

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Immunokemia
2012

Katja Salonen

IDS 25-HYDROXY VITAMIN D EIA –MENETELMÄN TESTAUS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Katja Salonen

IDS 25-HYDROXY VITAMIN D EIA –MENETELMÄN TESTAUS

Tutkimusten myötä paljastuu koko ajan uutta tietoa D-vitamiinin merkityksestä elimistölle. Puutteellisen D-vitamiinin saannin on todettu lisäävän riskiä moniin sairauksiin kuten osteoporoosiin, 1-tyyppin diabetekseen ja erilaisiin syöpiin. Maissa, joissa auringonvalo on valtaosan vuodesta vähäistä, seerumin alhainen kalsidiolipitoisuus on yleinen ilmiö. Kasvava kiinnostus D-vitamiinia kohtaan on lisännyt merkittävästi seerumin kalsidiolipitoisuusmittausten määrää laboratorioissa.

Veren kalsidiolipitoisuusmittausten luotettavina määrittämenetelminä pidettävät massaspektrofotometriset ja nestekromatografiset menetelmät ovat suhteellisen kalliita. Kustannustehokkaammissa immunokemiallisissa määrittämenetelmissä on kuitenkin todettu olevan ongelmia mitattavan analyysin lipofiilisyydestä ja voimakkaasta proteiineihin sitoutumisesta johtuen. Aikaisemmissa tutkimuksissa immunokemiallisten määrittämenetelmien välillä on todettu olevan hajontaa ja epäspesifisyyttä tiettyjen D-vitamiinin metaboliittien mittaamisessa.

Tutkimuksen aihe saatiin Turun ammattikorkeakoululta. Otokoko oli 30 havaintoyksikköä. Mitattavat näytteet valittiin Turun ammattikorkeakoulun Ruiskadun laboratorioissa säilytettävistä seeruminäytteistä. Referenssimittaukset Siemens Total VitD –menetelmällä suoritti VITA-laboratorio.

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA –menetelmän toimivuutta. Tavoitteena oli selvittää IDS EIA –menetelmän tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus sekä arvioida menetelmän soveltuvuutta kliiniseen ja tutkimukselliseen käyttöön. Tarkkuutta tutkittiin vertaamalla testattavan IDS EIA –menetelmän tuloksia akkreditoitujen Siemens Total VitD –menetelmän tuloksiin. Tavoitteena oli myös selvittää pakastuksen vaikutusta kalsidiolipitoisuuteen käyttäen IDS EIA –menetelmää. Tutkimus on kvantitatiivinen.

IDS EIA –menetelmä korreloi referenssimenetelmän kanssa, mutta yksittäisten näytteiden kohdalla havaittiin merkittävää hajontaa. Tulostasot menetelmissä olivat yhtenevät. IDS EIA –menetelmän toistettavuus ja uusittavuus todettiin hyväksi. Pakastuksella todettiin olevan kalsidiolipitoisuutta laskeva vaikutus.

ASIASANAT:

D-vitamiini, Menetelmävertailu, Immunomääritys

Katja Salonen

TESTING THE IDS 25-HYDROXY VITAMIN D EIA METHOD

Research constantly brings forth new information about vitamin D and its significance to the human body. In countries where exposure to sunlight is minimal during most of the year low serum calcidiol concentrations are common. Growing interest towards vitamin D has significantly increased the amount of serum calcidiol measurements performed in laboratories. Deficient vitamin D intake has been proven to increase the risk for many diseases, including osteoporosis, type 1 diabetes and different types of cancers.

The mass spectrophotometric and liquid chromatographic methods for measuring serum calcidiol concentrations are considered reliable, but they are rather expensive. The more cost-effective immunochemical assay methods, however, have proven to have problems due to the measured analyte's lipophilicity and high tendency to bind to proteins. Previous studies have shown that there is high inter-method variability and unspecificity when measuring certain vitamin D metabolites.

This study was commissioned by Turku University of Applied Sciences. The sample size was 30 observational units. The analyzed samples were chosen from serum samples kept in the Ruiskatu laboratory of Turku University of Applied Sciences. Reference assays were performed by VITA Laboratorio using the Siemens Total VitD method.

The purpose of this study was to examine whether the IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA method is functional. The object was to find out how accurate, repeatable and reproducible results the IDS EIA method produces and to evaluate its suitability for clinical and research use. Accuracy was examined by comparing the acquired results to the results obtained by using the Siemens Total VitD method. The object was also to examine the effects freezing has on the calcidiol levels in the samples by using the IDS EIA method. The study is quantitative.

There was strong correlation between the results from IDS EIA and from the reference method; however, significant variation among individual samples was found. The result levels were comparable. Repeatability and reproducibility for the IDS EIA method were determined to be high. Freezing was shown to lower the samples' calcidiol concentrations.

KEYWORDS:

Vitamin D, Method comparison, Immunoassay

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 D-VITAMIININ IMMUNOKEMIALLINEN MÄÄRITYS	7
2.1 D-vitamiini	7
2.1.1 Metabolia	8
2.1.2 Merkitys elimistölle	10
2.1.3 Puutos	11
2.1.4 Toksisuus	13
2.1.5 Suositukset	13
2.2 Immunokemiallinen määrittäminen	15
2.2.1 Antigeeni ja vasta-aine	16
2.2.2 Kalibrointi ja lineaarisuus	18
2.2.3 Fotometria	18
2.2.4 Entsyymi-immunomäärittäminen	20
2.2.5 Kemiluminesenssi-immunomäärittäminen	21
2.3 D-vitamiinin määrittäminen	22
2.3.1 IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA	23
2.3.2 Siemens ADVIA Centaur® XP Vitamin D Total	25
2.4 Menetelmävertailu	25
2.4.1 Tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus	26
3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	27
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	28
4.1 Metodologiset lähtökohdat	28
4.2 Toteutus	29
4.2.1 Analysointi IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA -kitillä	30
5 TUTKIMUSTULOKSET	32
5.1 Menetelmävertailu	32
5.2 Intra assay CV%	36
5.3 Interassay CV%	37
5.4 Pakastuksen vaikutus	39
5.5 Kontrollit	40
6 POHDINTA	41
6.1 Tutkimustulosten tarkastelu	41
6.2 Luotettavuuden arviointi	43

6.3 Eettiset näkökohdat	44
LÄHTEET	46

LIITTEET

LIITE 1: Toimeksiantosopimus	
LIITE 2: Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä	
LIITE 3: Ajosuunnitelma	
LIITE 4: Pakkausinsertin ohje	
LIITE 5: Pakkausinsertin tietoja	

KUVIOT

Kuvio 1. D-vitamiinin metabolia (rakennekaavat Richard S. 2006.)	10
Kuvio 2. Vasta-aineen perusyksikön rakenne (mukailen Crowther 2001).	17
Kuvio 3. IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA -periaate (Salonen 2012).	24
Kuvio 4: Menetelmien 25-OH D-tulosten korrelaatio (nmol/l) (n=30)	32
Kuvio 5: Näytteen 25-OH D-pitoisuuden vaikutus menetelmien väliseen variaatiokertoimeen	34
Kuvio 6: 25-OH D-pitoisuudet pylväskaaviona (n=30)	35
Kuvio 7: Sarjojen välinen korrelaatio (nmol/l) (n=9)	38
Kuvio 8: Pakastuksen vaikutus 25-OH D-pitoisuuteen	40

TAULUKOT

Taulukko 1. Menetelmien suorituskyky (Carter ym. 2010).	23
Taulukko 2: Menetelmien välinen 25-OH D-tulosten vertailu (n=30).	33
Taulukko 3: Sarjan sisäinen toistuvuus (n=44).	36
Taulukko 4: Sarjan sisäinen toistuvuus standardi- ja kontrollinäytteillä (n=9)	36
Taulukko 5: Sarjojen välinen toistuvuus (n=9).	37
Taulukko 6: Pakastuksen vaikutus (n=14).	39
Taulukko 7: Käytetyt kontrollit ja mitatut pitoisuudet	40

1 JOHDANTO

Veren D-vitamiinipitoisuusmittauksia on ryhdytty tekemään jo 1970-luvun alkupuolella (Wallace ym. 2010). D-vitamiinin merkitys luuston hyvinvoinnille on tiedetty jo pitkään, mutta viimeaikaisten tutkimusten perusteella D-vitamiinilla näyttäisi olevan merkitystä myös sydän- ja verisuonisairauksien, joidenkin syöpien ja autoimmuunisairauksien kehittymisessä. Kiinnostus väestön D-vitamiinitasoa kohtaan onkin kasvanut viimevuosina eksponentiaalisesti. (Alfthan ym. 2012.)

Aikaisemmin D-vitamiinimäärityksiä tehtiin vain erikoislaboratorioissa. Viime vuosina D-vitamiinin mittaamiseen tarkoitettujen kaupallisten kittien valikoima on lisääntynyt. Vain osa menetelmistä on akkreditoituja ja tulostasojen onkin todettu vaihtelevan menetelmien välillä. Joidenkin menetelmien on todettu mittaavan epäspesifisti veren kokonais D-vitamiinipitoisuutta. Menetelmien tulisi mitata D-vitamiinitasot luotettavasti ja riittävän suurella pitoisuusalueella, jotta potilaiden saama hoito olisi laadukasta. (Aro 2005, Carter ym. 2004a.)

D-vitamiinitutkimuksissa suurien näytemäärien analysointi laadukkailla nestekromatografisilla ja massaspektrometrisilla menetelmillä on kallista ja aikaavievää. Laboratoriot tarvitsevat automatisoituja ja luotettavia väestöseulontaan sopivia immunologisia analysointimenetelmiä. (Alfthan ym. 2012.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on testata IDS Hydroxy Vitamin D entsyymi-immunomääritysmenetelmän luotettavuutta ja toistettavuutta. Testaus tehdään vertaamalla menetelmällä saatuja tuloksia akkreditoidun referenssimenetelmän tuloksiin.

2 D-VITAMIININ IMMUNOKEMIAALLINEN MÄÄRITYS

2.1 D-vitamiini

Yleisesti vitamiineiksi määritellään ruoassa luonnollisina komponentteina esiintyvät orgaaniset yhdisteet, joiden tarve on erittäin vähäinen, mutta niiden vähentynyt saanti johtaa spesifisiin puutosoireisiin. Vitamiinit ovat yhdisteitä, joita elimistö ei yksinään kykene syntetisoimaan tarpeeseen nähden riittävästi. Vitamiinit vaikuttavat elimistön normaaliin fysiologiaan kuten solujen kasvuun, kehitykseen ja ylläpitoon. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

D-vitamiinit ovat molekyyliä, joiden steroidirunko on hajonnut avoketjuksi. D-vitamiinien ryhmään lasketaan viisi erilaista molekyyliä; D₂, D₃, D₄, D₅ ja D₆-vitamiinit. Tavallisesti D-vitamiinista puhuttaessa tarkoitetaan D₃-vitamiinia eli kolekalsiferolia. (Toriola 2010.) D-vitamiini ylläpitää elimistön kalsium- ja fosfaattitasapainoa sekä osallistuu luiden mineralisaatioon (Mutanen & Voutilainen 2005).

D-vitamiinia saadaan pääasiassa D₃-vitamiinina sekä pienemmässä määrin D₂-vitamiinina eli ergokalsiferolina. Molemmat metaboloituvat elimistössä samalla tavalla. (Aro 2005.) D-vitamiini ei ole välttämätön ravintoaine, jos iholle kohdistuvaa auringonvalon UVB-säteilyä on riittävästi. UVB-säteilyn vaikutuksesta iholla syntetisoituu D₃-vitamiinia sen esiasteesta, 7-dehydrokolesterolista, joka on kolesterolimetaboliitti. (Mutanen & Voutilainen 2005.) D₃-vitamiinia saadaan eläinkunnasta peräisin olevista ruuista, erityisesti kalasta. Vitamiinivalmisteisiin sitä saadaan eristämällä lampaan villasta. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2011.)

D₂-vitamiinia eli ergokalsiferolia saadaan joistakin sienistä, esimerkiksi suppilovahveroista, sekä D-vitamiinivalmisteista ja täydennetyistä elintarvikkeista. Vitamiinilisävalmisteisiin ja elintarvikkeisiin ergokalsiferolia saadaan hiivan ergosterolista UV-säteilyn avulla. (Aro 2005.)

2.1.1 Metabolia

D-vitamiinin metaboliitteja on eristetty useita, mutta suurin osa niistä on fysiologisesti inaktiivisia. (Mutanen & Voutilainen 2005.) D-vitamiinin kaikkia tehtäviä elimistössä ei tiedetä, mutta sillä on reseptoreita useissa eri solutyypeissä. Kalsitriolireseptoreita on tavallisesti tiedetty olevan suoliston, luun ja munuaisen kudoksissa. Niitä on löydetty kuitenkin myös sydäimestä, aivoista ja joistakin lymfosyyteistä. Joidenkin kudosten ja kasvainten solujen on todettu kykenevän tuottamaan paikallisesti kalsitriolia, joka herättää kysymyksen kalsitriolin vaikutuksista solujen kasvun säätelyyn ja apoptoosin edistämiseen. (Aro 2005.)

D-vitamiinin metabolia on havainnollistettu Kuviossa 1. Iholla kolesterolin metaboliitista, 7-dehydrokolesterolista, muodostuu UVB-säteilyn vaikutuksesta D₃-previtamiinia. D₃-previtamiini isomerisoituu ihossa lämmön vaikutuksesta D₃-vitamiiniksi. Muodostunut D₃-vitamiini sitoutuu transkalsiferiiniin eli D-vitamiinia sitovaan proteiiniin (DBP) ja kulkeutuu maksaan. Endogeenista D-vitamiinia ei pääse muodostumaan haitallisia määriä, sillä ylimäärin syntetisoitunut D₃-previtamiini hajoaa valon vaikutuksesta biologisesti tehottomiksi yhdisteiksi. Nämä syntyneet isomeerit, kuten lumisteroli ja takysteroli, poistuvat elimistöstä ihon hilseilyn mukana. (Mutanen & Voutilainen 2005, Toriola 2010.)

Ravinnossa D-vitamiini on vapaassa muodossa tai rasvahappoihin esteröityneenä D-vitamiiniglykosidina. Esteröityneen muodon entsymaattinen hajotus tapahtuu haiman lipaasien ja saponin vaikutuksesta, koska D-vitamiini imeytyy vain vapaassa muodossa. D-vitamiini imeytyy ohutsuolessa saturoitumattomassa passiivisessa diffuusiassa. Ohutsuolen soluissa vapaa D-vitamiini kiinnittyy kylomikroneihin, jotka ovat kuljettavia lipoproteiineja. Kuljetettava D-vitamiini päätyy imusuoniston kautta verenkiertoon ja kulkeutuu maksaan. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

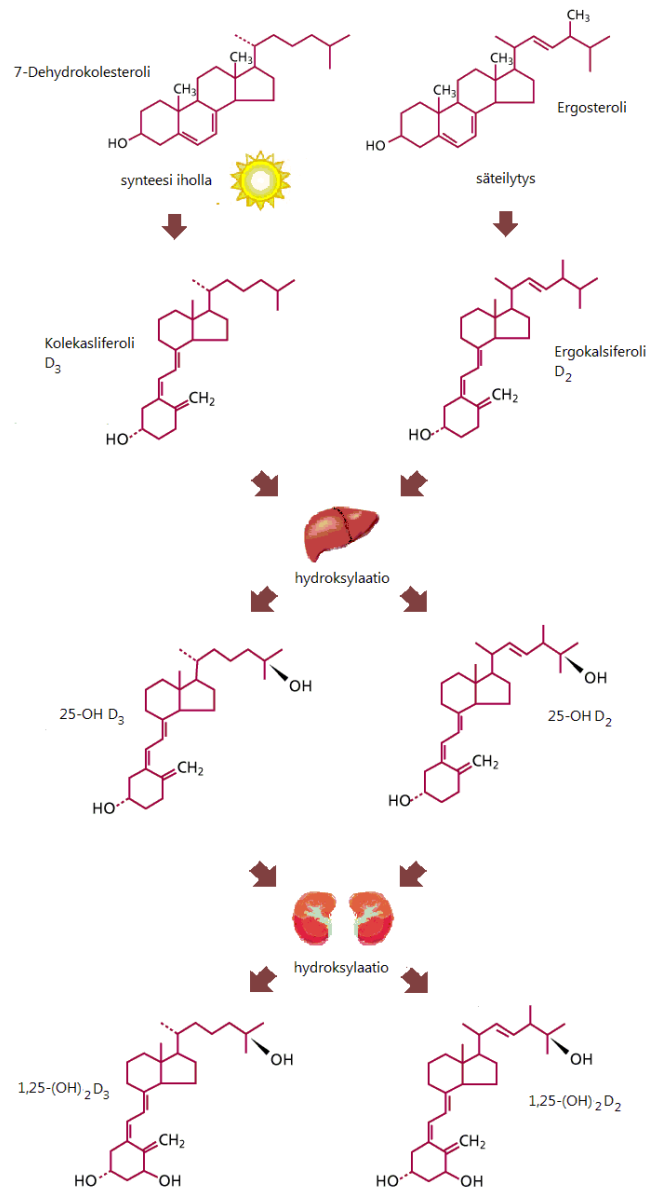
Maksassa D-vitamiini hydroksyloituu 1 alfaentsyymin avulla 25-hydroksi-D-vitamiiniksi ja erittyy sieltä suurimmaksi osaksi plasmaan, josta se transkalsiferiiniin kiinnittyneenä kulkeutuu munuaisiin. Pieniä määriä yhdistettä

kulkeutuu myös muihin kudoksiin. Munuaisissa 25(OH)D hydroksyloituu toisen kerran ja muodostuu 1,25(OH)₂D eli kalsitrioli, joka on D-vitamiinin metaboliiteista aktiivisin ja toimii elimistössä hormonina. (Aro 2005, Mutanen & Voutilainen 2005.)

Munuaisissa hydroksyloituu myös 24,25(OH)₂D-vitamiinia (Toriola 2010). Tämän metaboliitin tehtäviä ei tarkalleen tiedetä, mutta muotoa pidetään yhtenä D-vitamiinin inaktiivisista muodoista. Päinvastoin kuin kalsitriolin, 24,25(OH)₂D-synteesiä kiihdyttävät kalsium- ja fosfaattipitoisuuksien suurentuminen. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

D-vitamiini varastoituu pääasiassa elimistön rasvakudokseen. Puolet varastoituneesta D-vitamiinista on vapaassa hydroksyloitumattomassa muodossa. 20% varastoituu hydroksyloituneena 25(OH)D-muotona, vaikka sen määrä plasmassa on huomattavasti suurempi. Myös useat kudokset kuten maksa, munuaiset, keuhkot ja sydän varastoivat D-vitamiinia 25(OH)D-muodossa. Luuston D-vitamiinista yli puolet on 25(OH)D-muodossa ja alle 35% aktiivisena kalsitriolina eli 1,25(OH)₂D-muodossa. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

D-vitamiinin metabolia



Kuvio 1. D-vitamiinin metabolia (rakennekaavat: Richard 2006.)

2.1.2 Merkitys elimistölle

Ohutsuolessa kalsitriolireseptorikompleksi käynnistää mRNA:n synteesin, jonka tuottaman lähetti-RNA:n koodittamana syntetisoidaan kalbindiinia. Kalbindiini on kalsiumia sitova proteiini, joka mahdollistaa kalsiumin imeytymisen ohutsuolen luumenista. Kalsitrioli vaikuttaa ohutsuolessa myös fosfaatin imeytymiseen. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

Kalsitrioli osallistuu sekä luiden mineralisaatioon, että demineralisaatioon. Kalsitriolireseptoreja on luuta rakentavissa osteblasteissa. Toisaalta D-vitamiini stimuloi myös osteoklastien eli luun syöjäsolujen erilaistumista, vaikuttaen myös luun demineralisaatioon. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

25-OH-D-vitamiinin hydroksyloituminen kalsitrioliksi riippuu 1-alfahydroksylaasista, jonka aktiivisuuteen vaikuttavat useat eri tekijät. Entsyymien aktiivisuutta lisäävät lisäkilpirauhasen parathormoni (PTH), kilpirauhasen kalsitoniini ja plasman alhainen fosfaattipitoisuus. Kalsitrioli ja PTH tehostavat kalsiumin mobilisoitumista luustosta, minkä vuoksi plasman kalsiumpitoisuuden laskiessa PTH:n erityis lisääntyy. PTH edistää munuaisissa fosfaatin eritystä virtsaan laskien sen pitoisuutta plasmassa. Plasman alhainen fosfaattipitoisuus taas aktivoi 1-alfaentsyymiä kiihdyttäen kalsitriolisynteesiä. Kalsitriolin ja PTH:n määrän suurentuessa kalsiumin ja fosfaatin imeytyminen ohutsuoletta ja mobilisointi luustosta lisääntyy. Kalsitriolipitoisuuden nousu plasmassa inaktivoi 1-alfaentsyymiä, jolloin kalsitriolisynteesi hidastuu. (Aro 2005; 1749-54, Mutanen & Voutilainen 2005.)

Veren kalsiumpitoisuuden nousu käynnistää vastareaktion kalsitoniinin pitoisuuden nousun. Kalsitoniini estää kalsiumin ja fosfaatin mobilisointia luustosta ja lisää munuaisissa niiden eritystä virtsaan. Tällä tavoin elimistö ylläpitää kalsium-fosfaattihomeostaasia. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

Munuaisten distaalisissa tubuluksissa kalsitrioli stimuloi vastaavasti fosfaatin takaisinimeytymistä. Munuaistubuluksissa kalsiumin takaisinimeytymisestä n. 1% tapahtuu kalsitriolin vaikutuksesta. (Mutanen & Voutilainen 2005.)

2.1.3 Puutos

Jotta laboratoriotulosta voidaan tulkita, tarvitaan tietoa siitä millainen tulos on odotettavissa terveellä henkilöllä. Paras verrokki potilaan laboratoriotuloksille olisi potilaan oma aikaisempi laboratoriotulos, vaikka biologista variaatiota analytytien pitoisuuksissa tapahtuisi tässäkin tilanteessa. Viitearvoryhmistäkin huolimatta viitevälin määritelmän mukaan on 5% mahdollisuus, että terve

henkilö saa yksittäisessä tutkimuksessa viitearvojen ulkopuolisen tuloksen. Etenkin erikoisanalytiikassa laboratorioden välillä voi olla tulotasoeroa ja tämän vuoksi tulisi käyttää potilastulosten tulkinnassa analyysin tehneen laboratorion viitearvoja. (Kairisto 2010.)

Seerumin kalsidiolipitoisuuden laskiessa alle 40 nmol/l puhutaan D-vitamiinin puutteellisesta saannista. Pitoisuuden laskiessa alle 20 nmol/l kyse on jo puutostilasta. Kalsiumin imeytyminen on optimaalista, kun seerumin kalsidiolipitoisuus on yli 80nmol/l. (Aro 2005; 1749-54, Tykslab 2011, VITA 2012.) Myös The Lancet Neurology -lehdessä julkaistun tiedartikkelin mukaan tavoiteltava seerumin kalsidiolipitoisuus on luokkaa 50-100nmol/l (Vitamin D 2010).

Puutokseen voivat olla syynä puutteellinen ruokavalio, vähäinen auringonvalo, metaboliahäiriöt tai jotkin lääkeaineet kuten epilepsialäkkeet. Vähäinen saanti johtaa kalsiumin imeytymisen heikentymiseen, jolloin myös seerumin kalsiumpitoisuus alkaa laskea. D-vitamiinin ylläpitämä kalsiumhomeostaasi reagoi nopeasti kalsiumpitoisuuden laskuun veressä ja aktivoi parathormonin tuotantoa. PTH edistää kalsiumin mobilisointia luustosta ja jatkuvasti korkea PTH-pitoisuus aiheuttaa luuston riittämättömän mineralisaation. Aikuisilla tämä altistaa osteroporoosille ja osteomalasialle ja lapsilla riisitaudille. (Aro 2005, Mutanen & Voutilainen 2005, Tykslab 2011.)

Suomen leveysasteilla D-vitamiinisynteesin kannalta riittävää auringonvaloa saadaan vain kesäkuukausina (Aro 2005). Kolekalsiferolin synteesi on heikompaa auringonvalon määrästä riippumatta tummaihoisilla, koska ihon melaniini vähentää synteesiä (Nienstedt ym. 2008). Kolekalsiferolin synteesi heikentyy myös käytettäessä aurinkovoiteita sekä ikääntymisen seurauksena (Mutanen & Voutilainen 2005). Runsaan, jopa ihon palamisen aiheuttavan, UV-säteilyn määrä ei lisää D-vitamiinisynteesiä vaan altistaa melanoomalle (Aro 2005).

2.1.4 Toksisuus

D-vitamiini metaboloituu elimistössä erittäin hitaasti, minkä takia sitä pidetään yhtenä toksisimmista vitamiineista. Seerumin 25(OH)D-pitoisuutta pidetään toksisena, kun se ylittää arvon 375 nmol/l (Aro 2005, Tykslab 2011, VITA 2012). Lapset ovat kaikkein herkimpiä D-vitamiinimyrkytykselle. Pienimmät lapset voivat saada intoksikaatio-oireita pitkäaikaisen saannin ylittäessä määrän 25-50µg/vrk (Mutanen & Voutilainen 2005). Aikuiset sietävät paremmin suuriakin D-vitamiiniannoksia. (Aro 2005, Mutanen & Voutilainen 2005.)

Ihon saaman UVB-säteilyn vaikutuksesta ei muodostu yliannostusta, mutta D-vitamiinimyrkytys on mahdollinen, jos ravinnosta saatu määrä on suuri. Runsas saanti ravinnosta kiihdyttää 25(OH)D:n tuotantoa maksassa. Seerumin kohonnut kalsitriolipitoisuus tehostaa kalsiumin imeytymistä ohutsuolesta sekä mobilisaatiota luustosta. Samanaikaisesti PTH:n pitoisuus laskee ja munuaisten filtraatio hidastuu. Muodostuu kalsinoositila, jossa kalsiumia ja fosfaattia kiteytyy pehmytkudoksiin, kuten sydämeen, munuaisiin ja hengityselimiin. Myrkytysoireita ovat pahoinvointi, ruokahaluttomuus, päänsärky, ruoansulatuskanavan oireet ja jano. Pahimmassa tapauksessa tajunnan häiriöt ja jopa kuolema. (Aro 2005, Mutanen & Voutilainen 2005.)

2.1.5 Suositukset

Valtion ravitsemuskunnan aloitteesta vuonna 2003 ryhdyttiin täydentämään maitovalmisteita D-vitamiinilla. Lisätyn D-vitamiinin määrä oli 0,5µg/100ml maitovalmisteissa ja rasvalevitteissä 10µg/100g. Lisäksi 50-luvulta lähtien lapsille on suositeltu D-vitamiinilisää. (Aro 2005.)

D-vitamiinin saantisuosituksia päivitettiin Suomessa edellisen kerran vuonna 2011. Uudet suositukset laativat Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, valtion ravitsemusneuvottelukunta ja Suomen lastenlääkäriyhdistys. Uudet suositukset ovat aikaisempia yksinkertaisemmat, millä pyritään turvaamaan D-vitamiinin riittävää ja säännöllistä saantia. Alle kaksivuotiailla D-vitamiinivalmisteen käyttö tulisi aloittaa kahden viikon iässä, jolloin päivittäisen saannin tulisi olla 10µg

(400UI) vuorokaudessa ympäri vuoden. 2-18-vuotiaiden ympärivuotisen vuorokausiannoksen suositeltu määrä on 7,5µg (300UI). Vitamiinivalmisteita käytettäessä on huomioitava muu D-vitamiinin saanti esimerkiksi runsaasti vitamiinoiduista maitovalmisteista. Odottavien ja imettävien äitien saantisuositus vuorokaudessa on 10µg (400UI). Yli 60-vuotiailla saantisuositus on korkein; 20µg (800UI) vuorokaudessa (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2010). Suositeltavaa on, että valmisteet koostuvat D₃-vitamiinista, joka on elimistölle luontaisempi muoto kuin D₂-vitamiini. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2011.)

Kanadalaisia suosituksia D-vitamiinin saannille nostettiin vuonna 2010. Alle 50-vuotiaiden terveiden henkilöiden saantisuositus nostettiin 10µg:sta 25µg:aan vuorokaudessa ja yli 50-vuotiaiden terveiden henkilöiden uusi suositus on 20-50µg. (Hanley 2010.)

National Academy of Sciences (2012) tiedejärjestö on julkaissut raportin vuonna 2010 Institute of Medicine –sivustollaan D-vitamiininsaantisuosituksista. Raportin mukaan päivittäinen saantisuositus on 15µg (600UI) yli vuoden ikäisillä ja 20µg (800UI) yli 70-vuotiailla. Raskaana olevilla suositus on 15µg (600UI).

Ravitsemusterapeutti ja kansanterveyden asiantuntija Dixonin (2010) mukaan D-vitamiinilisän tarve on yksilöllistä. Jokaisen olisi hyvä käydä mittauttamassa oma D-vitamiiniarvonsa ja saatujen tulosten mukaisesti lisätä tai vähentää käytettävän vitamiinilisän määrää. Tärkeämpää on saada veren D-vitamiinipitoisuus oikealle tasolle kuin pyrkiä nauttimaan saantisuosituksen mukaisia määriä vitamiinia. Vastaavasti jotkut eivät tarvitsisi D-vitamiinilisiä lainkaan. Puutostiloissa päivittäinen D-vitamiiniannostus voi olla hetkellisesti moninkertainen verrattuna saantisuosituksiin. Tutkimusten mukaan aikuiset sietävät 250µg päivittäisannoksia ilman haittavaikutuksia ja joidenkin tutkimusten mukaan jopa 1000µg vuorokausiannoksia (Vitamin D 2010).

Ohion osavaltiossa toteutetussa yliopistotutkimuksessa seurattiin luuntiheyttä ja murtumien esiintymistä 36 828 postmenopausaalisella naisella. Päivittäin osa tutkittavista sai lumelääkettä ja osa 10µg D₃-vitamiinilisää ja 1000mg kalsiumilisää. Murtumien seuranta-aika oli seitsemän vuotta. Ravintolisää

saaneiden keskuudessa lonkkaluun tiheys kasvoi keskimäärin 1,6%, mutta murtumariskin ei todettu pienentyneen. Päinvastoin ravintolisän käyttö kasvatti munuais kivien kehittymisen riskiä. (Jackson ym. 2006.)

Eläinkokeissa kalsitriolin varhaisen saannin on todettu vähentävän autoimmuunisairauksia kuten 1-tyyppin diabetesta ja nivelreumaa. Pohjois-Suomessa 1960-luvulla syntyneillä D-vitamiinisupplementaatiota saaneilla lapsilla on todettu olevan vähentynyt riski tyyppin 1 diabetekseen. Supplementaatioissa käytetyt vitamiiniannokset olivat viisinkertaisia nykyisin käytettyihin verrattuna. Myös Norjassa tehdyssä tutkimuksessa on todettu samankaltainen yhteys D-vitamiinin saannin ja tyyppin 1 diabeteksen välillä. Tyyppin 1 diabetes on yleinen sairaus Pohjoismaissa, joissa myös D-vitamiinin saanti on talviajan pimeyden vuoksi niukkaa. Lisäksi lauhkeilla vyöhykkeillä esiintyy yleisesti rinta-, paksusuoli- ja eturauhassyöpää, mikä on antanut aiheutta selvittää D-vitamiinivajauksen yhteyttä kyseisiin syöpiin. (Aro 2005, Toriola 2010.)

2.2 Immunokemiallinen määrittäminen

Immunokemialliset menetelmät perustuvat antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen sitoutumiseen toisiinsa. Analyysissä voidaan mitata joko antigeenin tai vasta-aineen pitoisuutta. Menetelmissä antigeeni tai vasta-aine konjugoidaan eli leimataan leimausaineella. Esimerkiksi jotkin entsyymit, fluoresoivat tai kemiluminoivat molekyylit voivat toimia mitattavina leimoina. Immunokemiallisia menetelmiä ja niiden variaatioita on useita. (Halonen 2004.) Immunomääritysten yleisimpiä ongelmia ovat spesifisyysongelmat, endogeeniset häiriöt ja viitearvojen menetelmäriippuvuus (Åkerman ym. 2010b).

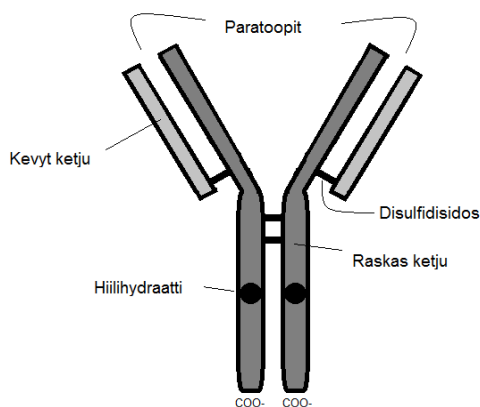
Immunomäärityksissä voidaan käyttää apuna myös sekundaarisia leimoja kuten biotiinia ja avidiinia. Avidiini on vitamiini biotiiniin erityisen voimakkaasti sitoutuva proteiini. Avidiinin ja biotiinin välinen sidos on voimakkain luonnossa esiintyvä ei-kovalenttinen sidos (Honkonen 2003). Avidiini on hyvin kestävä proteiini ja sietää korkeitakin lämpötiloja (Honkonen 2003). Käyttämällä biotiinia

ja avidiinia menetelmästä saadaan sensitiivisempi kuin yksinkertaisemmat vasta-aine menetelmät. (Crowther 2001, Kricka ym. 2008.)

2.2.1 Antigeeni ja vasta-aine

Antigeeni on molekyyli, esimerkiksi proteiini tai hiilihydraatti, joka käynnistää elimistössä vasta-ainetuotannon. (Kricka ym. 2008.) Vasta-aineet ovat seerumissa ja kudostenesteissä sijaitsevia glykoproteiineja, joita kutsutaan myös immunoglobuliineiksi. Vasta-aineet jaetaan niiden koon, varauksen, aminohappojärjestyksen ja hiilihydraattipitoisuuden mukaan luokkiin IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. (Crowther 2001.) Eri vasta-aineluokkiin kuuluvilla immunoglobuliineilla on immuunipuolustuksessa erilaisia tehtäviä (Laatikainen 2003). Useimmiten immunomäärityksissä reagenssina käytettävä vasta-aine kuuluu luokkaan IgG (Kricka ym. 2008).

Vasta-aineiden rakenne koostuu yhdestä tai useammasta perusyksiköstä, joka on kuvattu Kuviossa 2. Perusyksikkö on symmetrinen molekyyli, jossa on neljä polypeptidiketjua. Niistä kaksi on identtistä kevytketjua ja kaksi identtistä raskasketjua. Ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfididisidoksilla, joiden sijainti ja määrä vaihtelevat vasta-aineluokittain. Antigeenin sitoutumiskohta vasta-aineessa sijaitsee Y-rakenteen sakaroissa, kevyen ja raskaan ketjun muodostamassa raossa. Sitoutumiskohtaa kutsutaan paratoopiksi, jonka vastaavaa kiinnittymiskohtaa antigeenissa kutsutaan epitoopiksi. Affiniteetti kuvaa tämän sidoksen voimakkuutta tasapainovakiona. Mitä suurempi on vasta-aine-antigeenikompleksin affiniteetti, sitä paremmin paratooppi tunnistaa epitoopin ja kiinnittyy siihen. (Crowther 2001.) Aviditeetti kuvailee kokonaisvaltaista antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisvoimakkuutta huomioiden affiniteetin lisäksi myös muut kompleksin ominaisuudet. (Kricka ym. 2008.)



Kuvio 2. Vasta-aineen perusyksikön rakenne (mukaillen Crowther 2001).

Elimistössä vasta-aineiden tuotannosta huolehtivat B-lymfosyytit. B-lymfosyytin tunnistaessa elimistölle vieraan antigeenin, solu erilaistuu plasmasoluksi ja ryhtyy tuottamaan tunnistetulle antigeenin epitoopille spesifistä vasta-ainetta. Monesta solulinjasta peräisin olevia vasta-aineita kutsutaan polyklonaaliksiksi, koska ne tunnistavat useita eri epitooppeja. Yhden solulinjan tuottamat vasta-aineet ovat monoklonaalisia, vain tietylle epitoopille spesifisiä, ja niitä tavallisesti käytetään immunomääritysten reagensseina. Vasta-aineita voidaan tuottaa immunoisomalla koe-eläin halutulla antigeenilla. Tämän jälkeen pernasta eristetään vasta-ainetta tuottavat solut, joita viljelemällä saadaan tuotettua suuria määriä vasta-ainetta. (Kricka ym. 2008.)

Antigeenit ja vasta-aineet voivat muodostaa komplekseja tasapainoreaktiossa muodostuvilla varauksettomilla sidoksilla. Jos reaktiossa vasta-aineen sitoutumiskohtia on merkittävästi enemmän kuin antigeenin epitooppeja, kompleksit muodostuvat nopeasti. Tämä vähentää ristireaktioiden määrää. (Kricka ym. 2008.)

Immunokemialliset menetelmät voivat olla tekniikaltaan suorita tai epäsuoria. Suorat menetelmät ovat nopeampia, koska niissä on vähemmän komponentteja. Menetelmät voivat perustua kilpailuun, inhibitioon, kaksoisvasta-aine eli sandwich-tekniikkaan tai olla niiden yhdistelmiä. Kilpailevaa määritysmenetelmää käytetään tavallisesti, jos antigeeni on pienikokoinen tai sillä on vain yksi epitooppi. (Thermo Fisher Scientific Inc 2012.)

2.2.2 Kalibrointi ja lineaarisuus

Immunomäärityksissä kalibrointi tehdään pitoisuudeltaan tunnetuilla kalibrointiliuoksilla. Mitatut signaalit ja pitoisuusarvot sijoitetaan taulukkoon, jolloin muodostuu suora tai kaareva kalibraatiokäyrä. Tuntemattomien näytteiden pitoisuudet saadaan määritettyä laskemalla arvot kalibrointisuorasta. (Kricka ym. 2008.)

Lineaarisuus kuvastaa mitatun arvon ja odotetun arvon välistä suhdetta analyttisellä mittausalueella. Lineaarisuutta voidaan arvioida monella tavalla. Immunomäärityksissä tehdään usein tunnetusta näytteestä laimennossarja, jonka avulla selvitetään väheneekö analyytin pitoisuus laimennoskertoimen mukaisesti. (Linnet & Boyd 2008.)

2.2.3 Fotometria

Fotometria on mittausmenetelmä, joka perustuu valon läpäisevyyteen eli transmittanssiin ja imeytyvyyteen eli absorptioon väliaineessa. Valo on sähkömagneettista säteilyä, jonka aallonpituus on välillä 200-2000nm. Silmin nähtävän valon aallonpituus on välillä 380-750nm. Esimerkiksi esine, joka heijastaa eli reflektoi valoa 440-500 nm aallonpituusalueella näyttää siniseltä. Siniseltä näyttää myös liuos, joka transmittoi valoa tältä aallonpituudelta. Samalla liuos absorboi eli imee itseensä muun väristä valoa. (Åkerman ym. 2010a.)

Valon absorptio ja emissio (valon säteily) perustuu energian vapautumiseen valona, toisinsanoen atomien siirtymiseen eri energiatasoille. Absorptiossa on kyse siirtymisestä pienemmältä energiatasolta suuremmalle ja emissiossa päinvastoin. Siirtyminen tapahtuu fotonin välityksellä, joka on valon sähkömagneettista energiaa välittävä hiukkanen (Jaarinen & Niiranen 1997). Absorbtiossa atomin siirtyminen tasolta toiselle tapahtuu sellaisen fotonin aikaansaamana, jolla on atomin siirtymistasojen välisen energiaeron suuruinen energia (Jaarinen & Niiranen 1997). Koska tietyllä atomilla voi olla vain

tietyosuuruinen viritystilä, vain ne fotonit absorboituvat, joilla on sama energia. (Åkerman ym. 2010a.)

Eri atomit, ionit ja molekyylit absorboivat ja emittoivat valoa niille tyypillisillä aallonpituuksilla. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää kemiallisissa mittauksissa. Esimerkiksi, jos näytekyvetti transmittoi kaiken valon, on absorbanssi nolla. Tällöin käytetyllä aallonpituudella absorboivan analyytin pitoisuus näytteessä on nolla. Analyytin pitoisuuden kasvaessa transmittanssi vähenee ja absorbanssi kasvaa. Tapahtuma on logaritminen ja muutoksista muodostuu kaareva kuvaaja. Tavallisesti mitataan näytteen absorbanssia, josta voidaan laskea logaritmisien funktion avulla, Lambert-Beerin lain mukaisesti, mitattavan aineen pitoisuus ja muodostaa lineaarinen kuvaaja. Lambert-Beerin lain funktio on: $A = -\frac{\log I_s}{I_0} = -\log T$, jossa A on absorbanssi ja I_s/I_0 kuvaa transmittanssia. Tilanteessa $I_s=I_0$ transmittanssi on 100% ja absorbanssi nolla. (Åkerman ym. 2010a.)

Kaikki näytekyvettiin kohdennettu valo ei kulje suoraan näytteen läpi valoa mittaavalle valokennolle vaan osa heijastuu ja absorboituu muualle. Tämän virheen korjaamiseksi käytetään nollamittausta eli referenssikyvettä, jonka pitoisuus tiedetään nolaksi. Lisäksi jotkut näytemateriaalit sisältävät fotometriä häiritseviä tekijöitä. Niitä pyritään eliminoimaan käyttämällä kahta aallonpituutta, jolloin mitattavan aineen absorbanssista vähennetään häiritsevän tekijän aikaansaama absorbanssi. Vain yhden aallonpituusalueen valoa kutsutaan monokromaattiseksi valoksi. Käytettävä aallonpituus tulee valita analyytin absorptiomaksimin alueelta. (Åkerman ym. 2010a.)

Valo emittoituu hyvin lyhyessä ajassa (10^{-9} - 10^{-6} s) ja emittoituneen valon aallonpituus on suurempi (energiäärä pienempi) kuin absorboivan eli näytteeseen imeytyvän valon. Spektrofotometriassa emissiovalo kohdennetaan detektorin kautta emissiomonokromaattorille. Monokromaattorin tehtävänä on hilan tai prisman avulla erotella kaikkia aallonpituuksia sisältävästä valosta haluttu eli monokromaattinen aallonpituus. Detektori on spektrofotometrin osa, joka muuttaa valon sähköiseksi signaaliksi. Emittoitunut säteilyenergia siroaa

kaikkiin suuntiin. Havaitun signaalin voimakkuus riippuu suodattimen, linssin, hilan ja prisman valonläpäisykyvystä, detektorin herkkyydestä ja mitattavan yhdisteen pitoisuudesta näytteessä. (Halonen 2004.)

2.2.4 Entsyymi-immunomääritys

Entsyymi-immunomäärityksissä (EIA) antigeeni leimataan entsyymillä. Vasta-aineet ja entsyymit sitoutuvat suhteellisen helposti toisiinsa kovalenttisella sidoksella. Ideaalisessa leimaamisreaktiossa entsyymi sitoutuu spesifisesti vasta-aineeseen ja kaikki reaktioseoksessa oleva vasta-aine tulee leimattua. Teknisesti tämä on mahdotonta, mutta myös huonommissa konjugaatioissa voidaan saavuttaa määrityksen kannalta riittävä herkkyys. (Crowther 2001.) Entsyymaattisissa määritysmenetelmissä on etuna useimpien entsyymien substraattispesifisyys, joka parantaa menetelmän tarkkuutta (Åkerman ym. 2010a).

Entsyymit ovat biologisissa reaktioissa katalysaatteina toimivia proteiineja (Åkerman ym. 2010b). Tavallisimmat leimoina käytettävät entsyymit ovat piparjuuriperoksidaasi, alkalinen fosfataasi ja β -galaktosidaasi. Entsyymimolekyylissä on tietty rakenne, aktiivinen keskus, johon substraatti sitoutuu (Åkerman ym. 2010a). Substraatti metaboloituu entsyymin vaikutuksesta värilliseksi lopputuotteeksi, joka mitataan fotometrisesti. Väriin intensiteetistä voidaan laskea mitattavan analyytin pitoisuus. (Crowther 2001; 10.)

Heterogeenisessä entsyymi-immunomäärityksessä jokin reaktion komponenteista sidotaan kiinteään faasiin ja jokin konjugoidaan entsyymillä, riippuen siitä halutaanko määrittää antigeenin vai vasta-aineen pitoisuus. Heterogeenisellä määrityksellä tarkoitetaan menetelmää, jossa reaktion komponenttien lisäysten välillä suoritetaan pesuvaihe sitoutumattomien komponenttien poistamiseksi. Tavallisimmin määrityksessä käytetään 96-kuoppaista kuoppalevyä, jolloin kiinteänä faasina toimii kuoppalevyn seinämä. Reaktion eri komponentit lisätään buffer-liuoksessa, joka on reaktion kannalta neutraalia. Komponenttien lisäysten välissä suoritetaan pesujen lisäksi vasta-

aineiden sitoutumista nopeuttavia inkubaatiovaiheita. Viimeisenä lisätään substraatti, joka metaboloituu värilliseksi lopputuotteeksi. Värin intensiteetti voidaan mitata fotometrisesti käyttäen sopivaa aallonpituutta. Ennen mittausta reaktio voidaan pysäyttää inhibiittorilla tai muuttamalla liuoksen pH:ta. (Crowther 2001.)

EIA-määritysten variaatiot tekevät menetelmästä joustavan, mikä mahdollistaa saman analyysin mittaamisen useilla eri tekniikoilla (Crowther 2001). Yksi suosituimmista tekniikoista on sandwich-tekniikka menetelmän sensitiivisyyden vuoksi (Thermo Fisher Scientific Inc 2012).

2.2.5 Kemiluminesenssi-immunomääritys

Kemiluminesenssiperiaatetta käytetään yleisesti vitamiinien, hormonien, proteiinien ja lääkeainepitoisuuksien immunokemiallisissa mittauksissa. Kemiluminesenssimenetelmä on fotometrinen, luminesenssiin eli valon emissioon perustuva mittausmenetelmä. (Halonen 2004.)

Luminesenssi on säteilyenergian tai valon vapautumista molekyyli-rakenteesta, jossa elektroni palautuu korkeammalta energiatilalta matalammalle. Fluorometriassa tapahtuma saadaan aikaan viritysvälillä ja kemiluminometriassa kemiallisella reaktiolla. (Åkerman ym. 2010a.)

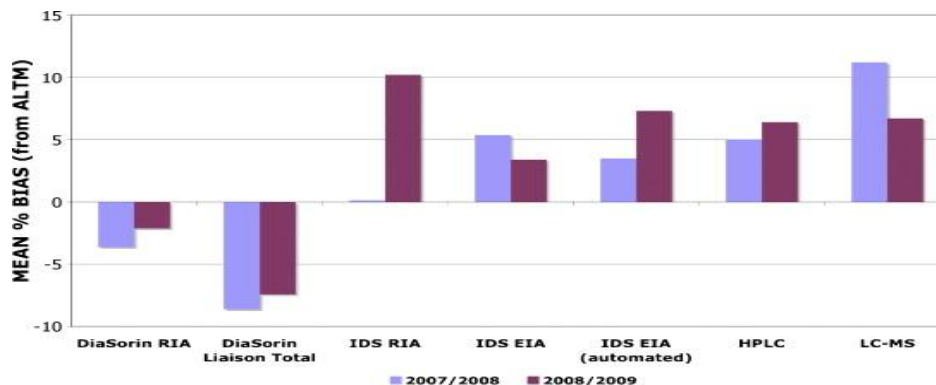
Kemiluminesenssissa valon emissio saadaan aikaan kemiallisen reaktion avulla hapetusreaktiossa. Hapettimena voidaan käyttää vetyperoksidia, hypokloriittia tai happea. Hapettavana osapuolena on jokin orgaaninen yhdiste kuten luminoli tai akridiniumesteri. Hapetusreaktio tarvitsee edetäkseen katalyytin läsnäoloa. Katalyytteina voivat olla entsyymit, metalli-ionit tai hemi. Hapettuvan yhdisteen palautuminen matalammalle energiatasolle johtuu molekyylien energian menetyksestä niiden törmäillessä toisiinsa. Emissiota syntyy siis elektronin palatessa virittyneeltä energiatasolta matalaenergisemmälle tasolle. (Halonen 2004.)

2.3 D-vitamiinin määrittäminen

D-vitamiinin veressä kuljetettavia muotoja ovat D_2 , D_3 , $25(OH)D$, $1,25(OH)_2D$ ja $24,25(OH)_2D$ (Mutanen & Voutilainen 2005). Pääasiainen D-vitamiinin veressä kiertävä metaboliitti on kuitenkin kalsidioli $25(OH)D$ -vitamiini, jonka pitoisuudet ovat 1000-kertaiset kalsitrioliin verrattuna. $25(OH)D$ -vitamiinin puoliintuminen kestää viikkoja, kun sama tapahtuma vie $1,25(OH)_2D$ -vitamiinilla vain tunteja. $25(OH)D$ -pitoisuus kuvastaa sekä endogeenistä että eksogeenistä D-vitamiinin saantia. (Aro 2005, Toriola 2010.)

Kalsidiolin määrittämissä on todettu eroja laboratorioden välillä, eivätkä kaikki menetelmät mittaa luotettavasti D_2 -vitamiinin metaboliittia (Aro 2005). D-vitamiinimäärittämissä haastavuus johtuu mitattavien metaboliittien hydrofobisuudesta ja voimakkaasta proteiineihin sitoutumisesta (Van den Ouweland 2010).

DEQAS eli *Vitamin D External Quality Assessment Scheme* on Dr. Graham Carterin organisoima järjestö, joka toteuttaa D-vitamiinimittausten laaduntarkkailua (Carter ym. 2004a). Charing Cross –sairaalan asiantuntijat laativat DEQASin laaduntarkkailukierroksista yhteenvedon vuonna 2009. Luotettavuuden arvioimiseksi laaduntarkkailukierrosten tuloksia tarkasteltiin 15 vuoden ajalta. Tutkimuksen perusteella epätarkkuus laboratorioden välillä on vähentynyt vuoden 1994 32%:sta vuoden 2009 kierroksen 15,3%:iin. Taulukossa 1 on esitetty eri menetelmien suhteellinen suorituskyky. Johtopäätöksenä asiantuntijat toteavat, että ennen kuin onnistutaan kehittämään luotettava standardi $25-OH$ D-vitamiinimittauksille, ei voida yksiselitteisesti valita parasta menetelmää. (Carter ym. 2010.)



Taulukko 1. Menetelmien suorituskyky (Carter ym. 2010).

D-vitamiinin määrittämiseen immunologisilla menetelmillä liittyy tunnetusti useita häiriötekijöitä, kuten kantajaproteiinin ja joidenkin lääkeaineiden aiheuttamat ristireaktiot. 25-OH D-vitamiinin lipofiilisesta luonteesta johtuen näytteessä olevat lipidit voivat aiheuttaa virhettä tuloksiin. (Wallace ym. 2010.) Yksittäisillä näytteillä tuloserot voivat olla merkittäviä. Johtopäätöksenä ongelmanäytteille ja poikkeavan pitoisuuden näytteille suositellaan mittausta HPLC- (nestekromatografia) tai LC-MS/MS (massaspektrofotometria) –menetelmällä. (Alfthan ym. 2012.)

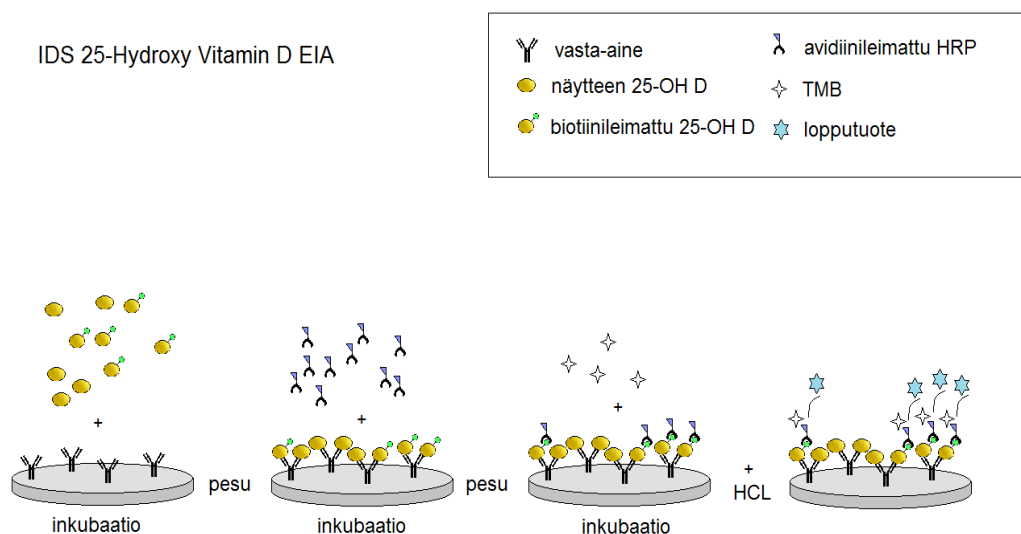
25-OH D-vitamiinin pitoisuutta ei voida täysin luotettavasti määrittää, jos analyttia ei ensin eroteta sitojaproteiinistaan. Nestekromatografisissa ja massaspektrometrisissa menetelmissä kantajaproteiinin erotus tapahtuu liuotinuuttovaiheessa. Monet kaupalliset immunomääritykset sisältävät denaturointiainetta samaa tapahtumaa varten, mutta liikesalaisuuksista johtuen denaturointiaineista ei ole toistaiseksi saatavilla yksityiskohtaista tietoa. (Wallace ym. 2010.)

2.3.1 IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA

Kitin pakkausselosteen mukaan IDS EIA -menetelmä soveltuu sekä 25-OH D-vitamiinin, että muiden D-vitamiinin hydroksyloituneiden metaboliittien mittaamiseen seerumista tai plasmasta. IDS EIA-menetelmä on kilpaileva menetelmä, jossa pakkausinsertin mukaan hyödynnetään biotiinia ja avidiinia. Vasta-aineena on lampaassa tuotettu 25-OH D -vasta-aine, entsyyminä toimii

piparjuuriperoksidaasi ja substraattina tetrametyylibentsidiini. Menetelmä on epäsuora, koska mitatun absorbanssin määrä on kääntäen verrannollinen analyytin pitoisuuteen. Menetelmän periaate on havainnollistettu Kuviossa 3.

IDS 25-OH Vitamin D EIA -pakkauksen ohjeen mukaan näytteiden erotus tulee tehdä mahdollisimman nopeasti. Pitkäaikaisessa säilytyksessä näytteet tulee pakastaa ja uudelleen pakastusta tulee välttää. Pakkaus insertin tietoja on Liitteessä 5.



Kuvio 3. IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA -periaate (Salonen 2012).

DEQAS-laaduntarkkailukierroksilla vuosina 2004-2006 IDS EIA-menetelmän tulokset 25-OH D-tulokset poikkesivat tavoitearvosta 5,7-23%. Vuonna 2006 menetelmä uudelleenkalibroitiin ja poikkeama tavoitearvosta väheni noin 5%:iin. Vuosina 2004-2006 laboratorioiden välinen variaatio IDS EIA-menetelmän suhteen vaihteli 14,4-18,4%:n välillä. (Wallace ym. 2010.)

Asiantuntijaryhmä on vertaillut kansainvälisen laaduntarkkailujärjestön 25-OH D-vitamiinituloksia. Tutkimuksessa vertailtiin eri laboratorioiden menetelmiä massaspektrometriseen menetelmän tuloksiin. Tutkimuksessa IDS EIA – menetelmän ja massaspektrometriseen menetelmän välinen korrelaatiokerroin oli 0,95. (Carter ym. 2004b.)

Muutaman tutkimuksen mukaan IDS EIA-menetelmä korreloi hyvin massaspektrometrinen menetelmien kanssa. Korrelaation on kuitenkin todettu heikkenevän pitoisuuksien ylittäessä 125 nmol/l. (Wallace ym. 2010.)

2.3.2 Siemens ADVIA Centaur® XP Vitamin D Total

Siemensin immunokemiallinen menetelmä on automatisoitu kemiluminometrinen D-vitamiinin määritysmenetelmä. Menetelmä perustuu kilpailevaan vasta-aineen sitoutumiseen. Menetelmässä käytetään monoklonaalista hiiren anti-fluoreseiini vasta-ainetta, jossa on kovalenttisella sidoksella kiinnittynyt paramagneettipartikkeli. Komponentteina on myös hiiren monoklonaalinen anti-25(OH)D-vasta-aine, joka on leimattu akridiumesterillä ja fluoreseiinileimattu D-vitamiinianalogi. Näytteen 25-OH D-vitamiinipitoisuus on kääntäen verrannollinen mitattujen valoyksiköiden määrään. (Siemens ADVIA 2011, Siemens Healthcare 2011.)

2.4 Menetelmävertailu

Menetelmävertailussa tarkoituksena on selvittää uuden menetelmän käyttökelpoisuus vertaamalla sitä käytössä olevaan menetelmään. Vertailussa halutaan selvittää ovatko samojen näytteiden tulokset yhtenevät eri menetelmillä. Rinnakkaismittausten ja parinäytteiden hajontaa tutkitaan tilastollisin menetelmin. (Linnet & Boyd 2008.)

Menetelmävertailussa käytettävien näytteiden tulisi olla tuoreita ja riittävän laajalta pitoisuusalueelta. Analysointeja olisi hyvä suorittaa useana päivänä, jotta analysointikertojen väliset erot tulevat esiin. Suunnittelussa tulee arvioida myös näytteiden edustavuutta ja määrän tarpeellisuutta. Huomiota tulee kiinnittää myös näytteiden käsittelyyn ja säilytykseen, sekä arvioida niiden mahdollista vaikutusta näytteiden pitoisuuteen. (Linnet & Boyd 2008.)

2.4.1 Tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuus kuvastaa mitatun pitoisuuden ja oletetun pitoisuuden yhteensopivuutta. Toisin sanoen, kuinka spesifisesti menetelmä mittaa kohdeanalyytin pitoisuuden (Linnet & Boyd 2008). Toistettavuus ilmaisee kuinka samanlaisia tuloksia menetelmä antaa samasta näytteestä samoissa olosuhteissa. Toistettavuus lasketaan keskihajontana samanaikaisesti ajettujen rinnakkaisnäytteiden tuloksista. Uusittavuutta arvioidaan eri mittausolosuhteissa samalla menetelmällä ja samasta näytteestä saatujen tulosten hajonnalla. (Jaarinen & Niiranen 1997.)

3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää Immuno Diagnostics Systemsin (IDS) valmistaman entsyymi-immunomääritykseen perustuvan 25-OH Hydroxy Vitamin D –kitin toimivuus. Tavoitteena on selvittää soveltuuko kitti 25-OH D-vitamiinimittauksiin seerumista ja saadaanko kitillä yhteneviä tuloksia referenssimenetelmän kanssa. Tavoitteena on selvittää myös pakastamisen vaikutusta 25-OH D-vitamiinin pitoisuuteen näytteessä.

Tutkimusongelmat:

1. Millainen on IDS 25-OH Hydroxy Vitamin D EIA –menetelmän toistettavuus ja uusittavuus?
2. Arvioida IDS 25-OH Hydroxy Vitamin D EIA –menetelmän tarkkuutta vertaamalla tuloksia akkreditoituun referenssimenetelmään.
3. Millainen vaikutus pakastuksella on näytteen 25-OH D-vitamiinipitoisuuteen?

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Metodologiset lähtökohdat

Tutkimusstrategia kuvaa tutkimuksessa käytettyjen menetelmien kokonaisuutta. Tutkimusmetodi on väline, jolla strategia toteutetaan. Edellä mainittujen määrittämiseksi on selvitettävä tutkimuksen johtoajatus ja pääongelma, jota voidaan vielä täsmentää osaongelmilla. (Hirsjärvi ym. 2004.)

Tutkimus on määrällinen eli kvantitatiivinen. Kvantitatiivinen tutkimus keskittyy mittaamaan määriteltyjä muuttujia (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009). Tutkimuksen keskeisiin piirteisiin kuuluvat johtopäätökset edellisistä tutkimuksista ja aiempien teorioiden käsittely. Kvantitatiivisen tutkimuksen pääpiirteisiin kuuluu hypoteesien esittäminen ja käsitteiden määrittely, sekä otoskoon rajaaminen. (Hirsjärvi ym. 2007.)

Jotta kvantitatiivista tutkimusta voidaan pitää luotettavana on arvioitava, onko tutkimuksessa mitattu juuri sitä, mitä on ollut tarkoituskin mitata. Validiteetin näkökulmasta arvioidaan tutkimuksessa käytetyn mittarin sopivuutta. Tutkimuksen täsmällisyyttä ja tarkkuutta arvioidaan reliabiliteetin avulla. Reliaabeli mittari tuottaa saman tuloksen tutkimusta toistettaessa. (Hirsjärvi ym. 2004, Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.)

Mittaustuloksia arvioidaan muuttujien välisiä yhteyksiä tarkastelemalla ja tilastollisia menetelmiä käyttäen. Analysointimenetelmä ja koejärjestelyt tulee valita siten, että kerätty tutkimusaineisto soveltuu numeeriseen mittaamiseen (Hirsjärvi ym. 2007). Saatujen tulosten tilastollista merkitsevyyttä tulee arvioida ja pyrkiä yleispätevään loppupäätelmään. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.)

Merkitsevyyden arviointia helpottaa muuttujien asettaminen taulukkomuotoon (Hirsjärvi ym. 2007). Tutkimustulosten taulukointi antaa yleiskuvan tulosjakaumasta. Tulosjakauman tukena käytetään jakaumasta laskettuja tunnuslukuja, jolloin tarkasteluun saadaan erilaisia näkökulmia. Tunnuslukuja

ovat esimerkiksi moodi, mediaani, keskiarvo ja keskihajonta sekä variaatiokerroin. (Holopainen & Pulkkinen 2002.)

Kahden muuttujan välistä hajontaa voidaan tarkastella myös variaatiokertoimen avulla, joka saadaan keskihajonnan ja keskiarvon osamäärästä. Variaatiokerroin kuvaa muuttujien välisten jakaumien suhteellista hajontaa. Variaatiokerroin ei edellytä muuttujilta samaa mittayksikköä. (Holopainen & Pulkkinen 2008.)

Tavallisesti kahden vähintään välimatka-asteikollisen muuttujan välistä riippuvuutta kuvataan korrelaatiokertoimen avulla. Korrelaatiokertoimen arvot vaihtelevat -1 ja 1 välillä. Korrelaatiokertoimen lähetessä nollaa korrelaatio vähenee. Kertoimen etumerkki osoittaa riippuvuuden suunnan eli pieneneekö vai suureneeko toinen muuttuja toisen kasvaessa. Korrelaatiokerrointa voidaan havainnollistaa sirontakuvion avulla ja havaita mahdolliset voimakkaasti poikkeavat muuttujien arvot. Selitysaste saadaan korottamalla korrelaatiokerroin toiseen potenssiin. Selitysaste ilmoittaa kuinka suuri osa selitettävän muuttujan vaihtelusta selittyy toisen muuttujan vaihtelulla. (Heikkilä 2008.)

Tutkimus on vertaileva. Vertailevassa tutkimuksessa voidaan asettaa hypoteeseja riittävien perusteluiden nojalla. Hypoteesi voi olla luonteeltaan työhypoteesi, jossa tutkija esittää odotuksiaan tuloksista. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.) Hypoteesi on väitteen muodossa ja se on ennakoitu ratkaisu tutkimusongelmaan. Hypoteesin asettamisesta on suositeltavaa luopua, jos päteviä perusteluita teoreettisista malleista ja aikaisemmista tutkimustuloksista ei saada. (Hirsjärvi ym. 2007).

4.2 Toteutus

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Turun Ammattikorkeakoulu. Toimeksiantosopimus on tämän opinnäytetyön liitteenä (LIITE 1). Tutkimuksen kulusta laadittiin suunnitelma ja eteneminen on kuvattu vuokaaviona (LIITE 2). Suunnitelman tekemisen jälkeen aloitettiin teoreettisen viitekehyksen laatiminen perehtymällä kirjallisuuteen ja aikaisempiin tutkimustuloksiin.

Analysoitaviksi näytteiksi IDS EIA –kitillä valittiin Turun Ammattikorkeakoulun Ruiskadun laboratorion varaseeruminäytteitä, joiden D-vitamiini pitoisuus oli mitattu VITA-laboratorion akkreditoidulla Siemensin immunokemiallisella menetelmällä keväällä 2012. Näytteiden varaseeruminäytteet oli säilytetty pimeässä pakastettuina -80°C:ssa. Referenssimenetelmän tulosten perusteella 144 näytteen aineistosta valittiin 30 näytettä analysoitavaksi IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA –kitillä. Analysoitavaksi valittiin pitoisuudeltaan matalia, korkeita ja keskitasoisia näytteitä.

4.2.1 Analysointi IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA -kitillä

Näytteiden analysoinnit IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA -kitillä suoritettiin lokakuun 2012 aikana. Ennen analysointeja näytteiden ajosta laadittiin ajosuunnitelma (LIITE 3). Ensimmäisenä analysointipäivänä ohjaava opettaja perehdytti opinnäytetyön tekijää analysoinnissa käytettäviin laitteisiin. Toisena päivänä ohjaava opettaja oli läsnä ja kolmannen analysoinnin opinnäytetyön tekijä suoritti itsenäisesti.

Näytteet analysoitiin kahdella IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA kitillä, pakkaus insertin ohjeen (LIITE 4) ja ajosuunnitelman mukaisesti. Ohjeesta poikettiin lisäämällä inkubaatioiden ajaksi kuoppalevyn sekoitus näytteiden tasalaatuisuuden varmistamiseksi. Inkubaatioissa käytettiin Thermo iEMS Incubator/shaker HT –laitetta asetuksilla 24°C ja 400rpm. Kuoppien pesu suoritettiin käsin käyttäen monikanavapipettiä. Kuoppalevyn kuoppien fotometriseen mittaukseen käytettiin Thermo Multiskan EX –laitetta, joka on pystyvaloteinen 8-kanavainen suodatinfotometri. Mittausaallonpituutena käytettiin kitin ohjeiden mukaisesti 450nm. Lukulaite oli yhdistetty Ascent Software 2.6 –ohjelmaan.

Ensimmäisessä ajossa analysoitiin ensimmäisellä kitillä standardinäytteet *ca10-ca16* sekä kitin kaksi kontrollia.

Toisena analysointipäivänä mitattiin standardit ja kontrollit, sekä 14 tutkimusnäytettä triplikaatteina. Tutkimusnäytteet pakastettiin odottamaan

seuraavaa ajoa. Alkuperäisen suunnitelman mukaan näytteitä olisi ajettu duplikaatteina 30, mutta sentrifugoitaessa osa näyteputkista rikkoutui. Tehtiin uusi ajosuunnitelma 14 näytteelle. Toisen ajopäivän jälkeen potilasnäytteet pakastettiin ja ne sulatettiin kolmantena ajopäivänä.

Kolmannessa ajossa otettiin käyttöön samaa eränumeroa oleva uusi kitti ja analysoitiin standardit, kontrollit sekä samat näytteet kuin edellisessä ajossa. Lisäksi analysoitiin 16 uutta näytettä. Kaikki näytteet ajettiin duplikaatteina. Näytteet sentrifugoitiin ennen analysointia.

Lukulaitteen tulokset kopioitiin Ascent Software 2.6 –ohjelmasta Microsoft Excel –taulukkolaskentaohjelmaa, josta tulokset syötettiin IBM SPSS Statistics 20 –tilasto-ohjelmaan tilastollisia analyyseja varten.

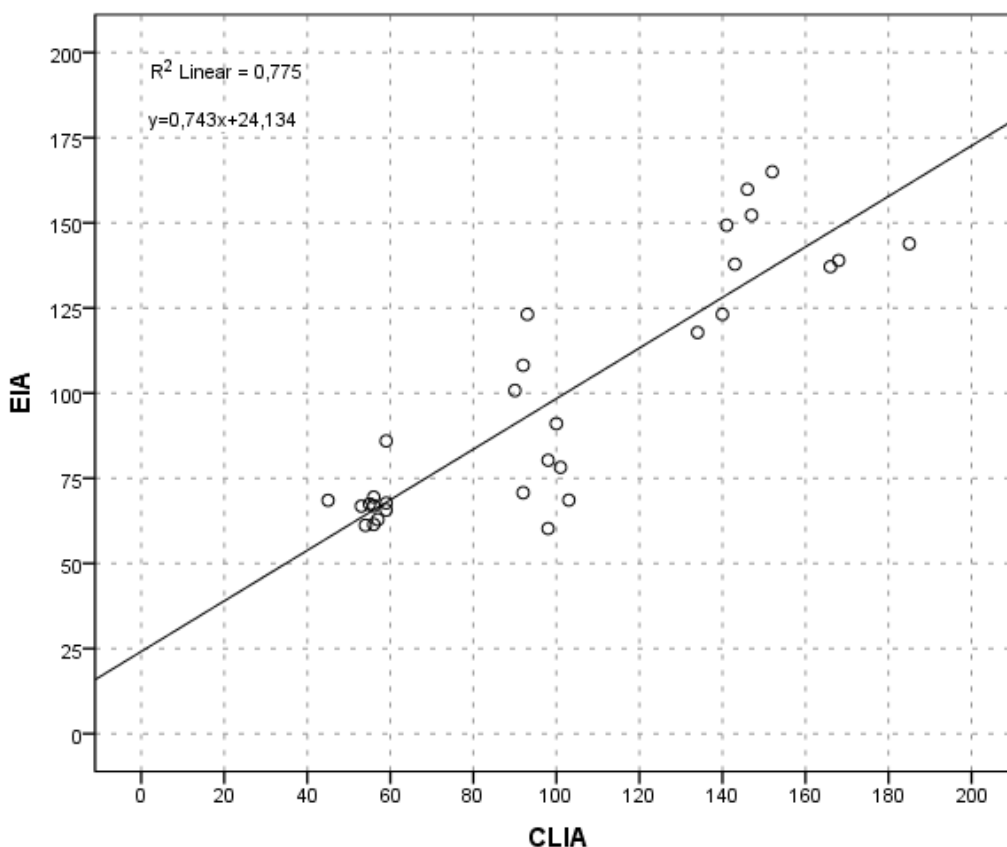
Menetelmien vertailuun valittiin ensimmäisen ajopäivän näytteiden 1-14 tulokset sekä toisen ajopäivän tuloksista näytteiden 15-30 tulokset, jotta vertailuun saatiin vain uudelleenpakastamattomien näytteiden tuloksia. IDS EIA –menetelmän sarjojen sisäisen toistuvuuden tarkastelussa käytettiin yksittäisen havaintoyksikön rinnakkaisia ajotuloksia. 14 näytteestä oli käytettävissä kolme rinnakkaistulosta ja 30 näytteestä kaksi rinnakkaistulosta. Havaintoyksiköiksi sisäisen toistuvuuden tarkasteluun valittiin myös seitsemän standardinäytettä ja kaksi kontrollinäytettä. Sarjojen välistä toistuvuutta ja menetelmän uusittavuutta tutkittiin eri ajopäivinä analysoiduilla standardi- ja kontrollinäytteiden tulosten välisen hajonnan avulla. Pakastuksen vaikutusta tutkittiin 14 näytteellä joiden pitoisuus analysoitiin kaksi kertaa. Analysointikertojen välissä näytteet säilytettiin -80°C:ssa 3vrk:n ajan. Tuloksia analysoitiin IBM SPSS Statistics 20 -tilasto-ohjelmalla ja Microsoft Office Excel 2007 -ohjelmalla. Tuloksista laskettiin tunnuslukuja, korrelaatiokertoimia ja tehtiin tilastollinen T-testi.

25-OH D-pitoisuuden vaikutusta IDS EIA- ja referenssimenetelmän välisen hajonnan suuruuteen tutkittiin tarkastelemalla variaatiokertoimen ja näytteen keskiarvopitoisuuden riippuvuutta toisistaan.

5 TUTKIMUSTULOKSET

5.1 Menetelmävertailu

Menetelmiä verrattiin parinäytteiden (n=30) tulosten tunnuslukujen, korrelaatiokertoimen ja t-testin avulla. IDS 25-OH Vitamin D EIA- ja referenssimenetelmän (*Siemens Vitamin D Total*) 25-OH D-tulosten välinen korrelaatio ja regressiosuora Kuviossa 4. Regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y=0,743x+24,134$. Korrelaatiota tutkittiin Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla ja kertoimen arvoksi saatiin 0,880 ja p-arvoksi 0,001.



Kuvio 4: Menetelmien 25-OH D-tulosten korrelaatio (nmol/l) (n=30)

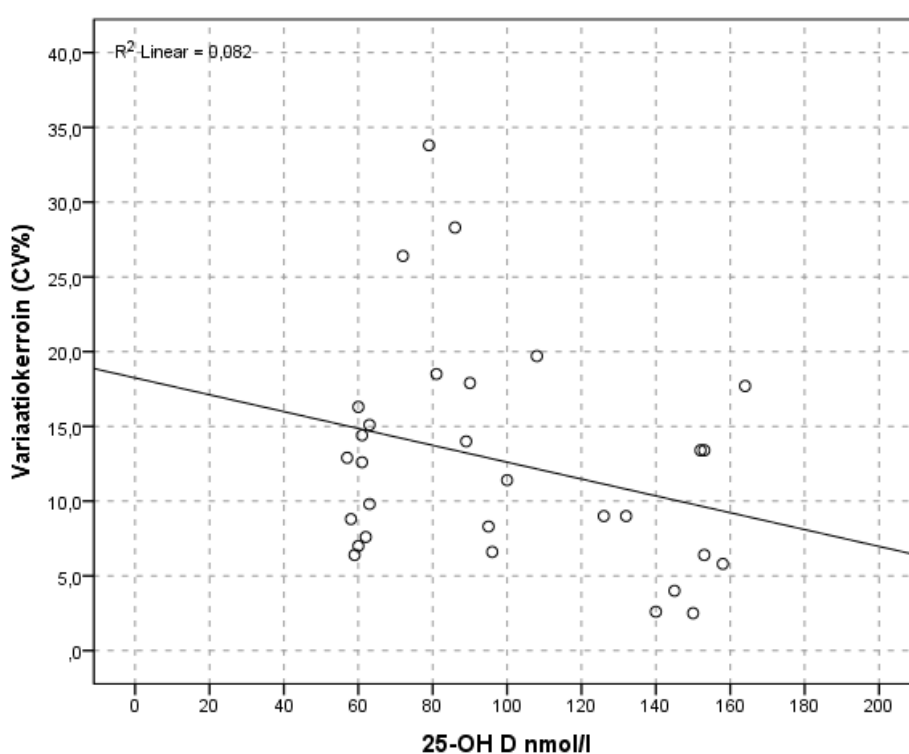
IDS 25-OH Vitamin D EIA- ja referenssinä käytetyn Siemensin immunomäärityksen tulosten (n=30) keskiarvot on esitetty Taulukossa 2. IDS EIA -menetelmän ja referenssimenetelmän tuloksista laskettiin rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksien keskihajonta ja keskiarvo. Variaatiokerroin saatiin jakamalla keskihajontatulos keskiarvolla. Rinnakkaisten näytteiden 25-OH D – pitoisuuksien keskiarvoksi saatiin IDS EIA –menetelmällä 98,3 nmol/l ja referenssimenetelmällä 99,9 nmol/l. Keskihajonnaksi IDS EIA:n tuloksille laskettiin 35,7 nmol/l ja referenssimenetelmän tuloksille 42,3 nmol/l. IDS EIA –menetelmän keskivirhe oli 6,5 ja referenssin 7,7. Menetelmien 25-OH D:n tulostasojen eroksi laskettiin 1,6 nmol/l eli 1,6%. IDS EIA ja Siemens Vitamin D Total -menetelmillä analysoitujen parinäytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat 2,5 ja 33,8 välillä ja keskimäärin se oli 12,7%. Keskimääräinen keskihajonta parinäytteillä oli 12,1 nmol/l ja sen arvot vaihtelivat välillä 3,6-9,1.

IBM SPSS 20 Statistics –tilasto-ohjelmassa tulosten todettiin noudattavan normaalijakaumaa ($p>0,05$), joten tehtiin parierojen t-testi. T-testin tuloksena p-arvoksi saatiin 0,667. T-testissä parierojen keskiarvo oli 1,6 nmol/l ja keskivirhe 3,7.

Taulukko 2: Menetelmien välinen 25-OH D-tulosten vertailu (n=30)

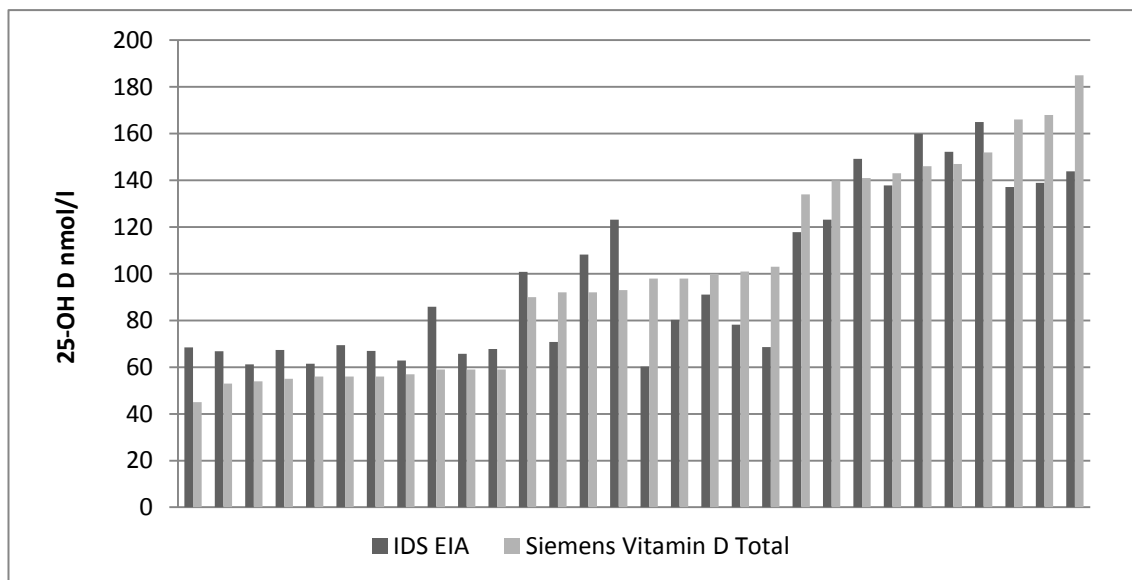
	<i>IDS EIA</i> (nmol/l)	<i>Siemens VitD</i> (nmol/l)	<i>Variaatiokerroin</i> CV%
Keskiarvo	98,3	99,9	12,7
Min-Max			2,5-33,8
Keskihajonta			7,5
Vaihteluväli			31,3

Näytteen 25-OH D-pitoisuuden vaikutusta menetelmien väliseen variaatiokertoimeen tarkasteltiin korrelaatiokertoimen avulla. IDS 25-OH Vitamin D EIA- ja referenssimenetelmän parinäytteiden variaatiokertoimien ja näytteen pitoisuuden välinen korrelaatio on esitetty Kuviossa 5. Kuviossa 25-OH D -pitoisuus on menetelmillä mitattujen pitoisuuksien keskiarvo. Pearsonin korrelaatiokertoimeksi saatiin -0,286 ja p-arvoksi 0,126.



Kuvio 5: Näytteen 25-OH D-pitoisuuden vaikutus menetelmien väliseen variaatiokertoimeen

25-OH D-pitoisuudet kummallakin menetelmällä on esitetty pylväskaaviona Kuviossa 8. menetelmien tulosten keskiarvon mukaan lajiteltuna nousevassa järjestyksessä.



Kuvio 6: 25-OH D-pitoisuudet pylväskaaviona (n=30)

5.2 Intra assay CV%

IDS EIA –menetelmän rinnakkaisten näytteiden 25-OH D-pitoisuuksien keskihajonta potilasnäytteillä (n=44) vaihteli välillä 0,5-25,2 nmol/l ja se oli keskimäärin 4,5 nmol/l. Sarjan sisäinen variaatiokerroin on laskettu Taulukossa 3. Rinnakkaismääritysten variaatiokertoimien keskiarvoksi laskettiin 4,3% ja se vaihteli välillä 0,85-18,3%.

Taulukko 3: Sarjan sisäinen toistuvuus (n=44)

	Variaatiokerroin
Intra assay	CV%
Min-Max	0,85-18,3
Keskiarvo	4,3
Keskihajonta	3,9
Vaihteluväli	17,4

Havaintoyksiköiksi sisäisen toistuvuuden tarkasteluun valittiin myös seitsemän standardinäytettä ja kaksi kontrollinäytettä, joiden sarjojen sisäinen variaatiokerroin on laskettu Taulukossa 4. Nollastandardin variaatiokerrointa ei voitu laskea keskiarvon ollessa 0. Standardi- ja kontrollinäytteillä IDS EIA –menetelmän rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksien keskihajonta vaihteli 0,0-24,2 nmol/l välillä ja oli keskimäärin 4,1 nmol/l. Variaatiokertoimien keskiarvoksi laskettiin 8,3% ja se vaihteli välillä 0,0-51,4%.

Taulukko 4: Sarjan sisäinen toistuvuus standardi- ja kontrollinäytteillä (n=9)

	Variaatiokerroin
Intra assay	CV%
Min-Max	(0,0-51,4)
Keskiarvo	8,3
Keskihajonta	10,4
Vaihteluväli	51,4

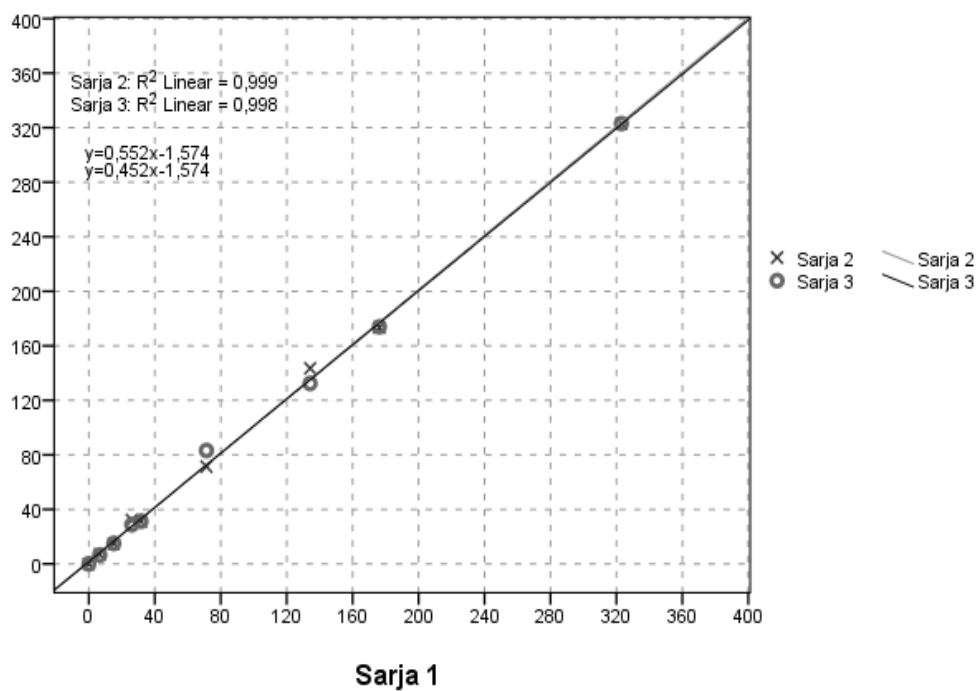
5.3 Interassay CV%

Sarjojen välisessä toistuvuuden tarkastelussa oli käytävissä 9 havaintoyksikköä. Taulukossa 5 on esitetty havaintoyksiköiden keskiarvot ja yksittäisten havaintoyksiköiden tulosten keskihajonta ja variaatiokerroin. Sarjojen keskiarvoiksi laskettiin 87,1, 88,5 ja 88,2 nmol/l. Sarjojen välinen rinnakkaismäärittysten pitoisuuksien keskihajonta vaihteli välillä 0,0-6,9 nmol/l ja oli keskimäärin 2,0 nmol/l. Variaatiokerroin vaihteli välillä 0,0-10,7% ja oli keskimäärin 3,4%.

Taulukko 5: Sarjojen välinen toistuvuus (n=9)

	Variaatiokerroin
Inter assay	CV%
Vaihteluväli	10,7 (0,0-10,7)
Keskiarvo	3,4
Keskihajonta	4,1

Sarjojen 1-3 arvojen korrelaatiota tutkittiin Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,999 ja p-arvoksi 0,000 kaikkien kolmen sarjan välillä. Sarjojen välinen korrelaatio, regressiosuora ja suoran yhtälö on esitetty Kuviossa 6. Tulosten todettiin noudattavan normaalijakaumaa ja tehtiin parierojen T-testi. T-testissä sarjojen 1 ja 2 p-arvo oli 0,310, sarjoilla 1 ja 3 p-arvo oli 0,450 ja sarjoilla 2 ja 3 p-arvo oli 0,903. Parierojen keskiarvo sarjoilla vaihteli välillä 0,2-1,4, parierojen keskihajonta välillä 3,8-5,8 ja keskivirhe välillä 1,3-2,0.



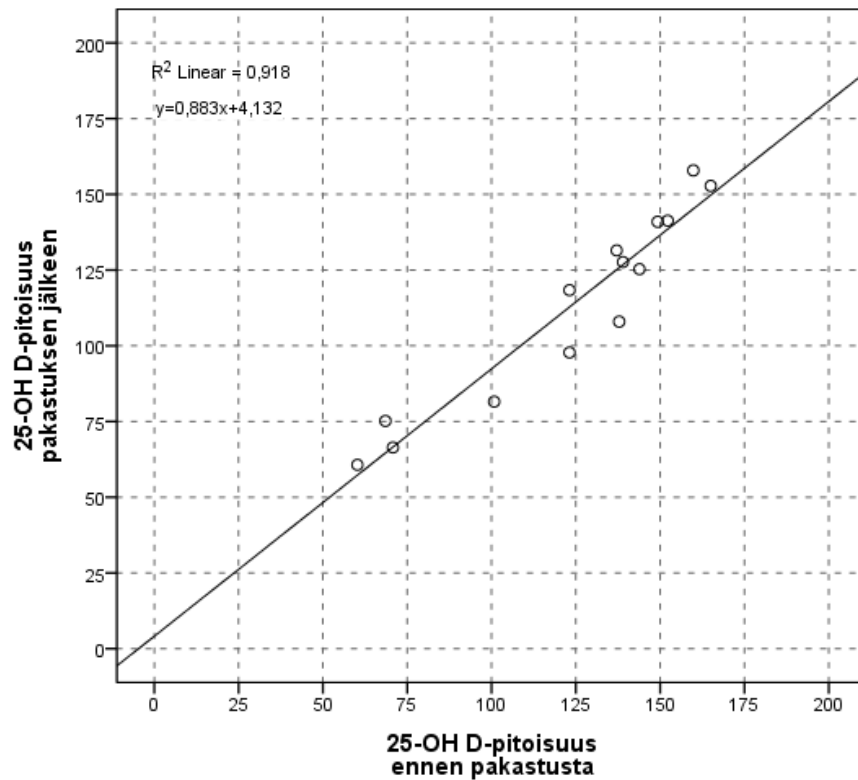
Kuvio 7: Sarjojen välinen korrelaatio (nmol/l) (n=9)

5.4 Pakastuksen vaikutus

Pakastuksen vaikutusta tutkittiin 14 havaintoyksiköllä. Taulukossa 6 on esitetty tulosten tunnuslukuja. Pearsonin korrelaatiokertoimen arvoksi saatiin 0,958 ja p-arvoksi 0,001. Tulosten korrelaatio, regressiosuora ja regressiosuoran yhtälö on esitetty Kuviossa 7. Regressioanalyysin selitysaste oli 0,911 ja keskiarvo 9,61. Tulosten todettiin noudattavan normaalijakaumaa ja tehtiin parierojen t-testaus. T-testissä p-arvoksi saatiin 0,002. T-testissä parierojen keskiarvo oli 10,4 ja keskiarvo 2,7. Tulostasoeroksi laskettiin 10,4 nmol/l eli 8,0%.

Taulukko 6: Pakastuksen vaikutus (n=14)

	Ennen pakastusta	Pakastuksen jälkeen	Variaatiokerroin CV%
Keskiarvo	123,6 nmol/l	113,2 nmol/l	6,9
Min-Max			0,6-17,2
Keskihajonta			5,5
Vaihteluväli			16,6



Kuvio 8: Pakastuksen vaikutus 25-OH D-pitoisuuteen

5.5 Kontrollit

IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA –kitin kontrollien tavoitearvot ja mitatut pitoisuudet on esitetty Taulukossa 7.

Taulukko 7: Käytetyt kontrollit ja mitatut pitoisuudet

	Kontrolli 1	Kontrolli 2
Sarja 1	26,0	134,3
Sarja 2	32,2	143,5
Sarja 3	28,8	132,4
Keskiarvo	29	136,7
Keskihajonta	3,1	6,0
CV%	10,7	4,4
Tavoitearvo	27	119
Viiteväli	22-32	95-142

6 POHDINTA

6.1 Tutkimustulosten tarkastelu

Tutkimustulosten perusteella IDS 25-OH Vitamin D EIA ja Siemens Vitamin D Total –menetelmien tulosten välillä on voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaatio on tilastollisesti erittäin merkitsevä p-arvon 0,001 perusteella. Tulostaseroa menetelmillä laskettiin olevan 1,6%, joten menetelmien tulostasot vastaavat hyvin toisiaan. Keskimäärin IDS EIA antoi 1,6 nmol/l matalampia 25-OH D-pitoisuuksia kuin referenssimenetelmä. Menetelmien tulosten välillä ei todettu tilastollisesti merkitsevää eroa ($p=0,667$).

IDS 25-OH Vitamin D EIA –menetelmän ja referenssimenetelmän välillä oli suhteellisen suurta hajontaa yksittäisten näytteiden välillä. Keskimäärin parinäytteiden välinen variaatiokerroin oli 12,7%. Keskimäärin menetelmät antoivat 20,1 nmol/l eroavia tuloksia. Korkein variaatiokerroin oli 33,8% ja se laskettiin näytteelle, jonka pitoisuus oli IDS EIA –menetelmällä 60 nmol/l ja referenssimenetelmällä 98 nmol/l. Menetelmästä johtuva variaatio saattaisi niiden näytteiden kohdalla, joiden pitoisuus on viitearvojen rajalla, vaikuttaa potilaan saamaan hoitoon.

Näytteen 25-OH D-pitoisuuden ja menetelmien tulosten välisen variaatiokertoimen välillä todettiin heikko negatiivinen korrelaatio. Korrelaatio ei ole merkitsevä, koska p-arvoksi saatiin 0,126. Näytteen pitoisuuden ei todettu tilastollisesti merkitsevästi vaikuttavan variaatiokertoimeen IDS EIA- ja referenssimenetelmän tulosten välillä. Aikaisempien tutkimusten mukaan joidenkin kalsidiolin määritysmenetelmien välisen korrelaation oli todettu heikentyneen korkeilla pitoisuuksilla.

IDS 25-OH Vitamin D EIA –menetelmän sarjan sisäinen toistuvuus todettiin hyväksi. Variaatiokertoimien keskiarvoksi saatiin 4,3% potilasnäytteillä. Standardi- ja kontrollinäytteiden variaatiokerroin oli korkeampi, mutta arvoa nostivat yksittäiset merkittävästi poikkeavat näytteet. Standardinäyte 2:lla variaatiokerroin 51,4% oli suurin ja rinnakkaisnäytteiden keskihajonta 3,6 nmol/l.

IDS 25-OH Vitamin D EIA –menetelmän uusittavuutta tutkittiin tarkastelemalla sarjojen välistä toistuvuutta eri analysointipäivinä. Sarjojen kolmen ajopäivän tuloksissa ei todettu tilastollisesti merkitsevää eroa. Sarjojen välillä todettiin erittäin merkitsevä voimakas positiivinen korrelaatio. Menetelmän uusittavuus todettiin hyväksi variaatiokertoimien keskiarvon ollessa 3,4%.

Tämän tutkimuksen perusteella menetelmä ei sovellu kliiniseen käyttöön, koska yksittäisten potilasnäytteiden kohdalla todettiin merkittävä ero referenssimenetelmän tulokseen nähden. Yksittäisten näytteiden hajonta voi vaikuttaa tulokseen siinä määrin, että potilaan sama hoito muuttuu. Lisäksi, IDS EIA –kitin korkeimman kalibrintiliuksen pitoisuus oli 323 nmol/l. Toksisena seerumin kalsidiolipitoisuutena pidetään yleisesti 375 nmol/l, joten IDS EIA –menetelmän mittausalue ei ole riittävä kliiniseen käyttöön.

Menetelmä soveltuu tutkimuskäyttöön hyvän toistettavuuden ja uusittavuuden perusteella. Voidaan siis luottaa menetelmän antavan yhteneviä tuloksia samalle näytteelle analysointikerrasta riippumatta.

Ennen ja jälkeen pakastamista analysoitujen tulosten välillä on voimakas positiivinen korrelaatio. Tutkimustulosten perusteella näytteiden pakastamisella on kuitenkin vaikutusta analyytin pitoisuuteen IDS 25-OH Vitamin D EIA –menetelmällä mitattuna. Tulosten välillä todettiin tilastollisesti merkitsevää eroa ($p=0,002$). Parierojen keskivirhe oli 2,7nmol/l, joten tulokseen voidaan luottaa. Regressioanalyysin mukaan pitoisuuksien muutoksesta 91% selittyy näytteiden pakastamisella, joten pakastamisella on vaikutusta analyytin pitoisuuteen. Pakastaminen laskee 25-OH D-pitoisuutta keskimäärin 10,4 nmol/l.

Jatkotutkimusaiheena voisi olla tutkimuksen toistaminen tuoreilla näytteillä ja suuremmalla otoskoollla. Tutkimukseen tulisi saada näytteitä myös hyvin matalilta ja korkeilta pitoisuusalueilta. Tässä tutkimuksessa referenssimenetelmän tulosten mukaan korkein analysoitu pitoisuus oli 185 nmol/l. IDS EIA –kitin kalibrintiliusten korkein pitoisuus oli 323 nmol/l. Kitin toimivuutta voisi tutkia myös näytteillä, joiden pitoisuus on erittäin korkea.

Tässä tutkimuksessa sisäisen toistuvuuden tarkastelussa käytettiin duplikaatteina ja triplikaatteina analysoitujen näytteiden tuloksia. Toistuvuuden tarkastelua varten voisi tehdä enemmän toistomäärityksiä samalle näytteelle. Tarkkuutta ja tulostasoa voisi arvioida eri valmistajien kaupallisilla kontrolleilla. Lisäksi lineaarisuuden tarkastelua varten voisi valmistaa ja analysoida laimennossarjan.

Pakastuksen vaikutusta voisi tutkia lisää arvioimalla pakastusajan vaikutusta näytteen kalsidiolipitoisuuteen.

6.2 Luotettavuuden arviointi

Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi se, että ohjaava opettaja perehdytti opinnäytetyöntekijää analysoinnissa tarvittaviin laitteisiin ennen tutkimusnäytteiden analysoimista. Opettaja oli läsnä kahtena ensimmäisenä näytteiden analysointipäivänä. Luotettavuutta lisäsi suunnitelmien laatiminen ja määritysmenetelmän ohjeisiin perehtyminen ennen käytännön toteutusta.

Pakastettuina olleiden näytteiden annettiin sulaa huoneenlämmössä kokonaan ennen pipetointia. Kontrolli- ja standardinäytteitä sekä IDS 25-OH Vitamin D EIA –pakkauksen muita komponentteja käsiteltiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Myös muilta osin noudatettiin huolellisesti analyysin suorituksen ohjeita. Ohjeesta poikettiin lisäämällä inkubaatioiden ajaksi sekoitus 400 rpm, koska se lisää tulosten tasalaatuisuutta ja luotettavuutta (Venojärvi 5.10.2012).

Tutkimuksen luotettavuutta tukee se, että pipetoinnit suoritettiin vain kalibroiduilla pipeteilla. Pipetointitarkkuutta lisäsi monikanavapipettien käyttö ja käänteinen pipetointimenetelmä. Pipetoinnit suoritti aina sama henkilö, mikä myös lisäsi luotettavuutta. Luotettavuutta olisi tukenut kuoppien pesuvaiheiden suoritus automaattilaitteella, mutta rajallisten analysointimateriaalien vuoksi pesut suoritettiin kuoppalevyn kuoppien säästämiseksi käsin.

Teoreettista viitekehystä laadittaessa noudatettiin asianmukaista lähdekritiikkiä. Tietolähteen arviointia on tehtävä koko tiedonhakuprosessin ajan ja erityisesti elektronisten lähteiden suhteen tulee olla tarkkaavainen (Koivunen 2011).

Tutkimuksen luotettavuutta heikentää se, että näytteitä oli käsitelty monen eri henkilön toimesta. Menetelmävertailun luotettavuutta heikentää myös se, että referenssimenetelmällä analysoituja näytteitä ei oletettavasti oltu pakastettu ennen analysointia. IDS EIA –menetelmällä ajetut näytteet olivat säilytyksessä -80°C:ssa usean kuukauden ajan ennen analysointia. Käytännössä pakastamisen vaikutuksen arviointia varten näytteet pakastettiin toistamiseen.

Luotettavuutta heikentävät pieni otoskoko ja kaupallisten kontrollien puuttuminen. Luotettavuutta saattoi heikentää toisen analysointipäivän kontrollitulosten sijoittuminen hieman viitevälin yläpuolelle. Suurempi näytemäärä ja näytteet laajemmalla pitoisuusalueelta olisivat parantaneet tutkimuksen luotettavuutta.

6.3 Eettiset näkökohdat

Tutkimus tulee toteuttaa noudattaen hyvää tieteellistä käytäntöä. Käytäntöön kuuluu tutkimuksen asianmukainen suunnittelu ja tarvittavien lupien hakeminen. Käytäntöä tulee noudattaa, jotta tutkimus on luotettava ja hyväksyttävä. Kaikissa tutkimusvaiheissa on toimittava rehellisesti ja huolellisesti. Tiedonhankintatapojen on oltava eettisesti kestäviä ja tutkimustulosten julkaisemisessa on noudatettava avoimuutta. Plagiointi ei kuulu hyvään tieteelliseen käytäntöön. Muiden osapuolten tekemä työ otetaan huomioon asianmukaisella tavalla heidän saavutuksiaan kunnioittaen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2011.)

Tutkimukseen tarvittava toimeksiantosopimus saatiin Turun ammattikorkeakoululta. Tutkimus suoritettiin koulun tiloissa, joten erillistä tutkimuslupaa ei tarvittu. Ennen tutkimuksen aloittamista tehtiin tutkimussuunnitelma, jonka toimeksiantaja hyväksyi. Teoreettista viitekehystä laatiessa toisten tekstejä ei plagioitu ja lähdemerkinnät tehtiin asianmukaisesti. Muiden osapuolten tekemä työ huomioitiin. Tutkimuksen eteneminen, tulokset ja virheet raportoitiin avoimesti ja rehellisesti. Tutkittavia näytteitä käsiteltiin anonymisti. Tutkimusta tehtäessä noudatettiin huolellisuutta ja varmistettiin, että näytteiden käsittely ja analysointi tapahtui oikein.

Suomessa on säädetty laki ihmisen elimien, kudosten ja solujen lääketieteellisestä käytöstä. Kudoksia ja soluja, jotka on kerätty hoitotoimenpiteen tai taudinmäärityksen yhteydessä, voidaan varastoida ja käyttää lääketieteellistä käyttöä varten. (Laki ihmisen elimien 101/2001.)

Tutkimus oli määritysmenetelmän toimivuuden testaus, eikä sillä ollut vaikutusta potilaiden saamaan hoitoon. Näytteet oli identifioitu juoksevilla numerolla. Näytteiden ja niistä saatujen tulosten käsittely tapahtui anonymisti koko tutkimuksen ajan, eikä opinnäytetyöntekijä nähnyt missään vaiheessa potilaiden henkilötietoja. Tutkimuksesta saatiin tietoa, jota voidaan hyödyntää arvioitaessa menetelmän soveltuvuutta erilaisiin käyttötarkoituksiin.

LÄHTEET

Alfthan H., Turpeinen U., Helin A., Laitinen P., Markkanen H. & Hämäläinen E. 2012. Onko immunologisten 25-OH-D-vitamiinimääritysten laatu riittävä D-vitamiinipuutteen arvioimiseksi? *Kliinlab* 4/2012, 72-73.

Aro A. 2005. D-vitamiini –monivaikutteinen hormoni. *Lääketieteen aikakauskirja Duodecim* 2005; 121:1749-54.

Carter G.D., Berry J.L., Gunter E., Jones J.C., Makin H.L.J., Sufi S. & Wheeler M.J. 2010. Proficiency testing of 25-Hydroxyvitamin D (25-OHD) assays. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 121, Issues 1-2, July 2010, 176-179.

Carter G.D., Carter C.R., Gunter E., Jones J., Jones G., Makin H.L.J. & Sufi S. 2004a. Measurement of vitamin D metabolites: an international perspective on methodology and clinical interpretation. *The Journal of Steroid Biochemistry and molecular Biology*. Vol. 89-90, May 2004, 467-471.

Carter G.D., Carter R., Jones J. & Berry J. 2004b. How Accurate Are Assays for 25-Hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality Assessment Scheme. *Clinical Chemistry*. Vol. 50 No. 11. Nov 2004, 2195-2197.

Crowther J.R. 2001. *The ELISA Guidebook. Methods in Molecular Biology*. Vol 149. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Dixon S. 2010. New Vitamin D Recommendations Reignite Controversy. *About.com Guide. Health; Colon cancer* Dec 1, 2010. <http://coloncancer.about.com/b/2010/12/01/new-vitamin-d-recommendations-reignite-controversy.htm> (12.10.2012).

Halonen T. 2004. *Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WSOY.*

Hanley D. 2010. New vitamin D guidelines. Faculty of Medicine. July 14/2010. University of Calgary Medicine.

Heikkilä, T. 2008. *Tilastollinen tutkimus. 7. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.*

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2004. *Tutki ja kirjoita. 10. osin uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.*

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2007. *Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Keuruu: Tammi.*

Holopainen M. & Pulkkinen P. 2002. *Tilastolliset menetelmät. 1. painos. Vantaa: WSOY.*

Honkonen O. 2003. *Uutta tietoa avidiinin toiminnasta ja muokkaamisesta. Jyväskylän Yliopisto: Väitöskirja. Abstract.*

Jaarinen S. & Niiranen J. 1997. *Laboratorion analyysitekniikka: Laatu, Spektrometria, Kromatografia. 2. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.*

Jackson R.D., LaCroix A.Z., Gass M., Wallace R.B., Robbins J., Lewis C.E., Bassford T., Beresford S.A., Black H.R., Blanchette P., Bonds D.E., Brunner R.L., Brzyski R.G., Caan B., Cauley J.A., Chlebowski R.T., Cummings S.R., Granek I., Hays J., Heiss G., Hendrix S.L., Howard B.V., Hsia J., Hubbell F.A., Johnson K.C., Judd H., Kotchen J.M., Kuller

L.H., Langer R.D., Lasser N.L., Limacher M.C., Ludlam S., Manson J.E., Margolis K.L., McGowan J., Ockene J.K., O'Sullivan M.J., Phillips L., Prentice R.L., Sarto G.E., Stefanick M.L., Van Horn L., Wactawski-Wende J., Whitlock E., Anderson G.L., Assaf A.R., Barad D. 2006. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. The New England journal of medicine. Feb 2006 16;354(7):669-83. Abstract.

Kairisto, V. 2010. Laboratoriotuloksen tulkinta. Teoksessa Niemelä O. & Pulkki K. (toim.) 2010. Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2009. Tutkimus hoitotieteessä. WSOY.

Koivunen A. 2011. Lähteiden käytön opas. Turun Yliopisto. http://www.hum.utu.fi/oppiaineet/mediatutkimus/opiskelu/lahdeopas_koivunen.html (6.11.2012).

Kricka L.J., Phil D., Chem C. & Path F.R.C. 2008. Principles of Immunochemical Techniques. Teoksessa Teoksessa C.A. Burtis, E.R. Ashwood & D.E. Bruns (toim.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Sixth Edition. St. Louis: Saunders Elsevier; 155-170.

Laatikainen A. 2004. Puolustusvaste. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WSOY.

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 101/2001. Elimien, kudoksien ja solujen talteenotto 547/2007). 6§ Yleiset edellytykset ja rajoitukset. 7§ Potilaan suostumus ja muut talteenoton edellytykset.

Linnet K. & Boyd J.C. 2008. Selection and Analytical Evaluation of Methods –With Statistical Techniques. Teoksessa C.A. Burtis, E.R. Ashwood & D.E. Bruns (toim.) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Sixth Edition. St. Louis: Saunders Elsevier; 201-228.

Mutanen M. & Voutilainen E. 2005. Vitamiinit ja kivennäisaineet. Teoksessa Aro, A.; Mutanen, M. & Uusitupa, M. (toim.) Ravitsemustiede 2005. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

National Academy of Sciences. 2012. Institute of Medicine. 2010. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. <http://www.iom.edu/Reports/2010/Dietary-Reference-Intakes-for-Calcium-and-Vitamin-D/Report-Brief.aspx> (12.10.2012).

Nienstedt W., Hänninen O., Arstila A. & Björkqvist S-E. 2008. Aineenvaihdunnan säätely. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15.-17. painos. Helsinki: WSOY.

Richard S. 2006. Vitamin D and Metabolites. Warde Medical Laboratory. Vol. 17, No.1 2006. http://www.wardelab.com/17_1.html (12.9.2012).

Siemens ADVIA Centaur® and ADVIA Centaur® XP Immunoassay systems. 2011. Vitamin D Total (VitD) –pakkauseloste.

Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011. ADVIA Centaur D-vitamiinitesti –esite.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2011. D-vitamiinivalmisteiden käyttösuositukseen muutoksia. http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/tiedote?id=23892 (27.4.2012).

Thermo Fisher Scientific Inc. 2012. Overview of ELISA. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403#elisaformats> (1.10.1012).

Toriola Adetunji T. 2010. Epidemiological study of the role of vitamin D in the aetiology of ovarian cancer. Research 47/2010. Helsinki: University print.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2011. Hyvä tieteellinen käytäntö. http://www.tenk.fi/hyva_tieteellinen_kaytanto/kaytanto.html (12.4.2012).

Tykslab. 2011. D-vitamiini-25-OH, seerumista. Tutkimusohjekirja. <http://ohjekirja.tykslab.fi/> (12.4.2012).

Wallace A.M., Gibson S., Hunty A. de la., Lamberg-Allardt C. & Ashwell M. 2010. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. Vol 75, Issue 7, July 2010, 477-488.

Valtion ravitsemusneuvottelukunta. 2010. Ravitsemussuositukset ikääntyneille. <http://www.ravitsemusneuvottelukunta.fi/attachments/vrn/ikaantyneet.suositus.pdf> (27.4.2010).

van den Ouweland J.M.W., Beijers A.M., Demacker P.N.M. & van Daal H. 2010. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *Journal of Chromatography B*. Vol. 878, Issues 15-16, 1 May 2010, 1163-1168.

VITA Laboratorio. 2012. D-vitamiini-25-OH. Laboratoriokäsikirja. http://www.vita.fi/etsi.php?tutk_id=69 (14.4.2012).

Vitamin D: hope on the horizon for MS prevention. *The Lancet Neurology*. 2010. Volume 9, Issue 6, Page 555, June 2010. <http://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422%2810%2970121-6/fulltext> (27.10.2012).

Åkerman K., Jokela H., Savolainen K., Parviainen M., Savolainen E-R. & Orpana A. 2010a. Laboratorion perusmenetelmät. Teoksessa Niemelä O. & Pulkki K. (toim.) 2010. Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Åkerman K., Savolainen R-E., Pelliniemi T-T. & Koski T. 2010b. Laboratoriolaitteet. Teoksessa Niemelä O. & Pulkki K. (toim.) 2010. Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

HENKILÖKOHTAISET TIEDONANNOT

Venojärvi, M. Bioanalytiikan koulutusohjelman lehtori. Turun ammattikorkeakoulu. Keskustelu 5.10.2012.

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Katja Salonen

Osoite _____

Puhelin koti _____

Sähköposti katja.salonen@students.turkuamk.fi

Koulutusohjelma Bioanalytiikka

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA
-menetelmän testaus

Aikataulu 1.4-29.11.2012

TOIMEKSIAANTAJA

Organisaatio Turun Ammattikorkeakoulu bioanalytiikan ko.

Työn ohjaaja / yhteys henkilö koulutuspäällikkö Heila Tiilikka

Osoite Ruiskatu 8 Turku

Puhelin _____ Sähköposti _____

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Mika Venojärvi

Puhelin _____ Sähköposti mika.venojarvi@turkuamk.fi

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT**OHJAUS JA VASTUUT**

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määriteltyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

11/4 2012

11/4 2012

Opiskelijat

Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

Tulosta lomake

Opinnäytetyön toteutuksen vaiheet:

Tutkimussuunitelman laatiminen ja sen hyväksyttäminen
opettajalla



Toimeksiantosopimuksen kirjoittaminen



Teoreettisen viitekehyksen laadinta



Näytteiden analysointi 25-OH Vitamin D EIA kitillä



Tulosten tilastollinen analysointi



Tutkimustulosten tarkastelu ja johtopäätösten tekeminen



Pohdinta tutkimuksen onnistumisesta

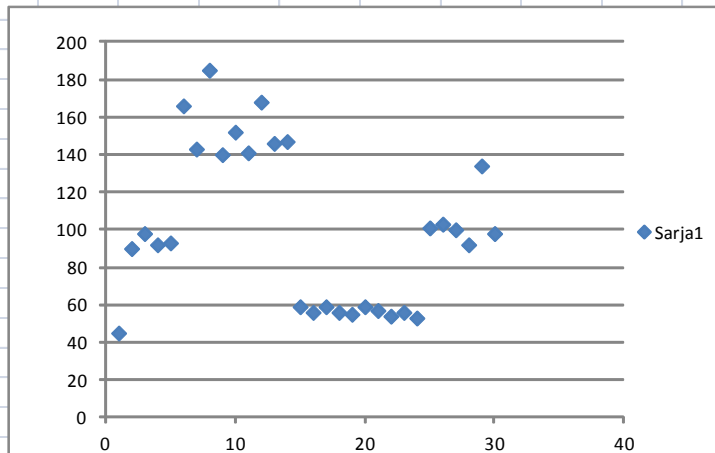


Opinnäytetyön luovuttaminen toimeksiantajalle

Liite 3: Ajosuunnitelma

	Testiajo		1.ajo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cal0	cal4	ctrl2	cal2	cal6	1	4	6	9	12	14	
B	cal0	cal4	ctrl2	cal3	ctrl1	1	4	7	9	12		
C	cal1	cal5	cal0	cal3	ctrl1	2	4	7	10	12		
D	cal1	cal5	cal0	cal4	ctrl1	2	5	7	10	13		
E	cal2	cal6	cal0	cal4	ctrl2	2	5	8	10	13		
F	cal2	cal6	cal1	cal5	ctrl2	3	5	8	11	13		
G	cal3	ctrl1	cal1	cal5	ctrl2	3	6	8	11	14		
H	cal3	ctrl1	cal2	cal6	1	3	6	9	11	14		

	pakastus											
	2.ajo		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cal0	cal4	ctrl2	4	8	12	16	20	24	28		
B	cal0	cal4	ctrl2	4	8	12	16	20	24	28		
C	cal1	cal5	1	5	9	13	17	21	25	29		
D	cal1	cal5	1	5	9	13	17	21	25	29		
E	cal2	cal6	2	6	10	14	18	22	26	30		
F	cal2	cal6	2	6	10	14	18	22	26	30		
G	cal3	ctrl1	3	7	11	15	19	23	27	30		
H	cal3	ctrl1	3	7	11	15	19	23	27	30		



Näytteet		referenssimenetelmän	
Pitoisuus	nro (vanha)	ID	pitoisuus nmol/l
	1	AMK12/56	45
	2	AMK12/72	90
	3	AMK12/74	98
	4	AMK12/78	92
	5	AMK12/79	93
	6	AMK12/13	166
	7	AMK12/14	143
	8	AMK12/38	185
	9	AMK12/61	140
	10	AMK12/83	152
	11	AMK12/98	141
	12	AMK12/108	168
	13	AMK12/116	146
	14	AMK12/127	147
	15	AMK12/12	59
	16	AMK12/26	56
	17	AMK12/53	59
	18	AMK12/64	56
	19	AMK12/89	55
	20	AMK12/91	59
	21	AMK12/103	57
	22	AMK12/105	54
	23	AMK12/132	56
	24	AMK12/144	53
	25	AMK12/9	101
	26	AMK12/24	103
	27	AMK12/46	100
	28	AMK12/133	92
	29	AMK12/136	134
	30	AMK12/84	98

Assay Procedure

Reconstitute or prepare reagents as described in "Preparation of Reagents".

1. Prepare labelled borosilicate glass or polypropylene tubes, one for each Calibrator [CAL], Control [CTRL] and sample [SPE].
2. Add **25 µL** of each Calibrator [CAL], Control [CTRL] or sample to the appropriately labelled tubes.
3. Add **1 mL** of 25-D Biotin Solution [25-D BIOTIN] [SOLN] to all tubes. Vortex thoroughly for 10 seconds.
4. Add **200 µL** of each diluted Calibrator, Control or sample to the appropriate wells of the Antibody Coated Plate [MICROPLAT] in duplicate. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 18-25°C for 2 hours.
5. Wash all wells three times with Wash Solution [WASHBUF] [SOLN].
 - a) Automatic plate wash: Set plate washer to dispense at least 300 µL of Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] per well. Fill and aspirate for 3 cycles.
 - b) Manual wash: Decant the contents of the wells by inverting sharply. Dispense 250 µL of Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] to all wells. Decant and repeat twice.

Tap the inverted plate firmly on absorbent tissue to remove excess Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] before proceeding to the next step.
6. Add **200 µL** of Enzyme Conjugate [ENZYMCONJ] to all wells using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 18-25°C for 30 minutes.
7. Repeat wash step 5.
8. Add **200 µL** of TMB Substrate [SUBS] to all wells using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 18-25°C for 30 minutes.

Note: TMB Substrate is easily contaminated. Only remove the required amount for the assay from the bottle. Dispose of unused TMB Substrate. Do not return to bottle.
9. Add **100 µL** of Stop Solution [HCL] to all wells using a multichannel pipette.
10. Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference 650 nm) using a microplate reader within 30 minutes of adding the Stop Solution.

Calculation of Results

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the calibration curve and to calculate the concentrations of unknown samples and controls. A 4 parameter logistic (4PL) curve fit, omitting Calibrator 0, is recommended. Alternatively, a smoothed spline fit can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the ordinate

against concentration of 25-hydroxyvitamin D on the abscissa. Calibrator 0 should not be included in the calibration curve.

Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve in nmol/L (nM).

Conversion of Units:

$$\begin{array}{l}
 X \text{ nmol/L} \quad \times 0.40 \Rightarrow \quad Y \text{ ng/mL} \\
 \leftarrow \times 2.5
 \end{array}$$

Quality Control Report

ids

Qualitätskontrollbericht / Rapport du contrôle de qualité / Rapporto del controllo di qualità / Informe de control de calidad / Relatório do controle da qualidade / Kwaliteitscontrolerapport / Kvalitetskontrollrapport / Kvalitetskontrollrapport

25-Hydroxy Vitamin D EIA

REF : AC-57F1

LOT : 17621

: 2013-04

Reagent / Reagens / Réactif / Reagente / Reactivo / Reagente / Reagens / Reagensmiddel / Reagens	REF	LOT	Reagent / Reagens / Réactif / Reagente / Reactivo / Reagente / Reagens / Reagensmiddel / Reagens	REF	LOT
CAL	AC-5701	16452	ENZYMCONJ	AC-5704	17620
MICROPLAT	AC-5702W	17034	SUBS	AC-SUBS	14453
25D-BIOTIN 50x	AC-5703	15891	HCL	AC-STOP	17369
BUF	AC-5703B	17366			

Quality Control Results

Qualitätskontrollergebnisse / Résultats du contrôle de qualité / Risultati del controllo di qualità / Resultados de control de calidad / Resultados do controle da qualidade / Kwaliteitscontroleresultaten / Kvalitetskontrollresultater / Kvalitetskontrollresultat

		nmol/L	ng/mL	OD/DO
CAL	0	0	0	2.172
CAL	1	6.8	2.7	2.012
CAL	2	14.8	5.9	1.711
CAL	3	31	12.4	1.216
CAL	4	71	28.4	0.703
CAL	5	171	68.4	0.435
CAL	6	323	129.2	0.360

CTRL	LOT	Result / Ergebnis/ Résultat / Risultato / Resultado / Resultado / Resultaat / Resultat / Resultat		Mean & Acceptable Range / Mittelwert und Akzeptanzbereich / Moyenne & limites acceptables / Media e intervallo accettabile / Media y limites aceptables / Média & limites aceitáveis / Middenwaarde en acceptabel bereik / Middelværdi & acceptabelt område / Medelvärde och acceptabla gränser	
		nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL
1	16873	23.6	9.4	27 (22-32)	10.8 (8.8-12.8)
2	16874	108.2	43.3	119 (95-142)	47.6 (38.0-56.8)

QA Manager / Qualitätssicherungs-Manager / Directeur de garantie de la qualité / Direttore della garanzia di qualità / Gerente de garantía de calidad / Gestor da garantia da qualidade / Hoofd kwaliteitsborging / Leder af kvalitetsstyring / Kvalitetssåkringchef

Date / Datum / Date / Data / Fecha / Data / Datum / Dato / Datum



23 Jul 2012
QCREP5TC
Issue: 65
Date: 04 July 2012I M M U N O D I A G N O S T I C • S Y S T E M S • L I M I T E D
10 DIDCOT WAY • BOLDON BUSINESS PARK • BOLDON • TYNE & WEAR • NE35 9PD • UK
TELEPHONE +44(0)191-519 0660 • FAX +44(0)191-519 0760 • EMAIL info.uk@idsplc.com • WEB www.idsplc.com