



SAVONIA

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

IMMUNOKEMIAALLISET MENE- TELMÄT KLIINISEN KEMIAN ANALYTIIKASSA

Oppimateriaali bioanalyttikko-opiskelijoille

TEKIJÄT: Sini Heikkinen
Laura Moilanen
Annika Virén

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Sini Heikkinen, Laura Moilanen ja Annika Virén	
Työn nimi Immunokemialliset menetelmät kliinisen kemian analytiikassa	
Päiväys 26.11.2014	Sivumäärä/Liitteet 58/1
Ohjaaja(t) Sanna Kolehmainen	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia ammattikorkeakoulu	
Tiivistelmä <p>Immunokemiallisia menetelmiä käytetään laajalti kliinisen kemian analytiikassa proteiinien, hormonien, lääke- ja huumaussaineiden sekä nukleinihappojen määrittämiseen potilasnäytteistä. Määrittämissä hyödynnetään vasta-aineiden ja antigeenien välisiä immunologisia reaktioita. Immunokemialliset menetelmät perustuvat pääasiassa antigeenien tai vasta-aineiden leimaamiseen jollain mitattavissa olevalla merkkiaineella, jolloin puhutaan leimamenetelmistä. Lisäksi on olemassa menetelmiä, joissa immunokompleksit havaitaan suoraan näytteestä ja joista käytetään nimitystä agglutinaatio- ja saostusmenetelmät. Immunokemialliset määrittämenetelmät ovat sensitiivisiä, spesifisiä, kustannustehokkaita ja helppokäyttöisiä ja ne tuottavat tuloksia nopeasti.</p> <p>Immunokemiallisten menetelmien perusteet sisältyvät bioanalytiikan koulutusohjelman kliinisen kemian opintoihin. Opinnäytetyö tehtiin kehittämistyönä Savonia ammattikorkeakoululle ja sen tarkoituksena oli tuottaa bioanalytiikan opiskelijoille oppimateriaaliksi posterit, jotka sisältävät ydinasiat kliinisen kemian analytiikassa käytettävistä immunokemiallisista menetelmistä. Kehittämistyön tavoite on tukea bioanalytiikan kliinisen kemian opintoja ja edistää ammatillista tietämystä yhdestä bioanalytiikan erikoisosaamisalueesta. Posterit olivat esillä Laboratoriolääketiede ja näyttely 2014 – tapahtumassa Helsingissä. Posterit sijoitetaan Savonia AMK:n harjoitusluokkatilaan.</p> <p>Opinnäytetyössä perehdytään tutkimustiedon ja kirjallisuuden avulla immunologisten reaktioiden hyödyntämiseen kliinisen kemian analytiikassa ja immunokemiallisten menetelmien periaatteisiin ja sovelluksiin. Lisäksi opinnäytetyössä perehdytään immunokemiallisiin vieritesteihin, sekä käydään läpi immunokemiallisiin menetelmiin liittyviä virhelähteitä ja tulevaisuuden näkymiä immunokemiallisten määrittämenetelmien saralla.</p>	
Avainsanat kliininen kemia, immunokemiallinen menetelmä, antigeeni, vasta-aine, saostusmenetelmä, agglutinaatiomenetelmä, leimamenetelmä, vieritesti	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Sini Heikkinen, Laura Moilanen & Annika Virén			
Title of Thesis Immunochemical assays in the analytics of clinical chemistry			
Date	26.11.2014	Pages/Appendices	58/1
Supervisor(s) Sanna Kolehmainen			
Client Organisation /Partners Savonia university of applied sciences			
<p>Abstract</p> <p>Immunochemical assays are widely used in clinical laboratories to determine/analyse proteins, hormones, therapeutic drugs and drugs-of-abuse and nucleic acids in patient samples. The immunochemical assays are based on the immunological reactions between antigens and antibodies. Principally, the determination is based on labeling the antigen or antibody. In addition, there are assays that rely on the detection of the immunocomplex via agglutination and precipitation reactions. Immunochemical assays are sensitive, spesific, cost efficient and easy to use and they produce results fast.</p> <p>In the degree of biomedical laboratory science the basics of immunochemistry are included in the studies of clinical chemistry. This functional thesis was sponsored by Savonia University of Applied Sciences. The purpose of the thesis was to produce educational material in the form of a poster for the students. The poster summarizes the main information about the immunochemical assays. The objective of the thesis was to support the studies of clinical chemistry and to advance the knowledge in one particular field of the biomedical laboratory science. The poster was displayed in Laboratoriolääketiede ja näyttely 2014 -exhibition in Helsinki and it will be positioned in the educational facilities of Savonia UAS.</p> <p>The thesis focuses on how to utilize the immunochemical reactions in the assays of clinical chemistry and on the main principles and applications of the immunochemical assays on the basis of research studies and literature. Furthermore, the thesis includes aspects of immunochemical point-of-care testing, the causes of analytical errors in assays and the future of immunochemical assay development.</p>			
<p>Keywords clinical chemistry, immunochemical assay, antigen, antibody, precipitin test, agglutination assay, labeled immuno-assay, point-of-care testing</p>			

Keskeiset käsitteet

Affiniteetti	Kahden rakenteen välinen sidosvoima. Affiniteetiksi sanotaan esimerkiksi antigeenisen epitoopin (tai haptenin) ja vasta-aineen sitomiskohdan välistä sidosvoimaa.
Agglutinaatio	Saostusreaktio, jossa on mukana mikropartikkeleita tai soluja, joilla on pinta-antigeneja.
Analyytti	Kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti määritettävä yhdiste, esim. proteiini, hormoni, lääkeaine tai nukleiinihappo.
Antigeeni	Voi olla elimistössä normaalisti esiintyvä tai ulkopuolinen molekyyli. Antigeenista käytetään lyhennettä Ag.
Antiseerumi	Seerumi, joka sisältää monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita.
Aviditeetti	Vasta-aineiden ja kohderakenteiden välinen nettosidosvoima eli kokonaisaffiniteetti.
Cross-linking/silloittuminen	Saostusreaktiossa kompleksien välille muodostuu verkkomainen rakenne, jota kutsutaan silloittumiseksi
Dipoli	Polaarisesti varautunut molekyyli. Molekyylin toinen pää on negatiivisesti ja toinen positiivisesti varautunut.
Epitooppi	Antigeenin rakenteessa oleva kohta, johon vasta-aine sitoutuu.
Hapteni	Pieni molekyyli, joka voi toimia antigeeninä sitoutuessaan johonkin suurempaan kantajamolekyyliin.
Immunokompleksi	Molekyyli, joka muodostuu vasta-aineen ja antigeenin sitoutuessa toisiinsa.
Konjugaatti	Immunologiassa antigeeni tai vasta-aine, johon on kiinnitetty merkkiaine.
Ligandi	Yhdiste, jonka avulla voidaan linkittää molekyyliä toisiinsa. Immunokemissa ligandeja käytetään esimerkiksi vasta-aineiden kiinteään faasiin sitomisessa ja merkkiaineen päällystyksen.

Merkkiaine/ leima	Yhdiste, jonka avulla määritettävä vasta-aine tai antigeeni havaitaan näytteestä.
Mikropartikkeli	Pieni hiukkanen jota käytetään apuaineena immunokemiallisissa määrityksissä mm. määritettävien kompleksien erottamiseen muista reaktiokomponenteista tai agglutinaation muodostuksessa.
Ristireaktio	Vasta-aine reagoi määritettävän antigeenin sijasta jonkin muun molekyylin kanssa.
Sensitiivisyys/herkkyys	Menetelmän kyky havaita pitoisuuden muutoksen aiheuttama vaste mitasignaalisissa. Mitä herkempi menetelmä, sitä pienemmät pitoisuuserot se havaitsee näytteiden välillä.
Spesifisyys	Menetelmän kyky mitata vain tarkoitettua yhdistettä.
Vasta-aine	Molekyyli, joka tunnistaa ja sitoutuu tiettyyn antigeeniin muodostaen immunokompleksin. Vasta-aineesta käytetään myös lyhennystä Ab (antibody).

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	8
2. IMMUNIPUOLUSTUKSEN REAKTIOT MENETELMIEN TAUSTALLA	10
2.1. Immunipuolustuksen mekanismit elimistössä	10
2.2. Vasta-aineet immunokemiallisissa menetelmissä	11
2.3. Vasta-aineiden ja antigeenien väliset sitoutumisreaktiot	12
3. IMMUNOLOGISTEN REAKTIOIDEN HYÖDYNTÄMINEN KLIINISEN KEMIAN ANALYTIKASSA ...	15
3.1. Kilpailevan sitoutumisen tekniikka	15
3.2. Kaksoisvasta-ainetekniikka	16
3.3. Hetero- ja homogeeniset menetelmät	17
4. IMMUNOKEMIALLISTEN MENETELMIEN SOVELLUKSET	18
4.1. Leimamenetelmät	18
4.1.1. Radioaktiivisia isotooppeja käyttävät leimamenetelmät	19
4.1.2. Fluoresenssiin ja kemiluminesenssiin perustuvat leimamenetelmät	21
4.1.3. Entsyymiaktiivisuuteen perustuvat leimamenetelmät EIA (enzyme immunoassay)	25
4.2. Immunokompleksien agglutinaatio- ja saostusmenetelmät	29
4.2.1. Nefelometriset menetelmät	30
4.2.2. Turbidometriset menetelmät	31
4.3. Immunokemialliset menetelmät Puijon sairaalan kliinisen kemian laboratoriossa	32
4.4. Immunokemialliset vieritestit	32
4.4.1. Menetelmät immunokemiallisissa vieritesteissä	33
4.4.2. Yleisimpiä immunokemiallisia vieritestisovelluksia	34
4.4.3. Vieritestien käytettävyys ja luotettavuus	35
4.5. Immunokemiallisissa määryksissä esiintyvät virhelähteet	36
4.6. Tulevaisuuden näkymät immunokemiallisten menetelmien sovelluksissa	37
5. KEHITTÄMISTYÖ OPINNÄYTETYÖNÄ	39
5.1. Kehittämistyön prosessi	39
5.2. Kehittämistyön tavoitteet ja tarkoitus	40
5.3. Kehittämistyön ideointi ja suunnittelu	40
5.3.1. Hyvän posterin ominaisuuksia	41
5.3.2. Posterin soveltuminen oppimateriaaliksi	42

5.4. Kehittämistyön toteuttaminen	43
5.4.1. Aineiston hankinta ja kehittämistyön teoriaosuuden kokoaminen	43
5.4.2. Posterin toteuttaminen ja arviointi	44
6. POHDINTA	46
6.1. Opinnäytetyön eettisyys	46
6.2. Lähdekritiikki ja luotettavuus	47
6.3. Työprosessin ja oman oppimisen arviointi	47
7. LÄHTEET	50
LIITE 1: POSTERI	58

1. JOHDANTO

Immunoanalyysi on yleistermi menetelmälle, joka perustuu elimistön immuunipuolustukseen kuuluvien vasta-aineiden ja antigeenien välisen vuorovaikutuksen havaitsemiseen. Kliinisen kemian analytiikassa immunoanalyyseistä käytetään suomenkielisessä kirjallisuudessa yleisesti nimitystä immunokemiallinen analyysi. Immunokemiallisissa analyyseissä reaktiot perustuvat vieraiden molekyylien eli antigeenien spesifiseen tunnistamiseen vasta-aineiden avulla. (Rosner, Grassman & Haas 1991; Meri 2011, 12-14.)

Immunokemiallisia menetelmiä käytetään lääketieteellisissä laboratoriosovelluksissa proteiinien, hormonien, lääkeaineiden ja nukleiinihappojen määrittämiin. Menetelmät ovat laajalti kliinisessä käytössä niiden tehokkuuden ja sopivuuden vuoksi. Osalle kliinisesti merkittävillä proteiini- tai peptidihydriesteille, kuten hormonit, syöpämerkkiaineet ja patogeenit, ei välttämättä ole muita vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä tai immunokemiallisia menetelmiä ovat verraten nopeita, yksinkertaisia ja edullisia suorittaa. Immunokemiallisten määrittäysten etuna on se, että ne ovat spesifisiä ja analyysiin verrattuna samankaltaisten molekyylien läsnäolo näytteessä ei yleensä häiritse määrittäystä. (Gosling 1990; Wu 2006; Stenman & Hämäläinen 2010.)

Analyysimenetelmät perustuvat pääasiassa antigeenien tai vasta-aineiden leimaamiseen jollain mitattavissa olevalla merkkiaineella. Vanhimpia leimausmenetelmiä ovat radioisotooppien käyttö, mutta nykyään paremman työturvallisuuden vuoksi on siirrytty enemmän fluoresenssia ja kemiluminesenssia hyödyntäviin leimaustekniikoihin sekä entsyymileimoihin. Lisäksi on olemassa menetelmiä, joissa immunokompleksit havaitaan suoraan näytteestä eikä niissä tarvitse käyttää merkkiaineita. (Halonen 2004b, 90–100; Gosling 1990.) Immunokemialliset menetelmät ovat mahdollistaneet myös herkempien ja kvantitatiivisten vieritestien kehittämisen ja viime aikoina immunokemiallisten vieritestien määrä onkin noussut nopeasti (von Lode 2005).

Tässä opinnäytetyössä perehdytään kliinisen kemian analytiikassa käytettäviin immunokemiallisiin menetelmiin tutkimustiedon ja kirjallisuuden avulla. Opinnäytetyötä suunniteltaessa tehtiin lisäksi opintokäynti Puijon sairaalan ISLAB:n kliinisen kemian laboratorioon lisätietojen saamiseksi. Menetelmien periaatteiden lisäksi käsittelemme myös menetelmien olennaisimpia virhelähteitä sekä työturvallisuusnäkökulmia. Tämä opinnäytetyö tehtiin kehittämistyönä Savonia-ammattikorkeakoululle ja se koostuu raportista ja tuotoksesta. Opinnäytetyön tarkoituksena on tuottaa oppimateriaalia Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opiskelijoille posterin muodossa. Työn tavoite on tukea bioanalytiikan kliinisen kemian opintoja ja edistää ammatillista tietämystä yhdestä bioanalytiikan erikoisosaamisalueesta.

Immunokemiallisten menetelmien perusteet sisältyvät kliinisen kemian opintojaksoon bioanalytiikan koulutusohjelmassa. Opinnäytetyön tekijät ideoivat opinnäytetyön aiheen itse. Aihe on tarpeellinen koska sen avulla voidaan edistää ammatillista tietämystä ja erikoisosaamista. Opinnäytetyössä pe-

rehdytään vielä opintojaksosisältöjä tarkemmin immunokemiallisiin analyysimenetelmiin. Aiheen valintaan vaikutti myös tekijöiden oma kiinnostus aihetta kohtaan. Kyseiset menetelmät ovat laajalti kliinisessä käytössä, joten niiden tarkempi tunteminen on hyödyksi opiskelijoille.

2. IMMUNIPUOLUSTUKSEN REAKTIOT MENETELMIEN TAUSTALLA

Immuneetti on yksi elimistön monimutkaisimmista systeemeistä. Kun vierasaine eli antigeeni pääsee elimistöön, se aiheuttaa joukon tapahtumia solu- ja molekyyllitasolla. Jotta voitaisiin ymmärtää pääperiaatteet immunologisista reaktioista laboratorioanalyysien taustalla, on hyvä tutustua immunologiaan yleisellä tasolla, sillä immunokemialliset analyysit perustuvat antigeenien ja vasta-aineiden väliseen reaktioon. (Josko 2012.)

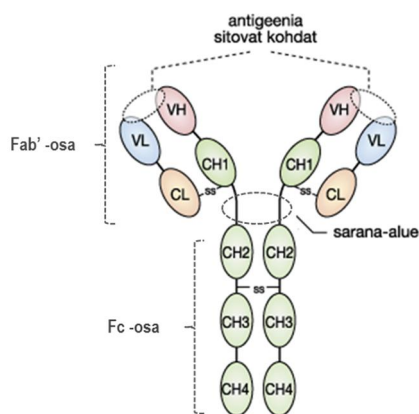
Nopeiden ja tarkkojen tulosten saaminen edistää potilaan hyvää hoitoa, minkä vuoksi laboratorio-määrityksissä suositaan uusinta teknologiaa, joka tuottaa tutkimustuloksia nopeasti. Immunokemialliset määritykset ovat hyvä valinta nopeiden ja tarkkojen tulosten saamiseksi sillä ne ovat sensitiivisiä ja spesifisiä, kustannustehokkaita ja helppokäyttöisiä menetelmiä. (Josko 2012.) Kliinisen kemian menetelmissä sensitiivisyys eli herkkyys tarkoittaa menetelmän kykyä havaita pitoisuuden muutoksen aiheuttama vaste mittasignaalisissa. Mitä herkempi menetelmä, sitä pienemmät pitoisuuserot se havaitsee näytteiden välillä. Spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä mitata vain tarkoitettua yhdistettä. (Linko ym. 2009.)

2.1. Immuunipuolustuksen mekanismit elimistössä

Immunologia tarkoittaa oppia elimistöä infektioilta suojaavista puolustusjärjestelmistä. Nämä järjestelmät jakautuvat luontaiseen eli synnynnäiseen immuneettiin ja adaptiiviseen eli opittuun immuneettiin. (Meri 2011, 12-14.) Luontainen ja opittu immuunijärjestelmä toimivat yhteistyössä ja niiden puolustusjärjestelmät jaetaan edelleen soluvälitteiseen ja vasta-ainevälitteiseen immuneettiin sen mukaan, miten immuneetti levittäytyy elimistön eri osiin ja mitkä molekyylit immuunipuolustuksesta vastaavat (Arstila 2011; Jokiranta & Seppälä 2011). Soluvälitteisessä immuneetissa elimistön puolustuksesta vastaavat mm. luonnolliset tappajasolut (Natural killer-solut), makrofagit ja T-lymfosyytit (Arstila 2011). Vasta-ainevälitteisessä immuneetissa taudinaiheuttajia vastaan käydään vasta-aineiden eli immunoglobuliinien avulla, jotka kulkeutuvat elimistössä solunulkoisten nestetilojen välityksellä (Jokiranta & Seppälä 2011).

Immuunijärjestelmän puolustusmekanismit perustuvat vieraiden molekyylien eli antigeenien tunnistamiseen (Meri 2011, 12-14). Luontaiselle immuneetille on ominaista, että reaktiot tapahtuvat nopeasti, toistuvat samanlaisina ja antigeenien spesifinen tunnistus on hyvin rajallista. Opiteissa immuneetissa antigeenien tunnistus sen sijaan on hienovaraisempaa ja tarkempaa ja saman antigeenin uudelleenkohtaaminen aiheuttaa huomattavasti voimakkaamman ja nopeamman immuunivasteen kuin ensimmäisellä kerralla, eli muodostuu hankittu immuneetti tiettyä taudinaiheuttajaa vastaan. Opiteissa immuneetissa tunnistaminen perustuu antigeenissa olevien rakenteiden spesifiseen tunnistamiseen vasta-aineiden avulla. (Meri 2011, 12-14.) Immunologiseksi reaktioksi kutsutaan antigeenin ja vasta-aineen välistä sitoutumisreaktiota (Solunetti 2006).

Vasta-ainevälitteinen immunitetti on perustana immunologisten reaktioiden hyödyntämiseen analytiikassa. Vasta-ainevälitteisessä immuunireaktiossa elimistö pyrkii estämään infektioita ja tuhoamaan mikrobeja tuottamalla vasta-aineita elimistön puolustukseksi. (Jokiranta & Seppälä 2011, 102.) Vasta-aine on molekyyli, joka omaa tietyllä antigeenille stereokemiallisesti komplementaarisen rakenteen. Kyseinen molekyyli tunnistaa ja sitoutuu antigeeniin avain - lukko -periaatteella, jolloin muodostuu immunokompleksi. (Solunetti 2006.) Vasta-aineet tunnistavat antigeenin sen rakenteessa olevan tunnistusosan, eli epitopin perusteella. Eri luokkiin kuuluvilla vasta-aineilla on erilainen sitoutumispaikka antigeenille, joten vasta-ainemolekyylit tarttuvat erilaisiin epitoppeihin. Yleensä vasta-aineet sitoutuvat voimakkaasti vain yhteen epitoppiin, toisin sanoen vasta-aineilla on spesifisyys tietyllä epitopille. Elimistön vasta-aineet ovat immunoglobuliineiksi kutsuttuja proteiineja. Vasta-aineita tuottavat siihen erikoistuneet B-lymfosyytit, jotka kypsyvät luuytimessä. Immunoglobuliinien (Ig) pääluokkia on viisi (IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM). Vasta-aineen perusyksikkö on Y-kirjaimen muotoinen. Yksittäisestä perusyksiköstä koostuvia vasta-aineita kutsutaan monomeereiksi (IgG, IgD, IgE). Osa vasta-aineista esiintyy myös useamman perusyksikön sisältävinä rakenteina, jolloin puhutaan dimeereistä (2 perusyksikköä, IgA) ja pentameereistä (5 perusyksikköä, IgM). Kuvassa 1 on esitetty kaavakuva perusyksikön rakenteesta. (Solunetti 2006; Jokiranta & Seppälä 2011, 101, 106, 109-110.)



Kuva 1. Vasta-aineen perusyksikkö on rakenteeltaan Y-kirjaimen muotoinen (Jokiranta & Seppälä 2011, muokattu).

Antigeeni voi olla elimistöön normaalisti kuuluva tai ulkopuolinen molekyyli (Halonen 2004a, 90). Useimmiten antigeenit ovat kokonaisia mikrobeja tai niiden osia tai tuotteita ja ne käynnistävät elimistön puolustusjärjestelmän eli aiheuttavat immuunireaktion (Karhumäki, Jonsson & Saros 2009, 43, Meri 2011, 14). Elimistön omat antigeenit eivät yleensä aiheuta vasta-aineiden muodostumista elimistössä (Halonen 2004a, 90).

2.2. Vasta-aineet immunokemiallisissa menetelmissä

Immunokemiallisissa menetelmissä vasta-aineina käytetään yleensä immunoglobuliineja, sillä niillä on hyvä saatavuus, ne ovat stabiileja ja niiden kehittäminen on helppoa. Immunoglobuliineja pysty-

tään muodostamaan kaikenlaisia ei-toksisia antigeeneja vastaan, sekä myös heikosti tai ei ollenkaan antigeenisia yhdisteitä (käytetään nimitystä haptenei) vastaan liittämällä heikko antigeeni tai haptenei kantajaproteiiniin. (Gosling 1990.) Haptenei on pieni molekyyli, joka voi toimia antigeeninä sitoutuessaan johonkin suurempaan kantajamolekyyliin (Meri 2011, 13).

Vasta-aineita kykenevät tuottamaan selkärangaiset eläimet, mutta eivät sitä alkeellisemmat eliöt (Jokiranta & Seppälä 2011, 101). Kun eläin immunisoidaan yhdisteellä, sen immuunijärjestelmä alkaa tuottaa monenlaisia vasta-aineita ja ne, jotka reagoivat antigeeneihin, lisääntyvät eläimen elimistössä. Toimivia vasta-aineita voi olla useita ja niissä on erilaisia spesifisiä antigeenin sitomiskojoja. Tätä seosta kutsutaan polyklonaaliseksi vasta-aineeksi, mikä tarkoittaa, että vasta-aineet ovat peräisin useista erilaisista B-lymfosyyteistä. Monoklonaalinen vasta-aine tarkoittaa puolestaan sitä, että monistetaan yhdenlaista B-lymfosyyttiä, jolloin tuotetussa vasta-aineessa on vain yksi spesifinen sitomiskojo antigeenille. (Halonen 2004a, 90.)

Kliinisen kemian analytiikassa on alun perin käytetty pelkästään polyklonaalisia vasta-aineita, mutta laboratoriomenetelmien kehittyessä monoklonaaliset vasta-aineet ovat alkaneet yleistyä yhä enenevässä määrin. Polyklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen käytetään pääasiassa kaneja, lampaita ja vuohia. Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan soluviljelmissä muun muassa hiiren kasvainsolulla. Polyklonaalisten vasta-aineiden sijaan voidaan käyttää myös erilaisten monoklonaalisten vasta-aineiden yhdistelmiä. (Wu 2006; Gosling 1990.) Monoklonaalisilla vasta-aineyhdistelmillä saadaan aikaiseksi spesifisempi immuunireaktio kuin polyklonaalisilla, mutta niiden tuottaminen on kalliimpaa (Lidde 2005, 161).

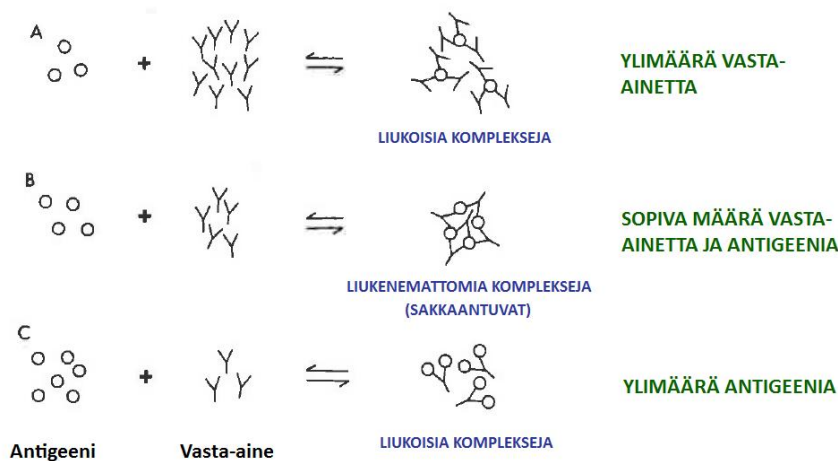
Vasta-aineita voidaan joutua myös muokkaamaan, jotta ne sopisivat paremmin analyyseissä käytettäviksi. Immunoglobuliinimolekyylin Fc -osa on usein tarpeeton, ja se voi aiheuttaa jopa häiriötä analyyseissä, jos se sitoutuu seerumissa olevaan komplementtiin tai reumafaktoriin. Näin ollen joissakin analyyseissä on käytetty pelkästään immunoglobuliinin Fab' -osia. (Gosling 1990.)

2.3. Vasta-aineiden ja antigeenien väliset sitoutumisreaktiot

Vasta-aineen ja antigeenin välisillä sitoutumismekanismeilla on merkittävä rooli, kun immuunireaktiota pyritään soveltamaan analyttisiin tarkoituksiin. Vasta-aineen ja antigeenin sitoutuminen perustuu kolmenlaiseen vuorovaikutukseen molekyylien välillä; Van der Waals-London dipoli-dipoli vuorovaikutus, hydrofobinen vuorovaikutus ja Coloumbin sidokset. Van der Waals-London dipoli-dipoli vuorovaikutus on elektrostaattinen ilmiö, joka muodostuu kahden dipolin välille. Dipoli on polaarisesti varautunut molekyyli, jonka toisessa päässä on negatiivinen ja toisessa positiivinen osavaraus (Mortimer 2001, 79). Vuorovaikutus vaikuttaa lyhyillä etäisyyksillä (4-6 nm) ja on merkittävä suurten molekyylien kohdalla. Hydrofobinen vuorovaikutus on olemassa olevaa sidosta vahvistava tai vakauttava voima, joka esiintyy vesiliuoksessa hydrofobisten molekyylien välillä. Coloumbin sidos muodostuu molekyylien varautuneiden ryhmien välille. Yleensä kyseessä ovat COO- ja NH₄⁺ -ryhmät. (Kricka, Phil & Path 1999, 207.)

Antigeenin ja vasta-aineen sitoutuminen on tasapainoreaktio ja se tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa reaktio on nopea ja käsittää yksittäisten Ag-Ab sidosten muodostumisen (kompleksit ovat liukoisia). Toisessa vaiheessa alkaa muodostua komplekseja, jotka sisältävät useamman kuin kaksi molekyyliä. Kompleksit jatkavat kasvuaan ja kolmannessa vaiheessa ne ovat saavuttaneet koon, jossa saostuminen alkaa. Reaktion nopeus riippuu pääasiassa liuoksen elektrolyyttipitoisuudesta, mutta myös pH, lämpötila ja antigeenin ja vasta-aineen affiniteetti vaikuttavat. (Kricka ym. 1999, 208.) Affiniteetilla tarkoitetaan antigeenisen epitopin ja vasta-aineen sitomiskohdan välistä sidosvoimaa. Vasta-aineiden kokonaisaffiniteetista eli nettosidosvoimasta käytetään nimitystä aviditeetti. Vahvempi sidosvoima tarkoittaa, että muodostuvat kompleksit ovat pysyvämpiä. (Meri 2011, 13.)

Immunokemiallisissa määrityksissä hyödynnettäviä antigeenin ja vasta-aineen välisiä reaktiotyyppejä ovat saostusreaktio ja kiinteän ja nestemäisen aineen rajapinnassa (solid-liquid interface) tapahtuva reaktio (Kricka ym. 1999, 208-209). Saostusreaktiossa kompleksien välille muodostuu verkkomainen rakenne, jota kutsutaan silloittumiseksi (cross-linking). Saostusreaktio on riippuvainen antigeenin ja vasta-aineen määrästä ja otollisinta on, että antigeenin ja vasta-aineen määrät ovat lähellä toisiaan (kuva 2). Tällöin todennäköisyys silloittumiseen on suurempi ja muodostuvat kompleksit ovat isompia ja saadaan aikaiseksi maksimaalinen saostuminen, jolloin myös sitoutumattoman vasta-aineen ja antigeenin määrät ovat vähäiset. Jos vasta-ainetta on runsaasti verrattuna antigeenin määrään, vasta-aineet sitoutuvat nopeasti antigeenin pintaan ja silloittumista ei ehdi tapahtua. Näin ollen muodostuu vain pieniä liukoisia komplekseja. Vastaava tapahtuu myös antigeenin määrän ollessa runsas ja vasta-aineen vähäinen. Saostusreaktioissa apuna voidaan käyttää polymeerejä sillä polymeerin lisääminen reaktioseokseen edesauttaa immuunikompleksien kasvua. Käytössä on useita eri polymeerejä. Hyödyllisiä ominaisuuksia polymeerille ovat suuri molekyyllipaino, lineaarisuus ja vesiliukoisuus. (Kricka ym. 1999, 208-210; Koivunen & Krogsrud 2006.)



Kuva 2. Saostusreaktio on riippuvainen antigeenin ja vasta-aineen määrästä (Kricka ym. 1999, suomennettu).

Agglutinaatioksi kutsutaan saostusreaktota, jossa on mukana mikropartikkeleita tai pinta-antigeenejä omaavia soluja. Agglutinoitumisen edellytyksenä on, että antigeenimolekyylillä on useita epitooppeja jotka edesauttavat silloittumista ja aikaansaavat silminnähtävää sakkautumista. Mikro-partikkeliagglutinaatiosta puhutaan silloin, kun vasta-aine tai antigeeni on sidottu kantajapartikkeliin. Mikro-partikkelien käyttö lisää määritysten herkkyyttä. (Halonen 2004a, 99; Koivunen & Krogsrud 2006.)

Antigeenin tai vasta-aineen sitominen kiinteään pintaan vaikuttaa edullisemmin molekyylien välisten vuorovaikutusten muodostumiseen verrattuna liuoksessa vapaana olevaan antigeeniin tai vasta-aineeseen. Tämän takia kiinteän ja nestemäisen aineen rajapinnassa tapahtuvilla reaktioilla voidaan aikaansaada alhaisempia havaitsemisrajoja. (Kricka ym. 1999, 209.)

3. IMMUNOLOGISTEN REAKTIOIDEN HYÖDYNTÄMINEN KLIINISEN KEMIAN ANALYTIKASSA

Immunokemiallisia menetelmiä käytetään monipuolisesti lääketieteellisissä laboratoriosovelluksissa mm. lääkeaine- ja hormonimäärityksiin. Menetelmät ovat laajalti kliinisessä käytössä niiden tehokkuuden ja sopivuuden vuoksi. Osalle kliinisesti merkittävillä proteiini- tai peptidiyhdisteille, kuten hormonit, tuumorimarkkerit ja patogeenit, ei välttämättä ole muita vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä. Immunokemialliset menetelmät ovat myös verraten nopeita, yksinkertaisia ja edullisia suorittaa. (Gosling 1990.)

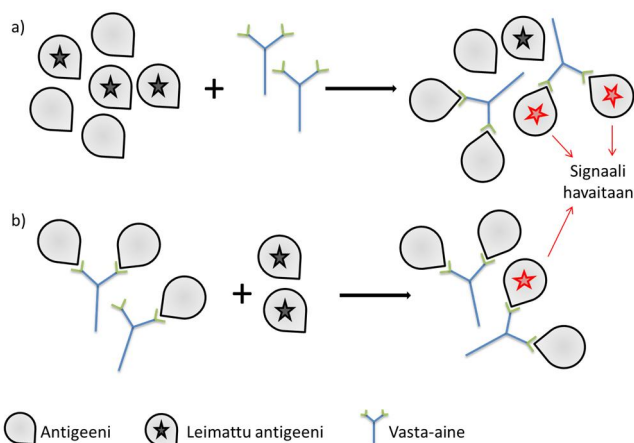
Immunokemialliset menetelmät perustuvat pääasiassa antigeenien tai vasta-aineiden leimaamiseen jollain mitattavissa olevalla *merkkiaineella*, jolloin tutkimuksen kohteena olevan yhdisteen pitoisuus näytteessä voidaan määrittää. Määritettävästä yhdisteestä käytetään nimitystä *analyytti* ja se voi olla joko antigeeni tai vasta-aine riippuen siitä kumpaa tutkimuksen kannalta on mielekkäämpää määrittää (vertaa esimerkiksi lääkeainemääritys ja virusvasta-ainemääritys). Menetelmissä hyödynnetään antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen kykyä sitoutua toisiinsa. (Savolainen & Parviainen 2010, 65; Eggins 2004, 253.)

Merkkiaineita käyttävät immunokemialliset menetelmät voidaan jakaa toteutustapansa mukaan kilpailevan sitoutumisen tekniikoihin ja kaksoisvasta-ainetekniikoihin (Halonen 2004a, 90). Kilpailevan sitoutumisen tekniikoista käytetään myös nimitystä immunomääritys (immunoassay) ja kaksoisvasta-ainetekniikoista nimitystä immunometrinen määritys (immunometric assay) (Gosling 1990). Immunokemialliset menetelmät voidaan jakaa myös heterogeenisiin ja homogeenisiin menetelmiin sen mukaan, miten näyte käsitellään ennen mittausta (Halonen 2004a, 90).

3.1. Kilpailevan sitoutumisen tekniikka

Kilpailevan sitoutumisen tekniikassa käytetään määritettävän antigeenin lisäksi vastaavanlaista leimattua antigeenia, josta käytetään myös nimitystä *konjugaatti*. Analyytti ja konjugaatti kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen, jonka affiniteetti on samansuuruinen sekä analyyttiin että konjugaattiin. (Halonen 2004a, 90; Gosling 1990.)

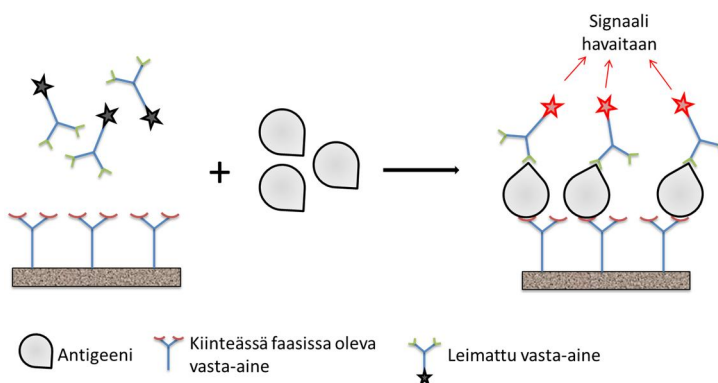
Analyytti ja leimattu antigeeni voidaan sekoittaa vasta-aineeseen yhtä aikaa tai portaittain (kuva 3). Yhtä aikaa sekoitettaessa vasta-aineen ja antigeenin määrä on rajoitettu tunnettuun määrään. Portaittaisessa menetelmässä analyytti sekoitetaan ylimäärään vasta-ainetta ja immunokompleksien muodostumisen jälkeen lisätään leimattu antigeeni. Leimattu antigeeni-vasta-aine -kompleksi havaitaan ja leiman määrän perusteella lasketaan analyytin pitoisuus, joka on kääntäen verrannollinen konjugaatin pitoisuuteen. Mitä enemmän leimattua antigeenia on sitoutunut vasta-aineeseen, sitä vähemmän analyyttiä voi sitoutua. Kilpailevan sitoutumisen menetelmissä myös määritettävä vasta-aine voi kilpailla leimatun vasta-aineen kanssa sitoutumisesta kiinteässä faasissa olevaan antigeeniin. (Halonen 2004a, 90; Gosling 1990.)



Kuva 3. Analyytti ja leimattu antigeeni voidaan sekoittaa vasta-aineeseen yhtä aikaa (a) tai portaittain (b).

3.2. Kaksoisvasta-ainetekniikka

Kaksoisvasta-ainetekniikassa luodaan ns. sandwich -rakenne, jossa käytetään kahta eri vasta-ainetta. Toinen vasta-aineista on sidottu kiinteään faasiin ja toinen on vapaana liuoksessa (kuva 4). Vapaana oleva vasta-aine on yleensä leimattu ja sen määrä on suoraan verrannollinen antigeenin määrään. Antigeeni sitoutuu molempiin vasta-aineisiin, jolloin sillä on oltava kaksi erillistä vasta-aineen sitoutumispaikkaa, jotka voidaan tunnistaa yhtäaikaaisesti. Tämä rajoittaa analyysin käyttöä rakenteeltaan yksinkertaisille steroideille, pienille peptideille (alle 15-20 aminohappoa) ja useimmille lääkeaineille. (Gosling 1990; Halonen 2004a, 90.)

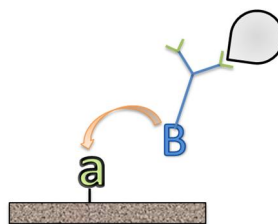


Kuva 4. Kaksoisvasta-ainetekniikan periaate.

Kahta vasta-ainetta käytettäessä menetelmä on spesifisempi kuin yhdellä vasta-aineella. Menetelmässä reagensseja käytetään ylimäärin ja vasta-aineen affiniteetti ei ole niin merkittävässä roolissa kuin kilpailevissa analyyseissä. (Gosling 1990; Halonen 2004a, 90.) Onnistunut kaksoisvasta-ainemääritys edellyttää, että antigeeni on tarpeeksi suuri sisältääkseen useita erilaisia epitoppeja ainakin kahdelle eri vasta-aineelle. Kun analyytinä on pieni molekyyli, voidaan käyttää kilpailevaa sitoutumista. (Koivunen & Krogsrud 2006.)

3.3. Hetero- ja homogeeniset menetelmät

Immunokompleksien muodostumisen jälkeen reaktioseokseen jää yleensä aina vähän sitoutumattomia vasta-aineita ja antigeenia. Heterogeeninen menetelmä tarkoittaa, että antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisen jälkeen suoritetaan erotusvaihe, jolloin vapaana olevat antigeenit ja vasta-aineet saadaan erotettua sitoutuneista immunokomplekseista. (Kricka ym. 1999, 217; Halonen 2004a, 93.) Perinteisin erotusmenetelmä on immunokompleksin saostus ja erottaminen sentrifugimalla sitoutumattomista yhdisteistä. Helppoutensa ja tehokkuutensa vuoksi yleisemmäksi menetelmäksi on kuitenkin tullut kiinteään faasiin valmiiksi sidotut vasta-aineet tai antigeenit, jotka kiinnittävät immunokompleksin, jolloin sitoutumattomat molekyylit voidaan huuhdella pois. Kiinteään faasiin sitominen voidaan tehdä myös ligandin avulla reaktion aikana. Yleisesti käytetty ligandi on biotiini, joka muodostaa voimakkaan sidoksen avidiinin kanssa (kuva 5). Yleensä biotiini on kiinnitetty vasta-aineeseen ja avidiini kiinteään faasiin, ja näiden muodostaessa sidoksen myös immunokompleksi sitoutuu kiinteään faasiin. Ligandin käyttö vähentää inkubaatio- ja erotusvaiheita, kun näyte ja leimatut vasta-aine voidaan lisätä yhtä aikaa. (Gosling 1990.)



Kuva 5. Vasta-aineeseen kiinnitetty biotiini (B) sitoutuu kiinteään faasiin kiinnitettyyn avidiiniin (a) sitoen samalla immunokompleksin.

Suurin osa immunokemiallisista menetelmistä ja varsinkin ne, jotka toimivat pienemmissä pitoisuuksissa, vaativat erotusvaiheen. Nykyisin kiinteät faasit ovat sellaisia, ettei erottamiseen tarvita sentrifugointia vaan kiinteän faasin pinta päällystetään vasta-aineella tai antigeenilla, jolloin se on helppo huuhdella immuunireaktion jälkeen. Yleisiä kiinteitä faaseja ovat mm. magneettiset mikropartikkelit, koeputkien seinämät ja kuoppalevyt. Vieritesteissä antigeenit tai vasta-aineet on useimmiten sidottu testiliuskan pintaan. (Gosling 1990.)

Homogeenisissä menetelmissä sitoutuneita ja sitoutumattomia komponentteja ei eroteta toisistaan, vaan immunokompleksin sitoutumisreaktio saa aikaan merkkiaineen muuttumisen, jolloin se voidaan havaita erillisenä vapaana olevista leimatuista molekyyleistä. (Kricka ym. 1999, 217; Halonen 2004a, 93.) Merkkiaineen aktiivisuus joko kasvaa tai pienenee sitoutumisreaktiossa. Ideaalitulanteessa merkkiaineen tulisi muuttua 100 %:sti, mutta todellisuudessa tämä on vaikea toteuttaa, minkä vuoksi homogeeniset menetelmät eivät ole niin sensitiivisiä, kuin heterogeeniset menetelmät. Homogeeniset menetelmät ovat kuitenkin yksinkertaisia ja nopeita ja tulos voidaan havaita suoraan reaktioseoksesta. Niitä käytetään lääke- ja huumausaineiden sekä hormonien määrittämiseen verestä ja virtsasta. Huonomman herkkyytensä vuoksi homogeeniset menetelmät sopivat parhaiten käytettäväksi kun määritettävät pitoisuudet ovat suuria. (Gosling 1990; Stenman & Hämäläinen 2010.)

4. IMMUNOKEMIALLISTEN MENETELMIEN SOVELLUKSET

Immuunireaktiota hyödyntävien analyysien historian ensimmäinen merkkipaalu kliinisen kemian analytiikassa oli radioimmunoanalyysin (RIA) kehittäminen vuonna 1959, jolloin kyseisellä menetelmällä määritettiin plasman insuliinia. Vuonna 1977 menetelmän kehittäjästä toinen, Rosalyn S. Yalow, vastaanotti Nobelin palkinnon kehitystyöstään menetelmän parissa. (Wu 2006.) RIA on hyvin herkkä menetelmä ja etenkin pienten, pikogrammoissa mitattavien, peptidien määritykset ovat erityisen tarkkoja ja herkkiä (Wu 2006; Becker & Border 1998). RIA:n jälkeen immunokemiallisten menetelmien kehitystyö on edennyt yhä spesifisempiä, sensitiivisempiä ja turvallisempia määritysmenetelmiä kohti. Tärkeitä vaiheita kehitystyössä ovat olleet monoklonaalisten vasta-aineiden kehittäminen hiiren kasvainsolujen avulla sekä homogeenisten menetelmien ja ei-radioaktiivisten leimojen kehittäminen. (Wu 2006.)

Monoklonaaliset vasta-aineet mahdollistivat kaksoisvasta-ainetekniikoiden kehittymisen, koska vasta-aineita voitiin tuottaa suuria määriä. Yksi ensimmäisistä kaksoisvasta-ainemäärityksistä oli ELISA-määritys vuodelta 1973, jolla tutkittiin erästä syöpämerkkiainetta. Ensimmäinen homogeeninen immunomääritys oli EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) (Rubenstein ym. 1972 Wu 2006 mukaan), jossa morfiinin sitoutuminen lysosyymi-entsyymillä leimattuun vasta-aineeseen havaittiin entsyymiaktiivisuuden inhibiitiona. EMIT:n keksimisen seurauksena kehitettiin muita ei-radioaktiivisia leimoja käyttäviä menetelmiä, kuten FPIA (*Fluorescence Polarization Immunoassay*) vuonna 1981 ja CEDIA (*Cloned Enzyme Donor Immunoassay*) vuonna 1986. Kemiluminesoivat leimat kehitettiin 1970-luvulla. Nykyaikaisissa automatisoiduissa immunomäärityksissä hyödynnetään enimmäkseen kemiluminesenssia, koska määritysten herkkyys on verrattavissa radioaktiivisia leimoja käyttävien määritysten herkkyyteen. (Wu 2006.)

Tässä luvussa käsitellään kliinisen kemian analytiikassa käytettäviä immunokemiallisia menetelmiä, esitellään niiden virhelähteitä ja tehdään lyhyt katsaus tulevaisuuden näkyviin menetelmien sovelluksissa. Immunokemiallisten menetelmien jaotteluun on erilaisia tapoja mutta tässä opinnäytetyössä jako on tehty leimamenetelmien ja reaktiokomponenttien agglutinaatiota tai saostumista hyödyntävien menetelmien välille. Leimamenetelmät jaetaan edelleen käytettävän merkkiaineen mukaan ja agglutinaatio- ja saostusmenetelmät jaetaan nefelometriin ja turbidometriin menetelmiin, jotka perustuvat immunokompleksien suoraan havaitsemiseen reaktioseoksesta. Immunokemiallisia menetelmiä käytetään sekä kvalitatiivisiin että kvantitatiivisiin määrityksiin.

4.1. Leimamenetelmät

Vanhimmissa immunokemiallisissa menetelmissä leimaamiseen käytettiin merkkiaineena radioisotooppeja, mutta nykyään paremman työturvallisuuden vuoksi on siirrytty enemmän fluoresenssia ja kemiluminesenssia hyödyntäviin leimaustekniikoihin sekä entsyymileimoihin (Halonen 2004a, 90-100). Merkkiaineella on useita tärkeitä piirteitä, joita tulisi pohtia sitä valittaessa. Näitä ovat spesifi-

nen aktiivisuus, merkkiaineen kiinnittämisen helppous vasta-aineeseen tai antigeeniin, määrittämisen helppous, mahdollisuus vahvistaa merkkiaineen signaalia sekä turvallisuus ja käyttömahdollisuudet homogeenisiin analyysiin. Merkkiaineen spesifisellä aktiivisuudella tarkoitetaan sitä, että havaittava signaali on peräisin pelkästään tutkittavista komplekseista eikä ulkopuolisista lähteistä. Spesifinen aktiivisuus on tärkeää alhaisten määritysrajojen saavuttamiseksi. (Gosling 1990.) Yleisesti käyttökelpoisuuteen vaikuttaa käytettävän merkkiaineen spesifisyys ja hyvä sitoutumiskyky, mutta myös se, että merkkiaine voidaan mitata luotettavasti ja tarkasti (Woodhead & Weeks 1985).

Pienten antigeenipitoisuuksien määrittämistä helpottaa merkkiaineen signaalin vahvistaminen. Merkkiaineina käytettävät fluoresoivat yhdisteet on helppo havaita ja niitä voidaan virittää yhä uudelleen, jolloin signaalia saadaan vahvistettua. Kemiluminesoivat yhdisteet on myös helppo havaita, mutta ne voivat käydä reaktion läpi vain kerran, jolloin signaalia ei saada vahvistettua ja havainnointitehokkuus on pienempi verrattuna esim. radio-isotooppeihin. Signaalia voidaan voimistaa myös lisäämällä immunokomplekseihin enemmän merkkiainemolekyylejä. (Gosling 1990.)

Tunnetuin työturvallisuusongelma merkkiaineiden käytössä on isotooppien aiheuttama ionisoiva säteily, minkä vuoksi niiden käyttöä on vähennetty. Radio-isotooppianalyysien riskit ovat kuitenkin olleet tiedossa ja vapautuvaa säteilyä on helppo mitata ja valvoa. Uudemmissa menetelmissä on otettava huomioon, että vaikka ei-radioaktiiviset leima-aineet eivät tuota säteilyä, on niihinkin suhtauduttava mahdollisesti vaarallisina aineina (mm. karsinogeenisyys, teratogeenisyys ja yleinen toksisuus) niin kauan kuin niiden turvallisuutta ei ole pystytty varmaksi osoittamaan. (Gosling 1990.)

Työturvallisuus on huomioitava aina ihmisperäisiä näytteitä käsiteltäessä tartuntavaaran takia. Myös muilta määrityksissä käytettäviltä haitallisilta aineilta on syytä suojautua. Radioaktiivisiin isotooppeihin perustuvat menetelmät ovat vähentyneet kliinisessä käytössä merkittävästi, mikä on parantanut työturvallisuutta. RIA -menetelmä on pääasiassa korvattu kemiluminesenssiin perustuvalla LIAISON:illa. Käytettävät reagenssit voivat edelleen olla haitallisia, mutta niiden osalta työturvallisuutta on parantanut se, että reagenssit tulevat käyttöön suljetuissa kaseteissa ja avoimien reagenssien käyttö on vähäistä. (Halonen 2013.)

4.1.1. Radioaktiivisia isotooppeja käyttävät leimamenetelmät

Ensimmäiset immunomääritykset tehtiin käyttäen radioaktiivisia isotooppileimoja (Wu 2006). Yleisimmät radioaktiivisia merkkiaineita käyttävät menetelmät ovat radioimmunoanalyysi (RIA) ja immunoradiometrinen analyysi (IRMA). Molemmat menetelmät ovat heterogeenisiä, mikä tarkoittaa, että ennen mittauksia on tehtävä erotusvaihe. (Åkerman ym. 2010a, 84; Halonen 2004a, 94.) Nämä menetelmät alkavat jäädä vähemmälle käytölle kliinisissä laboratorioissa mutta ne ovat olleet merkittävä osa immunokemiallisten menetelmien kehitystä (Wu 2006).

Radioimmunoanalyysi RIA (radioimmunoassay)

RIA -menetelmä on heterogeeninen kilpailevaan sitoutumiseen perustuva menetelmä (Halonen 2004a, 94). RIA-menetelmällä voidaan määrittää hormoni-, vitamiini-, lääkeaine-, entsyymi- ja vasta-ainepitoisuuksia (Becker & Border 1998; Karonen 1982; Haapala 2010, 164). Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen (ISLAB) Puijon sairaalan kliinisen kemian laboratoriossa RIA:lla määritetään esimerkiksi kromograniniini A -glykoproteiinia, joka on biokemiallinen merkkiaine ja käytetty neuroendokriinisten kasvainten diagnostiikassa (ISLAB 2014c; Eloranta 2005).

RIA-menetelmässä leimataan antigeeni radioaktiivisella merkkiaineella ja se kilpailee analyytin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Yleisiä merkkiaineita ovat ^{125}I , ^{131}I ja ^3H . Mitattavan yhdisteen pitoisuus on kääntäen verrannollinen mitattuun radioaktiivisuuteen. Mitä suurempi analyytin pitoisuus on, sitä vähemmän leimatut antigeenit voivat sitoutua vasta-aineeseen ja sitä pienempi on mitattu radioaktiivisuus. Radioaktiivisuus mitataan tuikelaskurilla. Vasta-ainemäärityksissä leimataan vasta-aine, joka kilpailee analyytin (määritettävä vasta-aine) kanssa sitoutumisesta antigeeniin. (Halonen 2004a, 90, 94; Stenman & Hämäläinen 2010; Kimball 2011; Wu 2006.)

RIA-menetelmissä vapaat ja sitoutuneet antigeenit voidaan erotella eri tavoin. Erottelu voidaan tehdä kahden vasta-aineen avulla siten, että reaktioseokseen lisätään antigeenin ja sille spesifisen primäärin vasta-aineen lisäksi myös toinen, sekundaarinen vasta-aine, joka on spesifinen ensimmäiselle vasta-aineelle (vasta-aineiden oltava eri eläinlajeista). Sekundaarinen vasta-aine on sidottu pienikokoisiin mikropartikkeleihin ja sen vuoksi vasta-aineen lisäys aiheuttaa immunokompleksien saostumista erilleen liuoksesta. Radioaktiivisuus mitataan muodostuneesta sakasta tai supernatanttiin jääneistä vapaista antigeeneista. (Chapman 1998; Kimball 2011; Halonen 2004a, 94.)

Toisessa, edellistä herkemässä erotusmenetelmässä vasta-aine sidotaan kiinteään faasiin ja erotusvaiheen jälkeen radioaktiivisuus mitataan kiinteään faasiin sitoutuneista immunokomplekseista sekä vapaista, erotetuista leimatuista antigeeneista. Kyseisessä menetelmässä vapaiden ja sitoutuneiden antigeenien erottaminen on yksinkertaisempaa ja reagensseja tarvitaan vähemmän. (Chapman 1998; Kimball 2011.)

Radioimmunoanalyysin etuna on se, että analyysimenetelmänä se on tarkka ja herkkä, joten sillä voidaan määrittää todella pieniä pitoisuuksia, erityisesti peptidihormoneja (Becker & Border 1998). Isotooppi on helppo liittää mitattavaan yhdisteeseen, merkkiaineen signaali voidaan mitata ilman erityistä optimointia ja menetelmä on myös epäherkkä häiriötekijöille (Halonen 2004a, 93-94).

RIA:n ongelmia ovat reagenssien lyhyt käyttöikä ja niiden heikentyvä saatavuus, radioaktiivisten merkkiaineiden epäterveellisyys ja niiden vaatimat säteilytyötilat sekä erikoismittalaitteiden tarve. Johtuen edellä mainituista syistä, radioimmunoanalyysin käyttö onkin vähenemässä rutiinilaboratorioissa. Myös uusien immunometrinen menetelmien kehittäminen on vähentänyt radioimmunoanalyysin tarvetta. (Savolainen & Parviainen 2010, 65; Halonen 2004a, 93.) Beckerin ja Borderin (1998) tutkimuksen mukaan RIA-menetelmä oli käytössä diagnostisena välineenä enää kolmasosassa tutkimukseen vastanneista laboratorioista Texasin osavaltiossa Yhdysvalloissa kyseisenä ajankohtana.

Menetelmän käytön vähenemisen syynä olivat muut halvemmat ja helposti saatavilla olevat analyysimenetelmät ja toisaalta myös se, että RIA-menetelmän ylläpitoon liittyi paljon aikaavievää kirjaamistyötä. Tyypillisin korvaava menetelmä tutkimukseen vastanneissa laboratorioissa oli entsyymi-immunoanalyysi (EIA). (Becker & Border 1998.)

Immunoradiometrinen analyysi IRMA (immunoradiometric assay)

IRMA on heterogeeninen menetelmä ja perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan. Verrattuna kilpailevaan sitoutumiseen perustuvaan radioimmunoanalyysiin, immunoradiometrinen menetelmä on paljon herkempi ja mittausalueeltaan laajempi. (Halonen 2004a, 94.) Menetelmällä voidaan määrittää monenlaisia antigeenejä, esimerkiksi hyperkalsemiaa aiheuttavaa proteiinia, jota tuottavat esimerkiksi tietyt kasvaimet (Miles 1975; Bilezikian 1995). IRMA:lla määritetään myös esimerkiksi parathormonin kaltaista peptidiä, jonka avulla selvitetään hyperkalsemian etiologiaa (ISLAB 2014d).

IRMA-menetelmässä vasta-aine leimataan radioaktiivisella merkkiaineella, esimerkiksi ^{125}I :lla. Menetelmätyyppejä on erilaisia. Tietäntyyppisessä IRMA:ssa immunokompleksit muodostuvat vapaasti liuoksessa ja analyytin annetaan reagoida leimatun liukoisen vasta-aineen kanssa, jolloin muodostuu radioaktiivisia immunokomplekseja. Seuraavassa vaiheessa vapaaksi jääneet leimatut vasta-aineet tarttuvat kiinteässä faasissa oleviin antigeeneihin, kun taas radioaktiiviset immunokompleksit säilyvät liuoksessa. Sentrifugaation jälkeen supernatanttiin jäänyt radioaktiivisuus mitataan. (Chapman 1998; Miles 1975.)

Toisentyypisessä IRMA -menetelmässä immunokompleksit ovat suurempia ja ne kiinnittyvät kiinteään faasiin. Menetelmässä käytetään kahta vasta-ainetta, leimattua ja kiinteässä faasissa olevaa leimaamatonta vasta-ainetta ja määrittäminen suoritetaan kahdessa vaiheessa. Ensin analyytin reagoi kiinteän faasin vasta-aineen kanssa muodostaen immunokomplekseja. Seuraavaksi lisätään leimattu vasta-aine, joka kiinnittyy kiinteässä faasissa olevan immunokompleksin analyyttiosaan. Syntyvässä rakenteessa on kiinteän faasin vasta-aine, analyytin sekä leimattu vasta-aine (sandwich-rakenne). Vapaat leimatut vasta-aineet erotetaan pesemällä. Radioaktiivisuus mitataan kiinteästä faasista. Tämän menetelmän käyttö rajoittuu niille antigeeneille, jotka kykenevät sitomaan kaksi vasta-ainetta. (Chapman 1998; Miles 1975.)

Molemmissa IRMA -menetelmissä analyytin pitoisuus on suoraan verrannollinen radioaktiivisuuden määrään. Mitä enemmän näytteessä on analyyttiä, sitä enemmän syntyy immunokomplekseja ja sitä suurempi on mitattu radioaktiivisuus. (Chapman 1998.)

4.1.2. Fluoresenssiin ja kemiluminesenssiin perustuvat leimamenetelmät

Osa merkkiaineista havaitaan atomin virittymisen kautta muodostuvan valon perusteella. Atomin virittymisellä tarkoitetaan tilaa, jossa ulkopuolisen energian seurauksesta kohdeatomin elektroni siirtyy korkeammalle energiatasolle (ulommalle elektronikuorelle). Atomi pyrkii palautumaan perusenergiatilaan, jolloin elektronin siirtyessä takaisin alkuperäiselle energiatasolleen vapautuu samalla energiaa

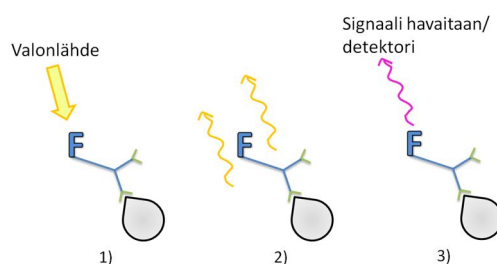
säteilyemissiona (mm. valo). (Woodhead & Weeks 1985.) Tätä ilmiötä kutsutaan luminesenssiksi. Luminesenssin eri muotoja ovat mm. fluoresenssi ja kemiluminesenssi. (Halonen 2004b, 74.) Valoemissio mitataan valomonistinputkella tai fotodiodilla (Kricka ym. 1999, 222).

Fluoresenssiin perustuvat tekniikat FIA (fluorescence immunoassay)

Fluoresoivien merkkiaineiden eli fluoroforien käyttö perustuu fluoresenssiin. Fluoresoiva molekyyli absorboi valoa sille ominaisella aallonpituudella ja tämän jälkeen emittoi valoa usein hieman pidemmällä aallonpituudella. (Kivelä 2003.) Mittausta varten fluoroforit viritetään oikean aallonpituuden omaavalla valopulssilla, ja havaittava emittoituva valo on verrannollinen fluoroforin määrään. Fluoresenssitekniikoissa ongelmana on määritettävien aineiden taustafluoresenssi, joka häiritsee varsinaisen merkkiaineen fluoresenssin mittausta. Taustafluoresenssia esiintyy erityisesti biologisissa näytteissä, kuten veren seerumissa. (Soini & Kojola 1983; Kricka ym. 1999, 211.)

Aikaerotteinen fluoroimmunomääritys TRFIA (time-resolved fluorescence immunoassay)

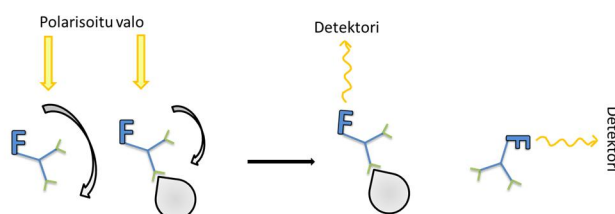
TRFIA-määritykset ovat heterogeenisiä ja niissä käytetään sekä kilpailevan sitoutumisen tekniikkaa että kaksoisvasta-ainetekniikkaa. Yleisimpiä määryksiä ovat hormoni- ja immunoglobuliinimääritykset. (Halonen 2004a, 97.) Hormonimäärityksiä ovat mm. kilpirauhas- ja gonadotropiinihormonit sekä prolaktiini ja insuliini (Stenman & Hänninen 2010). TRFIA:ssa merkkiaineena käytetään lantanidike-laatteja, joiden fluoresenssi on pitkäikäistä verrattuna taustafluoresenssiin. Merkkiaineen fluoresenssi voidaan mitata pienellä viiveellä virityksestä, taustafluoresenssin jo sammuttua (kuva 6). (Soini & Kojola 1983; Åkerman ym. 2010a, 84.) Kelaatti on kompleksi, jossa ligandit muodostavat rengasrakenteen keskusmetalli-ionin kanssa (Mortimer 2001, 236). Kelaateilla on myös muita optisia ominaisuuksia, joiden vuoksi ne sopivat erityisen hyvin fluoresoiviksi leimoiksi biologisiin näytteisiin. Lantanideja esiintyy biologisissa näytteissä äärimmäisen vähän. Lisäksi ne ovat biokemiallisesti reagoimattomia ja eivät siten vaikuta näytteeseen. Aikaerotteinen mittaustapa ja lantanidien käyttö parantavat perinteisen fluoresenssimenetelmän herkkyyttä. (Soini & Kojola 1983.) Yleisimmin käytetyt lantanidit ovat europium, samarium ja terbium (Halonen 2004a, 97). Fluoresenssimenetelmiä pidetään 10–100 kertaa herkempinä kuin vastaavia isotooppileimamenetelmiä (Stenman & Hämäläinen 2010). Fluoresenssiin perustuvien määrytysten etuja ovat nopeus ja reagenssien turvallisuus (Soini & Kojola 1983).



Kuva 6. TRFIA menetelmässä fluoresoiva molekyyli (F) viritetään (1). Ensin vapautuu taustafluoresenssi (2) ja viiveen jälkeen havaitaan näytteen fluoresenssi (3).

Fluoresenssipolarisaatioimmunomääritys FPIA (fluorescence polarization immunoassay)

FPIA on homogeeninen kilpailevaan sitoutumiseen perustuva menetelmä, jota käytetään mm. huumaus- ja lääkeaineiden määrittämisessä (Kricka ym. 1999, Halonen 2004a, 97). Antigeeniin kiinnitetty fluoresoiva molekyyli viritetään tasopolarisoidulla valolla. Molekyyleillä on taipumus värähdellä ja pyöriä lämpöliikkeen vaikutuksesta. Jos molekyyli ei pyörisi, sen emittoima fluoresenssi olisi samassa polarisaatiokulmassa viritykseen nähden, mutta molekyylien taipumus pyöriä muuttaa fluoresenssiemission kulmaa. Vapaa antigeeni-leima-yhdiste on pienempi ja pyörii nopeasti kun taas vasta-aineen sitoutuminen hidastaa pyörimisnopeutta, jolloin emissio ehtii tapahtua samassa kulmassa ja se voidaan havaita (kuva 7). Emissio mitataan viritykseen nähden samassa ja poikittaisessa kulmassa, jolloin emissioiden intensiteettien suhteesta voidaan laskea vapaan ja vasta-aineeseen sitoutuneen leiman suhde. (Kivelä 2003, Kricka ym. 1999.) Reaktioseokseen lisätään analytyille spesifistä vasta-ainetta sekä pieni määrä leimattua antigeenia. Mitä enemmän mitattavaa yhdistettä reaktioseoksessa on, sitä vähäisemmässä määrin leimattu yhdiste sitoutuu vasta-aineeseen, ja havaittu polarisoitunut valo on kääntäen verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Halonen 2004a, 98.)



Kuva 7. FPIA -tekniikassa käytetään hyväksi tasopolarisoitua valoa.

Fluoresenssin resonanssienergiansiirto FRET (fluorescence resonance excitation transfer)

FRET on homogeeninen kaksoisvasta-ainemenetelmä, jota käytetään hormoni-, kilpirauhas-, syöpämerkkiaine- ja sydänmerkkiainemäärityksissä (Halonen 2004a, 98). FRET -tekniikka perustuu kahden merkkiaineen käyttöön, joista toista kutsutaan luovuttajaksi (donor) ja toista vastaanottajaksi (acceptor). Luovuttaja on fluoresoiva molekyyli ja vastaanottaja on molekyyli, joka pystyy tehokkaasti absorboimaan säteilyä, jota luovuttaja emittoi virittyessään (energiaa siirtyy, *excitation transfer*). Energian siirto näiden kahden merkkiaineen välillä onnistuu vain niiden välisen etäisyyden ollessa tarpeeksi pieni (alle 100 Ångströmiä). Merkkiaineet tulevat sopivalle etäisyydelle vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisen johdosta. Molemmat merkkiaineet voivat esimerkiksi olla kiinnitettynä samaan vasta-aineeseen, ja antigeenin sitoutuessa vasta-aineen muoto muuttuu niin että merkkiaineet joutuvat toistensa läheisyyteen. Vastaanottaja voi olla ns. sammuttaja, jolloin se vaimentaa luovuttajan emissiota. Vastaanottaja voi olla myös fluorofori, joka virittyy luovuttajan vaikutuksesta ja fluoresoi eri aallonpituudella kuin luovuttaja. Tarkkailemalla muutoksia emission aallonpituudessa ja voimakkuudessa voidaan todeta immunokompleksien muodostuminen. (Bruno, Ulvick, Uzzell, Tabb, Valdes & Batt 2001; Lichlyter, Grant & Soykan 2003.) Merkkiaineina ovat europium(III)trisbipyridiinikryptaatti ja allofykosyaniini. Viritettäessä europium siirtää energian allofykosyaniinille, joka fluoresoi. Mittaus on aikaeroitteinen. (Halonen 2004a, 98.)

Kemiluminesenssiin perustuvat tekniikat CLIA (chemiluminescence immunoassay)

CLIA on heterogeeninen kaksoisvasta-ainemenetelmä ja sillä tehdään mm. lääkeaine-, vitamiini-, hormoni ja proteiinimäärityksiä (Halonen 2004a, 98). Kemiluminesenssissa molekyylin virittyminen saadaan aikaan kemiallisen reaktion avulla. Tyypillisiä kemiluminesoivia aineita ovat luminoli, isoluminoli, akridiniumesteri ja luciferin sekä näiden johdannaiset. Kemiallisena reaktiona toimii hapetusreaktio, jonka avuksi tarvitaan usein katalyyttiä. Hapettimena voi toimia vetyperoksidi, hypokloriitti tai happi ja katalyyttinä mm. entsyymit tai metalli-ionit. Reaktion hajoamistuotteet emittoivat valoa. (Halonen 2004b, 76; Kricka ym. 1999, 221; Woodhead & Weeks 1985.) Koska näkyvän valon lähteitä on luonnollisesti paljon, on mittaussysteemi suojattava tarkoin ulkopuolisilta valonlähteiltä häiriön vähentämiseksi. Luminesenssia mitattaessa herkkyys voi olla parempi kuin isotooppimenetelmillä. Menetelmän etuna on, että reagenssit pysyvät stabiileina pitkän aikaa. (Woodhead & Weeks 1985.)

Kemiluminesenssiin perustuvien menetelmien ongelmana on mitattavan valon vaimeneminen näytteessä (esim. seerumissa). Yleisesti vasta-aine pyritäänkin kiinnittämään kiinteään faasiin, jolloin immunokompleksien muodostumisen jälkeen näytematriisi voidaan huuhdella pois ennen kemiluminesenssireaktiota. (Woodhead & Weeks 1985.) Toisena ongelmana on luminesoivien merkkiaineiden kiinnittäminen vasta-aineisiin siten, etteivät merkkiaineen ominaisuudet muuttuisi. Tavallisesti vasta-aine vaimentaa merkkiaineen luminesenssia ja tämän vuoksi muodostunut immunokompleksi olisi poistettava reaktioseoksesta ennen luminesenssin mittaamista parhaan tuloksen saavuttamiseksi. Merkkiaine voidaan irrottaa korkeassa lämpötilassa voimakkaan emäksisissä olosuhteissa, mutta tämä tuo jälleen yhden lisävaiheen analyysiin. Joidenkin luminesoivien molekyylien, kuten akridinium esterin hapetusreaktio johtaa molekyylin hajoamiseen, jolloin virittynyt tuotemolekyyli jää irralleen ja valontuotto on voimakkaampaa. (Woodhead & Weeks 1985.)

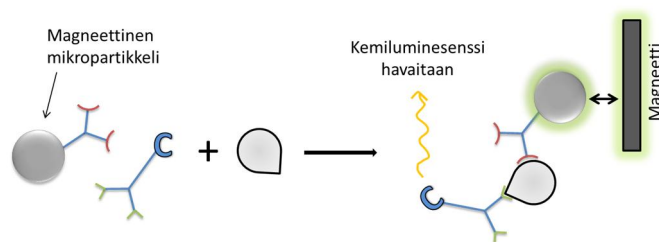
Elektrokemiluminesenssi-immunoanalyysi ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay)

ECLIA on muunnelma perinteisestä CLIA-menetelmästä, ja siinä kemiluminesenssireaktio aiheutetaan elektrodien pinnalla sähkön avulla (Halonen 2004b, 76). ECLIA on heterogeeninen kaksoisvasta-ainemenetelmä, jossa biotinyloitu monoklonaalinen vasta-aine ja rutenium(II)tris(bipyridyl)-leimattu vasta-aine sitoutuvat antigeeniin ja muodostavat immunokompleksin. Biotiini sitoo kompleksin streptavidiinilla päällystettyihin paramagneettisiin rautapartikkeleihin, jotka kiinnittyvät elektrodin pinnalle. Sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois ja reaktio tapahtuu vasta pesun jälkeen. ECLIA-menetelmää käytetään mm. hormoni-, kilpirauhas-, tuumorimarkkeri- ja sydänmerkkiainemäärityksiin. (Halonen 2004a, 98–99; Åkerman ym. 2010a, 85.)

Kemiluminesenssi mikropartikkeli immunoanalyysi CMIA (chemiluminescence microparticle immunoassay)

CMIA-määritys on kaksoisvasta-ainetekniikkaa hyödyntävä heterogeeninen menetelmä, jossa toinen vasta-aine on sidottu magneettisiin mikropartikkeleihin ja toinen, vapaana reaktioseoksessa oleva, vasta-aine on leimattu akridiniumilla. Kun näytteessä on sopivaa antigeeniä, muodostuu kaksoisvasta-aine-antigeeni -kompleksi. Magneettisten mikropartikkeleiden avulla kompleksit saadaan helposti erilleen pesujen aikana (kuva 8). Lopulta kiinnittyneet merkkiaineet erotetaan komplekseista, aiheutetaan kemiluminesenssireaktio ja määritetään merkkiaineen määrä, joka on verrannollinen antigeeni-

nin määrään. (Quinn 2005.) CMIA-määrittystä käytetään mm. immunosuppressiivisen syklosporiinin ja aktiivisen B12-vitamiinin määrittämisessä (ISLAB 2014a; ISLAB 2014b).



Kuva 8. CMIA menetelmässä erotusvaihe tehdään magneettisten mikropartikkeleiden avulla.

4.1.3. Entsyymiaktiivisuuden perustuvat leimamenetelmät EIA (enzyme immunoassay)

Entsyymi-immunomäärityksissä käytetään entsyymejä merkkiaineina ja hyödynnetään niiden katalyyttisiä ominaisuuksia immunologisten reaktioiden havainnoinnissa ja mittauksessa. Ensimmäiset kvantitatiiviset entsyymi-immunomääritykset tehtiin 1970-luvulla. (Kricka ym. 1999, 219; Jauhiainen 1981.) Entsyymimääritykset voidaan jakaa kaksoisvasta-ainetekniikoihin ja kilpailevaan sitoutumiseen perustuviin tekniikoihin (Gosling 1990).

Entsyymimääritykset ovat nopeita ja herkkiä menetelmiä antigeenien tai vasta-aineiden havaitsemiseen potilaan seerumista. Entsyymaattisissa immunomäärityksissä entsyymileimatun vasta-aineen tai antigeenin pitoisuus saadaan selville entsyymi-substraattireaktion reaktiotuotteiden määrityksellä, joka kuvastaa entsyymiaktiivisuutta. (Koivunen & Krogsrud 2006; Åkerman ym. 2010b, 67.)

Entsyymiaktiivisuus ja EIA-määrittysten mittausperiaatteet

Entsyymiaktiivisuus tarkoittaa entsyymien kykyä katalysoida reaktiota. Entsyymiaktiivisuuden yksikkö on U (unit), joka on se entsyymimäärä, joka katalysoi yhden mikromoolin substraattia minuutin aikana. Yleensä entsyymiaktiivisuus ilmoitetaan U/l, mutta aktiivisuus voidaan ilmoittaa myös kataaleina mol/s. Entsyymi-substraattikompleksin muodostuminen noudattaa Michaelis-Mentenin kinetiikkaa, jossa substraatin pitoisuus on verrannollinen reaktionopeuteen pienillä substraattipitoisuuksilla. Liian suurilla substraattipitoisuuksilla saadaan virheellisiä tuloksia. Entsyymiaktiivisuus voidaan määrittää mittaamalla entsyymien katalysoimia reaktiotuotteita. Määritys voidaan tehdä päätepistemittauksena tai kineettisenä mittauksena. Päätepistemittauksessa entsyymi-substraattireaktio on pysäytettävä, jotta saadaan selville vasta-aineen, eikä substraatin pitoisuus. Kineettisessä mittauksessa seurataan entsyymi-substraattikompleksien muodostumisnopeutta. (Åkerman ym. 2010b, 67-69; Halonen 2004c, 82-84; Leinikki 1980.)

Entsyymiaktiivisuutta mitataan reaktioseoksesta yleensä fotometrisesti tai kolorimetrisesti. Tarkempaa määrittystä varten voidaan käyttää fluorometrisesti tai luminometrisesti mitattavia substraatteja. Pienten antigeenien leimaus voi olla ongelmallista, kun taas vasta-aineeseen voidaan liittää molekyy-

likooltaan isokin entsyymi ilman, että se häiritsee immunoreaktiota. (Stenman & Hämäläinen 2010.) Entsyymien käyttö merkkiaineena on johtanut useiden eri entsyymiaktiivisuutta mittaavien määrittymenetelmien kehittämiseen. Aktiivisuusmääritykset fluorometrisesti tai luminometrisesti vaativat erikoistunutta laitteistoa, joskin ne ovat herkkiä menetelmiä ja siksi sopivia entsyymiaktiivisuuden kvantitatiivisessa määrittämisessä. Kolorimetrisessä määrittämisessä useiden värillisten reaktiotuotteiden absorptiviteetti on rajoittunutta, minkä takia menetelmä ei ole kovin herkkä. Kolorimetrisen määrittämisessä herkkyyttä voidaan parantaa käyttämällä alkalista fosfataasia apuaineena, joka voimistaa entsyymiaktiivisuutta. (Gosling 1990.)

Entsyymileimana EIA-menetelmissä käytetään yleensä HRP- (horseradishperoxidase eli piparjuuriperoksidaasi) tai alkaalifosfataasi-entsyymejä. HRP-entsyymien käytön suosion syitä ovat sen hyvä katalysointiominaisuus, määrittämisen spesifisyys, soveltuvuus erilaisiin konjugaatio-menetelmiin ja pieni molekyylikoko. (Gosling 1990.) HRP-entsyymi liitetään yleensä IgG-vasta-aineen sarana-kohtaan siten, ettei vasta-aine menetä immunologista aktiivisuutta, eikä entsyymi entsyymiaattista vaikutusta (Gosling 1990; Nakane & Kawaoi 1974). Käytettävän entsyymien valinnassa tulee huomioida stabiilisuus, entsyymiaktiivisuus ja entsyymien puhtausaste. Entsyymiaktiivisuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat pH, lämpötila, aktivaattorit ja inhibiittorit sekä koentsyymit ja prosteettiset ryhmät. (Åkerman ym. 2010b, 67–68.)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA-määritykset ovat heterogeenisiä menetelmiä, joissa jokin reaktioon osallistuvista komponenteista on sidottu kiinteään faasiin. Kliinisen kemian analytiikassa ELISA:a on käytetty muun muassa reumafaktorin määrittämiseen. (Leinikki 1980.) ELISA-menetelmät jaetaan suoraan ja epäsuoraan menetelmään, kaksoisvasta-ainetekniikkaan ja kilpailevaan sitoutumiseen (Halonen 2004a, 94–95). ELISA-määrityksiä voidaan tehdä automatisoiduilla analyysilaitteilla tai manuaalisesti kuoppalevytekniikalla (Åkerman ym. 2010a, 84). ELISA-määrityksissä syntyy substraatin katalysoitumisen seurauksena värillinen reaktiotuote. Ne ovat käteviä seulonta-, vierianalytiikka- ja kotitesteissä. Tulokset voidaan määrittää silmämääräisesti tai spektrofotometrisesti. (Halonen 2004a, 95; Penttilä 2004, 253.)

Suorassa ELISA-määrityksessä määritettävä antigeeni sidotaan muovilevyn pintaan. Reaktioon lisätään entsyymileimattu vasta-aine, joka sitoutuu analyysiin. Tämän jälkeen vasta-aine-entsyymi -ylijäämä pestään pois, jolloin jäljelle jäävät entsyymileimatut immunokompleksit. Entsyymille spesifinen substraatti lisätään. Havaittava entsyymien aktiivisuus on suoraan verrannollinen analyysin määrään. Suoran ELISA-määrityksen hyötyjä ovat nopeus ja helppous. (Sino Biological Inc. 2004-2014a.)

Epäsuorassa ELISA-määrityksessä sidotaan antigeeni kiinteään faasiin ja reaktioon lisätään antigeenille spesifinen määritettävä vasta-aine. Tämän jälkeen reaktioon lisätään entsyymiin sidottu vasta-aine, joka tunnistaa antigeeniin sidotun vasta-aineen ja sitoutuu siihen. Substraatti lisätään ja entsyymiaktiivisuus mitataan. Epäsuora ELISA on herkkä menetelmä, koska määrittämisessä hyödynnetään useamman, kuin yhden vasta-aineen spesifisyyttä. Useamman vasta-aineen käyttö lisää kui-

tenkin ristireaktioiden mahdollisuutta. Menetelmä on myös joustava, koska antigeenin havaitsemiseen voidaan käyttää monia erilaisia primäärisiä vasta-aineita, eikä niitä tarvitse leimata erikseen sekundäärisen leimallisen vasta-aineen ansiosta. Epäsuoralla ELISA:lla määritetään esimerkiksi virusvasta-aineita. (Sino Biological Inc. 2004-2014b; Kricka ym. 1999, 221.)

Kaksoisvasta-aine ELISA (sandwich) on herkkä menetelmä, jossa näytettä ei tarvitse puhdistaa ennen määrittystä. Näytteen antigeeni sitoutuu kiinteässä faasissa olevaan vasta-aineeseen. Tämän jälkeen kiinteä faasi pestään, jolloin jäljelle jää mitattavasta antigeenista ja vasta-aineesta muodostuneet kompleksit. Lisätään entsyymileimattu kaksoisvasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin. Jälleen sitoutumaton vasta-aine pestään pois. Substraatti lisätään ja katalysoituneen reaktiotuotteen pitoisuus on suoraan verrannollinen näytteestä mitattavaan analytyttiin. Kaksoisvasta-aine ELISA:ssa antigeenin havaitseva ja sitova vasta-aine voi olla monoklonaalinen tai polyklonaalinen. Monoklonaalisten vasta-aineiden käytön etu on se, että ne tunnistavat herkemmin pienet erilaisuudet antigeenien rakenteessa. Polyklonaaliset vasta-aineet sen sijaan voivat sitoa faasiin paljon enemmän antigeenia. (Sino Biological Inc. 2004-2014c; Halonen 2004a, 94–95.)

Kilpailevaan sitoutumiseen perustuvassa ELISA-menetelmässä näytteen sisältämä antigeeni kilpailee toisen antigeenin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Menetelmän eri sovelluksissa entsyymi voidaan konjugoida joko vasta-aineeseen, joka sitoutuu vapaana tai kiinteässä faasissa olevaan kilpailevaan antigeeniin tai entsyymi voidaan konjugoida myös kilpailevaan antigeeniin. Entsyymileima voidaan sitoa myös sekundaariseen vasta-aineeseen, joka on spesifinen primaariselle vasta-aineelle. Perusperiaate kilpailevaan sitoutumiseen perustuvassa ELISA:ssa on, että mitä vähemmän näytteessä on antigeenia, sitä enemmän vasta-ainetta sitoutuu kilpailevaan antigeeniin ja sitä voimakkaampi kromogeeninen tai fluoresoiva signaali saadaan. (Leinikki 1980, Sino Biological Inc. 2004-2014d.)

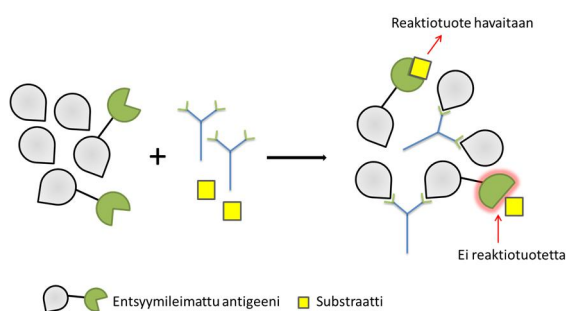
Mikropartikkeli-entsyymi-immunomääritys MEIA (microparticle enzyme immunoassay)

MEIA on heterogeeninen kaksoisvasta-aine menetelmä, jossa vasta-aine tai antigeeni on kiinnitetty mikropartikkeliin (latex-partikkeli). Menetelmällä voidaan määrittää hormoneja ja proteiineja, kuten syöpämerkkiaineita. MEIA soveltuu hyvin pienten sarjojen ja yksittäisten näytteiden analyysiin. Menetelmässä mikropartikkeli kiinnitetään sitojamolekyylisiin, joka voi olla vasta-aine tai antigeeni. Immunokompleksi syntyy, kun näytteen analytytti sitoutuu sitojamolekyyleihin. Immunokompleksien erottamiseen käytetään lasikuitumatriksia, johon kompleksit sitoutuvat pysyvästi mikropartikkeleiden ansiosta. Kompleksien havaitsemiseen käytetään entsyymileimattua vasta-ainetta, joka muodostaa kaksoisvasta-aine-kompleksin immunokompleksin vasta-aineen kanssa. Lasikuitumatriksin pesun jälkeen lopulliseen reaktioseokseen lisätään substraattia, joka entsyymien kanssa katalysoituu fluoresoivaksi yhdisteeksi. Fluoresoivan yhdisteen määrä on suoraan verrannollinen näytteen yhdisteen määrään. (Halonen 2004a, 95; Åkerman ym. 2010a, 85; Wu 2001, 173; Ford 2005, 352, 354.)

Homogeeninen entsyymi-immunomääritys EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique)

EMIT on yksi ensimmäisistä homogeenisista kilpailevan sitoutumisen menetelmistä ja sen yleisiä käyttökohteita ovat lääkeaine-, hormoni- ja metaboliittimääritykset. EMIT-määrityksissä reaktiotuotteita ei tarvitse erottaa toisistaan, vaan ne voidaan mitata suoraan reaktioseoksesta. EMIT-määritys

perustuu merkkiaineena käytetyn entsyymin aktiivisuuteen. Menetelmässä näytteessä oleva analyytin, substraatti ja vasta-aine annostellaan samanaikaisesti mittauskyvetiin. Reaktioseosta inkuboidaan, jonka aikana vasta-aine sitoutuu analyyttiin. Tämän jälkeen lisätään entsyymileimattua antigeeniä, joka sitoutuu ylimääräiseen vasta-aineeseen. Entsyymi-antigeenikompleksissa entsyymiaktiivisuus joko lisääntyy tai vähenee sen sitoutuessa vasta-aineeseen käytetystä entsyymileimasta riippuen. Immunokompleksin muodostus voi esimerkiksi muuttaa entsyymin molekyyliarakennetta, jolloin substraatin sitoutuminen estyy (kuva 9). Kun substraatti on lisätty, entsyymiaktiivisuutta mittaamalla voidaan määrittää vapaan ja immunokomplekseissa olevan entsyymileimatun antigeenin suhde ja sitä kautta näytteessä olevan antigeenin määrä voidaan laskea kalibraatiosuoran avulla. (Halonen 2004a, 96; Gosling 1990; Kricka ym. 1999, 220–221; Rosenthal, Vargas & Klass 1976.)

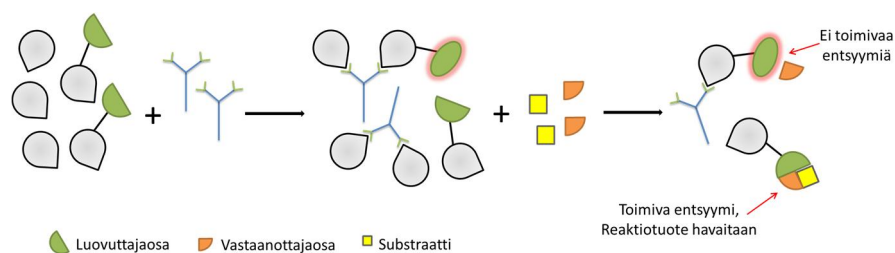


Kuva 9. EMIT -menetelmässä immunokompleksin muodostus muuttaa entsyymin molekyyliarakennetta, jolloin substraatin sitoutuminen estyy.

EMIT-määrittystä käytetään monien pienten molekyylien havaitsemiseen. EMIT-sovelluksilla määrittäminen on alle minuutin ja niillä voidaan havaita pieniäkin analyyttimääriä (<1nM). Yksinkertaisuutensa vuoksi EMIT-menetelmä on helppo automatisoida ja se onkin sisällytetty moniin immunokemiallisiin analyysilaitteisiin. (Kricka ym. 1999, 220.)

CEDIA (cloned enzyme donor immunoassay)

CEDIA on homogeeninen kilpailevan sitoutumisen menetelmä, jolla voidaan havaita näytteestä pienen molekyyliainepainon omaavia analyyttejä. Menetelmää käytetään huumausaineseulonnoissa sekä terapeuttisten lääkeaineiden määrittämisessä. (Jeong, Yang & Andrade 2004; Thermo Scientific 2014; Armbruster, Hubster, Kaufman & Ramon 1995.) CEDIA:ssa antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktio saa aikaan muutoksen merkkiaineen aktiivisuudessa. Siinä geeniteknologisesti valmistetut beeta-galaktosidaasientsyymien inaktiiviset luovuttaja- ja vastaanottajaosat liittyvät toisiinsa, jolloin muodostuu aktiivinen entsyymi. Entsyymien luovuttajaosaan on liitetty antigeeni, joka kilpailee reaktioseoksessa olevan analyytin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Kilpailevan antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen estää luovuttajaosan liittymisen vastaanottajaosaan, jolloin entsyymien muodostuminen estyy (kuva 10). Reaktioseoksen entsyymiaktiivisuutta voidaan suoraan verrata analyytin pitoisuuteen. Jos näytteessä on antigeeniä, se sitoutuu vasta-aineeseen ja kilpailevaan antigeeniin sidottu entsyymi-luovuttajaosa pääsee reagoimaan entsyymi-vastaanottajaosan kanssa saaden aikaan toimivan entsyymin. (Halonen 2004a, 96-97.)



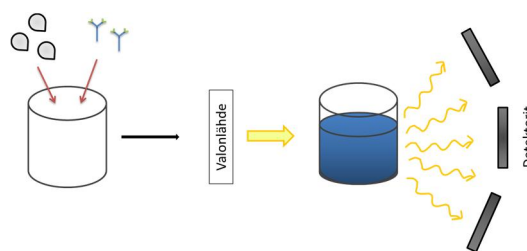
Kuva 10. CEDIA -menetelmässä aktiivinen entsyymi muodostetaan inaktiivisista luovuttaja- ja vastaanottajaosista.

4.2. Immunokompleksien agglutinaatio- ja saostusmenetelmät

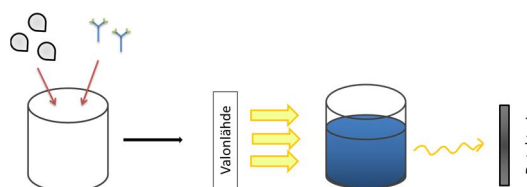
Immunokompleksien suoraan havaitsemiseen perustuvat saostusmenetelmät ovat kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia menetelmiä, jotka perustuvat antigeenin ja vasta-aineen välisessä reaktiossa muodostuvan sakan havaitsemiseen. Antigeenin ja vasta-aineen määrien suhde on reaktion kannalta kriittinen, sillä ylimäärä jompaakumpaa voi heikentää sakkautumista. Agglutinaatiosta puhuttaessa reaktiossa on mukana antigeenien ja vasta-aineiden lisäksi mikropartikkeleita tai soluja. Stabiilit ja yhdenmukaiset partikkelit, puhtaat antigeenit ja spesifiset vasta-aineet ovat saostumisreaktion kannalta olennaisia. (Gosling 1990; Kricka ym. 1999, 223; Halonen 2006, 99.)

Saostumisreaktion aikaansaamiseksi voidaan käyttää antiseerumia, joka voi koostua joko polykloonaalisista vasta-aineista tai yhdistelmästä monokloonaalisia vasta-aineita. Myös yhtä monokloonaalista vasta-ainetta voidaan käyttää antiseerumina. IgM-luokan vasta-aineet pystyvät sitomaan useamman antigeenin kuin IgG-luokan vasta-aineet, ja toimivat siten paremmin saostus- ja agglutinaatiomenetelmissä, sillä ne muodostavat suurempia immunokomplekseja. Myös IgG-luokan vasta-aineita voidaan käyttää, mutta silloin saostumisreaktiota vauhditetaan yleensä kemiallisin menetelmin käyttämällä apuaineita, kuten polymeereja. Reaktiota voidaan myös voimistaa pienentämällä reaktioseoksen ionivahvuutta. (Gosling 1990; Kricka ym. 1999, 223; Halonen 2006, 99.)

Immunokomplekseja voidaan havaita suoraan näytteestä nefelo- ja turbidometrisillä menetelmillä eikä määrittämissä tarvita merkkiaineita (Gosling 1990). Molemmat menetelmät ovat yksinkertaisia, nopeita ja herkkiä. Nefelometria on herkempi mutta myös epävakampi. Nefelometriassa mittaus perustuu valon siroamiseen seoksen partikkeleista ja turbidometriassa valon absorptioon, heijastamiseen ja siroamiseen (kuva 11). (Morais, Tóth & Rangel 2006; Irjala 1981; Åkerman ym. 2010b, 58.) Käytettävä menetelmä valitaan sen perusteella, kuinka näytteessä olevista komplekseista siroaa valoa. Valosäteilyn intensiteetti on riippuvaista partikkeleiden määrästä, koosta ja muodosta sekä säteilevän valon aallonpituudesta. Kun näytteen partikkelipitoisuus on suuri, valon siroaminen on laaja-alaista ja tällöin voidaan käyttää turbidometristä mittaustekniikkaa (kuva 12). Pieniä pitoisuuksia taas on helpompaa mitata nefelometrisesti, jolloin mitataan sironneen valon intensiteettiä mustaa taustaa vasten. (Morais ym. 2006.)



Kuva 11. Nefelometriassa mitataan valon siroamista.



Kuva 12. Turbidometriassa mitataan valon vaimenemista.

Menetelmissä voi esiintyä ongelmia antigeeniylimäärän kanssa, jolloin silloittuminen estyy (ks. sivu 13). Nykyaikaiset analysaattorit havaitsevat antigeeniylimäärätilanteen ja varoittavat siitä. (Halonen 2004b, 71, 99.) Antigeeniylimäärä voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia, minkä takia tarvitaan kontrolli- ja standardinäytteitä. Turbidometrinen ja nefelometrinen menetelmien käyttöä rajoittaa epäsopeus hapteneiden määrittämiseen sekä niiden rajoitettu käyttöalue. (Gosling 1990.)

4.2.1. Nefelometriset menetelmät

Yleisin nefelometrian käyttökohde on antigeeni-vasta-ainereaktioista syntyvän sakan muodostumisnopeuden mittaaminen. Liuksessa olevat antigeeni-vasta-aine-kompleksit hajottavat valoa useissa eri kulmissa valonlähteeseen nähden. Kompleksien valaisemiseen käytetään polarisoitua eli yhdessä tasossa värähtelevää valoa ja sironta mitataan poikkeavassa kulmassa valon kulkusuuntaan nähden. Valonlähteenä voidaan käyttää myös laser-sädettä. (Halonen 2004b, 71; Åkerman ym. 2010b, 58.)

Nefelometriassa korkean intensiteetin valo läpäisee reaktioastian ja fotodetektorit kerää siroavan valon signaalin. Reaktioon tarvitaan vasta-aine, jolla on kaksi tai useampia sitomiskohtia (bivalentti), ja antigeeni jossa on vähintään kaksi epitoppia. Mittaustulokset voidaan lukea kuvaajalta jossa on kolme päävyöhykettä. Ensimmäinen vyöhyke kuvaa alussa olevaa tilannetta, jossa vasta-ainetta on ylimäärin jolloin silloittuminen ja sakanmuodostus on vähäistä. Kun antigeenin määrää lisätään, reaktio siirtyy ekvivalenssivyöhykkeelle, jossa jokainen vasta-aine on kiinnittynyt antigeeniin. Tässä vyöhykkeessä saavutetaan maksimaalinen sakanmuodostus. Kolmannessa vyöhykkeessä antigeenia on ylimäärin, jolloin kaikki vapaa vasta-aine on sidottu eikä sen takia sakkaa enää muodostu. Keskeistä on, että kaikissa nefelometrisissä määrittämissä tulisi toteutua vaiheet vasta-aineylimäärästä ekvivalenssitilanteeseen. Päätepistemäärittämissä saostuman muodostumista mitataan, kun reaktio saavuttaa tasapainon (ekvivalenssivyöhyke) ja kineettisessä mittauksessa mitataan saostuman muodostumisnopeutta käyrän alkuosasta. (Koivunen & Krogsrud 2006.)

Nefelometristä määrittystä voidaan käyttää proteiinien kuten immunoglobuliinien, albumiinin, antitrombiini III:n, fibrinogeenin, reumafaktoreiden ja myoglobiinin määrittämiseen. Nefelometrisia pääte-pistemäärittäyksiä voidaan muokata herkemiksi kytkemällä antigeenit pieniin partikkeleihin. Partikkelivastuksilla nefelometrisillä määrittäyksillä voidaan mitata herkkää C-reaktiivista proteiinia, joka on sydän- ja verisuonitautien merkkiaine. (Koivunen & Krogsrud 2006.)

4.2.2. Turbidometriset menetelmät

Turbidometristä määrittystä voidaan käyttää kvantitatiivisissa lääkeaineiden ja biomarkkereiden määrittäyksissä kehon nesteistä, kuten seerumista, plasmasta tai virtsasta (Koivunen & Krogsrud 2006). Sitä voidaan käyttää myös hyytymisen mittaukseen ja mikrobiologiassa bakteeriviljelmän kasvun seuraamiseen (Halonen 2004b, 72). Turbidometria on yleisesti käytössä myös vierianalyysilaitteissa, joilla mitataan proteiineja, kuten esimerkiksi C-reaktiivista proteiinia (Åkerman ym. 2010b, 58).

Turbidometriassa mittausperiaate on spektrofotometrinen. Siinä mitataan siroamisesta, heijastumisesta tai absorptiosta johtuvaa valon läpäisevyyden alenemista reaktioseoksessa sakan takia, mikä havaitaan absorbanssin muutoksena spektrofotometrillä. Valonsironta mitataan samassa kulmassa valon kulkusuuntaan nähden. Lääkeaineiden tai proteiinien määrittäyksessä käytetään kilpailevaa sitoutumista, jossa lääkeaine- tai proteiinikonjugaatti on kiinnitetty mikropartikkeliin. Agglutinoituminen tapahtuu nopeasti, jos näytteessä on vähän tai ei ollenkaan antigeeniä. (Koivunen & Krogsrud 2006; Halonen 2004b, 71-72.) Turbidometriaa soveltavia menetelmiä ovat muun muassa TINIA ja KIMS.

Turbidometrinen inhibitioimmunomääritys TINIA (Turbidimetric inhibition immunoassay)

TINIA on homogeeninen kilpailevan sitoutumisen menetelmä. Sen avulla voidaan määrittää muun muassa glykoitunutta hemoglobiinia (HbA1c) kokoverestä. Glykoituneen hemoglobiinin määrittämisessä verinäytteet hemolysoidaan ja vapautunut kokonaihemoglobiini mitataan fotometrisesti ennen antigeeni-vasta-aine reaktiota. Anti-HbA1c-spesifistä vasta-ainetta lisätään näytteeseen, minkä seurauksena muodostuu liukoisia vasta-aine-HbA1c-komplekseja. Sen jälkeen seokseen lisätään polyhapteeniliuos, joka reagoi vasta-aineylimäärän kanssa. Näin muodostuneet liukenemattomat kompleksit mitataan turbidometrisesti. (Aksungar, Serteser, Coşkun & Ünsal 2013.) Polyhapteeneilla on lukemattomia epitoppeja, jotka reagoivat vasta-aineen kanssa. Mitä enemmän näytteessä on HbA1c:a, sitä vähemmän muodostuu liukenemattomia polyhapteeni-immunokomplekseja. (Wiener Laboratorios 2004.) TINIA-menetelmän muunnos on PETINIA-menetelmä (Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay), jossa käytetään latex-partikkeleita ja määritettävät analyytit ovat isokokoisia antigeeneja (Gosling 1990; Wu 2001, 172).

Homogeeninen mikropartikkeli-immunomääritys KIMS (Kinetic interaction of microparticles in solution)

KIMS on homogeeninen mikropartikkeliagglutinaatiomenetelmä, jolla voidaan tutkia lääke- ja huumausaineita virtsasta, mm. digoksiinia ja kinidiinia (ISLAB 2014e; ISLAB 2014f). Siinä lääkeaine kil-

pailee sitoutumisesta spesifiseen vasta-aineeseen mikropartikkeliin (latex-partikkeli) sidotun lääkeainekonjugaatin kanssa. Vasta-aineen sitoutuminen lääkeainekonjugaattiin aiheuttaa ristikkorakenteen muodostumisen, jossa vasta-aineen ja latex-mikropartikkelien välillä tapahtuu silloittumista. Syntyvä ristikkorakenne lisää tehokkaasti valon absorbanssia ja sitä mitataan turbidometrisesti. Analyysin pitoisuus on kääntäen verrannollista agglutinaation määrään, koska lääkeaineen esiintyminen virtsassa estää agglutinaation muodostumisen. (Armbruster, Schwarzhoff, Hubster & Liserio 1993; Bertholf & Reisfield 2012, 406–407.)

4.3. Immunokemialliset menetelmät Puijon sairaalan kliinisen kemian laboratoriossa

Puijon sairaalan kliinisen kemian laboratoriossa näytemäärien kannalta tärkein on Cobas analysaattori, johon kuuluu immunologinen yksikkö e601 sekä peruskemian yksikkö c501, joka myös suorittaa joitakin immunokemiallisia analyysyjä. Immunologinen e601 yksikkö perustuu heterogeeniseen magneettipartikkeli ECLIA menetelmään. Peruskemian yksikössä käytetyt immunomääritykset ovat mm. KIMS, CEDIA ja EMIT. Ne ovat homogeenisiä analyysyjä, joilla määritetään mm. C-reaktiivista proteiinia (CRP), antibiootteja ja lääkeaineita, mm. karbamatsepiini, teofylliini, vankomysiini, digoksiini, fenytoiidiini ja buprenorfiini. Laboratoriossa eniten käytettyjä menetelmiä ovat ECLIA ja KIMS, jolla määritetään erityisesti epilepsialääkkeitä. Laboratoriossa on lisäksi erillinen Cobas-analysaattorin yksikkö, joka käyttää immunoturbidometristä TINIA -menetelmää. Yksikköä käytetään pitkäaikaisverensokeri HbA1C -määrityksissä. Määrityksissä käytettävät vasta-aineet ovat yleensä monoklonaalisia. (Halonen 2013.)

Lisäksi kemian laboratoriossa on muutamia immunokemiallisiin menetelmiin perustuvia erikoisanalytiikan laitteita, kuten Abbotin valmistama analysaattori, jossa menetelmänä ovat CLIA ja CMIA. Kyseisillä menetelmillä analysoidaan mm. immunosuppressiivisten lääkkeiden ja aktiivisen B12 -vitamiinin määrää. Fluoresenssiin perustuva analysaattori käyttää FPIA menetelmää, ja sitä pidetään tarkkana ja erityisen hyvänä menetelmänä lääkeaineille. (Halonen 2013.)

Joitakin menetelmiä ei ole automatisoitu, kuten ELISA-menetelmä, ja ne ovat jääneet kliinisestä rutiinikäytöstä kokonaan pois, mutta etenkin yliopistollisissa sairaaloissa ne ovat edelleen tutkimuskäytössä ja tutkimushoitajat käyttävät niitä työkaluinaan määrittäessään mm. soluvälittäjäaineita kuten sytokiineja ja interleukiineja. ELISA on yleisemmässä käytössä mikrobiologian analyysissä, kuten virusvasta-aineiden määrityksessä. (Halonen 2013.)

4.4. Immunokemialliset vieritestit

Kvalitatiivisia immunokemiallisia menetelmiä on useita (mm. geelidiffuusiomenetelmä), mutta niiden vähäisen kliinisen käytön vuoksi, tässä työssä keskitytään pääasiassa vieritesteihin. Laboratoriopalveluiden keskittäminen on johtanut vieritestien eli POC (point of care) -testien yleistymiseen. Määrittysten tekeminen keskittyy suurien yksiköiden keskuslaboratorioihin mutta samaan aikaan tarve tiettyjen tutkimusten nopeille vastauksille säilyy pienemmissäkin yksiköissä. Laboratorioiden lisäksi vieri-

testejä käytetään mm. lääkärin vastaanotolla, ensiavussa, tehohoito-osastoilla, leikkaussaleissa ja ambulansseissa. Vieritestilaitteita on myös potilaiden kotikäytössä. (von Lode 2005; Lewandrowski 2009; Kricka ym. 1999, 210.) Vierianalytiikassa käytettävät tyypillisimmät näyttemateriaalit ovat koveri (ihopistos) ja virtsa. Useimmille vieritesteille sopii verinäyte kapillaarisuonista, mikä helpottaa näytteenottoa. Kuitenkin verrattaessa tuloksia analysaattorien kanssa, jotka usein määrittävät pitoisuuksia plasmasta tai seerumista, olisi hyödyllistä korjata vieritestin tulos hematokriitin suhteen. Kehittyneimmissä vieritesteissä voikin olla mukana keino hematokriitin määrittämiseksi. (von Lode 2005.)

4.4.1. Menetelmät immunokemiallisissa vieritesteissä

Perinteisesti vieritestit ovat perustuneet muihin kuin immunokemiallisiin menetelmiin, mutta viime aikoina immunokemiallisten vieritestien määrä on noussut nopeasti. Immunokemialliset menetelmät ovat mahdollistaneet herkempien ja kvantitatiivisten vieritestien kehittämisen. Immunokemialliset vieritestit eivät ole tyypillisesti kiireellisiä tutkimuksia vaan tähtäävät enemmänkin sairauksien varhaiseen diagnostiikkaan. Esimerkiksi lääkärin vastaanottoaikana tehtävä diagnostiikka voi vähentää uudelleenikäyntien ja puhelinvastaanottojen tarvetta. (von Lode 2005.)

Yleisimmät periaatteet immunokemiallisille vieritesteille ovat immunokromatografiset ja immunosuodatusmenetelmät sekä agglutinaatio. Näissä menetelmissä etuna on se, että tulokset voidaan lukea silmin ja näin niitä voidaan käyttää paikasta riippumatta. Suurin osa testeistä on kvalitatiivisia tai semikvantitatiivisia, mutta testeille on kehitetty myös yksinkertaisia lukulaitteita, jotka perustuvat reflektometriaan ja joiden avulla vieritestauksen kvantitatiivisuutta voidaan parantaa. (von Lode 2005.)

Tällä hetkellä suurin osa immunokemiallisista vieritesteistä perustuu immunokromatografisiin menetelmiin. Ne ovat heterogeenisiä menetelmiä, jotka ovat helppokäyttöisiä, herkkiä ja monikäyttöisiä. Testiliuskat koostuvat tyypillisesti eri materiaalikerroksista ja reagenssit on sidottu omille kohdilleen liuskaa. Liuskoissa on monesti mukana myös tyyny, jonka avulla plasma suodatetaan erilleen koverestä. Analyytti siirtyy näytteen mukana liuskaa pitkin kapillaarivoimien avulla ja kiinnittyy vastaainetta (tai antigeeniä) sisältäviin alueisiin muodostaen näkyvän viivan. Liuskoissa on yleensä erilliset kontrolli- ja testialueet. (von Lode 2005.)

Entsyymileimaa hyödyntäviä immunokromatografisia vieritestejä käytetään hormonien (istukkahormoni hCG, luteinisoiva hormoni LH), virusten (hepatiitti B ja C), bakteerien (*Streptococcus*, *Chlamydia*, *Helicobacter pylori*), bakteerien toksienien, parasiittien (malaria) sekä lääke- ja huumausaineiden määrittämisissä. Niillä voidaan määrittää myös biomerkkiaineita, kuten troponiinia ja prostataspesifistä antigeenia (PSA). (Koivunen & Krogsrud 2006.)

Immunosuodatusmenetelmät ovat niin ikään heterogeenisiä testejä, joissa näyte sekä reagenssit ja pesuliuokset suodatetaan peräkkäin huokoisen kalvon läpi. Kalvoon on kiinnitetty spesifisiä vasta-

aineita näytettä ja kontrollointia varten. Immunosuodatusmenetelmät sisältävät tyypillisesti useita käsin suoritettavia vaiheita, kun näyte ja reagenssit lisätään yksitellen. Myös tässä testissä havaitaan silminnähtävä värireaktio. Immunokromatografiset menetelmät ovat jossain määrin syrjäyttäneet immunosuodatusmenetelmiä yksinkertaisemman käytettävyytensä vuoksi. (von Lode 2005.)

Pinta-antigeenejä omaavat molekyylit agglutinoituvat eli muodostavat sakkaa immunologisten reaktioiden seurauksena (Halonen 2004a, 99). Silminnähtävä sakka voi muodostua, kun immunokompleksissa on mukana suuria rakenteita, kuten soluja tai latex-palloja. Hemagglunaatiosta puhutaan silloin kun antigeenit ovat kiinnittyneinä punasolujen pinnalle. Hemagglutinaatiota sovelletaan mm. veriryhmämäärityksissä, jolloin käytetään punasolujen pinnalla luonnostaan olevia antigeeneja. (Kricka ym. 1999, 223.) Latex-palloja taas käytetään esimerkiksi mikrobiologiassa tehtäessä streptokokki-tyypitystä. Vieritestauksen agglutinaatiomenetelmät ovat yleisempiä hematologian ja mikrobiologian tutkimuksissa ja sen vuoksi niitä ei käsitellä tarkemmin tässä työssä.

4.4.2. Yleisimpiä immunokemiallisia vieritestisovelluksia

Immunokemiallisista vieritesteistä kliinisissä kemian tutkimuksissa yleisimmin käytettyjä ovat raskaustesti, pika CRP testi, huumeeseula, pitkäaikaisverensokerin (HbA1c) pikatesti ja ulosteen veri pikatesti (Halonen 2013; Lewandrowski 2009).

Raskaustestissä mitataan hCG (human chorion gonadotrophin) -hormonia, jota erittyy istukasta raskauden aikana. hCG-hormoni muodostuu kahdesta erilaisesta alayksiköstä, alfa ja beeta. Vieritesti on immunokromatografinen kaksoisvasta-ainetesti ja näytteenä toimii virtsa. Värin muodostava selenium on sidottu anti-alfa-hCG:hen, joka sitoutuu alfa-yksikköön. Testiliuskaan on kiinnitetty anti-beeta-hCG:tä, joka sitoo kompleksin beeta-yksiköstä. Valmis kompleksi muodostaa värillisen viivan, joka tulkitaan positiiviseksi. Testin onnistuminen edellyttää myös kontrolliviivan näkymistä. (Osikowicz ym. 1990.)

Huumevieritesteissä näytteenä käytetään tyypillisimmin virtsaa, ja tällöin mitataan yleensä huumeiden aineenvaihduntatuotteita. Lisäksi voidaan mitata myös varsinaista huumausainetta ja huumeryhmiä esimerkiksi opiaatteja. Toisena vartenotettavana näytevaihtoehtona pidetään sylkeä, josta huumausaineet voitaisiin havaita jo aikaisemmin kuin virtsasta. Vieritestit voivat mitata vain yksittäistä huumausainetta, mutta terveydenhuollossa yleisemmin käytössä ovat useamman aineen paneelit (huumeeseula). Valtaosa testeistä perustuu kilpailevan sitoutumisen menetelmään, ja tällöin, toisin kuin raskaustestissä, näkyvä merkkiviiva muodostuu silloin kun huumausainetta ei ole näytteessä. Toisin sanoen merkkiviivan puuttuessa tulos tulkitaan positiiviseksi. Tämä toteutetaan niin, että huumausaineen konjugaatti on sidottu testiliuskan pintaan ja vasta-aine on vapaana. Kun näytteessä oleva huumausaine sitoutuu vasta-aineeseen, sen sitoutuminen konjugaattiin estyy ja värillistä kompleksia ei synny. (Melanson 2009.)

Ulosteen veri -testiä käytetään suolistoverenvuotojen havaitsemiseen ja siten suolistosyöpien seurlontaan. Uudenaikaisissa testeissä tunnistetaan immunologisesti ihmisen hemoglobiini, jolloin ravinnon kautta saatu veri ei häiritse testiä ja mitään erityisruokavaliota ei tarvitse noudattaa testin takia. (Sanford & McPherson 2009.) Hemoglobiinin lisäksi voidaan tunnistaa myös hemoglobiini-haptoglobiinikomplekseja (Hb/Hp). Hemoglobiinin hajotessa suolistossa haptoglobiini sitoo hemoglobiinin hajoamistuotteita. Näin ollen mitattaessa Hb/Hp -komplekseja, voidaan havaita myös vanhemmat tai ylempänä suolistossa olevat verenvuodot. Testi on immunokromatografinen ja toimii siten, että testiliuska on päällystetty testialueen kohdalta anti-human-Hb- ja anti-human-Hp-vastaaineilla. Liuskan alkupäässä on vasta-ainetta, johon on sidottu värin muodostavia kultamolekyylejä. Suolaliuokseen sekoitettua ulostenäytettä siirretään testikasetille. Jos näytteessä on Hb- tai Hb/Hp-molekyylejä, ne sitoutuvat kulta-vasta-aineeseen ja lopulta testialueella olevaan vasta-aineeseen, jolloin muodostuu näkyvä viiva positiivisen tuloksen merkinä. (Biohit Healthcare 2013.)

CRP:tä mittaavat vieritestilaitteet (mm. QuickRead, Orion Diagnostic) edustavat perinteisen kvalitatiivisen vieritestauksen sijaan pienikokoisia kvantitatiivisia analysaattoreita. Esimerkiksi QuickRead perustuu immunoturbidometriseen määrittelyyn, mutta suuren analysaattorin sijaan testipaketti sisältää pienen lukulaiteen ja kaikki tarvittavat reagenssit valmiina koeputkessa, jonne tarvitsee vain lisätä näyte ohjeiden mukaisesti. Tällaisia laitteita käytetään paljon mm. lääkärin vastaanotoilla selvittäessä infektion aiheuttajaa (virus vai bakteeri) ja mahdollisen antibioottikurin tarvetta. Vastavanlaisia laitteita valmistaa myös Afinion (Alere) sekä Siemens, joiden tutkimusvalikoimaan kuuluu lisäksi mm. HbA1c. Siemensin DCA Vantage -pika-analysaattorilla HbA1c:n määrittäminen perustuu homogeeniseen latex-agglutinaatioreaktioon, jossa vasta-aineena toimii monoklonaalinen vasta-aine, joka tunnistaa HbA1c-molekyylissä olevan glykoituneen aminohapposekvenssin. (Sanchez-Mora ym. 2011.)

4.4.3. Vieritestien käytettävyys ja luotettavuus

Vieritestien käyttöön vaikuttavat kaksi pääasiallisia, käytettävyys ja luotettavuus. Käytettävyys nousee tärkeään rooliin, koska usein testejä käyttävät henkilöt eivät ole laboratorioden henkilökuntaa, ja testin käyttämisen on oltava helppoa. Vieritestien käytettävyyteen liittyy myös tulosten saamisen nopeus. (von Lode 2005.)

Testien on oltava luotettavia, koska niiden perusteella tehdään hoitopäätöksiä. Luotettavuuteen kuuluu mm. tarkkuus, pieni häiriöalttius ja tulosten toistettavuus. (von Lode 2005.) Haasteena on myös henkilökunnan kouluttaminen vieritestien oikeaoppiseen käyttöön. Vieritestaus on yleisesti kalliimpaa kuin laboratorioautomaatiolla suoritettavat analyysit materiaalikustannusten ja työläytensä takia. Sen vuoksi on mietittävä tarkkaan, mitä vieritesteillä kannattaa määrittää, jotta saatava hyöty on suurempi kuin kasvaneet kulut. Myös laatu ja luotettavuus on otettava huomioon. Analytiikan käyttöönotto ja käytön opastus on tapahduttava koulutetun henkilön valvonnassa. (Lee-Lewandrowski & Lewandrowski 2009; Åkerman ym. 2010a, 81.)

4.5. Immunokemiallisissa määrityksissä esiintyvät virhelähteet

Immunokemiallisten määritysten etuna on, että ne ovat spesifisiä ja analyttiin verrattuna samankaltaisten molekyylien läsnäolo näytteessä ei yleensä häiritse määrittystä. Menetelmät eivät kuitenkaan ole täysin häiriöttömiä ja häiritsevät tekijät voivat aiheuttaa joko liian pieniä tai liian suuria tuloksia. Mahdollisten virhelähteiden vaikutusmekanismi on yleensä tarkoitettua immunoreaktiota tavalla tai toisella estävä. (Stenman & Hämäläinen 2010.)

Hormonimäärityksissä ongelmia voivat aiheuttaa potilaan oman komplementtijärjestelmän osat ja reumafaktori, jotka voivat häiritä antigeenin ja vasta-aineen tasapainoreaktiota tai estää sitoutumista. Hormonien määrittystä voi häiritä myös hormonin liian tiukka sitoutuminen kantajaproteiiniin, ristireaktiot lääkeaineiden kanssa tai hormonien eristeiset muodot. Immunomääritysten ristireaktiot johtuvat siitä, että jotkin vasta-aineet osoittavat ristireaktiivisuutta muidenkin molekyylien epitoppeja kohtaan. Hormonimäärityksissä virheellisiä tuloksia on arvioitu esiintyvän 1 % verran. (Stenman & Hämäläinen 2010; Koivunen & Krogsrud, 2006.)

Muita virhelähteitä aiheuttavia tekijöitä immunokemiallisissa määrityksissä voivat olla näytteessä esiintyvät proteiinit, lipidit, hiilihydraatit ja suolat sekä potilaan muodostamat heterofiiliset vasta-aineet, hiirivasta-aineet ja autovasta-aineet (Stenman & Hämäläinen 2010). Heterofiiliset vasta-aineet ovat potilaan omia vasta-aineita, jotka voivat sitoutua toisista lajeista peräisin oleviin vasta-aineisiin (Gosling 1990). Hiirivasta-aineet muodostuvat monoklonaalisia vasta-aineita kohtaan ja autovasta-aineet potilaan omia antigeeneja kohtaan (Stenman & Hämäläinen 2010). Myös kontaminaationa reagensseissa esiintyvät entsyymit voivat olla häiritseviä tekijöitä (Gosling 1990). Hookvaikutuksella immunologisissa menetelmissä tarkoitetaan tilannetta, jossa mitattavan antigeenin pitoisuus on hyvin korkea (antigeeniylimäärä) ja antigeeni-vasta-aine-kompleksin muodostuminen häiriintyy. Tämä voi olla syy virheellisen mataliin pitoisuuksiin joissain immunomäärityksissä. (Stenman & Hämäläinen 2010, Kricka ym. 1999, 217.)

Määrityksissä esiintyviä häiriöitä voidaan välttää vasta-aineiden ja merkkiaineiden huolellisella valinnalla, puskurin optimoinnilla sekä käyttämällä reagensseja joiden epäspesifinen sitoutuminen on vähäistä. Puskuriliuoksilla voidaan vaikuttaa näytteessä olevien proteiinien aiheuttamaan häiriöön ja epäspesifistä sitoutumista voidaan estää käyttämällä vasta-aineita, joista puuttuu erityisesti komplementtia sitova Fc-osa. (Gosling 1990.) Näytteiden laimentaminen tai analyysin suorittaminen uudelleen on hyödyllistä epäiltäessä häiriöistä aiheutuvia liian suuria tai pieniä analyyttipitoisuuksia. Näytteen laimentaminen voi korjata esimerkiksi liiasta suolapitoisuudesta johtuvia virheitä. Hookilmiö voidaan välttää suunnittelemalla analyysi huolellisesti sekä lisäämällä siihen pesuvaiheita ennen vasta-aineiden lisäyksiä. Mikäli menetelmässä on kuitenkin mahdollisuus hookvaikutukseen, usein paras tapa varmistaa epäilyttävä tulos on suorittaa uusintamääritys laimennetuista näytteistä. Mahdollisten hiiri- tai heterofiilisten vasta-aineiden poistamiseksi näytteestä voidaan käyttää kaupallisia vasta-ainepreparaatteja. (Stenman & Hämäläinen 2010; Kricka ym. 1999, 217.) Taulukossa 1 on kuvattu immunokemiallisten menetelmien virhelähteet ja niihin vaikuttaminen.

Taulukko 1. Immunokemiallisten menetelmien yleisimmät virhelähteet ja niihin vaikuttaminen.

Häiriötekijä	Ratkaisu
Näytteessä esiintyvät proteiinit, lipidit, hiilihydraatit ja suolat	Puskuriliuoksen optimointi, näytteen laimentaminen
Komplementtijärjestelmän osat ja reumafaktori Potilaan muodostamat heterofiiliset vasta-aineet, hiirivasta-aineet ja autovasta-aineet	Käytetään reagensseja, joiden epäspesifinen sitoutuminen on vähäistä Hiiri- tai heterofiilisten vasta-aineiden poistaminen kaupallisilla vasta-ainepreparaateilla Vasta-aineiden huolellinen valinta
Ristireaktiot lääkeaineiden kanssa	Vasta-aineiden huolellinen valinta
Antigeeniylimäärä	Näytteen laimentaminen

Toistettavuus immunokemiallisilla menetelmillä ei ole niin hyvää kuin peruskemian menetelmillä. Spektrofotometriseen havaitsemiseen perustuvilla immunokemiallisilla menetelmillä häiritseviä tekijöitä ovat samat kuin peruskemiankin; hemolyysi, ikteerisyys ja lipeemisyys (HIL indeksi). Analyysit ovat kuitenkin kehittyneet jo sen verran, että häiritsevistä Hook-efektistä, jossa analyytin korkea pitoisuus häiritsee immunokompleksien muodostumista, on päästy pitkälti eroon. Näytteistä voidaan tehdä edelleen käsilaimennoksia, mutta ne aiheuttavat jonkin verran epätarkkuutta tuloksiin. Huumausaineiden analytiikassa huumeen suuri pitoisuus näytteessä aiheuttaa sen, että mittaustulos ei sijoitu kalibraatioalueelle. Tulos voidaan kuitenkin tulkita positiiviseksi. (Halonen 2013; Stenman & Hämäläinen 2010.)

4.6. Tulevaisuuden näkymät immunokemiallisten menetelmien sovelluksissa

Tulevaisuudessa uudet sovellukset parantavat immunomääritysten herkkyyttä. Yksi suuntaus menetelmien kehityksessä on multiplex-määritykset, joiden avulla voidaan määrittää useampia, yhteisiä tekijöitä omaavia analyyttejä samanaikaisesti, mm. sytokiineja, autoimmuunisairauksien merkkiaineita ja patogeeneja. (Wu 2006.) Immunomääritysten uudemmissa ja kehitteillä olevissa sovelluksissa käytetään mm. immunoblottausta (western-blotting) ja immunoblottauksen yhdistelmiä, joilla osoitetaan vasta-aineita potilaan näytteestä tiettyjä proteiiniantigeeneja kohtaan, lateral flow -immunokromatografiaa, jota hyödynnetään esimerkiksi vieritesteissä, sekä kvanttipisteitä ja magneettileimoja. Erityisesti mikrobiologisiin immunomäärityksiin on luvassa päivityksiä. (Magi & Liberatori 2005, 228; Josko 2012.)

Kvanttipisteet ovat nanokristalleja joiden ydin on puolijohteista materiaalia, jota ympäröi toinen puolijohde. Ne ovat epäorgaanisia fluoroforeja, joiden emission aallonpituus on kvanttipisteen koosta riippuvainen. Niiden fluoresenssi-ominaisuudet ovat hyvät, sillä kvanttipisteet fluoresoivat kirkkaasti ja kestävät hyvin valosäteilyä ilman, että niiden rakenne muuttuu. Immunomäärityksissä kvanttipisteitä on käytetty esimerkiksi prostataspesifistä antigeenia määritettäessä sekä mikrobiologisissa mul-

tplex-määrityksissä, joissa vasta-aineet on konjugoitu erikokoisiin kvanttipisteisiin, jotka emittoivat eri aallonpituuksilla. (Azzazy, Mansour & Kazmierczak 2007.)

Magneettipartikkeleita on käytetty mittaamaan antigeenipitoisuutta (MIA, magneto immunoassay). Niiden käyttö analyseissä on saanut suosiota, koska niiden syntetisointi ja pintakäsittely on helppoa. Mitattavat partikkelit tai solut voidaan leimata superparamagneettisilla nanopartikkeleilla, jotka reagoivat voimakkaasti ulkoisessa magneettikentässä. Superparamagneettisissa materiaaleissa on suuri määrä atomiryppäitä (klustereita) joiden magneettiset dipolit suuntautuvat yhdensuuntaisesti kohti ulkoista magneettikenttää tehostaen sitä. (Kim & Ligler 2010; Larsson, Kriz & Kriz 1999.)

Tulevaisuudessa mikromittakaavan välineistö tulee lisäämään määritysten herkkyyttä ja suoritustehokkuutta. Kvanttipisteitä ja fluoresoivia nanopartikkeleita hyödyntävien menetelmien nopea kehittyminen tuottaa lisää määrityksiä, joilla voidaan tutkia useita analyyttejä samanaikaisesti. (Koivunen & Krogsrud 2006.) Kehitystä tapahtuu myös menetelmissä, joissa vasta-aineita leimataan DNA:lla. Oligonukleotidejä ja magneettin nanopartikkeleita hyödyntävien menetelmien herkkyyks antaa paremmat mahdollisuudet joidenkin antigeenien havaitsemiseen potilaan näytteestä kuin perinteiset immunomääritykset. Niiden avulla on voitu esimerkiksi osoittaa potilaan näytteestä merkkiaineita, jotka liittyvät Alzheimerin tautiin. (Wu 2006.)

5. KEHITTÄMISTYÖ OPINNÄYTETYÖNÄ

Opinnäytetyömme on toiminnallinen opinnäytetyö ja se tehtiin kehittämistyönä Savonia-ammattikorkeakoululle. Toiminnallinen opinnäytetyö on vaihtoehto tutkimukselliselle opinnäytetyölle. Siinä yhdistyy teoria ja käytäntö. Toiminnallisen opinnäytetyön tuloksena syntyy jokin tuotos, esimerkiksi ammatilliseen käytäntöön suunnattu ohje, ohjeistus tai opastus. Tuotos voi olla myös vaikka tapahtuma tai konkreettinen tuote alasta riippuen. Yhteinen piirre tuotokselle on alasta riippumatta, että sen tulee ilmentää työn tavoiteltuja päämääriä. (Vilka & Airaksinen 2003, 9, 51.) Kehittämistyö on toimintaa, jonka avulla luodaan uusia tai parannetaan olemassa olevia tuotteita, palveluja, välineitä tai menetelmiä. Kehittämistyön lähtökohtana on tarve jonkin asian kehittämiseen, uusien asioiden esille saamiseen tai uusien ratkaisujen löytymiseen olemassa olevaan ongelmaan. (Heikkilä, Jokinen & Nurmela 2008, 21, 60.)

5.1. Kehittämistyön prosessi

Terveystieteiden tutkimuksessa on yleistä, että jonkin palvelun tai menetelmän kehittäminen organisoidaan toteutettavaksi määräaikaisena hankkeena, jonka tavoitteena on saavuttaa määritelty tavoite etukäteen määritellyn ajanjakson aikana. Kehittämistyö voi kohdistua tarkasti rajattuun ilmiöön, jolloin se on kestoltaan lyhytaikainen. Pitkäkestoiset, useita vuosia kestävät hankkeet ovat puolestaan laajoja ja niiden tavoitteena on jonkin toimintatavan tai palvelun muuttaminen paremmaksi. Ammattikorkeakouluissa valmistuvat opinnäytetyöt ovat merkittävä osa työelämän kehittämistä. Opinnäytetöitä voidaan tehdä osana laajempaa kehittämishanketta tai jonkin yksittäisen tarkkarajaisen ongelman ratkaisemiseksi. (Heikkilä ym. 2008, 56.)

Kehittämistyö tehdään vaiheittain ja sen vaiheita ovat ideointi ja esisuunnittelu, suunnittelu, käynnistyminen, toteutus, päättäminen, arviointi, käyttöönotto, seuranta ja tavoiteltu tulos. Tärkein kehittämistyön yksittäinen vaihe on suunnittelu, koska hyvällä suunnittelulla säästetään aikaa ja vältetään monenlaisia ongelmatilanteita. Suunnittelun avulla mahdollistetaan oikeiden asioiden tekeminen oikeaan aikaan ja arvioidaan aikataulua. Hyvä suunnitelma osoittaa kehittämistyön tavoitteet ja mitä kehittämistyössä tehdään. Kehittämistyön luonteesta johtuen suunnitelmaa voi kuitenkin joutua tarkistamaan ja muokkaamaan työprosessin edetessä. (Heikkilä ym. 2008, 58, 68-69.)

Varsinainen työskentely tapahtuu kehittämistyön toteutusvaiheessa, silloin suunnitelma pannaan täytäntöön. Toteutusvaiheessa tehtäviä on paljon ja ne etenevät sykleittäin. Toteutusvaiheen tehtäviä ovat esimerkiksi olemassa olevan tiedon kerääminen eri lähteistä, dokumentointi ja viestintä. Kehittämistyössä on tärkeää hyödyntää jo olemassa olevaa tietoa, jolle rakennetaan omaa toimintaa. Olemassa olevan tiedon hyödyntämiseen vaaditaan tiedon systemaattista keruuta ja kerätyn tiedon kriittistä arviointia. Viestintä on tärkeä osa kehittämistyön prosessia ja viestintäkulttuurin tulisi olla avoin ja eri vaihtoehtoja pohtiva. Toimivien viestintäyhteyksien rakentaminen kehittämistyöhön osal-

listuvien välille on tärkeää, koska viestinnän avulla kaikki, työn tilaaja mukaan lukien, pysyvät perillä kehittämistyön etenemisestä. (Heikkilä ym. 2008, 99, 104, 115, 117.)

Kehittämistyönä tehtyä raporttia ja tuotosta arvioidaan sekä toteutusvaiheessa, että päätösaiheessa. Toteutuksen aikana arvioidaan työn etenemistä ja päätösaiheessa toimintaa ja tuloksia. Opin- näytetyönä tehtävän kehittämistyön raportin arviointi voidaan tehdä opinnäytetyön vaatimusten näkökulmasta ja arvioinnissa korostuu perustelut aiheen valinnalle ja tarpeellisuudelle, työelämän kehittämisen ja oman ammatillisen kehittymisen näkökulmat sekä tehtävän rajauksen ja tavoitteiden asettamisen onnistuminen. Kehittämistyön tuotoksesta arvioidaan pääasiassa kuinka se vastaa tavoitteisiin ja käytännön ongelmaan. (Heikkilä ym. 2008, 127, 130.) Savonia-ammattikorkeakoulun arviointikriteerien (2013) mukaan opinnäytetyössä arviointi kohdistuu prosessin hallintaan ja asiantuntijuuteen sekä opinnäytetyön tuotosten hyödynnettävyyteen. Prosessin hallintaan ja asiantuntijuuteen liittyen opinnäytetyössä arvioidaan muun muassa kehittämiskohteen valintaa perusteluineen, kehittämiskohteen rajausta ja sisällöllisiä valintoja, tavoitteiden asettamista ja työprosessin etene- mistä sekä asiantuntijuuden kehittymistä. Opinnäytetyön tuotosten hyödynnettävyyden kannalta arvioidaan tuotoksen laadukkuutta ja työelämälähtöisyyttä, työn pohdintaosuuden kattavuutta sekä raportin ja tuotosten sisältöä, jäsentelyä ja ammatillista ilmaisua. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2013.)

5.2. Kehittämistyön tavoitteet ja tarkoitus

Tämän kehittämistyön tarkoituksena on tuottaa oppimateriaalia bioanalytiikan opiskelijoille posterin muodossa. Posterit sisältää ydinasiat kliinisen kemian analytiikassa käytettävistä immunokemiallisista menetelmistä selkeästi ja oppimista edistävällä tavalla esitettyinä. Posterit sijoitetaan Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan harjoitusluokkatilaan.

Kehittämistyön tavoite on tukea bioanalytiikan kliinisen kemian opintoja ja edistää ammatillista tietämystä yhdestä bioanalytiikan erikoisosaamisalueesta. Perehtyminen näihin menetelmiin edesauttaa työhön oppimista muun muassa kliinisen kemian laboratorioissa.

5.3. Kehittämistyön ideointi ja suunnittelu

Immunokemiallisia menetelmiä käsitellään kliinisen kemian opintojaksolla ammattiopinnoissa ja immunologiaa omalla kurssillaan perusopinnoissa bioanalytiikan koulutusohjelmassa. Ideoimme opinnäytetyön aiheen itse. Aihe on tarpeellinen, koska sen avulla voidaan edistää ammatillista tietämystä ja erikoisosaamista. Opinnäytetyössä perehdytään opintojaksosisältöjä tarkemmin immunokemiallisiin analyysimenetelmiin. Aiheen valintaan vaikutti myös tekijöiden oma kiinnostus aihetta kohtaan. Kyseiset menetelmät ovat laajalti kliinisessä käytössä, joten niiden tarkempi tunteminen on hyödyksi opiskelijoille.

Kehittämistyön tarkoituksena oli tuottaa oppimateriaalia posterin muodossa, joten suunnittelu aloitettiin siitä, miten posterit olisi hyvä toteuttaa ja minkälaisia mahdollisuuksia se antaa oppimateriaalina. Tutustuttuamme hyvän posterin ja oppimateriaalin ominaisuuksiin, aloimme tehdä posteria teoretietomme pohjalta niin, että saimme sisällytettyä oppimisen kannalta olennaisimmat asiat rajattuun tilaan.

5.3.1. Hyvän posterin ominaisuuksia

Posterit ovat tutkimus- ja kehittämistyön julkistamiseen ja tulosten esittelyyn käytettävä apuväline. Ne ovat ulkomuodoltaan juliste tai tietotaulu, jota voi hyödyntää muun muassa opinnäytetyön esityksissä tai konferensseissa, joissa se voi toimia johdantona tutkimusaiheeseen. (Kajaanin ammattikorkeakoulun www-sivut 2014.) Posterin avulla on mahdollista visualisoida esimerkiksi tutkimuksen keskeinen anti tai esitellä muuta osaamista. Olennaista on, että informaatio ja kuvat sekä graafiset elementit muodostavat tehokkaan kokonaisuuden. (Silén 2013.)

Posterin tarkoituksena on tutustuttaa lukijansa uuteen asiaan ja sen myötä jakaa tietoa. Posterin avulla on mahdollista tavoittaa suuria väkimääriä, koska se voi olla esillä pitempiäkin ajanjaksoja. Posterit ovat käyttökelpoinen väline useille eri tieteenaloille, joskin luonnontieteiden parissa tieteellisiä postereita on tuotettu kaikista pisimpään. (Silén 2013.)

Postereita on erilaisia riippuen niiden käyttötarkoituksesta. Tieteellinen posterit kuvaavat tutkimuksen kokonaisuutta ja sen tuloksia ja sisältää yleensä johdannosta, menetelmistä, tuloksista ja pohdinnasta. Posterin loppuun kuuluvat myös käytetyt lähteet, mahdolliset kiitokset ja tekijöiden yhteystiedot. Käytännöllinen/ammattillinen posterit ovat sisällöltään vapaamuotoisempia ja sillä voidaan kuvata esimerkiksi jonkin potilasryhmän ohjaustoimintaa tai kehittämishankkeen kokonaisuutta. Mainostava posterit tavoittelevat esimerkiksi kehitetyn tuotteen uutuuden ja myytävyyden esilletuontia, jolloin laadukkaat kuvat nousevat tekstiä tärkeämmiksi. (Kajaanin ammattikorkeakoulun www-sivut 2014; Leinonen & Särkämö 2007.)

Posterit ovat kirjallinen julkaisu, jolla on jokin viesti. Julkaisun viesti syntyy teknisten ominaisuuksien lisäksi julkaisun ulkoasusta ja siihen liittyvistä valinnoista. Ulkoasu suunnittelun lähtökohtia ovat typografia, kuvasuunnittelu, värit, taitto ja sommittelu sekä paperin valinta. Ulkoasu on julkaisun eisanallista viestintää ja sen ajatellaan antavan julkaisun viestille mm. sen ilmeet, eleet ja painotuksen. Julkaisun ulkoasun tulee tukea viestin välittymistä eteenpäin ja visuaalisen suunnittelun avulla varmistetaan viestin perillemeno. (Pesonen 2007, 2.)

Posterin suunnittelussa tärkeintä on sen sisältö. Tarkoitus ei ole esitellä sanasta sanaan esimerkiksi koko opinnäytetyötä, vaan poimia sieltä tärkeimmät ydinajatuksia. (Cranor 1996.) Posterin suunnittelussa tulee miettiä muun muassa sellaisia seikkoja, kuten mitä sillä halutaan kertoa, paljonko tilaa on käytettävissä ja minkä verran sallitaan rahallisia kustannuksia. (Hess, Tosney & Liegel 2013.)

Posterin ulkoasun tulisi sisältää sekä tekstiä, kuvia että kuvaajia ja jotta katsojan huomio kiinnittyisi posteriin, sen tulisi sisältää huomiota herättävä otsikko. Tekstin määrä tulisi pitää minimaalisena ja kooltaan niin suurena, että sen lukeminen onnistuu 1-2 metrin päästä. Otsikoilla ja kappalejaolla helpotetaan lukijaa, jotta hän löytää nopeasti etsimänsä tiedon. Posterista tulisi nopeasti nähdä pääkohdat ja niiden sisällön tulisi painottua kuviin ja kuvaajiin, jotta posterit olisi nopeasti luettavissa. Kuvien tehtävä posterissa on tukea tekstiä ja tuoda lisäinformaatiota ja niiden suunnittelussa on hyvä muistaa, että yksinkertaiset kuvat ovat parempia kuin monitasoiset ja kirjavat. Valkoista tilaa kannattaa käyttää eri osioiden järjestelyyn ja värien kanssa tulee olla tarkka. Kahdesta kolmeen eri väriä on riittävästi ja tekstin ja taustan kontrastiin tulee kiinnittää huomiota, tummaa tekstiä vaalealla pohjalla on helpoin lukea. Kirkkaat värit väsyttävät silmän. Posterista tulee löytyä tekijän tiedot. (Hess 2010; Alley 2008; Leinonen & Särkämö 2007.)

5.3.2. Posterin soveltuminen oppimateriaaliksi

Oppiminen on sekä tietoinen että alitajuntainen prosessi, jossa ihminen työstää eri aistikanavilta saatua tietoa. Oppimiseen kuuluu monia eri tekijöitä, kuten esimerkiksi oppimistilanne, tilanteeseen liittyvät henkilöt (mm. opiskelija ja opettaja), vuorovaikutus, oppimistehtävä, oppimisympäristö sekä oppimisvälineet. (Kauppila 2003, 17.) Oppimista voidaan ajatella henkisen pääoman kartuttamisena ja oppimisen myötä syntyvää osaamista hyödykkeenä. Tätä hyödykettä taas tarvitaan työhön ja työllistymiseen, joten henkilö, jolla on ammattitaitoa ja osaamista, on vahvoilla työelämän markkinoilla. Oppimisen kautta sopeutuminen myös uusiin tilanteisiin ja uusien tietojen ja taitojen omaksuminen mahdollistuu. Voidakseen toimia tarkoituksenmukaisesti muuttuvassa maailmassa, henkilön kyky oppia on erittäin tärkeää. (Kokkinen, Rantanen-Väntsi, Tuomola & Breitenstein 2008, 7.)

Oppimateriaali on oppiainesta sisältävä tietolähde ja sen ydintehtävä on saada aikaan käyttäjässään sellaisia elämyksiä ja oppimiskokemuksia, joista syntyy tavoitteiden mukaisia ja pysyviä tietojen ja taitojen muutoksia. Pedagogisesti hyvän oppimateriaalin päämäärä on ensisijaisesti rikastuttaa käyttäjänsä kognitiivista tietämystä. Oppimateriaaleja voidaan ryhmitellä mm. auditiivisiin (kuuloaistiin perustuvat), visuaalisiin (näköaistiin perustuva), audiovisuaalisiin (sekä kuulo- että näköaistiin perustuva) ja digitaalisiin opetusvälineisiin. Hyvä oppimateriaali etenee asiasisällöltään järkevästi ja se jaksottaa ja painottaa opittavaa ainesta tarkoituksenmukaisesti. (Uusikylä & Atjonen 2005, 164–165, 167–169, 177; Kokkinen ym. 2008, 20.)

Tämän opinnäytetyön tuotos on posterit, jotka sijoitetaan Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman tiloihin, jossa se toimii bioanalyttikko-opiskelijoiden oppimateriaalina tuke-
massa klinisen kemian opintoja. Päädyimme posteriin sen takia, että aihealueessa on paljon asiaa ja kirjallinen opas olisi liian työläs lukea. Video taas on vaikea toteuttaa pelkästään kirjallisuusaiheesta ja videot jäävät monesti käytännössä varsin vähälle käytölle.

5.4. Kehittämistyön toteuttaminen

Aloitimme opinnäytetyön teon ensimmäisen opiskeluvuotemme loppupuolella, toukokuussa 2013 ja suunnittelimme sen valmistuvan keväällä 2014. Opinnäytetyön ja samaan aikaan suoritettavien muiden opintojen yhteensovittaminen osoittautui kuitenkin hieman ennalta suunniteltua vaivalloisemmaksi, joten työn valmistumisaikataulu siirtyi syksylle 2014.

Opinnäytetyön toteutus alkoi aineiston hankinnalla. Lisäinformaatiota saimme opintokäynniltämme Puijon Islabin laboratoriosta. Yhtä aikaa aineiston hankinnan kanssa kokosimme raporttimme teoriaosaa. Raporttia teimme internetselaimessa Google Drive -ohjelman avulla, koska se mahdollisti yhden tiedoston muokkaamisen meiltä kaikilta kolmelta yhtä aikaa. Posterin suunnittelun aloitimme vasta kun teoriaosuus oli lähes valmis.

5.4.1. Aineiston hankinta ja kehittämistyön teoriaosuuden kokoaminen

Aloitimme aineiston hankinnan yhdessä Savonia AMK:n informaattikon kanssa. Olimme kartoittaneet etukäteen sopivia hakusanoja tiedonhakuja varten ja etsineet tietoa kursseilla käytetyistä oppikirjoista. Tiedonhaussa keskityimme alussa katsausartikkeleiden etsimiseen, sillä tietoa oli tarjolla hyvin paljon. Käytimme hyväksi myös MeSH -asiasanoja. Myöhemmin etsimme lisää aineistoa itsenäisesti ja hyödyllistä aineistoa keräsimmekin vähitellen koko opinnäytetyöprosessin ajan. Haussa käytimme mm. Nelli-portaalia, Pubmedia ja Google scholaria. Oppikirjoja ja opinnäytetöitä etsimme Aapelin kautta. Jo hakuvaiheessa pyrimme rajaamaan valitsemiamme artikkeleita sen perusteella, että ne koskivat kliinisiä sovelluksia. Hyödynsimme myös paljon keskeisimpien oppikirjojen (mm. Tietz Textbook of Clinical Chemistry) ja katsausartikkelien kattavia lähdeluetteloita. Teoriaosuutta varten haimme tietoa pääasiassa englanninkielisillä termeillä. Kohdensimme hakua niin, että hakusanoja käytettiin pääasiassa aiheella tai nimekkeellä hakemiseen, jolloin jo julkaisujen otsikoiden perusteella voitiin valikoida sopivaa aineistoa. Uusiin aineistoihin perehdyttiin kirjoittamisen ohessa.

Hakusanoina käytimme muun muassa: *immunochemical assay*, *immunoassay*, tutkimusmenetelmien nimet (esimerkiksi *ELISA*, *radioimmunoanalyysi*), *immunologiset reaktiot*, *lääkeainemääritykset*, *huumausainemääritykset*, *hormonimääritykset*, jne.

Opinnäytetyön suunnitteluvaiheessa teimme tutustumiskäynnin Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Puijon sairaalan kliinisen kemian laboratorioon 14.11.2013. Laboratorion apulaisylikemisti esitteli kliinisen kemian analytiikassa käytettävien immunokemiallisten menetelmien periaatteita ja laitteita, joiden analyysit perustuvat immunokemiallisiin reaktioihin. Tutustumiskäynnin tavoitteena oli saada vastauksia seuraaviin aihealueisiin.

- Mitä immunokemiallisia menetelmiä on nykyään yleisesti kliinisessä käytössä?
- Mitkä ovat kyseisten menetelmien periaatteet ja minkälaisia työturvallisuusnäkökulmia niihin liittyy?

- Mitkä ovat merkittävimmät virhelähteet?
- Minkälaisia immunologisia pikatestejä on käytössä?

Aloitimme teoriaosuuden rakentamisen miettimällä ensin aiheeseen liittyviä kokonaisuuksia, joita voisimme käyttää pääotsikkoina. Helpointa oli lähteä liikkeelle eri menetelmistä ja koota niitä kokonaisuuksiksi (esim. entsyymi-, fluorensenssi-, radioisotooppimenetelmät -> leimamentelmät). Taustalle halusimme kasata pohjatietoa immunologiasta ja immunokemiallisista reaktioista, jotta lukijan olisi helpompi ymmärtää menetelmien periaatteita. Jaoimme eri kokonaisuuksia niin, että jokainen etsi tietoa ja kirjoitti raporttia pääasiassa oman osa-alueensa osalta. Valmista tekstiä pohdimme sitten yhdessä ja pyrimme opettamaan eri osa-alueiden tietoa toisillemme. Sitä mukaan kun tekstiä valmistui, yritimme miettiä mitä muuta tietoa kokonaisuuteen kannattaisi sisällyttää, jotta siitä saataisiin mahdollisimman ehyt ja kattava tietopaketti. Päädyimme lisäämään tietoa muun muassa virhelähteistä, historiasta ja tulevaisuudesta.

5.4.2. Posterin toteuttaminen ja arviointi

Tämän kehittämistyön tuotoksena syntyvä posterit on tieteellisen ja ammatillisen posterin välimuoto. Se on sisällöltään informatiivinen ja perustuu kirjallisuuteen ja tutkimustietoon, mutta koska emme työssämme tuota uutta tutkimustietoa, posteria ei voi luokitella suoraan tieteelliseksi (ks. Kajaanin ammattikorkeakoulun [www-sivut 2014](#); Leinonen & Särkämö 2007). Koska posterit tulee oppimateriaaliksi opiskelijoille, mielestämme on tärkeää, että se on helppolukuinen ja -tajuinen, varsinkin koska aihe on haastava. Mielestämme oli perusteltua tehdä posterista vähän vapaamuotoisempi ja näin ollen eräänlainen välimuoto tieteelliselle ja ammatilliselle posterille.

Posterissa käsiteltäviksi menetelmiksi valitsimme sellaisia menetelmiä, jotka ovat käytössä klinisissä laboratorioissa tällä hetkellä. Pohjana tälle käytimme tietoa siitä, mitä analyysejä ISLAB:n klinisen kemian laboratoriossa tehdään. Tiedon tiivistäminen raportista posteriin oli haastavaa, koska oleellisia asioita on paljon, mutta posterissa tilaa on vain vähän. Päätimme käyttää mahdollisimman paljon kuvia, koska ne jäävät helpommin mieleen ja ovat ehkä nopeammin ymmärrettävissä. Kuvien suunnittelun haasteena oli tehdä niistä yksinkertaisia mutta informatiivisia. Tekstiä tuli posteriohjeisiin nähden melko paljon, mutta perustelemme sitä sillä, että informaation ymmärrettävyys olisi kärsinyt, jos tekstiä olisi jätetty vähemmälle. Kyseessä on kuitenkin oppimateriaali, joten myös posterista saatava hyöty olisi kärsinyt tekstin vähentämisestä.

Posterit suunniteltiin A0-kokoiseksi ja tekemiseen käytettiin Microsoft Office Power Pointi:a. Pohjaväriksi valitsimme harmaan värin, ja jaottelimme eri aihekokonaisuuksia omiin selkeästi rajattuihin osioihinsa. Tekstin värinä käytimme mustaa ja tekstin taustalla erisävyisiä vaaleita värejä niin, että teksti erottuisi mahdollisimman hyvin. Pyrimme käyttämään myös toisiinsa liittyvissä osioissa yhteneväistä värikoodia. Menetelmiä havainnollistavat kuvat suunnitelimme ja teimme itse käyttämällä apuna kirjallisuudesta löytyviä kuvia. Halusimme tehdä kuvat itse, jotta ne olisivat ulkoasultaan yh-

teneväiset. Posterit painatettiin Grano-painopalvelussa. Päätimme painattaa posterin kankaalle, jotta se olisi kestävämpi ja tarpeen tullen sitä olisi myös helpompi kuljettaa.

Olemme valmiiseen posteriin erittäin tyytyväisiä. Sitä muokattiin lukuisia kertoja ja useamman kuukauden aikavälillä ennen painatusta, jotta lopputulos olisi varmasti huolellisesti tehty ja sisällöltään ja visuaaliselta ilmeeltään tarkoitukseensa sopiva. Mielestämme se vastaa tavoitteeseen tukea bioanalyttikko-opiskelijoiden kliinisen kemian opintoja ja edistää ammatillista tietämystä, mutta varsinaista käytännön tietoa meillä ei ole posterin toimivuudesta oppimateriaalina. Posterit lähetettiin esiteltäväksi bioanalyttikko-opiskelijoiden opinnäytetöiden posterinäyttelyyn Laboratoriolääketiede ja näyttely 2014 -tapahtumaan Helsinkiin.

6. POHDINTA

Tässä luvussa pohditaan opinnäytetyön eettisiä näkökulmia ja luotettavuutta. Lisäksi arvioidaan opinnäytetyön tekijöiden omaa oppimista ja opinnäytetyöprosessia.

6.1. Opinnäytetyön eettisyys

Tutkimuksen tekoon liittyy olennaisesti hyvän tieteellisen käytännön noudattaminen. Malli hyvän tieteellisen käytännön noudattamisesta esitetään Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisemassa ohjeessa. Ohjeen tavoitteena on edistää hyvää tieteellistä käytäntöä ja ennaltaehkäistä epärehellisyttä organisaatioissa kuten yliopistoissa, ammattikorkeakouluissa ja tutkimuslaitoksissa. Hyvän tieteellisen käytännön lähtökohtia ovat mm. eettisesti kestävien tiedonhankintamenetelmien soveltaminen ja muiden tutkijoiden työn ja saavutusten huomioiminen. Muiden tutkijoiden työtä tulee kunnioittaa ja heidän julkaisuihinsa viitata asianmukaisella tavalla. Muiden tutkijoiden saavutuksille on annettava niille kuuluva arvo ja merkitys viitatessa heidän tutkimustuloksiinsa. Hyvään tutkimuskäytäntöön ei kuulu plagiointi, eikä tutkimuksen lähdeluettelon paisuttelu tutkimusviittausten määrän keinotekoiseksi lisäämiseksi. (Vilkkä 2008, 29–30; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tämä opinnäytetyö ei ole tutkimus vaan olemassa olevasta tutkimustiedosta koostuva tietopaketti, jonka tavoitteena on tukea bioanalytiikan kliinisen kemian opintoja ja edistää ammatillista erityisosaamista. Olemme suhtautuneet opinnäytetyön tekoon yhtä suurella vakavuudella ja harkinnalla kuin tulee suhtautua tieteellisen tutkimuksen tekoon ja olemme noudattaneet hyvää tieteellistä käytäntöä parhaan taitomme mukaan.

Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu myös sopia kaikkien tutkimuksen osapuolten kesken oikeudet, tekijyyttä koskevat periaatteet, vastuut ja velvollisuudet sekä aineistojen säilyttämistä ja käyttöoikeuksia koskevat kysymykset (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2013). Me opinnäytetyön tekijät ja tilaaja Savonia-ammattikorkeakoulu olemme allekirjoittaneet ohjaus- ja hankkeistamissopimuksen, jossa edellä mainituista asioista sovitaan. Opinnäytetyön sopimusehtojen mukaan me, opinnäytetyön tekijät, olemme vastuussa opinnäytetyön valmistumisesta ja Savonia-ammattikorkeakoulun vastuulla on opinnäytetyön ohjaaminen työn tavoitteiden saavuttamiseksi. Sen lisäksi, että olemme vastuussa työn tilaajalle, olemme vastuussa myös toisillemme, että jokainen opinnäytetyön tekijä hoitaa oman osuutensa tasapuolisesti ja vastaa osaltaan työn toteutumisesta. Tekijänoikeudet opinnäytetyöhön ja sen tuotokseen posteriin kuuluvat työn tekijöille ja erillisestä sopimuksesta myös työn tilaajalle eli Savonia-ammattikorkeakoululle. Opinnäytetyö on julkinen ja se luovutetaan tilaajalle ja julkaistaan Theseus-tietokannassa tekijänoikeussäädöksiä noudattaen. Erinäisistä opinnäytetyön myötä syntyvistä kustannuksista sovitaan tilaajan kanssa erikseen mutta pääsääntöisesti Savonia-ammattikorkeakoulu ei vastaa opinnäytetyön kustannuksista. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2011.) Tämän opinnäytetyön tuotoksena syntyvän posterin painatuskulut kustantaa tilaaja, Savonia-ammattikorkeakoulu.

Kliinisen laboratoriotyön eettisiin periaatteisiin kuuluu bioanalyytikon velvollisuus ylläpitää ja kehittää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista ja omaksua uusia menetelmiä ja toimintatapoja, jotka ovat tieteellisesti tutkittuja ja hyväksytyjä (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006). Mielestämme opinnäytetyömme vastaa tähän periaatteeseen hyvin, koska sen avulla tulevat bioanalytikot voivat syventää tietojaan immunokemiallisten menetelmien periaatteista ja sen myötä kehittävät omaa ammattitaitoaan yhdestä alan erikoisosaamisalueesta. Uskomme myös, että menetelmien periaatteiden tietäminen luo mielekkyyttä omien työtehtävien tekemiseen kliinisen kemian laboratoriossa kun työntekijä ymmärtää, millä periaatteella analysaattorit aikaansaavat tuloksen.

Opinnäytetyössä ei käsitellä luottamuksellisia aineistoja, vaan pelkästään olemassa olevaa, arvestetuissa lähteissä julkaistua tietoa. Opinnäytetyön lähteet on merkitty asianmukaisella tavalla.

6.2. Lähdekritiikki ja luotettavuus

Koko opinnäytetyön ajan kiinnitimme huomiota lähteiden luotettavuuteen. Pyrimme etsimään mahdollisimman uusia julkaisuja, mutta varsinkin immunokemiallisten menetelmien teoreettisista periaatteista löysimme parhaiten tietoa vanhoista ja alkuperäisistä julkaisuista, sillä menetelmien kehitys on tapahtunut pääasiassa 60–80 –luvulla. Kurssien oppikirjat eivät ole parhaita mahdollisia lähteitä, joten pyrimme löytämään muita lähteitä tukemaan oppikirjoista saatua tietoa. Laitevalmistajien Internet-sivustoja käytimme lähteinä harkiten. Lähtökohtaisesti pyrimme luottamaan tietoihin, joita tuotteiden valmistaja sivuillaan on antanut menetelmien kuvauksesta. Emme kuitenkaan käyttäneet valmistajien väittämiä menetelmiensä paremmuudesta muihin verrattuna tai muita sellaisia laadullisia seikkoja, joihin valmistajan omat intressit vaikuttavat. Lähdemateriaalia on runsaasti ja se on kansainvälistä, joten mielestämme se lisää työmme luotettavuusarvoa.

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tuottaa oppimateriaalia bioanalytiikan opiskelijoille. Olemme ymmärtäneet vastuumme oppimateriaalin teossa ja siinä esittämämme informaatio on peräisin samoista luotettaviksi katsomistamme lähteistä kuin kirjallisessa raportissakin.

6.3. Työprosessin ja oman oppimisen arviointi

Opinnäytetyön tavoitteena on, että opiskelija harjaantuu itsenäiseen tiedonhankintaan, tiedon kriittiseen analyysiin, ongelmanratkaisu- päättely ja argumentaatiotaitoihin, työkäytäntöjen analysointiin ja kehittämiseen sekä selkeään kirjalliseen ja suulliseen viestintään (Vidgren 2013). Tämän opinnäytetyön tekoprosessissa on korostunut eniten tiedonhankintaan ja tiedon kriittiseen analysointiin liittyvät tavoitteet. Tiedonhaku vaati erilaisten hakukoneiden ja tietokantojen käytön opettelua informaation avustuksella, sekä useiden tiedostopolkujen seuraamista ennen kuin varsinainen lähde oli silmien edessä. Kaikki lähteet eivät löytyneet suoraan internet-tietokannoista vaan välillä tarvittiin Savonian kirjaston henkilökunnan apua artikkelien tilaamiseksi varastokirjastosta. Luettuamme lukemattomia tieteellisiä artikkeleita englanniksi, olemme harjaantuneet etsimään tietoa kansainväli-

sistä tutkimusartikkeleista ja julkaisuista. Tiedonhakutaidot ja taito lukea tieteellisiä artikkeleita auttavat meitä varmasti työelämässä kehittämään itseämme. Uusin tutkimustieto löytyy kansainvälisistä julkaisuista ja niiden lukeminen on tarpeen oman ammattitaidon kehittämiseksi.

Tässä opinnäytetyössä opimme myös ryhmätyöskentelytaitoja. Lähdimme heti alussa jakamaan työtehtäviä, mikä nopeutti varmasti koko työprosessia. Eri asiakokonaisuuksien jakamisessa on kuitenkin se vaara, että lopulta kaikki osaavat vain omaan vastuualueeseensa kuuluneen tiedon. Olemmekin pyrkineet aktiivisesti lukemaan toistemme tuotoksia ja opettamaan toisillemme löytämäämme tietoa. Olemme myös kokoontuneet säännöllisin väliajoin yhteen miettimään, mihin suuntaan opinnäytetyötä tulisi kehittää vielä. Asiakokonaisuuksien jakamisessa haasteellista oli myös saada tekstiin yhdenmukainen tyyli, huolimatta siitä, että kirjoittajia oli kolme. Jokaisella on oma persoonallinen kirjoitustyyli, jonka havaitsee tekstiä lukiessa. Kieliasun ja tekstin hiominen sekä yhdenmukaisuuden saaminen eri asiakokonaisuuksien välille vaativat runsaasti työtä.

Ulkomaiset lähteet ovat tuoneet omat haasteensa opinnäytetyön kirjoittamiseen ja sisällön kokoamiseen, koska tällaisessa aiheessa terminologia voi olla melko haastavaa. Samoilta asioilta voi olla monta eri nimitystä, mutta raporttiamme varten yritimme valita eniten käytössä olevat termit. Välillä oli hankaluuksia löytää myös sopivia suomenkielisiä käännöksiä termeille, sillä valtaosa aineistosta oli englanninkielistä. Opinnäytetyöprosessin aikana kirjalliset viestintätaitomme ovat väistämättä kehittyneet lukuisien tekstin korjauksien ja uudelleenmuotoilujen myötä.

Suunnittelimme opinnäytetyön sisältöä huolellisesti opinnäytetyöprosessin alusta lähtien ja se pysyikin kohtuullisen muuttumattomana koko prosessin ajan. Asioiden kasaaminen loogiseen järjestykseen on ollut yksi suurimmista haasteista, koska tietomäärä on ollut niin valtava. Asiasisältö on osittain melko vaikeatajuista, mutta olemme pitäneet oletuksena sen, että lukijakunta omaa riittävät pohjatiedot kemiasta, fysiikasta, biologiasta ja immunologiasta.

Lähdemateriaalin luotettavuuden arviointi on tuonut oman haasteensa työskentelyyn. Aineistojen lisääntyessä on herännyt myös ymmärrys siitä, kuinka laajaa aihetta olemme käsittelemässä. Etenkin kun tekee Internethaun immunokemiallisista määrityksistä, erilaisia menetelmäsovelluksia tulee vastaan lukuisia. On pitänyt osata arvioida, mistä sovelluksista kannattaa kirjoittaa ja mikä on menetelmän peruseräite. Siksi vanhat lähteet menetelmien alkua ajoilta ovat olleet arvokas apu, koska niissä kerrottuihin menetelmiin perustuvat sovellukset, joita nykyään hyödynnetään kliinisessä analytiikassa. Aiheen vaativuus on myös lisännyt tulkinnallisten virheiden mahdollisuutta. Etenkin englanninkielisiin lähteisiin on joutunut kiinnittämään tarkempaa huomiota, ettei tekstin sisällön merkitys muutu oman kirjoittamisen yhteydessä.

Opinnäytetyö tehdään aiheesta, joka liittyy opiskelijan koulutusohjelmaan tai suuntautumisvaihtoehtoon ja joka tukee opiskelijan kehittymistä asiantuntijaksi omalla alalla. Opinnäytetyön avulla opiskelija voi syventää omaa erityisosaamistaan. (Vidgren 2013.) Kliininen kemia on yksi bioanalyytikon ammatin perustavista osaamisalueista, joten mielestämme oli perusteltua syventyä tarkemmin kliiniseen analytiikkaan kiinteästi kuuluviin immunokemiallisiin menetelmiin ja valita se opinnäytetyön ai-

heeksi. Opinnäytetyön myötä olemme syventäneet tietämystämme kliinisen kemian analytiikassa käytettävistä immunokemiallisista menetelmistä ja saaneet hyvät valmiudet hyödyntää tietoamme työelämässä. Teoreettisen tiedon avulla tietämys laboratorioprosessin analyttisestä vaiheesta on syventynyt ja ymmärrämme tarkemmin, mistä ja miten laboratoriovastaus todella syntyy. Mielestämme on perusteltua todeta, että opinnäytetyömme aiheen valinta ja koko opinnäytetyöprosessi on tukenut meitä bioanalytiikan asiantuntijoiksi kehittämisessä.

7. LÄHTEET

AKSUNGAR, Fehime Benli, SERTESER, Mustafa, COŞKUN, Abdurrahman ja ÜNSAL, Ibrahim 2013. A comparison between turbidimetric inhibition immunoassay and capillary electrophoresis in glycated hemoglobin (HbA_{1c}) measurement. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51 (8), e191-e193.

ALLEY, Michael 2008. Scientific Posters [verkkoaineisto]. The Leonhard Center. The Pennsylvania State University. [Viitattu 2014-04-02.] Saatavissa: <http://writing.engr.psu.edu/posters.html>

ARMBRUSTER, David A., HUBSTER, Edward C., KAUFMAN, Melvin S. ja RAMON, Monica K. 1995. Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) for Drugs-of-Abuse Screening. *Clinical Chemistry* 41 (1), 92-98.

ARMBRUSTER, David A., SCHWARZHOFF, Robert H., HUBSTER, Edward C. ja LISERIO, Monica K. 1993. Enzyme Immunoassay, Kinetic Microparticle Immunoassay, Radioimmunoassay, and Fluorescence Polarization Immunoassay Compared for Drugs-of-Abuse Screening. *Clinical Chemistry* 39 (10), 2137-2146.

ARSTILA, Petteri 2011. Soluvälitteinen immunitteetti. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Martti (toim.) *Immunologia - Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim [Sähköinen kirja]. [Viitattu 2014-10-06.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04492&p_selaus=19142

AZZAZY, Hassan M.E., MANSOUR, Mai M.H. ja KARMIERCZAK, Steven C. 2007. From diagnostics to therapy: Prospects of quantum dots. *Clinical Biochemistry* 40, 917-927.

BECKER, Sally ja BORDER, Barbara G. 1998. Clinical Laboratory Radioimmunoassay Usage. *Clinical Laboratory Science* 11 (1), 9.

BERTHOLF, Roger L. ja REISFIELD, Gary M. 2012. Drug testing in pain management. Julkaisussa: DASGUPTA, Amitava (toim.). *Therapeutic drug monitoring. Newer drugs and biomarkers*. 1. Painos. Elsevier Ltd. 397-416.

BILEZIKIAN, John P. 1992. Clinical Utility of Assays for Parathyroid Hormone-Related Protein. *Clinical Chemistry* 38 (2), 179-181. Saatavissa: <http://www.clinchem.org/content/38/2/179.full.pdf>

BIOHIT HEALTHCARE 2013. ColonView ulosteen veritesti. ColonView Hb and Hb/Hp test (30). Instructions for use [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2014-03-06.] Saatavissa: <http://www.biohithealthcare.com/resource/files/media/manuals/colonview-ifu.pdf>

BRUNO, John G., ULVICK, Sydney J., UZZELL, Gary L., TABB, Joel S., VALDES, Erica R. ja BATT, Carl A. 2001. Novel immuno-FRET assay method for *Bacillus* spores and *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 875-880.

- CHAPMAN, R.S.1998. Immunoassays in clinical chemistry (principles of immunoradiometric assays). International Atomic Energy Agency. International Nuclear Information System (INIS) 29 (15), 18-31. Saatavissa: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:29024304
- CRANOR, Lorrie Faith 1996. Research Posters 101 [verkkoaineisto]. XRDS Crossroads, The ACM Student Magazine. [Viitattu 2013-07-22.]. Saatavissa: <http://xrds.acm.org/article.cfm?aid=332138>
- EGGINGS, Brian R. 2004. Chemical sensors and biosensors. 3. painos. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- ELORANTA, Eija 2005. Neuroendokriinisten kasvainten hoitoperiaatteet [verkkoaineisto]. Oulun yliopisto/OYS. Sisätautien klinikka. [Viitattu 2014-04-28.] Saatavissa: <http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/050512.htm>
- FORD, Kent 2005. Automated Batch Analyzers IMx[®]. Julkaisussa: WILD, David. (toim.) The immunoassay handbook. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd, 351-357.
- GOSLING, James P. 1990. A decade of development in immunoassay methodology. Clinical Chemistry 36 (8), 1408-1427.
- HAAPALA, Anna-Maija 2010. Allergian ja autoimmuunisairauksien laboratoriodiagnostiikka. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni. ja PULKKI, Kari. (toim.) Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 161-165.
- HALONEN, Toivo 2004a. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö, 90-100.
- HALONEN, Toivo. 2004b. Fotometriset menetelmät. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö, 66-76.
- HALONEN, Toivo. 2004c. Entsyymianalyysien periaatteet. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö, 82-90.
- HALONEN, Toivo 2013-11-14. Apulaisylikemisti. [Haastattelu.] Kuopio: Puijon sairaala
- HEIKKILÄ, Asta, JOKINEN, Pirkko ja NURMELA, Tiina 2008. Tutkiva kehittäminen - avaimia tutkimus- ja kehittämishankkeisiin terveysalalla. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.
- HESS, George R. 2010. Effective scientific posters - Quick Reference [verkkoaineisto]. North Carolina State University [Viitattu 2014-01-27.] Saatavissa: <http://www.ncsu.edu/project/posters/documents/QuickReferenceV3.pdf>

HESS, George, TOSNEY, Kathryn ja LIEGEL, Leon 2013. Creating an effective poster requires time and planning [verkkoaineisto]. [viitattu 22.7.2013]. Saatavissa:

<http://www.ncsu.edu/project/posters/CreatePosterPlanning.html>

HIRSJÄRVI, Sirkka, REMES, Pirkko ja SAJAVAARA, Paula 2007. Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

IRJALA, Kerttu 1981. Proteiinien ja turbido- ja nefelometristen määritysmenetelmien periaatteet ja sovellutukset. Moodi (5), 7-8.

ISLAB 2014a. B-Syklosporiini A [Verkkajulkaisu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB). [Viitattu 2014-03-18.] Saatavissa: <http://www.islab.fi/index.asp?tz=-2>

ISLAB 2014b. S-B12-vitamiini, aktiivinen [verkkojulkaisu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB). [Viitattu 2014-03-18.] Saatavissa: <http://www.islab.fi/index.asp?tz=-2>

ISLAB 2014c. fP-Kromograniini A [verkkojulkaisu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB) [Viitattu 2014-04-28.] Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=3871>

ISLAB 2014d. P-Parathormonin kaltainen peptidi [verkkojulkaisu] Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB). [Viitattu 2014-06-23.] Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=3522>

ISLAB 2014e. S-Digoksiini [verkkojulkaisu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB) [Viitattu 2014-03-30.] Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=515>

ISLAB 2014f. S-Kinidiini [verkkojulkaisu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen Liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB) [Viitattu 2014-03-30.] Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=519>

JAUHIAINEN, Matti 1981. Entsyymi-immunokemiallisten määritysten periaatteet ja sovellutusalueet (EIA-metodit). Moodi (5), 9-11.

JEONG, Sang Il, YANG, Xiaoyun & ANDRADE, Joseph D. 2004. Modeling of homogenous cloned enzyme donor immunoassay. Analytical Biochemistry 333, 136-147.

JOKIRANTA, Sakari ja SEPPÄLÄ, Ilkka J. T. 2010. Vasta-ainevälitteinen immunitaetti. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN, Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Martti (toim.) Immunologia - Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. [Sähköinen kirja]. [Viitattu 2014-10-06.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04492&p_selaus=19142

JOSKO, Deborah 2012. Updates in Immunoassays: Introduction. *Clinical Laboratory Science* 25 (3), 170-172.

KAJAANIN AMMATTIKORKEAKOULUN WWW-SIVUT. [Viitattu 2014-01-17.] Opinnäytetyön esitys, arviointi ja palautus. Saatavissa:

<http://www.kamk.fi/opari/Opinnaytetyopakki/Opinnaytetyoprosessi/Ylempi-amk-%28Soteli%29/Opinnaytetyoprosessi/Posterit>

KARHUMÄKI, Eliisa, JONSSON, Anne ja SAROS, Marita 2009. Mikrobit hoitotyön haasteena. Helsinki: Edita Prima.

KARONEN, Sirkka-Liisa 1982. RIA-laboratorion laaduntarkkailun suunnittelusta. *Moodi* (5), 104-106.

KAUPPILA, Reijo A. 2003. Opi ja opeta tehokkaasti - Psykkinen valmennus oppimisen tukena. Opetus 2000 -sarja. Jyväskylä: PS-Kustannus.

KIM, Jason S. ja LIGLER, Frances S. Utilization of microparticles in next-generation assays for micro-flow cytometers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (6), 2373-2382.

KIMBALL, John W. 2011. Radioimmunoassay (RIA) [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2014-03-18.] Saatavissa: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html>

KIVELÄ, Petri 2003. Monileimalaskimet. *Analyysi* [verkkójulkaisu] 4, 7-9. [Viitattu 2013-10-08.] Saatavissa: http://www.laboratorioalanliitto.fi/wp-content/uploads/analyysi_2003_4.pdf

KOIVUNEN, Marja E. ja KROGSRUD, Richard L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Labmedicine* 37 (8), 490-497.

KOKKINEN, Annemari, RANTANEN-VÄNTSI, Leena, TUOMOLA, Anita ja BREITENSTEIN, Joakim 2008. Aikuisen oppijan kirja. Helsinki: Kirjapaja.

KRICKA, Larry J., PHIL, D. ja PATH, F.R.C. 1999. Principles of immunochemical techniques. Julkaisussa: BURTIS, Carl A. ja ASHWOOD, Edward R. (toim.) *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3. painos. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 205-225.

LARSSON, K., KRIZ, K. ja KRIZ, D. 1999. Magnetic Transducers in Biosensors and Bioassays. *Analysis* 27 (7), 617-621.

LEE-LEWANDROWSKI, Elizabeth ja LEWANDROWSKI, Kent 2009. Perspectives on cost and outcomes for point-of-care testing. *Clinics in laboratory medicine* 29 (3), 479-489.

LEINIKKI, Pauli 1980. ELISA-menetelmien käyttömahdollisuuksia infektiosairauksien diagnostiikassa. *Moodi* 1980 (3), 2-8.

LEINONEN, Alina ja SÄRKÄMÖ, Teppo 2007. Ohjeita aloittelevalle tieteellisen posterin kirjoittajalle [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-04-30.] Saatavissa:

http://www.helsinki.fi/behav/tiedepaiva/2008/posteriohjeet_yksi%20koko4.07.pdf

LEWANDROWSKI, Kent 2009. Point-of-care testing: an overview and a look to the future (circa 2009, United States). *Clinics in laboratory medicine* 29 (3), 421-432.

LICHLYTER, Darcy J., GRANT, Sheila A. ja SOYKAN, Orhan. 2003. Development of a novel FRET immunosensor technique. *Biosensors and Bioelectronics* 19, 219-226.

LIDDEL, Eryl 2005. Antibodies. Julkaisussa: WILD, David. (toim.) *The immunoassay handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd, 144-166.

LINKO, Solveig, SAVOLAINEN, Eeva-Riitta, ÅKERMAN, Kari, NISSINEN, Antti, ILANNE-PARIKKA, Pirjo, JOUTSI-KORHONEN, Lotta, JYLHÄ, Anneli, LASSILA, Riitta, LINKO-PARVINEN, Anna-Maria, LINKO Linnéa, MENESES, Ennamaria, MUUKKONEN, Leila, NOKELAINEN, Satu, PORKKALA-SARATAHO, Elina, PUHAKAINEN, Eino, SIITONEN, Anja, SUNI, Jukka ja VUENTO, Risto 2009. Vieritestaus terveydenhuollossa - Labqualityn asiantuntijasuositus. *MOODI* 33 (6), 269-342.

LODE, Piia von. 2005. Review: Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry* 38, 591-606.

MAGI, Barbara ja LIBERATORI, Sabrina 2005. Immunoblotting techniques. Julkaisussa: BURNS, Robert (toim.) *Methods in Molecular Biology*. 3. painos. New Jersey: Humana Press Inc., 227-253. Saatavissa:

<http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-873-0%3A227#page-1>

MELANSON, Stacy E.F. 2009. Drug-of-abuse testing at the point of care. *Clinics in laboratory medicine* 29 (3), 503-509.

MERI Seppo 2011. Johdanto immunologiaan. Julkaisussa: HEDMAN, Klaus, HEIKKINEN, Terho, HUOVINEN, Pentti, JÄRVINEN Asko, MERI, Seppo ja VAARA, Martti (toim.) *Immunologia - Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 12-17.

MILES, Laughton E. M. 1975. Properties, variants, and applications of the immunoradiometric assay method. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 5 (1), 59-72.

MORAIS, Inês P., TÓTH, Ildikó V. & RANGEL, António O. S. S. 2006. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters* 39, 547-579.

- MORTIMER, Charles E. 2001. Kemia. Kääntänyt ja suomalaiseseen ammatilliseen koulutukseen sovel-
tanut HAKKARAINEN, Marjatta. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- NAKANE, Paul K. ja KAWAOI, Akira 1974. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation.
Journal of Histochemistry & Cytochemistry 22 (12), 1084-1091.
- OSIKOWICZ, Gene, BEGGS, Michael, BROOKHART, Paul, CAPLAN, Diane, CHING, Shanfun, ECK,
Paul, GORDON, Julian, RICHERSON, Russel, SAMPEDRO, Susan, STIMPSON, Don ja WALSWORTH,
Frank. 1990. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choriogonad-
otropin in urine. Clinical Chemistry 36 (9), 1586.
- PENTTILÄ, Ilkka 2004. Toksikologiset ja lääkeainetutkimukset. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka (toim.)
Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö, 252-260.
- PESONEN, Elisa 2007. Julkaisijan käsikirja. Jyväskylä: Docendo
- QUINN, Frank A. 2005. Architect i2000 and i200SR analyzers. Julkaisussa: WILD, David. (toim.) The
immunoassay handbook. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd, 406-411.
- ROSENTHAL, Arthur F., VARGAS, Marta G. ja KLASS, Carl S. 1976. Evaluation of entzyme-multiplied
immunoassay technique (EMIT) for determination of serum digoxin. Clinical Chemistry 22, 1899-
1902.
- ROSNER, Mitchell H., GRASSMAN, Jean A. ja HAAS, Robert A 1991. Immunochemical Techniques in
Biological Monitoring. Environmental Health Perspectives 94, 131-134.
- SÁNCHEZ-MORA, Catalina, RODRIGUEZ-OLIVA, Manuel S., FERNÁNDEZ-RIEJOS, Patricia, MATEO,
Joaquin, POLO-PADILLO, Juan, GOBERNA, Raimundo ja SÁNCHEZ-MARGALET, Victor 2011. Evalua-
tion of two HbA1c point-of-care analyzers. Clinical chemistry and laboratory medicine [verkkojulkai-
su] 49 (4), xxx-xxx. [Viitattu 2014-02-13.] Saatavissa:
[http://www.medial.cz/data/files/medial/download/klinicke_studie/Afinion/HbA1c-POCT-Afin-DCA-
cclm-11.pdf](http://www.medial.cz/data/files/medial/download/klinicke_studie/Afinion/HbA1c-POCT-Afin-DCA-cclm-11.pdf)
- SANFORD, Kimberly W. ja McPHERSON, Richard A. 2009. Fecal occult blood testing. Clinics in labor-
atory medicine 29, 523-541.
- SAVOLAINEN, Kari ja PARVIAINEN, Markku 2010. Immunokemialliset menetelmät. Julkaisussa:
NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari (toim.) Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia. 3.
painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. s. 65-66.
- SAVONIA-AMMATTIKORKEAKOULU 2011. Opinnäytetyön sopimusehdot [verkkoaineisto]. [Viitattu
2014-04-15.] Saatavissa:
[https://reppu.savonia.fi/opiskelu/Opiskelu_ja_oppiminen%20Savoniassa/Lomakkeet/Opinn%C3%A4
ytety%C3%B6n%20sopimusehdot.pdf](https://reppu.savonia.fi/opiskelu/Opiskelu_ja_oppiminen%20Savoniassa/Lomakkeet/Opinn%C3%A4ytety%C3%B6n%20sopimusehdot.pdf)

SAVONIA-AMMATTIKORKEAKOULU 2013. Opinnäytetyön arviointikriteerit [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-04-15.] Saatavissa:

http://webd.savonia.fi/moodle/yhteiset_tiedotteet/ont/ohjeet/fi/Arviointikriteerit.pdf

SILÉN, Saija 2013. Tieteellinen posterit [verkkoaineisto]. Jyväskylän yliopisto. Posterikurssi. [Viitattu 2014-04-02.] Saatavissa:

<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/tvt/posteri/POSTERIluento%20ilman%20kuvia.pdf>

SINO BIOLOGICAL INC 2004-2014a. Direct ELISA, Simple and Time-saving [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-03-17.] Saatavissa: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/direct-elisa>

SINO BIOLOGICAL INC 2004-2014b. Indirect ELISA, conventional but efficient [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-03-17.] Saatavissa: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/indirect-elisa>

SINO BIOLOGICAL INC 2004-2014c. Sandwich ELISA, Highly Sensitive [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-04-07.] Saatavissa: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>

SINO BIOLOGICAL INC 2004-2014d. Competitive ELISA: Basic Principles [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-04-07.] Saatavissa: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/types/competitive-elisa>

SOINI, Erkki ja KOJOLA, Hannu 1983. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates – a new generation of nonisotopic immunoassays. *Clinical Chemistry* 29 (1), 65-68.

SOLUNETTI 2006. Vasta-aineet [verkkoaineisto]. [Viitattu 2013-06-25.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>

STENMAN, Ulf-Håkan ja HÄMÄLÄINEN, Esa 2010. Hormonien määrittäminen. Kirjassa: VÄLIMÄKI, Matti, SANE, Timo & DUNKEL, Leo (toim.) *Endokrinologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 31-49.

SUOMEN BIOANALYYTIKKOLIITTO RY 2006. Bioanalytiikan, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet [Verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-01-10.] Saatavissa:

<http://www.bioanalyttikoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+%281%29.pdf>

THERMO SCIENTIFIC INC. 2014. CEDIA™ Therapeutic Drug Monitoring (TDM) Assays [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-03-30.] Saatavissa:

<http://www.thermoscientific.com/en/product/cedia-therapeutic-drug-monitoring-tdm-assays.html>

TUTKIMUSEETTINEN NEUVOTTELUKUNTA 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa [verkkoaineisto]. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. [Viitattu 2014-03-8.] Saatavissa:

http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

UUSIKYLÄ, Kari & ATJONEN, Päivi 2005. Didaktiikan perusteet. Helsinki: WSOY

VIDGREN, Mervi 2013. Opinnäytetyön tekeminen [verkkoaineisto]. Savonia-ammattikorkeakoulu. [Viitattu 2014-05-23.] Saatavissa:

https://reppu.savonia.fi/opiskelu/Opiskelu_ja_oppiminen%20Savoniassa/Sivut/Opinn%C3%A4ytety%C3%B6n-tekeminen.aspx

VILKKA, Hanna 2007. Tutki ja kehitä. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

VILKKA, Hanna ja AIRAKSINEN, Tiina 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

WIENER LABORATORIOS 2004. Turbidimetric inhibition immunoassay for quantitative determination of HbA1c [verkkoaineisto]. [Viitattu 2014-02-07.] Saatavissa: http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/9455_hba1c_turbitest_aa_en.pdf

WOODHEAD, J. Stuart ja WEEKS, Ian 1985. Chemiluminescence immunoassay. Pure & Applied Chemistry 57, 523-529.

WU, Alan H. B. 2001. Immunochemical Techniques. Julkaisussa: BISHOP, Michael L., FODY, Edward P. ja SCHOEFF, Larry E. Clinical Chemistry. 7. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluvers business, 160-178.

WU, Alan H. B. 2006. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 369 (2), 119-124.

ÅKERMAN, Kari, SAVOLAINEN, Eeva-Riitta, PELLINIEMI, Tarja-Terttu ja KOSKI, Tomi 2010a. Laboratoriolaitteet. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari (toim.) Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 79-92.

ÅKERMAN, Kari, JOKELA, Hannu, SAVOLAINEN, Kari, PARVIAINEN, Markku, SAVOLAINEN, Eeva-Riitta ja ORPANA, Arto 2010b. Laboratorion perusmenetelmät. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari (toim.) Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 49-78.

Immukemialliset menetelmät kliinisen kemian analytiikassa

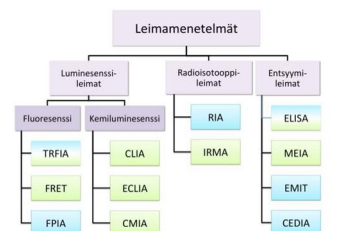
Sini Heikkinen, Laura Moilanen & Annika Virén

Johdanto

Immukemiallisissa menetelmissä reaktiot perustuvat vieraiden molekyylien eli antigeenin spesifiseen tunnistamiseen vasta-aineiden avulla. Menetelmiä käytetään lääketieteellisissä laboratoriosovelluksissa muun muassa proteiinien, hormonien, lääkeaineiden ja nukleiinihappojen määrittämiseen. Menetelmät perustuvat antigeenin tai vasta-aineiden leimaamiseen jollain mitattavissa olevalla merkkiaineella tai immunokompleksien agglutinaatioon/saostamiseen, jolloin reaktiossa muodostuva sakka havaitaan. Immukemiallisia menetelmiä käytetään yleisesti myös vieritestissä. Immukemialliset määrytykset ovat spesifisiä ja analyytin kanssa samankaltaisten molekyylien läsnäolo näytessä ei yleensä häiritse määrytystä.

Leimamenetelmät

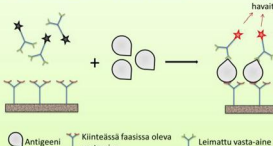
Vanhimmat leimamenetelmät perustuvat radioisotooppiin käyttöön mutta nykyään on siirrytty enemmän luminesenssiä hyödyntäviin leimaustekniikoihin sekä entsyymi-leimoihin. Leimamenetelmät voidaan jakaa toteutustapansa mukaan **kaksoisvasta-ainetekniikkaan** ja **kilpailevan sitoutumisen tekniikkaan**. Immunokompleksien muodostumisen jälkeen reaktiooskeen jää yleensä aina vähän sitoutumattomia vasta-aineita ja antigeeniä. **Heterogeeninen** menetelmä tarkoittaa, että antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisen jälkeen suoritetaan erotusvaihe, jolloin vapaana olevat antigeenit ja vasta-aineet saadaan erotettua sitoutuneista immunokomplekseista. **Homogeenisissä** menetelmissä sitoutuneita ja sitoutumattomia komponentteja ei eroteta toisistaan, vaan immunokompleksin sitoutumisreaktio saa aikaan leiman muuttumisen, jolloin se voidaan havaita erillisellä vapaana olevista leimatuista molekyyleistä.



Vihreällä pohjalla olevat menetelmät perustuvat kaksoisvasta-ainetekniikkaan ja sinisellä pohjalla olevat menetelmät perustuvat kilpailevan sitoutumisen tekniikkaan. TRFIA- ja ELISA-menetelmissä käytetään molempia tekniikoita. Oikealla on esitetty molempien tekniikoiden periaatteet ja ISLAB:ssa eniten käytetyt sovellukset leimamenetelmissä.

- TRFIA Time-resolved fluorescence immunoassay
- FRET Fluorescence resonance energy transfer
- FPIA Fluorescence polarisation immunoassay
- CLIA Chemiluminescence immunoassay
- ECLIA Electrochemiluminescence immunoassay
- CMIA Chemiluminescence microparticle immunoassay
- RIA Radioimmunoassay
- IRMA Immunoradiometric assay
- ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
- MEIA Microparticle enhanced immunoassay
- EMIT Enzyme multiplied immunoassay
- CEDIA Cloned enzyme donor immunoassay

Kaksoisvasta-ainetekniikka



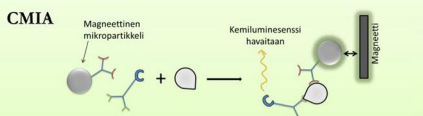
Kahta eri vasta-ainetta käytetään sandwich-rakenteen muodostamiseen. Toinen vasta-aineista on sidottu kiinteään faasiin ja toinen on vapaana liuoksessa. Vapaana oleva vasta-aine on yleensä leimattu ja sen määrä on suoraan verrannollinen antigeenin määrään.

Termejä

Analyytti Kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti määritettävä yhdiste, joka voi olla antigeeni tai vasta-aine, esim. proteiini, hormoni, lääkeaine.

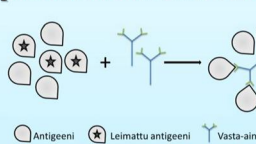
Konjugaatti Analyyttiä vastaava antigeeni/vasta-aine, joka on leimattu.

Immunokompleksi Molekyyli, joka muodostuu vasta-aineen ja antigeenin sitoutuessa toisiinsa.



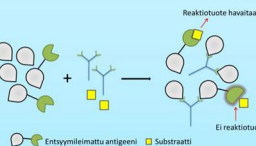
Kemiluminesenssimenetelmissä kemiluminesoiva molekyyli viritetään kemiallisen hapetusreaktion (CMIA, CLIA) tai sähköön (ECLIA) avulla ja reaktion hajoamistuotteet emittoivat valoa. CMIA:ssa toinen vasta-aine on sidottu magneettisiin mikropartikkeleihin ja toinen, vapaana reaktiooskeksessa oleva vasta-aine, on leimattu. Sitoutuneet immunokompleksit erotetaan magneetin avulla ja valoemissio havaitaan.

Kilpailevan sitoutumisen tekniikka



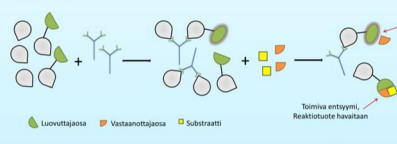
Analyytti ja konjugaatti kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen, analyytin pitoisuus on kääntäen verrannollinen konjugaatin pitoisuuteen.

EMIT



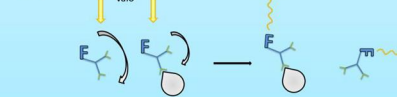
Ensyymeileimamenetelmissä hyödynnetään entsyymien ja siihen sitoutuneen substraatin välistä reaktiota, jossa syntyy mitattavissa olevaa reaktiotuotetta. EMIT:ssä konjugaatti ja analyytti kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen. Konjugaatin sitoutuminen vasta-aineeseen estää substraatin sitoutumista entsyymiin. Analyytin pitoisuus voidaan määrittää entsyymiaktiivisuuden ja kalibraatio-suoran avulla fotometrisesti.

CEDIA



CEDIA:ssa antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktio saa aikaan muutoksen leiman aktiivisuudessa. Inaktiiviset luovuttaja- ja vastaanottaja-osat muodostavat aktiivisen entsyymien. Entsyymien luovuttaja-osaan on liitetty antigeeni, joka kilpailee analyytin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Kilpailevan antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen estää luovuttajaosaan liittymisen vastaanottajaosaan, jolloin aktiivisen entsyymien muodostuminen estyy. Entsyymiaktiivisuutta voidaan suoraan verrata analyytin pitoisuuteen.

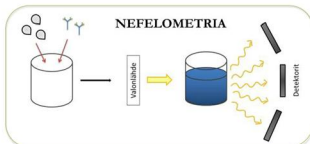
FPIA



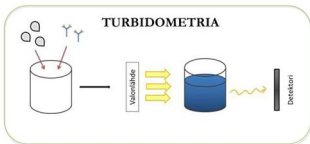
Fluoresoiva molekyyli viritetään, jolloin se emittoi valoa. Emittoitu valo on verrannollinen leiman määrään. FPIA mittauksessa leima viritetään tasopolarisoidulla valolla ja emissio mitataan viritetyksen nähden samassa ja poikittaisessa kulmassa. Lämpöliikkeen vaikutuksesta molekyyliellä on taipumus pyöriä. Suurikokoinen vasta-aine-antigeenikompleksi pyörii hitaammin kuin pelkkä leimattu vasta-aine.

Immukompleksien agglutinaatio- ja saostusmenetelmät

Immukompleksien agglutinaatio- ja saostusmenetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen välisessä reaktiossa muodostuvan sakan havaitsemiseen. Agglutinaatiosta puhuttaessa reaktiossa on mukana antigeenin ja vasta-aineiden lisäksi mikropartikkeleita tai soluja. Immukomplekseja voidaan havaita suoraan näytteestä nefelo- ja turbidometrisillä menetelmillä eikä määrytyksissä tarvita merkkiaineita. Valo siroaa ja heijastuu muodostuneista immunokomplekseista sekä absorboituu niihin.



Nefelometriassa mitataan immunokomplekseista siroannutta valoa. Yleensä menetelmän avulla mitataan syntyvän sakan muodostumis-nopeutta.



Turbidometriassa mitataan valon läpäisevyyttä reaktiooskeksessa. Kliinisiä sovelluksia ovat TINIA ja KIMS, joissa molemmilla sakan muodostusta on tehostettu.

- TINIA Turbidimetric inhibition immunoassay
- KIMS Kinetic interaction of microparticles in solution

Vieritestit

Yleisimmät immukemialliset vieritestit ovat immunokromatografisia mutta lisäksi on agglutinaatio- ja immunosodatusmenetelmiä. Immunokromatografiassa testilukset koostuvat eri materiaalikerroksista ja reagenssit on sidottu liuskalle. Näyte siirtyä liuskaa pitkin kapillaarivoimien avulla ja analyytti kiinnittyy vasta-aineita (tai antigeeniä) sisältäviin alueisiin muodostaen näkyvän viivan. Kliinisen kemian tutkimuksissa yleisimmin käytettyjä ovat raskaustesti, CRP-pikatesti, huumeuseula, pitkäaikaisverenسكرin (HbA1c) pikatesti ja ulosteen veri-pikatesti.

Immukemiallisten menetelmien virhelähteet

Häiriötekijä	Ratkaisu
Näytteessä esiintyvät proteiinit, lipidit, hiilihydraatit ja suolat	Puskuriliuoksen optimointi, näyteen laimentaminen.
Komplementtijärjestelmän osat ja reumafaktori	Käytetään reagensseja, joiden epäspesifinen sitoutuminen on vähäistä.
Potilaan muodostamat heterofiiliset vasta-aineet, hiirivasta-aineet ja autovasta-aineet	Hiiri- tai heterofiilisten vasta-aineiden poistaminen kaupallisilla vasta-ainepreparaateilla. vasta-aineiden huolellinen valinta.
Ristireaktiot lääkeaineiden kanssa	Vasta-aineiden huolellinen valinta.
Antigeenylimäärä	Näyteen laimentaminen.

Lähteet



- HALONEN, T. 2004a. Immukemiallisten menetelmien periaatteet. Julkaisussa: PENTTILÄ, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö, 71-71, 94-97. /GOSLING, J. P. 1990. A decade of development in immunoassay methodology. Clinical Chemistry 36, 1408-1427. /MERI, S. 2011. Johdanto immunologiaan. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. (toim.) Immunologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, s. 12-17. /RICKES, L. J., PHIL, D. ja PATH, F.R.C. 1999. Principles of immunochemical techniques. Julkaisussa: BURRIS, C.A. ja ASHWOOD, E.R. (toim.) Tietä textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, s. 205-225. /STENMAN, U.H. & HÄMÄLÄINEN, E. 2010. Hormonien määrytysmenetelmät. Kirjassa: VALIMÄKI, M., SÄNE, T. & DUNKEL, L. (toim.) Endokrinologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. /WU, A. H. B. 2006. A selected history of and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 369 (2), 119-124.