuojat	18
6	Tulokset.....	19
6.1	Sarjojen välinen ja sisäinen toistuvuus	19
6.2	Kahden menetelmän vertailu	20
7	Pohdinta	22
7.1	Tulosten tarkastelu	23
7.2	Luotettavuus.....	24
7.3	Eettisyys.....	25
7.4	Tulosten hyödyntäminen	26
7.5	Kehittämisehdotukset.....	26
7.6	Ammatillinen kasvu	26
	Lähteet	28

Liitteet

Liite 1. Rinnakkaisten analysointien (n=36) tulokset

Liite 2. Passing-Bablok ja Bland-Altman analyysien näytteiden tulokset.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö käsittelee seerumin inhibiini B:n tutkimuksen tarkoitusta ja käyttökohteita sekä ELISA-menettelyn periaatetta. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida inhibiini B-tutkimus käyttöön Dynex DS2-laitteelle. Tavoitteena oli ottaa kyseinen tutkimus käyttöön HUS Diagnostiikkakeskuksessa Erikoiskemialla. Verifioitava ELISA-menettelmä Ansh Labs on voittanut kilpailutuksen avoimella menettelyllä vuonna 2022. Verifiointi eli todentaminen on objektiiviseen näyttöön perustuvaa varmistumista siitä, että ennalta määritetyt vaatimukset täyttyvät (Labquality 2022). Verifiointi perustuu ISO 15189 laatustandardiin ja verifiointi aloitetaan aina tekemällä verifiointisuunnitelma (Helenius 2021).

Inhibiini B on glykoproteiinihormoni, jota erittyy naisilla munasarjoista ja miehillä kiveksistä. Helsingin Uudenmaan Sairaalan (HUS) Diagnostiikkakeskus tarjoaa asiakkailleen seerumin inhibiini B-tutkimusta, jota voidaan hyödyntää monen eri taudin tai oireen selvittelyyn. Miehillä tutkitaan hypogonadismia, infertiliteettia, anorkiaepäilyä tai murrosiän häiriöitä ja naisilla kuukautiskierron sekä murrosiänkehityksen säätelyn häiriöitä. Tutkimusta voidaan käyttää myös inhibiiniä tuottavien kasvainten seurannassa. (Kalra ym. 2010: luku 1. Introduction; Fimlab 2022.)

Enzyme immunoassay (EIA) ja enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) menetelmät ovat molemmat laajalti käytössä laboratoriolääketieteessä ja diagnostiikassa. Ne ovat myös käytössä analyttisenä työkaluna biolääketieteen tutkimuksissa, kun halutaan tutkia tiettyjä antigeenejä tai vasta-aineita näytteistä. Inhibiinin pitoisuutta verestä voidaan mitata muun muassa immunologiseen vasta-ainereaktioon perustuvalla ELISA-tekniikalla. ELISA on biokemiallinen määrittely, jossa käytetään vasta-aineita ja entsyymivälitteistä värinmuutosta. Tämän avulla havaitaan joko antigeenin läsnäolo tai vasta-aine ja sen pitoisuus tutkittavassa näytteessä. (Gran & Patel 201: 1.)

HUSLAB ja HUS kuvantaminen ovat yhdistyneet ja ovat nykyään HUS Diagnostiikkakeskus. Opinnäytetyössä puhuttaessa HUS Diagnostiikkakeskuksesta tarkoitetaan laboratoriota (ent. HUSLAB). Opinnäytetyötä aloittaessa HUS Diagnostiikkakeskus hankki inhibiini B-tutkimuksen Synlab Suomi Oy alihankintalaboratoriosta. Laboratoriossa on käytössä akkreditoitu menetelmä, jolla seeruminäytteet analysoidaan. Synlab käyttää analysoinnissa Beckman Coulterin valmistamaa inhibiini B menetelmää. Inhi-

biini B näytteitä analysoidaan kerran viikossa ja tulokset valmistuvat seitsemässä arkipäivässä. Näytemuotona toimii seerumi ja analyysiin riittää 1 ml näytettä. Huoneenlämmössä näyte säilyy kaksi tuntia. Näyte lähetetään kylmälähetystenä, mikäli se on perillä kahdeksan tunnin kuluessa. Muissa tapauksissa näyte tulee pakastaa ja lähettää pakastettuna. (Synlab 2022.)

2 Validointi ja verifiointi

Validoinnissa arvioidaan jonkin menetelmän tai laitteen soveltuvuutta aiottuun käyttötarkoitukseensa, esimerkiksi näytteiden analysointiin. Validoinnissa tuotetaan haluttuja vertailuarvoja parametreille, jotka kuvaavat tutkitun menetelmän luotettavuutta ja soveltuvuutta. Näille parametreille asetetaan etukäteen tavoitellut ominaisuuksien vaatimukset, jotka vaihtelevat käyttötarkoituksen sekä menetelmän mukaan. Vaatimukset tulee asettaa tapauskohtaisesti. Validoinnilla varmennetaan, että tulokset täyttävät säännöksiensä ja lakien vaatimukset. Laajuuteen vaikuttaa tutkittava analyysimenetelmä ja sen käyttötarkoitus. (Hägg 2016: 7–8.)

Menetelmän kelpuuttamiseen voi riittää myös kevyempi menettely eli verifiointi. Jos standardimenetelmälle on jo tehty täydellinen testaus esimerkiksi valmistajan toimesta tai siitä on kertynyt paljon käyttökokemusta, voidaan se vain verifioida. (Kemianseurat 2022.) Verifiointi on siis validointia suppeampi ja kevyempi menettely. Verifiointi menetelmälle riittää, kun mittausmenetelmä on jo muualla käytössä, ja menetelmä on jo validoitu. Verifiointi on riittävä myös, jos omassa laboratoriossa jo validoituun menetelmään tehdään muutoksia esimerkiksi laitteissa, näytteen käsittelyssä tai tietojärjestelmässä. Uusi menetelmä voidaan hyväksyä käyttöön, kun verifiointi on hyväksytty ja loppupäätelmät tehty. (Hägg 2016: 6–8.)

2.1 Verifiointisuunnitelma

Verifiointi on suoritettava ennalta laaditun verifiointisuunnitelman mukaisesti, jonka hyväksyy asianmukainen henkilökunta. Verifiointisuunnitelmassa tulee lisäksi olla määritettynä käyttötarkoitus, eli mihin tutkimusta käytetään, tutkimusmenettely, sekä mittausuure ja sen dokumentointi. Mittausuureen kuvaaminen vaatii tietoa analyysistä, analyysin kunnosta sekä käytetyn tutkimusmenettelyn ominaisuuksista. Verifiointisuunnitelmassa on lisäksi yksilöitävä tutkijat ja henkilö/henkilöt, sekä ne, joilla on asianmukaiset valtuudet ammatillisen koulutuksen ja vastuun perusteella (Roelofsen-de Beer ym. 2019.) Laatutavoitteet määritellään joko verifiointissa tai ennen verifiointia.

Menetelmän tai laitteen, joka on aiemmin jo validoitu, verifiointissa testaamiseen riittää 20–50 potilasnäytettä. Otos tulisi valita niin, että ne edustavat kattavasti koko mittausalueen tasaisesti. Mittausalueen korkeimpia tai matalampia tuloksia voi olla haastava löytää. Standardit vaativat analysoimaan minimissään 5krt/pv viiden päivän ajan laadunohjausnäytteitä eli kontrolleja. (Helenius 2021.)

Verifiointisuunnitelmaa tehtäessä tulee asettaa tuloksille vaatimustaso, joka pitää täytyä. Vaatimukset valitaan jo olemassa olevan tiedon avulla ja esimerkiksi toimintajärjestelmässä kuvatulla tavalla eli, kuinka on laboratoriossa tapana toimia. Toistettavuuden vaatimuksena voi olla esimerkiksi CV% alle 10 % tai vertailtavien tulosten ero ei saa poiketa >20 % toisistaan. HUS Diagnostiikkakeskus on laatinut oman verifiointisuunnitelman sekä verifiointi raportin toimintajärjestelmänsä mukaisesti.

2.2 ISO Standardit

Standardeilla luodaan yhteisiä toimintatapoja ja ne luokitellaan ICS-luokituksella (International Classification of Standards). Standardien tarkoituksena on suojella kuluttajia, lisätä tuotteiden yhteensopivuutta ja turvallisuutta, ja helpottaa sekä kotimaista että kansainvälistä kauppaa. (Standardi.) ISO (International Organization for Standardization) on itsenäinen, valtiosta riippumaton kansainvälinen organisaatio. ISO on julkaissut kansainväliset standardit ja niihin liittyvät asiakirjat, jotka kattavat lähes joka alan teknologiasta elintarviketurvallisuuteen, maatalouteen ja terveydenhuoltoon. (International Organization for Standardization 2020.) ISO-standardien tarkoituksena on vakiinnuttaa käytäntöjä universaalisti. Lääketieteellisen laboratorion laatu- ja pätevyysvaatimuksia ohjaa ISO-standardi ISO 15189. Henkilöstöön, ympäristöolosuhteisiin, laboratorioanalyysointoreihin, reagensseihin ja tarvikkeisiin sovelletaan saman standardin teknisiä vaatimuksia. Lisäksi sitä sovelletaan tutkimusten tulosten laadun varmistamisessa, tulosten raportoinnissa, sekä tietojärjestelmien hallinnassa. (Pereira 2020.)

Standardit perustuvat riskienhallintaan, jossa laboratorioammattilaiset varmistavat, että paikalliset vaatimukset täyttyvät heidän työskentelytilansa ja -tapojensa olosuhteissa. ISO-standardi 15189 ohjaa lääketieteellisten laboratorioden henkilökunnan tekemistä sekä siihen liittyviä kelpoisuusvaatimuksia. Tutkimusmenettelyjen validoinnissa ja verifiointissa tämä tarkoittaa, että laboratorion ammattilaiset käyttävät omaa harkintakykyään siihen, mitkä ominaisuudet tarvitsevat arviointia saavuttaakseen halutun laadun. ISO 15189: 2012 mukaan laboratorion on ennen uuden tutkimusmenetelmän käyttöön

ottamista tehtävä sille validointi tai verifiointi. Tutkimusmenetelmän on sovelluttava aiottun laboratoriolääketieteellisen diagnostiikan käyttötarkoitukseen ja sen tulee täyttää asiaankuuluvat hyväksymiskriteerit. (Roelofsen-de Beer ym. 2019.)

3 Inhibiini B ja sen tutkiminen

3.1 Inhibiini B:n tausta

Opinnäytetyön keskiössä ovat inhibiinit ja erityisesti inhibiini B, jota tutkitaan käyttäen ELISA-menetelmää. Inhibiini B on transformoiva kasvutekijä beeta (TGF β) suurperheeseen kuuluva glykoproteiinihormoni, joka koostuu alfa-alayksiköstä (α) ja beeta-B-alayksiköstä (β B). Sitä erittyy naisella munasarjojen granuloosasoluista ja miehillä kives-ten Sertolin soluista. Tämän lisäksi sitä tuotetaan jonkin verran myös lisämunuaisissa. Inhibiini B ohjaa osaltaan sukurauhasten toimintaa säätelemällä aivolisäkkeen etulohkosta erittyvää munarakkuloita kypsyttävää eli follikkeliä stimuloivaa hormonia (FSH). (Vänttinen 2003.) FSH stimuloi naisilla munarakkuloiden kasvua sekä naishormonin eli estradiolin eritystä. Miehillä FSH:n tuotanto vaikuttaa sukusolujen tuotantoon. (Eerola 2022.)

Kliinisessä lääketieteessä inhibiinejä käytetään nykyään muun muassa merkkiaineena munasarjakasvainten, erityisesti granuloosasolukasvainten diagnostiikassa sekä hoidon seurannassa (Färkkilä ym. 2015). Tämän lisäksi inhibiinin pitoisuuksia naisilla voidaan hyödyntää kuukautiskierron ja puberteettikehityksen häiriöiden selvittämiseen ja miehillä testosteronin puutoksen eli hypogonadismien, infertiliteetin, anorkiaepäilyn sekä puberteettihäiriöiden selvittämiseen (Synlab 2022). Määrittystä voidaan myös hyödyntää vastasyntyneen sukupuolen selvityksessä (Anttonen & Itkonen 2023).

Seerumin inhibiini B pitoisuus vaihtelee iän ja sukupuolen välillä. Työillä ja naisilla kuukautiskierron vaihe saattaa vaikuttaa tulostasoihin, jonka vuoksi näytteenotto tulisi suorittaa kuukautiskierron 3.–5. päivänä. (Anttonen & Itkonen 2023, Synlab 2022.) Murrosikäisillä pojilla pitoisuudet puolestaan riippuvat puberteetin vaiheesta. Tulosten tulkin- nassa on siis aina huomioitava kliininen kokonaiskuva. (Anttonen & Itkonen 2023.)

3.2 Inhibiini B tytöillä ja naisilla

Tytöillä ja nuorilla naisilla inhibiinin pitoisuudet nousevat murrosiän alkaessa. Tämän vuoksi inhibiini B:n mittauksen avulla pystytään arvioimaan sukupuolirauhasten kypsyttää, sekä diagnosoimaan tyttöjen ennen aikaista murrosikää. Naisten saavuttaessa lisääntymisiän, inhibiini B:n tasot muuttuvat kuukautiskierron mukana. Inhibiini B on tärkeässä roolissa, sillä se säätelee follikkelia stimuloivan hormonin (FSH) pitoisuutta. (Laboratory Corporation of America 2022.) Taulukossa 1 on listattuna tyttöjen inhibiini B:n viitearvot 15-vuoteen asti.

Taulukko 1. Inhibiini B viitearvot tytöt (Synlab 2022).

Ikä	Viitearvo (ng/l)
Napanuoraveri	Alle 18
Alle 3 kuukautta	Alle 226
3–5 kuukautta	Alle 208
6–8 kuukautta	Alle 152
9–11 kuukautta	Alle 67
12–20 kuukautta	Alle 52
21–23 kuukautta	Alle 66
2–5 vuotta	Alle 72
6–9 vuotta	Alle 130
10–11 vuotta	Alle 186
12–15 vuotta	20–360

Päivää, jolloin kuukautisvuoto alkaa kutsutaan kuukautiskierron ensimmäiseksi päiväksi. Ovulaatio tapahtuu noin kierron 14. päivänä. Tätä ajanjaksoa ennen ovulaatiota

kutsutaan follikulaariseksi vaiheeksi. Luteaalivaiheeksi puolestaan kutsutaan follikulaarisen vaiheen jälkeistä ajanjaksoa, ennen kuukautisvuotoa, jolloin keltarauhanen (luteaalirauhanen) tuottaa progesteronia. (Niemelä & Pulkki 2014: 152.) Menopausi merkitsee aikaa, jolloin kuukautiskierto loppuu. Se diagnosoidaan, kun kuukautisia ei ole ollut 12 kuukauteen. (Hall 2015.)

Munasarjassa kehittyvien munarakkuloiden granuloosasolut erittävät inhibiini B:tä (ei-steroidihormoni) ja estrogeenia (steroidihormoni). Molemmat estävät follikkeliä stimuloivan hormonin (FSH) eritystä. Inhibiini B vaikuttaa suoraan negatiivisesti aivolisäkkeeseen, johtaen FSH:n erityksen vähenemiseen. Tämän vuoksi lisääntymisikäisten naisten korkea inhibiini B:n pitoisuus seerumissa on yksi tärkeimmistä tekijöistä FSH:n alhaisen pitoisuuden ylläpitämiseksi seerumissa. Ikääntyessä sekä munarakkuloiden laatu että määrä vähenevät, johtaen vähitellen seerumin inhibiini B:n pitoisuuden laskuun ja FSH:n estovaikutuksen heikkenemiseen. (Wen ym. 2021.)

Inhibiini B:n pitoisuudet ovat follikkelivaiheessa korkeat, ja arvot nousevat entisestään ovulaatiovaiheessa. Pitoisuus romahtavaa kuitenkin taas luteaalivaiheessa. Postmenopausi vaiheessa olevilla naisilla inhibiini B:n taso on yleensä mittaamattoman matala, koska sitä tuottava granuloosasolut puuttuvat. (Laboratory Corporation of America 2021.) Taulukossa 2. on esiteltyä naisten ja tyttöjen inhibiini B:n pitoisuuksia eri kuukautiskierron vaiheissa.

Taulukko 2. Naiset ja yli 16-vuotiaat tytöt, joiden kuukautiskierto on säännöllistynyt (Synlab 2022).

Kuukautiskierron vaiheet	Viitearvo (ng/l)
Follikkelivaihe	30–90
Kuukautispäivä 1.–2.	15–70
Kuukautispäivä 3.–5.	45–120
Luteaalivaihe	Alle 50
Ovulaatiohuippu	80–200
Postmenopausi	Alle 10

3.3 Inhibiini B pojilla ja miehillä

Pojilla ja miehillä inhibiini B:tä tuottavat kivesten Sertolin solut toimivat FSH:n erityksen ensisijaisena säätelijänä, joka on havaittavissa läpi koko elämän. Inhibiini B:n pitoisuudet ovat suhteellisen korkeat vastasyntyneillä poikavauvoilla, mutta laskevat vähitellen ikääntyessä. Lapsuuden aikana seerumin inhibiini B:n perustasoja on käytetty kiveskudoksen läsnäolon ja toiminnan merkkiaineena. (Laboratory Corporation of America 2021.) Inhibiini B:n pitoisuudet pysyvät matalina murrosikästä asti, kunnes ne jälleen nousevat. Tämä on ensin FSH:n stimulaation seurausta ja sitten yhdistetyn FSH:n säätelyn sekä jatkuvan spermatogeneesin eli siittiöiden muodostuksen seurasta. Aikuisella seerumin inhibiini B:llä on selkeä vuorokausivaihtelu, joka liittyy läheisesti testosteronin erityksen vaihteluun. Inhibiini B:n tuotannon säätely muuttuu läpi elämän. (Meachem & Nieschlag & Simoni 2001.) Taulukossa 3. on listattuna poikien ja miesten inhibiini B viitearvot.

Taulukko 3. Inhibiini B viitearvot pojat ja miehet (Synlab 2022).

Ikä	Viitearvo (ng/l)
Napanuoraveri	87–243
Alle 2 vuorokautta	128–300
2–6 vuorokautta	152–486
7–9 vuorokautta	180–420
10–13 vuorokautta	227–405
14–19 vuorokautta	200–362
20–29 vuorokautta	268–450
30 vuorokautta – 2 kuukautta	254–513
3–5 kuukautta	204–427
6–8 kuukautta	126–500
9–11 kuukautta	94–383
12–14 kuukautta	71–272
15–17 kuukautta	96–245
18–20 kuukautta	80–248
21–23 kuukautta	71–204
2–9 vuotta	Alle 258
10–15 vuotta	Alle 400
Yli 16-vuotiaat	120–400

Murrosikä eli puberteetti on siirtymävaihe, jossa nuori kasvaa ja kehittyy lapsesta aikuiseksi, ja sen tarkoituksena on saavuttaa sukukypsyys. Puberteetin vaiheita on luokiteltu kliinisesti Tanner-luokituksen mukaan. Se perustuu ulkoisten sukupuolikehityksen merkkien konkreettisesti havaittaviin muutoksiin. Taulukossa 4 on kuvattuna poikien inhibiini B pitoisuuksia eri puberteettivaiheessa Tanner asteikolla 1–5. (Marttila 2020.)

Taulukko 4. Pojat puberteettivaihe Tanner (Synlab 2022).

Puberteetinvaihe	Viitearvo (ng/l)
Tanner I	35–182
Tanner II	62–338
Tanner III	78–323
Tanner IV	67–304
Tanner V	120–400

3.4 ELISA-menetelmä

Vasta-aineet kuuluvat valkuaisaineisiin, joita kutsutaan immunoglobuliineiksi (Ig). Vasta-aine muodostuu spesifin antigeenin vaikutuksesta. Antigeeni on puolestaan aine, joka herättää immuunivasteen, jonka seurauksena muodostuu vasta-aineita. Vasta-aine reagoi spesifisesti tietyn antigeenin kanssa. (Terveyskirjasto 2016.) ELISA-menetelmä käyttää immunologian peruskonseptia, jossa vasta-aine sitoutuu antigeeniin. Tämä mahdollistaa hyvin pienten antigeenimäärien, kuten esimerkiksi hormonien tai proteiinien havaitsemisen tai kvantitoinnin näytteestä. ELISA-menetelmä voi olla joko kompetitiivinen eli yhtä vasta-ainetta hyödyntävä tai sitten non-kompetitiivinen kahta vasta-ainetta hyödyntävä ns. "sandwich"-menetelmä. Valtaosa kaupallisista ELISA-menetelmistä on non-kompetitiivisia. ELISA-menetelmässä antigeenien annetaan ensin sitoutua yhteen sille spesifiseen kiinteään faasin sidottuun vasta-aineeseen. Myöhemässä vaiheessa antigeeniin sitoutuu toinen, entsyymiin konjugoitu vasta-aine. Antigeenin läsnäolo voidaan osoittaa värimuutoksella, jonka tuottaa entsyymin kromogeeninen substraatti. ELISA-menetelmä voi olla kvantitatiivinen tai kvalitatiivinen riippuen,

millaisella mittarilla arvioidaan kolorimetrisiä lukemia. ELISA-teknologiaa voidaan käyttää useaan eri testiin vaihtamalla käytettyjä vasta-aineita. (Gran & Patel 2013: 1–2.)

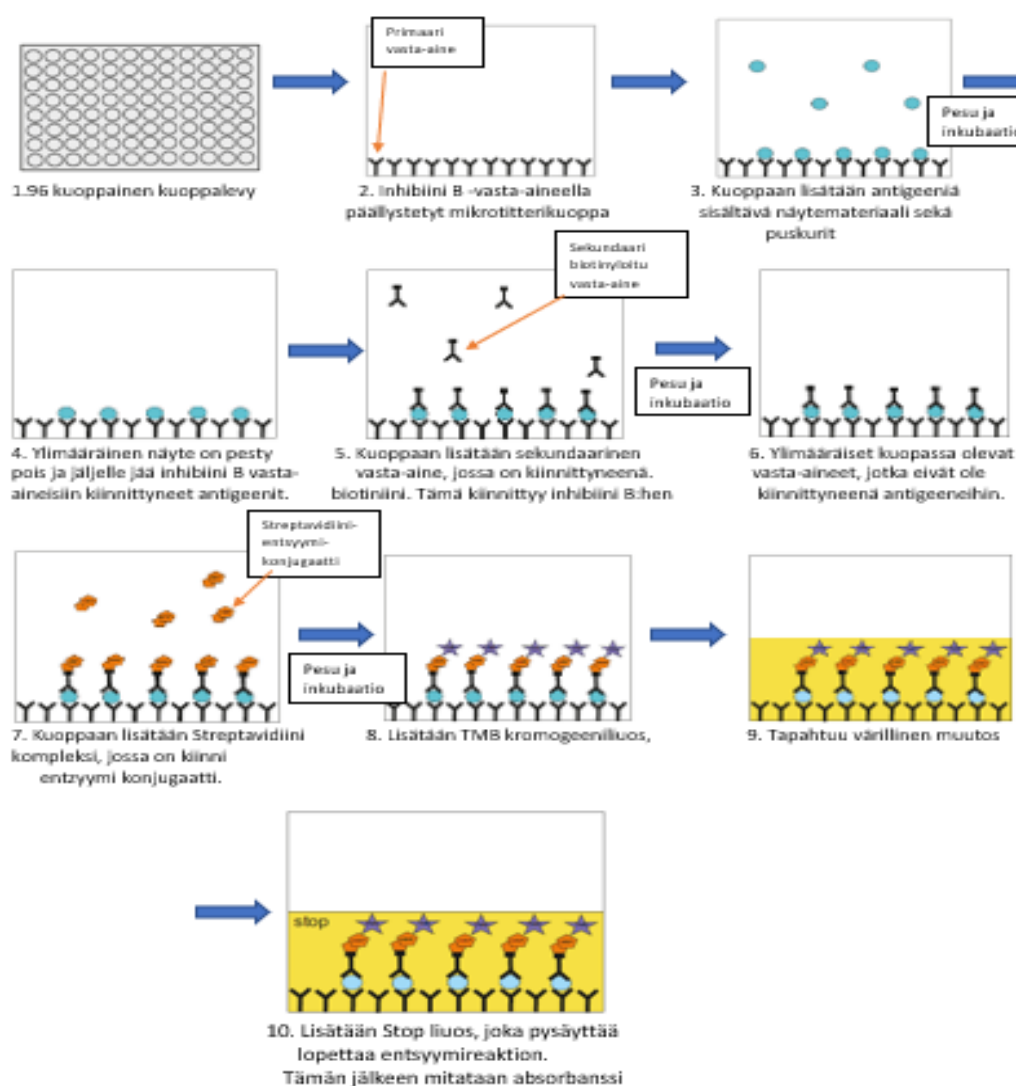
Sandwich-tekniikkaa käytetään osoittamaan tiettyä antigeeniä näytteestä. Kuoppalevyn kuoppien pintaan on kiinnitetty tutkittavalle yhdisteelle spesifiä vasta-ainetta, jotta saadaan vangittua haluttu antigeeni näytteestä. Kuoppiin lisätään puskuria ja tutkittavaa näytettä. Näytteen lisäämisen jälkeen levyä inkuboidaan, jotta tutkittava antigeeni ehtii tarttua kiinteän faasin vasta-aineeseen. Sen jälkeen pestään kiinteään faasiin sitoutumaton aine pois. Sitten kuoppiin voidaan lisätä toinen spesifinen vasta-aine, johon on konjugoitu jokin entsyymi ja inkuboidaan uudestaan. Näin vasta-aineiden annetaan kerrostaa antigeeni. Inkubaation jälkeen sitoutumattomat vasta-aine-entsyymi-konjugaatit pestään pois kuopista. Kuoppaan lisätään substraatti, joka vaihtaa väriä konjugoidun entsyymin vaikutuksesta. Värimuutos voidaan mitata tyypillisesti spektrofotometrillä. (Gran & Patel 2013: 1–2.)

3.5 Inhibiini B ELISA-menetelmä

Inhibiini ”löydettiin” vuonna 1985, jonka jälkeen odotukset niiden käyttämisestä sairauksien diagnostiikassa olivat suuret. Pitkään ongelmana oli kuitenkin laadukkaiden määrittymenetelmien puute, eikä inhibiinin määrittystä otettu laajaan käyttöön. (Bläuer & Vihko 1997.) Tuolloin käytössä ollut analyysi oli rajallinen toiminnoiltaan, koska se tunnisti yksinomaan inhibiinin alfa-alayksikön eikä siten pystynyt erottamaan vapaita alfa-alayksiköitä ja dimeerisiä inhibiinejä tai erottamaan inhibiini A:ta ja B:ta. Kehityksen ja ajan myötä inhibiini alfa- ja beeta-alayksikköjä vastaan kehitettiin monoklonaalisia vasta-aineita, joita hyödyntämällä voitiin kehittää spesifisiä immunologisia inhibiini A ja B menetelmiä. (Makanji ym. 2014.) Monoklonaaliset vasta-aineet ovat laboratoriossa tuotettuja, vain tiettyä antigeeniä tunnistavia vasta-aineita, jotka käyttäytyvät kuin ihmisen immuunijärjestelmän vasta-aineet (American Cancer Society 2023).

Tässä työssä verifioitu inhibiini B:n ELISA on kvantitatiivinen sandwich-tyyppinen immunomääritys. Ensiksi kalibraattorit, kontrollit ja halutut näytteet pipetoidaan mikrotitrauskuoppiin, joissa inhibiini B-vasta-aine on kiinnitettynä kuoppien seinämiin. Kuoppiin lisätään puskuria A (Assay Buffer A), joka on proteiinipohjainen (naudan albumiini) ja B (Assay Buffer B), jotka on optimoitu estämään epäspesifistä sitoutumista kiinteän faasin vasta-aineeseen. Näiden jälkeen kuoppalevyä inkuboidaan ja kuopat pestään sitoutumattomasta aineesta pois ja Inhibiini B jää kiinnittyneenä mikrotitrauskuoppien seinillä olevaan inhibiini B-vasta-aineeseen. Ensimmäisen vaiheen jälkeen kuopat inku-

boidaan toisen biotinyloidun inhibiini B-vasta-aineen kanssa, joka valmistetaan yhdistämällä kittiin kuuluvat Biotin Conjugate -konsentraatti ja -diluentti. Näiden yhdistäminen tehdään juuri ennen pipetointia, koska seos on herkkä ympäristön olosuhteille. Mikrotitrauskuoppiin lisätään streptavidini kompleksi, jossa on kiinni entsyymi (HRP) ja sen jälkeen kuoppalevyä inkuboidaan. Streptavidini sitoutuu spesifisesti biotiiniin. Tämän jälkeen lisätään vielä entsyymin substraatti eli kromogeeniliuos (TMB) ja kuoppalevyllä suoritetaan viimeinen inkubaatio. Entsyymien vaikutuksesta kromogeeniliuos muuttuu värilliseksi. Viimeisen inkubaation jälkeen lisätään pysäytysliuos, joka lopettaa entsyymireaktion. Kitin ohjeesta poiketen ohjelman loppuun lisättiin kuoppalevyn sekoitus, jotta pysäytysliuos leviää koko näytteeseen. Ohjeistuksen tämän lisäämiseen saimme kemistiltä. Pysäytysliuoksen jälkeen suoritetaan absorbanssin mittausta 450nm aallonpituudella. (AnshLab 2014.) Inhibiini B:ssä tapahtuva ELISA menetelmä on kuvattu kuviossa 1.

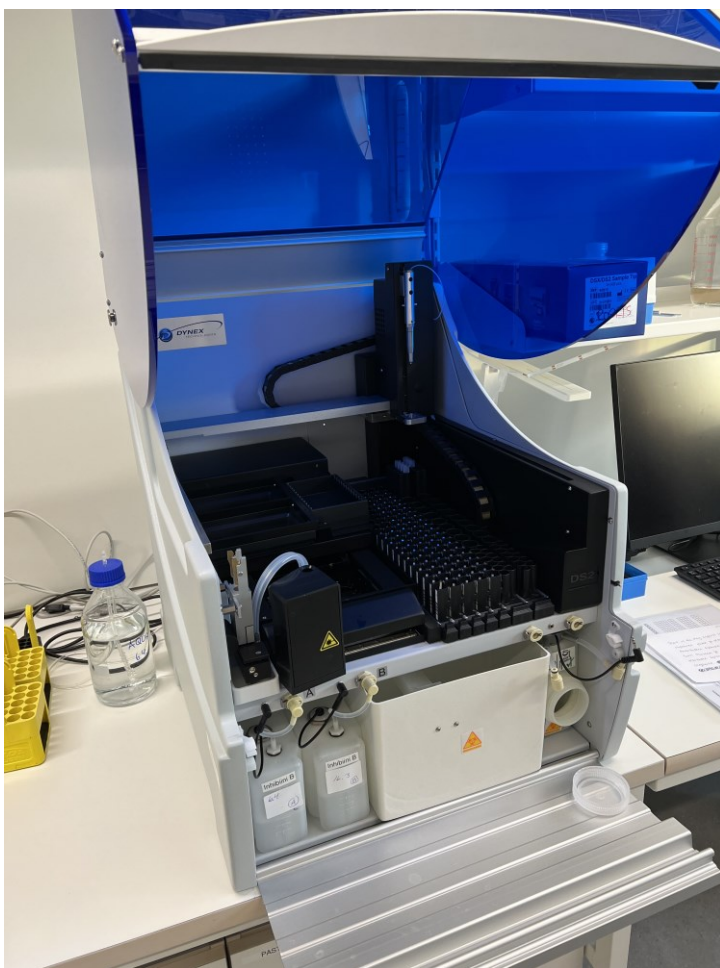


Kuvio 1. Piirros ELISA-menetelmästä inhibiini B-tutkimuksessa.

3.6 Dynex DS2

Inhibiini B -tutkimus verifioitiin Dynex DS2-laitteelle. Täysautomaattinen DS2-ELISA-analysaattori on avoin ja joustava järjestelmä, jota pystytään käyttämään lähes mihin tahansa ELISA-sovellukseen kliinisessä diagnostiikassa. Käyttäjän tulee suorittaa tietyt toimenpiteet ennen analyysien suorittamista. Näitä ovat näytteiden lataaminen ja työluettelon luominen (asetetaan näytteille suoritettavat analyysit), tarvikkeiden riittävyyden tarkistaminen, sekä levyjen lataaminen ja ohjelman käynnistäminen. (Clindia 2019: 9–60.)

Dynex DS2-laite sisältää kaksi näytekärkitelinettä, viivakoodinlukijan, liukuvat näyte-, reagenssi- ja kontrollitelineet, kahden levyn inkubaattorin, kaksi erillistä näytelevyn siirtäjää, käyttöpaneeli puskureille, jätetullolle ja näytekärkien jätteestialle sekä laimennuskaivojen teline (Dynex Technologies 2023). Kansi suojaa analysaattoria muun muassa valolta ja pölyltä. Kuvassa 1 on Dynex DS2 laite.



Kuva 1. Erikoiskemian Dynex DS2 laite.

4 Opinnäytetyön tavoitteet, tarkoitus ja tutkimuskysymys

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida inhibiini B-tutkimus DS2-analysaattorille HUS Diagnostiikkakeskuksen Erikoiskemialla osana tutkimuksen aiottua kotiuttamisprosessia Synlab Suomi Oy:stä. Tämä tehtiin arvioimalla aineistosta analysoituja tuloksia ja pohdittiin, olivatko ne luotettavia ja toistettavissa. Tarkoituksena oli myös verifiointin merkityksen selventäminen. Verifiointilla varmistettiin, että laitteella ja siinä käytettävällä ELISA-menetelmällä saadaan luotettavia tuloksia potilaiden näytteistä tulevaisuudessa. Tavoitteena oli saada inhibiini B-tutkimus käyttöön Erikoiskemialle. Inhibiini B-tutkimuksen tekeminen Erikoiskemian laboratoriossa on taloudellisesti kannattavampaa kuin alihankinta. Näytteet saadaan analysoitua nopeammin, jolloin tulokset saadaan aikaisemmin hoitavalle taholle ja lääkäreille, jotka hyödyntävät niitä ja tulkitsevat ne potilaalle. Myös näytteiden säilyttämisestä sekä lähettämisestä johtuvat preanalyttiset virhetekijät voivat vähentyä. Näytteitä ei välttämättä tarvitse pakastaa ja lähettää, joten riski näytteiden sulamiseen pienenee.

Työn tavoitteena oli saada vastaukset tutkimuskysymyksiin:

- Voidaanko inhibiini B- tutkimuksen menetelmä ottaa käyttöön Erikoiskemialla?
- Mitä tarkoittaa verifiointi?

5 Opinnäytetyön menetelmät

5.1 Menetelmälliset lähtökohdat

Tutkimukset on mahdollista jakaa karkeasti kahteen eri kategoriaan - teoreettisiin ja empiirisiin tutkimuksiin. Teoreettinen tutkimus perustuu aiempien havaintojen käyttämiseen perustana teorianmuodostamisessa, eikä tässä kerätä uusia tietoja. Empiirisessä tutkimuksessa käsitellään mittaustuloksia, jotka saadaan aistihavainnoista tai mittausanalysaattoreilla. (Nummenmaa & Holopainen & Pulkkinen 2017: 13–16.) Opinnäytetyö toteutettiin empiirisenä tutkimuksena. Empiirisen tutkimuksen yksi ryhmistä on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus, joka vastaa kysymyksiin mikä, missä, paljonko ja miksi. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa edellytetään, että on riittävän suuri sekä edustava otos. Ilmiöt kuvataan numeerisesti ja usein selvitetään asioiden välisiä riippuvuuksia tai tapahtuneita muutoksia. (Heikkilä 2014: 7–8.)

5.2 Aineiston keruu ja keruumenetelmä

Näytteiden kerääminen tapahtui syksyllä 2022 asiakkailta, joilta oli pyydetty inhibiini B-tutkimus osana hoitosuunnitelmaa. Analyysiin kävi sekä seerumigeeliputkeen, että geelittömään seerumiputkeen otettu näyte. Automaatiolaboratorion näytteiden vastaanotto erotteli näytteet heti, kun ne saapuivat sinne. Näytteet sentrifugoitiin kierroksilla 2000 g 10 minuutin ohjelmalla. Seerumi eroteltiin kahteen lisäaineettomaan erotteluputkeen. Tämän jälkeen näytteiden vastaanotto lähetti toisen erotteluputken analysoitavaksi Synlabiin ja säilöi toisen erotteluputken pakkaseen -20 asteeseen. Näytteet säilytettiin pakkasessa niin pitkään, kunnes niitä tarvittiin analysointia varten. Näytteet olivat luotettavasti esikäsitelty, koska ne oli käsitelty samalla tavalla kuin kaikki potilasnäytteet.

Näytteiden vastaanotto oli kerännyt inhibiini B näytteitä noin 200–250 kappaletta, joista valikoitui analysointia varten 91 eri näytettä. Tutkimukseen valikoitui tarpeeksi laaja pitoisuusalue inhibiini B näytteistä, jotka oli analysoitu Synlabissa. Mukaan valittiin mahdollisimman paljon eriarvoisia tuloksia ja näytteiden lukumäärää voidaan pitää edustavana otoksena. Analysaattorista saadut tulokset syötettiin Microsoft Office Excel –ohjelmaan. Tulosten analysointiin käytettiin ohjelman tilastollisia menetelmiä ja laskentataulukko-ohjelmaa. Käytettyjä menetelmiä esitellään kappaleessa 5.3 Aineiston analysointimenetelmä.

5.3 Toimintaympäristö, kohderyhmä, hyödynsaajat

Toimintaympäristönä toimi Erikoiskemian osasto. Opinnäytetyön kohderyhmänä oli asiakkaat, joilta lääkäri oli määrännyt inhibiini B-tutkimuksen määritettäväksi. Lisäksi tutkimuksen kohderyhmään kuului myös Synlab Suomi Oy:n inhibiini B-tutkimuksen analysointia suorittanut laboratorioalan yksikkö. Hyödynsaajana oli HUS.

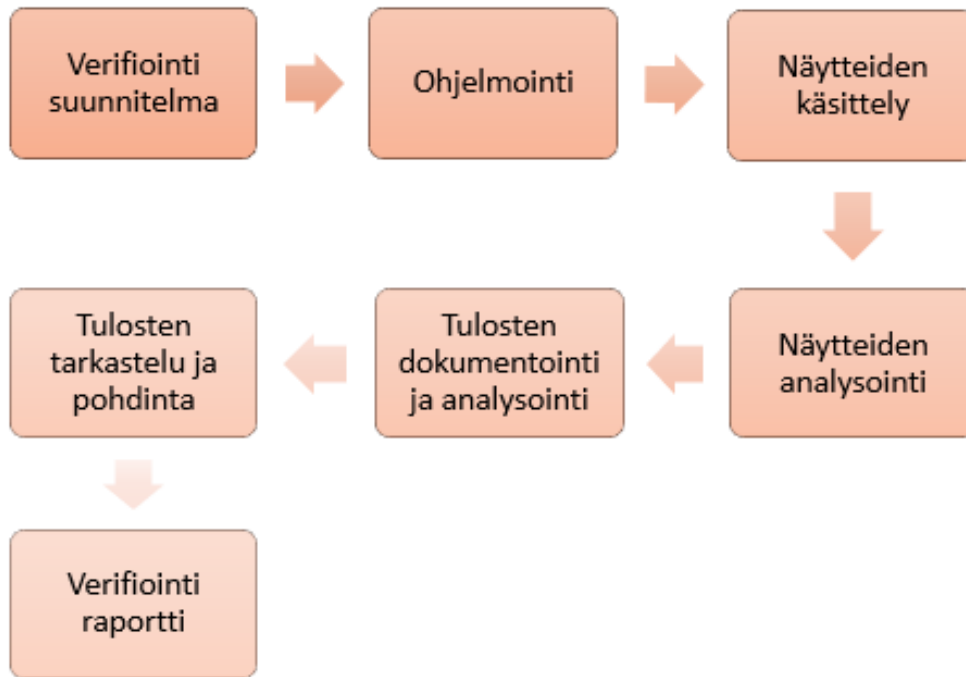
Kaikki tuotoksien ja materiaalien oikeudet luovutettiin kokonaisuudessaan HUS Diagnostiikkakeskuksen käyttöön. Heillä on myös oikeus käyttää ja päivittää materiaalia.

5.4 Toiminnan etenemisen kuvaus

Opinnäytetyön prosessin etenemistä kuvataan prosessikuviossa (kuvio 2), jossa on merkittynä eri vaiheet opinnäytetyöstä. Ensimmäiseksi tuli luoda verifiointisuunnitelma, jonka pohjalta lähdettiin työstämään verifiointia.

Verifiointin toteuttaminen aloitettiin ohjelmoimalla Dynex DS2-laitteelle ohjelma, jonka avulla analysaattori analysoi näytteet. Ohjelmoimiseen käytettiin DS-Matrix 1.40.3 ohjelmaa, joka oli valmiiksi asennettuna laitteen yhteydessä olevalle Erikoiskemian tietokoneelle. DS-Matrix 1.40.3. -ohjelmassa oli valmiiksi "stimulation mode", missä pystyi luomaan uusia ohjelmia. Erikoiskemian kemistiltä saatiin apua sekä ohjelman käyttämisessä että sen luomisessa. Ohjelma luotiin Inhibiini B-tutkimukseen käytettävän kitin AL-107-i mukana tulleen käyttöohjeen mukaan. Lisäksi mallia otettiin aiemmin kyseisellä ohjelmalla tehdyistä ohjelmista (Elastaasi ja Calpro) ja verrattiin inhibiini B:n analysointi ohjelmaa näihin. Ennen potilasnäytteiden analysointia, testattiin ohjelman toimivuutta ensimmäisen kerran vedellä. Onnistuneen vesitestauksen jälkeen pystyttiin aloittamaan näytteiden analysointi.

Käytetyn kitin ohjeiden mukaan näytteet säilyvät jääkaapissa $+4^{\circ}\text{C}$, jos analysointi suoritetaan 24 tunnin kuluessa, muuten pakastettuna -20°C tai -80°C . Kitin ohjeissa oli myös mainittu, että näytteet kestäisivät sulattamisen ja uudelleen pakastamisen jopa kolme kertaa. Näytteiden analysointi aloitettiin suunnitelman mukaisesti. Aloittamisen jälkeen huomattiin, että kontrollit ja vakiot eivät menneet tavoitearvoihin. Syytä huonoihin tuloksiin yritettiin selvittää suorittamalla lisää testauksia laitteelle. Virheellisten tulosten syyksi selvisi laitevika, sillä laitteen pipetoidessa reagensseja kävi sama pipetointikärki vuorollaan jokaisessa reaktiokaivossa liian syvällä. Laitteelle jouduttiin tilaamaan huolto, jonka vuoksi varsinaisten näytteiden analysointi viivästyi. Tästä syystä päätettiin, että Erikoiskemian kemisti jatkaa näytteiden analysointia ja tulosten kirjaamista, jotta inhibiini B saataisiin tavoiteaikataulun mukaisesti omaan tuotantoon. Tämän vuoksi myös lopullinen verifiointiraportti toteutettiin Erikoiskemian asiantuntijoiden toimesta. Tulosten laskemista varten saatiin analysoitujen näytteiden data. Saadusta datasta analysoitiin Bland-Altman sekä Passing-Bablok- regressioanalyysi. Näiden lisäksi laskettiin myös sarjojen sisäisen variaation hyödyntäen Dahlbergin kaavaa ja sarjojen välisen toistuvuuden. Tuloksista pohdittiin niiden merkitystä sekä sitä, että pystyttiinkö inhibiini B ottamaan käyttöön Erikoiskemian omaan tuotantoon.



Kuvio 2. Prosessikaavio.

5.5 Aineiston analysointimenetelmä

Tuloksia verrattiin alihankintalaboratorion antamiin tuloksiin Passing-Bablok ja Bland-Altman analyysillä. Tulostason vertailu suoritettiin kerätyillä potilasnäytteillä. Ei-parametrisellä Passing-Bablok-regressioanalyysillä voidaan osoittaa eri menetelmien välinen lineaarinen yhteys, toisin sanoen yhtälön $y = a + b x$ parametrit a ja b . Kerroin lasketaan ottamalla kaikkien kahden pisteen välisten suorien kulmakertoimien mediaani, lukuun ottamatta suoria, joille $b=0$ ja tai $b=\infty$. Parametri a lasketaan $a = \text{mediaani}(y_i - b x_i)$. Sekä a :lle että b :lle lasketaan 95 % luottamusvälit. Passing-Bablok menetelmä on pätevä vain, kun x :n ja y :n välillä on lineaarinen suhde. (MedCalc 2022.)

Bland-Altman-analyysillä voidaan selvittää kahden kvantitatiivisen menetelmän absoluuttinen ja suhteellinen ero. Bland-Altmanin kuvaajassa vaakasuorat viivat rajataan määrittämällä mittausten keskimääräinen ero (mean). Lisäksi määritetään sovitut rajat (LoA). (MedCalc 2022.) Sovittujen rajojen sisään lukeutuu 95 % mittausten välisistä eroista (Giavarina 2015). Kuvaajaa voidaan käyttää tunnistamaan satunnaista virhettä tai systemaattista poikkeamaa. Mikäli kahden mittauksen keskiarvon ero on jatkuvasti positiivinen tai negatiivinen voi se viitata systemaattiseen poikkeamaan mittaustekniikassa. (DATAtab 2023.)

Sarjan sisäinen toistuvuus (CV_{sis}) laskettiin kahden rinnakkaisen tuloksen variaatiosta Dahlbergin kaavalla. Tämä toteutettiin analysoimalla parinäytteet potilasnäyttemateriaalista. Lisäksi laskettiin sarjojen välinen toistuvuus (CV_{vai}), jossa kirjattiin kontrollinäytteiden toteuma verifiointin aikana. Näyte materiaalina toimi kitin omat päivittäiskontrollit, joita oli kahta eri tasoa. Sarjan sisäinen toistuvuus kertoo menetelmän toistettavuutta samoissa mittaolosuhteissa yhden mittaussarjan sisällä. Sarjojen välinen toistuvuus taas kertoo menetelmän toistettavuuden laboratoriossa eri päivänä, eri laitteilla, eri tarvikkeilla tai jopa eri henkilön suorittamana. (Hägg 2016.) Toistuvuus tarkoittaa mittauksen täsmällisyyttä, joka saavutetaan toteuttaessa määrittäminen toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Tällaisia toistuvuusehtoja voivat esimerkiksi olla samat tekijät, laitteet, reagenssit ja lämpötilat. Toistuvuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä eri pitoisista näytteistä. Yleisesti ottaen sarjojen sisäinen vaihtelu on sarjojen välistä vaihtelua pienempää. Tämän vuoksi, jos sarjojen välinen hajonta on merkittävästi suurempi kuin sarjojen sisäinen hajonta, esiintyy sarjojen välillä todellista hajontaa. Syy vaihteluun on aina pyrittävä selvittämään. (Metrologian neuvottelukunta 2011.)

Dahlbergin menetelmää pystytään hyödyntämään tutkimusten välisen virheen varianssin arvioimiseksi. Menetelmä olettaa, että näytteellä on normaalijakauma ja se ei ole puolueellinen. Toisen ja ensimmäisen mittauksen välisen eron varianssi on yhtä suuri kuin ensimmäisen ja toisen mittauksen virheiden varianssien summa. Dahlbergin hajonta saatiin käyttämällä kaavaa (kuvio 3), jossa d on ensimmäisen ja toisen mittauksen välinen ero ja n on näyttemäärän koko. (Hae-Young 2013.)

Luottamusväli eli CI (confidence interval) on parametrin estimoinnin luotettavuutta kuvaava mitta. Se kuvaa perusjoukosta lasketun tuntemattoman parametriarvon sijaintia. Yleisin käytetty luottamusväli on 95 %, joka saadaan estimoidun keskivirheen ja t-jakauman 95 % jakaumapisteiden avulla. Tämän lisäksi voidaan myös käyttää muun muassa 90 %, 99 % tai 99,9 % luottamusväliä. (Tilastokeskus.)

Keskiarvo ilmoittaa, mihin kohtaan muuttujan jakauman keskikohta mitatulla alueella asettuu. Se on niin sanotusti keskiluvuista kaikkein yleisin. Keskihajonta eli SD puolestaan kertoo, kuinka keskittyneitä havainnot ovat eli kuinka kaukana havainnot ovat keskimäärin keskiarvosta. Keskimääräisen etäisyyden ollessa suurempi, on myös jakauma vähemmän keskittynyt. (Tilastokeskus.)

Variaatiokerroin eli CV% on tilastollinen hajontaluku, jota pystytään hyödyntämään jatkuvien muuttujien vertailussa. Se saadaan laskemalla rinnakkaisten tuloksen keskihajonta, joka jaetaan rinnakkaisten tulosten keskiarvolla. Variaatiokerroin ilmaistaan

yleensä prosenttilukuna. (Tilastokeskus.) Kuviossa 4. on esitettyä Dahlbergin variaatiokerroin, jota hyödynnettiin tulosten analysoinnissa.

$$S(d) = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

Kuvio 3. Kaavasta saadaan Dahlbergin hajonta ($S(d)$), jossa lasketaan kahden eri mittauksen erotusten neliöiden (d^2) summa, jaettuna näytteiden lukumäärä kerrottuna kahdella. Näiden tulos laitetaan neliöjuureen. (Coelho & de Souza Galvao & Sato 2012.)

$$CV\% = \frac{S(d)}{k_a} \cdot 100\%$$

Kuvio 4. Kaaviossa lasketaan Dahlbergin hajonta jaettuna mittausten keskiarvojen keskiarvolla. Tulos kerrotaan 100 %:lla, jolloin saadaan Dahlbergin variaatiokerroimen kaava (CV%). Näin saadaan selville kahden eri tuloksen tasoero. (Tilastokeskus.)

5.6 Luvat ja tietosuojat

Opinnäytetyön tutkimuslupaa tulee hakea, jos kohteena ovat potilaat tai potilaista otetut kudokset tai näytteet. Lisäksi tarvitaan opinnäytetyön tutkimuslupa, jos tutkimuksessa käytetään HUS Diagnostiikkakeskuksen henkilökuntaa, tiloja, laitteita, tietojärjestelmiä tai rekistereitä. (HUS.) Opinnäytetyön tutkimuslupaa haettiin HUSin ohjeiden mukaisesti heidän omilta verkkosivuiltaan.

Vertailutulokset haettiin MY+ ohjelmasta näytetunnisteella, jotka oli analysoitu Synlabissa. Näitä tuloksia verrattiin verifioitavan laitteen tuloksiin, jolloin nähtiin myös potilaiden tiedot. Tästä syystä tutkimusta ei ollut mahdollista toteuttaa anonyymina. Opinnäytetyöprosessin aikana käsiteltiin ihmisten henkilötietoja. Niitä ei ole liitetty tutkimukseen eikä ole julkaistu missään. Opinnäytetyöntekijöinä allekirjoitimme HUS Diagnostiikkakeskuksen salassapitosopimuksen.

Näytteitä säilytettiin analysoinnin jälkeen osastolla pakastettuna suljetuissa, läpinäkyvässä riskijäteastioissa noin kaksi kuukautta. Tämän jälkeen ne hävitettiin HUS Diagnostiikkakeskuksen muun potilasjätteen mukana tietosuojattuna biologisena jätteenä (Fortum). Tulokset jäivät HUS Diagnostiikkakeskukseen ja jatkossakin vain he saavat käyttää tietoja. Tuloksia käsitelti HUS Diagnostiikkakeskuksen vastuukemisti ja lääkäri sekä opinnäytetyön tekijät Emma Saari ja Jenna Koivula. Verifiointiprosessissa saadut numeeriset tulokset säilytetään, niin kauan kuin verifioitava menetelmä on HUS Diagnostiikkakeskuksen Erikoiskemialla käytössä. Potilastietoja säilytettiin vain tämän

opinnäytetyön suorittamisen ajan, kunnes verifiointiraportti hyväksyttiin. Tämän jälkeen potilastiedot hävitettiin tietosuojajätteeseen.

6 Tulokset

Seerumin inhibiini B-tutkimukselle oli asetettu 10 % laatutavoite verifiointisuunnitelmassa. Tämä tarkoittaa, että sarjan sisäisestä (CV_{sis}) ja sarjojen välisestä ($CV_{väl}$) variatiosta laskettu mittausepävarmuus ($u_c = \sqrt{(CV_{sis}\% ^2 + CV_{väl}\% ^2)}$) saa olla enintään 10 %. Passing-Bablokiin ja Bland-Altmanin analyysihin käytetyt tulokset on esitetty liitteessä 2.

6.1 Sarjojen välinen ja sisäinen toistuvuus

Kontrolleja analysoitiin sarjojen välistä toistuvuutta varten kahdesta eri kitistä, joilla oli eri erännumero eli LOT. Analysointi kertoja tuli yhteensä kuusi, joista neljässä oli sama kitin erännumero (#072021) ja kahdessa eri kitin erännumero (#070622). Päädyimme käyttämään vain yhden LOTin arvoja, jotta voimme vertailla niitä keskenään. Päädyimme valitsemaan LOTin, jolla oli toteutettu enemmän analysointi kertoja. Taulukossa 5 on selvyiden vuoksi käytetty pyöristettyjä lukuarvoja.

Taulukko 5. Sarjojen välinen toistuvuus (LOT: #072021).

Analysointi pvm.	Kontrolli I, analysointi 1.	Kontrolli I, analysointi 2.	Keskiarvo	Kontrolli II, analysointi1.	Kontrolli II, analysointi2	Keskiarvo 2	LOT
19.12.2022	121	120	121	312	342	327	#072021
							#072021
20.12.2022	130	129	129	312	333	323	
21.12.2022	119	108	113	328	318	323	#072021
21.12.2022	114	108	111	331	325	328	#072021
Ka			119,0			325	
s			7,1			2,44	
CVväl%			6 %			0,8 %	

Sarjan välinen toistuvuus toteutettiin kahdella eri laadunohjausnäytteellä - kontrolli I (matala) ja II (korkea). Kontrollit olivat jokaisessa analyysissä kuoppalevyn alussa sekä

lopussa. Laskimme tulosten keskiarvot ja näiden keskiarvojen keskiarvot, sekä hajonnat, joiden perusteella saimme sarjojen väliset variaatiokertoimet. Kontrollille I saimme variaatiokertoimeksi 6 % ja kontrollille II kertoimeksi 0,8 %.

Liitteessä 1 on rinnakkain analysoitujen 36 näytteen tulokset ja taulukoissa 6 on esitettyä esimerkkituloksia. Sarjan sisäinen variaatio tutkittiin analysoimalla 36 näytettä rinnakkaismäärittäjinä (A ja B). Sarjan sisäiseksi variaatiokertoimeksi saatiin 4,6 % Dahlbergin kaavalla laskemalla parinäytteiden CV% ja näiden CV%:en keskiarvo. Variaatiokerroin pysyi 10 % laatutavoitteessa ja on näin hyväksyttävässä marginaalissa.

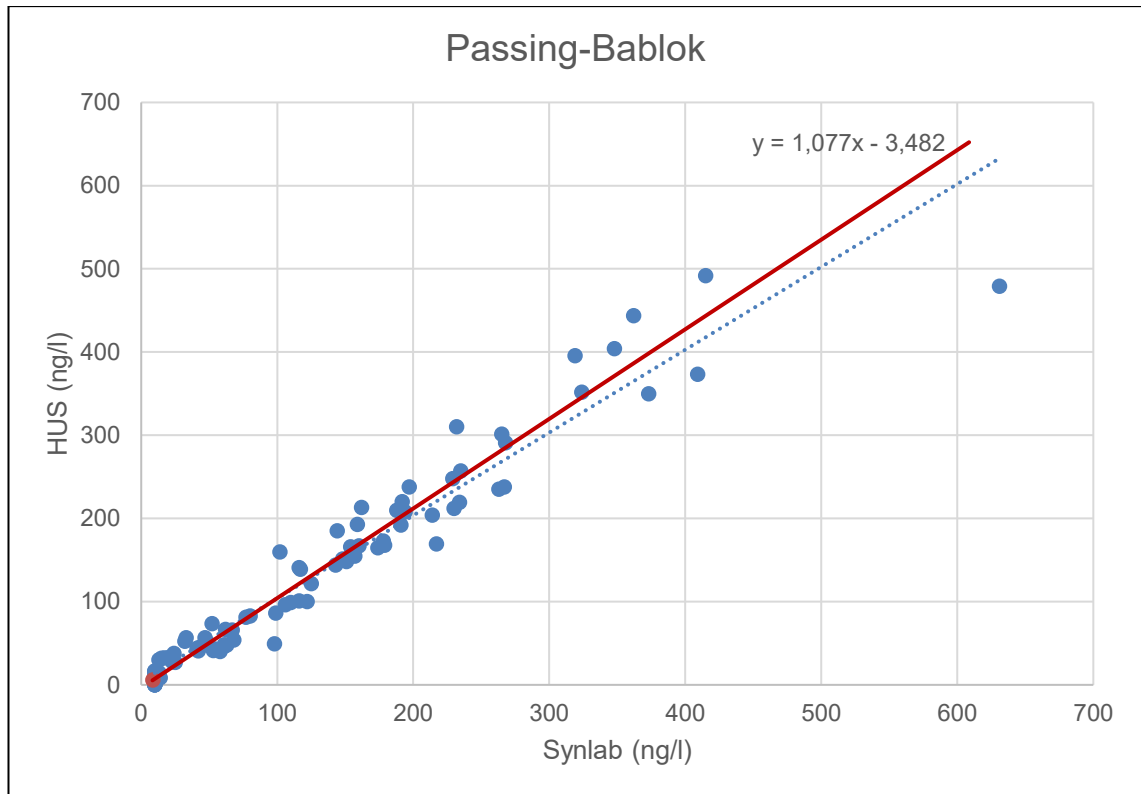
Taulukko 6. Rinnakkaisten analysointien matalimmat ja korkeimmat eroprosentit.

Näyte (<1 %)	A (ng/l)	B (ng/l)	Näyte (>10 %)	A (ng/l)	B (ng/l)
2.	349,642	349,946	3.	32,247	20,896
4.	86,187	85,975	15.	73,389	65,864
22.	491,592	493,066	23.	52,169	43,796
31.	32,619	32,626	33.	373,026	421,063
36.	395,543	395,670	34.	32,068	18,913

Taulukkoon 6. on vasemmalla kerättyinä parhaimpia mitattuja tuloksia. Näissä mittaus-ten välinen ero on alle 1 % eli ovat lähes identtisiä. Oikealla puolella on esitetty arvoja, jotka poikkeavat eniten toisistaan. Näiden eroprosentti on yli 10 %.

6.2 Kahden menetelmän vertailu

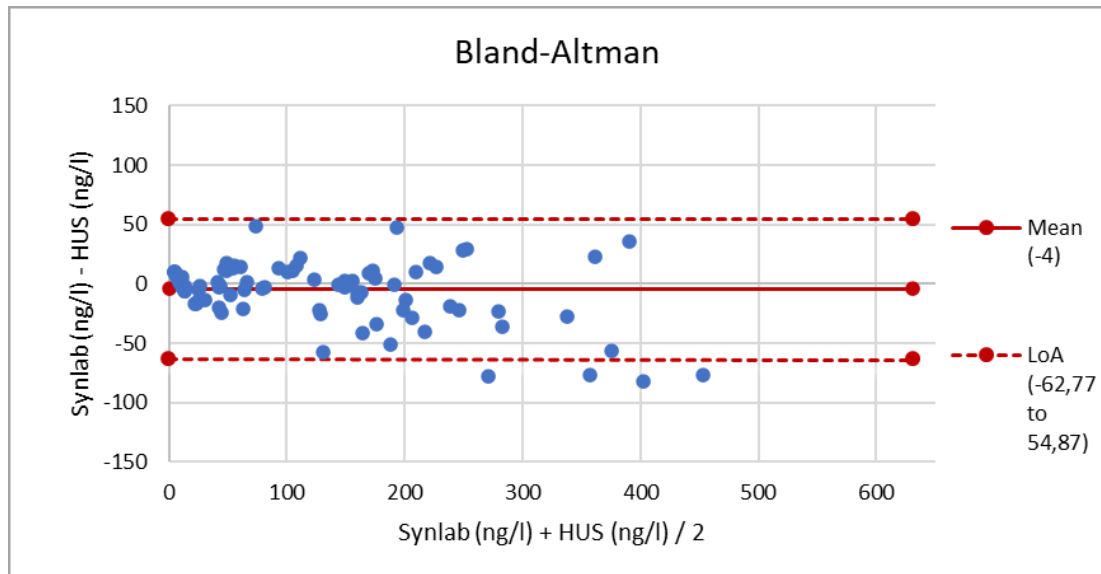
Passing-Bablok-regressio on tekniikka kahden menetelmän vertaamiseksi, jolla nähdään tuottavatko ne samanlaisia tuloksia vai eivät (MedCalc 2022). Kuviossa 5 näkyvän suoran yhtälö on $y=1,077 (0,9961 \text{ to } 1,142) x - 3,482 (-8,673 \text{ to } 1,330)$, jonka kulmakerroin on 1,077 ja leikkauspiste on $-3,482$. Koska sekä kulmakertoimen että vakion 95 % luottamusväli sisältää 1:n, ei tulosten välillä ole suhteellista eikä vakioeroa (bias).



Kuvio 5. Passing-Bablok kuvaaja. x-akselilla on HUS Diagnostiikkakeskuksessa analysoidut tulokset ja y-akselilla on Synlabista saadut tulokset.

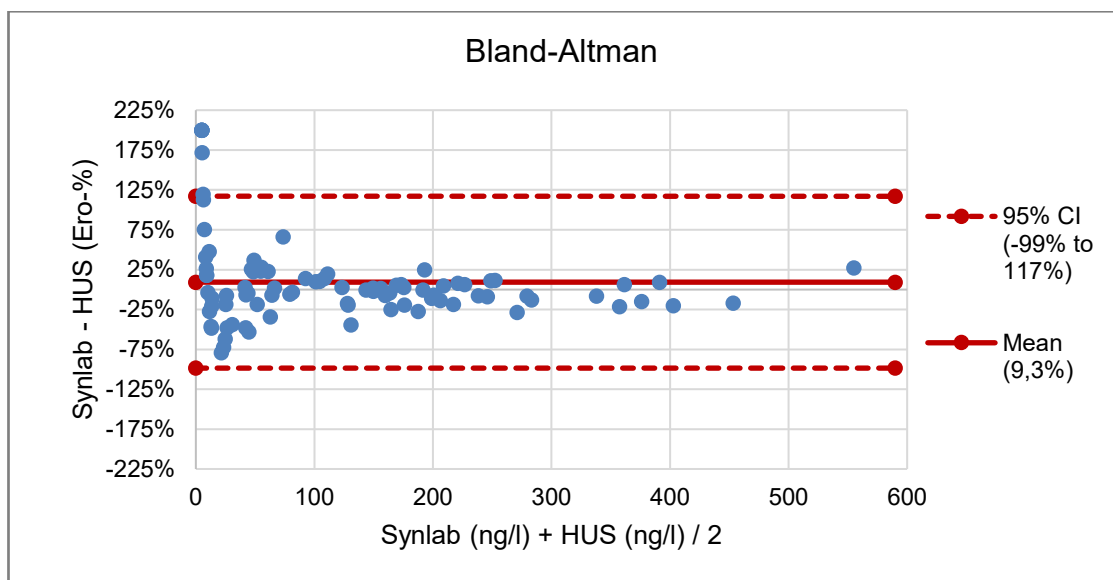
Bland-Altman kuvaaja on graafinen menetelmä kahden mittaustekniikan vertaamiseksi (MedCalc 2022). Kuvio 6 rajat saadaan laskemalla kahden mittauksen välisen eron keskiarvo sekä keskihajonta. Kuviossa Y-akselissa on kahden parillisen mittauksen välinen erotus (Synlab - HUS) ja X-akselilla on mittausten keskiarvo ((Synlab + HUS) /2).

Kuviossa 6 on selvitetty kahden menetelmän absoluuttinen ero. Tulosten eron keskiarvo on -4 ng/l, joka tulee kaikkien tulosten erotusten keskiarvosta. Tulokset siis eroavat keskimäärin 4 ng/l toisistaan. Kuviossa LoA= -62,77–54,87. LoA=limits of agreement on raja, joiden sisään 95 % eroista asettuu.



Kuvio 6. Absoluuttinen ero Bland-Altman kuvaaja.

Kuviossa 7 on selvitetty suhteellinen ero. Kuvaajassa on 95 %, joka kuvaa sitä väliä, johon laskettu ero 95 % todennäköisyydellä osuu. Koska CI sisältää nollan, menetelmällä ei ole tilastollisesti merkitsevää vakioeroa. 95 % luottamusväli ulottuu -99 %–117 %. Ero-% Bland-Altman kuvaajassa 9,3 % (95 % CI x-y).



Kuvio 7. Suhteellinen ero Bland-Altman kuvaaja.

7 Pohdinta

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli itse verifioida Erikoiskemian avustuksella seerumin inhibiini B tutkimus Dynex DS2 laitteelle. Ohjelmoinnin sekä useiden mittausten jälkeen

laite ei kuitenkaan toiminut halutulla tavalla ja syytä tähän emme tiedäneet vielä silloin. Aikataulullisten syiden takia päätimme, että Erikoiskemialta heidän oma kemistinsä selvittäisi tilannetta, miksi laite ei toiminut halutulla tavalla. Syy huonoihin mittauksiloksiin löytyi laitteesta. Laitteen pipetoimissa reagensseja kävi sama pipetointikärki vuorollaan jokaisessa reaktiokaivossa liian syvällä. Päätimme tässä kohtaa, että Erikoiskemian kemisti jatkaa inhibiini B näytteiden analysointia laitteen huollon jälkeen. Verifiointi raportti suoritettiin myös tämän takia Erikoiskemian toimesta. Yhteistyö kemistien kanssa oli järkevintä, jotta aikataulu inhibiini B tutkimuksen omaan tuotantoon saamisessa ei viivästyisi liikaa. Vaikka emme päässeet suorittamaan koko prosessia alusta loppuun, koemme kuitenkin, että saimme hyvän kokonaiskuvan verifiointin toteuttamisesta, sekä Dynex DS2 laitteen ohjelmoinnista ja näytteiden analysoinnista.

7.1 Tulosten tarkastelu

Sarjan sisäinen variaatio toteutettiin analysoimalla potilasnäyttemateriaalista rinnakkaisnäytteitä ja laskemalla niistä variaatiokerroin. Näin saimme tietää, minkä verran tulokset vaihtelevat yhden analyysisarjan sisällä. Tulokset olivat hyväksyttävissä asetettujen laatutavoitteiden rajoissa. Sarjojen välisen variaation laskemiseksi vertailimme kontrollinäytteiden tuloksia, jotka oli analysoitu samalla analysaattorilla kaksi kertaa peräkkäin saman päivän aikana. Myös nämä tulokset olivat laatutavoitteen mukaisia. Tulosten vaihteluväli ei erottunut liikaa eri analysointi kerroilla. Kontrolli I sarjojen välinen variaatiokerroin oli isompi kuin kontrolli II. Tämän johtuu siitä, että alhaisilla pitoisuuksilla vaihtelu on prosentuaalisesti isompaa. Sarjan sisäisellä ja välisellä variaatiokertoimella selvitettiin menetelmän toistettavuutta. Tulosten perusteella voidaan tulkita analysaattorilla saatuja tuloksia toistettavina.

Bland-Altman sekä Passing-Bablok-analyyseissa vertailtiin HUSissa saatuja verifioitavan laitteen potilastuloksia Synlabissa saatuihin tuloksiin. Vertailemalla tuloksia nähtiin, ovatko HUSissa saadut tulokset vertailukelpoisia Synlabissa saatuihin tuloksiin. Passing-Bablokin kuvaajassa (kuvio 5.) näkyy, että HUSissa saaduista tuloksista laskettu lineaarinen suora ei juurikaan poikkea kuvasta näkyvästä tavoiteltavasta suorasta. Menetelmien välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Kuvaajassa näkyvät tulosten väliset erotusten pisteet ovat sijoittuneet lähelle lineaarista suoraa. Poikkeuksena on yksittäinen arvo, joka sijoittuu kauemmaksi suorasta, joka tekee siitä poikkeavan arvon. Tätä ei kuitenkaan pidetä merkittävänä, koska se on yksittäinen poikkeama.

Bland-Altmanin absoluuttisessa kuvaajassa (kuvio 6.) punainen keskiviiva kuvaa menetelmien välisen eron keskiarvoa ($k_a = 4 \text{ ng/l}$). Kuvaajassa y-akselilla on erotus kahden

menetelmän välillä ja x-akselilla on pitoisuus. Se kuvaa, millainen ero on pitoisuuden suhteessa. Mikäli korkeilla pitoisuuksilla ero olisi suurempi kuin matalilla, sinisten pisteiden pilvi taipuisi. Ei ole merkitystä liikutaanko korkeilla vai matalilla pitoisuuksilla mitaustulosten ero on molemmissa samaa suuruusluokkaa. Bland-Altmanin suhteellisessa kuvaajassa (kuvio 7) luottamusväli 95 % CI kuvaa sitä väliä, johon laskettu ero 95 % todennäköisyydellä osuu. Suhteellinen ero-% on 9,3 %. HUSin käytettävän menetelmän tulostaseroaa Synlabissa käytetystä menetelmästä 9,3 % eli tulokset ovat HUSissa korkeampia kuin Synlabissa. Tulokset sisältävät satunnaisvaihtelua. Bland-Altman kuvaajassa havaitaan myös yksi poikkeava arvo. Poikkeava arvo on havaintoarvo, joka poikkeaa muista vastaavista havaintoarvoista, sekä voi vinouttaa kuvaajaa. Usein poikkeavan arvon syy selvitetään ja se voidaan poistaa, mutta tässä tapauksessa päädyimme pitämään arvon, koska se ei merkittävästi muuta kuvaajaa tai meidän lopputulostamme.

7.2 Luotettavuus

Luotettavuus eli reliabiliteetti ilmaisee sen, kuinka luotettavasti ja toistettavasti käytetty menetelmä mittaa haluttua ilmiötä (Avoin tiede 2018). Opinnäytetyön luotettavuus taataan noudattamalla hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Hyviin tieteellisiin käytäntöihin tutkimuksessa kuuluu tiedeyhteisön tunnustaminen ja toimintatapojen noudattaminen. Niihin sisältyy rehellisyyden, huolellisuuden ja tarkkuuden noudattaminen tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa ja esittämisessä, sekä tutkimusten ja niiden tulosten arvioinnissa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2021.)

Opinnäytetyössä käytettiin useita luotettavia tiedonlähteitä, kuten tieteellisiä artikkeleita tutkimusaiheestamme. Pidimme huolta siitä, että olimme lähdekriittisiä työskennellessä ja vertailimme eri lähteiden tietoja keskenään, varmistaaksemme työn luotettavuuden.

Näytelaatua opinnäytetyössä voidaan pitää luotettavana. Näytteet olivat potilasnäytteitä, jotka oli jaettu kahteen erotteluputkeen. Näin ollen näytteiden vastaanotto käsitteli näytteitä samalla tavalla kuin potilasnäytteitä. Analysointivaiheessa analysoitiin 91 eri inhibiini B pitoisuuden omaavaa seeruminäytettä eri kertoina. Analysointiin saatiin hyvin näytteitä matalista, keskitasosta ja korkeista pitoisuuksista. Aina ei ole mahdollista saada monelta eri pitoisuudelta näytteitä verifiointiin. Tämä lisäkin verifiointin luotettavuutta. Sarjojen välinen toistuvuus laskettiin analysointikerroista, joissa analysoitiin kaksi eri tasoista kontrollia neljänä eri päivänä. Tuloksista laskettiin sarjojen välinen variaatiokerroin, jota verrattiin laatutavoitteeseen. Vaikka tulokset ovat tavoitelluissa ar-

voissa, analysointikertoja olisi voinut olla enemmän osoittamaan toistettavuutta. Toisella kitin erällä analysoiduista kontrolleista laskettiin myös sarjan välisen variaation ja tulos oli laatutavoitteen mukainen. Tuloksia voidaan pitää toistettavina. Sarjan sisäinen toistettavuus laskettiin 36 näytteestä, jotka analysoitiin kahdella eri näytteellä. Näytemäärää voidaan pitää luotettavana lukumääränä sarjan sisäisen variaation arviointiin. Tutkimuksesta vastaava lääkäri teki lopullisen arvioin siitä, oliko näytteiden skaala tarpeeksi iso, jotta voitiin luotettavasti ottaa käyttöön uusi menetelmä.

7.3 Eettisyys

Bioanalyttikko käsittelee kaikkea näytemateriaalia eettisen ohjeen mukaan näytteenluovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. Bioanalyttikko käyttää vain hyväksytyjä menettelytapoja ja kantaa vastuun laboratoriotutkimusten luotettavuudesta sekä laadusta tutkimusprosessin aikana. Jos tutkimuksen aikana tulee ilmi sellaisia seikkoja, jotka eivät vastaa tutkimukselle asetettuja vaatimuksia, esimerkiksi näytteenoton, näytteiden kuljetuksen tai analysoinnin aikana tulee siitä ilmoittaa tutkimuksen pyytäjälle. Bioanalyttikoiden velvollisuutena on kehittää sekä ylläpitää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista ja oppia uusia tieteellisiin menetelmin tutkittuja toimintatapoja. Tavoitteena bioanalyttikoiden toiminnassa on asiakkaan oikeuksien kunnioittaminen ja heidän hyvinvointinsa. (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry 2017.)

Opinnäytetyössä käsiteltiin pseudonymisoituja henkilötietoja sisältävää materiaalia. Pseudonymisointi tarkoittaa henkilötietojen käsittelemistä niin, että henkilötietoja ei pystytä yhdistämään tiettyyn henkilöön ilman lisätietoja. Tällaiset lisätiedot säilytettiin huolellisesti erillään henkilötiedoista työn aikana. Henkilötietoja ovat kaikki ne tiedot, jotka kohdistuvat tunnistettuun tai tunnistettavissa olevaan luonnolliseen henkilöön. Tietosuoja on kaikkien perusoikeus, joka turvaa oikeuksien ja vapauksien toteutumisen käsiteltäessä henkilötietoja. Henkilötietojen käsittelyn tulee aina perustua lakiin. (Tietosuojavaltuutetun toimisto.) Työskentelyssä kunnioitettiin ja noudatettiin tietosuojalakea.

Näytemateriaalin kerääminen tapahtui syksyllä 2022 lääkärin määräämänä, osana potilaan hoitoa. Näytteet olivat ylijäämänäytteitä, joista oli etukäteen määritetty inhibiini B tulos Synlabissa. Tämän vuoksi lupaa näytteenottoon ei tarvittu potilaalta, eikä siitä koitunut myöskään ylimääräistä haittaa potilaalle.

7.4 Tulosten hyödyntäminen

Saatujen tulosten perusteella pystyttiin luotettavasti ottamaan HUS Diagnostiikkakeskuksen Erikoiskemialle käyttöön inhibiini B-tutkimus. Tutkimus on tällä hetkellä käytössä HUSin omassa tuotannossa. Opinnäytetyön valmistumisen jälkeen Erikoiskemia saa opinnäytetyössä tuotetun materiaalin heidän omaan käyttöönsä, jota he pystyvät hyödyntämään muun muassa opetusmateriaalina. Tulokset julkistetaan esittämälle ne ammattiyhteisölle osastokokouksessa.

7.5 Kehittämisehdotukset

Verifiointisuunnitelman olisi voinut aloittaa tekemään aiemmin ja varata siihen enemmän aikaa. Jos suunnitelma olisi ollut laajempi niin itse työn tekemiseen ja kirjoittamiseen ei olisi kulunut niin paljoa aikaa. Koimme myös, että ohjaussuunnitelman tekemiseen ja koululta tullut aikataulu olisi voinut olla selkeämpi. Tämä olisi selkeyttänyt oman aikataulun tekemistä. Kohdallemme sattunut laitteen pipetointivirhe huomattiin vasta, kun olimme jo analysoineet muutaman kerran näytteitä. Tämän olisi voinut huomata aiemmin, ja saada laitehuollon nopeammalla aikataululla. Laite viasta ja lisäksi harjoitteluiden eriaikaisuudestakin johtuen aikataulumme muuttui niin, että emme ehtineet itse analysoida näytteitä. Onneksi kuitenkin Erikoiskemian kemisti pystyi analysoimaan näytteet ja lähettämään meille datan. Viestintään olisimme voineet panostaa enemmän paremman läpinäkyvyyden takaamiseksi.

7.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön aihe saatiin HUS Diagnostiikkakeskuksen Erikoiskemialta. Opinnäytetyötä lähdettiin työstämään nopeasti, koska aihe oli mielenkiintoinen. Työn edetessä huomattiin, kuinka laaja opinnäytetyön aihe on. Opinnäytetyö on pitkä prosessi, joka vaatii hyvää aikataulutusta, sekä kykyä koko prosessin hahmottamiseen.

Ennen kuin päästiin analysoimaan näytteitä, täytyi meidän ohjelmoida tietokoneelle haluttu menetelmä. Tähän saimme ohjeistusta kemistiltä, sekä kitin mukana tulleesta manuaalista. Manuaalissa oli käsimenetelmällä tehtävän analyysin vaiheet, jonka mukaan rakensimme tietokoneelle analysointiohjelman. Muokkasimme sitä analysaattorille sopivaksi. Saimme ohjelmoinnilla kokemusta analysaattorin käytöstä ja ohjelmoinnin toteutuksesta. Tämän lisäksi se kasvatti ymmärrystämme menetelmästä. Saimme kokemusta myös tutkimuksen verifioimisesta sekä sen käyttöönottamisesta laboratorioon.

Koemme, että tämä on tuonut lisää valmiuksia työelämään vastaavanlaisten töiden tekemisestä. Lähitulevaisuudessa mahdollisesti julkaisemme opinnäytetyöstä artikkelin Suomen kliinisen kemian yhdistyksen Kliinlab-lehdessä.

Opinnäytetyö oli kokonaisuudessaan iso oppimisprosessi. Työ antoi arvokasta kokemusta tutkimuksen verifiointista, siinä käytettävästä menetelmästä ja laitteesta. Työskentely Erikoiskemialla antoi valmiuksia siirtyä työelämään opintojen päätyttyä. Lopuksi haluamme yhdessä kiittää koko Erikoiskemian henkilökuntaa ja meidän kanssamme työskennelleitä kemistejä sekä opinnäytetyön ohjaavaa opettajaa.

Lähteet

American Cancer Society 2023. Monoclonal Antibodies and Their Side Effects. <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/monoclonal-antibodies.html>> Luettu 28.3.2023

AnshLabs 2014. Inhibin B ELISA. Document No: AL-107-i. Kitin manuaali.

Anttonen, Mikko & Itkonen, Outi 2023. Inhibiini B, seerumista. HUS tutkimusohjekirja. <<https://huslab.fi/ohjekirja/6450.html>> Luettu 29.3.2023

Avoin tiede 2018. Todennettavuus ja toistettavuus. <<https://avointiede.fi/fi/ajankoh-taista/todennettavuus-ja-toistettavuus>> Luettu 19.3.2023

Bläuer, Merja & Vihko, Kimmo 1997. Aktiivinit ja inhibiinit; laboratorionsta klinikkaan. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo70384>> Luettu 16.9.2022

Clindia 2019. DS2 Automated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) System Operator Manual. <<https://www.clindia.nl/media/2258/ds2-operation-manual.pdf>> Luettu 18.9.2022

Coelho, Edvaldo Capobianco & de Souza Galvao, Maria Christina & Sato, Joao Ricardo. Dahlberg formula – a novel approach for its evaluation. <https://www.researchgate.net/publication/262478115_Dahlberg_formula_a_novel_approach_for_its_evaluation> Luettu 20.3.2023

DATAtab 2023. Bland-Altman plot. <<https://datatab.net/tutorial/bland-altman-plot>> Luettu 13.4.2023

Eerola, Hannaleena. Duodecim Terveyskirjasto. Follikkelia stimuloiva hormoni, seerumista (S-FSH). <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk00002>> Luettu 17.3.2023

Fimlab 2022. Inhibiini B. <<https://fimlab.fi/tutkimus/6747>> Luettu 18.9.2022

Färkkilä, Anniina & Koskela, Sanna & Bryk, Saara & Alfthan, Henrik & Butzow, Ralf & Leminen, Arto & Puistola, Ulla & Tapanainen, Juha S. & Heikinheimo, Markku & Anttonen, Mikko & Unkila-Kallio, Leila. International Journal of Cancer. The clinical utility of serum anti-Mullerian hormone in the follow-up of ovarian adult-type granulosa cell tumors – A comparative study with inhibin B. Luettu 10.4.2023

Gran, Stephanie D. & Patel, Kruti R. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. <https://www.researchgate.net/profile/Kruti-Patel-3/publication/255958640_Enzyme_Immunoassay_and_Enzyme-Linked_Immunosorbent_Assay/links/56cc7efa08aee3cee5437a2a/Enzyme-Immunoassay-and-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay.pdf> Luettu 5.9.2022

Giavarina, Davide. 2015. Understanding Bland Altman analysis. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470095/>> Luettu 16.3.2023

Hae-Young, Kim 2013. Statistical notes for clinical researchers: Evaluation of measurement error 2: Dahlberg's error, Bland-Altman method, and Kappa coefficient. <<https://rde.ac/DOIx.php?id=10.5395/rde.2013.38.3.182>> Luettu 21.3.2023

Hall, Janet E. 2015. National Library of Medicine. Endocrinology of Menopause. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6983294/>> Luettu 6.4.2023

Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. Edita Publishing Oy, Helsinki. <<http://tilastollinentutkimus.fi/1.TUTKIMUSTUKI/KvantitatiivinenTutkimus.pdf>> Luettu 12.12.2022

Helenius, Mikko 2021. Verifiointi kliinisessä laboratoriossa. <<https://www.labconsult.fi/laboratoriolaaketiede/verifiointi-kliinisessa-laboratoriossa/>> Luettu 21.3.2023

HUS. Tutkimuslupa. <<https://www.hus.fi/tutkimus-ja-opetus/tutkijan-ohjeet/tutkimuslupa-opinnaytetyon-tutkimuslupa-ja-tietolupa#husin-tietolupa>> Luettu 16.9.2022

Hägg, Margareta. Validoinnin suunnittelun opas. VTT. <<https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>> Luettu 15.3.2023

International Organization for Standardization 2020. Information for visitors. <https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/contact_ISO/information_for_visitors.pdf> Luettu 13.4.2023

Kalra, Bhanu & Kumar, Ajay & Patel, Kinita & Patel, Amita & Khosravi, M.J. 2010. Development of a second-generation Inhibin B ELISA. Journal of Immunological Methods. Luettu 10.12.2022

Kemianseura 2022. Analyysimenetelmien validointi. <<https://kemianseurat.fi/finntesting/analyysimenetelmien-validointi/>> Luettu 18.9.2022

Labquality 2022. Validointi ja verifiointi. <https://www.labquality.fi/sote-ammattilaisille/laadukas_vieritutkimus/validointi_verifiointi/> Luettu 18.9.2022

Makanji, Yogeshwar & Holmquist, Chris & Mayo, Kelly E. & Mishra, Rama & Schwartz, Neena B. & Wong, Winifred P. S. & Woodruff, Teresa K. & Zhu, Jie 2014. Inhibin at 90: From Discovery to Clinical Application, a Historical Review. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4167436/>> Luettu 16.9.2022

Marttila, Eetu 2020. Pojan murrosikäkehityksen aikatauluun vaikuttavat tekijät ja sen vaikutukset myöhempään terveyteen. Kirjallisuuskatsaus. <https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/22507/urn_nbn_fi_uef-20200304.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Luettu 7.4.2023

Meachem, S.J & Nieschlah, E. & Simoni, M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11720872/>> Luettu 20.3.2023

MedCalc 2022. Bland-Altman plot. <<https://www.medcalc.org/manual/bland-altman-plot.php>> Luettu 6.11.2022

MedCalc 2022. Passing-Bablok regression. <<https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok-regression.php>> Luettu 6.11.2022

Metrologian neuvottelukunta 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. <<https://publications.vtt.fi/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>> Luettu 17.3.2023

Niemela, Onni & Pulkki, Kari 2014. Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Kandidaattikustannus Oy. Luettu 8.4.2023

Nummenmaa, Lauri & Holopainen, Martti & Pulkkinen Pekka 2017. Tilastollisten menetelmien perusteet. Sanoma Pro Oy. Luettu 17.1.2023

Pereira, Paulo 2020. Part 2 – ISO 15189; 2012 “Medical laboratories – Requirements for quality and competence”. February 2017 Updated January 2020. <<https://www.westgard.com/iso-15189-2012-requirements-1.htm>> Luettu 20.2.2023

Roelofsen-de Beer, Roseri & Wienders, Jos & Boursier, Guilaine & Vodnik, Tatjana, Vanstapel, Florent & Huisman, Willem & Vukasović, Ines & Vaubourdolle, Michel, Sönmez, Çiğdem & Linko, Solveig & Brugnoli, Duilio & Kroupis, Christos & Lohmander, Maria & Šprongl, Luděk & Bernabeu-Andreu, Francisco & Meško Brguljan, Pika & Thelen, Marc. "Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation" Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), vol. 58, no. 3, 2020, pp. 361-367. <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-1053/html>> Luettu 10.2.2023

Standardi. ISO Standardit helpottavat arkea – useimmiten ihan huomaamatta. <<https://www.standardi.fi/>> Luettu 20.3.2023

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf> Luettu 5.4.2023

Synlab 2022. Inhibiini B. Laboratoriokäsikirja. <<https://www.yml.fi/tuotekuvaukshow.php?tuotenro=540>> Luettu 20.2.2023

Terveyskirjasto 2016. Lääketieteen sanasto; Vasta-aine, Immunoglobuliini, Antigeeni. <<https://www.terveyskirjasto.fi/sisalto/laaketieteen-sanasto>> Luettu 14.4.2023

Tietosuojavaltuutetun toimisto. Pseudonymisoidut ja anonymisoidut tiedot. <<https://tietosuoja.fi/pseudonymisointi-anonymisointi>> Luettu 20.9.2022

Tietosuojavaltuutetun toimisto. Tietosuoja. <<https://tietosuoja.fi/tietosuoja>> Luettu 12.9.2022

Tilastokeskus. Keskiarvo. <<https://www.stat.fi/meta/kas/keskiarvo.html>> Luettu 6.4.2023

Tilastokeskus. Tilastojen ABC. <https://tilastokoulu.stat.fi/verkko-koulu_v2.xql?page_type=sisalto&course_id=tkoulu_tlkt&lesson_id=4&subject_id=5> Luettu 20.3.2023

Tilastokeskus. Luottamusväli. <<https://www.stat.fi/meta/kas/luottamusvali.html>> Luettu 28.3.2023

Tilastokeskus. Variaatiokerroin. <<https://www.stat.fi/meta/kas/variaatiokerroi.html>> Luettu 19.3.2023

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2021. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanta-htk>> Luettu 10.9.2022

Vänttinen, Teemu 2003. Inhibins and Activins in the Ovary and the Adrenal Cortex. Väitöskirja. Kuopion Yliopisto. <https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/9196/urn_isbn_951-781-897-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Luettu 30.3.2023

Wen, Jingyi & Huang, Kecheng & Du, Xiaofang & Zhang, Hanwang & Ding, Ting & Zhang, Cuilian & Ma, Wenmin & Zhong, Ying & Qu, Wenyu & Liu, Yi & Li, Zhiying & Deng, Song & Luo, Aiyue & Jin, Yan & Zhang, Jinjin & Wang, Shixuan 2021. Can Inhibin B Reflect Ovarian Reserve of Healthy Reproductive Age Women Effectively. *Frontiers in Endocrinology*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8081350/>> Luettu 6.4.2023

Liite 1.

Rinnakkaisten analysointien (n=36) tulokset

Näyte	A (ng/l)	B (ng/l)
1	169,134	164,134
2	349,642	349,946
3	32,247	20,896
4	86,187	85,975
5	237,708	226,282
6	27,708	21,620
7	100,043	96,871
8	37,537	35,627
9	237,838	243,327
10	138,949	136,057
11	66,481	67,974
12	247,629	253,683
13	43,747	39,144
14	403,925	393,926
15	73,389	65,864
16	82,689	89,183
17	56,716	53,120
18	159,693	163,621
19	213,312	228,310
20	26,859	30,088
21	478,879	544,009
22	491,592	493,066
23	52,169	43,796
24	172,857	182,612

25	65,757	62,348
26	56,557	59,114
27	8,608	8,858
28	219,464	231,468
29	212,062	223,963
30	13,183	7,690
31	32,619	32,626
32	192,690	202,437
33	373,026	421,063
34	32,068	18,913
35	166,945	164,912
36	395,543	395,670

Liite 2.**Passing-Bablok ja Bland-Altman analyysien näytteiden tulokset.**

Näyte	HUS (ng/l)	Synlab (ng/l)
1	169	217
2	350	373
3	32	17
4	86	99
5	238	197
6	28	23
7	100	122
8	38	24
9	238	267
10	139	117
11	66	62
12	248	229
13	44	41
14	404	348
15	73	52
16	83	80
17	57	33
18	160	102
19	213	162
20	27	25
21	479	631
22	492	415
23	52	32
24	173	178
25	66	67
26	57	47
27	9	14
28	219	234
29	212	230
30	13	10
31	33	20
32	193	159
33	373	409
34	32	15
35	167	160

Liite 2
2 (3)

36	396	319
37	257	235
38	8	10
39	1	10
40	0	10
41	15	13
42	163	156
43	41	53
44	8	10
45	204	214
46	155	157
47	148	151
48	208	194
49	46	61
50	168	179
51	8	10
52	3	10
53	220	192
54	101	116
55	15	12
56	99	110
57	141	116
58	48	63
59	444	362
60	151	148
61	310	232
62	166	154
63	0	10
64	301	265
65	185	144
66	192	191
67	81	77
68	16	10
69	96	106
70	10	10
71	16	10
72	7	10
73	30	13
74	165	174
75	45	43
76	0	10

77	40	58
78	43	54
79	352	324
80	144	143
81	291	268
82	0	10
83	41	42
84	48	61
85	235	263
86	210	188
87	122	125
88	3	10
89	5	10
90	54	68
91	49	98