

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytikkokoulutus  
Kliininen mikrobiologia  
2015

Jenni Auramo

# PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUS IGG-VASTA-AINEKITIN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jenni Auramo

## PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUS IGG-VASTA-AINEKITIN VALIDOINTI

Puutiaisaivokuumeetta esiintyy vyöhykkeellä, joka ulottuu Keski-Euroopasta Japaniin. Suomessa puutiaisaivokuumeviruksen endeemisiä alueita ovat erityisesti Turun saaristo ja Ahvenanmaa. Puutiaisaivokuumeen aiheuttaa flavi-viruksiin kuuluva puutiaisaivokuume- eli TBE-virus. Puutiaisaivokuumevirusta levittävät puutiaiset. Puutiaisaivokuume diagnosoidaan tutkimalla seerumin IgG- ja IgM- vasta-ainepitoisuudet.

Validointi on keino, jolla osoitetaan menetelmän soveltuvuus sille aiottuun käyttötarkoitukseen. Jokainen menetelmä, jota käytetään analytiikassa, tulisi validoida. Oikeaoppisen validoinnin kuuluisi kattaa tiettyjä asioita kuten spesifisyys tai selektiivisyys, tarkkuus sekä menetelmään liittyvät häiriöt. Validoinnista laaditaan aina validointiraportti, joka arkistoidaan pysyvästi. Validointiraportti sisältää esimerkiksi tiedon siitä, miten tutkittu menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseen, menetelmän luotettavuuskriteerit sekä mahdolliset häiriötekijät.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida Tyks-Sapa liikelaitoksen Mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen Kliinisen virologian laboratorion käyttöön puutiaisaivokuumeen IgG-luokan vasta-aineiden tutkimiseen käytettävä kitti ja tehdä tutkimuksen suorittamiseen avuksi työohje. Validoinnista laaditaan myös validointiraportti. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on helpottaa ja yhtenäistää tulevaisuudessa puutiaisaivokuumeen IgG-luokan vasta-aineiden tutkimista.

Tutkimustuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, että validoitu kitti on toimiva ja laadukas ja se voidaan ottaa käyttöön. Validoinnin suorittaminen sujui todella hyvin ja tulokset olivat vastaavia vertailukitin tuloksien kanssa. Tutkimustulosten luotettavuutta tarkasteltaessa voidaan todeta, että validointi ja siinä saadut tulokset ovat päteviä eli valideja. Validointi suoritettiin laadukkailla välineillä ja uudella avaamattomalla kitillä.

### ASIASANAT:

puutiaisaivokuume, IgG-vasta-aine, validointi, kitti, validointiraportti, työohje

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory science | Clinical microbiology

2015 | 38

Seija Kirkko-Jaakkola

Jenni Auramo

## THE VALIDATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IGG-ANTIBODY KIT

Tick-borne encephalitis occurs in a zone extending from Central Europe to Japan. In Finland the endemic areas of tick-borne encephalitis virus are the Turku archipelago and Åland Islands. The cause of tick-borne encephalitis is a tick-borne encephalitis virus belonging to the flaviviruses. Tick-borne encephalitis virus is spread by ticks. Tick-borne encephalitis is diagnosed by examining the IgG and IgM antibody levels in serum.

Validation is a means of demonstrating the suitability of the method for the intended purpose. Each method used in analysis should be validated. Orthodox validation should cover a number of issues such as the specificity or selectivity, precision and the interferences associated with the method. A validation report is always written and filed permanently. Validation report contains information on how investigated method is suitable for its intended purpose, the reliability criteria of the method as well as any distractions.

The purpose of this study is to validate a tick-borne encephalitis IgG-antibody kit and create a working instructions to help executing the test. A validation report will also be prepared. The aim of this study is to facilitate and unify the investigation of tick-borne encephalitis IgG class antibodies in the future.

When examining the results of the study it can be concluded that the validated kit is functional and high quality and it can be put to use. The validation process went really well and the results were comparable with the reference kit results. Examining the reliability of the results of the study it can be concluded that the validation and the results obtained therein are valid. Validation was performed with high-quality tools and a new, unopened kit.

### KEYWORDS:

tick-borne encephalitis, IgG-antibody, validation, kit, validation report, working instructions

# SISÄLTÖ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 JOHDANTO</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2 PUUTIAISAIVOKUUME JA DIAGNOSTIIKKA</b>              | <b>7</b>  |
| 2.1 Puutiaisaivokuume                                    | 7         |
| 2.1.1 Oireet, hoito ja ehkäisy                           | 8         |
| 2.1.2 Diagnostiikka                                      | 9         |
| 2.2 Validointi   | 10        |
| 2.3 IgG-luokan vasta-aineet                              | 11        |
| 2.3.1 Vasta-aineiden tuottaminen                         | 11        |
| 2.3.2 Vasta-aineiden perusrakenne                        | 12        |
| 2.3.3 IgG-luokan vasta-aineiden rakenne                  | 13        |
| 2.3.4 IgG-vasta-aineiden toiminta kehossa                | 14        |
| 2.4 EIA-menetelmä  | 14        |
| <b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT</b> | <b>16</b> |
| <b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>                | <b>17</b> |
| 4.1 Opinnäytetyön toteutus                               | 17        |
| 4.1.1 Validointiin käytettyjen näytteiden valinta        | 18        |
| 4.1.2 Näytteiden kerääminen                              | 18        |
| 4.1.3 Näytteiden analysointi                             | 19        |
| 4.1.4 Validoinnin tulosten kirjaaminen                   | 20        |
| 4.2 Validointiin liittyvät tuotokset                     | 22        |
| 4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat              | 23        |
| 4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat                   | 24        |
| <b>5 TUTKIMUSTULOKSET</b>                                | <b>26</b> |
| 5.1 Tutkimusaineiston kuvaus                             | 26        |
| 5.2 Tulosten taulukointi                                 | 26        |
| 5.3 IgG-kvalitatiiviset tulokset                         | 27        |
| 5.4 Sarjan sisäinen toistettavuus                        | 29        |
| 5.5 Sarjojen välinen toistettavuus                       | 30        |
| <b>6 TULOSTEN TARKASTELU</b>                             | <b>32</b> |

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>7 POHDINNAT</b> | <b>35</b> |
|--------------------|-----------|

|                |           |
|----------------|-----------|
| <b>LÄHTEET</b> | <b>37</b> |
|----------------|-----------|

## **LIITTEET**

Liite 1. Validoinnissa käytettyjen näytteiden tulostaulukko

Liite 2. Kitin työohje

## **KUVIOT**

|  |    |
|--|----|
| Kuvio 1. Vasta-aineiden perusyksikön rakenne (Alberts ym. 2008). | 12 |
| Kuvio 2. IgG-luokan vasta-aineen rakenne (Alberts ym. 2008).     | 13 |
| Kuvio 3. Validoinnin suorittamisen toimintakaavio (Auramo 2015). | 17 |

## **TAULUKOT**

|  |    |
|--|----|
| Taulukko 1. Seeruminäytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015).                    | 27 |
| Taulukko 2. Likvorinäytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015).                    | 28 |
| Taulukko 3. Laaduntarkkailukierrosten näytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015). | 29 |
| Taulukko 4. Sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset, näytesarja 1 (Auramo 2015).        | 30 |
| Taulukko 5. Sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset, näytesarja 2 (Auramo 2015).        | 30 |
| Taulukko 6. Sarjojen välinen toistettavuus, näytesarja 1 (Auramo 2015).                  | 31 |
| Taulukko 7. Sarjojen välinen toistettavuus, näytesarja 2 (Auramo 2015).                  | 31 |

# 1 JOHDANTO

Puutiaisiin liittyvä keskustelu käy taas kiivaana. Mainokset punkkirokotteista ja kiertävät punkkibussit herättävät kysymyksiä ja myös pelkoa. On vaikea tietää, mitä tauteja punkki levittää ja mikä on riski sairastua niihin (Nykopp 2014.) Puutiaisaivokuumetta tavataan Suomessa yleisesti vain Turun saaristossa ja Ahvenanmaalla, mutta nyt puutiaisaivokuumeetapaukset ovat alkaneet lisääntyä myös epätavallisimmilla alueilla, kuten Etelä-Karjalassa. Yleensä Etelä-Karjalan alueella on ollut vuosittain parhaimmillaan vain neljä tartuntatapausta, mutta vuonna 2014 puutiaisaivokuumeetapauksia on ollut jo kahdeksan, eli määrä on yhtäkkiä kaksinkertaistunut. Tämä määrä ylittää jopa Varsinais-Suomen tapausten määrän, vaikka Varsinais-Suomessa puutiaisaivokuumeen esiintyvyys on ollut edellisinä vuosina korkeampi kuin Etelä-Karjalassa. (Schönberg 2014.)

Lasten sairastamaa puutiaisaivokuumetta on pidetty lievempänä kuin aikuisten. Ruotsalaistutkimuksen mukaan puutiaisaivokuume on lapsilla oletettua vakavampi ja aiheuttaa saatujen tulosten mukaan lapsillakin lyhyt- ja pitkäkestoisia neurologisia oireita, kuten häiriöitä muistissa ja tunne-elämässä. Yleisin oire lapsilla kuitenkin on vain väsymys ja päänsärky, jolloin oireiden tunnistaminen puutiaisaivokuumeen aiheuttamiksi on vaikeaa. Yleisesti on myös oletettu, että lapsilla puutiaisaivokuumetta on vain vähän. Ruotsalaistutkimukseen osallistuneesta lapsipotilasmäärästä kuitenkin hieman yli kahdeksalla prosentilla oli puutiaisaivokuumevirus, joka on huomattavasti aiempaa oletusta enemmän. (Mäkelä 2013.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida puutiaisaivokuumeviruksen tutkimiseen käytettävä testipakkaus, josta käytetään opinnäytetyössä jatkossa termiä kitti, ja tehdä validoinnista validointiraportti sekä laatia selkeä ja kattava työohje kitin käyttämiseen. Tämän opinnäytetyön tuotoksen tavoitteena on helpottaa kitin käyttöä selkeän ja kattavan työohjeen avulla. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on yhtenäistää tulevaisuudessa puutiaisaivokuumeviruksen tutkimista mahdollistamalla saman valmistajan kittien käytön sekä IgM- että IgG-luokan vasta-aineiden tutkimiseen.

## 2 PUUTIAISAIVOKUUME JA DIAGNOSTIIKKA

### 2.1 Puutiaisaivokuume

Puutiaisaivokuume eli puutiaisaivotulehdus on flaviviruksiin kuuluvan TBE-viruksen aiheuttama enkefaliitti eli aivokuume (Puutiaisaivotulehdus 2013). Flavivirukset ovat kooltaan 50 nanometrin kokoisia vaipallisia RNA-virusia. Flaviviruksiin kuuluu puutiaisaivokuumeviruksen lisäksi maailman tärkeimmät niveljalkaisten välittämät virukset. Flavivirukset koostuvat yhdestä lähetti-RNA:na toimivasta RNA-molekyylistä. RNA-molekyylin koodaama polyproteiini pilkotaan lukuisiksi erilaisiksi proteiineiksi, joista kolme rakenneproteiinia, C-, M- ja E-proteiinit, muodostavat flaviviruksen viruspartikkelin. Viruksen antigeeneistä tärkein on pinnalla oleva E-vaippaproteiini. (Terveystieteiden tutkimuskeskus THL 2013)

Puutiaiset levittävät puutiaisaivokuume- eli TBE-virusta. Virus tarttuu ihmiseen punkin puremasta syljen välityksellä. (Vaehri & Vapalahti 2010.) Puutiaisaivokuumevirusta on kolme eri geneettistä alatyyppeä. Virustyyppit on jaoteltu endeemisen alueen ja virusta levittävän puutiaislajin mukaan. Eurooppalaista virustyyppiä levittää Ixodes Ricinus-puutiainen. Kahta muuta virusalatyyppeä eli Siperian ja Kaukoidän virustyyppiä levittää Ixodes Persulcatus-puutiainen. Vaikka puutiaisaivokuumeviruksesta on nämä kolme alatyyppeä, ne ovat ominaisuuksiltaan vähintään 95 % samankaltaisia. Tämän vuoksi niihin tehoaa sama rokote. (THL 2013.)

Puutiaisaivokuumetta esiintyy vyöhykkeellä, joka ulottuu Keski-Euroopasta Japaniin. Suomessa TBE-viruksen endeemisiä alueita ovat erityisesti Turun saaristo ja Ahvenanmaa. (Vaehri & Vapalahti 2010.) TBE-tartuntojen määrä Suomessa oli 16 - 33 tapausta vuodessa vuosina 2001 - 2005 ja näistä suurin osa Ahvenanmaalla. Ahvenanmaan suuren tartuntaprosentin vuoksi siellä alettiin vuonna 2006 antaa TBE-rokotetta kaikille 2000-luvun jälkeen syntyneille. (Rapola & Vapalahti 2007.)

### 2.1.1 Oireet, hoito ja ehkäisy

Puutiaisaivokuume on oireiltaan kaksivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa oireet ilmaantuvat yleensä noin 7-14 päivässä ja tämän vaiheen oireena on influenssamainen kuumeilu. Suurimmalla osalla tartunnan saaneista tauti ei etene tämän jälkeen vaan pysähtyy tähän. Tätä seuraa 1-33 päivän (keskimäärin 6-8 päivää) oireeton vaihe, jonka jälkeen tulee taudin toinen vaihe. Toisen vaiheen oireina ovat kuume ja keskushermoston oireet, kuten päänsärky ja sekavuus. Tauti on vakavampi iäkkäimmillä ihmisillä. Taudin sairastettuaan potilaan kehoon jää IgG-vasta-aineita pysyvästi, eli taudin sairastaneille kehittyy elinikäinen immuniteetti virusta vastaan (Gubler, Kuno & Markoff 2007; Vaheri & Vapalahti 2010; THL 2013.)

Puutiaisaivokuumeen diagnostisina kriteereinä ovat kliinisten oireiden ilmaantuminen sekä jokin seuraavista laboratoriodiagnostiikassa tehdyistä löydöksistä:

1. seerumissa todetaan sekä IgG- että IgM- luokan vasta-aineita
2. likvorissa eli aivoselkäydinnesteessä todetaan IgM-luokan vasta-aineita
3. PCR-menetelmällä tai virusviljelyllä todetaan viruspositiivisuus. Näitä menetelmiä käytetään diagnosoinnissa harvoin.

Puutiaisaivokuumeeseen ei ole parantavaa lääkehoitoa, mutta se vaatii silti usein sairaalahoitoa vakavien oireiden vuoksi. Puutiaisaivokuumetta vastaan on kuitenkin kehitetty 2 erilaista rokotetta (läntinen ja itäinen rokote), jotka molemmat antavat oikein annosteltuna hyvän suojan. Rokote annetaan vuoden aikana kolmessa osassa ja tämän jälkeen tulisi käydä ottamassa rokotetehoste kolmen vuoden välein. Kuitenkin jo kahden rokoteannoksen ottaminen suojaa pahimman puutiaiskauden eli kesän yli. Paras keino välttää tautia on suojautua punkeilta mahdollisimman hyvin. Paras suoja on käyttää esimerkiksi metsässä ja heinikossa kulkiessa pitkiä housuja ja paitoja sekä korkeavartisia kenkiä tai saappaita. Puutiaisaivokuumevirus tarttuu jo muutamassa minuutissa punkin veriaterioinnin alkamisesta, joten jo kiinnittyneen punkin irrottaminen ei luultavasti suojaa taudin tarttumiselta. (Jääskeläinen 2011; THL 2013.)



Larsen (2014) kartoitti puutiaisaivokuumeen testaamisen ja rokottamisen tarvetta Norjan itärannikolla, jossa länsirannikosta poiketen tapauksia ei ole vielä ollut. Kartoitukseen osallistuneilta (n=461) otettiin verinäyte ja he täyttivät kyselykaavakkeen koskien mahdollisia punkinpuremia, ennen sairastettuja flavivirustauteja tai niitä vastaan otettuja rokotteita. Tutkittavien asuinalueelta (Ostfoldin lääni) kerättiin myös Ixodus ricinus-punkkeja tutkittaviksi. Näytteistä 8 oli IgG-vasta-ainepositiivisia ja kaksi näytettä hylättiin aikaisemmin saadun rokotuksen vuoksi. Tulosten perusteella puutiaisaivokuumeetapauksia voi esiintyä alueella silloin tällöin, mutta tapausten yleisyys on todella pieni.

### 2.1.2 Diagnostiikka

Puutiaisaivokuumevirusta voidaan epäillä taudin aiheuttajaksi, jos potilaalla on todettu erilaisia keskushermosto-oireita. Puutiaisaivokuumetta ei voida kuitenkaan tunnistaa oireiden perusteella, sillä keskushermosto-oireet voivat aiheutua monesta muustakin virustartunnasta, kuten herpeksestä. Puutiaisaivokuumeen diagnosoimiseen tarvitaankin aina laboratoriotutkimuksia. Periaatteessa puutiaisaivokuumeviruksen pystyy eristämään potilaan verestä ensimmäisen oirejakson aikana. Yleensä hoitoon kuitenkin hakeudutaan vasta toisen oirevaiheen aikana kun keskushermosto-oireet alkavat ja voimistuvat. Tässä vaiheessa virus on jo poistunut kehosta ja kehon immuunipuolustus on aktivoitunut. (Holzmann 2003.)

Immuunipuolustuksen aktivoituttua lähes kaikilla potilailla voidaan todeta veren puutiaisaivokuumevirus-spesifisiä IgM- ja IgG-luokan vasta-aineita. Likvorissa voidaan ensimmäisten oireiden ilmaantuessa todeta viruksen aiheuttamia muutoksia, mutta niiden perusteella ei voi yksinään todeta puutiaisaivokuumeetartuntaa. Keskushermosto-oireiden ilmaantumisen alkuvaiheessa IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita ilmenee likvorista vain 50 % potilaista. Vasta noin 10 päivän kuluttua keskushermosto-oireiden alkamisesta vasta-aineita löytyy mitattavia määriä lähes kaikilla potilailla. (Holzmann 2003; THL 2013.)

Puutiaisaivokuumevirus diagnosoidaan osoittamalla seerumista tai likvorista virukselle spesifisiä IgG- ja/tai IgM-luokan vasta-aineita. Parhaat menetelmät

vasta-aineiden toteamiseen on hemagglutinaation inhibitio-menetelmä (HI) ja entsyymi-immuno-menetelmää (EIA). Nykyään entsyymi-immuno-menetelmät ovat nopeampia ja käytetympiä tutkimusmetodeja. Entsyymi-immunomenetelmästä on olemassa epäsuora sekä suora menetelmä. Näistä kahdesta epäsuora menetelmä on spesifimpi, sillä suorassa menetelmässä seerumin heterofiiliset vasta-aineet tai reumafaktori voivat aiheuttaa IgM-luokan vasta-aineita mitattaessa niiden epäspesifiä sitoutumista. Vasta-ainemäärityksessä tulee ottaa huomioon se, että menetelmän havaitsemat IgM-luokan vasta-aineet saattavat johtua potilaan saamasta puutiaisaivokuumerokotuksesta. (Holzmann 2003; THL 2013.)

Holzmann & Kaiser (2000) tutkivat erilaisia laboratoriodiagnostisia keinoja, joiden avulla voidaan tutkia puutiaisaivokuumetta ja miten niiden antamat tulokset ovat yhteydessä taudin ennusteeseen. Puutiaisaivokuumetta sairastavien potilaiden (n=100) näytteitä tutkittiin erilaisilla laboratoriodiagnostisilla muuttujilla, jotka mahdollisesti ovat ominaisia tälle taudille. Monilla potilailla yleisimpiä löydöksiä olivat veri-aivoselkäydinesteen häiriöt ja vasta-aineiden muodostuminen. Sairaalaan tulon yhteydessä 84 % näistä potilaista löydettiin puutiaisaivokuumeviruksen IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita. Vasta-aineita havaittiin myös 15 päivän jälkeen tehdyssä tarkistuksessa jo kaikilla potilailla. Tästä pääteltiin, että vakavampi taudinkuva on yhteydessä siihen, ettei potilaan keho ole tuottanut vasta-aineita ollenkaan tai todella vähän.

## 2.2 Validointi

Validointi on keino, jolla osoitetaan menetelmän soveltuvuus sille aiottuun käyttötarkoitukseen. Se tulisi suorittaa siinä ympäristössä, jossa menetelmää tullaan käyttämään tai esimerkiksi sellaisilla näytteillä, joita menetelmällä tullaan tutki-  
maan. Jokainen menetelmä, jota käytetään analytiikassa, tulisi validoida. Oikeaoppisen validoinnin kuuluisi kattaa tiettyjä asioita kuten spesifisyys tai selektiivisyys, tarkkuus sekä menetelmään liittyvät häiriöt. Validoinnissa selvitetään myös mahdollisten häiriöiden ja olosuhdemuutosten vaikutus menetelmän laatuun. Va-

lidoinnista laaditaan aina validointiraportti, joka arkistoidaan pysyvästi. Validointiraportti sisältää esimerkiksi tiedon siitä, miten tutkittu menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseen, menetelmän luotettavuuskriteerit sekä mahdolliset häiriötekijät. (Jaarinen & Niiranen 2008; Engel 2010; Hiltunen, Hemminki, Hägg, Järvenpää, Kärhä, Linko, Saarinen & Simonen 2011.)

Validoinnin suorittamiselle on monia syitä. Yleisin on se, että otetaan uusi menetelmä käyttöön ja sen pätevyys täytyy tarkistaa. Uutta menetelmää voidaan myös verrata vanhaan tai sillä hetkellä käytössä olevaan menetelmään ja näin testata, kumpi menetelmistä on parempi. Jo käytössä oleva menetelmä tulee validoida, jos siihen tehdään muutoksia tai sen tutkimusvalikoimaa tai käyttötarkoitusta laajennetaan. Validoinnin tarkoituksena on tarkastella vertailun avulla menetelmän kykyä tuottaa oikeanlaisia tuloksia ja toistomittauksilla todentaa menetelmän sisäinen toistettavuus. Kahden eri menetelmän vertailu keskenään on usein käytetty validointitapa. Vertailussa molemmilla menetelmillä tutkitaan samat näytteet ja tuloksia vertaillaan keskenään. (Jaarinen & Niiranen 2008; Engel 2010; Hemminki ym. 2011.)

## 2.3 IgG-luokan vasta-aineet

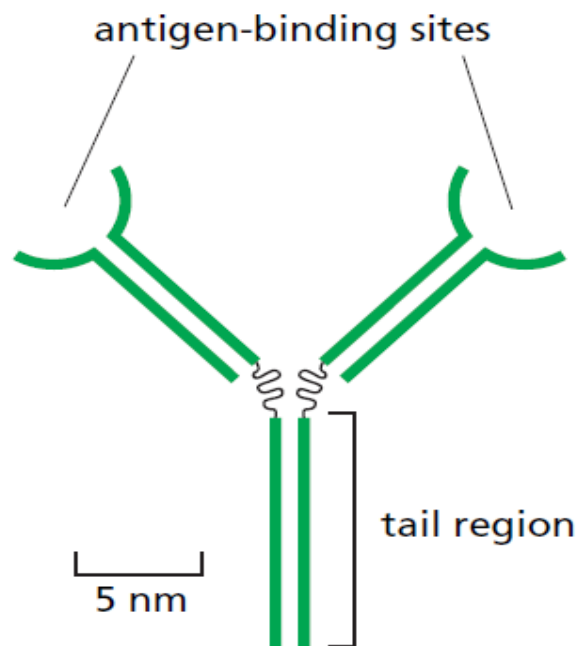
### 2.3.1 Vasta-aineiden tuottaminen

Vasta-aineet ovat erilaisia valkuaisaineita, jotka ihmiskehossa kulkevat pääasiassa verenkierrossa. Vasta-aineet ovat osa kehon immuunipuolustusta ja niiden toiminta perustuu kykyyn sitoutua antigeneiksi kutsuttuihin rakenteisiin. (Sepälä 2003.) Ilman vasta-aineita keho ei pysty puolustautumaan infektioita vastaan. Kehossa vasta-aineita tuottavat siihen erikoistuneet B-lymfosyytit eli B-solut, jotka kypsyvät luuytimessä. B-soluilla on pinnallaan reseptoreita, jotka ovat spesifisiä juuri tietyille antigeneille. Jokainen B-solu tuottaa tiettyä yhtä spesifiä vasta-ainetta ja niiden pinnalla on vain tietynlaisia reseptoreita. Kun keho havaitsee vieraita antigeneja, B-solut alkavat lisääntyä nopeasti ja erikoistua vasta-aineita tuottaviksi efektorisoluiksi. Nämä efektorisolut tuottavat spesifejä vasta-

aineita, joiden avulla keho puolustautuu. B-solun lopullinen kehitysmuoto on plasmamuoto, joka tuottaa jatkuvasti vasta-aineita jopa 5000 molekyyliä/sekunti nopeudella. B-solun plasmamuoto elää vain muutamia päiviä. (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter 2008; Jokiranta & Seppälä 2011.)

### 2.3.2 Vasta-aineiden perusrakenne

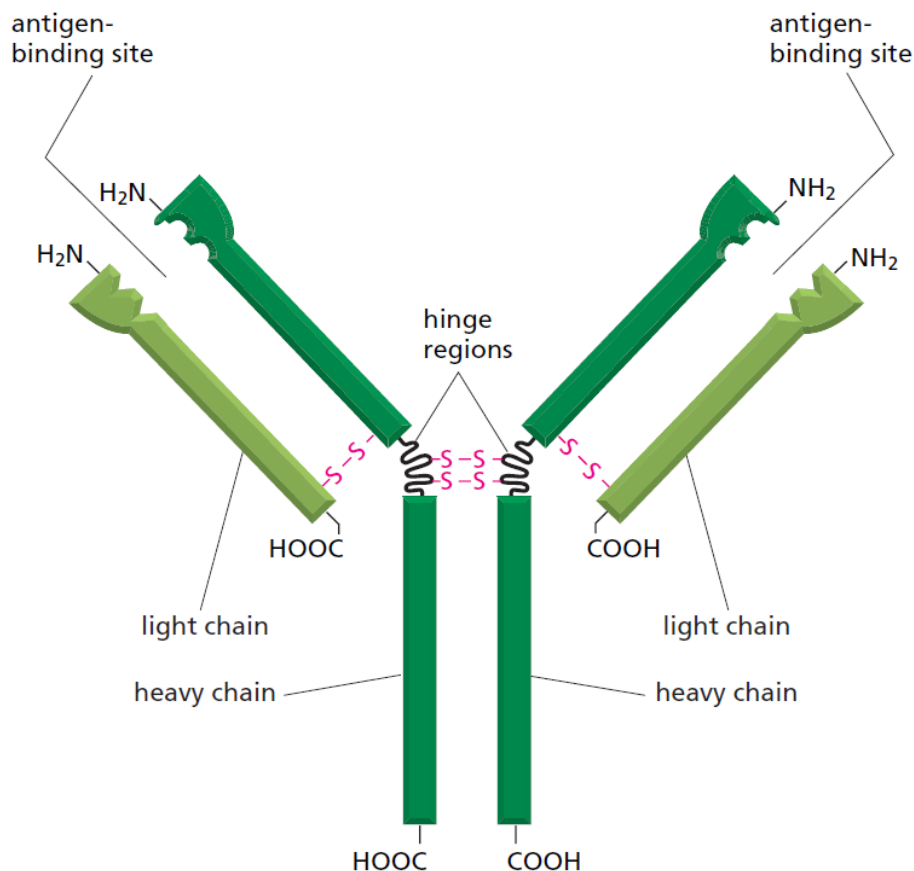
Seerumia fraktioitaessa eli pilkottaessa vasta-aineet asettuvat saostuvaan globuliinifraktioon ja tästä syystä niitä kutsutaan myös immunoglobuliineiksi (Ig). (Seppälä 2003.) Ihmisellä on viisi eri vasta-aine- eli immunoglobuliiniluokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Näillä kaikilla luokilla on sama perusrakenne eli perusyksikkö. Vasta-aineiden perusrakenne on Y-kirjaimen muotoinen molekyyli, jossa on proteiineista muodostuva runko-osa eli "häntä-osa", johon on kiinnittyneenä kaksi hiilihydraateista muodostuvaa identtistä antigeenin sitomisosaa (kuvio 1). Häntäosan ja antigeenin kiinnittymisosan välillä on saranaosa (hinge region), joka on joustava ja siten mahdollistaa antigeenin helpon liikkumis- ja venymiskyvyn. Tätä perusrakennetta kuvataan usein termillä monomeeri. (Alberts ym. 2008; Jokiranta & Seppälä 2011.)



Kuvio 1. Vasta-aineiden perusyksikön rakenne (Alberts ym. 2008).

### 2.3.3 IgG-luokan vasta-aineiden rakenne

Vasta-aineiden alaluokkia on useita, joista tässä työssä keskitytään IgG- alaluokkaan. IgG-vasta-aine on rakenteeltaan monomeeri eli yhdessä IgG-vasta-ainemolekyylissä on yksi vasta-aineiden perusyksikön kaltainen Y-kirjaimen mallinen yksikkö. (Seppälä 2003.) IgG-luokan vasta-ainemolekyylissä on neljä ketjua: kaksi identtistä raskasketjua (heavy chain, H-ketju) sekä kaksi identtistä kevyetketjua (light chain, L-ketju) (kuvio 2). Jokaisella immunoglobuliinilla on oma raskasketju-luokkansa, joka on IgG-vasta-aineella gamma-ketju eli  $\gamma$ -ketju. H-ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa kahdella tai useammalla kovalentilla rikkisillalla sekä muilla ei-kovalenteilla sidoksilla. L-ketjut ovat kiinnittyneet raskasketjuihin yleensä yhdellä rikkisillalla ja epäkovalentein sidoksin. (Alberts ym. 2008; Jokiranta & Seppälä 2011.)



Kuvio 2. IgG-luokan vasta-aineen rakenne (Alberts ym. 2008).

### 2.3.4 IgG-vasta-aineiden toiminta kehossa

IgG-vasta-aineesta on erilaisia alaluokkia, mutta niiden rakenteet ovat niin samankaltaisia, että voidaan käyttää yleisnimitystä IgG. Yli 2/3 ihmisen veren ja kudosten vasta-aineesta eli immunoglobuliinista on IgG-luokan vasta-aineita. IgG – vasta-aineet ovat tehokkaita neutraloimaan toksiineja ja ne pystyvät aktivoimaan komplementin (veren proteiiniyryhmä), saostamaan antigeeneja sekä opsonoimaan bakteereja. Opsonoinnissa IgG-vasta-aineet päällystävät bakteerin, jolloin se on helpompi eliminoida. (Seppälä 2003.) Jotkin IgG-vasta-aineen alaluokat ovat kehon ainoita vasta-aineita, jotka pystyvät läpäisemään istukan ja siten siirtymään äidistä sikiöön. Tämä on mahdollista siksi, että äidin veren kanssa kosketuksissa olevassa istukan osassa on IgG-vasta-aineita sitovia reseptoreita, joiden kautta vasta-aineet siirtyvät sikiöön ja vapautuvat sikiön vereen. Raskauden jälkeen IgG-vasta-aineet siirtyvät äidinmaidon kautta lapseen ja lapsen vatsan kautta verenkiertoon, jossa IgG-vasta-aineet suojaavat lasta infektioilta. (Alberts ym. 2008.)

### 2.4 EIA-menetelmä

EIA-menetelmä eli entsyymi-immunologinen menetelmä (enzyme immunoassay) perustuu entsyymien käyttöön merkkiaineina. Entsyymien katalyyttisten eli reaktiota jouduttavien ominaisuuksien avulla havainnoidaan ja mitataan immunologisia reaktioita. Entsyymi-immunologiset menetelmät ovat paljon käytössä niiden nopeuden ja herkkyuden vuoksi. EIA-menetelmillä mitataan vasta-aineiden tai antigeenien tasoa potilaan seerumissa. Vasta-aine tai antigeeni leimataan entsyymillä ja niiden pitoisuus mitataan entsyymin katalysoiman reaktion reaktiotuotteista. Tätä kutsutaan entsyymiaktiivisuudeksi. (Heikkinen, Moilanen & Virén 2014.)

Reaktiotuotteiden pitoisuus voidaan mitata joko päätepistemittauksena tai kineettisenä mittauksena. Päätepistemittauksessa reaktio on pysäytettävä esimerkiksi pysäytysliuoksella, jotta pystytään mittaamaan reaktiotuotteen eikä käytetyn

substraatin pitoisuutta. Kineettisessä mittauksessa mittauskohteena on reaktion entsyymi-substraattikompleksin muodostumisnopeus. (Heikkinen, Moilanen & Virén 2014.)

Forsgren, Günther, Haglund, Lindquist & Sköldenberg (1997) vertailivat kolmea eri ELISA- menetelmää puutiaisaivokuumeen IgA-, IgM- ja IgG-vasta-aineiden tutkimiseen seerumista ja aivo-selkäydinnesteestä. ELISA-menetelmä on heterogeeninen entsyymi-immunologinen menetelmä, jota käytetään yleisesti kliinissä kemiassa näytteiden tutkimisessa (Halonen 2004). Tutkittavina oli 69 ruotsalaista potilasta, joiden näytteet tutkittiin heti tartunnan tapahduttua ja 11 - 13 kuukautta tartunnan jälkeen. Tutkimustulosten perusteella kaikki menetelmät olivat luotettavia, mutta kiinnitystekniikkamenetelmä oli niistä herkin ja sen tulokset olivat helpoimmin toistettavissa.

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida Tyks-Sapa liikelaitoksen Mikrobiologian ja genetiikan palvelualueen Kliinisen virologian laboratorion käyttöön puutiaisaivokuumeen IgG-luokan vasta-aineiden tutkimiseen käytettävä TBE IgG EIA-kitti ja tehdä tutkimuksen suorittamiseen avuksi työohje. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on helpottaa ja yhtenäistää tulevaisuudessa puutiaisaivokuumeen IgG-luokan vasta-aineiden tutkimista. Kliinisen virologian laboratoriollla on tällä hetkellä puutiaisaivokuumeviruksen IgM- ja IgG-vasta-aineiden tutkimiseen käytössä kahden eri valmistajan kitit. Tämän opinnäytetyön myötä suoritettava IgG-vasta-ainekitin validointi mahdollistaa puutiaisaivokuumeen vasta-aineiden tutkimisen saman valmistajan kiteillä.

Tässä opinnäytetyössä validoidaan puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-ainekitti sekä raportoidaan validoinnin suorittamisen vaiheista ja tuloksesta. Opinnäytetyön sisältö jakautuu seuraaviin osa-alueisiin

- a) Puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-ainekitin validointi
- b) Validointiraportti
- c) Työohje kitillä tehtävän testin suorittamiseen



## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tämän opinnäytetyön tekemiselle haettiin toimeksiantolupa Kliinisen virologian laboratoriolta, josta opinnäytetyön aihe saatiin. Validointi suoritettiin helmikuussa 2015 Kliinisen virologian laboratoriossa tutkimalla potilaiden seerumi- ja likvori-näytteitä sekä käytössä olevalla että testattavalla kitillä ja vertaamalla saatuja tuloksia keskenään (kuvio 3). Lopullinen opinnäytetyö ja sen tuotoksena syntyvä työohje ja validointiraportti julkaistiin keväällä 2015. Tämän opinnäytetyön käytännön osuudessa eli validointinäytteiden analysoinnissa käytettyjen välineiden ja materiaalien hankkiminen aiheutti opinnäytetyötä tarjoavalle organisaatiolle kustannuksia.



Kuvio 3. Validoinnin suorittamisen toimintakaavio (Auramo 2015).

#### 4.1.1 Validointiin käytettyjen näytteiden valinta

Validointi aloitettiin alkuperäiseksi näytteiden kokonaismääräksi tarkoitettulla pienemmällä näytemäärällä (n=31). Validoinnissa käytetyt näytteet olivat puutiaisai-vokuume-epäilyn vuoksi tutkittavaksi lähetettyjä potilasnäytteitä vuosilta 2013 - 2015. Näytteet olivat laadultaan joko seerumia tai likvoria. Nämä ensimmäisen sarjan näytteet oli valikoitu vertailukitillä saatujen tulostensa perusteella jo valmiiksi opinnäytetyön toimeksiantajan puolesta. Opinnäytetyön tekijän ideasta ja halusta johtuen validointia jatkettiin vielä lisänäytteillä (n=29). Toimeksiantaja tuki opinnäytetyön tekijän ideaa, sillä näytemäärän lisääminen teki näyteotoksesta monipuolisemman ja validoinnista saatiin luotettavampi ja laadukkaampi. Opinnäytetyön tekijä valitsi lisänäytteet eli toisen näytesarjan itse. Toisen näytesarjan näytteiksi sopivia näytteitä etsittiin kansioista, joihin oli arkistoitu viimeisen kahden vuoden aikana tutkitut puutiaisai-vokuumeviruksen IgG-vasta-ainenäytteet.

Validoinnissa käytetyn kokonaisnäyteotoksen (n=60) näytteiksi valittiin sekä seerumi- että likvorinäytteitä, jotka oli aiemmin tutkittu tässä validoinnissa vertailtava kittäinä käytettävällä kitillä. Luotettavuuden ja variaation vuoksi valittiin likvorinäytteiksi puutiaisai-vokuumeviruksen IgG-vasta-aineiden kannalta negatiivisia sekä positiivisia näytteitä. Vastaavanlaisesti seeruminäytteiksi valittiin puutiaisai-vokuumeviruksen IgG-vasta-aineiden kannalta negatiivisia, heikosti positiivisia eli raja-arvoisia sekä positiivisia näytteitä.

#### 4.1.2 Näytteiden kerääminen

Opinnäytetyön tekijä keräsi kaikki validoinnissa käytetyt näytteet (n=60) itse. Valituista näytteistä suurin osa oli arkistoitu -20 °C arkistopakastimeen numeroituihin laatikkoihin ja muutamat uudemmat näytteet olivat säilössä pienemmässä, työhuoneessa sijaitsevassa -20 °C pakastimessa. Opinnäytetyön tekijä keräsi näistä pakastimista sekä ensimmäisen näytesarjan näytteet että toisen näytesarjan näytteet. Näytteet kerättiin tarkkaan laadittuun numerojärjestyksen mukaiseen järjestykseen kahteen erilliseen näytetelineeseen kahdessa eri erässä.

Näytteet kerättiin kahteen telineeseen ja kahdessa eri erässä siksi, että ensimmäisen erän analysointi aloitettiin heti validoinnin alussa, mutta toisen erän valikoituminen analysoitavaksi päätettiin vasta myöhemmin.

#### 4.1.3 Näytteiden analysointi

Näytteiden analysointi suoritettiin helmikuussa 2015. Analysoinnin suorittamiselle varattiin oma työpiste ja säilytystilat näytteille ja oma tila käytettäville välineille sekä kitille. Analysoinnissa käytettiin validoitavaa kittiä, 96-kuoppalevyjä, Thermo Fischerin pipettejä sekä Finnpiipetten pipettikärkiä. Analysoinnissa käytettyjä laitteita olivat tasoravisteliija (Wallac 1296-003 Delfia® plateshake), kuoppalevypesuri (Nunc-Immuno™ Wash 8) sekä analysaattori (PerkinElmer Victor<sup>3</sup>™ 1420 Multilabel Counter).

Ennen analysoinnin aloittamista liuotettiin kitin positiivinen kontrolli sekä negatiivinen kontrolli validoidun kitin ohjeiden (liite 2) mukaisesti. Ensin pipetoitiin 1,3ml Dilution Bufferia kumpaankin kontrollipulloon, suljettiin pullot huolellisesti ja sekoitettiin niitä Vortexilla sekä käsin, kunnes kontrolli oli kokonaan liuennut. Tämän jälkeen kontrollit jaettiin 120µl eriin eppendorf-putkiin ja pakastettiin -20 °C tulevaa käyttöä varten. Kitin omien kontrollien lisäksi otettiin jääkaapista toimeksiantajan itse keräämä ja käyttämä tasokontrolli. Tasokontrolli koostuu poolatuista eli keskenään sekoitetuista potilasseeruminäytteistä.

Näytteiden analysointi suoritettiin noudattamalla tarkasti ja koko analysoinnin ajan validoitavan kitin analysointiohjetta (liite 2). Analysointi aloitettiin tekemällä ensimmäisen näytesarjan näytteistä laimennokset 96-kuoppalevyille. Seeruminäytteet laimennettiin Dilution Bufferilla 1:201 ja likvorinäytteet 1:20. Tasokontrollia käsiteltiin kuten seeruminäytteitä tekemällä siitäkin laimennos 1:201. Laimennosten tekemisen jälkeen kitin mukana tulleet näytekuoppauhat eli näytestripit kiinnitettiin strippikehykseen. Näytestripit pestiin kerran kuoppalevypesurilla kitin mukana tulleella, ultrapuhtaaseen veteen 1:1000 liuotetulla Washing Solution-pesunesteellä. Pesun jälkeen laimennetut näytteet pipetoitiin näytestripeille. Kullekkin näytteelle varattiin yksi näytekuoppa ja näytettä pipetoitiin 100µl/kuoppa.

Tämän jälkeen näytteet laitettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön tasoravistelijaan 60 minuutiksi.

Inkubaatioajan jälkeen näytekupat pestiin Washing Solution-pesuliuksella 4 kertaa, jonka jälkeen näytekuppiin pipetoitiin HRP Conjugate-konjugaattia 100µl/kuoppa. Konjugaatti havaitsee näytteissä olevat puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-aineet. Konjugaatin lisäyksen jälkeen näytestrippejä inkuboitiin tasoravistelijassa 60 minuuttia. Tämän jälkeen näytekupat pestiin Washing Solution-pesuliuksella 5 kertaa ja niihin pipetoitiin TMB Substrate-substraattia, joka aiheuttaa värimuutoksen niissä kuopissa, joissa puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-aineita on havaittu. Substraattia sisältäviä kuoppia inkuboitiin pimeässä 30 minuuttia, jonka jälkeen kuoppiin pipetoitiin Stop Solution, joka lopettaa substraatin aiheuttaman värireaktion. Tämän jälkeen näytteet olivat valmiita analysoitaviksi ja ne tuli analysoida 10 minuutin kuluttua Stop Solution-reagenssin lisäämisestä.

Näytteet analysoitiin PelkinElmer Victor<sup>3</sup>™ 1420 Multilabel Counter-analysaattorilla. Analysaattorille ei tarvinnut ajaa kontrolleja tai muutenkaan valmistella sitä käyttöä varten vaan analysaattori oli käyttövalmis aina kun opinnäytetyön tekijä sitä tarvitsi. Strippikehys näytteineen asetettiin analysaattorin mittausalustalle kevyesti mutta tukevasti ja näyteluukun kansi suljettiin. Analysaattori oli kytkettynä tietokoneeseen, jolla sitä ohjattiin. Tietokoneessa oli asennettuna analysaattorin kanssa yhteydessä oleva mittausohjelma, josta valittiin ne näytekupat, jotka haluttiin mitata sekä mittaukseen haluttu absorbanssi. Tässä mittauksessa käytettiin aallonpituutta 450nm, sillä se oli kitin valmistajan ohje. Analysoitavien kuoppien ja halutun aallonpituuden valitsemisen jälkeen analysaattori mittasi näytteiden absorbanssit noin 30 sekunnissa.

#### 4.1.4 Validoinnin tulosten kirjaaminen

Validoinnissa saatuja tuloksia kirjattiin Microsoft Excel-ohjelmalla taulukoihin reaaliaikaisesti sen mukaan, kun tuloksia validoinnin eri vaiheissa saatiin. Ensimmä-

mäisen sarjan näytteistä opinnäytetyön toimeksiantaja oli jo tehnyt taulukon, johon oli listattu näytteiden tunnistetiedot, näytteiden laatu sekä vertailtavalla kitillä näytteistä saadut absorbanssit sekä IgG-tiitterit. Ensimmäisen näytesarjan analysoituaan opinnäytetyön tekijä lisäsi tähän taulukkoon validoitavalla kitillä näytteistä saadut absorbanssi- ja IgG-tiitteritulokset. Opinnäytetyön tekijä lisäsi valitsemansa toisen näytesarjan näytteet samaan taulukkoon eri numerokoodilla. Näistäkin näytteistä taulukkoon merkittiin näytteiden tunnistetiedot, näytteiden laatu, vertailtavalla kitillä saadut absorbanssit ja IgG-tiitterit sekä validoitavalla kitillä saadut absorbanssit ja IgG-tiitterit. Vertailtavalla kitillä analysoitujen näytteiden absorbanssit etsittiin arkistokansioista ja niiden tiitterit laskettiin taulukkoa tehdessä. Näytteiden IgG-tiitterit laskettiin jakamalla näytteen absorbanssi positiivisen kontrollin absorbanssilla ja kertomalla luvulla 100.

Näytteiden sarjojen sisäisen toistettavuuden analysoinnissa saadut tulokset merkittiin omiin taulukoihinsa. Ensimmäisen näytesarjan ja toisen näytesarjan tulokset merkittiin omiin värikoodattuihin taulukoihinsa, jotta taulukot saatiin selkeiksi ja yksinkertaisiksi ja koska ensimmäinen ja toinen näytesarja analysoitiin koko ajan erillisinä sarjoina. Sisäisen toistettavuuden tulokset taulukoitiin niin, että taulukoihin tulivat näytteiden tunnistetiedot sekä näytteen laatu ja myös tieto siitä, oliko kyseinen näyte IgG-vasta-aineiden suhteen negatiivinen, raja-arvoinen vai positiivinen. Taulukoihin merkittiin tieto siitä, minkä kuopan näytteestä on kyse (kuoppa 1, kuoppa 2...). Jokaisen rinnakkaisen näytekuopan tulos merkittiin kahden vierekkäiseen sarakkeeseen, joista toiseen merkittiin mitattu absorbanssi ja toiseen laskettu IgG-tiitteri. Saaduista viidestä rinnakkaisista absorbansseista laskettiin myös keskiarvot, keskihajonta sekä variaatiokertoimet.

Näytteiden sarjojen välisen toistettavuuden analysoinnissa saadut tulokset merkittiin myös omiin taulukoihinsa. Ensimmäisen näytesarjan ja toisen näytesarjan tulokset kirjattiin omiin, sisäisen toistettavuuden taulukoiden kanssa samoin tavoin värikoodattuihin taulukoihinsa, jotta taulukoista näkyi selkeästi, kumman näytesarjan näytteiden tuloksista oli kyse. Taulukoihin merkittiin taas näytteiden tunnistetiedot sekä näytteen laatu ja tieto, oliko näyte IgG-vasta-aineiden suhteen negatiivinen, raja-arvoinen vai positiivinen. Koska sarjojen välinen toistettavuus

mitattiin kolmena erillisenä ajona, taulukkoon merkittiin tulokset aloittaen ensimmäisestä ajosta ja merkiten jokaisesta näytteestä absorbanssi, laskettu IgG-tiiteri sekä kyseessä ollut ajo. Kolmessa ajossa saaduista kolmesta rinnakkaisesta IgG-tiiteristä laskettiin taulukkoon omiin sarakkeisiinsa myös absorbanssien keskiarvot, keskihajonnat sekä variaatiokertoimet.

#### 4.2 Validointiin liittyvät tuotokset

Validoinnin suorittamisesta laaditaan aina validointiraportti. Validointiraportin sisältöön kuuluu työn tavoite, sen toteutus ja tiedot validoinnissa käytetyistä välineistä, laitteista ja muista materiaaleista. Materiaaleista ja välineistä tulisi merkitä tunnistetiedot ja eränumerot tarkasti. Validointiraportista selviää testatun menetelmään toistettavuus ja spesifisyys ja mahdolliset menetelmään vaikuttavat häiriötekijät. Validointiraportin yhteenveto-osuudessa todetaan, täyttikö validoitu menetelmä sille asetetut vaatimukset ja onko menetelmä soveltuva sille aiottuun käyttötarkoitukseen. Validointiraportti arkistoidaan yhdessä validoinnin tulosten kanssa. (Jaarinen & Niiranen 2008; Hemminki ym. 2011.)

Tämän opinnäytetyön tuotoksia ovat validointiin kuuluva validointiraportti sekä puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-ainetestin käyttöä helpottava työohje. Validointiraportti tehtiin toimeksiantajan ohjeiden mukaisesti toimeksiantajalta saatuu mallipohjaan. Raportin alkuun kirjattiin syy validoinnin suorittamiselle, listattiin validoitavan menetelmän eli tässä opinnäytetyössä validoitavan kitin tiedot sekä validoinnissa käytettyjen näytteiden laatu. Raportissa kerrottiin validoinnin toteutuksesta sekä taulukoilla ja sanallisesti tuloksista ja niiden luotettavuudesta.

Työohjeen tehtävä on ohjeistaa ja täsmentää, miten jokin työ suoritetaan ja missä sen voi suorittaa. Työohjetta tarvitaan esimerkiksi kun perehdytetään uusia työntekijöitä tai otetaan käyttöön kokonaan uusi menetelmä tai tutkimus. Hyvällä työohjeella on suuri merkitys sille, että työ suoritetaan laadukkaasti. Työohjeen tekijän tulee työohjetta tehdessään tietää, kuka työohjetta tulee käyttämään, sillä työohje tulisi kirjoittaa kohderyhmälle selkeällä kielellä ja ottaen huomioon ryhmän tietämys asiasta. (Mattila, Ruusunen & Uola 2006; Rissanen 2008.)

Puutiaisaiivokuumevirus IgG-vasta-ainetestin käyttämiseen tehtiin suomenkielinen työohje. Työohje on osa laboratorion laatukäsikirjaa ja se tehtiin laatukäsikirjan ohjeenmukaiseen mallipohjaan. Työohjeeseen kirjattiin suoritettavan testin perustiedot, testin suorittamiseen tarvittavat välineet ja testillä tutkittavien näytteidien käsittelyohjeet. Työohjeesta selviää myös testin menetelmän perustiedot ja sen ominaisuudet. Työohjeen lopussa kerrotaan tulosten raportoinnista ja vastaamisesta sekä niiden oikeaoppisesta säilytyksestä. Opinnäytetyön toimeksiantajan päätöksestä validointiraporttia ja työohjetta ei julkaista opinnäytetyön liitteinä.

#### 4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa eli määrällisessä tutkimuksessa asioita kuvaillaan yleensä numeerisilla arvoilla ja saatuja tuloksia havainnollistetaan usein taulukoilla tai kuviolla. Kvantitatiivisella tutkimuksella voidaan kartoittaa olemassa olevaa tilannetta sekä selvittää asioiden välisiä riippuvuuksia tai mahdollisia muutoksia tutkittavassa ilmiössä. Tutkimuksen aineistoksi tarvitaan melko suuri ja edustava otos. Tästä aineistosta saatuja tuloksia pyritään yleistämään laajempaan joukkoon. Tutkimusaineisto voidaan hankkia muiden tekemistä tilastoista tai rekistereistä tai kerätä itse. (Heikkilä 2008.)

Kvantitatiivisen tutkimuksen tekijä määrittelee itse tutkimusaineistonsa ja sen laajuuden. Tutkimuksen tekijä ei yleensä pysty ottamaan tutkimukseensa kaikkia tiettyä aineistoa edustavia henkilöitä tai näytteitä, joten hänen tulee rajata aineistonsa edustavaksi perusjoukoksi. Määritellystä perusjoukosta tutkija valikoi edustavan otoksen, jota hän käyttää tutkimuksessaan ja tästä otoksesta saatuja tuloksia pyritään yleistämään koskemaan suurempaa joukkoa. Kvantitatiiviseen tutkimukseen kuuluu keskeisenä tutkimuksessa saatujen tulosten vertaaminen aiempiin tai aiempaan tutkimukseen sekä johtopäätösten tekeminen tämän vertailun avulla. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009.)

Toiminnallisessa opinnäytetyössä syntyy aina jokin konkreettinen tuotos. Tuotos voi olla esimerkiksi opas, esite tai kirja. Hyvän tuotoksen kriteereitä ovat esimerkiksi hyödyllisyys ja helppokäyttöisyys. Toiminnallisen opinnäytetyön tekemisessä ja tuotoksen kehittämisessä on mukana useita eri toimijoita eri vaiheissa. Työskentely näiden eri toimijoiden kanssa vaatii paljon vuorovaikutusta, palautteen antoa ja vastaanottoa sekä vertaistukea. (Salonen 2013.)

Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen, sillä aineistona on laaja potilasnäyttemäärä ja saatuja tuloksia yleistetään koskemaan suurempaa joukkoa eli tulevaisuudessa tutkittavia potilasnäytteitä. Opinnäytetyössä tehtävän validoinnin tulokset ovat numeerisia ja niitä vertaillaan tällä hetkellä käytössä olevalla kitillä saatuihin tuloksiin ja havainnollistetaan kuvioilla ja taulukoilla. Validoinnin onnistumisesta ja laadukkuudesta tehdään johtopäätöksiä vertaamalla saatuja tuloksia edelliseen ”tutkimukseen”, eli vertailtavalla kitillä saatuihin tuloksiin ja tekemällä johtopäätöksiä tämän vertailun avulla. Tämä opinnäytetyön on myös toiminnallinen opinnäytetyö, sillä opinnäytetyön tuloksena syntyy kaksi tuotosta. Syntyviä tuotoksia ovat validointiraportti ja työohje.

#### 4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tälle opinnäytetyölle hankittiin tarvittava toimeksiantolupa. Tämän opinnäytetyön aihe on tärkeä, koska tässä tutkimuksessa tehtävä validointi antaa todistetut perusteet käyttää validoitavaa puutiaisaivokuumevirus IgG-vasta-ainekittiä potilasnäytteiden tutkimiseen Kliinisen virologian laboratoriossa. Opinnäytetyöhön kuuluva IgG-vasta-ainetestin työohje on osa laboratorion laatukäsikirjaa ja osaltaan varmistaa menetelmän laadukkaan käytön. Tässä opinnäytetyössä käytettiin potilasnäytteitä validoitavan kitin laadun testaamiseen. Validoinnissa saadut tulokset eivät vaikuta potilaiden hoitoon. Potilasnäytteitä käsiteltiin ja tutkittiin kunnioittaen potilaan yksityisyyttä eikä potilaan tietoja merkitty näkyviin mihinkään validoinnissa saataviin tuloksiin (Bioanalyytikon, laboratoriohitoajan eettiset 2006.)



Opinnäytetyön tekemisessä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Validointia tehdessä noudatettiin huolellisuutta, tarkkuutta ja rehellisyyttä kaikissa validoinnin vaiheissa. Erityistä huolellisuutta ja vastuullisuutta noudatettiin tulosten tallentamisessa ja niiden esittämisessä sekä tutkimuksen ja siinä saatujen tulosten arvioinnissa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.) Tämä opinnäytetyö tehtiin käyttämällä hyväksyttäviä laboratorion menettelytapoja ja opinnäytetyön tekijä vastasi työn laadusta ja luotettavuudesta (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset 2006). Opinnäytetyön tekijä otti koko opinnäytetyön prosessin ajan huomioon opinnäytetyön toimeksiantajan kriteerit ja ehdot. Validointi, siinä saatujen tulosten tarkastelu ja kirjaaminen sekä opinnäytetyön kirjallinen osio tehtiin toimeksiantajan luvalla ja toimeksiantajan toiveita kunnioittaen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

## 5 TUTKIMUSTULOKSET

### 5.1 Tutkimusaineiston kuvaus

Tutkimusaineisto kerättiin vuosina 2013 - 2015 tutkituista potilasnäytteistä toimeksiantajan näytteiden säilyttämiseen tarkoitetuista pakastimista. Tutkimukseen valittiin 60 näytettä. Laadultaan tutkimusnäytteet olivat seeruminäytteitä (n=36) sekä likvorinäytteitä (n=12). Lisäksi näyteaineistoon kuului 12 laaduntarkkailukierrosten (Labquality) näytettä (liite 1). Likvorinäytteiksi valittiin IgG-vasta-aineiden suhteen sekä negatiivisia että positiivisia näytteitä. Seeruminäytteiksi valittiin IgG-vasta-aineiden suhteen negatiivisia, raja-arvoisia sekä positiivisia näytteitä. (kuviot 4-6).

### 5.2 Tulosten taulukointi

Koko validoinnin suorittamisen ajan saatuja tuloksia kirjattiin Excel-tilukoihin, joihin merkittiin näytteen tunnistet, saatu absorbanssi sekä siitä laskettu IgG-tiiteri. Ensimmäistä 31 näytettä käsiteltiin termillä ensimmäinen näytesarja ja jälkimmäisiä 29 näytettä termillä toinen näytesarja. Sarjojen välistä toistettavuutta tutkittiin molempien näytesarjojen näytteillä. Sekä ensimmäisen että toisen näytesarjan ensimmäiset tulokset merkittiin samaan suurempaan taulukkoon numerolla koodattuina, jotta tiedettiin mitkä näytteet olivat ensimmäistä ja mitkä toista näytesarjaa. Ensimmäisen sarjan näytteet merkittiin numerolla 1 ja toisen näytesarjan näytteet numerolla 2. Ensimmäisten tulosten mittauksissa saadut poikkeavat tulokset kirjattiin taulukkoon huom-sarakkeeseen (liite 1). Sekä ensimmäisen että toisen näytesarjan näytteistä valittiin muutama edustava näyte sarjan sisäisen toistettavuuden sekä sarjojen välisen toistettavuuden mittaamiseen. Toistettavuusmittausten tulokset on esitetty kahdessa eri taulukossa (kuvio 7 ja kuvio 8). Samoin toimittiin toisen näytesarjan kanssa. Sarjojen sisäisen toistettavuuden sekä sarjojen välisen toistettavuuden taulukoihin merkittiin saadut absorbanssit

sekä niiden keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokerroin. Kirjaamisen jälkeen tulokset annettiin toimeksiantajan edustajan tarkastettavaksi ja yhdessä pohdittiin mahdollisten poikkeavien tulosten syitä.

### 5.3 IgG-kvalitatiiviset tulokset

Validoinnissa saatuja tuloksia verrattiin vertailukitillä saatuihin tuloksiin. Tutkittavina näytteinä oli vertailukitillä saatujen tulosten perusteella IgG-vasta-aineiden suhteen negatiivisia, heikosti positiivisia eli raja-arvoisia sekä positiivisia näytteitä. Näytteen luokiteltiin em. luokkiin vertailukitin ohjeiden mukaisesti. Kittien antamia tuloksia vertailtaessa näytteet jaettiin laadun mukaan likvorinäytteisiin (n=12), seeruminäytteisiin (n=36) sekä laaduntarkkailukierrosten näytteisiin (n=12). Validoitavalla kitillä saadut IgG-tulokset jaettiin positiivisiin, raja-arvoisiin ja negatiivisiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Validoitavalla kitillä tutkittiin IgG-arvoiltaan negatiivisia, raja-arvoisia sekä positiivisia seeruminäytteitä. Saatujen tulosten lukumäärät laskettiin yhteen ja niitä verrattiin vertailukitillä saatujen tulosten lukumääriin ja tulokset taulukoitiin vertailutaulukkoon (taulukko 1).

Taulukko 1. Seeruminäytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015).

|               |  | Validoitava kitti |     |           |     |           |
|---------------|--|-------------------|-----|-----------|-----|-----------|
| Vertailukitti |  | Seerumi           | neg | raja-arvo | pos | Yhteensä  |
| neg           |  |                   | 12  |           |     | 12        |
| raja-arvo     |  |                   | 1   |           |     | 1         |
| pos           |  |                   | 4   | 7         | 12  | 23        |
| Yhteensä      |  |                   | 17  | 7         | 12  | <b>36</b> |

Seeruminäytteiden lisäksi tutkittiin IgG-arvoiltaan negatiivisia sekä positiivisia likvori-näytteitä validoitavalla kitillä (taulukko 2). Valmistaja ei ole validoinut TBE IgG EIA-kittiä likvorinäytteiden tutkimiseen, mutta likvorinäytteet otettiin silti vertailtaviksi, koska validoitavalla kitillä tullaan tutkimaan myös potilaiden likvorinäytteitä.

Taulukko 2. Likvorinäytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015).

|               |           | Validoi-<br>tava kitti |     |           |     |           |
|---------------|-----------|------------------------|-----|-----------|-----|-----------|
|               |           | Likvori                | neg | raja-arvo | pos | Yhteensä  |
| Vertailukitti | neg       |                        | 5   |           |     | 5         |
|               | raja-arvo |                        |     |           |     | 0         |
|               | pos       |                        | 5   | 1         | 1   | 7         |
|               | Yhteensä  |                        | 10  | 1         | 1   | <b>12</b> |

Validointiin valitut laaduntarkkailukierrosten näytteet taulukoitiin ja vertailtiin erikseen muista seeruminäytteistä, sillä ne eivät olleet potilasnäytteitä (taulukko 3). Laaduntarkkailukierrosten näytteistä myös tiedettiin, mikä niiden tuloksen tulisi olla toisin kuin potilasnäytteistä. Laaduntarkkailukierrosten näytteiden ”oikeat” tulokset on esitetty validoitavalla kitillä saatujen tulosten kanssa samassa taulukossa (liite 1).

Taulukko 3. Laaduntarkkailukierrosten näytteiden kvalitatiiviset tulokset (Auramo 2015).

|               |               | Validoi-<br>tava kitti |           |     |               |
|---------------|---------------|------------------------|-----------|-----|---------------|
|               | LV            | neg                    | raja-arvo | pos | Yh-<br>teensä |
| Vertailukitti | neg           | 4                      |           |     | 4             |
|               | raja-arvo     |                        |           |     | 0             |
|               | pos           | 2                      | 1         | 5   | 8             |
|               | Yh-<br>teensä | 6                      | 1         | 5   | <b>12</b>     |

#### 5.4 Sarjan sisäinen toistettavuus

Sarjan sisäisessä toistettavuudessa jokaista näytettä pipetoitiin viisi rinnakkaiskuoppaa eli rinnakkaisnäytettä, jotta sisäisen toistettavuuden otos olisi tarpeeksi kattava. Näin saatiin myös monta rinnakkaista tulosta, joita vertailla keskenään. Jokaisen rinnakkaiskuopan absorbanssi-tulokset kirjattiin taulukkoon niin, että ensimmäiselle ja toiselle näytesarjalle tehtiin omat taulukkonsa (taulukot 4-5). Molempiin taulukoihin laskettiin absorbanssien keskiarvo (AVG), keskihajonta (STD) sekä variaatiokerroin ( $CV \% = STD/AVG \times 100$ ). Saatuja tuloksia vertailtiin myös näiden lukujen avulla.

Taulukko 4. Sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset, näytesarja 1 (Auramo 2015).

|    |            | 1 kuoppa | 2 kuoppa | 3 kuoppa | 4 kuoppa | 5 kuoppa |       |       |      |
|----|------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|------|
| ID | näytelaatu | IgG abs  | IgG abs  | IgG abs  | IgG abs  | IgG abs  | AVG   | STD   | CV%  |
| 2  | likvori    | 0,050    | 0,053    | 0,054    | 0,052    | 0,056    | 0,053 | 0,002 | 4 %  |
| 6  | likvori    | 0,614    | 0,701    | 0,748    | 0,759    | 0,764    | 0,717 | 0,063 | 9 %  |
| 20 | seerumi    | 0,075    | 0,072    | 0,076    | 0,071    | 0,072    | 0,073 | 0,002 | 3 %  |
| 26 | seerumi    | 0,528    | 0,528    | 0,438    | 0,552    | 0,581    | 0,525 | 0,054 | 10 % |
| 28 | seerumi    | 3,021    | 3,002    | 2,903    | 3,011    | 3,172    | 3,022 | 0,096 | 3 %  |

Taulukko 5. Sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset, näytesarja 2 (Auramo 2015).

| ID | näytelaatu | IgG abs | IgG abs | IgG abs | IgG abs | IgG abs | AVG   | STD   | CV% |
|----|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|-----|
| 33 | likvori    | 0,046   | 0,047   | 0,046   | 0,040   | 0,041   | 0,044 | 0,003 | 7 % |
| 52 | likvori    | 0,415   | 0,364   | 0,376   | 0,359   | 0,325   | 0,368 | 0,032 | 9 % |
| 49 | seerumi    | 0,135   | 0,131   | 0,118   | 0,135   | 0,123   | 0,128 | 0,008 | 6 % |
| 54 | seerumi    | 0,481   | 0,480   | 0,483   | 0,474   | 0,450   | 0,474 | 0,014 | 3 % |
| 44 | seerumi    | 2,524   | 2,594   | 2,720   | 2,497   | 2,619   | 2,591 | 0,088 | 3 % |

## 5.5 Sarjojen välinen toistettavuus

Sarjojen välistä toistettavuutta mitattaessa jokainen näyte ajettiin kolme kertaa erillisinä ajoina ja toistettavuudessa otettiin huomioon myös sarjojen sisäisessä toistettavuudessa saadut arvot sekä alkuajossa saatu arvo. Sarjojen välisen toistettavuuden tulokset merkittiin kuitenkin omaan taulukkoonsa niin, että taulukossa olivat vain sarjojen välistä toistettavuutta mitanneen kolmen erillisajon tulokset eikä toistettavuus- tai alkuajon tuloksia. Ensimmäisen näytesarjan (taulukko 6) ja toisen näytesarjan (taulukko 7) tulokset taulukoitiin omiin taulukoihinsa.

Taulukko 6. Sarjojen välinen toistettavuus, näytesarja 1 (Auramo 2015).

|    |            | 1 ajo   | 2 ajo   | 3 ajo   |       |       |      |
|----|------------|---------|---------|---------|-------|-------|------|
| ID | näytelaatu | IgG abs | IgG abs | IgG abs | AVG   | STD   | CV%  |
| 2  | likvori    | 0,049   | 0,050   | 0,043   | 0,047 | 0,004 | 8 %  |
| 6  | likvori    | 3,117   | 0,829   | 0,794   | 1,580 | 1,331 | 84 % |
| 20 | seerumi    | 0,081   | 0,076   | 0,064   | 0,074 | 0,009 | 12 % |
| 26 | seerumi    | 0,823   | 0,509   | 0,511   | 0,614 | 0,181 | 29 % |
| 28 | seerumi    | 3,668   | 2,966   | 2,150   | 2,928 | 0,760 | 26 % |

Taulukko 7. Sarjojen välinen toistettavuus, näytesarja 2 (Auramo 2015).

|    |            | 1. ajo  | 2. ajo  | 3. ajo  |       |       |     |
|----|------------|---------|---------|---------|-------|-------|-----|
| ID | näytelaatu | IgG abs | IgG abs | IgG abs | AVG   | STD   | CV% |
| 33 | likvori    | 0,048   | 0,049   | 0,048   | 0,048 | 0,001 | 1 % |
| 52 | likvori    | 0,512   | 0,583   | 0,578   | 0,558 | 0,040 | 7 % |
| 49 | seerumi    | 0,124   | 0,127   | 0,127   | 0,126 | 0,002 | 1 % |
| 54 | seerumi    | 0,542   | 0,532   | 0,562   | 0,545 | 0,015 | 3 % |
| 44 | seerumi    | 2,962   | 3,137   | 2,961   | 3,020 | 0,101 | 3 % |

## 6 TULOSTEN TARKASTELU

IgG-kvalitatiiviset tulokset olivat pääasiassa vertailtavia ja yhteneviä. Taulukoitujen tulosten perusteella voidaan todeta, että validoitavan kitin täsmävyys on hyvä. Laaduntarkkailukierrosten näytteet antoivat molemmilla kiteillä toisiinsa täsmäviä tuloksia. Kaksi tulosta oli poikkeavia niin, että vertailukitti antoi positiivisen tuloksen, mutta validoitava negatiivisen. Molemmat näytteet ajettiin uudelleen. Uudelleenajolla saatiin toisesta näytteestä luotettava ja vertailukitillä saadun tuloksen kanssa yhtenevä tulos, mutta toinen jäi edelleen poikkeavaksi. Kitien välisten tulosvertailujen lisäksi tämä yksi näyte ei antanut toivottua tulosta vertailtaessa tiedettyihin Labqualityn antamiin näytteiden ”oikeisiin” tuloksiin vaan se näytti negatiivista vaikka tuloksen tulisi olla positiivinen. Tuloksen poikkeavuus voidaan mahdollisesti selittää sillä, että näyte oli vielä hieman jäässä, kun se pipetoitiin tutkittaviksi, jolloin näytettä pipetoitiin liian vähäinen määrä tai jään aiheuttama sakka vaikeutti absorbanssin mittaamista.

Likvorinäytteiden määrästä jopa puolet antoi validoitavalla kitillä negatiivisen tuloksen ja vertailtavalla kitillä positiivisen. Validoitavaa kittiä ei ole valmistajan mukaan validoitu likvorinäytteiden tutkimiseen, joten tulosten luotettavuutta ei täysin voida taata. Likvorinäytteet ovat myös voineet kärsiä pitkästä säilytyksestä pakastimessa ja siten niiden IgG-vasta-ainepitoisuus on voinut muuttua. Tulosten erilaisuus ei luultavasti vaikuttaisi potilaan diagnoosiin, sillä Kliinisen virologian laboratoriossa likvorinäytteistä tutkitaan aina myös IgM-vasta-aineet, joiden positiivisuuden/negatiivisuuden perusteella diagnoosi voidaan tehdä.

Seeruminäytteet olivat eniten keskenään vertailukelpoisia ja niiden täsmävyys onkin kitin täsmävyuden toteamisen kannalta tärkein, sillä kitti on valmistajan mukaan validoitu juuri seeruminäytteiden tutkimiseen. Suurin osa kittien antamien tulosten välisistä poikkeavuuksista oli se, että vertailukitti antoi IgG-vasta-aineiden kannalta positiivisen tuloksen ja validoitava kitti raja-arvo-tuloksen. Potilaan saamaan diagnoosiin tämä tulosten poikkeavuus ei vaikuta, sillä raja-arvojenkin tulos tulkitaan niin, että potilaalla on veressään IgG-vasta-aineita. Raja-



arvotuloksen saaneelta potilaalta voidaan ottaa myös toinen vertailunäyte hie-  
man myöhemmin ja tutkia myös IgM-vasta-ainetaso.

Sarjan sisäisen toistettavuuden mittausten tulokset olivat kaikin puolin täsmääviä,  
toistettavia ja luotettavia. Jokaisen näytteen viisi rinnakkaista tulosta olivat kes-  
kenään vertailukelpoisia ja lähellä toisiaan. Kun saatuja absorbansseja vertaa  
niistä laskettuun keskiarvoon, niin jokainen tulos on lähellä keskiarvoa. Näyttei-  
den keskihajontakin on todella pientä. Variaatiokertoimen suuruus ei saisi ylittää  
10 %. Sisäisen toistettavuuden mittauksissa vain yksi variaatiokerroin oli suuruu-  
deltaan tasan 10 % ja muut kertoimet jäivät reilusti tämän luvun alle. Saatujen  
tulosten ja variaatiokertoimien avulla voidaan todeta, että validoitavan kitin sarjan  
sisäinen toistettavuus on hyvä ja luotettava.

Sarjojen välisen toistettavuuden mittausten tuloksissa oli hieman enemmän vaih-  
televuutta. Toisen näytesarjan sarjojen välisen toistettavuuden tulokset olivat  
keskenään vastaavia ja tasaisia. Kaikki absorbanssit olivat lähellä toisiaan ja kes-  
kiarvoa ja keskihajontakin oli pientä. Kaikki lasketut variaatiokertoimet jäivät rei-  
lusti alle 10 %. Ensimmäisen näytesarjan sarjojen välisen toistettavuuden tulok-  
set eivät olleet niin selkeästi vertailukelpoisia keskenään ja niiden välillä oli suurta  
hajontaa. Negatiivinen likvorinäyte antoi ensimmäisessä ajossa valtavan suuren  
tuloksen, jonka perusteella näyte olisikin ollut vasta-aineiden suhteen positiivi-  
nen. Seuraavassa kahdessa ajossa tulos laski huomattavasti ja kaksi viimeistä  
tulosta ovat keskenään vertailukelpoisia ja luotettavia. Ensimmäisen tuloksen  
suuruus voidaan selittää sillä, että näyte ei olisi ollut huoneenlämpöinen sitä pi-  
petoitaessa tai että pipetoitaessa on sattunut jokin virhe. Ensimmäisen tuloksen  
epätavallinen suuruus selittää variaatiokertoimen suuruuden (83 %) ja kahta  
muuta tulosta tarkasteltaessa voidaan todeta, että toistettavuus on hyvä.

Muissakin näytteissä ensimmäinen ajo antoi paljon suurempia tuloksia kuin seu-  
raavat kaksi ja tämä vaikuttaa kaikkien tulosten variaatiokertoimen suuruuteen.  
Tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, että ensimmäisen ajon kohdalla on ta-  
pahtunut jokin pipetointivirhe tai näytteet eivät ole vielä olleet huoneenlämpöisiä.  
Vaikka ensimmäisen näytesarjan sarjojen välisen toistettavuuden tuloksissa on  
eroavaisuuksia ja variaatiokertoimet ovat hieman suuria, niin validoitavan kitin

sarjojen välisen toistettavuuden voidaan silti todeta olevan hyvä. Tämä voidaan todeta sillä perusteella, että toisen näytesarjan tulokset ovat erittäin toistettavia ja luotettavia ja että ensimmäisen näytesarjan ensimmäisessä ajossa on tapahtunut virheitä, jotka vaikuttavat tuloksiin.

Tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, että validoitava kitti on täsmäävä ja luotettava. Mahdollisesti mittausten suorittaminen tuoreilla näytteillä olisi voinut antaa vielä luotettavampia tuloksia, mutta tutkittavien näytteiden säilytys ja käsittely oli tehty kaikin tavoin oikein, joten suurta eroa tuloksissa ei varmastikaan olisi tullut. Suuremman näytemäärän ajaminen tai useampien rinnakkaisten mittausten tekeminen ei olisi vaikuttanut tulosten luotettavuuteen vaan ehkä jopa lisännyt vaihtelevien tuloksien määrää ja siten hankaloittanut tulosten tulkintaa.

## 7 POHDINNAT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida Kliinisen virologian laboratorion käyttöön puutiaisaivokuumeen IgG-luokan vasta-aineiden tutkimiseen käytettävä kitti ja tehdä tutkimuksen suorittamisen avuksi työohje. Tutkimustehtävä tuli tehtyä ja sen tuloksena voidaan todeta, että validoitu kitti on toimiva ja laadukas ja se voidaan ottaa käyttöön. Validoinnin suorittaminen sujui todella hyvin ja tulokset olivat vastaavia vertailukitin tuloksien kanssa.

Jonkin menetelmän tai asian validiteetti kertoo siitä, miten hyvin kyseinen asia tai menetelmä mittaa juuri sitä ominaisuutta, jonka mittaamiseen se on tarkoitettu (Tilastokeskus). Tutkimustulosten luotettavuutta tarkasteltaessa voidaan todeta, että validointi ja siinä saadut tulokset ovat päteviä eli valideja. Tutkimuksen validiteettia eli pätevyyttä tukevat useat asiat. Validointi suoritettiin laadukkailla välineillä ja uudella avaamattomalla kitillä. Näytteiden tutkiminen suoritettiin tarkkaan kitin tutkimisohjeita noudattaen ja käyttäen vain kitin omia reagensseja ja näytestrippejä. Sarjojen sisäistä toistettavuutta tarkasteltaessa jokaisesta näytteestä tehtiin viisi rinnakkaista näytettä eli jokaiselle näytteelle pipetoitiin viisi rinnakkaista kuoppaa, jolloin jokaiselle näytteelle saatiin viisi keskenään verrattavaa tulosta. Tämä selkeästi tukee tutkimuksen pätevyyttä ja luotettavuutta.

Sarjojen välistä toistettavuutta tarkasteltaessa jokainen näyte ajettiin erillisinä sarjoina kolme kertaa, joiden lisäksi tarkasteluun otettiin myös sarjojen sisäisen vertailun ajo sekä näytteiden ensimmäinen ajo. Vertailuun otettiin siis jokaisesta näytteestä viisi erillisinä ajoina saatua tulosta, joka tukee tulosten luotettavuutta erittäin hyvin. Koko validointiprosessin ajan tehtiin pohdintoja ja havaintoja erilliseen vihkoon. Poikkeavista tuloksista tai muista ongelmakohtista ja niiden ratkaisusta keskusteltiin yhdessä toimeksiantajan edustajan kanssa. Opinnäytetyön tekijä arvioi ja tarkasteli saatuja tuloksia ja kirjasi ne selkeisiin taulukoihin. Kaikki tulokset annettiin toimeksiantajan edustajan tarkastettaviksi ja hyväksyttäväksi.

Tutkimustuloksen luotettavuuteen saattaa vaikuttaa muutama asia. Validoinnissa käytetyt näytteet olivat 1 - 2 vuotta vanhoja ja pakastimessa pitkän aikaa olleita näytteitä. Vaikka näytteiden pakastamisen ei pitäisi vaikuttaa näytteiden laatuun, on mahdollista, etteivät ne enää ole niin laadukkaita kuin tuoreet näytteet, joten ne saattavat antaa erilaisia tuloksia kuin aikaisemmin. Validoinnin ensimmäisessä ajossa saatuja tuloksia verrattiin nykyään käytössä olevan kitin tuloksiin, joita opinnäytetyön tekijä ei ollut itse tutkinut vaan tulokset oli saatu silloin, kun kukin näyte oli toimeksiantajalle tutkittavaksi tullut. Olisi siis voinut olla luotettavampaa, että validoinnin suorittaja olisi tutkinut itse kaikki näytteet sekä alkupe-  
räisellä että uudella kitillä.

Tämän opinnäytetyön tuloksia tukevat myös aikaisemmat samansuuntaiset tutkimustulokset. Puutiaisaivokuumeetartuntaa epäiltäessä vasta-aineiden tutkiminen on tehokas ja ennusteen kannalta olennainen toimenpide. (ks. Holzmann & Kaiser) Validoidun kitin testimenetelmä on entsyymi-immunologinen EIA-menetelmä, joka perustuu kiinnitystekniikkaan. Tämä menetelmä on nopea, täsmävä ja herkkä keino puutiaisaivokuumeviruksen tutkimiseen ja hyvin toistettava (ks. Forsgren, Günther, Haglund, Lindquist & Sköldenberg 1997).

Akkreditointi on jonkin asian toteamista päteväksi. Se perustuu kansainvälisiin kriteereihin. Akkreditoinnilla todetaan toimielimen ja sen antamien todistusten antamisen olevan luotettavaa ja pätevää. Akkreditointia voi hakea itse määrittämälleen osa-alueelle ja sen hakeminen on vapaaehtoista. (Finas.) Opinnäytetyön aiheeseen liittyviä jatkotutkimusaiheita voisi olla validoitavan kitin tutkiminen suuremmalla näytemäärällä. Tämä voisi mahdollistaa kitin akkreditoinnin. Suurempi näytemäärä voisi akkreditoinnin hakemisen lisäksi antaa vielä enemmän luotettavuutta kitin laadukkuudelle. Tutkimusta voisi myös jatkaa testaamalla kittiä tuoreilla potilasnäytteillä ja verrata tuoreiden näytteiden antamia tuloksia pakastimessa säilytettyjen näytteiden antamiin tuloksiin.

## LÄHTEET

Aberle, J.H.; Chmelik, V.; Heinz, F.X.; Karrer, U.; Stiasny, K. 2012. Quantitative determination of IgM antibodies reduces the pitfalls in the serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*. Vol 54, 115-120.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Fifth Edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Andreassen, Å.; Bjørland, M.; Dudman, S.; Kanestrøm, A.; Larsen, A.; Soleng, A.; Vene, S. 2014. Detection of specific IgG antibodies in blood donors and tick-borne encephalitis virus in ticks within a non-endemic area in southeast Norway. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Vol 46, no 3, 181-184. Viitattu 12.1.2015. <http://informa-healthcare.com/doi/abs/10.3109/00365548.2013.865140>

Bisen, P.S.; Depnath, M.; Prasad, G.B.K.S. 2010. *Molecular diagnostics: Promises and possibilities*. New York: Springer.

Carson, P.A.; Dent, N.J. 1990. *Good laboratory and clinical practices*. Oxford: Heinemann Professional Publishing Ltd.

Crowther, J.R. 2009. *The ELISA guidebook*. Second edition. New York: Humana press.

Engel, A. 2010. *Verification, validation, and testing of engineered systems*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Finas. Mitä on akkreditointi?. Viitattu 14.5.2015. <http://www.finas.fi/page.aspx?pageID=25&contentID=141>

Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S.; Vaara, M. (toim.) 2011, *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Hedman, K.; Heikkinen, T.; Huovinen, P.; Järvinen, A.; Meri, S.; Vaara, M. (toim.) 2010. *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

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

Heikkinen, S.; Moilanen, L.; Virén, A. 2014. *Immunokemialliset menetelmän kliinisen kemian analytiikassa*. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Kuopio: Savonian ammattikorkeakoulu. Viitattu 16.5.2015. <http://www.theseus.fi/handle/10024/82689>

Hemminki, S.; Hiltunen, E.; Hägg, M.; Järvenpää, E.; Kärhä, P.; Linko, L.; Saarinen, P.; Simonsen, S. (toim.) 2011. *Laadukkaan mittaamisen perusteet*. Vantaa: Multiprint Oy.

Hirsjärvi, S.; Remes, P.; Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. 15., uudistettu painos. Hämeenlinna: Kariston kirjapaino Oy.

Holzmann, H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. Vol 21, 36-40.

Holzmann, H.; Kaiser, R. 2000. Laboratory Findings in Tick-Borne Encephalitis - Correlation with Clinical Outcome. *Infection*. Vol 28, no 2, 78-84. Viitattu 18.5.2015. <http://search.proquest.com.ezproxy.turkuamk.fi/docview/17815237/abstract?source=fedsrch&accountid=11365>

Howley, P. M.; Knipe, D. M. 2007. *Fields, virology*. Fifth edition, volume one. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Huovinen, P.; Meri, S.; Peltola, H.; Vaara, M.; Vaheeri, A.; Valtonen, V. (toim.) 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Jaarinen, S.; Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Jääskeläinen, A. 2011. Detection and molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus infections. Helsinki University Biomedical Dissertations. No. 154.
- Kainulainen, K. (toim.); Nohynek, H.; Pekkanen, E.; Turtiainen, P. 2007. Matkailijan terveysopas 2007. 12., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Mattila, H.; Ruusunen, T.; Uola, K. 2006. Viestinnän työkaluja AMK-opiskelijalle. Helsinki: WSOY.
- Mäkelä, K. 2013. Puutiaisaivotulehdus oletettua vakavampaa lapsille. Yle uutiset terveys. Viitattu 02.02.2015. [http://yle.fi/uutiset/puutiaisaivotulehdus\\_oletettua\\_vakavampaa\\_lapsille/6569774](http://yle.fi/uutiset/puutiaisaivotulehdus_oletettua_vakavampaa_lapsille/6569774)
- Nykopp, J. 2014. Kesän huolet: Borrelioosi ja puutiaisaivokuume. Potilaan lääkärilehti uutiset. 28.05.2014. Viitattu 01.12.2014. <http://www.potilaanlaakarilehti.fi/uutiset/kesan-huolet-borrelioosi-ja-puutiaisaivokuume/#.VHxZoMnUizr>
- Penttilä, T. (toim.) 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Rissanen, R. 2008. Laatutavoitteista johdetun työohjeen arviointimittarin ja rakennemallin kehittäminen ruokapalvelujen tuotannonohjausjärjestelmään, hyvä työohje – tehokas työ – laadukas tuote. Viitattu 16.5.2015. <http://www.uasjournal.fi/index.php/osaaja/thesis/view/15>
- Salonen, K. 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Tampere: Juvenes Print Oy.
- Schönberg, K. 2014. Puutiaisaivokuume lisääntyi huomattavasti Etelä-Karjalassa. Yle Uutiset 25.09.2014. Viitattu 01.12.2014. [http://yle.fi/uutiset/puutiaisaivokuume\\_lisaantyi\\_huomattavasti\\_etela-karjalassa/7489099](http://yle.fi/uutiset/puutiaisaivokuume_lisaantyi_huomattavasti_etela-karjalassa/7489099)
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006. Bioanalytiikan, laboratoriohitoijan eettiset ohjeet. Viitattu 12.1.2015. [http://www.bioanalytikkoliitto.fi/haku/?E\\*Q=eettiset+ohjeet](http://www.bioanalytikkoliitto.fi/haku/?E*Q=eettiset+ohjeet)
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. Pitäisikö TBE-rokotusohjelmaa laajentaa? Puutiaisaivokuumerokotustyöryhmän raportti. Työpaperi 44/2013.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2013. Puutiaisaivotulehdus. Viitattu 12.11.2014. <http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/puutiaisaivotulehdus>
- Tilastokeskus. Käsitteet ja määritelmät. Validiteetti. Viitattu 14.5.2015. <http://www.stat.fi/meta/kas/validiteetti.html>
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Viitattu 16.5.2015. [http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)
- Van Emon, J.M. (toim.) 2007. Immunoassay and other bioanalytical techniques. Lontoo: CRC Press.

# Validoinnissa käytettyjen näytteiden tulostaulukko

| Opinnäytetyö Jenni Auramo                                     |    |            |               |            |           |            |          |             |           |           |            |       |             |
|---|----|------------|---------------|------------|-----------|------------|----------|-------------|-----------|-----------|------------|-------|-------------|
| PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUS, VASTA-AINEET (TBEAbG, IgG EIA)        |    |            |               |            |           |            |          |             |           |           |            |       |             |
| TBE-kitin verifiointi   |    |            |               |            |           |            |          |             |           |           |            |       |             |
| IgG kuva = Vertailukitin työohjeen mukaan kuvaajalta katsottu |    |            |               |            |           |            |          |             |           |           |            |       |             |
| sarja 1 = 1, sarja 2 = 2                                      |    |            | Vertailukitti |            |           |            |          | Validoitava |           |           |            |       | Vertailtava |
| sarja   | ID | näytelaatu | IgG abs       | ajopvm     | pos kontr | kval tulos | IgG kuva | IgG abs     | ajopvm    | pos kontr | kval tulos | kval  |             |
| 2   | 58 | seerumi    | 0,337         | 27.5.204   | 1,153     | raja-arvo  | 20       | 0,401       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 54 | seerumi    | 0,464         | 15.7.2014  | 0,811     | pos        | 50       | 0,575       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 60 | seerumi    | 1,592         | 18.3.2014  | 0,943     | pos        | >100     | 2,548       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 37 | seerumi    | 0,468         | 23.12.2014 | 1,009     | pos        | 40       | 0,602       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 40 | seerumi    | 0,944         | 7.10.2014  | 1,103     | pos        | 90       | 0,733       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 45 | seerumi    | 1,329         | 7.10.2014  | 1,103     | pos        | >100     | 0,361       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 42 | seerumi    | 0,992         | 9.9.2014   | 1,106     | pos        | 90       | 0,547       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 55 | seerumi    | 0,570         | 17.6.2014  | 1,138     | pos        | 40       | 0,521       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 57 | seerumi    | 0,720         | 27.5.204   | 1,153     | pos        | 65       | 0,369       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 56 | seerumi    | 0,867         | 3.6.2014   | 1,208     | pos        | 70       | 0,436       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 59 | seerumi    | 0,624         | 22.4.2014  | 1,295     | pos        | 45       | 0,291       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 38 | seerumi    | 0,636         | 27.1.2015  | 1,370     | pos        | 40       | 0,450       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 41 | seerumi    | 1,234         | 27.1.2015  | 1,383     | pos        | 90       | 0,947       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 44 | seerumi    | 2,750         | 27.1.2015  | 1,383     | pos        | >100     | 2,724       | 17.2.2015 | 2,183     | pos        | ok    |             |
| 2   | 43 | seerumi    | 2,780         | 9.12.2014  | 1,383     | pos        | >100     | 0,103       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 39 | seerumi    | 1,309         | 11.11.2014 | 1,539     | pos        | 80       | 0,238       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 26 | seerumi    | 0,623         | 19.8.2014  | 0,944     | pos        | 60       | 1,147       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 31 | seerumi    | 1,092         | 3.7.2014   | 0,976     | pos        | >100     | 0,560       | 3.2.2015  | 2,504     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 1   | 29 | seerumi    | 1,130         | 7.10.2014  | 1,103     | pos        | >100     | 0,779       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 24 | seerumi    | 0,722         | 27.1.2015  | 1,127     | pos        | 60       | 0,404       | 3.2.2015  | 2,504     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 1   | 30 | seerumi    | 2,329         | 2.9.2014   | 1,131     | pos        | >100     | 1,952       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 27 | seerumi    | 2,891         | 27.1.2015  | 1,370     | pos        | >100     | 3,710       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 28 | seerumi    | 2,783         | 27.1.2015  | 1,370     | pos        | >100     | 3,790       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 25 | seerumi    | 0,854         | 8.12.2014  | 1,383     | pos        | 55       | 0,288       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 51 | seerumi    | 0,119         | 16.9.2014  | 0,938     | neg        | <10      | 0,113       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 50 | seerumi    | 0,103         | 9.9.2014   | 1,106     | neg        | <10      | 0,169       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 49 | seerumi    | 0,114         | 9.9.2014   | 1,106     | neg        | <10      | 0,116       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 48 | seerumi    | 0,142         | 2.9.2014   | 1,131     | neg        | <10      | 0,147       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 46 | seerumi    | 0,107         | 2.9.2014   | 1,131     | neg        | <10      | 0,174       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 47 | seerumi    | 0,109         | 2.9.2014   | 1,131     | neg        | <10      | 0,185       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 36 | seerumi    | 0,074         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <10      | 0,278       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 1   | 21 | seerumi    | 0,113         | 7.10.2014  | 1,103     | neg        | <10      | 0,390       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 22 | seerumi    | 0,108         | 2.9.2014   | 1,131     | neg        | <10      | 0,209       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 19 | seerumi    | 0,116         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <10      | 0,116       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 20 | seerumi    | 0,091         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <10      | 0,080       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 23 | seerumi    | 0,233         | 10.6.2014  | 1,423     | neg        | <10      | 0,134       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
|   |    |            |               |            | neg       |            | 12       |             |           | neg       |            | 17    |             |
|   |    |            |               |            | raja-arvo |            | 1        |             |           | raja-arvo |            | 7     |             |
|   |    |            |               |            | pos       |            | 23       |             |           | pos       |            | 12    |             |
|   |    |            |               |            | yht       |            | 36       |             |           | yht       |            | 36    |             |
| 1   | 7  | LV         | 2,770         | 27.1.2015  | 1,127     | pos        | >100     | 3,900       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 8  | LV         | 0,266         | 27.1.2015  | 1,127     | neg        | <10      | 0,188       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 16 | LV         | 0,096         | 25.2.2014  | 1,259     | neg        | <10      | 0,074       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 12 | LV         | 0,158         | 26.8.2014  | 1,418     | neg        | <10      | 0,159       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 15 | LV         | 0,152         | 13.5.2014  | 1,433     | neg        | <10      | 0,199       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 9  | LV         | 2,241         | 18.11.2014 | 1,127     | pos        | >100     | 1,580       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 17 | LV         | 1,649         | 25.2.2014  | 1,259     | pos        | >100     | 2,044       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 18 | LV         | 1,513         | 25.2.2014  | 1,259     | pos        | >100     | 2,675       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 10 | LV         | 0,749         | 26.8.2014  | 1,418     | pos        | 50       | 0,180       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 11 | LV         | 1,094         | 26.8.2014  | 1,418     | pos        | 80       | 0,563       | 3.2.2015  | 2,504     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 1   | 13 | LV         | 0,691         | 13.5.2014  | 1,433     | pos        | 40       | 0,373       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 14 | LV         | 2,348         | 13.5.2014  | 1,433     | pos        | >100     | 3,811       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
|   |    |            |               |            | neg       |            | 4        |             |           | neg       |            | 6     |             |
|   |    |            |               |            | raja-arvo |            | 0        |             |           | raja-arvo |            | 1     |             |
|   |    |            |               |            | pos       |            | 8        |             |           | pos       |            | 5     |             |
|   |    |            |               |            | yht       |            | 12       |             |           | yht       |            | 12    |             |
| 2   | 52 | likvori    | 1,845         | 21.10.2014 | 1,100     | pos        | >10      | 0,466       | 17.2.2015 | 2,183     | raja-arvo  | Huom! |             |
| 2   | 34 | likvori    | 0,644         | 27.1.2015  | 1,127     | pos        | 5        | 0,070       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 35 | likvori    | 0,658         | 5.8.2014   | 1,271     | pos        | 5        | 0,158       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 5  | likvori    | 1,122         | 7.10.2014  | 1,103     | pos        | >10      | 0,313       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 3  | likvori    | 0,500         | 7.1.2015   | 1,127     | pos        | 4        | 0,055       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 1   | 6  | likvori    | 1,885         | 2.9.2014   | 1,131     | pos        | >10      | 0,899       | 3.2.2015  | 2,504     | pos        | ok    |             |
| 1   | 4  | likvori    | 0,629         | 30.7.2014  | 1,157     | pos        | 5        | 0,184       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | Huom! |             |
| 2   | 53 | likvori    | 0,199         | 27.1.2015  | 1,127     | neg        | <1       | 0,066       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 32 | likvori    | 0,175         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <1       | 0,064       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 2   | 33 | likvori    | 0,092         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <1       | 0,046       | 17.2.2015 | 2,183     | neg        | ok    |             |
| 1   | 1  | likvori    | 0,081         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <1       | 0,047       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
| 1   | 2  | likvori    | 0,082         | 27.1.2015  | 1,370     | neg        | <1       | 0,044       | 3.2.2015  | 2,504     | neg        | ok    |             |
|   |    |            |               |            | neg       |            | 5        |             |           | neg       |            | 10    |             |
|   |    |            |               |            | raja-arvo |            | 0        |             |           | raja-arvo |            | 1     |             |
|   |    |            |               |            | pos       |            | 7        |             |           | pos       |            | 1     |             |
|   |    |            |               |            | yht       |            | 12       |             |           | yht       |            | 12    |             |

## Kitin työohje

