



Metropolia

Maria Viren

Randoxin molaarisen lipoproteiini (a) -menetelmän verifiointi Architect c8000 -analysaattorille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

30.5.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Maria Viren
Otsikko:	Randoxin molaarisen lipoproteiini (a) -menetelmän verifiointi Architect c8000 -analysaattorille
Sivumäärä:	32 sivua + 1 liite
Aika:	30.5.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	tutkimuspäällikkö Terhi Vihervaara lehtori Mia Ruismäki

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida Randoxin valmistama lipoproteiini (a) -menetelmä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Biomarkkerit-laboratorion käyttöön. Verifioitava menetelmä on immunoturbidimetrisen, ja sitä mitataan Architect c8000 -analysaattorilla.

Edellinen Quantian valmistama menetelmä perustui massayksiköihin, eikä ottanut huomioon Lp(a)-partikkelin koon merkittävää vaihtelua. Sekä ihmisten välillä että yksilöillä esiintyy eri kokoisia Lp(a)-partikkeleita. Uusi menetelmä perustuu molaarisiin yksiköihin ja ottaa huomioon partikkelin heterogeenisyyden.

Verifiointissa määritettiin sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus, tarkkuus ja laajennettu mittausepävarmuus. Sarjan sisäinen toistettavuus määritettiin kolmelta eri tasolta, joiden variaatiokertoimet olivat 1,01–1,38 %. Arvoja verrattiin valmistajan antamiin tuloksiin, ja ne sijoittuivat valmistajan ilmoittamien viitearvojen väliin. Sarjojen välinen toistettavuus määritettiin kahdelta eri tasolta, joissa variaatiokertoimet olivat 6,16 ja 1,69 %. Tarkkuus määritettiin Labqualityn kontrollinäytteiden perusteella ja poikkeamien keskiarvo oli –6,0 %. Laajennettu mittausepävarmuus määritettiin matalalle ja korkealle pitoisuudelle sekä niille yhteisesti. Koko mittausalueen laajennettu mittausepävarmuus oli 8,2 % ($k = 2$).

Koska edellinen menetelmä korvattiin uudella, verifiointiin kuului myös menetelmävertailu. Menetelmävertailun pooli- ja yksittäisnäytteiden tulokset käsiteltiin erikseen. Molemmille piirrettiin Altman-Bland-kuvaajat ja regressiosuorat. Randoxin menetelmä antoi 0,75–1,50 mg/dL korkeampia tuloksia edelliseen Quantian menetelmään verrattuna. Regressiosuoran kulmakertoimet olivat lähellä yhtä ja selitysasteet erittäin korkeat. Verifioitava menetelmä antaa siis luotettavia ja vertailukelpoisia tuloksia.

Avainsanat: ateroskleroosi, kolesteroli, lipoproteiini, lipoproteiini (a), immunoturbidimetria, fotometria, verifiointi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Maria Viren
Title: Verification of the Molar Lipoprotein (a) Assay for the Architect c8000 Analyser
Number of Pages: 32 pages + 1 appendix
Date: 30 May 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Terhi Vihervaara, Research Manager
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

The aim of this thesis work was to verify the Lipoprotein (a) assay manufactured by Randox for use in the Biomarkers Laboratory of the Finnish Institute for Health and Welfare (THL). The method under verification is immunoturbidimetric and is measured on Abbott's Architect c8000 analyzer.

The previous method manufactured by Quantia was based on mass units, which did not consider the significant variation in the size of Lp(a) particles. These particles exhibit varying sizes, both among individuals and within the same individual. The new method is based on molar units, which takes into account the heterogeneity of the particle.

In the verification process, intra- and inter-assay repeatability, accuracy and expanded measurement uncertainty were determined. Intra-assay repeatability was determined at three different levels, with coefficients of variation ranging from 1.01 %–1.38 %. The values were compared to those provided by the manufacturer and fell within the range of manufacturer's reported values. Inter-assay repeatability was determined at two different levels, with coefficients of variation of 6.16 % and 1.69 %. Accuracy was determined based on Labquality control samples, with an average deviation of –6.0%. Expanded measurement uncertainty was determined for low and high concentrations, as well as combined, which was 8.2 % ($k = 2$).

Since the previous method was replaced by the new one, method comparison was also included in the verification. The results of the method comparison for pooled and individual samples were analyzed separately. Altman-Bland-plots and regression lines were drawn for both. The Randox method yielded results 0.75-1.50 mg/dL higher compared to the previous Quantia method. The slopes of the regression lines were close to 1, with very high coefficients of determination. Therefore, the verified method provides reliable and comparable results.

Keywords: Atherosclerosis, Cholesterol, Lipoprotein, Lipoprotein (a), Immunoturbidimetry, Photometry, Verification

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Lipoproteiinit ja niiden vaikutus ateroskleroosiin	2
2.1	Lipoproteiinien vaikutus ateroskleroosiin	2
2.2	Lipoproteiinien rakenne ja luokittelu	3
2.3	Lipoproteiini (a)	7
3	Lipoproteiini (a):n mittaus	10
3.1	Lipoproteiini (a):n mittaukseen liittyvät haasteet	10
3.2	Fotometria ja immunoturbidimetria kliinisessä kemiassa	12
4	Architect c8000 ja verrattavat Lp(a)-menetelmät	14
4.1	Architect c8000	14
4.2	Randoxin ja Quantian Lp(a)-menetelmät	14
5	Randoxin Lp(a)-menetelmän verifiointi	15
5.1	Kalibrointi	15
5.2	Verifiointi	17
5.2.1	Selektiivisyys	17
5.2.2	Mittausalue	18
5.2.3	Tarkkuus	18
5.2.4	Mittausepävarmuus	21
6	Menetelmävertailu	22
7	Johtopäätökset	27
	Lähteet	29

Liite 1: Sarjojen välinen toistettavuus

Lyhenteet

- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys. Immunokemiallinen menetelmä, joka perustuu antigeeni-vasta-aine-vuorovaikutukseen, joka havaitaan entsyymiaktiivisuuden perusteella.
- HDL: *High-Density Lipoprotein*, korkean tiheyden lipoproteiini. Kuljettaa kolesterolia kudoksista takaisin maksaan.
- IDL: *Intermediate-Density Lipoprotein*, keskitason tiheyden lipoproteiini. VLDL:n ja LDL:n välimuoto. Kolesterolia kuljettava lipoproteiini.
- IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen järjestö.
- k: Kattavuuskerroin. Vastaa 95 %:n luottamustasoa.
- KIV-2: *Kringle IV – 2*. Proteiiniidomeeni, joka löytyy apolipoproteiini (a):sta ja vaikuttaa sen pituuteen.
- LDL: *Low-Density Lipoprotein*, matalan tiheyden lipoproteiini. Kuljettaa kolesterolia kudoksiin ja myös valtimon seinämiin.
- sdLDL: Small Dense Low-Density Lipoprotein, pienitiheksinen LDL-partikkeli. Pieni ja tiheä LDL-partikkeli, joka on yhteydessä sydän- ja verisuonitauteihin.
- SRM: Standard Reference Material, standardireferenssimateriaali. Tarkasti määritelty materiaali, jota käytetään mittalaitteiden kalibrointiin ja testien luotettavuuden varmistamiseen.
- THL: Terveysten- ja hyvinvoinnin laitos.

VLDL: *Very-Low-Density Lipoprotein*, erittäin pienen tiheyden lipoproteiini
Kolesterolia kuljettava lipoproteiini.

WHO: *World Health Organization*, Maailman terveysjärjestö. Yhdistyneiden
Kansakuntien erityisjärjestö, joka vastaa kansainvälisestä kansan-
terveydestä.

1 Johdanto

Yleisin kuolinsyy Suomessa on valtimotautien aiheuttamat verenkiertoelinten sairaudet. Ateroskleroosi eli valtimonkovettumatauti kehittyy, kun ylimääräistä kolesterolia kertyy verisuonen seinämän sisään, jossa se hapettuu ja laukaisee paikallisen tulehdusreaktion. Valtimotautien riskien arviointiin on yleisesti kuulunut LDL-, HDL- ja kokonaiskolesteroli- sekä triglyseridimääritykset. [1.] Vähemmän huomiota on saanut lipoproteiini (a), vaikka sen kohonnut pitoisuus on itsenäinen riskitekijä ateroskleroosissa ja vaikuttaa arviolta 1,4 miljardiin ihmiseen maailmanlaajuisesti. [2.]

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida Randoxin valmistama Lp(a)-menetelmä Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Biomarkkerit-laboratorion käyttöön. Laboratorio on akkreditoitu ja toimii keskuslaboratoriona useissa kotimaisissa ja kansainvälisissä tutkimushankkeissa. Verifioitava menetelmä on immunoturbidimetrinen, ja sitä mitataan Abbotin Architect-analysaattorilla. Edellinen menetelmä perustui massayksiköihin, mikä ei ottanut huomioon Lp(a)-partikkelin koon merkittävää vaihtelua. Uusi menetelmä, joka perustuu molaariseen yksikköön, ottaa huomioon Lp(a):n koon vaihtelun ja antaa näin ollen tarkempia tuloksia.

Uusi menetelmä on jo valmistajan toimesta validoitu, joten ennen käyttöönottoa suoritettiin verifiointi ja menetelmävertailu. Verifiointiin kuului kontrollinäytteiden sarjan sisäisen ja sarjojen välisten toistettavuuden määrittäminen. Menetelmän tarkkuus määritettiin Labqualityn laadunvalvontakierrosten perusteella ja mittausepävarmuus laskettiin käyttämällä laajennettua mittausepävarmuuden laskentakaavaa. Verifiointiin kuului myös menetelmävertailu, jossa analysoitiin näytteitä rinnakkain vanhalla ja uudella menetelmällä. Menetelmävertailusta piirrettiin Altman-Bland-kuvaajat ja regressiosuorat.

2 Lipoproteiinit ja niiden vaikutus ateroskleroosiin

2.1 Lipoproteiinien vaikutus ateroskleroosiin

Yleisin kuolinsyy Suomessa on ateroskleroosien eli valtimotautien aiheuttamat verenkiertoelinten sairaudet. Ateroskleroosi voi aiheuttaa sepelvaltimon, aivovaltimon tai alaraajojen valtimoiden tukkeutumista. [1.] Valtimotauti kehittyy vuosien kuluessa, kun ylimääräistä kolesterolia alkaa kertymään verisuonen seinämän sisään. Kolesterolin hapettuessa se laukaisee paikallisen tulehdusreaktion. Tulehdussolut muuttuvat makrofageiksi eli syöjäsoluiksi, jotka syövät hapettunutta kolesterolia yrittäen siivota verisuonen seinämää. Hapettuneesta kolesterolista täyttyneitä makrofagia kutsutaan vaahtosoluksi. Useat vaahtosolut muodostavat rasvajuosteen. [3; 4.]

Kun makrofagit lopulta kuolevat syötyään liikaa hapettunutta kolesterolia, niiden keräämä kolesterolia vapautuu muodostaen plakin ytimen. Plakin päälle muodostuu sidekudosta. Makrofagit valmistavat metalloproteinaasia, joka on kollageenia hajottava entsyymi. Tämä aiheuttaa plakin sidekudoksen heikkenemistä. Haurastunut sidekudos voi yllättäen repeytyä, jolloin siihen muodostuu verihyytymä. Hyytymä voi tukkia verisuonen äkillisesti ja aiheuttaa infarktin. Ilman repeytymistä plakin kasvu ahtauttaa suonen ja estää riittävän verenkierron kohdelihakselle. [3; 5, s. 276.]

Valtimotautien kehittymiseen vaikuttavat elintavat sekä perinnöllisyys. Elintavoista merkittävimmät tekijät ovat tupakointi, vähäinen liikunta ja runsas tyydytetyneiden rasvojen käyttö. Riskiä lisäävät myös matala HDL-kolesterolia, korkeat triglyseriditasot, diabetes ja lihavuus, joista viimeinen on yhteydessä korkeampiin verenpaine-, kolesterolia-, triglyseridi- ja sokeri-arvoihin ja vähäiseen liikuntaan. Useampi riskitekijä aiheuttaa korkeamman kuolemanriskin. [1.]

On myös tekijöitä, jotka suojaavat valtimotaudilta. Korkeampi HDL-kolesterolin määrä veressä vähentää taudin riskiä. Myös kalan, vihannesten ja hedelmien syönti ja säännöllinen liikunta on yhteydessä pienempään valtimotaudin varaan. [1.]

Tärkeimmät määritykset sydän- ja verisuonitautien riskien määrittämisessä ovat LDL-, HDL- ja kokonaiskolesteroli sekä triglyseridit. [6.] Kokonaiskolesterolin määrittäminen mittaa kolesterolin määrää kaikista veressä olevista lipoproteiineista. Triglyseridimäärittämisessä taas mitataan kaikkien lipoproteiinien triglyseridit. [7.] Hoidon tehokkuuden arvioinnissa tärkein mittari on LDL-kolesteroli. [6.] Kolesterolin viitearvot on esitetty taulukossa 1.

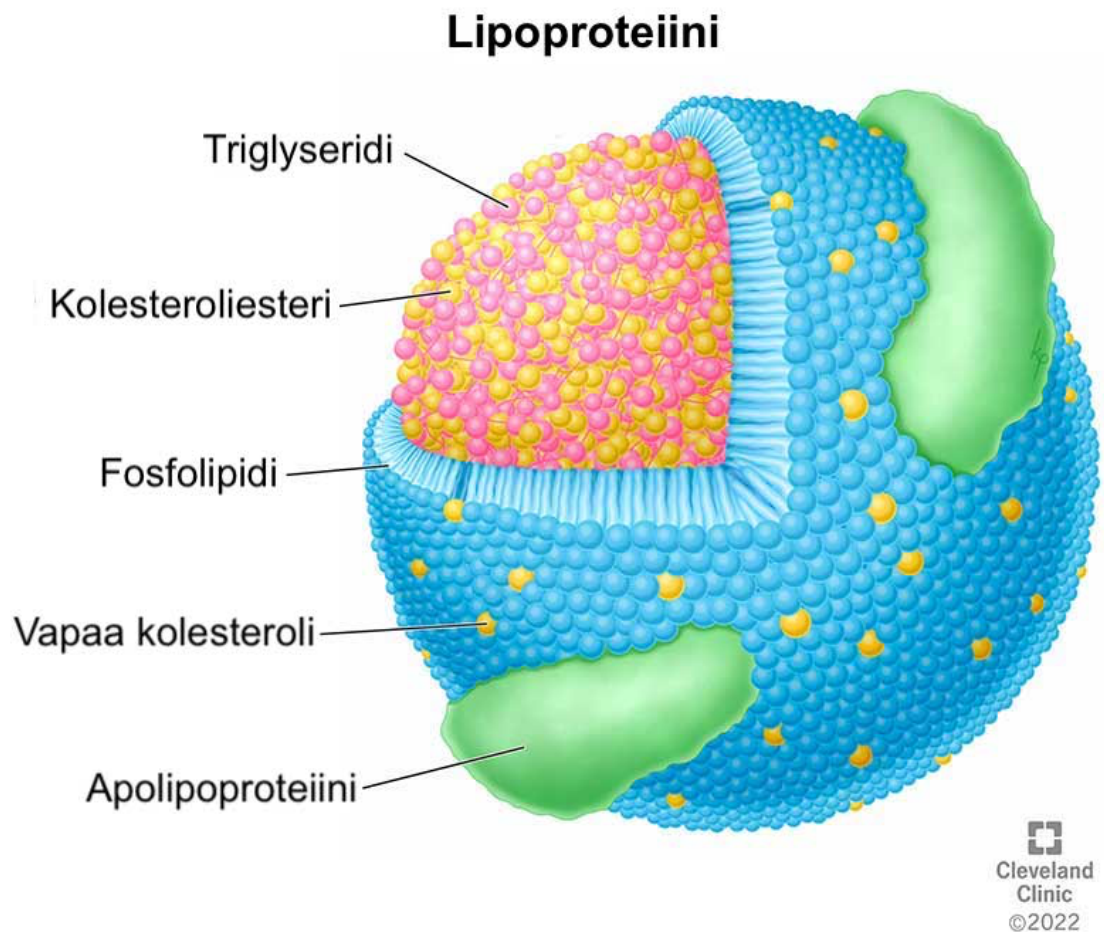
Taulukko 1. Kolesterolin viitearvot [6.]

Kokonaiskolesteroli	alle 5,0 mmol/L
LDL-kolesteroli	alle 3,0 mmol/L
HDL-kolesteroli	naisilla yli 1,2 mmol/L miehillä yli 1,0 mmol/L
Triglyseridipitoisuus	alle 1,7 mmol/L

Kun LDL-kolesterolipitoisuus, triglyseridipitoisuus tai HDL-kolesterolipitoisuus eivät ole viitearvoissa, puhutaan dyslipidemiasta. [8.]

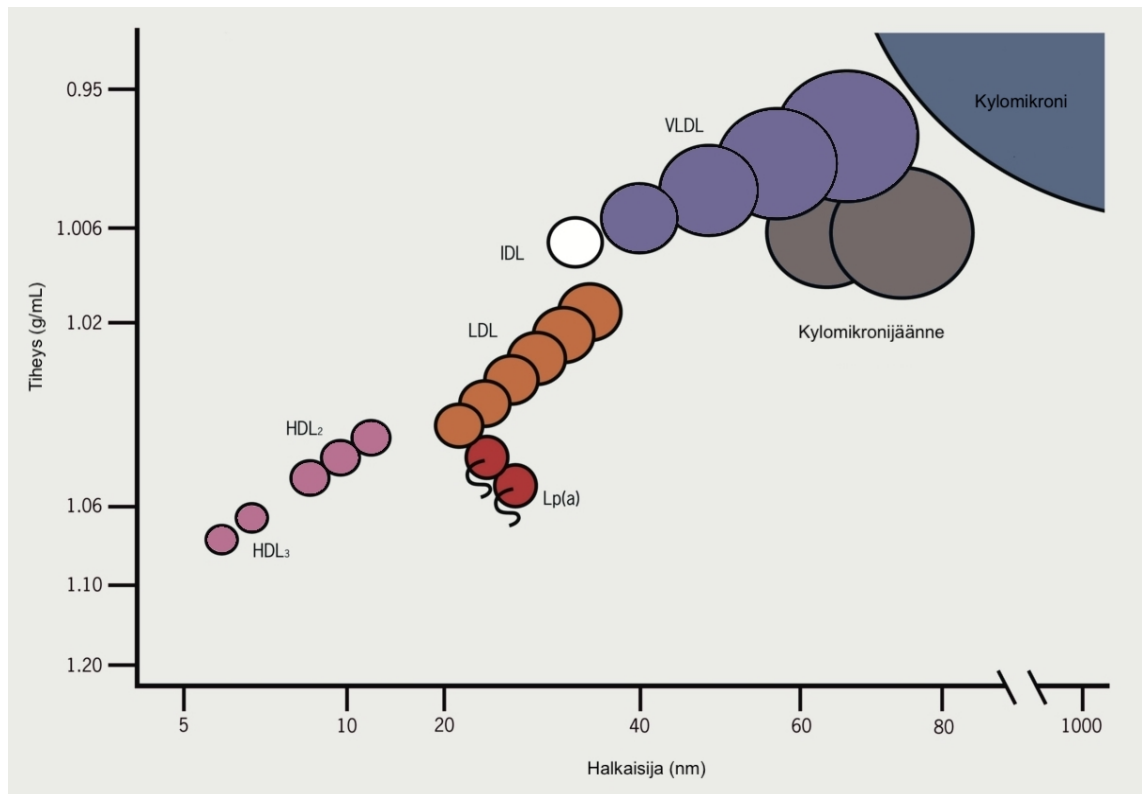
2.2 Lipoproteiinien rakenne ja luokittelu

Lipoproteiini on partikkeli, joka koostuu lipidi- ja proteiini- osasta (kuva 1). Lipoproteiinit kuljettavat rasvaliukoisia molekyylejä, kuten kolesterolia ja triglyseridejä, verenkierrossa. Lipoproteiineilla on hydrofobinen ydin, joka koostuu ei-polaarisista lipideistä, kuten triglyserideistä ja kolesteroliestereistä. Ydintä ympäröi hydrofiilinen kalvo, joka koostuu fosfolipideistä, vapaasta kolesterolista ja apolipoproteiineista. Lipoproteiinit voidaan luokitella tiheyden, koon, lipidikoostumuksen ja apolipoproteiinien perusteella (kuva 2). [9.]



Kuva 1. Lipoproteiinin rakenne. [10, muokattu.]

Apolipoproteiini on lipoproteiinin proteiiniosa. Apolipoproteiini toimii molekyylinä, joka kykenee sitoutumaan ja tunnistamaan spesifisiä lipoproteiinireseptoreita solun pinnalla. [9.] Aineenvaihdunnan eri vaiheissa apolipoproteiinit ohjaavat lipoproteiinien kulkua elimistön eri kudosten välillä muun muassa vuorovaikuttaen eri reseptorien kanssa, toimimalla entsyymien kofaktoreina ja osallistumalla lipoproteiinien rakenteen ylläpitoon. [7.] Kylomikronien tärkein rakennetta ylläpitävä apolipoproteiini on apo B-48, joka syntetisoidaan suolistossa. ApoB-100 on taas VLDL-, IDL-, LDL- ja Lp(a):n merkittävin apolipoproteiini ja se syntetisoidaan maksassa. HDL:n pääasiallinen rakenteellinen apolipoproteiini on apo A-I ja apo A-II. [9.]



Kuva 2. Lipoproteiinien koot ja luokittelu. [11, muokattu.]

Ravinnosta saatu rasva on pilkottava, jotta elimistö voi käyttää sitä energiana ja rakennusaineena. Lipoproteiiniaineenvaihdunta voidaan karkeasti jakaa kolmeen osaan: eksogeeniseen reittiin, endogeeniseen reittiin ja käänteiseen kolesterolin kuljetukseen. [9.]

Eksogeeninen lipoproteiinireitti alkaa suolistossa, jossa ravinnosta saadut ja imeytyneet lipidit sisällytetään kylomikroneihin. Kylomikronit liikkuvat verenkielrossa kuljettaen kolesterolia ja triglyseridejä. Lipoproteiinilipaasi hajottaa triglyseridejä vapaiksi rasvahapoiksi verisuonten sisäkerroksen endoteelisoluissa. Rasvahapot kulkeutuvat energianlähteeksi lihaksiin tai varastoituvat rasvakudokseen. Jäljelle jääneet kylomikronijäänteet palaavat maksaan. Triglyseridien määrä vaikuttaa kylomikronien kokoon. Rasvainen ateria lisää kuljetettavia triglyseridejä, kun taas paastotilassa kylomikronit ovat pienempiä. [9.]

Endogeeninen lipoproteiinireitti alkaa maksasta, jossa muodostuu VLDL-lipoproteiineja (very low-density lipoprotein). Nämä partikkelit kuljettavat

verenkierrassa kylomikronien tavoin triglyseridejä, jotka lipoproteiinilipaasin vaikutuksesta vapautuvat elimistön käyttöön, joko lihaksiin energian lähteeksi tai varastoon rasvakudokseen. Myös VLDL:n koko vaihtelee riippuen triglyseridien määrästä. VLDL-partikkelit ovat kuitenkin pienempiä kuin kylomikronit. Triglyseridien vapautuessa, VLDL-partikkeleista muodostuu IDL-partikkeleita (intermediate-density lipoprotein). IDL on VLDL:n ja LDL:n välimuoto. IDL metaboloituu LDL:ksi (low-density lipoprotein). VLDL, IDL ja LDL eroavat toisistaan pääasiassa koostumuksensa suhteen. Kun triglyseridit vähenevät, kolesterolin suhteellinen osuus partikkelissa kasvaa. [9; 12.]

LDL-partikkelin ydin koostuu enimmäkseen kolesterolista [12.], ja se kuljettaakin suurimman osan verenkierrassa olevasta kolesterolista. LDL-kolesterolia kutsutaan ”pahaksi kolesteroliksi”, koska sen suurentunut määrä on erityisen haitallinen terveydelle. [13.] Solujen, erityisesti maksasolujen pinnalla olevat LDL-reseptorit säätelevät LDL-pitoisuutta verenkierrassa. LDL-reseptorit sitovat LDL-partikkeleita solun sisälle, missä ne hajoavat ja vapauttavat kolesterolin solun käyttöön. [5, s. 252.] Pieni määrä LDL-reseptoreita on yhdistetty korkeisiin LDL-tasoihin, kun taas suuri määrä LDL-reseptoreita on yhdistetty mataliin LDL-tasoihin. [9.]

LDL-partikkelit vaihtelevat kooltaan, joista pienet ja tiheät partikkelit (sdLDL, small-dense LDL) ovat aterogeenisempiä eli valtimotautia edistävämpiä kuin suuret partikkelit. Pienet ja tiheät LDL-partikkelit eivät kiinnity LDL-reseptoreihin yhtä tehokkaasti kuin suuremmat. Tämän vuoksi ne viipyvät verenkierrassa pidempään, tunkeutuvat ja takertuvat valtimon seinämien sisään. Ne ovat alttiimpia myös hapettumiselle, mikä houkuttelee makrofageja puoleensa. [3; 9; 14.]

Tutkimukset ovat osoittaneet, että sdLDL-pitoisuudet ovat korkeampia muun muassa sydän- ja verisuonitautien, lihavuuteen liittyvien dyslipidemioiden sekä tyypin 1 ja 2 diabeteksen tapauksissa. sdLDL on yksi biomarkkereista, joka voi auttaa tunnistamaan yksilöt, joilla on korkea riski sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. [14.]

Käänteiseksi kolesterolin kuljetukseksi kutsutaan aineenvaihduntareittiä, jossa HDL-partikkelit keräävät kolesterolia ääreiskudoksista ja kuljettavat sitä takaisin maksaan. HDL-partikkelit muodostuvat maksassa ja suolistossa. [9.] HDL-partikkelit ovat anti-aterogeenisiä, ja niillä on myös antioksidanttisia, tulehdusta ehkäiseviä, veren hyytymistä estäviä ja apoptoosia eli ohjattua solukuolemaa ehkäiseviä ominaisuuksia. [9.] HDL-partikkelit voivat kerätä kolesterolia myös verisuonen sisäkalvon makrofaagisoluista. [7.] HDL-kolesterolia kutsutaankin ”hyväksi kolesteroliksi”. [15.]

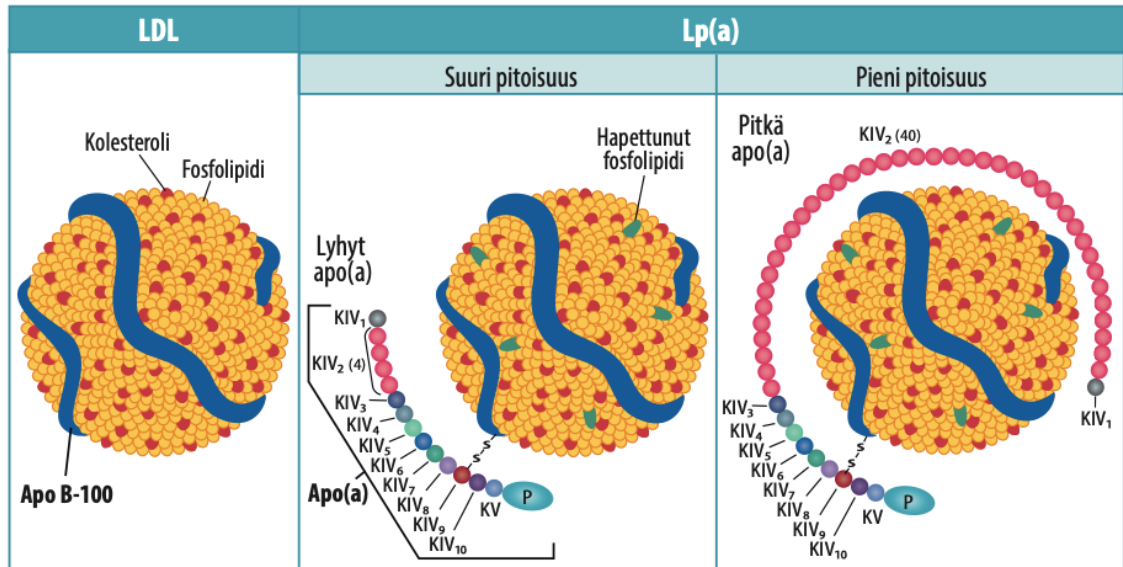
2.3 Lipoproteiini (a)

Lipoproteiini (a) muistuttaa rakenteeltaan LDL-partikkelia. Molemmat ovat pallo-maisia, matalan tiheyden lipoproteiineja, joiden ydin koostuu kolesterolieste-reistä ja jota ympäröi fosfolipideistä sekä kolesterolista koostuva lipidikalvo. Tä-män kalvon pinnalla on osittain uponneena yksi apolipoproteiini B-100. Lp(a) eroaa LDL-partikkelista siten, että sen apoB-100:aan on kiinnittynyt kovalentti-sella disulfididoksella apolipoproteiini (a) (kuva 3). [16.]

Apo(a) on glykosyloitunut vesiliukoinen proteiini, eikä se osallistu rasvojen kulje-tukseen. Se syntetisoidaan maksan solulimakalvostossa, ja sen kiinnittyminen LDL-partikkeleihin voi tapahtua maksasoluissa, niiden pinnalla tai verenkie-rrossa. Maksan pinnalla on myös useita reseptoreita, jotka osallistuvat Lp(a)-par-tikkeleiden poistoon verenkierrosta. Nämä ovat usein LDL-reseptoreita. Lp(a)-partikkelit poistuvat myös munuaisiin. [16.]

Apo(a):n monimuotoisuus perustuu pitkälti KIV-2 (kringle IV-2) -kopioiden luku-määrään. Apo(a):n KIV jakautuu 10 osaan. KIV-1 ja KIV-3-10 esiintyvät yhtenä kappaleena, mutta KIV-2-osiossa voi olla useita identtisiä kopioita. Kopiomäärä vaihtelee kolmesta yli 40:een. Toistot vaikuttavat merkittävästi Lp(a):n molekyy-lipainoon, joka voi vaihdella 150:n ja 900:n kilodaltonin välillä. Jopa yksilön apo(a):n koossa on paljon vaihtelua. [17.] Kopiomäärää säätelee LPA-geeni, joka sijaitsee kromosomissa 6q26-27. Vaihtelevia kokoja kutsutaan apo(a)-iso-formeiksi. [18.]

Apo(a):n pituus on yhteydessä verenkierron Lp(a):n pitoisuuteen. Apo(a):n ollessa lyhyt sen muodostuminen ja erittyminen maksasta on voimakkaampaa ja näin myös Lp(a)-pitoisuus veressä on korkeampi. Apo(a):n ollessa pitkä, Lp(a):n pitoisuus veressä on pienempi. Lp(a)-pitoisuus määräytyy geneettisesti ja vaihtelee merkittävästi yksilöiden, väestön ja etnisten ryhmien välillä. Korkea pitoisuus lisää riskiä sairastua ateroskleroottiseen valtimotautiin. [16.]



Kuva 3. Lp(a):n rakenne verrattuna LDL-partikkeliin. Lp(a) muistuttaa LDL-partikkeliä, mutta sen apoB-100:an on kuitenkin kiinnittynyt apo(a), jonka pituus vaihtelee KIV-2-kopiomäärän perusteella. Suuri pitoisuus on yhteydessä lyhyempään apolipoproteiiniin, jossa KIV-2-kopioita on vähemmän. Pieni pitoisuus on yhteydessä pidempään apolipoproteiiniin, jossa KIV-2-kopioita on enemmän. [16.]

Lp(a) osallistuu ateroskleroosin etenemiseen ainakin kolmella eri tavalla: se edistää valtimoiden kovettumista, veren hyytymistä ja tulehdusreaktioita. Lp(a) kiinnittyy valtimoiden seinämiin ja on herkempi hapettumaan kuin LDL. Hapettuminen ja siitä seurannut tulehdusreaktio saavat makrofagit keräämään verisuonen seinämillä kolesterolia. Täyttyessään ne muuttuvat vaahtosoluiksi. [19.]

Korkeat Lp(a)-tasot edistävät plakin repeämistä ja veritulpan muodostumista verisuonissa. Apo(a)-proteiiniosa on samankaltainen plasminogeenin kanssa, ja se kilpailee sitoutumispaikoista endoteelisoluissa. Plasminogeenin tehtävänä on

hajottaa verihyytymiä, mutta tämä kilpailu voi heikentää plasminogeenin kykyä toimia hyytymien liuottamisessa. Apo(a) varastoi hapettuneita fosfolipidejä, mikä lisää tulehduksellista vaikutusta. [19.]

Lp(a):n pitoisuuden yksikköinä käytetään massayksikköä mg/dL ja molaarista yksikköä nmol/L. Kun Lp(a)-pitoisuutta mitataan massayksiköissä, se ottaa huomioon koko Lp(a)-partikkelin massan. Lp(a):n rakenne vaihtelee kuitenkin suuresti sekä ihmisten välillä, että yksilöllä. Molaarinen mittaus perustuu partikkelien lukumäärään tietyssä pitoisuudessa. Molaarisesti mittaamalla saadaan vertailukelpoisempia tuloksia yksilöiden välillä, koska mittaus ei ole riippuvainen partikkelin koosta tai sisällöstä. [20.] Pyrkimys on siirtyä molaaristen yksiköiden käyttöön. [16.]

Lp(a):n pitoisuus vaihtelee alle 0,1 mg/dL:n ja yli 300 mg/dL:n välillä ja molaarisina yksiköinä alle 0,2 ja 750 nmol/L:n välillä. On havaittu, että riski sydän- ja verisuonisairauksiin lisääntyy Lp(a)-pitoisuuden ollessa yli 30 mg/dL ja molaarisina yksiköinä 75 nmol/L. [16; 21.]

UK Biobank havaitsi, että mediaani Lp(a)-pitoisuus vaihteli eri etnisten ryhmien keskuudessa (molaarisin yksiköin ilmaistuna, mediaanina): kiinalaisilla 16 nmol/L, valkoihoisilla 19 nmol/L, eteläaasialaisilla 31 nmol/L ja mustaihoisilla 75 nmol/L. Lp(a) pitoisuudet ovat yleensä noin 5–10 % korkeammat naisilla kuin miehillä sekä mustaihoisilla, että valkoihoisilla henkilöillä. Miehillä Lp(a)-tasot pysyvät suhteellisen vakaana, naisilla tasojen nouseminen vaihdevuosi-iässä on yleistä. Vaikka kohonnut Lp(a)-pitoisuus vaikuttaa 1,4 miljardiin ihmiseen maailmanlaajuisesti, sen merkitystä sydän- ja verisuonitauteihin ei ole korostettu riittävästi. [21.] Korkea Lp(a) on itsenäinen riskitekijä, jopa silloin kun henkilöillä on alhainen LDL-kolesterolipitoisuus. [2.]

3 Lipoproteiini (a):n mittaus

3.1 Lipoproteiini (a):n mittaukseen liittyvät haasteet

Lipoproteiini (a):n mittaukseen plasmasta tai seerumista on useita eri menetelmiä, kuten ELISA, nefelometria ja immunoturbidimetria. Lp(a)-pitoisuuden tarkka mittaus on vaikeaa, koska kyseisen lipoproteiinin proteiiniosa, apo(a), on hyvin vaihteleva kooltaan KIV-2 kopioiden vuoksi (kuva 3). Sekä ihmisten välillä että yksilöillä esiintyy eri kokoisia Lp(a)-partikkeleita. Yksilöllä on kaksi geneettisesti määräytynyttä isoformia, jotka peritään vanhemmilta. Kokoerojen lisäksi apo(a):n ja apoB:n kiinnittyminen toisiinsa ja apo(a):n samankaltaisuus plasminogeenin kanssa tuovat haasteita mittaukseen. [17.]

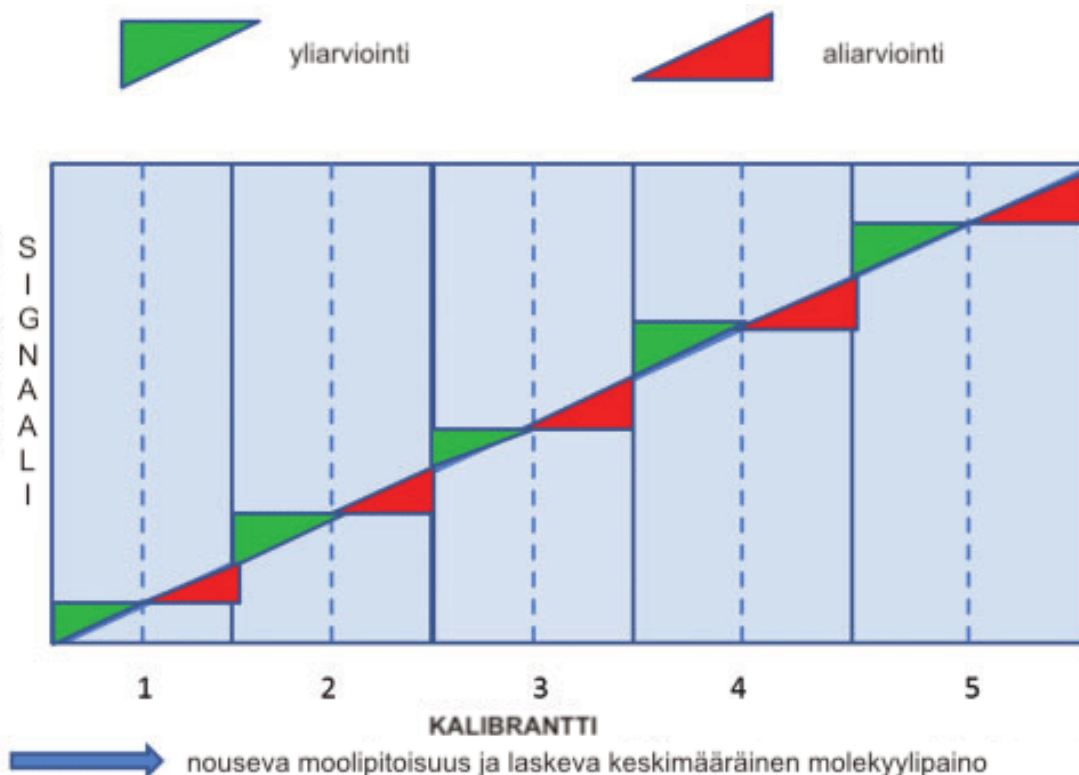
Lp(a):n mittausten tulosyksiköt vaihtelevat. Perinteisesti on käytetty massaan perustuvia yksiköitä, mg/dL ja mg/L, mutta uusimmissa menetelmissä käytetään SI-järjestelmän molaarista yksikköä, nmol/L, jolloin tulos heijastaa Lp(a)-partikkelien lukumäärää tilavuutta kohden. [16.] Kun Lp(a)-tulokset ilmoitetaan massayksiköitä käyttäen, ne ottavat huomioon koko partikkelin massan, johon sisältyy apo(a), apoB-100, kolesteroli, kolesteroliesterit, fosfolipidit ja triglyseridit. Edellä mainitut lipidit sisältävät myös erilaisia rasvahappolajeja, joiden molekyyli- ja vaihtelee ketjujen pituuden ja tyydyttyneisyyden suhteen. Lp(a) sisältää myös muita rasvaliukoisia molekyyliä ja hiilihydraattikomponentteja, jotka myös ovat vaihtelevia kooltaan. Immunomääritykset mittaavat Lp(a):n proteiiniosuutta eivätkä hiilihydraattien ja lipidien sisältöä, joten massayksikössä ilmaistut tulokset aiheuttavat mittausvirheitä. [22.] Näitä mittausvirheitä voidaan vähentää, kun mitataan partikkelien lukumäärää massan sijaan. [17.]

Koska Lp(a)-partikkelien koko vaihtelee, haaste on valita määrittäskalibraattoreihin sopivan kokoinen partikkeli. Kun näytteessä on suurempi Lp(a)-molekyyli kuin kalibraattorissa, määrittäminen antaa korkeamman signaalin, koska KIV-2-vastaaineet reagoivat voimakkaammin suurempien Lp(a)-partikkelien kanssa verrattuna pienempiin partikkeleihin. Tämä voimakkaampi reaktio johtaa Lp(a)-arvojen yliarviointiin, eli tulokset näyttävät suurempina kuin ne todellisuudessa

ovat. Kun näytteessä on taas pienempi Lp(a)-molekyylä kuin kalibraattorissa, määritys antaa matalamman signaalin, koska KIV-2-vasta-aineet reagoivat heikommin pienempien Lp(a)-partikkelien kanssa verrattuna suurempiin partikkeleihin. Tämä heikompi reaktio johtaa taas Lp(a)-arvojen aliarviointiin, eli tulokset näyttävät pienempinä kuin ne todellisuudessa ovat. Apo(a):n KIV-2-toistojen määrällä on siis merkittävä vaikutus Lp(a)-mittauksen tarkkuuteen. Referenssimateriaalilla, kalibrointimäärityksellä ja näytteillä ei ole samaa Lp(a)-koostumusta, joten samanlainen immunoreaktiivisuus on vaikea saavuttaa. [17.]

Lp(a):n immunomääritykseen tarvitaan vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä apo(a):lle. Näitä voidaan valmistaa puhdistetusta apo(a):sta tai puhdistetusta Lp(a):sta. Vasta-aineen valmistaminen puhdistetusta apo(a):sta vaatii sen erottamisen kokonaisesta Lp(a)-partikkelista pelkistämällä. Tämä kuitenkin johtaa disulfididissoluijon katkeamiseen apo(a):n ja apoB:n välillä, ja se myös katkaisee kolme intraketjuista disulfididissoluiosta kussakin kringle-domeenissa. Tämä muuttaa apo(a):n konformaatiota ja sen immunoreaktiivisuutta, jolloin tällä tavoin valmistetut vasta-aineet eivät tunnista apo(a):ta tehokkaasti. Jos vasta-aineita valmistetaan puhdistetusta Lp(a):sta, on polyklonaalisten ja monoklonaalisten vasta-aineiden oltava reagoimatta apoB:n tai plasminogeenin kanssa. [17.]

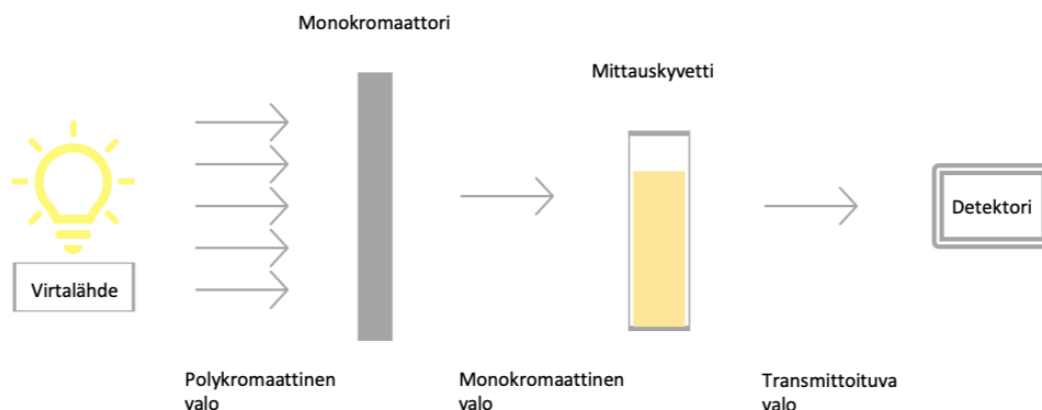
Lp(a)-pitoisuudet tulisi mitata menetelmällä, jossa isoformikoon vaikutus on minimoitu käyttämällä asianmukaisia vasta-aineita kalibrointimateriaaleineen, jotka on varmennettu jäljitettävyydestä WHO:n/IFCC:n vertailumateriaaleihin. Kun mittausmenetelmät on kalibroitu ja standardisoitu käyttämällä tunnettua, varmistettua vertailumateriaalia tulokset ovat vertailukelpoisia eri mittausten välillä. Valmistajan Denka Seiken reagensseja hyödyntävät mittaukset ovat tällä hetkellä kaupallisesti saatavilla olevista analyysimenetelmistä luotettavimpia. Sen sijaan, että kalibroinnissa käytettäisiin yhden korkean Lp(a)-pitoisuuden kalibraattorin laimennossarjaa, eri isoformikokojen vaikutusta on minimoitu käyttämällä viittä eri pitoisuuden sisältävää kalibraattoria, jotka sisältävät eri kokoisia Lp(a)-partikkeleita (kuva 4). Nämä kalibraattorit on valmistettu erilaisista seerumipoleista. [17; 22.]



Kuva 4. Denka-kalibranttien kaavio, jossa on 5 eri $L_p(a)$ -tasoa. [23, muokattu.]

3.2 Fotometria ja immunoturbidimetria kliinisessä kemiassa

Fotometriset menetelmät mittaavat valon läpäisevyyttä (transmittanssia), imeytymistä (absorptiota), säteilyä (emittoitumista), siroutumista, fluoresoitumista tai heijastumista. Fotometrisessä mittauksessa polykromaattinen valo, eli valo, joka sisältää useita eri aallonpituuksia, johdetaan esimerkiksi monokromaattoriin. Tämä hajottaa valon ja johtaa mittauskyvetteihin vain monokromaattisen valon eli valon, joka sisältää vain tietyn aallonpituuden. Mitattavan aineen läpi kulkeva transmittoitunut valo mitataan (kuva 5). [24, s.93–94.]



Kuva 5. Fotometrin pelkistetty toimintaperiaate [24, s. 93, mukailen.]

Turbidimetria on yksi fotometrisistä menetelmistä ja sitä käytetään kliinisessä kemiassa esimerkiksi seerumin, plasman, virtsan ja selkäydinnesteen sisältämien proteiinien pitoisuuksien mittaamiseen. Kliinisen kemian analysaattoreissa hyödynnetään paljon turbidimetriaa. [24, s. 92, 96, 105; 25, s. 66, 71–72.]

Immunokemiallinen määrittäminen perustuu spesifisten vasta-aineiden käyttöön, jotka on suunniteltu tunnistamaan tietty yhdiste tai samanlaisen rakenteen omaavat yhdisteet. Näissä menetelmissä esimerkiksi vasta-aine ja antigeeni sitoutuvat toisiinsa muodostaen proteiinikompleksin, joka aiheuttaa reaktioseokseen sameutta. Turbidimetriassa näytteen ja reagenssien seokseen ohjataan tietyllä aallonpituudella olevaa valoa, joka ei absorboi seoksen aineisiin. Valon osuessa vasta-aine-antigeenikompleksiin se siroaa pois kulkusuunnasta. Mittauksessa mitataan läpikulkeneen valon määrän vähenemistä, johon vaikuttavat pitoisuus ja partikkelikoko. [24, s. 105; 25, s. 71–72.]

Näytteen arvo saadaan vertaamalla näytteiden signaalia standardin signaaliin, joka sisältää tietyn määrän mitattavaa ainetta. Kalibraattorin ja näytteen analyysin tulisi olla rakenteellisesti samankaltainen, jotta sama immunoreaktiivisuus partikkelia kohti saavutetaan. [17.]

4 Architect c8000 ja verrattavat Lp(a)-menetelmät

Verifiointissa käytettiin seuraavaa laitetta ja reagensseja:

- Architect c8000 -analysaattori

Quantian reagenssit:

- Lp(a) Reagent Kit 7K00-03
- Lp(a) Control 5P84-11
- Lp(a) Calibrators 5P83-02

Randoxin reagenssit:

- Lp(a) Assay LP 2757
- Lp(a) Calibration Series LP 3403
- Lp(a) Control LE2661, LE2662, LE2663.

4.1 Architect c8000

Architect c8000 on Abbottin valmistama kliinisen kemian analysaattori. Järjestelmä käyttää suodatinfotometriaa aallonpituuksilla 340–804 nm, ja sen valonlähteenä on volframihalogeenilamppu. Maksimi analysointinopeus on 800 testiä/tunti. [26, s. 3.]

Architectin menetelmät perustuvat foto-, potentio- ja turbidimetriaan. Laite pysyy analysoimaan seerumi-, plasma-, kokoveri-, virtsa- ja aivo-selkäydinnesteitä. [27.]

4.2 Randoxin ja Quantian Lp(a)-menetelmät

Aikaisemmin käytössä on ollut Quantian reagensseja käyttämä fotometrinen immunoturbidimetrinen menetelmä. Menetelmä mittaa Lp(a)-partikkelin massaa tilavuutta kohden (mg/L), ja sen lineaarinen mittausalue on 13–900 mg/L. [28.]

Uusi Randoxin reagensseja käyttämä Lp(a)-määritys mittaa molaarista pitoisuutta (nmol/L). Menetelmä on fotometrinen ja immunoturbidimetrinen. Menetelmän on lisensoinut valmistaja Denka Seiken. Näytteessä oleva Lp(a) reagoi vasta-aineilla päällystettyjen latex-partikkeleiden kanssa ja muodostaa anti-geeni-vasta-ainereaktiossa sakan, jonka sameutta analysaattori mittaa turbidimetrisesti aallonpituudella 700 nm. Lineaarinen mittausalue on 5–205 nmol/L. Randoxin Lp(a) kalibroitimenetelmä on jäljitettävissä WHO/IFCC:n referenssimateriaaliin Lp(a) SRM 2B. [28.]

5 Randoxin Lp(a)-menetelmän verifiointi

Randoxin Lp(a)-menetelmä on valmistajan validoima, mutta ennen sen käyttöönottoa suoritetaan verifiointi, jotta voidaan todeta menetelmän soveltuvan Biomarkkerit-laboratoriolle ja Architect -analysaattorille. Verifiointi tehdään THL:n Kemiallisten menetelmien Validointiohjeen (TO-008) mukaan. Koska edellinen menetelmä korvataan uudella, ohella tehdään myös menetelmävertailu. [30, s. 10.] Valmistajan toimesta on testattu selektiivisyys ja mittausalue.

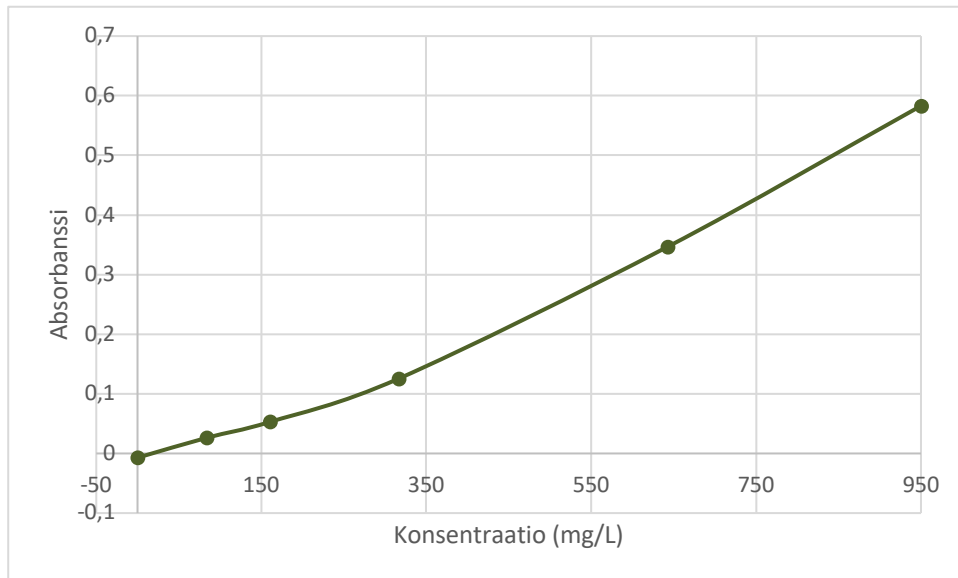
5.1 Kalibrointi

Randoxin Lp(a)-kalibroitisarja perustuu lyofilisoituun eli jäädytyskuivattuun ihmisen seerumiin, joka sisältää lipoproteiini (a):ta. Lp(a)-pitoisuuksia on viidellä eri tasolla. Kalibroitisarja on tarkoitettu in vitro-diagnostiseen käyttöön. Lp(a)-kalibraattorien molaariset arvot ovat jäljitettävissä WHO/IFCC:n referenssimateriaaliin Lp(a) SRM 2B. [28.]

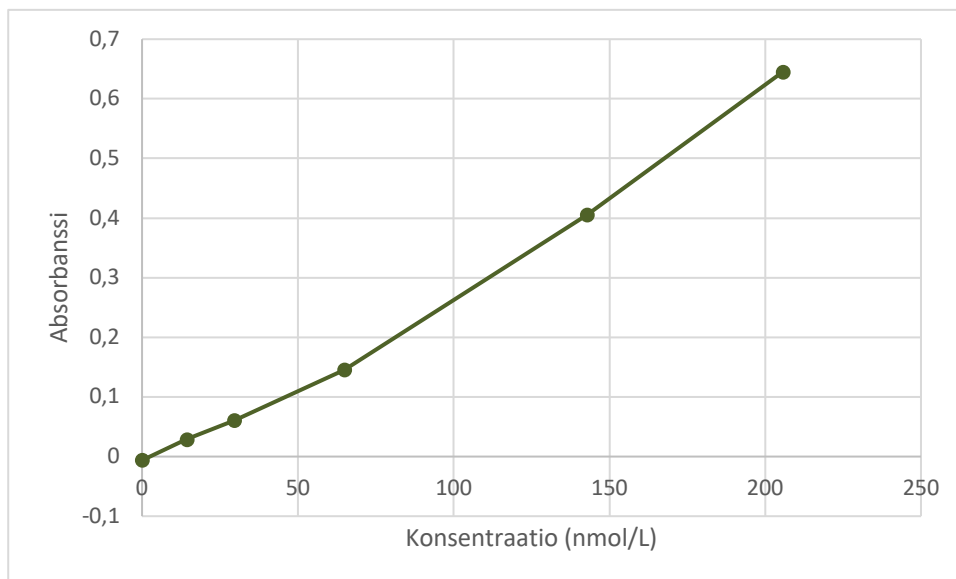
Jokaiseen kalibroitipulloon pipetoitiin 1 ml laboratoriovettä, minkä jälkeen pullot suljettiin korkilla ja niiden annettiin seistä 30 minuuttia. Sen jälkeen niitä sekoitettiin, kunnes sisältö oli täysin liuennutta. Kalibraattorit olivat tämän jälkeen käyttövalmiita. Niiden säilytyslämpötila on +2–8°C ja ne säilyvät 14 päivän ajan.

Randoxin lisäksi myös edellinen Quantian menetelmä kalibroitettiin Architect -analysaattorilla. Kummallakin on 5 kalibroititasoa ja yksi nollanäyte. Kuvassa 6 on

esitetty edellisen menetelmän, Quantian, kalibrointikuvaaja, jossa x-akselilla on konsentraatio yksikössä mg/L. Kuvassa 7 on esitetty Randoxin kalibrointi, jossa x-akselilla on konsentraatio yksikössä nmol/L. Molempien y-akseli kuvaa absorbanssia.



Kuva 6. Edellisen menetelmän, Quantian Lp(a)-kalibrointikuvaaja Lp(a), jonka pitoisuusalue on 0–950 mg/L.



Kuva 7. Verifioitavan menetelmän, Randoxin Lp(a)-kalibrointikuvaaja, jonka pituusalue on 0–205,7 nmol/L.

5.2 Verifiointi

5.2.1 Selektiivisyys

Valmistajan toimesta on testattu mahdollisesti häiriöitä aiheuttavat analyytit ja niiden pitoisuustasot reagenssien käytön yhteydessä, eikä niiden havaittu vaikuttavan tuloksiin. Testatut analyytit ja niiden pitoisuustasot on esitetty taulukossa 2.

Taulukko. 2 Reagenssien käytön yhteydessä testatut mahdollisesti häiriöitä aiheuttavat analyytit ja niiden pitoisuustasot valmistajan mukaan. [28.]

Hemoglobiini	500 mg/dL
Vapaa bilirubiini	100 mg/dL
Konjugoitunut bilirubiini	100 mg/dL
Triglyseridit	1000 mg/dL
Intralipid	1000 mg/dL

5.2.2 Mittausalue

Mittausalue on testattu valmistajan toimesta. Mittausalue on noin 0,93–90 mg/dL. Jos mittauksen tulos jää määrittelyrajan ulkopuolelle, mittaus uusitaan. Tällöin mittausalue laajenee 0,465–90 mg/dL:aan. Mittausalueeseen vaikuttaa kalibraattorin reagenssin vaihtuva erä (lot). Molaarisina yksikköinä lineaarinen mittausalue on 5–205 nmol/L. [28.]

Määrittelyraja on testattu valmistajan toimesta. Pienin luotettavasti havaittu Lp(a)-pitoisuus on 0,93 mg/dL. [28.]

5.2.3 Tarkkuus

Menetelmälle määritettiin sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus. Sekä sarjan sisäisessä että sarjojen välisessä toistettavuudessa käytettiin Randoxin Lp(a)-kontrolleja. Sarjojen välinen toistettavuus määritettiin ajamalla matalan ja korkean tasoista kontrollia 21 päivänä. Sisäisen toistettavuuden määrittelyt ovat taulukossa 3.

Sisäinen toistettavuus laskettiin analysoimalla kolmen eri tason näytteitä useasti, josta laskettiin keskiarvo (\bar{x}), (kaava 1), keskihajonta (s), (kaava 2) ja variatiokerroin ($cv\%$), (kaava 3).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (1)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$cv\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Taulukko 3. Sarjan sisäisen toistettavuuden määitykset, yksikössä nmol/L.

	Taso 1 (Lot 2832CH)	Taso 2 (Lot 2877CH)	Taso 3 (Lot 2836CH)
	26,79	36,43	54,6
	27,08	35,82	54,1
	27,46	36,05	54,6
	27,08	35,87	53,82
		36,84	55,24
		36,15	54,05
		35,92	54,56
		35,5	53,68
		35,96	53,91
		36,38	53,41
Keskiarvo (nmol/L)	26,97	36,09	54,2
Keskihajonta (nmol/L)	0,37	0,38	0,55
Variaatiokerroin (%)	1,38	1,05	1,01

Sarjan sisäisen toistettavuuden arvoja verrattiin myös valmistajan antamien tulosten kanssa ja niistä laskettiin poikkeama (*bias* %), (kaava 4). Sisäisen toistettavuuden arvot verrattuna valmistajan ilmoittamiin tuloksiin ovat taulukossa 4.

$$bias \% = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

jossa,

x_{lab} = oma arvo

x_{ref} = valmistajan ilmoittama arvo

Taulukko 4. Valmistajan asettamat viitearvot [28.] ja poikkeamat (*bias* %) verrattuna omiin määrittämyksiin.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3
Oma arvo (nmol/L)	26,97	36,09	54,2
Tavoitearvo (nmol/L)	29,5	36,2	55,7
Alaraja (nmol/L)	23,6	29,0	44,6
Yläraja (nmol/L)	35,4	43,3	66,8
Poikkeama (%)	-8,50	-0,30	-2,70

Tason 1 osalta oma tulos on $-8,50$ % matalampi kuin valmistajan ilmoittama tavoitearvo. Tulokset sijoittuvat kuitenkin valmistajan ilmoittamien viitearvojen väliin. Tason 2 ja 3 saadut arvot ovat pääosin yhteneväisiä eivätkä poikkea merkittävästi valmistajan ilmoittamista tavoitearvoista.

Sarjojen väliseen toistettavuuteen sisällytettiin 21 päivän matalan ja korkean tason tuloksia, joita oli 37 kummassakin (liite 1). Näistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Taulukossa 5 on sarjojen välisen toistettavuuden tunnusluvut.

Taulukko 5. Sarjojen välisen toistettavuuden tunnusluvut, yksikössä (nmol/L).

	Taso 1 (LPA2661L1)	Taso 3 (LPA2663L3)
Näytteiden lukumäärä	37	37
Keskiarvo (nmol/L)	35,04	70,54
Keskihajonta (nmol/L)	2,16	1,19
Variaatiokerroin (%)	6,16	1,69

Keskihajonta ja variaatiokerroin ovat tason 1 kohdalla korkeammat, kuin tason 3 kohdalla. Tulokset ovat kuitenkin hyväksyttävää tasoa.

Menetelmän tarkkuus laskettiin ulkoisen laadunvalvontakierroksen perusteella. Määrittämyksessä käytettiin Labqualityn 09/23 ja 09/22 laadunvalvontakierroksen

näytteitä. Näytteistä laskettiin poikkeamat oikeasta arvosta ja näiden keskiarvot, jotka on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Laadunvalvontakierrosten näytteiden poikkeamat (bias %).

Kierros	Oma tulos (nmol/L)	Oma tulos (mg/L)	Tavoite (mg/L)	Poikkeama (%)
09/23	103,76	433,37	460,56	-5,9
09/22	124,21	517,58	551,4	-6,1
			Keskiarvo	-6,0
			Keskihajonta	0,002

5.2.4 Mittausepävarmuus

Laajennetun mittausepävarmuuden laskemiseen käytettiin Validointiohjeen (TO-008) mukaista kaavaa (kaava 5), joka on julkaistu Moodi 4/1997-lehdessä [29.]:

$$\sqrt{CV_{\text{sarjan sisäinen}}\%^2 + CV_{\text{sarjojen välinen}}\%^2 + \left(\sqrt{\left(\frac{BIAS\%}{2}\right)^2 + STD\%^2}\right)^2 \cdot 2} \quad (5)$$

jossa,

CV = variaatiokerroin

$BIAS\%$ = poikkeama

$STD\%$ = poikkeamien keskihajonta

2 = kattavuuskerroin, jolloin laajennettu mittausepävarmuus on 95 % luottamustasolla

Sarjan sisäisen toistettavuuden eri tasojen variaatiokertoimien keskiarvo oli 1,15 %. Sarjojen välisten toistettavuuden variaatiokerroin matalalta pitoisuudelta oli 6,16 % ja korkealta pitoisuudelta 1,69 %. Näiden keskiarvo oli 3,92 %. Laajennettu mittausepävarmuus laskettiin matalalta ja korkealta pitoisuudelta sekä niille yhteisesti.

Ulkoisten laadunvalvontakierrosten perusteella laskettujen poikkeamien keskiarvo oli -6,0 % ja niiden keskihajonta oli 0,002 nmol/L.

Taulukko 7. Laajennettu mittausepävarmuus.

Laajennettu mittausepävarmuus	
Matala	12,5 %
Korkea	4,1 %
Yhteinen	8,2 %

Laajennettu mittausepävarmuus matalalta pitoisuudelta oli 12,5 % ja korkealta pitoisuudelta 4,1 %. Näiden yhteinen laajennettu mittausepävarmuus on 8,2 % ($k = 2$).

6 Menetelmävertailu

Kun menetelmää vaihdetaan, verifiointiin kuuluu myös menetelmävertailu. [30.] Lp(a)-näytteitä ajettiin sekä edellisellä Quantian että verifioitavalla Randoxin menetelmillä rinnakkain. Näytteissä oli sekä yksittäisen ihmisen seeruminäytteitä että seerumipooleja, jotka ovat 2–3 ihmiseltä yhdistettyjä näytteitä. Poolinäytteitä oli 39 ja yksittäisnäytteitä oli 113. Taulukossa 8 on esitetty näytteiden tilastolliset tunnusluvut.

Taulukko 8. Poolinäytteiden ja yksittäisnäytteiden tilastolliset tunnusluvut.

Poolinäytteet		Yksittäisnäytteet	
Lukumäärä	39	Lukumäärä	113
Keskiarvo (mg/dL)	34,71	Keskiarvo (mg/dL)	26,21
Keskiarvo (nmol/L)	75,10	Keskiarvo (nmol/L)	54,95
Keskihajonta (mg/dL)	13,90	Keskihajonta (mg/dL)	35,44
Keskihajonta (nmol/L)	32,74	Keskihajonta (nmol/L)	79,12

Koska yksittäisnäytteissä esiintyi huomattavasti korkeampia ja matalampia pitoisuuksia kuin poolinäytteissä, käsiteltiin nämä tulokset erikseen. Yksittäisnäytteessä myös havaitaan kaksi eri kokoista Lp(a)-partikkelia, koska kummaltakin vanhemmalta peritään yksi variantti. 2–3 ihmiseltä yhdistetyssä poolinäytteessä näitä variantteja on luonnollisesti useampi.

Randoxin menetelmän määrittäjäraja on 5 nmol/L. Jos pitoisuusarvo on tätä matalampi, analysaattori ilmoittaa arvoksi <5 nmol/L. Näitä määrittäjärajan alittavia tuloksia esiintyi 18 yksittäisnäytteessä. Koska niitä oli merkittävä määrä, ne säilytettiin laskuihin. Vertailua varten käytettiin määrittäjärajan puolikasta 2,5 nmol/L. Mittausalueen ylittävät pitoisuudet laite laimentaa automaattisesti.

Aikaisempi Quantian menetelmä käyttää mittayksikköinä mg/L ja uusi Randoxin menetelmä käyttää mittayksikköinä nmol/L. Tulosten tarkastelua ja vertailua varten Quantian tulosityksiköt muunnettiin mg/L:sta mg/dL:aan (kaava 6).

$$\frac{\frac{mg}{L}}{10} = \frac{mg}{dL} \quad (6)$$

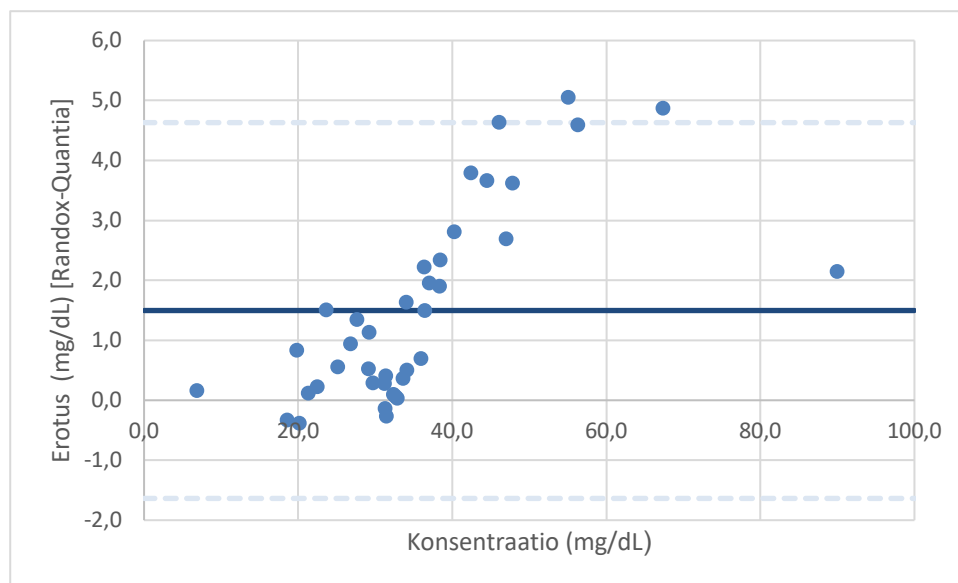
Randoxin nmol/L arvot muunnettiin mg/dL:ksi käyttämällä kirjallisuudesta saatua kaavaa (kaava 7). Tämä kaava on kehitetty mittaamalla 13 930:n Copenhagen General Population Study -tutkimukseen osallistuneen Lp(a)-arvot sekä mg/dL että nmol/L-yksiköissä, joista muodostettiin lineaarinen regressiosuora. [31.]

$$\frac{mg}{dL} = \left(\frac{nmol}{L} + 3,83 \cdot 0,4587\right) \quad (7)$$

Altman-Bland-kuvaaja piirrettiin keskiarvon ja erotuksien perusteella erikseen poolinäytteille ja yksittäisnäytteille. Y-akselilla on menetelmien välisten tulosten erotukset ja x-akselilla konsentraatiot yksikössä mg/dL.

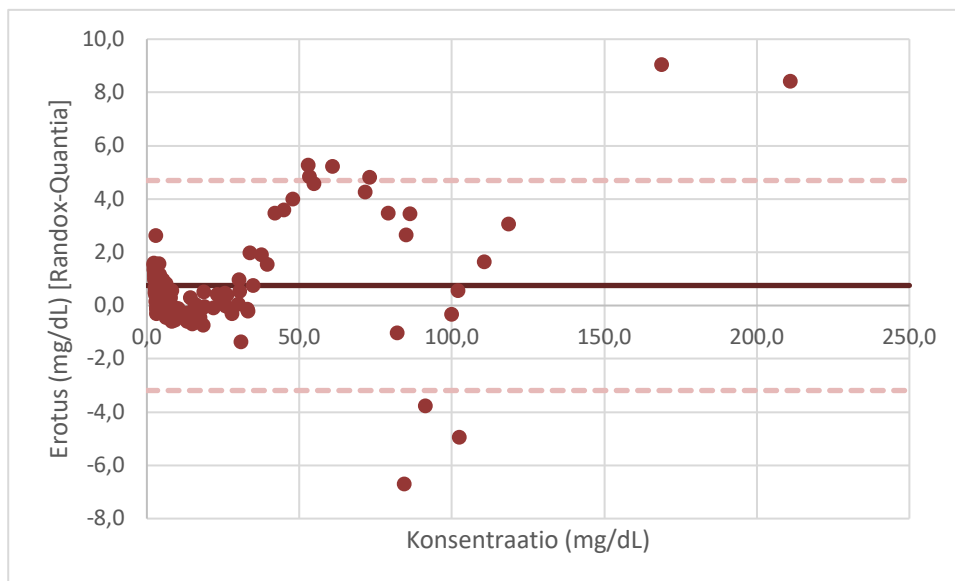
Poolinäytteiden osalta suurin erotus menetelmien välillä oli 5,06 mg/dL. Poolinäytteiden matalin pitoisuus on 6,77 mg/dL ja korkein pitoisuus on 89,90 mg/dL. Keskiarvon mukaan Randoxin menetelmän tulokset eroavat vanhan

menetelmän tuloksista 1,50 mg/dL, eli Randoxin menetelmä antaa noin 1,50 mg/dL korkeampia tuloksia. Menetelmien välinen tulosten hajonta kasvaa korkeammilla pitoisuuksilla. Luottamusvälien ulkopuolelle jää 3 näytettä 39:stä. Prosentuaalisesti tämä on 7,69 %. Nämä ovat luottamusvälin ylärajan ulkopuolella. Tulokset asettuvat y-akselin positiiviselle puolelle, kun konsentraatio ylittää 40 mg/dL:n (kuva 8).



Kuva 8. Altman-Bland-kuvaaja poolinäytteistä. Menetelmien keskimääräinen erotus on 1,50 mg/dL. 95 %:n luottamusvälin alaraja on -1,64 mg/dL ja yläraja 4,63 mg/dL.

Yksittäisnäytteiden osalta suurin erotus menetelmien välillä on 9,07 mg/dL. Yksittäisnäytteiden matalin pitoisuus on 2,10 mg/dL ja korkein pitoisuus on 210,82 mg/dL. Keskiarvon mukaan Randoxin menetelmän tulokset eroavat edellisen menetelmän tuloksista 0,75 mg/dL, eli uusi menetelmä antaa keksimäärin 0,75 mg/dL korkeampia tuloksia. 95 %:n luottamusvälin ulkopuolelle jää 9 näytettä 113:sta. Prosentuaalisesti tämä on 7,96 %. Suurimmat luottamusrajan ylärajan ylitykset olivat näytteillä, joilla oli korkein konsentraatio: 168,63 mg/dL ja 210,82 mg/dL. Menetelmien välistä tulosten hajontaa esiintyy myös konsentraation ollessa noin 50–70 mg/dL. Luottamusvälin alarajan ulkopuolelle jää kolme näytettä (kuva 9).



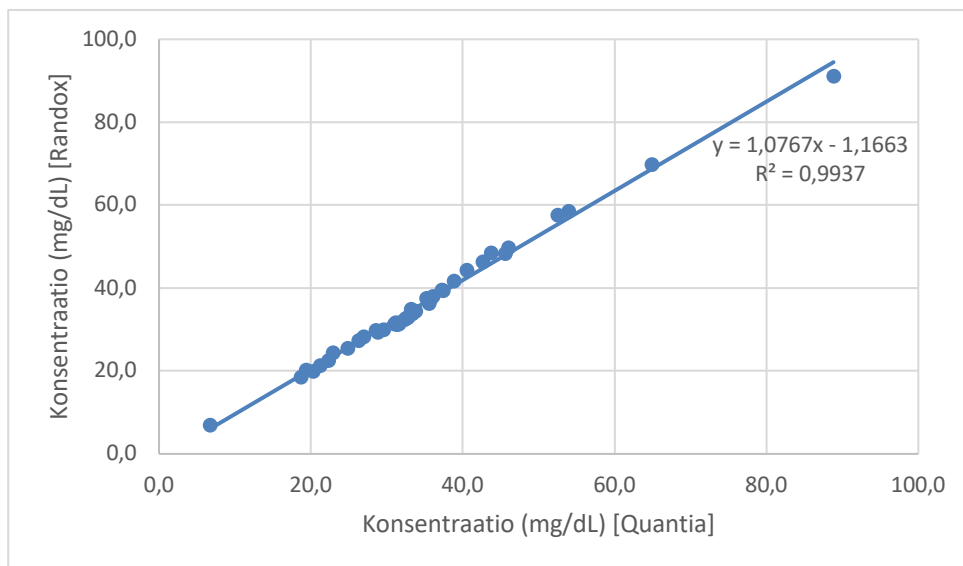
Kuva 9. Altman–Bland-kuvaaja yksittäisnäytteistä. Menetelmien keskimääräinen erotus on 0,75 mg/dL. 95 %:n luottamusvälin alaraja on –3,19 mg/dL ja yläraja 4,69 mg/dL.

Regressiosuoria varten tulokset piirrettiin pisteinä koordinaatistoon ja tehtiin suorien sovitus. Sekä pooli- että yksittäisnäytteiden tulokset osuivat hyvin suoralle.

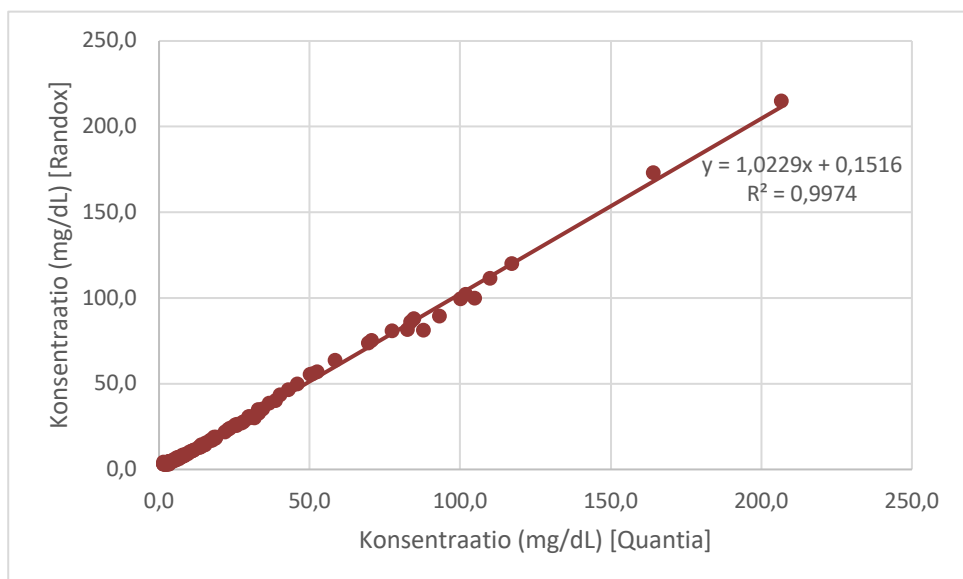
Kulmakerroin havainnoi, kuinka paljon y:n arvo muuttuu, kun x:n arvo muuttuu yhden yksikön. [32.] Se siis ilmaisee, kuinka paljon uuden menetelmän arvo muuttuu suhteessa vanhaan menetelmään. Kulmakerroin oli poolinäytteillä 1,0767 ja yksittäisnäytteillä 1,0229. Koska kulmakerroin on hiukan suurempi kuin 1, viittaa se siihen, että uusi menetelmä antaa hiukan korkeampia tuloksia kuin vanha menetelmä. Kulmakerroin on kuitenkin hyvin lähellä lukua 1, mikä viittaa siihen, että menetelmien tulostasojen väliset eroavaisuudet ovat vähäiset.

Selitysasteella (R^2) voidaan arvioida regressiosuoraa. Selitysaste havainnoi, kuinka suuren osan muuttuja x selittää muuttujan y vaihtelusta. [32.] Se siis ilmaisee, kuinka hyvin uuden menetelmän arvot voidaan ennustaa vanhan menetelmän arvojen perusteella. Selitysaste on parempi, kun pisteet ovat lähellä regressiosuoraa. Kun selitysaste lähestyy arvoa 1, se osoittaa, että uuden

menetelmän tuottamat arvot voidaan lähes täysin ennustaa vanhan menetelmän arvojen avulla. Tässä tapauksessa poolinäytteiden selitysaste on 0,9937 ja yksittäisnäytteiden 0,9974. Selitysasteet ovat erittäin korkeita, joten menetelmän välillä on vahva lineaarinen yhteys. Regressiosuorat poolinäytteille on esitetty kuvassa 10 ja yksittäisnäytteille kuvassa 11.



Kuva 10. Regressiosuora poolinäytteistä. Matalin konsentraatio on 6,77 mg/dL ja korkein konsentraatio 89,90 mg/dL.



Kuva 11. Regressiosuora yksittäisnäytteistä. Matalin konsentraatio on 2,10 mg/dL ja korkein konsentraatio 210,82 mg/dL.

7 Johtopäätökset

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida Randoxin valmistama molaarinen Lipoproteiini (a) -menetelmä Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Biomarkerit-laboratorioon. Verifiointiin kuului myös menetelmävertailu. Valmistajan toimesta oli määritetty selektiivisyys ja mittausalue. Verifiointiin kuului sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden, tarkkuuden ja laajennettun mittausepävarmuuden määrittäminen.

Sisäinen toistettavuus määritettiin kolmella eri tasolla, joiden keskihajonnat olivat 0,37–55 nmol/L ja variaatiokertoimet 1,01–1,38 %. Tuloksia verrattiin valmistajan antamiin arvoihin ja ne sijoituivat valmistajan antamien matalimpien ja korkeimpien arvojen väliin. Sarjojen välinen toistettavuus määritettiin kahdelta eri tasolta, joiden keskihajonnat olivat 2,16 ja 1,19 nmol/L ja variaatiokertoimet 6,16 % ja 1,69 %.

Menetelmän tarkkuuden määrittämiseen käytettiin Labqualityn kontrollinäytteitä. Kahden eri kierroksen tulosten poikkeamien keskiarvo oli –6,0 %. Laajennettua mittausepävarmuudet olivat matalalta tasolta 12,5 %, korkealta tasolta 4,1 % ja näiden yhteinen laajennettu mittausepävarmuus oli 8,2 % ($k = 2$).

Menetelmävertailua varten pooli- ja yksittäisnäytteiden tulokset käsiteltiin erikseen. Yksittäisnäytteissä esiintyy kaksi eri kokoista Lp(a)-partikkelia, koska kummaltakin vanhemmalta peritään yksi variantti. 2–3 ihmiseltä yhdistetyssä poolinäytteessä on siis useampia erikokoisia Lp(a)-partikkelia.

Yksittäisnäytteitä oli yhteensä 113, joista 18 oli määritysrajan 5 nmol/L alapuolella. Laskemista varten arvoksi asetettiin määritysrajan puolikas 2,5 nmol/L, joka on keskiarvo 0:n ja 5:n väliltä.

Tulosten vertailua varten verifioitavan Randoxin menetelmän molaariset tulokset muutettiin kaavaa käyttämällä mg/dL:ksi, joka oli edellisen Quantian menetelmän tulosyksikkö. Muuntokertoimien käyttö ei kuitenkaan aina ole välttämättä

tarkka kaikille Lp(a)-isoformeille. Lp(a)-partikkeleilla on vaihteleva molekyyli-paino ja apo(a):n KIV-2-rakenne.

Menetelmävertailua varten piirrettiin Altman-Bland-kuvaajat ja regressiosuorat. Menetelmien väliset pitoisuuserot olivat 0,75–1,50 mg/dL. Verifioitava Randoxin menetelmä antaa hiukan korkeampia tuloksia edelliseen menetelmään verrattuna. Suurin osa näytteiden tuloksista sijoittui Altman-Bland-kuvaajien luottamusvälien sisäpuolelle. Regressiosuoran kulmakertoimet olivat lähellä lukua 1 ja selitysasteet erittäin korkeat.

Kahden korkeimman tuloksen (>150 mg/dL) osalta menetelmien välinen hajonta oli suurempaa ja tulokset olivat luottamusvälien ylärajan ulkopuolella. Kyseiset tulokset ylittivät Architect c8000 -analysaattorin kalibrointialueet. Lp(a)-pitoisuudet, jotka ovat yli 150 mg/dL, ovat kuitenkin väestössä harvinaisia.

Seuraavien tekijöiden ansiosta Randoxin molaarinen menetelmä sopii paremmin Lp(a)-pitoisuuksien mittaamiseen:

1. Menetelmä laskee Lp(a)-partikkelien lukumäärän tietyissä pitoisuuksissa, eikä niiden massaa, joka koostuu useammasta komponentista ja joka on erittäin vaihteleva kooltaan ja rakenteeltaan. Molaarinen mittaus antaa siis tarkempia tuloksia ja parantaa näin riskiryhmiin luokittelua.
2. Menetelmä on jäljitettävissä WHO:n/IFCC:n referenssimateriaaliin, mikä lisää tulosten luotettavuutta ja vertailukelpoisuutta eri yksilöiden, ajan-kohtien, laboratorioden ja tutkimusten välillä.
3. Muut kliiniset rasva-arvomittaukset, kuten kokonaiskolesteroli, LDL-kolesteroli, HDL-kolesteroli ja triglyseridipitoisuus, perustuvat pääosin molaarisiin yksiköihin. Tästä syystä molaarisen menetelmän käyttö Lp(a):n määrittämisessä yhdenmukaistaa eri rasva-arvojen mittauksia.

Randoxin molaarisen Lp(a)-menetelmän on osoitettu toimivan Architect c8000-analysaattorilla ja se on voitu ottaa käyttöön.

Lähteet

- 1 Kettunen, Raimo. 2023. Valtimotauti (ateroskleroosi). Lääkärikirja Duodecim. Verkkoaineisto. Kustannus Oy Duodecim <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00095>> Luettu 4.1.2024.
- 2 Welsh, Paul; Welsh, Claire; Celis-Morales, Carlos A.; Brown Rosemary; Ho, Frederick K.; Ferguson, Lyn D.; Mark, Patrick B.; Lewsey, James; Gray, Stuart R.; Lyall, Donald M.; Gill, Jason M. R; Pell, Jill P.; de Lemos, James A.; Willeit, Peter; Sattar, Naveed. 2021. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease: prediction, attributable risk fraction, and estimating benefits from novel interventions. *European Journal of Preventive Cardiology*. Vol. 28(18). s. 1991–2000.
- 3 Valtimonkovettuman (ateroskleroosi) synty ja kehittyminen. 2021. Kuva- materiaalia valtimonterveydestä. Verkkoaineisto. Suomen Sydänliitto ry. <https://sydan.fi/ammattilaispalvelu/wp-content/uploads/sites/5/2021/10/valtimonkovettuman_synty_ja_kehittyminen_ohjausmateriaali.pdf> Luettu 4.1.2024.
- 4 Palomäki, Ari. 2011. Statiinit ja tromboosi. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. No 20. s.2131–2138.
- 5 Lehtimäki, Terho. 2023. Lipoproteiiniaineenvaihdunta – Dyslipidemiat, ateroskleroosin patogeneesi ja valtimotautiriskin arviointi. Teoksessa: Hatakainen, Kristina; Lakkisto, Päivi; Lempiäinen, Anna. *Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia*. 5 painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.
- 6 Tarnanen, Kirsi; Stranberg, Timo; Syväne, Mikko & Kukkonen-Harjula, Katriina. 2021. Dyslipidemiat eli veren poikkeavat rasva-arvot. Käypä hoito -suosituksen potilasversio. Verkkoaineisto. Helsinki: Suomalainen Lääkäri-seura Duodecim. <<https://www.kaypahoito.fi/khp00047>> Luettu 4.1.2024
- 7 Leiviskä, Jaana; Sundvall, Jouko; Jauhiainen, Matti; Laatikainen, Tiina. 2014. Apolipoproteiinit A-I ja B. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. No 22. s. 2331–2337.
- 8 Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Sisätautilääkärien Yhdistys ry:n asettama työryhmä. 2020. Dyslipidemiat. Käyvän hoidon tiivistelmät. Verkkoaineisto. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. <<https://www.kaypahoito.fi/kht00019>> Luettu 5.1.2024

- 9 Feingold, Kenneth R. 2023. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>> Luettu 2.2.2024
- 10 Cleveland Clinic. 2022. Lipoproteins. Verkkoaineisto. <<https://my.clevelandclinic.org/health/articles/23229-lipoprotein>> Luettu 4.2.2024
- 11 Packard, Chris J. 2023. Triglyceride-rich lipoproteins and their role in cardiovascular disease. *British Journal of Cardiology*. Vol. 30(2), s. 4-9.
- 12 Syväne, Mikko. 2015. Lipoproteiinit ja niiden aineenvaihdunta. Päivitetty 28.2.2019. Verkkoaineisto. Suomen Sydänliitto ry. <<https://sydan.fi/fakta/lipoproteiinit-ja-niiden-aineenvaihdunta/>> Luettu 6.2.2023
- 13 Mustajoki, Pertti. 2022. Kolesteroli. Lääkärikirja Duodecim. Verkkoaineisto. Kustannus Oy Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00035/kolesteroli>> Luettu 13.2.2024
- 14 Vekic, Jelena; Zeljkovic, Aleksandra; Cicero, Arrigo F. G.; Janez, Andrej; Stoian, Anca, Pantea; Sonmez, Alper; Rizzo, Manfredi. 2022. Atherosclerosis Development and Progression: The Role of Atherogenic Small, Dense LDL. 2022. *Medicina (Kaunas)*. Vol. 58(2). s. 299.
- 15 Tunturi, Satu. 2022. HDL-kolesteroli eli "hyvä kolesteroli" (P-Kol-HDL). Laboratoriotutkimusten tulkinta. Verkkoaineisto. Kustannus Oy Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03083>> Luettu 17.2.2024
- 16 Vuorio, Alpo; Jauhiainen, Matti; Kovanen, Petri T. 2020. Lipoproteiini (a):n suurentunut pitoisuus on ateroskleroottisen valtimotaudin riskitekijä, jonka tehohoito mahdollistuu uusilla täsmälääkkeillä. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. No 19. s. 2107–2115.
- 17 Marcovina, Santica M. & Albers, John J. 2016. Lipoprotein (a) measurements for clinical application. Thematic Review Series: Lipoprotein (a): Coming of Age at Last. *Journal of Lipid Research*. Vol 57(4). s. 526–537.
- 18 Korneva, Victoria, A; Kuznetsova, Tatjana Yurjevna; Julius, Ulrich. 2021. Modern Approaches to Lower Lipoprotein (a) Concentrations and Consequences for Cardiovascular Diseases. *Biomedicines*. Vol 9(9). s. 1271.
- 19 Rehberg-Likozar, Andreja; Zavrtnik, Mark; Šebeštjena Miran. 2020. Lipoprotein(a) in atherosclerosis: from pathophysiology to clinical relevance and treatment options. *Annals of Medicine*. Vol. 52(2). s. 162–177.
- 20 Tsimikas, Sotirios; Fazio, Sergio; Viney Nicholas J.; Xia, Shuting; Witztum, Joseph L.; Marcovina, Santica M. 2018. Relationship of lipoprotein(a)

- molar concentrations and mass according to lipoprotein(a) thresholds and apolipoprotein(a) isoform size. *Journal of Clinical Lipidology*. Vol. 12(5). s. 1313–1323.
- 21 Kronenberg, Florian; Mora Samia; Stroes, Erik S. G.; Ference, Brian A.; Arsenault, Benoit, J.; Berglund, Lars; Dweck, Marc R.; Koschinsky, Marly; Lambert, Gilles; Mach, François. 2022. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *European Heart Journal*. Vol. 43(39). s. 3925–3946.
 - 22 Cegla, Jaimini; Neely, R. Dermot G.; France, Michael; Ferns, Gordon; Byrne, Chris D.; Halcox, Julian; Datta, Dev; Capps, Nigel; Shoulders, Carol; Qureshi, Nadeem; Rees, Alan; Main, Linda; Cramb, Robert; Viljoen, Adie; Payne, Jules; Soran, Handrean; for the HEART UK Medical, Scientific and Research Committee. 2019. HEART UK consensus statement on Lipoprotein(a): A call to action. *Atherosclerosis*. Vol. 291. s. 62–70.
 - 23 Cegla, Jaimini; France, Michael; Marcovina, Santica M.; Neely, R. Dermot G. 2021. Lp(a): When and how to measure it. *Annals of Clinical Biochemistry*. Vol. 58(1). s. 16–21.
 - 24 Alagrund, Katariina; Nivukoski, Ulla; Orpana, Arto; Savukoski, Tanja; Sirén, Saija; Åkerman, Kari. 2023. Laboratorion perusmenetelmät. Teoksessa: Hotakainen, Kristina; Lakkisto, Päivi; Lempiäinen, Anna. *Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia*. 5 painos. Helsinki: Kandi-daattikustannus Oy.
 - 25 Halonen, Toivo. 2003. Fotometriset menetelmät. Teoksessa: Penttilä, Ilkka (toim.) *Kliiniset Laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Helsinki: WSOY.
 - 26 Architectin Laitekirja. BIOS. L019. THL:n sisäinen aineisto. VAPO/ VAKE, VABI.
 - 27 Abbott. Core Laboratory. Architect c8000. Verkkoaineisto. <<https://www.corelaboratory.abbott/int/en/offerings/brands/architect/architect-c8000.html>> Luettu 19.2.2024
 - 28 Architectin Menetelmäkirja. Lipoproteiini (a). Lp(a). THL:n sisäinen aineisto. VAPO/ VAKE, VABI.
 - 29 Siloaho, Maritta; Elg, Peter; Leppänen, Esa; Loikkanen, Minna; Puukka, Raija; Ruopuro, Marja-Leena; Saarmala, Hannu. 1997. Ohjeita mit-tausepävarmuuden arvioimiseksi ja laskemiseksi kliinisen kemian labora-toriossa. *Moodi*. No 4. s. 196–203.

- 30 Validointiohje TO-008. Kvantitatiivisen Architect – analysointimenetelmien verifiointi. Versio 3.2. THL:n sisäinen aineisto. VAPO/ VAKE.
- 31 Langsted, Anne; Kamstrup, Pia, R; Børge Nordestgaard. 2019. High lipoprotein(a) and high risk of mortality. *European Heart Journal*. Vol. 40(33). s. 2760–2770.
- 32 Heikkilä, Tarja. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9.painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Sarjojen välinen toistettavuus

Taulukko 1. Sarjojen välinen toistettavuus (nmol/L).

Sarjojen välinen toistettavuus (nmol/L)		
Päivämäärä	LPA2661L1	LPA2663L3
20.6.2023	38,44	69,95
20.6.2023	38,59	72,72
27.6.2023	38,49	71,63
27.6.2023	38,88	71,53
27.6.2023	38,49	71,25
27.6.2023	39,17	71,77
27.6.2023	38,64	72,26
27.6.2023	38,88	72,23
14.9.2023	38,21	72,04
15.9.2023	34,07	68,71
19.9.2023	33,45	69,57
20.9.2023	33,07	70,1
21.9.2023	34,26	68,34
28.9.2023	32,92	68,79
29.9.2023	33,83	69,31
29.9.2023	34,03	69,16
2.10.2023	34,03	68,83
2.10.2023	34,17	70,47
3.10.2023	34,69	69,16
25.10.2023	33,67	70,54
26.10.2023	33,97	70,28
27.10.2023	34,3	70,13
27.10.2023	33,63	70,58

31.10.2023	32,41	70,62
31.10.2023	34,93	71,89
1.11.2023	34,74	70,54
1.11.2023	35,27	72,23
2.11.2023	33,43	70,69
2.11.2023	34,06	70,17
7.11.2023	34,79	70,92
7.11.2023	33,97	71,48
8.11.2023	33,48	70,47
8.11.2023	33,38	69,6
9.11.2023	32,46	69,86
9.11.2023	33,77	72,38
13.11.2023	33,58	70,66
13.11.2023	34,5	69,1
Keskiarvo (nmol/L)	35,04	70,54
Keskihajonta (nmol/L)	2,16	1,19
Variaatiokerroin (%)	6,16	1,69