



**ELISA-MENETELMÄÄN PERUSTU-
VAN KAMPYLOBAKTEERIN MIT-
TAUSOHJELMAN VERIFIOINTI JA
TYÖOHJEEN LAADINTA FLUOS-
TAR OPTIMA MONILEIMALUKI-
JALLE**

Jere Alhonen

Opinnäytetyö
Helmikuu 2015
Ylempi ammattikorkeakoulututkinto
Hyvinvointiteknologian koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu

Terveysalan ylempi ammattikorkeakoulututkinto

Hyvinvointiteknologian koulutusohjelma

ALHONEN, JERE

Elisa-menetelmään perustuvan kampylobakteerin mittaushjelman verifiointi ja työohjeen laadinta Fluostar Optima monileimalukijalle

Opinnäytetyö 60 sivua, joista liitteitä 25 sivua

Helmikuu 2015

Monileimalukijat ovat laboratoriokäyttöön suunnattuja laitteita, joilla mitataan reaktioita monileimalukijaan laitettavalta mikrolevyltä, useinmiten 96-kuoppaiselta levyllä. Monileimalukijoiden toiminta perustuu valolla aikaan saatuihin reaktioihin valaisemalla näyte tietynlaisella valolla ja mitaamalla sen läpi päästämä valo.

Tutkimus suoritettiin immunologian osastolla Huslabissa ja siinä luotiin Optima Fluostar-monileimalukijalle kampylobakteerin Elisa-menetelmällä tehtävä immunologisen tutkimuksen mittaushjelma, jotta potilaat saisivat jatkossakin luotettavia ja laadukkaita tuloksia. Tutkimukseen valittiin entsyymaattisella ELISA-menetelmällä aiemmin tehdyt potilasnäytteet. Näiden potilasnäytteiden antamia iEMS-fotometrin mittaustuloksia verrattiin tässä työssä Fluostar optimalle tehtyyn kampylobakteerin mittaushjelman antamiin vastaaviin absorbanssi tuloksiin. Tulosten perusteella pystyttiin verifioimaan Fluostar optiman kampylo-mittaushjelma.

Tuloksena todetaan, että Fluostar Optimalle tehty uusi kampylobakteerin mittaushjelma saatiin toimimaan hyväksyttävällä tasolla verifioimalla kyseinen tutkimus toistettavuus- ja uusittavuustestauksilla yhdessä iEMSanalysointilaitteen kanssa. Näin ollen Fluostar Optimalle luotua uutta absorbanssi-menetelmällä mitattavaa kampylo-ohjelmaa voi luotettavasti käyttää jatkossa päämittaushjelmana tai varamittaushjelmana. Fluostar Optiman käytölle tehtiin samalla helpot ja selkeät työohjeet, joiden perusteella laitetta käyttävä henkilökunta voi mitata kampylolevyjä tai itse luoda uusia mittaushjelmia.

Asiasanat: fluostar Optima, kampylo, elisa, absorbanssi, monileimalukija, verifiointi.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Master's Degree Programme in Wellbeing Technology

ALHONEN, JERE

Cambylobacter measurement program verification for Fluostar optima spectrophotometry

Master's thesis 60 pages, appendices 25 pages
February 2015

Spectrophotometry microplate readers are laboratory-facing devices that measure responses to most of the 96 wellplates. Measuring operation is based on the light created reactions by illuminating the sample in certain types of light and measuring the light emitted through the sample.

Study was conducted in the Department of Immunology Huslab. The purpose of this study was to prepare campylobacter-program for Optima Fluostar multi-label reader. Main idea of this study was to make as good as older measurement program to ensure that patients would receive reliable and high quality results also in future. Previously studied and known patient samples were selected for this study. iEMS spectrophotometry measurements were compared with the results of a new Fluostar Optima Campylobacter measuring program absorbance results. The basis of the results it was possible to verify the Fluostar Optima Campylobacter-measurement program.

The study result was that the Fluostar Optima new campylobacter measurement program operated at an acceptable level. The campylobacter-program verified with the reproducibility, repeatability and testing together iEMS analyzer with. Thus, for Fluostar Optima created a new absorbance-method measurable Campylobacter program can reliably be used in the future as a measuring program or vice-measurement program. For users was made at the same time easy and clear work instructions for Fluostar Optima to enable personnel to measure the campylobacter plates or make a new measurement programs for the device.

Key words: fluostar optima, campylobacters, elisa, the optical density, multi-label reader, verification

Sisällys

1	JOHDANTO.....	1
2	KAMPYLOBAKTEERIT	3
3	ELISA-MENETELMÄ	5
	3.1 Suora ja epäsuora Elisa-mittausmenetelmä	7
	3.2 Sandwich-ELISA-mittausmenetelmä	9
4	MONILEIMALUKIJAT	12
	4.1 Fluostar optima	12
	4.2 iEMS Reader MF, Labsystems	12
5	MIKROLEVYJEN MITTAUS	13
	5.1 Absorbanssi mittausmenetelmä	13
	5.2 Absorbanssimääritykset	14
	5.3 Lambertin ja Beerin laki	14
6	FOTOMETRIT.....	16
	6.1 Spektrofotometri	16
	6.2 Spektrofotometrin rakenneosat	17
	6.3 Vakiokuvaaja	18
7	TYÖOHJE	20
	7.1 Työohjeen rakenne.....	20
	7.2 Työohjeen ulkoasu	21
	7.3 Otsikointi ja johdanto.....	21
	7.4 Kappalejako	21
	7.5 Kuvat.....	22
	7.6 Työohjeen käyttö	22
8	VERIFIOINTI JA VALIDOINTI	23
9	OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUS- KYSYMYKSET.....	25
10	OPTIMA FLUOSTAR VERIFIOINTIPROSESSI.....	27
11	TYÖOHJEIDEN TEKO	30
12	POHDINTA.....	31
	12.1 Tutkimustulosten luotettavuus	32
	12.2 Tutkimuksen mahdolliset virhelähteet.....	32
	12.3 Johtopäätökset.....	33
13	LÄHTEET	35
14	LIITTEET.....	40

Liite1.	Kampylo EIA-määrittäminen	40
Liite2.	Kampylonäytteiden IgM, IgG ja IgA korrelaatio iEMS vs. Optima	42
Liite3.	Kampylo IgG, IgM ja IgA toistettavuus ja uusittavuus.....	45
Liite4.	Pikaohje S -CampAb-testin mittaaminen ja tulostaminen.....	47
<u> </u>	optima-monileimalukijalla	47

1 JOHDANTO

Tartuntataudit lisääntyvät niin Suomessa kuin muualla maailmassa ihmisten entistä runsaamman liikkumisen, käyttäytymismuutosten ja ilmaston lämpenemisen vuoksi. Tartuntatautien tilastollista määrää on suurentanut myös diagnostiikan kehittyminen. (Leinikki 2005.)

Diagnostiikan kehittymisen seurauksena laboratoriomittauksissa on otettu käyttöön monenlaisia mittausmenetelmiä, kuten fotometriä, fluorometriä, nefelometriä ja luminometriä. Laajahko tutkimusmenetelmien kirjo on vaatinut luonnollisesti myös useita eri mittalaitteita. Laboratoriotekniikan kehitys on mahdollistanut sen, että yhteen laitteeseen on pystytty sisällyttämään useita mittausmenetelmiä.

Mittausmenetelmien ja laitteiden käyttöön vaikuttavat kaksi pääasiaa, käytettävyys ja luotettavuus. Käytettävyys nousee tärkeään rooliin, koska mittausohjelman laitteen käyttämisen on oltava helppoa. Niiden käytettävyyteen liittyy myös tulosten saamisen nopeus. Mittaustulosten on oltava luotettavia, koska niiden perusteella tehdään hoitopäätöksiä. Luotettavuuteen kuuluu mm. tarkkuus, pieni häiriöalttius ja tulosten toistettavuus. Haasteena on myös henkilökunnan kouluttaminen laboratoriolaitteiden oikeaoppiseen käyttöön. (von Lode 2005.) Analytiikan käyttöönotto ja käytön opastus on tapahduttava koulutetun henkilön valvonnassa (Åkerman et. al. 2010, 81).

Tämän opinnäytetyön tilaajana toimii Huslab immunologian osasto, josta aihe löytyi osaston ylilääkärin idean tiimoilta. Työn tarkoituksena oli luoda Optima Fluostar-monileimalukijalle kampylobakteerin Elisa-menetelmällä tehtävä immunologisen tutkimuksen mittausohjelma ja pikaohjeet, jotta potilaat saavat jatkossakin luotettavia ja laadukkaita tuloksia. Laitteen tarkoituksena on toimia varalaitteena, mikäli vanha iEMS-monileimalukija hajoaa.

Spektrofotometri Fluostar Optima on monileimalukija, mikä mahdollistaa muun muassa fluorometrisen, fotometrisen ja luminometrisen mittauksen (BmgLabtech 2007, 3). Spektrofotometrejä käytetään kvantitatiivisiin tutkimuksiin, kuten proteiini ja nukleiinihappopitoisuuksien määrittämiseen näytteistä, happo- ja lisäainepitoisuuksien tutkimiseen ja lisätty

jen tai luonnollisten väriaineiden pitoisuuksien määrittämiseen. (Happonen 2012, 8). Tässä opinnäytetyössä monileimalukijaa tullaan käyttämään kampylobakteerinäytteiden mittaamiseen fotometriaan perustuvalla absorbanssien mittauksella.

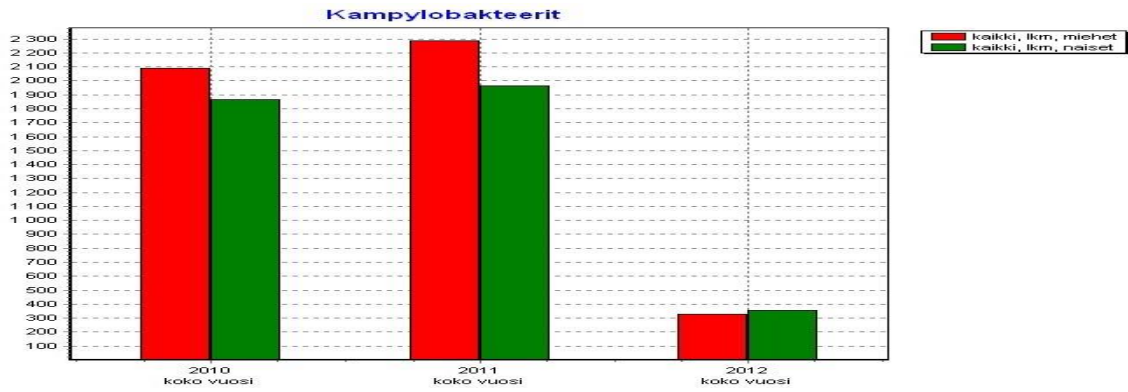
Opinnäytetyö koostuu kahdesta eri tulososiosta, joista ensimmäinen osa on kahden eri spektrofotometrin laitevertailu mittaustuloksille ja toinen osa tuotoksena laadittu työohje. Työohje sisältää työvaiheiden kuvauksen siitä, miten tutkimus suoritetaan ja pikaohjeen kampylo-testin mittaamisesta ja tulostamisesta OPTIMA-monileimalukijalla. Työohje etenee vaiheittain työn aloitustoimista työn lopetukseen, mutta työohjetta voidaan käyttää myös yksittäisten työvaiheiden tarkasteluun. Opinnäytteen ensimmäisissä kappaleissa perehdytään teorioihin käyttöönotetun kampylomittausohjelman taustalta. Seuraavissa luvuissa taas käydään läpi itse käyttöönotettujen laitteiden tekniset ominaisuudet ja rakenteet. Sen jälkeen jatketaan työohjeen laadintaan ja itse verifiointiin. Viimeisenä varsinaisessa luvussa vielä tehdään lyhyt pohdinta tämän käyttöönoton aikana havaituista asioista. Varsinaisen opinnäytteen lopuksi ovat vielä liitteinä itse tehdyt työohjeet Optima laitteelle.

2 KAMPYLOBAKTEERIT

Kampylobakteerit ovat kaikkialla maailmassa erittäin yleisesti esiintyviä eläinten ja lintujen suolistobakteereja. Kampylobakteerit tunnistettiin kuitenkin vasta 1970-luvulla ihmisen sairauksien aiheuttajiksi, vaikka yksittäisten ihmisten sairastumisia kampylobakteeri-infektioihin on kuvattu jo ennen 1970-lukua. Lajeista *C.jejuni* ja *C.coli* ovat yleisiä eläinperäisten elintarvikkeiden välityksellä leviäviä kampylobakteereita ja ripulin aiheuttajia, eivätkä ne kuulu ihmisen suoliston normaaliflooraan. Sen sijaan niitä tavataan yleisesti terveiden eläinten, sekä tuotanto, että villieläinten suolistosta. *C. lari* ja *C. butzleri* ovat taas harvinaisia ripulin aiheuttajia. Ihmisen kampylobakterioosi eli kampyloinfektio onkin yleisemmin peräisin elintarvikkeesta, joka on saastunut eläimen ulosteesta. Huonosti kypsytetty broileri tai muun eläimen liha, pastöroimaton maito tai saastunut juomavesi ovat myös yleisiä kampylobakteeri-infektion aiheuttajia. Kampylobakteeri harvoin tarttuu sairastuneesta eläimestä ihmiseen ja sairastuneesta ihmisestä toiseen vielä harvemmin. (Schönberg-Norio 2009, 10, Mäkelä & Mäkelä & Wager & Vaheri 1978, 271-272 ; Niemi & Rahkio & Siitonen 1998, 136-137; Kurki & Pammo 2010, 80).

Kampylobakteerit aiheuttavat ripulin ja kuumeen lisäksi kovia vatsakipuja. Kampylobakteeri-infektio alkaa useimmiten äkillisesti, kun saastuneen elintarvikkeen syömisestä on kulunut aikaa noin päivästä viikkoon. Ripulioireet kestävät normaalisti noin kolmesta viiteen päivään, mutta vatsakivut, sairaudentunne ja vatsan kurina voivat jatkua useita päiviä, jopa viikkoja ja ne ovat usein voimakkaampia kuin muissa bakteeritartunnoissa. Näennäistä paranemista seuraava uusi raju tautijakso ei myöskään ole harvinaisuus. (Mäkelä & Mäkelä & Wager & Vaheri 1978, 272).

Suomessa Kampylobakterioosi todetaan vuosittain muutamalla tuhannella ihmisellä, joista osa on saanut tartunnan kotimaassa, muut ruokaillessaan etelän lomakohteissa. Kuviossa 1 nähdään, että kampylobakteeritapaukset ovat pysyneet siinä 2000 sairastuneen luokassa per sukupuoli vuosien 2011 ja 2012 välisenä aikana. Vuoden 2012 osalta ei voida vielä sanoa, että mikä tilanne on, koska kuvassa vuodesta 2012 oli kulunut vasta muutama kuukausi.



Kuvio1. THL:n tartuntatautirekisteriin ilmoitetut kampylobakteeritapaukset vuosina 2010-2012 (THL/Tartuntatautirekisteri 2010-2012.)

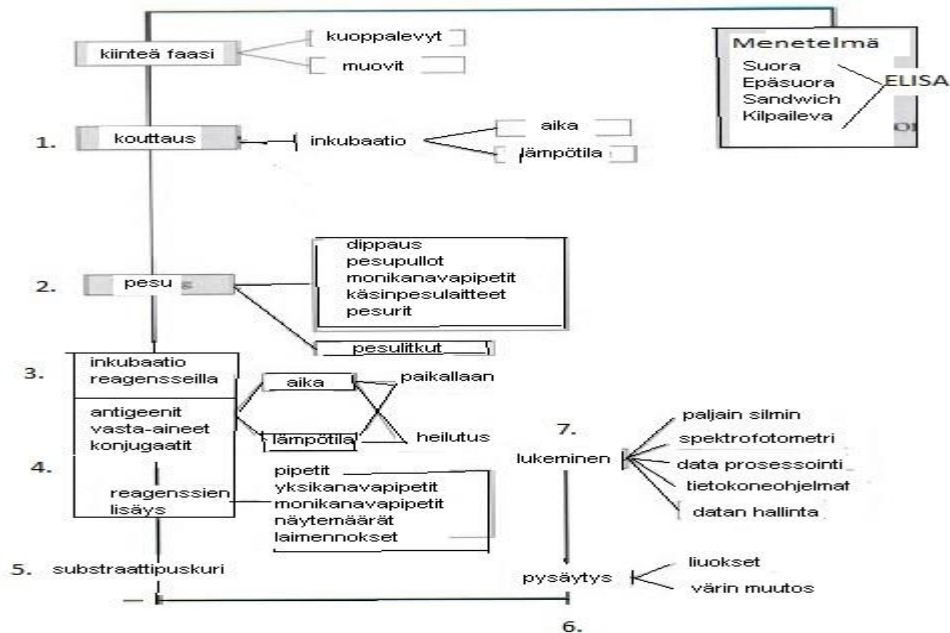
Kampylobakteeri-infektion jälkitautina osa sairastuneista saa reaktiivisen tulehduksen. Tavallisimmin potilailla, joilla on HLA-B27-antigeeni. Muina oireina voi ilmetä muun muassa Reiterin oireyhtymää, kardiittia ja pankreatiittia. (Mäkelä & Mäkelä & Wager & Vaheri 1978, 272).

3 ELISA-MENETELMÄ

Kampylobakteeri-infektion todennäköisyys tullaan tutkimaan ELISA-menetelmään perustuvalla vasta-aine tutkimuksella. ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbentti määrittely ELISA (engl. enzymelinked immunosorbent assay) on immunokemiallinen tekniikka, jota on laajalti käytössä bakteri- ja virustautien immunitetin osoittamisessa. Suurin syy Elisa-menetelmän laajaan käyttöön liittyy siihen, että testi on joustava ja sallii erilaisten kombinaatioiden käytön testin suorittamisessa. Lisäksi jatkuva spesifisten kaupallisten tuotteiden kehittäminen menetelmälle on lisännyt kiinnostusta kyseistä menetelmää kohtaan. Kaupallisesti on saatavana erilaisia konjugaatteja, jotka sisältävät entsyymien, substraatteja, mikrokuoppalevyjä sekä laitteita ja robotiikkaa, jotka helpottavat testien suorittamista. (Hay & Westwood 2002, 170, Mäkelä & Mäkelä & Wager & Vaheeri 1978, 61; Walker & Rapley 2008, 6.)

ELISA menetelmässä kiinteään faasiin, yleisemmin kuoppalevyille kiinnitetty antigeeni tai vasta-aine pystytään osoittamaan siihen sitoutuvan vasta-aineen tai antigeenin avulla. Tyypillisesti tämä osoitetaan entsyymaattisesti värireaktiona. Muodostuneen yhdisteen pitoisuus kuvastaa suoraan vasta-aineen konsentraatiota alkuperäisessä näytteessä. Tämä on paljon käytetty menetelmä erilaisissa vasta-ainemäärityksissä monin sovellutuksin. (Hay & Westwood 2002, 170; Mäkelä & Mäkelä & Wager & Vaheeri 1978, 61; Walker & Rapley 2008, 656.)

Kuviossa 2 on kuvattuna Elisa- menetelmä periaattetta ja numeroin, missä järjestyksessä tutkimus etenee.



Kuvio2. ELISA-menetelmä kulku. (Crowther 2009: 3.)

Menetelmän perustuu vasta-aineiden eli immunoglobuliinien tyypillisiin ominaisuuksiin. Vasta-aineet ovat molekyyliä, jotka ovat proteiinirakenteisia (valkuaisia) sekä ne syntyvät imukudoksessa antigeenistimulaation seurauksena spesifisiä kohdemolekyyliä kohtaan. Antigeenit taas ovat tiettyjä ulkoisia aineita, jotka synnyttävät vasta-aineita elimistössä ja niitä kutsutaan myös immunogeeneiksi. Tämä immunoglobuliinien ominaisuus mahdollistaa sen, että tutkittava aine havaitaan jo pieninä pitoisuuksina. Vasta-aineita on tunnistettu viisi erilaista immunoglobuliiniluokkaa (IgA, IgM, IgG, IgD ja IgE). Kohdemolekyylit voivat olla synteettisiä tai luonnollisia molekyyliä. Kohdemolekyylin ja vasta-aineen välinen sidos on luja ja kestää määrittämisen vaiheet. (Mäkelä, Mäkelä, Wager & Vaheeri 1978, 7; Crowther 2001, 9).

ELISA perustuu mitattavaan värinmuodostusreaktioon, jonka saa aikaan vasta-ainemolekyylisiin liitetty entsyymileima eli konjugaatti sopivan substraatti lisäyksen jälkeen (Davies 2005, 4). Yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat alkalinen fosfataasi sekä piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroksidase, HRP) (Kemeny 1989, 14; Crowther 2009, 61- 63).

ELISA jaotellaan kolmeen eri päätyyppiin: suoraan ja epäsuoraan menetelmään sekä sandwichELISA:an, joka voidaan myös jakaa suoraan ja epäsuoraan menetelmään. Kaikkia kolmea menetelmätapaa voidaan soveltaa myös inhiboivana menetelmänä tai kilpailevana menetelmänä (Crowther 2009, 12- 13, 16; Mäkelä, Mäkelä, Wager & Vaheri 1978, 53).

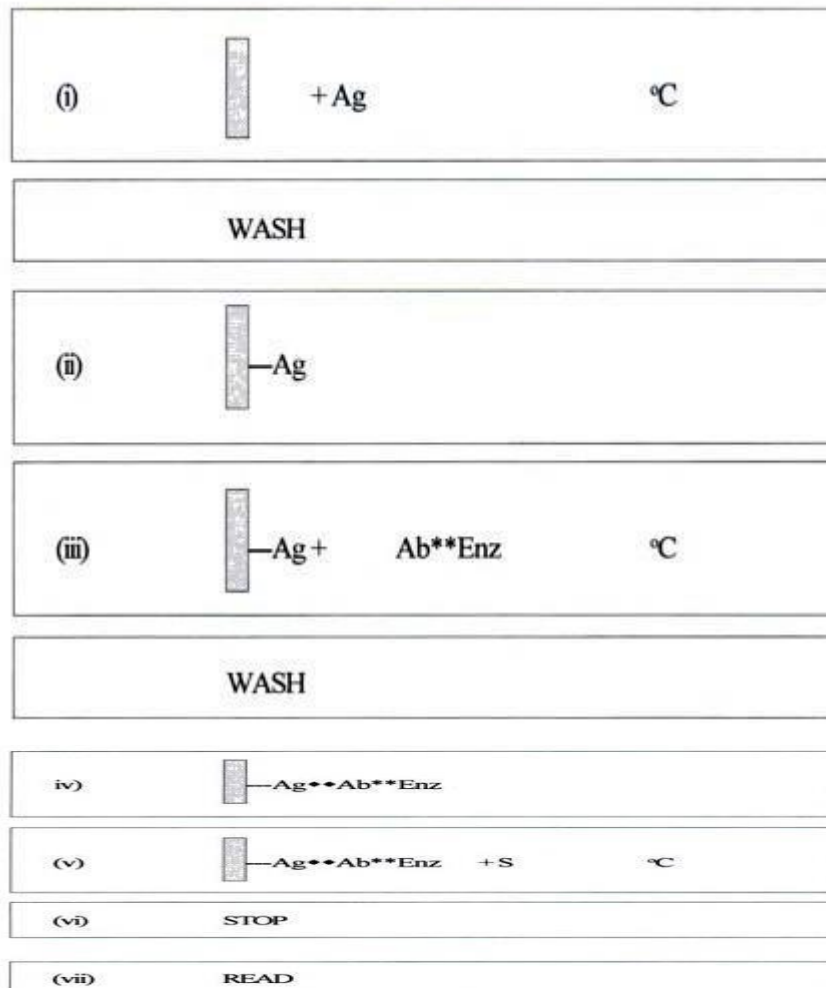
3.1 Suora ja epäsuora Elisa-mittausmenetelmä

Suora menetelmä (kuvio 3) voidaan pitää ELISA:n yksinkertaisimpana muotona. Siinä määritettävää antigeenia laimennetaan puskuriliuoksilla, yleensä PBS:llä (phosphate-buffered saline) tai korkean pH:n (9.6) karbonaattipuskurilla kiinteään faasiin. Salaisuus on siinä, ettei puskuriliuos sisällä muita proteiineja, jotka saattaisivat kilpailla määritettävistä antigeeneista kiinteän faasin pinnalla. Antigeenit ovat pääsääntöisesti proteiineja luonnossa ja sitoutuvat passiivisesti kiinteän faasin pinnalle inkuboinnin aikana, joka useimmiten on muovinen 96-kuoppalevy. Inkuboinnin jälkeen sitoutumaton osa näytteestä pestään pois yksinkertaisella pesulla puskuroidulla pesuliuoksella. Tris-pesupuskuri on useinmiten käytössä. Pesun jälkeen voidaan kuoppalevyille lisätä vasta-ainetta, jossa on entsyymileima, joka on antigeenille spesifistä. Tätä kutsutaan konjugaatiksi. Ennen kiinteälle faasille lisäämistä vasta-aine voidaan laimentaa puskurilla, joka sisältää blokkausyhdistettä, esimerkiksi proteiinia. Tällöin voidaan estää vasta-aineen passiivinen adsorptio kuoppalevyn pohjaan ja epäspesifinen sitoutuminen. Antigeenin ja vasta-aineen spesifinen sitoutuminen on silti mahdollista. BSA:ta (bovine serum albumin) eli naudan seerumin albumiinia tai puskuriin liuotettua rasvatonta maitojauhetta käytetään usein blokkauspuskurina. (Crowther 2009, 13-14, 58- 60; Crowther 2001, 13- 14.)

Inkuboinnin aikana entsyymileimattu vasta-aine eli konjugaatti sitoutuu spesifisesti kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja entsyymille sopi-

vaa substraattia tai substraatti-kromogeeni-yhdistelmää lisätään kuoppalevyille, jolloin entsyymi katalysoi värinmuodostusreaktion. Reaktio pysäytetään tietyn ajan kuluessa sopivalla STOP-liuoksella. Näytteiden antigeenipitoisuus mitataan käyttämällä spektrofotometriä sopivalla aallonpituudella (Crowther 2009,14; Crowther 2001, 13- 14).

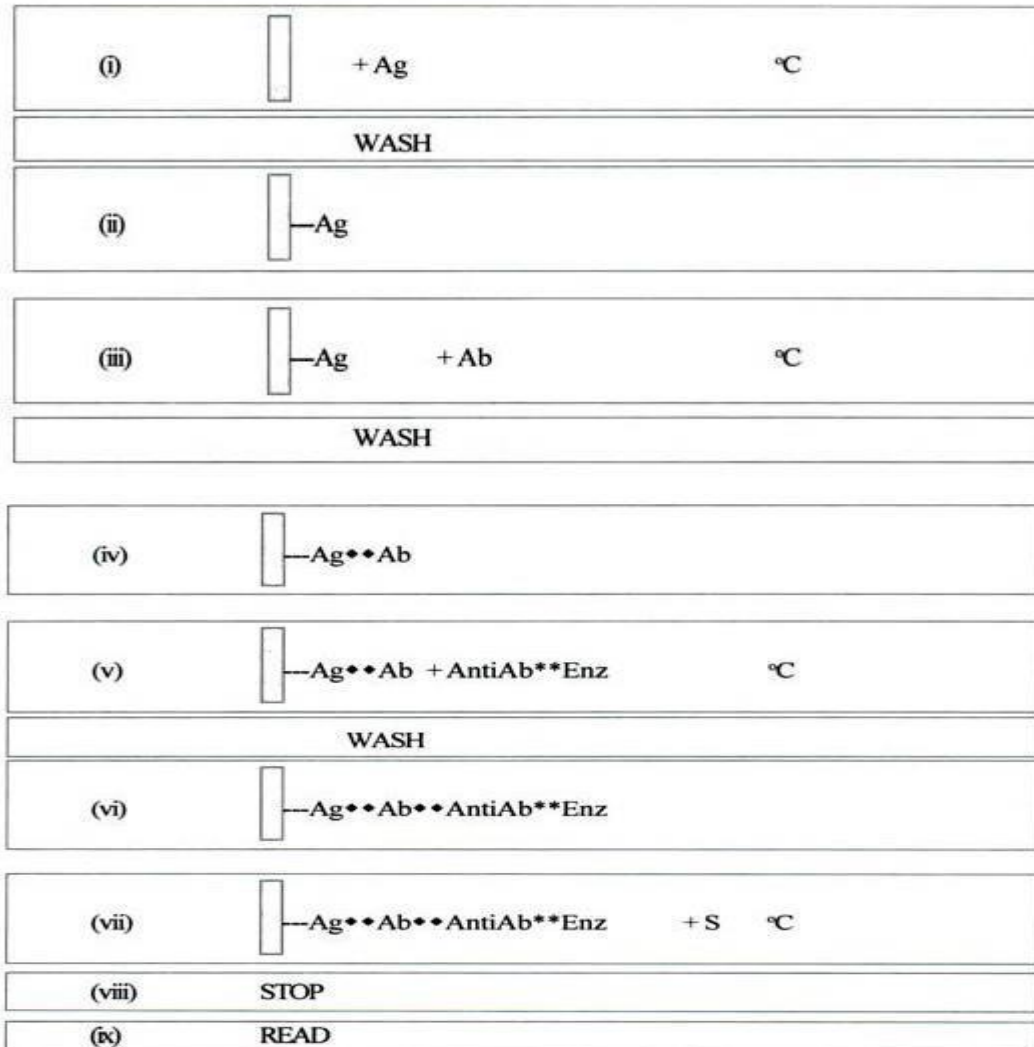
Direct ELISA



Kuvio 3. Suora ELISA-menetelmä. (Crowther 2001, 13).

Epäsuoran ELISA-menetelmän (Kuvio 4) erottaa suorasta menetelmästä kuoppalevyille lisättävä leimaamaton vasta-aine eli usein miten tutkittava näyte, joka inkuboinnin aikana tarttuu kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Pesun jälkeen levyille lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, joka sitoutuu aiemmin lisättyyn vasta-aineeseen. Kun suorassa menetelmässä konjugaatti ja vasta-aine lisätään samalla kertaa, niin epäsuorassa ne lisätään erikseen. Tämän vaiheen jälkeen määrittystä jatketaan samalla tavoin kuin suorassa menetelmässä. (Crowther 2009, 14 ; Crowther 2001, 14- 15.)

Indirect ELISA

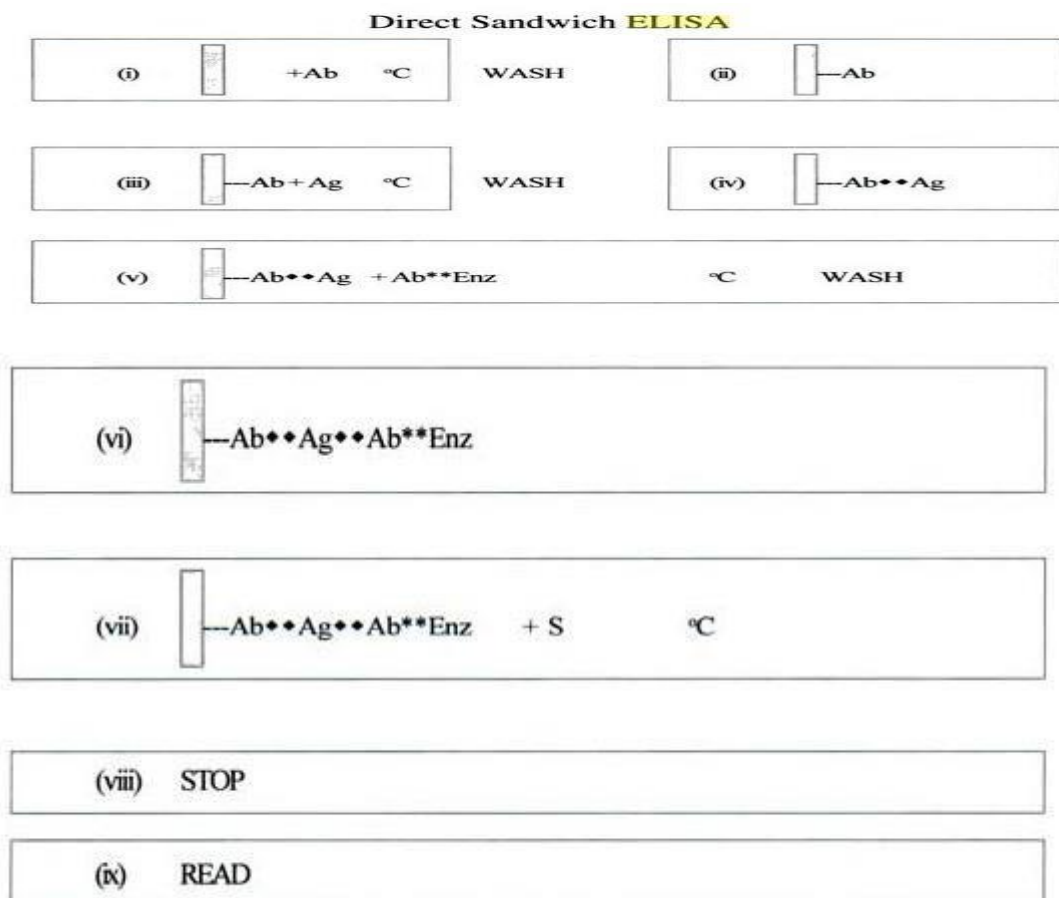


Kuvio 4. Epäsuora-ELISA. (Crowther 2001, 15).

3.2 Sandwich-ELISA-mittausmenetelmä

Sandwich-ELISA-menetelmä (Kuvio 5) voidaan jakaa kahteen eri menetelmään, jotka on nimetty suora-sandwich-ELISA ja epäsuora-sandwich-ELISA. Suorassa menetelmässä vasta-aineet (tutkittava näyte) sitoutuvat kiinteään faasiin passiivisesti inkubaation aikana. Kiinteään faasiin on sidottu tätä ennen vasta-aine (capture antibody), joka voi olla samaa tai

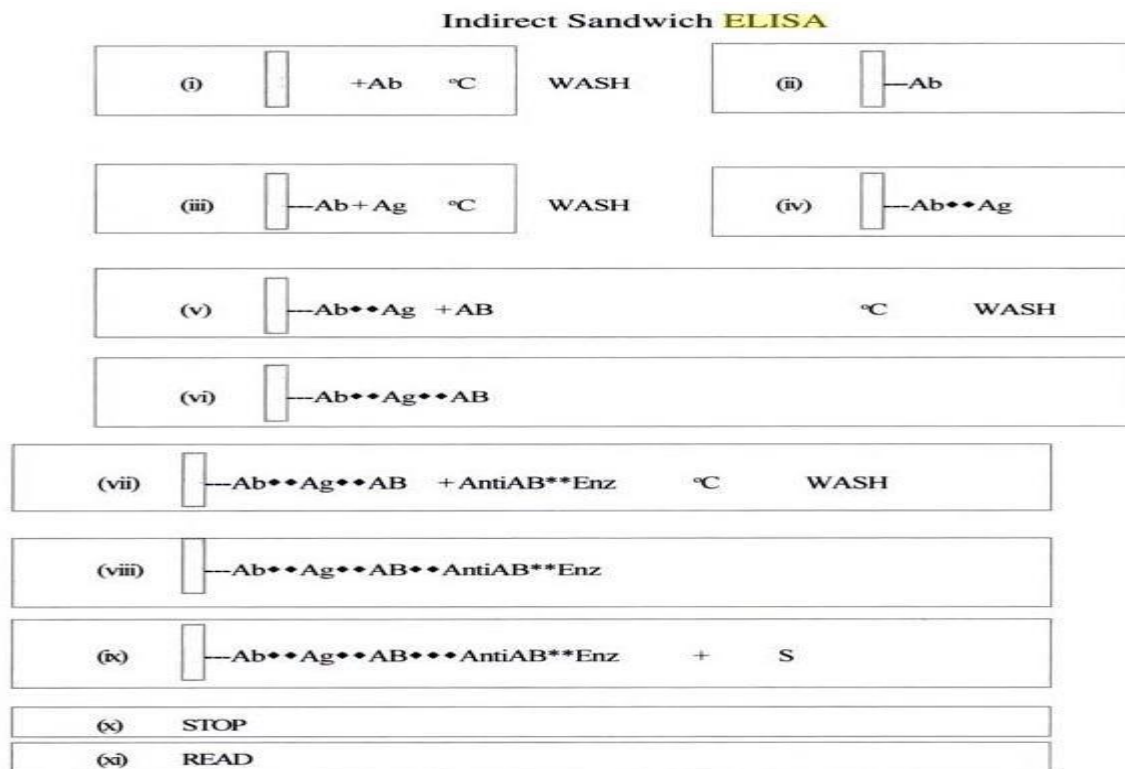
eri seerumia kuin tutkittava vastaaine. Inkubaation jälkeen vapaat vasta-aineet pestään pois puskuroidulla pesupuskurilla ja lisätään antigeenia, joka kiinnittyy kiinteällä faasilla oleviin vasta-aineisiin inkuboinnin aikana. Sitoutumattomat antigeenit pestään taas pois. Pesuvaiheen jälkeen kuoppalevyille lisätään entsyymikonjugoitu antigeenille spesifinen vasta-aine (sekundäärivasta-aine). Tämä sitoutuu antigeeniin inkuboinnin aikana. Inkuboinnin jälkeen toistetaan pesuvaihe ja lisätään entsyymille sopiva substraatti. Reaktio pysäytetään STOP-liuoksella ja näytteen antigeenipitoisuus mitataan käyttämällä spektrofotometriä sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009, 17; Crowther 2001, 17- 19.)



Kuvio 5. Sandwich-ELISA. (Crowther 2001, 17).

Sandwich-menetelmän rajoittavana tekijänä on, että antigeenilla on oltava vähintään kaksi vasta-ainetta sitovaa kohtaa eli epitooppia. Toisella epitoopilla se tarttuu kuoppalevyille liittäytyn sekundäärivasta-aineeseen ja toisella sidottuun vasta-aineeseen. Tämä rajoittaa menetelmän käyttöä (Crowther 2009, 18; Crowther 2001, 19.)

Epäsuorassa menetelmässä (Kuvio 6) vaiheet 1-4 ovat pääpiirteissään samanlaisia, mutta epäsuorassa-sandwich-menetelmässä taas ensimmäiseksi lisätään näytteen ja antigeenin inkuboinnin jälkeen leimaamaton sekundäärivasta-aine. Tämän jälkeen lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, joka tunnistaa leimaamattoman vasta-aineen rakenneosan, jolloin sitä voidaan käyttää laajalle määrälle eri sekundäärivasta-aineita. Kiinteään faasiin sidotun vasta-aineen ja sekundäärivasta-aineen täytyy olla peräisin eri eläinlajeista, jotta entsyymikonjugoitu vasta-aine reagoi vain sekundäärivasta-aineen, mutta ei kiinteään faasiin liitetyn vasta-aineen kanssa. (Crowther 2009, 19- 21, Crowther 2001; 192.)



Kuvio 6. Epäsuora sandwich-ELISA. (Crowther 2001, 20).

Tässä opinnäytetyössä käytetään Alkalinen fosfataasi-ELISA:an perustuvaa epäsuoraa ELISA-menetelmää, jossa substraattina toimii 4-nitrophenylfosfaatti (4-NPP), joka saa aikaan värillisen yhdisteen reagoiessaan konjugaatin kanssa. Lopulta värjäytyneen yhdisteen mittaaminen voidaan suorittaa spektrofotometrillä 450 nm aallonpituudella fotometrisesti absorbanssien mittaamisella.

4 MONILEIMALUKIJAT

Monileimalukijat ovat laboratoriokäyttöön suunnattuja laitteita, joilla on tarkoitus mitata kemiallisia, fysiologisia ja biologisia reaktioita monileimalukijaan laitettavalta kuoppalevyiltä. Monileimalukijoiden toiminta perustuu valolla aikaan saatuihin reaktioihin valaisemalla näyte tietynlaisella valolla ja mittaamalla sen läpi päästämä valo. (Bmglabtech 1997-2014.) Nykyiset levynlukijat voidaan jakaa karkeasti kahteen luokkaan; yhden mittausteknologian laitteisiin ja monileimalukijoihin, joihin on sisäänrakennettu monta eri mittausteknologiaa. Fluostar Optima kuuluu näistä tähän jälkimmäiseen luokkaan.

4.1 Fluostar optima

Fluostar optima on monileimalukija, jolla voidaan mitata signaaleja erikokoisista kuoppalevyistä viidellä eri teknologialla, joita ovat luminometria, fotometria, fluorometria, fluoresenssipolarisaatio ja aika-erotteinen fluorometria. Laitteen detektorina toimii hiljainen valomonistinputki (Low noise photomultiplier tube). Viritys valo saadaan korkea energisestä xenon-salama lampusta(High energy xenon flash lamp). Haluttu aallonpituus voidaan valita laitteeseen käsin lisättävillä filtereillä. (Bmglabtech: 5.)

4.2 iEMS Reader MF, Labsystems

96-kuoppalevyn fotometri, jonka avulla voidaan mm. määrittää endotoksiineja, solujen lisääntymistä, entsyymi aktiivisuuksia, koagulaatiotekijöitä, suorittaa immuunimäärityksiä (ELISA) sekä suorittaa levyn ravistelua ja termostointia. Laitteessa on kahdeksan filteriä ja UV-optiikka, jossa on 8-mittauskanavaa. Laitteen detektorina toimii 9 silikoniset photodiodit. Viritys valo saadaan volftami-halogeenilampusta. Haluttu aallonpituus voidaan valita laitteen sisällä valmiilla olevilla filtereillä eli suotimilla. (Labsystems Operation manual 1997.)

5 MIKROLEVYJEN MITTAUS

Monet eri Elisa-menetelmään perustuvat määritykset suoritetaan nykyisin yhä useammin mikrolevyissä. Mikrolevyt ovat ulkomitoiltaan 12,7 cm x 8,6 cm x 1,5 cm, useimmiten polystyreenistä valmistettuja näytelevyjä. Yleisimmin käytössä on 96-kaivoinen muoto, johon on käsittelyn helpottamiseksi saatavilla annostelu- ja pesulaitteistoja. mikrolevyjen kuoppakaivojen lisääntynyt määrä mikrolevyissä johtuu etenkin siitä, että reagenssit ovat todella kalliita. Käytetyt määritystilavuudet vaihtelevat 1 µL ja 300 µL välillä. Mikrolevyjä on saatavana kolmea eri väriä. Kampylobakteerimittauksissa käytetään 96-kuoppaista mikrolevyä näytteiden absorbanssien mittaamisessa. Mikrolevyjä kutsutaan useimmiten tuttavallisemmin kuoppalevyiksi.

(Suomen laboratoriolitto 2003, 7-9; Suominen, Haajanen & Pärssinen 2012.)

5.1 Absorbanssi mittausmenetelmä

Absorbanssin mittaamisen eli absorptiometrian yleisenä periaatteena on määrittää tutkittavan näytteen pitoisuus mittaamalla näytteen läpäisseen sähkömagneettisen säteilyn absorptio. Kyky absorboida UV- ja näkyvän valon alueen säteilyä on peräisin kromoforeista. Ne ovat molekyylin rakenneosia, kuten konjugoituneita kaksoissidoksia ja karbonaaliryhmiä, jotka siirtävät absorptiota pidemmälle aallonpituudelle. Absorboivana materiaalina voi toimia joko endogeeninen yhdiste (aine, jota voi muodostua tarkasteltavan eliön elimistössä luonnostaan), väriaine tai kemiallinen reaktiotuote. Aineen absorbanssin määrittämiseksi mitataan näytteen läpi kulkeneen valon ja näytteen ohittaneen valon intensiteettien suhde. Tätä suhdetta kutsutaan transmissioksi (T). Absorbanssi lasketaan transmission käänteislogaritmina: Absorbanssi = $-\log T$. Tällöin esimerkiksi 75 % valon kulkeutuessa näytteen läpi, transmittanssi on 0,75 ja 25 % absorboituu. Absorbanssi on $-\log 0,75 = 0,125$. Spektometrit rekistöivät transmittanssin automaattisesti aallonpituuden funktiona, jolloin saadaan näytteen absorptio- tai transmittanssispektri eikä sitä tarvitse laskea erikseen.

Jos absorbanssi on hyvin pieni, vain pieni osa valosta absorboituu näytteeseen ja tämän pienen muutoksen tarkka määrittäminen on vaikeaa. Jos toisaalta absorbanssi on hyvin

suuri, näytteen läpi menee säteilyä niin vähän, että sen mittaus on epätarkkaa. (Jaarinen 2005, 52 - 54).

5.2 Absorbanssimääritykset

Absorbanssimääritykset voivat olla nopeita ja käteviä, koska mitään ylimääräisiä reagensseja tai inkubointeja ei aina tarvita. Proteiinistandardinkaan ei tarvitse välttämättä olla valmis, eikä määrittäminen kuluta tällöin proteiinia. Suhde absorbanssin ja proteiinin konsentraatioon on lineaarinen. Proteiinien hyvin vaihtelevista absorptio-ominaisuuksista johtuen saattaa esiintyä huomattavia mittausvirheitä etenkin tuntemattomista näytteistä. Tämän takia on hyvä käyttää mittauksessa jotain tunnettuja kontrolleita sekä tehdä mittaus dublikaatteina eli rinnakkaisina mittauksina. (Caprette 1996.)

Mikä tahansa näytteseoksen ei-proteiini komponentti, joka absorboi ultraviolettivaloa saattaa sotkea kuitenkin määrittäystä. Solujen ja kudosten fraktiointi näytteet sisältävät usein liukenemattomia tai värittyviä komponentteja, jotka häiritsevät määrittäystä. Absorbanssimäärityksissä on suositeltavaa kalibroida vakiokuvaaja eli standardi naudan seerumin albumiinista (BSA) tai muusta puhtaasta proteiinista. (Caprette 1996.)

Tässä opinnäytetyössä käytetään Optima fluostar spektrofotometriä kamytonnäytteiden absorbanssien mittaamiseen. Mittaamisen suorittamiseksi on tehtävä oma mittauspohja, johon valitaan aallonpituudeksi 450 nm vanhemman Iems-monileimalukijan mittausohjelman mukaisesti.

5.3 Lambertin ja Beerin laki

Absorbanssin havaitsemista käytetään ELISA-määrityksissä, proteiini- ja nukleinihappomäärityksissä tai entsyymiaktiivisuudemäärityksissä ja ne perustuvat yleensä Lambert ja Beerin lakiin, tutkijoidensa löytämien havaintojen mukaisesti. Lakia kutsutaankin fotometrian peruslaiksi, jossa Absorbanssi = kcl . Vakio k on kullekin kloroforille ominainen

absortiviteetti eli molaarinen ekstinktiokerroin, c on mitattavan aineen pitoisuus ja l on näytteen paksuus. (Rantala 1998, 220).

Analyttisissä mittauksissa on tärkeä merkitys käytännön kannalta siltä, onko Lambertin ja Beerin laki voimassa vai ei. Beerin lain ollessa kyseessä tarvitaan mittauksia varten tehdä kalibraatiokäyrä. Absorboituneen valon määrä tietyllä aallonpituudella on Beerin lain mukaan verrannollinen valon kulkutiellä olevan absorboituvan aineen määrään eli aineen pitoisuuteen liuoksessa, kun tarkasteltavan näytteen paksuus pidetään muuttumattomana. Absorbanssin mukaan piirretty konsentraatiokuvaaja on Beerin lain vallitessa origon kautta kulkeva suora. (Adlercreutz 1972, 44- 45).

6 FOTOMETRIT

Valtaosa nykyään käytettävistä kliinis-kemiallisista tutkimusmenetelmistä on kolorimetrisia menetelmiä, joissa tutkittava aine todetaan tai mitataan siitä johtuvan värin avulla. Aineesta aikaansaadaan, ellei se itse ole sellaisenaan sopiva väriaine, kemiallisen reaktion avulla väriäinen, jonka värin voimakkuus on suoraan verrannollinen aineen määrään. Liuoksen väriä verrataan tutkittavan aineen tunnetuilla liuoksilla saatuihin väreihin ja näiden voimakkuuksien mukaan päätellään aineen pitoisuus näytteessä. Värin voimakkuuden mittaaminen silmän avulla eli visuaalinen kolorimetria on epätarkkana ja hankalana menetelmänä jäänyt pois käytännössä varsinaisissa määrityksissä. Tähän tarkoitukseen käytetään sen sijaan valon määrän sähköiseen mittaukseen suunniteltuja laitteita, fotometreja.

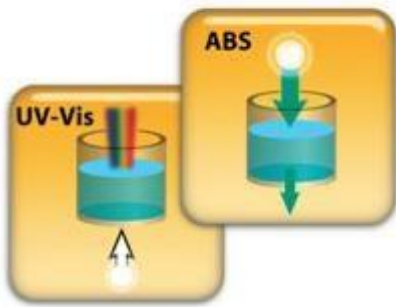
(Adlercreutz 1972, 43- 44).

Fotometrisissa mittauksissa mittausolosuhteiden tulisivat olla sellaiset, että tuloksena saatava absorbanssiarvo on luotettava. Tämä tarkoittaa sitä, että näytteen absorbanssin ollessa hyvin pieni, signaali voi kadota taustakohinaan ja suurilla absorbanssiarvoilla hajavalon puolestaan rajoittaa Lambert-Beerin lain mukaista lineaarista aluetta. (Jaarinen & Niiranen 2005, 60).

6.1 Spektrofotometri

Yksi käytettävistä laiteista absorbanssien mittaamiseksi (kuva 7) on spektrofotometri. Laitteen toiminta perustuu siihen, että suuritehoinen ksenonsalama valaisee näytteen käyttäen tietyllä aallonpituudella spesifistä optista suodatinta (filteriä), tai näyte mitataan koko näkyvän spektrin alueelta. Tämän jälkeen valonilmaisim (detektori), joka sijaitsee mitattavan kuopan toisella puolella mittaa kuinka paljon alkuperäisestä (100%) valosta on kulkenut näytteen läpi. Läpi menneen valon määrä on suoraan verrannollinen tutkittavan näytteen pitoisuuteen. (Bmglabtech 1997- 2014.)

Absorbance (ABS)



Kuva 7. Absorbanssin mittaaminen (Bmglabtech 1997- 2014).

Fotometriaan kuuluvat paitsi kolorimetriset mittaukset myös vastaavat absorptiospektritutkimukset ultraviolett- ja infrapuna-alueilla sekä mm. liekkifotometria ja fluorometria. (Adlercreutz 1972, 44).

Spektrofotometri on osoittautunut monipuolisimmaksi, luotettavimmaksi ja laajalti käytetyimmäksi kaikista laboratoriovälineistä. Suurin osa laboratoriotoinnoista on kehitetty tuottamaan värillinen lopputuote, joka voidaan havaita ja mitata tietynlaisella fotometrilla. Jopa korkeasti automatisoidut analysointijärjestelmät käyttävät spektrofotometriä loppumittaus laitteena. spektrofotometriä käytetään johtuen on välttämätöntä, että laboratorio työntekijöillä on spektrofotometriä periaatteen ymmärrystä sekä teknisiä kykyä käyttää näitä välineitä kunnolla ja suorittaa perus kalibrointi ja huoltotoimenpiteet. (Clinical Chemistry Lab Manual UNIT.)

6.2 Spektrofotometrin rakenneosat

Spektrofotometri koostuu kahdesta eri instrumentista; Spektrometrissa ja fotometrissa. Spektrometri tuottaa valoa tietyllä halutulla aallonpituudella ja fotometri mittaa valon voimakkuutta. Välineet on sijoitettu spektrofotometrilla niin, että mitattava kyveti/ levy voidaan sijoittaa spektrometripalkin ja fotometrin väliin. Läpi kulkeneen valon määrä putkesta

mitataan fotometrilla. Fotometri tuottaa jännitesignaalin näyttölaitteelle, tavallisesti galvanometrillä. Signaalin voimakkuus muuttuu riippuen valon määrän absorboitumisesta näytteen. (Caprette 1996.)

Kehittyneeseen väriin liittyvä aineen pitoisuus liuoksessa voidaan mitata määrittämällä imeytyvää valoa sopivalla aallonpituudella (Caprette 1996). Kuvassa 8 on kuvattuna spektrofotometrinen mittaus ja rakenneosat.

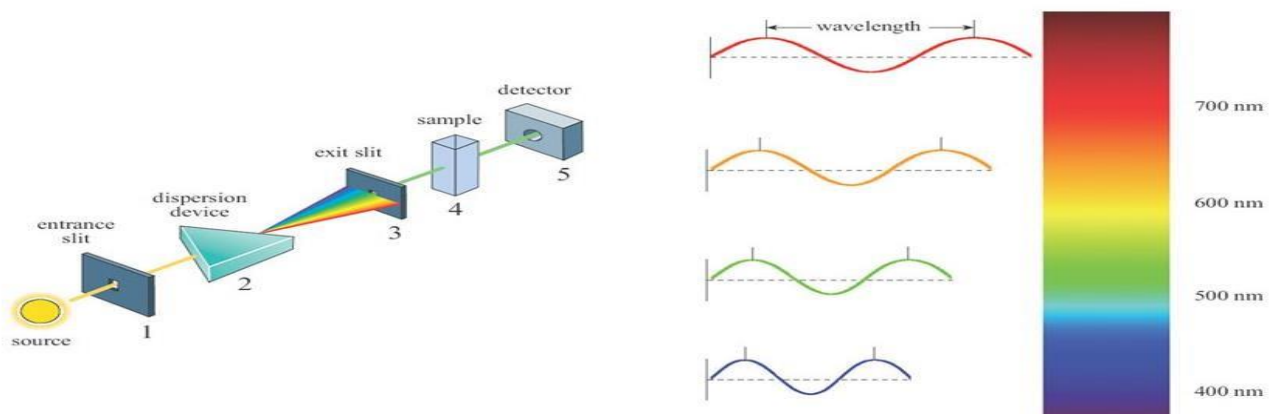


Figure 10: A spectrophotometer measures how much light of a certain wavelength is absorbed by a liquid

Kuva 8. spektrofotometrinen mittaus ja rakenneosat. (Jaarinen 2005, 55).

6.3 Vakiokuvaaja

Tuloksien saamiseksi ja mittaamiseksi täytyy mitattaville tutkimuksille olla olemassa ohjelmat, joihin on tehty mittauspohja, layout. Mittauspohjiin voidaan lisätä vakiot eli standardit, joiden avulla saadaan halutun näköinen kuvaaja. Lisäksi mittauspohjaan voidaan lisätä kontrollit sekä tutkittavat näytteet.

Riippuen tutkimuksesta, saattaa vakioiden määrä olla hyvinkin erilainen. Tästä johtuen on olemassa erilaisia vakiokuvaajia. Tutkimuksesta riippuen valitaan haluttu vakiokuvaaja, josta tulokset saadaan lasketuksi. Mars data analyser on ohjelmisto Fluostar Optimalle, joka kykenee vakiokuvaajan valinnan jälkeen laskemaan tulokset tutkituille näytteille.

Usein laboratoriomittaukset tehdään niin, että mittaustulosta verrataan tunnettuun standardikuvaajaan. Standardikuvaajan avulla pystytään laskemaan laboratoriomittausten lukemat. Tämän takia erilaisten laimennossarjojen teko on rutiinia biolaboratoriotöissä. SFS 3700-standardissa on käsitelty mm. mittausten lineaarisuutta. Teknisessä raportissa CEN/TR 10345 on käsitelty tulosten tilastollista käsittelyä. Perinteisesti laimennossarjojen teko onnistuu useimmiten punnitsemalla eri määrä kiinteää ainetta tunnettuun liuostilavuuteen. Lopputuloksena saadaan sarja liuoksia, joiden tarkat pitoisuudet tunnetaan ja näitä voidaan käyttää standardeina tai tunnettuina näytteinä tarvittavissa analyysissä. Yleensä erilaisia standardeja on noin 5 kpl sekä nollanäyte (tausta). Tausta voidaan vähentää pois mittauksen jälkeen, jolloin saadaan optimaalinen lukema mitatuille arvoille. (Suominen, Haajanen & Pärssinen 2012.)

7 TYÖOHJE

Tervosen (2004) mukaan työohjeessa kuvataan tietynlaisia toimintoja yksittäisistä työvaiheista (Tervonen 2004). Työohje on oleellinen ja tärkeä osa työn toteuttamista. Sen avulla työntekijä pystyy tekemään ammattimaisen tarkasti kaikki tarvittavat työvaiheet unohtamatta mitään tärkeää. Työohjeen avulla pystytään noudattamaan työturvallisuutta ja täten vähentämään työtapaturmia ja laiterikkoja. Kankaan (200,10) mukaan työohje lukeutuu perehdytysmateriaaliin, jonka keskeiset sisällöt ovat esimerkiksi tekniset, omaan työhön liittyvät asiat.

Ennen työohjeen kirjoittamista tehtävä työ käydään useampaan kertaan läpi tehden yksityiskohtaisia muistiinpanoja eri työvaiheista. Muistiinpanoja tehtäessä on suositeltavaa etsiä työvaiheet niin, että työ voidaan jakaa helpommin eri osiin. On myös järkevää ottaa kuvankaappauksia ja valokuvia työvaiheista. Näin mahdollistetaan se, että työohjeesta tulee tarkka eikä mikään työvaihe pääse unohtumaan. On tärkeää myös käydä läpi laitteiden käyttöohjeet ennen työohjeen kirjoittamista. (Hirsijärvi & Remes & Sajavaara 2007, 42–49.)

7.1 Työohjeen rakenne

Toimiva työohje on rakenteeltaan helppokäyttöinen, selkeä, kattava sekä yksityiskohtainen. Työohjeesta on hyvä tehdä ytimekäs, jonka lukemisessa mielenkiinto pysyy yllä loppuun asti. (Kjelin & Kuusisto 2003, 211.) Toimivan työohjeen avulla alan ammattilainen tai opiskelija pystyy tekemään työn ilman aikaisempaa kokemusta. Tyylejä työohjeen kirjoittamiseen on useita ja se on samankaltainen tyyliltään kuin opinnäytetyö, sillä sen on tarkoitus olla selkeä ja helposti ymmärrettävä. (Hirsijärvi 2007, 244–245.)

7.2 Työohjeen ulkoasu

Työohjeen tarkoituksena on auttaa lukijaa ymmärtämään monimutkaisia asioita (Huovila 2006, 11, 150). Työohjeen kuvat selkeyttävät, lisäävät tekstin ymmärrettävyyttä, täydentävät, jäsentävät ja työohjeen ulkoasua pidetään hyvin keskeisenä, sillä se toimii osaltaan viestin välittäjänä työtä tekevälle henkilökunnalle (Pesonen 2007, 33). Ulkoasun avulla viestitetään suoraan tekstin sisältöä. Epäolennaisen tiedon poistaminen, kuvien rajaaminen ja lukijan huomion kiinnittäminen olennaisiin asioihin, on tärkeä osa työohjeen rakenteesta. Kuvissa voidaan käyttää erilaisia elementtejä, kuten monimuotoista grafiikkaa, esimerkiksi valokuvia, johon on liitetty erilaisia symboleja ja tekstiä, helpottaa havainnollistavat tekstiä (Pesonen 2007, 48).

7.3 Otsikointi ja johdanto

Työohjeen otsikko kiteyttää selkeästi tehtävä työn. Työohjeen johdanto-osassa kerrotaan tiivistetysti työvaiheet, välineet sekä muut erityishuomiota vaativat toimenpiteet ennen työhön ryhtymistä, mikäli se on työtä helpottavaa ja tarpeellista. Näin vältetään yllätyksiltä kesken työn teon. Johdannossa voi myös olla esimerkiksi kuvaaja tai kaavio työvaiheista. Kuvaaja helpottaa ymmärtämään, minkälaisia työvaiheita tuleva työ pitää sisällään. Kuvaajan vaiheet on kannattavaa nimetä samoin, kuin niille tarkoitetut kappaleet on työohjeessakin nimetty. Tällä helpotetaan ymmärtämään, mitä työvaihetta mikäkin kohta kuvaajassa tarkalleen tarkoittaa. (Hirsijärvi 2007, 248–254.)

7.4 Kappalejako

Työohjeen selkeyden kannalta on kannattavaa laittaa jokainen työvaihe omaksi kappaleekseen ja tarvittaessa alaotsikoida kappaleita. Tämä helpottaa tietynlaisten kohtien löytämistä työohjeesta. Ulkoasusta tulee hyvin selkeä, kun kappalejako on tehty huolella. (Hirsijärvi 2007, 302–304.)

7.5 Kuvat

Työohjeen kuvat eri työvaiheista selkeyttävät asian ymmärrettävyyttä. Kuvat nimetään selkeästi, jotta työn tekijä tietää aina, mihin työn vaiheeseen ne liittyvät. Kuvina voidaan käyttää valokuvia, kuvan kaappauksia tietokoneelta tai piirroksia eri työvaiheista. (Hirsijärvi 2007, 311.)

7.6 Työohjeen käyttö

Tässä työssä laaditun työohjeen tarkoitus on olla apuna Elisa-menetelmään perustuvan kampylobakteerin mikrolevyn mittaamisessa. Työohjetta on hyvä pitää myöhemminkin mukana työtä tehdessä, jotta mikään työvaihe ei unohdu. Näin taataan aina ammattimaisesti ja huolella valmistetut ja mitatut mikrolevyt. Työohjeen kirjoittamisen jälkeen on hyvä pyytää testihenkilöä tekemään kampylobakteerisarja tämän uuden työohjeen perusteella tai pyytää ammattilaisen käymään työohje tarkasti läpi kohta kohdalta asiavirheiden varalta. Tällä selvitetään, että työohje on ymmärrettävä ja helposti seurattava. (Hirsijärvi 2007, 49–56.)

8 VERIFIOINTI JA VALIDOINTI

Opinnäytteeni on muodoltaan tutkielma, jonka tarkoituksena on verifioida kampylobakteerin vasta-ainetutkimuksen lopullinen mittausohjelma immunologian yksikköön sekä tuottaa verifiointin vaiheista ja tuloksista kirjallinen raportti. Tässä kappaleessa kuvaan verifiointin vaiheita ja periaatteita.

Menetelmät täytyy validoida/verifioida ennen käyttöönottoa laadunvarmistamiseksi. Laadunvarmistuksen yhteydessä puhutaan katselmuksesta (tekninen katselmus, technical review) sekä todentamisesta ja kelpoistamisesta (verification and validation). Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän toimivuuden varmistamista ennen sen hyväksymistä käyttöön. Koska kampylobakteeri vastaainetutkimus on jo aikoinaan varmistettu toimivaksi, niin omaksi tehtäväkseni jää uuteen laitteeseen (Fluostar Optima) tulostusohjelman tekeminen ja verifiointi käyttöön. (Haikala & Märijärvi 2006, 267–269; Vaara 2013,19.)

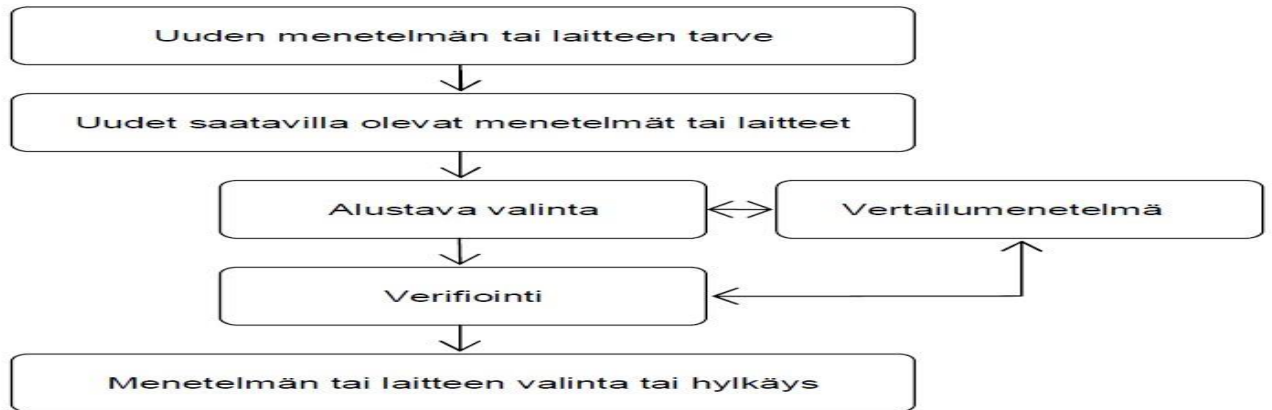
Validointia varten laaditaan suunnitelma esim. tarkoitukseen suunniteltua lomaketta käyttäen. Validointisuunnitelman/-raportin laatii tutkimuksen vastuhenkilö. Validoinnista saadut primääritulokset sekä validointisuunnitelma/-raportti arkistoidaan ao. työpisteessä. Vastuuyksikön päällikkö hyväksyy uuden menetelmän ennen sen käyttöönottoa. Validoinnin taso riippuu siitä, onko kyseessä referenssimenetelmä tai sellaiseen verrattavissa oleva menetelmä, muualla validoitu menetelmä (esim. kaupallinen, valmistajan validoima testausmenetelmä) vai laboratorion kehittämä testausmenetelmä.

Muualla täydellisesti validoidun menetelmän käyttöönottoon riittää se, että laboratoriossa osoitetaan menetelmän toimivan valmistajan tarkoittamalla ja käyttöön hyväksyttävällä tavalla ja että testikontrollit pysyvät valmistajan määrittelemissä validointirajoissa.

Referenssi- tai vastaavan menetelmän käyttöönottoa varten riittää osittainen validointi (verifiointi), jota varten määritetään esimerkiksi uusittavuus ja toistettavuus ja lineaarisuus. (Vaara 2013,19.)

Validoinnin periaatteena on tehdä mittausten sarja. Sen avulla tutkimalla ja puolueettomalla näytöllä varmistetaan, että menetelmä täyttää käyttötarkoituksen asettamat vaatimukset. Olemassa oleva taustatieto ja validoinnin tuloksena syntyvä tieto kerätään yhteen ja niiden perusteella todetaan onko menetelmä luotettava ja arvioidaan sen soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin avulla saadaan tietää menetelmien kriittiset tekijät, ja saadun validointitiedon avulla saadaan määritettyä menetelmän toimintarajat. Mikäli menetelmiin tehdään oleellisia muutoksia, kuten omassa tapauksessani uuden laitteen käyttöönottoa, tehdään uudelleenvalidointi. Tällöin esimerkiksi toistettavuuden, uusittavuuden ja lineaarisuuden todentamista kutsutaan verifiointiksi. Menetelmän verifiointilla todennetaan, että saatavien tulosten tarkkuus ja mittausalue täyttävät laboratorion ja asiakkaan asettamat tarpeet tai vaatimukset. Käytännössä verifiointilla tarkoitetaan validointia suppeampaa menetelmän testausta ja menetelmävastuuhenkilö päättää tapauskohtaisesti verifiointin laajuuden. (Vaara 2013, 19.) Sippolaa (2013) mukaillen voidaan sanoa, että dokumentoimaton verifiointi- tai validointitulokset on sama asia kuin sitä ei olisi olemassakaan.

Verifiointissa (kuvio8) aluksi todetaan uuden menetelmän tai laitteen tarve. Sitten selvitetään uusien laitteiden saatavuus ja tehdään alustava valinta. Tämän jälkeen tehdään testaus yhdessä vertailulaitteen kanssa. Verifiointin laajuudesta riippuen päätetään lopulta minkälaisia laatukriteereitä (toistettavuus, lineaarisuus, uusittavuus) tarvitaan. Verifiointissa saatujen tulosten ja niistä tehtyjen johtopäätösten perusteella valitaan voidaanko menetelmä tai laite ottaa käyttöön. (Ikäheimo 2002,14).



Kuvio 8. Verifiointin vaiheet. (Ikäheimo 2002,14).

9 OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyö on toiminnallinen opinnäytetyö ja se tehtiin kehittämistyönä Huslabille immunologian yksikköön. Siinä yhdistyy teoria ja käytännön toimenpiteet. Toiminnallisen opinnäytetyön tuloksena syntyy jokin tuotos, esimerkiksi ammatilliseen käytäntöön suunnattu työohje tai opastus. Tuotos voi olla konkreettinen tuote tai vaikka tapahtuma alasta riippuen. Yhteinen piirre tuotokselle on alasta riippumatta, että sen tulee ilmentää työn tavoiteltuja päämääriä. (Vilka & Airaksinen 2003, 9, 51.) Kehittämistyön 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.) Ammattikorkeakouluissa valmistuvat opinnäytetyöt on suunnattu työelämän kehittämiseen. Opinnäytetöitä tehdään usein osana laajempaa kehittämishanketta tai jonkin yksittäisen tarkkarajaisen ongelman ratkaisemiseksi. (Heikkilä ym. 2008, 56.)

Kehittämistyönä tehtyä tuotosta arvioidaan sekä toteutusvaiheessa, että päätös vaiheessa.

Työn etenemistä ja päätös vaiheen toimintaa ja tuloksia arvioidaan koko toteutuksen aikana. Opinnäytetyönä tehtävän kehittämistyön raportin arviointi voidaan tehdä opinnäytetyön

vaatimuksista käsin ja arvioinnissa korostuvat perustelut aiheen valinnalle ja tarpeellisuu-
delle, 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.)

Työn tavoitteena on verifioida Optima Fluostar-laite immunologian osaston käyttöön kam-
pylobakteerin mittaamisen osalta. Työn onnistumiseksi rajataan tulostusohjelman tekemi-
nen kampylo vasta-ainetutkimukselle, josta tulokset saadaan absorbanssimittaus-menetel-
mällä. Laboratorioon tuleville kyseisen laitteen mittausprosesseille haetaan käyttöön ja sitä
kautta turvallisuuteen liittyvät valmistajan laatimat tekniset dokumentit. Näistä lähtökoh-
dista käsin sovelletaan lopullisessa muodossaan yksinkertaiset ja selkeät pikaohjeet ja kam-
pylobakteeri-mittausohjelma laboratoriolaitteelle. Ohjeiden suunnittelussa pyritään raken-
teeseen, jota on helppo tarvittaessa päivittää ja tulostaa laboratoriolaitteen mukana kulke-
vaksi.

Työssä käsitellään myös peruseriaatteet fotometrisestä absorbanssimittaus-menetelmästä,
jota kyseinen laite käyttää kampylobakteerien vasta-aineiden mittaamisessa. Muut mittaus-
menetelmät, joita laite sisältää jätetään tämän työn ulkopuolelle aiheen rajaamiseksi. Lisäksi
työssä käydään pintapuolisesti läpi teoriaa immunologisesta Elisa-menetelmästä ja laitteen
sovelluksena toimivasta MARS data analyzer laskentaohjelmistossa käytössä olevasta stan-
dardisuorasta. Kyseessä olevan kaltaisten laskentaohjelmien ja ohjeistusten laadinnassa on
oleellista tiedostaa käyttöön tulevien prosessien peruseriaatteet. Ohjeiden sisällön ja ulko-
asun suunnittelussa huomioidaan erityisesti laitetta käyttävä henkilökunta.

Tarkoitus on luoda mittausohjelma Kampylo IgA, -IgM, -ja IgG vasta-aineille. Referenssi-
laitteena tulee toimimaan iEMS-analysaattori, mikä sisältää saman immunologisen kampy-
lobakteeri-mittausohjelman kuin Fluostar Optimalle on tarkoitus tehdä.

Tässä työssä tavoitteena on vastata seuraaviin kysymyksiin:

1. Kuinka Optima laitteella saadut kampylo-näytteiden tulokset yhtenevät iEMS-laitteella saatujen tulosten kanssa?
2. Minkälainen toistettavuus on Optima-laitteella määritetyillä kampylo-toistonäytteillä?
3. Minkälainen uusittavuus on määritettäessä näytteitä Optima-laitteella?
4. Minkälaiset ovat onnistuneet työhohjeet?

10 OPTIMA FLUOSTAR VERIFIOINTIPROSESSI

Kokeellinen tutkimus suoritettiin HUSLABIN immunologian laboratoriossa syksyllä 2009. Tutkimus suoritettiin itse päällystetyillä (in-house) 96-kuoppaisilla levyillä. Laboratoriossa suoritettuna kokeellisen tutkimuksen vaiheet on kuvattu liitteessä 1. Tutkimus tehtiin molemmilla laitteilla sekä iEMS:llä, että Fluostar Optimalla kahteen kertaan käyttäen yli 70 tunnettua potilasnäytettä ja kontrollia.

Aluksi kuoppalevyjen mittaaminen tehtiin iEMS:llä, koska siinä oli vanha kampylobakteerin mittausohjelma jo olemassa. Tulokset siirrettiin tämän jälkeen Excel-tiedostoon odottaen jatkokäsittelyä. Tämän jälkeen siirryttiin opettelemaan Fluostar Optiman käyttöä. Kaikki täytyi aloittaa alusta, koska laite oli uusi ja sitä ei ollut kukaan käyttänyt osastolla aiemmin, eikä siellä ollut ainuttakaan mittausohjelmaa tehtynä. Ensimmäinen huomattava ero, mikä tuli esiin verrattuna iEMS:iin oli se, että laitteen suodattimet täytyi vaihtaa käsin laitteeseen. Laitteessa oli lumisenssin ja absorbanssin mittaamiseksi omat suodattimet.

Toiseksi perehdyttiin itse laitteen mittaus-sovellukseen. Itse mittaus-sovellus vaikutti alusta alkaen olevan melko yksinkertainen ja sitä pystyi hieman muokkaamaan esteettömämmäksi

omaa käyttöä varten. Tällä tarkoitetaan sitä, että asetuksista pystyi valitsemaan mikäli halusi, että tehdyn mittausohjelman mittaustulokset olivat levenä näkyvissä mittauksen aikana ja mikäli halusi mitattavan levyn ulos spektrofotometrasta mittauksen jälkeen.

Mittaus-sovelluksen perehtymisen jälkeen aloitettiin rakentamaan kampylobakteerille mittausohjelmaa. Tämä tapahtui niin, että valittiin sovelluksen ylävalikosta kuvakkeen ”Test Setup” ja edelleen ”Test Protocol”. Sieltä valittiin sitten ”new”, jolle annettiin nimeksi kampylo\A, M ja G. Aluksi Kampylobakteeri mittaukselle täytyi kuitenkin tehdä templaatti eli mittauspohja, joka tarkoitti sitä, että siihen lisättiin halutuille paikoille standardit eli vakiot, näytteet sekä kontrollit. Tämän jälkeen, jotta templaattista olisi mitään hyötyä, täytyi siihen lisätä vakioiden tiedetyt pitoisuudet, joiden perusteella pystyin lopulta laskemaan haluttujen asetusten mukaisesti laskentaohjelmassa tulokset ja siirtämään ne Exceliin jatkotutkiskelua varten. Laskentaohjelma Mars data analyzer oli Fluostar Optimassa erikseen ladattavana sovelluksena.

Templaatin valmistuttua päästiin lopulta mittaamaan samat näytteet mitkä olin aikaisemmin mitattu iEMS:llä. Ensimmäisen levyn mittauksen jälkeen huomattiin laitteen tallentavan tiedoston automaattisesti, joten mittaustulosten katoamisesta ei pitäisi olla huolta. Siis mikäli muisti tallentaa tiedoston omalla nimellä ennen mittaamista. Muuten ohjelma tallensi tiedoston edellisellä kerralla nimetyllä tiedostonimellä.

Kuoppalevyn mittaamisen jälkeen pystyi laskemaan tulokset Fluostar Optiman Mars data analyzer sovelluksella. Sovelluksessa sai itse päättää, missä järjestyksessä tai mitä kaikkea halusi templaatin tulostuspohjassa näkyvän. Halusiko näyte numeron, mitatun absorbanssilukeman ja siitä lasketun tuloksen näkyvän pohjassa. Tämä tapahtui laskentaohjelman vasemmasta laidasta näppäilemällä kyseistä kohtaa. Toiseksi sovelluksessa sai itse valita, mikälaista kalibroitikäyrää halusi käyttää. Vanhasta tottumuksesta johtuen valittiin Cubic Spline fit- käyrä, koska sitä oli käytetty vanhassa tutkimuksessa ja mittauslaitteessa onnistuneesti. Kolmanneksi sovelluksesta pystyi tekemään omia laskentamalleja, mikäli halusi. Tähän ei kuitenkaan lähdetty, koska sovellus osasi jo automaattisesti laskea vakioiden pitoisuuksien perusteella näytteille tulokset. Laskentamallien tekeminen oli hankalaa kovasta perehtymisestä huolimatta. Tietoa oli vain vaikeaa löytää mistään.

Mittausohjelman valmiiksi saamisen ja tunnettujen näytteiden mittamisen jälkeen tulokset siirrettiin excel-tiedostoon, missä oli jo aikaisemmin mitatut Iems-laitteen tulokset. Tämän jälkeen tuloksia ruvettiin käsittelemään. Tuloksien perusteella pystyttiin tekemään lineaarinen regressioanalyysi ja käyrä, joiden perusteella pystyttiin sanomaan, että tulokset korreloivat keskenään erittäin hyvin korrelaatiokerroimen neliön avulla. Korrelaatiokerroinhan siis mittasi kahden muuttujan välistä (lineaarista) tilastollista riippuvuutta. Tulosten analysoimisessa käytettiin korrelaatiokerroimen neliötä, joka kuvasi regressioanalyysin selitysvoimaa eli muuttujien välisen tilastollisen riippuvuussuhteen voimakkuutta. (Heikkilä 2005, 90.)

Excelliin tämän korrelaatiokerroimen neliön eli selityskerroimen tekeminen onnistui niin, että tehtyyn kuvaajaan (Lisää, pistekaavio) lisättiin lauseke ja selityskerroin. Tämä tapahtui niin, että napsautettiin hiiren oikeaa painiketta jonkin pistekuvion pisteen päällä. Valittiin esiin tulevasta valikosta Insert Trendline (Lisää trendiviiva). Komento löytyi myös Chart (Kaavio) valikosta. Tämän jälkeen valittiin haluttu malli Type (Laji) välilehdeltä. Tutkimukseen valittiin lineaarinen malli. Options (Asetukset) välilehdeltä valittiin tämän jälkeen mallin kaava tulostettavaksi kaavan yhteyteen Equation on Chart (näytä kaava kuviossa) kohdasta. Samaisesta paikasta myös lisättiin mallin selityskerroin r^2 Display R-squared Value on Chart (Näytä korrelaatiokerroimen arvo kuviossa) kohdasta.

Liitteessä 1Tässä on kuvattuna selityskerroimen antamat lukemat ja niistä voidaan tulkita, että yli 99% tutkituista näytteistä kaikilla IgA, IgG- ja IgM- vasta-aineilla korreloivat keskenään todella hyvin laitteiden välillä. Selityskerroimen R^2 avulla voitiin siis todeta, että hyvin oli onnistuttu.

Verifiointia varten tehtiin lisäksi toistettavuus, ja uusittavuustestauksen. Toistettavuudella mitattiin peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaustulokset suoritettiin samoissa mittausolosuhteissa. Uusittavuus taas kuvasi mittaustulosten yhtäpitävyyttä eri olosuhteissa tai pitkällä aikavälillä samalla näytteellä ja menetelmällä tehtynä. (Saari 2010.) Määritys tapahtui tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä. Toistettavuus tehtiin näytenuumerolle 09TC1237, joka oli aikaisemmin tutkittu potilasnäyte. Toistettavuustestauksessa näyte pipetoitiin kymmenelle kuopalle samalle 96-kuoppaiselle näytelevylle ja mitattiin sekä iEMS:llä, että Fluostar Optimalla. Tulokset olivat erittäin hyviä ja hyväksyttävissä rajoissa

(CV% alle 20). CV tarkoitti variaatiokerrointa (Coefficient of Variation, CV) ja se mittasi tulosten keskihajonnan suhdetta keskiarvoon. Tulokset ovat nähtävissä liitteissä. (Viander 2007.)

Uusittavuustestaus tehtiin neljänä eri päivänä kahdella eri näytteellä. Näytteet olivat kampakylokimuksen käytössä olleet sisäiset kontrollit TC-M1 ja TC-K2. Saatujen tulosten perusteella voitiin myös todeta, että uuden spektrofotometrin mittaamat lukemat olivat myös hyväksyttävissä rajoissa. Ainoastaan IgA-vasta-aineiden kohdalla matalan kontrollin kohdalla CV% ylitti juuri 20, mitä voitiin pitää kuitenkin juuri hyväksyttävissä rajoissa.

11 TYÖOHJEIDEN TEKO

Lopulta tulosten perusteella pystyttiin laatimaan Fluostar Optiman käytölle selkeät pikaohjeet sekä kampakylobakteerin vasta-aineiden mittaamiseksi ohjeet osaston henkilökunnan käytettäväksi. Työohjeiden teossa apuna olivat vanhat ohjeet kampakylobakteerisarjan tekemisestä ja mittaamisesta iEMS- analysaattorilla. Näiden ohjeiden avulla pystyttiin tekemään uusi ohje Optimalle. Uuden mittausohjelman avulla kampakylolevyt mitattiin kuitenkin ensin muutaman kerran. Tämän tarkoituksena oli varmistaa, että mittausohjelma asetti sille vaadittavat ominaisuudet.

Ennen työohjeiden kirjoittamista Fluostar Optimalle, käytiin uuden mittausohjelman mittauksen aikana työvaiheet ja laitteen käyttöohjeet huolellisesti läpi tehden samalla yksityiskohtaisia muistiinpanoja eri työvaiheista. Lisäksi otettiin kuvankaappauksia työvaiheiden aikana. Näin taattiin, että työohjeesta tuli tarkka, eikä mikään työvaihe päässyt unohtumaan.

Ajatuksena oli, että työohjeesta tulisi helppokäyttöinen, kattava, mutta yksityiskohtainen ja selkeä. Samalla pyrittiin lyhyeseen ja ytimekkääseen rakenteeseen, jonka lukemisessa mielenkiinto pysyisi yllä loppuun asti. Työohjeen kirjoittamisessa oli alusta alkaen selvää, että

kuvankaappauksia käytetään tulevassa työohjeessa. Tällä pyrittiin siihen, että kuvat selkeyttäisivät, lisäisivät tekstin ymmärrettävyyttä, täydentäisivät, jäsentäisivät ja havainnollistaisivat tekstiä. Työohjeen selkeyden kannalta jokainen työvaihe laitettiin omaksi kappaleekseen ja nimettiin työohje niin, ettei kenellekään voinut jäädä epäselväksi, mihin kyseistä työohjetta oli tarkoitus käyttää.

Työohjeen helppokäyttöisyyden testaamiseen valittiin alan ammattilainen, jonka mukaan työohje oli selkeä ja ymmärrettävä. Työohjeen testaaminen tapahtui niin, että alan ammattilainen teki itsenäisesti koko campylobakteerisarjan ja mittasi sen uuden työohjeen avulla. Työohjeeseen pyydettiin korjausehdotuksia, mutta ohje vaikutti olevan täydellinen siltä osin, ettei yhtään korjausehdotusta tullut. Työohjeen hyväksyi lopulta osaston ylilääkäri allekirjoituksellaan käyttöön.

12 POHDINTA

Tässä työssä tutkittiin Fluostar optiman soveltuvuutta iEms-analysaattoriin nähden laitevertailulla verifioimalla immunologiseen elisa-menetelmään perustuva campylobakteerin tulostusohjelma käyttäen tunnettuja näytteitä ja kontroleja mittauksessa. Näitä tuloksia voitiin käyttää tämän työn toistettavuuden, uusittavuuden ja korrelaation kontrollointiin. Tällä tiedolla voitiin varmistaa menetelmän ja mittausohjelman toimivuus sekä tulosten toistettavuus ensimmäistä kertaa Fluostar Optima-monileimalukijan osalta.

Ennen tutkimuksen suorittamista aiheeseen tutustuttiin laajan kirjallisuuden avulla ja opittiin ymmärtämään etenkin laitteen käyttöön liittyviä spesifikaatioita. Käytännön työskentelyyn ei tarvittu ohjausta ja opetusta osaston henkilökunnalta ennen tutkimuksen tekemistä ja sen aikana, koska campylobakteeri vasta-aine tutkimus oli hyvin tuttu aikaisemmilta vuosilta. Ainoastaan itse spektrofotometri sovelluksineen oli aivan uusi, joten siihen olisi mielellään toivottu ohjausta. Laitteeseen itsenäisesti perehtymisen jälkeen, pystyttiin suoriutumaan mittausohjelman teosta lopulta hyvin itsekseen. Pikaohjeet saatiin laadittua laitteen käytölle.

12.1 Tutkimustulosten luotettavuus

Laboratoriolaitteen tulosten luotettavuuteen vaikuttivat useat erilaiset tekijät. Luonnollisesti liian suuri näytemäärä tai vajaa näytemäärä vaikuttavat tulosten luotettavuuteen. Lisäksi käytettävien reagenssien lämpötila, oikeat laimennossuhteet ja mittausaika vaikuttavat tulosten luotettavuuteen. Tutkimuksessa pyrittiin toimimaan mahdollisimman luotettavasti, pipetoimaan oikealla näytemäärällä, huoneen lämpöisillä reagensseilla ja oikeilla laimennoksilla sekä toimimaan laitteen käyttöohjeiden mukaisesti. Laitteen käyttöä ei keretty harjoittelemaan kovinkaan hyvin ennen tutkimusnäytteiden analysointia, minkä takia virheiden mahdollisuus etenkin tutkimusten alussa on ollut suuri. Vuosien kokemus kamylobakteerisarjan tekemisestä kuitenkin antoi varmuutta siihen, etteivät mittaustuloksissa esiintyneet eroavaisuudet johtuneet osaamattomasta työskentelystä itse sarjan teossa. Laittevertailun tulosten perusteella näin ole tapahtunut, vaikka aina on olemassa mahdollisuus, että tutkijalle on käynyt virheitä työskentelyssä, mutta sellaista ei tullut ilmi tutkimuksen aikana. Laittevertailussa vieritestilaitteen tulokset kirjattiin ylös niin, että potilaiden henkilöllisyyttä ei voitu niistä selvittää. Näytteitä käsiteltiin koko tutkimuksen ajan luottamuksellisesti ja kunnioittavasti.

12.2 Tutkimuksen mahdolliset virhelähteet

Kamylobakteeritestissä oli paljon mahdollisia virhelähteitä työn eri vaiheissa. Kamylobakteeri vasta-ainetestissä vaadittavat vaiheet tehtiin huolellisesti alusta loppuun saakka, aina kamylobakteerin päällystämistä (koultaamisesta) levyille analysointiin saakka. Kyseisen testin eri työvaiheet sisälsivät paljon käsityötä, pienten seeruminäytemäärien käyttöä, tarkkoja inkubaatioaikoja, lämpötiloja ja pesuja. Nämä seikat lisäsivät virheiden mahdollisuuksia tutkimuksessa.

Työohjeiden tekemisen osalta voidaan todeta, että se oli lopulta opinnäytetyön yksinkertaisin vaihe, eikä siinä voinut tehdä virheitä ellei ollut huolimaton. Sen tekeminen oli helppoa, koska kaikki tarvittava taustatieto oli jo tässä vaiheessa olemassa paperilla. Eniten joutui miettimään sitä, että minkälaisia kuvia halusi laittaa työohjeeseen, jotta ohjeista tuli selkeät ja helposti ymmärrettävät. Työohjeisiin onnistuttiin lisäämään selkeät ja ymmärrettävät kuvat. Työohjeiden ollessa jo nyt reilun vuoden käytössä, niin ne ovat soveltuvat ja

hyvät käyttöön. Ainakaan kukaan ei ole toivonut uusien ohjeiden tekoa näiden tilalle tai huomannut virheitä niissä.

12.3 Johtopäätökset

Tutkimustuloksista nähdään, että Fluostar Optima on sarjan sisäiseltä toistettavuudeltaan ja sarjojen väliseltä toistettavuudeltaan tarpeeksi luotettava, jotta sen antamia tuloksia voidaan mielekkäästi tulkita. Mittausohjelman perusteella mitatut absorbanssi-arvot vastasivat hyvin aikaisemmin mitattuihin iEMS:n lukemiin nähden, joten voidaan luotettavasti todeta mittausohjelman teon onnistuneen. Fluostar optiman ja iEMS:n välinen korrelaatio tuloksissa oli erinomainen, joten Fluostar optima soveltuu näiden tulosten valossa varalaitteeksi erinomaisesti.

Soveltuvuutta lisää vielä se, että toistettavuusmittauksissa tulokset olivat kaikille vasta-aineille hyväksyttävissä rajoissa eli alle 20 % CV. Uusittavuusmittauksissa ainoastaan IgA-vasta-aineiden kohdalla matalan kontrollin tulokset ylittivät yli 20 %. Mittaustuloksia tutkaillessa tultiin siihen johtopäätökseen, että kyseessä olisi satunnaisvirhe, koska 8.6.2014 mitattu tulos oli selvästi matalampi kuin muut mittaukset kyseiselle matalalle kontrollille.

Variaatiokerrointa laskiessa sarjan sisäisen toistettavuuden variaatiokertoimeksi kaikkien rinnakkaisten näytteiden kohdalla saatiin alle 20 % lukuunottamatta IgA-vasta-aineiden kohdalla uusittavuutta matalalla kontrollilla. Tämän johtunee satunnaisvirheestä yhden näytteen kohdalla, koska muut tulokset vastasivat hyvin toisiaan. Satunnaisvirheen takia variaatiokerroin nousi hieman yli tavoitearvon. ELISA-menetelmän absorbanssien mittauksissa. Optima Fluostar täyttää kuitenkin laatutavoitteet ja se voidaan ottaa käyttöön kampylotutkimuksen osalta. Samalla voidaan alkaa testaamaan muita tutkimuksia kyseiselle laitteelle.

13 LÄHTEET

Adlercreutz, H. 1972. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: Wsoy.

Bmglabtech 2007. FLUOstar OPTIMA operation manual.

Bmglabtech 1997-2014. Absorbance. Verkkodokumentti. Luettu 19.09.2014. <http://www.bmglabtech.com/en/technology/detection-modes/uvvis-absorbance/>

Clinical Chemistry Lab Manual UNIT. Spectrophotometry 4spect.wpd Instrumentation II. Verkkodokumentti. Luettu 18.09.2011.

www.austincc.edu/mlt/chem/chemlab3bspectrometry.pdf

Caprette, D. 1996. Principles of Spectrophotometry. Rice University. Verkkojulkaisu. Luettu

18.05.2011.

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs280.html>

Crowther, J. 2001. The Elisa Guidebook: Humana Press.

Crowther, J. 2009. Methods in Molecular Biology. The ELISA guidebook: Humana Press.

Haigh RD. & Ketley JM. 2011. Growth of Campylobacter using BMG LABTECH's FLU-Ostar Omega equipped with ACU BMG LABTECH.

Hay, F. & Westwood, O. 2002. Practical immunology. Fourth edition: Blackwell science.

Heikkilä, A., Jokinen, P. & Nurmela, T. 2008. Tutkiva kehittäminen - avaimia tutkimus ja kehittämishankkeisiin terveysalalla. Helsinki: WSOY.

Heikkilä, T. 2005. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Prima Oy.

Heikkilä, T. 2002. Tilastollinen tutkimus. 4. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Hirsijärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Keuruu: Otava Kirjapaino Oy.

Huovila, T. 2006. "look" Visuaalista viestisi. Helsinki: Inforviestintä Oy.

Ikäheimo, I 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifiointista. Moodi 1. 13–14.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Kangas, P. 2000. Perehdyttäminen palvelualueilla. Työturvallisuuskeskus: Oy Edita Ab.

Kemeny D.M & Challoacombe S.J. 1989. ELISA and other solid phase immunoassays theoretical and practical aspects. John Wiley and sons ltd.

Kjelin, E. & Kuusisto, P-C. 2003. Tulokkaasta tuloksetekijäksi. 1. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

KTL. tartuntatautirekisteri. Luettu 27.6.2010.

<http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiati/tartuntatautirekisteri>

Kurki, R. & Pammo H. 2010. Tartuntataudit ja hoitotyön osaaminen.1.painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Labsystems. 1997. Operation manual. iEMS Reader/Dispenser MF.

Leinikki, P. 2005. Tarttuvat taudit. Suomalaisten terveys. Duodecim: Terveyskirjasto. Verk-kodokumentti.Luettu3.12.2014. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=suo00031

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

Märijärvi, J & Haikala, J. 2006. Ohjelmistotuotanto. 11. painos. Talentum: Helsinki.

Mäkelä O., Mäkelä H., Wager O. & Vaheri A. 1978. Lääketieteellinen mikrobiologia. 3. uusittu painos. Duodecim.

Niemi, V., Rahkio, M. & Siitonen A. 1998. Ruokamyrkytykset miksi sairastumme – miten suojaudumme. Art House.

Pesonen, E. 2007. Julkaisijan käsikirja. Jyväskylä: WSOY.

Rantala, I. & Lounatmaa, K. 1998. Biologinen valomikroskopia. Helsinki: university Press.

Saari, L. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Evira: Kemian ja toksikologian tutkimusyksikkö. Verkkodokumentti. Luettu 25.09.14.

http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf

Schönberg-Norio, D. 2009. Campylobacter Infections of Domestic Origin in Finland. University of Helsinki. akateeminen väitöskirja. Verkkojulkaisu. Luettu 19.09.2014.

<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20529/campylob.pdf?sequence=1>

Sippola, T. 2013. Terveysthuollon ja tarvikkeen verifiointi & validointi. GE Healthcare. Luettu 18.09.2014.

https://www.uef.fi/documents/976466/1812403/Sippola_L%C3%A4%C3%A4kinn%C3%A4llisen+laitteen+V%26V+Turku.pdf/a1213916-51bd-443cbf5f-7a04eb5e60df

Suomen laboratorioliiitto.2003. Analyysi. Suomen laboratorioliiitto ry ammatti- ja yhdistyslehti 4/2003. Turku. Verkkojulkaisu. Luettu 18.06.2014. http://www.laboratorioalanliitto.fi/wp-content/uploads/analyysi_2003_4.pdf

Suominen I., Haajanen K & Pärssinen R. 2012. Biogeeni Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Opetushallitus. Verkkojulkaisu. Luettu 18.09.2011.

<http://www.edu.fi/biogeeni/laboratorioharjoitustyot>

Tervonen, P. 2004. Mitä ovat tuotevastuu, toimintaohje ja työohje? Päivitetty 15.3.2004. Luettu 10.12.2014.

<http://www.vantaa.fi>

Vaara, M. 2013. Toimintakäsikirja osa D. Toiminnalliset prosessit. Versio 3.8. Huslab.

Viander, M. 2007. Mittausepävarmuudesta. Lääketieteellinen mikrobiologia ja immunologia.

Turun yliopisto. Verkkodokumentti. Luettu 25.09.2014.

[http://www.labquality.org/LQ/Pdf.aspx?dir=1&path=A\)%202007%20Mb-laboratorioi-den%20edustajien%20kokous%2FMittausepavarmuus_Viander_.pdf&type=file&vuosi=2009](http://www.labquality.org/LQ/Pdf.aspx?dir=1&path=A)%202007%20Mb-laboratorioi-den%20edustajien%20kokous%2FMittausepavarmuus_Viander_.pdf&type=file&vuosi=2009)

Vilkkä, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Tammi.

Walker J. & Rapley R. 2008. Molecular biomethods handbook. Humana Press.

Åkerman, K., Savolainen, E., Pelliniemi, T. & Koski, T. 2010a. Laboratoriolaitteet. Julkaisussa: Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 79-92.

14 LIITTEET

Liite1. Kamylo EIA-määrittäminen

KAMPYLO-EIA MÄÄRITYS

1. EIA-levyjen päällystäminen (kouttaus)

1. EIA-levyt päällystettiin (koutattiin) kamyloantigeenilla käyttäen titraustuloksen perusteella määritettyä käyttöläimennosta. Konsentraatio 3mg/ml, käyttöläim. 1µg/ml. Antigeeni laimennettiin PBS+0,02% NaN₃:iin. Kouttaislaimennosta tarvittiin noin 12 ml/levy (sis. pipetointivaran). Levyjä tehtiin n. kolmeksi kuukaudeksi, n.40kpl eli tarvittiin noin 500 ml kouttaislaimennosta, johon lisättiin antigeenia 16,7 ul, jotta käyttöläimennos oli 1ug/ml.

2. Kuoppalevyille, Greiner ref.655061, microlon, tasapohja pipetoitiin 100 µl/kuoppa kouttaislaimennosta elektronisella 8-kanavaisella pipetillä.

3. Levyt peitettiin levyteipillä ja inkuboitiin kosteassa kammiossa 1-2 tuntia RT tasosekoittajalla n. 100rpm. Levyt siirrettiin jääkaappiin ja inkuboitiin 2 vrk - viikonlopun yli. Kuoppalevyteippiin ja kuoppalevyn reunaan kiinnitettiin tarrat, joihin kirjoitettiin seuraavat tiedot: antigeenin nimi, kouttauspäivämäärä, tekijän nimikirjaimet, säilyvyysaika (yleensä 3 kk) ja säilytyslämpötila.

2. Pesu

1. Valmistettiin pesupuskuri, *PBS + 0,05 % Tween 20*: Lisättiin 500 ml 10 x PBS:ää 4.5 l dH₂O:aan ja lisättiin 25 ml 10 % Tween 20:tä. Säilyvyys oli 2 viikkoa.

2. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin viisi (5) kertaa 350µl pesupuskurilla (*PBS + 0.05 % Tween 20*). Kuoppalevyjen pesussa käytettiin automaattipesuria, Versa Microplate- pesuria.

3. Pesun jälkeen kuoppalevyn kaivoihin jäänyt ylimääräinen pesuneste taputettiin pehmeään paperiliinaan kuivaksi.

3. EIA-testaus

1. päivä

Näytteiden laimentaminen

1. Yksi koutattu levy, testaukseen tulevat näytteet, kontrolliseerumit, tasokontrolli ja reagenssit otettiin huoneenlämpöön n. 30 min ennen EIA-testin aloitusta.

2. Käytettiin laimennuspuskurina Tween-gelatinia, (TG, saa ELISA-työpisteestä).

3. Kontrolliseerumit ja näytteet laimennettiin Janus näytelaimentimella ohjelmalla Kampyloag test.

IgA ja IgM laimennettiin 1:500 ja IgG laimennettiin 1:4000.

4. Vakiot laimennettiin käsin TG-laimennusliuokseen. IgA/IgM-vakiot sekä IgG laimennettiin alla näkyvän taulukon mukaisesti.

IgA/IgM-Vakio

	laim.suhde	TG		Pitoisuus kuvaajalla	
				IgA	IgM
1	1:266	1590µl	6µl vakioseerumia	49,00	54,60
2	1:800	1200µl	600µl 1:266 laimennosta	16,30	18,07
3	1:2400	1200µl	600µl 1:800 laimennosta	5,43	6,04
4	1:7200	1200µl	600µl 1:2400 laimennosta	1,81	2,02
5	1:21600	1200µl	600µl 1:7200 laimennosta	0,60	0,68

IgG-Vakio

	laim.suhde	TG		Pitoisuus kuvaajalla
				IgG
1	1:400	2000µl	5µl vakioseerumia	12,44
2	1:1200	600µl	300µl 1:400 laimennosta	4,14
3	1:3600	600µl	300µl 1:1200 laimennosta	1,38
4	1:10800	600µl	300µl 1:3600 laimennosta	0,46
5	1:32400	600µl	300µl 1:10800 laimennosta	0,15

5. Januksen laimennuttua näytteet, lisättiin kouttauslevyille käsin 100 µl vakiolaimennosta/kuoppa tehdyn pipetointipohjan mukaisesti. Levyt peitettiin tiiviillä teipillä haihtumisen estämiseksi. Levyjä inkuboitiin 60 min kosteassa kammiossa tasosekoittajalla 100rpm.

Pipetointipohja

	IgA				IgM				IgG			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Näyte		Blank	Blank	Näyte		Blank	Blank	Näyte	
B	St1	St1	Näyte		St1	St1	Näyte		St1	St1	Näyte	
C	St2	St2	Näyte		St2	St2	Näyte		St2	St2	Näyte	
D	St3	St3	Näyte		St3	St3	Näyte		St3	St3	Näyte	
E	St4	St4	Näyte		St4	St4	Näyte		St4	St4	Näyte	
F	St5	St5	Näyte		St5	St5	Näyte		St5	St5	Näyte	
G	M	M	Näyte		M	M	Näyte		M	M	Näyte	
H	K	K	Näyte		K	K	Näyte		K	K	Näyte	

6. Näytteet siirrettiin inkuboinnin jälkeen jääkaappiin 2-8 asteeseen yön yli.

2. PÄIVÄ

Konjugaatin lisäys

1. Levyt ja reagenssit otettiin huoneenlämpöön 30 minuutiksi ennen seuraavaa työvaihetta. Ensimmäisenä laimennettiin konjugaatit 1:5000 TG puskuriin. Koska minulla oli 2 levyä jokaista konjugaattia /sarja, tein 30 ml konjugaattilaimennosta, jolloin pipetoin 6 ul konjugaattia laimennokseen.
2. Levyt pestiin Versa pesulaitteella 5x350 μ l ja taputeltiin kuivaksi paperiliinaan.
3. Pipetoitiin 100 μ l konjugaattilaimennosta/kuoppa, jonka jälkeen peitettiin levy teipillä ja inkuboitiin 90min kosteassa kammiassa tasosekoittajalla.

Substraatin lisäys

12. Laimennettiin substraatti (pNPP) dietanolamin liuoksella konsentraatioon 2mg/ml (kantaliuos 20mg/ml) Tarvittava määrä oli 10 ml/levy. Levyjä oli 6 per sarja, joten tein 70 ml substraattia. Tällöin tarvitsin 63 ml dietanolaminia ja kantaliuosta 7 ml.

13. Pipetoitiin 100 μ l substraattia/kuoppa ja inkuboitiin 30min tasosekoittajalla

Pysäyttäminen

14. Pysäytettiin reaktio lisäämällä kuoppiin 100 μ l 1M NaOH:a.

Mittaus

15. Levyt mitattiin ensin iEMS spektrofotometrillä aallonpituudella 405nm (ohjelma: Data-Testaukset-Kampylo-Kamag) ja tämän jälkeen Fluostar Optimalle tehdyllä mittausohjelmalla.

16. Lopulta tulokset tallennettiin Excel-taulukkoon ja ruvettiin käsittelemään dataa.

Seuraavassa on ilmoitettu laitteet ja tarvikkeet, mitä työssä käytettiin:

Laitteet

- Jääkaappi
- Kuoppalevypesuri, Versa Microplate washer
- Tasosekoittaja Heidolph Unimax2010 tai vastaava
- Lämpökaappi, Heraeus
- Pakastin -20°C
- Spektrofotometri, Labsystems iEMS Reader MF
- Spektrofotometri, BMGLabtech Fluostar Optima
- Vortex

Tarvikkeet

- Mekaaninen pipetti Finnpipette 0,5µl-10µl
- Mekaaninen pipetti Finnpipette 100µl-1000µl
- Kertakäyttökärjet, Finntip, Biohit
- Elektroninen 8-kanavainen pipetti Biohit e line 1200µl
- Kuoppalevyjen kuivausliina, Tenaset cellduk, art.no. 744000
- Kuoppalevyt, Greiner Microlon, tasapohja. Ref.655061
- Kuoppalevyteippi
- Pullo 1000 ml ja korkki
- Putket 5 ml ja 50 ml, Greiner

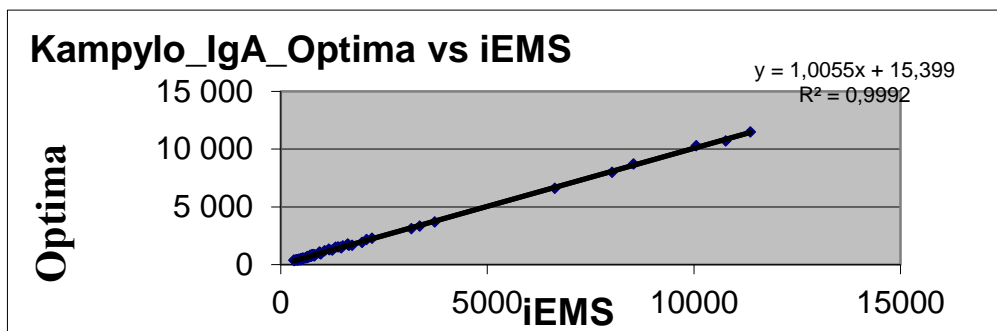
Reagenssit

- Kontrolliseerumit
- Koutattava virusantigeeni
- Tris-gelatin
- PBS x 10, pH 7.4, HUS elatusaineyksikkö
- PBS, pH 7.4, HUS elatusaineyksikkö
- 10% NaN₃
- Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-human IgA, IgM, IgG. Jackson Immuno Research
- Substraatti: 4-Nitrophelyl Phosphat 4-NPP (pNPP) Sigma ref: 71768-25g
- Tween 20, Fluka Chemica cat.no.93773

Liite2. Kampylonäytteiden IgM, IgG ja IgA korrelaatio iEMS vs. Optima

Kampylo IgA-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima

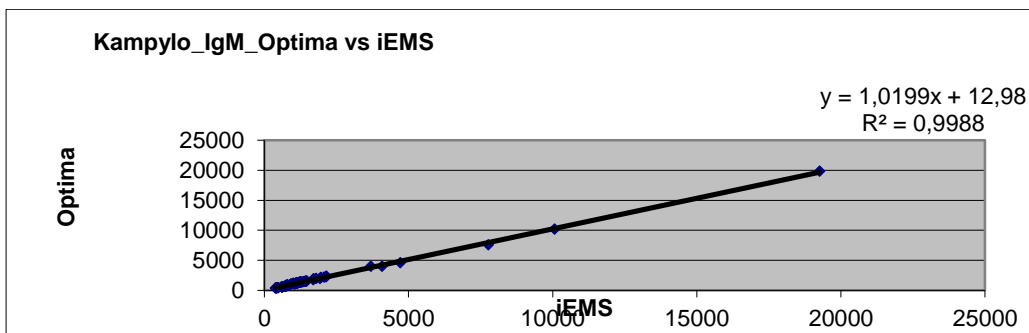
Kampylo IgA-vasta-aineet							
Poistettu standardinkuvaajan ulkopuolelle menevät tulokset							
pvm.	näyte	iEMS	Optima	pvm.2	näyte3	iEMS4	Optima
11082011	Kontr_1	1965	1 919	19082011	Kontr_1	2205	2287
	Kontr_2	8020	7 983		Kontr_2	8537	8702
	1	11361	11 468		31	726	719
	2	320	382		32	1627	1732
	3	518	526		33	638	592
	4	1650	1 654		34	1176	1271
	5	408	408		35	480	431
	6	1252	1 247		36	654	640
	7	478	506		37	10053	10288
	8	439	433		38	938	1017
	9	10770	10 701		39	420	405
	10	630	635		40	621	614
	11	518	444		41	592	549
	12	1449	1 495		42	468	407
	13	755	740		43	3727	3678
	14	3164	3 116		44	798	862
	15	522	480		45	764	869
	16	790	771		46	6634	6597
	17	509	451		47	2078	2171
	18	406	422		48	931	1004
	19	961	1 003		49	547	532
	20	364	395		50	1059	1197
	21	674	632		51	941	1085
	22	735	727		52	712	793
	23	1732	1 673		53	532	562
	24	972	920		54	446	441
	25	487	505		55	695	721
	26	831	832		56	1391	1537
	27	392	428		57	324	347
	28	417	388		58	1325	1486
	29	818	747		59	1618	1771
	30	1467	1 453		60	1164	1331
					61	654	696
					62	1507	1605
					63	771	822
					64	3360	3329



Kampylo IgA-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima. Korrelaatiokerroin 0,9992. Korrelaatio erinomainen.

Kampylo IgM-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima

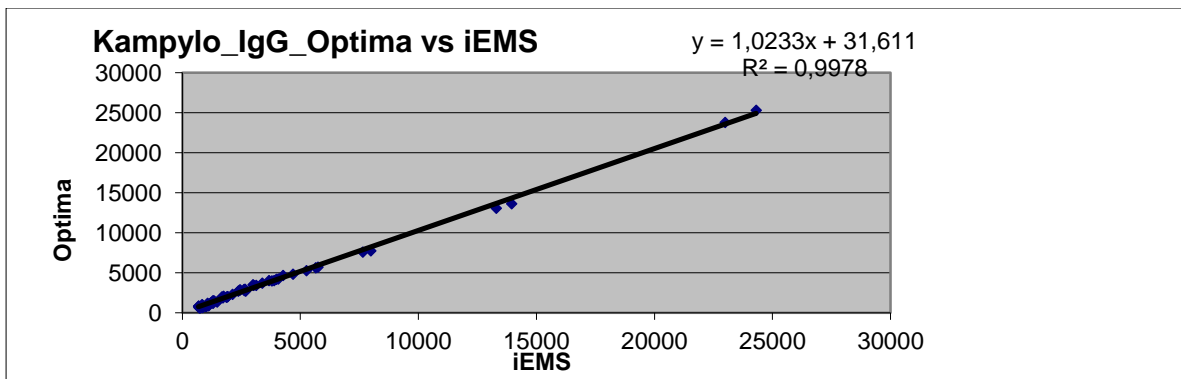
Kampylo IgM-vasta-aineet							
Poistettu standardinkuvaajan ulkopuolelle menevät tulokset							
pvm.	Näyte	iEMS	Optima	pvm.2	Näyte3	iEMS4	Optim
11082011	Kontr_1	1282	1253	19082011	Kontr_1	1439	1511
	Kontr_2	10689	9443		Kontr_2	10060	10170
	1	20076	23965		26	805	774
	2	2419	2635		27	1037	1047
	3	1210	1317		28	1055	1064
	4	2454	2570		29	1158	1191
	5	2331	2426		30	402	370
	6	634	578		31	1300	1354
	7	2883	3194		32	1466	1535
	8	757	823		33	1919	1968
	9	3686	4008		34	4074	4000
	10	1264	1351		35	1103	1141
	11	1421	1469		36	619	568
	12	1949	2143		37	2133	2229
	13	2145	2314		38	684	626
	14	778	829		39	594	501
	15	1204	1389		40	1128	1168
	16	1001	1169		41	4705	4576
	17	600	574		42	796	801
	18	602	542		43	19258	19817
	19	598	560		44	634	590
	20	1791	1987		45	380	371
	21	921	1042		46	827	799
	22	1101	1246		47	749	690
	23	988	1097		48	1133	1177
	24	1693	1890		49	472	411
	25	789	894		50	1005	1064
					51	2059	2177
					52	1355	1446
					53	1243	1311
					54	1683	1761
					55	693	624
					56	1401	1483
					57	1245	1315
					58	1247	1377
					59	411	437
					60	749	740
					61	901	938
					62	414	389
					63	456	406
					64	693	629



Kampylo IgM-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima. Korrelaatiokerroin 0,9988. Korrelaatio erinomainen.

Kampylo IgG-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima

Kampylo IgG- vasta-aineet							
Poistettu standardinkuvaajan ulkopuolelle menevät tulokset							
pvm.	Näyte	iEMS	Optima	pvm.2	Näyte	iEMS4	Optim
11082011	Kontr_1	2676	2717	19082011	Kontr_1	2653	2953
	Kontr_2	13951	13629		Kontr_2	13295	13077
	1	7638	7606		32	22996	23798
	2	2365	2733		33	1891	1988
	3	1081	1102		34	1920	2024
	4	2615	2928		35	842	688
	5	7982	7769		36	991	786
	6	793	778		37	4688	4853
	7	3886	4045		38	886	762
	8	1106	998		39	1299	1181
	9	5740	5728		40	1076	868
	10	868	854		41	709	650
	11	739	740		42	5647	5642
	12	2625	2784		43	3788	4000
	13	838	1045		44	3384	3701
	14	4266	4669		45	24311	25323
	15	689	846		46	737	686
	16	1280	1471		47	834	713
	17	1216	1285		48	1112	902
	18	1350	1471		49	753	680
	19	1715	1864		50	749	653
	20	2994	3510		51	697	696
	21	2426	2821		52	1027	912
	22	2441	2860		53	1859	1957
	23	699	792		54	781	681
	24	3132	3433		55	5257	5285
	25	774	786		56	2128	2321
	26	1061	1210		57	3982	4212
	27	1745	2079		58	3672	4033
	28	1315	1508		59	3013	3416
	29	1680	2008		60	858	756
	30	828	894		61	4057	4254
	31	689	836		62	725	674
					63	1471	1361



Kampylo IgG-vasta-ainenäytteiden välinen korrelaatio iEMS vs. Optima. Korrelaatio 0,9978. Korrelaatio erinomainen.

Liite3. Kampylo IgG, IgM ja IgA toistettavuus ja uusittavuus

Kampylo IgG-vasta-aineiden toistettavuus näytteellä 09TC1237, uusittavuus matalalla kontrollilla TC-M2 ja korkealla kontrollilla K1				
Sarake1	Sarake2	Sarake3	Sarake4	Sarake5
Pvm.	näyte	Pvm.	Matala	Korkea
	09TC1237		TC-M2	TC K1
Pvm	Titteri	Pvm	Titteri	Titteri
10.5.2012	17100			
10.5.2012	16660			
10.5.2012	19200	26.4.2012	1473	14224
10.5.2012	16200	10.5.2012	1502	14693
10.5.2012	16800	24.5.2012	1490	11884
10.5.2012	11500	6.8.2012	1329	10034
10.5.2012	15500			
10.5.2012	16000			
10.5.2012	17000			
10.5.2012	15400			
keskiarvo	16100,00	keskiarvo	1488,33	13600,33
keskihajonta	1950,00	keskihajonta	14,57	1504,77
CV%	12,10	CV%	5,561	17,039

Kampylo IgG- vasta-aineiden toistettavuus ja uusittavuus hyväksyttävissä rajoissa, CV% alle 20 %.

Kampylo IgM- vasta-aineiden toistettavuus näytteellä 09TC1237 ja uusittavuus matalalla kontrollilla TC-M1 ja TC-K1				
Sarake1		Sarake2		
Näyte 09TC1237		Matala kontr TC-M1	Korkea kontr. TC-K1	
pvm.	Titteri	Pvm	titteri	titteri
10052012	3795			
	4057			
	3938	26.4.2012	1520	11359
	3950	10.5.2012	1477	12026
	3936	24.5.2012	1290	12157
	3988	8.6.2012	1052	9475
	3814	2.8.2012	1409	10622
	4140	keskiarvo	1350,00	11100,00
	3997	keskihajon	188,00	1108,00
	3921	CV%	13,907	9,953
keskiarvo	3953,60			
keskihajon	102,62			
CV%	2,596			

Kampylo IgM- vasta-aineiden toistettavuus ja uusittavuus hyväksyttävissä rajoissa, CV alle 20%.

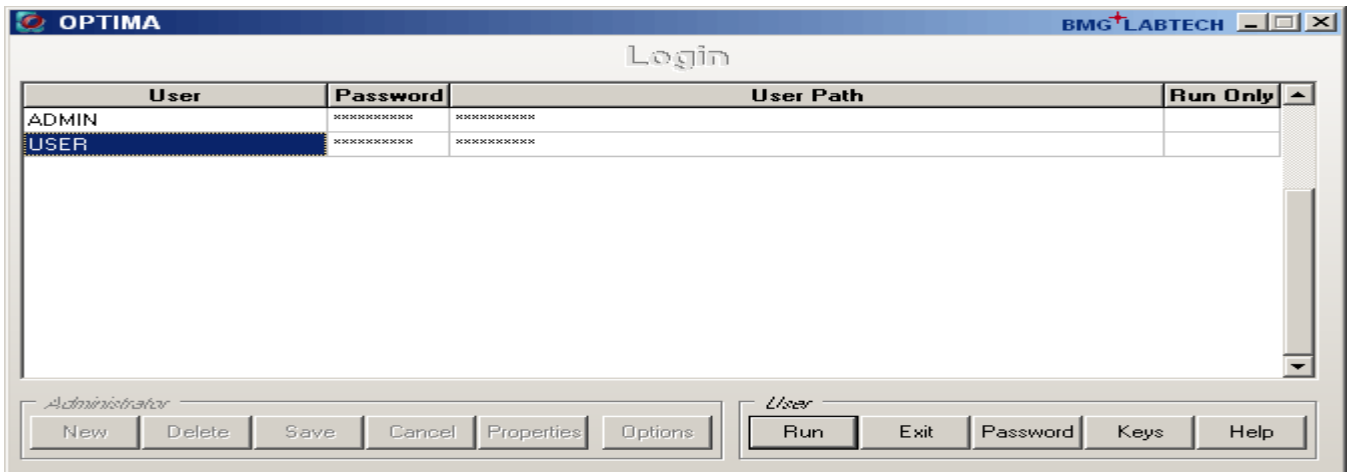
Kampylo IgA- vasta-aineiden toistettavuus näytteellä 09TC1237				
ja uusittavuus matalalla kontrollilla TC-M2 ja korkealla kontrollilla TC-K1				
Näyte 0	Sarake1	Sarake2	Matala	Korkea
pvm.	Titteri	Pvm.	TC-M2	TC K1
10.5.2012	1821			
	1734			
	1892	26.4.2012	608	6610
	1834	10.5.2012	609	8403
	1892	24.5.2012	806	8812
	1769	8.6.2012	487	6314
	1739	2.8.2012	802	8394
	1909			
	1916			
	1608			
keskiarvo	1811,40	keskiarvo	662,40	7706,60
keskihajon	99,14	keskihajon	138,46	1153,39
CV%	5,473	CV%	20,903	14,966

Kampylo-IgA- vasta-aineiden toistettavuus hyväksyttävissä rajoissa, CV alle 20%. Uusittavuus matalalla kontrollilla aivan hyväksyttävän rajamailla matalalla kontrollilla TC-M2 mitattuna ja Korkealla kontrollilla TC-K1 mitattuna hyväksyttävissä rajoissa.

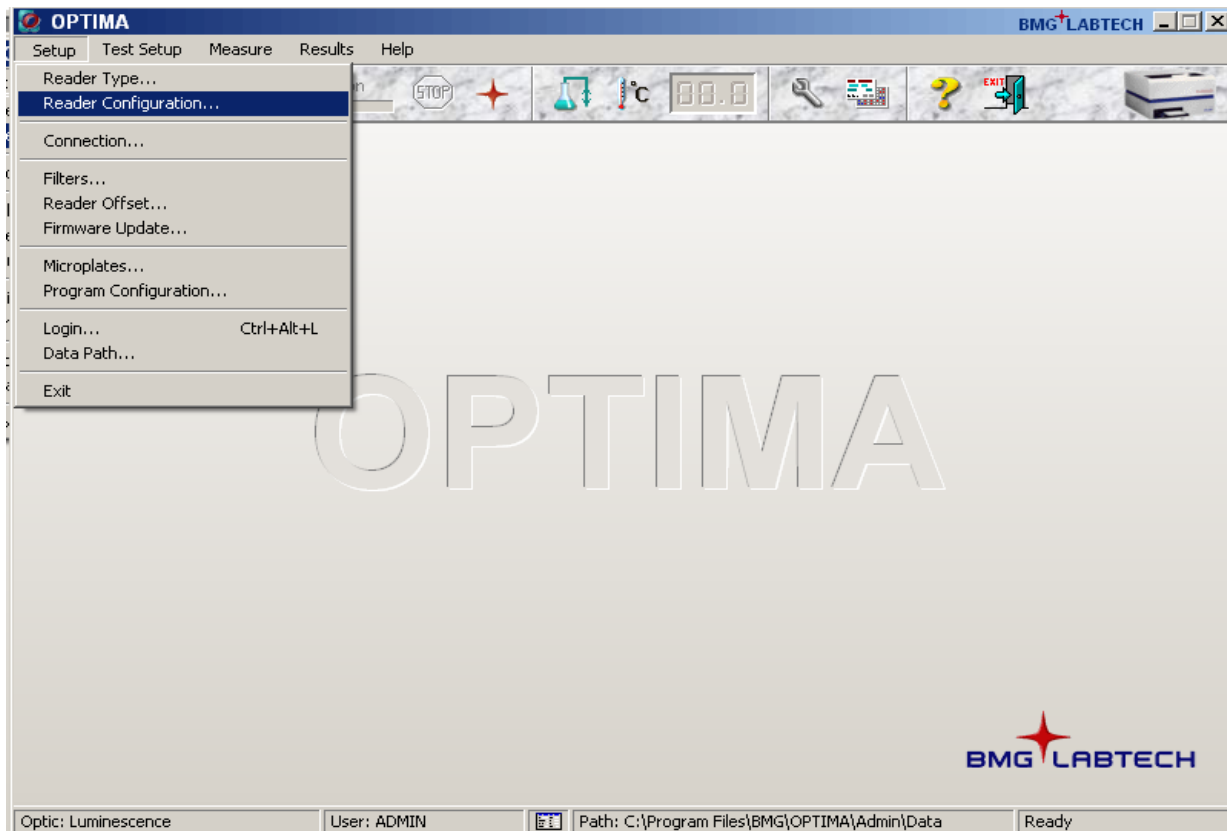
Liite4. Pikaohje S -CampAb-testin mittaaminen ja tulostaminen optima-monileimalukijalla

Aloitus ja kirjautuminen

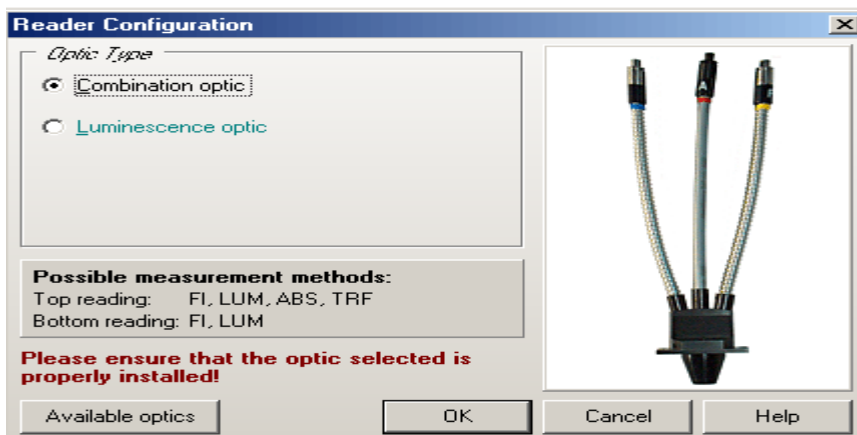
1. Tarkasta, että lukijassa on oikea ”lukupää” asennettuna. spektrofotometriaan käytetään Lukupäätä, jossa on kolme liitäntää, sininen värikoodi emissiolle, ja punainen A-kirjain sekä F-kirjain eksitaatiolle. Vaihda tarvittaessa.
2. Kytke virta sekä lukijaan että tietokoneeseen. Lukijan virtakytkin laitteen takareunassa, oikeassa laidassa.
3. Kirjaudu tietokoneeseen omilla xp-tunnuksilla. Varmista että sinulla on yhteysviros-asemalle. (\\helmeifs03\hel_huslab_viros)
4. Kaksoisklikkaa OPTIMA-kuvaketta työpöydällä.
5. Valitse käyttäjäksi ”admin” , salasanaksi ”bmg” ja klikkaa ”RUN”.



Kun olet vaihtanut mittauspään, Siirry ”Setup”-valikkoon, kohtaan ”Reader Configuration”-.



Valitse "Optic Type"-> "Combination optic".

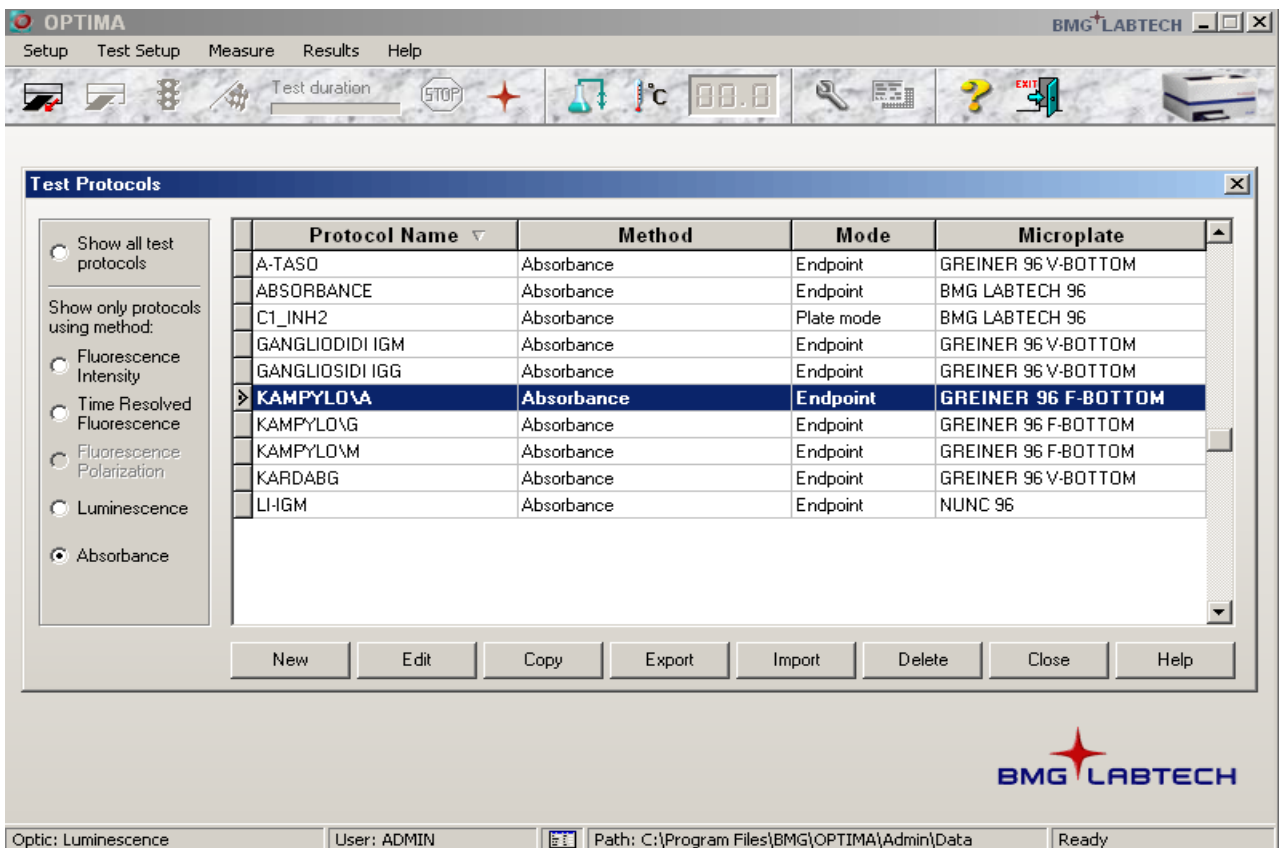


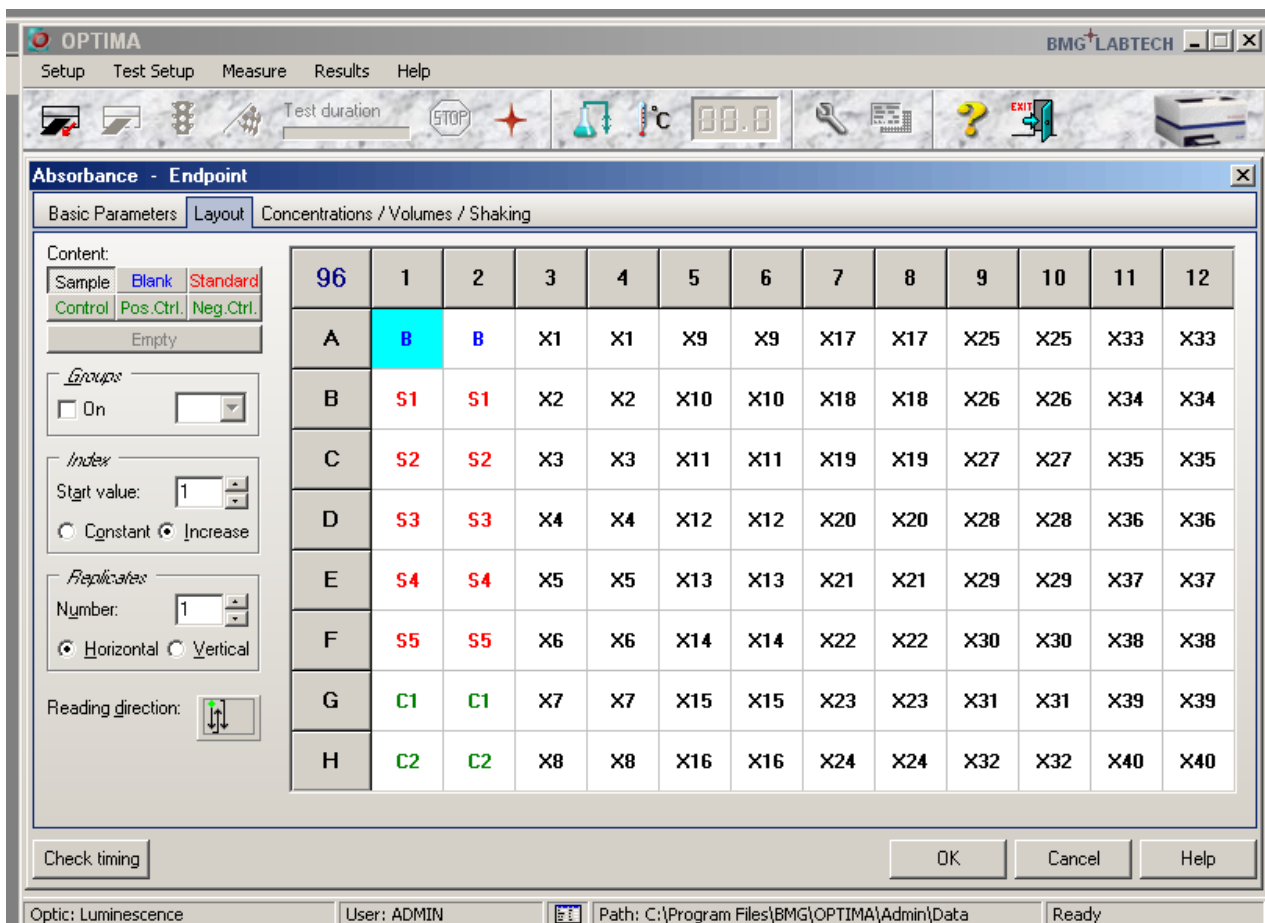
Mittausalueen määrittäminen

Huom! Pohjana on edellisen mittauksen pohja

Määritä mittausalue ohjeen mukaan

6. Valitse OPTIMA-kuvakkeen ylävalikosta ”Test Setup” ja edelleen ”Test Protocol”.
7. Valitse vasemmasta reunasta menetelmäksi ”Absorbance” ja ”Protocol Name”-luettelosta Kampylo\A, Kampylo\M tai Kampylo\G.
8. Klikkaa Edit- valikkoa ja valitse välilehti ”Layout”.
9. Poista ylimääräiset näytteet aktivoimalla ne ja klikkaamalla ”delete”. Lähtökohtaisesti Optima mittaa koko levyn muuten.
10. Poistu painamalla OK.





Mittaaminen

11. Aseta mitattava levy lukijaan painamalla mustaa pientä nappulaa lukijan vasemmassa reunassa tai klikkaamalla OPTIMA-kuvakkeen vasemmasta yläreunasta, ”setup”-valikon alta musta-punaista kuvaketta. Levytaso tulee esille, aseta levy ja paina uudelleen mustaa nappia tai klikkaa OPTIMA kuvakkeen vasemmasta yläreunasta, ”Test Setup”-valikon alta musta-punaista kuvaketta. Levy menee sisään.

12. Valitse OPTIMA-kuvakkeen yläreunasta valikko ”Measure” ja edelleen ”Measure”.

13. Valitse Protocol name-luettelosta Kampylo\A, Kampylo\M tai Kampylo\G ja paina OK.

OPTIMA BMG LABTECH

Setup Test Setup Measure Results Help

Test duration

STOP

°C

?

EXIT

Select Test Protocol

Show all test protocols
 Show only protocols using method:
 Fluorescence Intensity
 Time Resolved Fluorescence
 Fluorescence Polarization
 Luminescence
 Absorbance

Protocol Name	Method	Mode	Microplate
A-TASD	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 V-BOTTOM
ABSORBANCE	Absorbance	Endpoint	BMG LABTECH 96
C1_INH2	Absorbance	Plate mode	BMG LABTECH 96
GANGLIODIDI IGM	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 V-BOTTOM
GANGLIOSIDI IGG	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 V-BOTTOM
KAMPYLOVA	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 F-BOTTOM
KAMPYLOVG	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 F-BOTTOM
KAMPYLOVM	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 F-BOTTOM
KARDABG	Absorbance	Endpoint	GREINER 96 V-BOTTOM
LI-IGM	Absorbance	Endpoint	NUNC 96

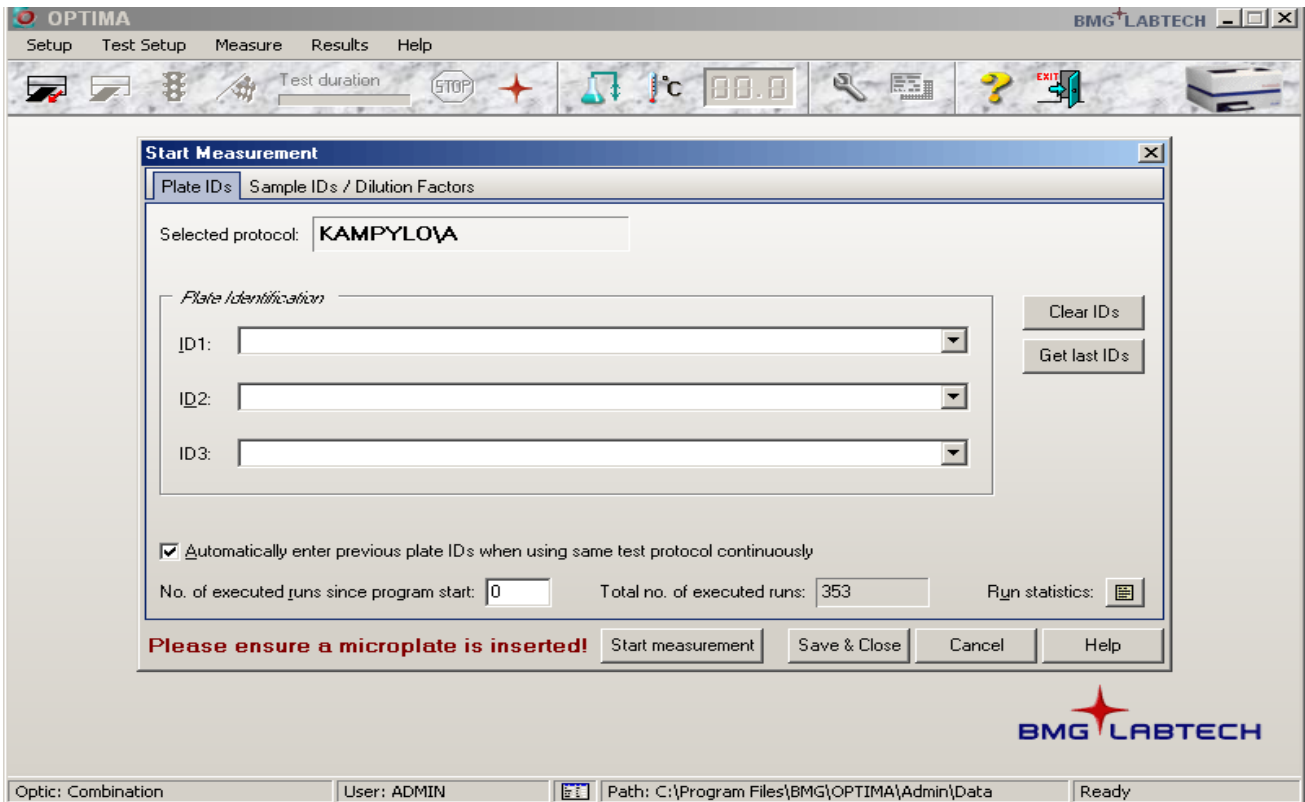
Note: Only the protocols are listed here, which can be performed using the current reader configuration!

OK Cancel Help

Optic: Combination User: ADMIN Path: C:\Program Files\BMG\OPTIMA\Admin\Data Ready

BMG LABTECH

14. Valitse välilehti "Plate IDs" ja kirjaa ID1-riville esim päivämäärä.



16 Voit aloittaa mittauksen painamalla ”Start measurement” .

17. Mittauksen jälkeen sulje seurantaikkuna ”close”.

18. Tulos tallentuu automaattisesti.

Tulostaminen

17. Valitse OPTIMA-kuvakkeen ylävalikosta ”Result”-välilehti ja edelleen ”open last test run”.

18. Tulos-sivu aukeaa ”plate view”-muodossa.

OPTIMA - MARS BMG LABTECH

Home View Calculations Templates Layout Formats and Settings

Open Close Print Export Close All Sign Change User Wizard Calculations Ranges Layout Abs in OD Templates Add Button Predefined Templates

Navigation Microplate View Table View Standard Curve Protocol Information 21 CFR part 11

Test Name: KAMPYLO IGA (based on Template: KAMPYLO IGA)
 ID1: 190811_0_5s
 Absorbance

Display legend in first column

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	1 0.157 << Y range	1 0.156 << Y range	500 733 n.a.	500 720 n.a.	500 10027 n.a.	500 10485 n.a.	500 823 n.a.	500 823 n.a.	1 2 n.a.	1 2 n.a.	0.1
B	1 3.3 >> Y range	1 3.284 >> Y range	500 462 1703	500 459 1685	500 0.332 981	500 0.332 979	500 1.412 6582	500 1.398 13	1 0.341 2	1 0.341 2	0.3
C	1 1.665 16	1 1.647 16	500 0.276 591	500 0.278 601	500 0.243 396	500 0.247 412	500 0.547 2120	500 0.554 4	1 0.295 1	1 0.295 1	0.3
D	1 0.684 6	1 0.661 5	500 0.379 1263	500 0.373 1228	500 0.28 616	500 0.279 611	500 0.201 << Y range	500 0.187 << Y range	1 1 n.a.	1 0.268 1	0.2
E	1 0.328 2	1 0.313 2	500 0.207 << Y range	500 0.212 << Y range	500 0.269 542	500 0.277 595	500 0.209 << Y range	500 0.208 << Y range	1 0.248 840.234E-3	1 0.248 856.849E	0.1
F	1 0.217 622.543E-3	1 0.208 << Y range	500 0.21 << Y range	500 0.206 << Y range	500 0.245 403	500 0.253 443	500 0.337 1009	500 0.334 2	1 0.291 1	1 0.291 1	0.2
G	500 0.568 2221	500 0.585 2304	500 0.252 436	500 0.25 429	500 0.859 3603	500 0.881 3709	500 0.267 528	500 0.269 1	1 0.424 3	1 0.424 3	0.4
H	500 1.735	500 1.735	500 0.287	500 0.279	500 0.311	500 0.316	500 0.202	500 0.197	1 0.229	1 0.229	0.2

19. klikkaa ”Print”-kuvaketta tulostusivulla. Tämän jälkeen voit valita mitkä sivut haluat tulostaa.

Define Print Pages

Printer Settings
 Print orientation: Landscape Portrait
 Print destination: \\helmeips01\hel1455168
 Printer Setup...

Page No.: 1 of 5

Available Print Objects:
 Microplate View (1/3) ▶
 Table View (1/3) ▶
 Protocol Information (0/1) ▶
 21 CFR part 11 (0/1) ▶
 Standard Fit Curve(s) (1/3) ▶
 Std. Fit Result(s) (0/3) ▶
 Comment (0/30) ▶

Selected Print Objects:
 Microplate View
 Standard Fit Curve(s)
 Table View

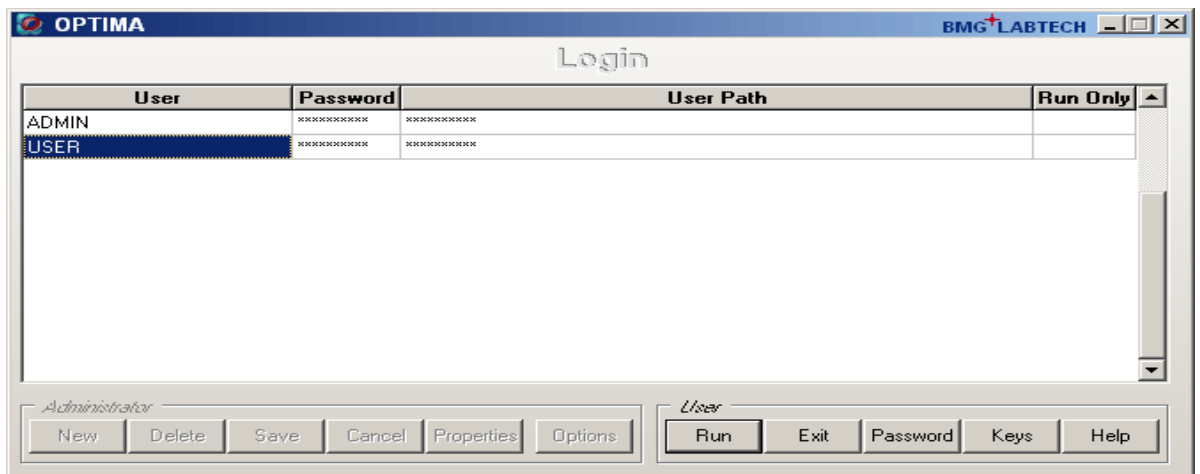
Print each data row in a separate microplate table

Header / Footer Print Settings... Page Setup... Print Preview Close Help

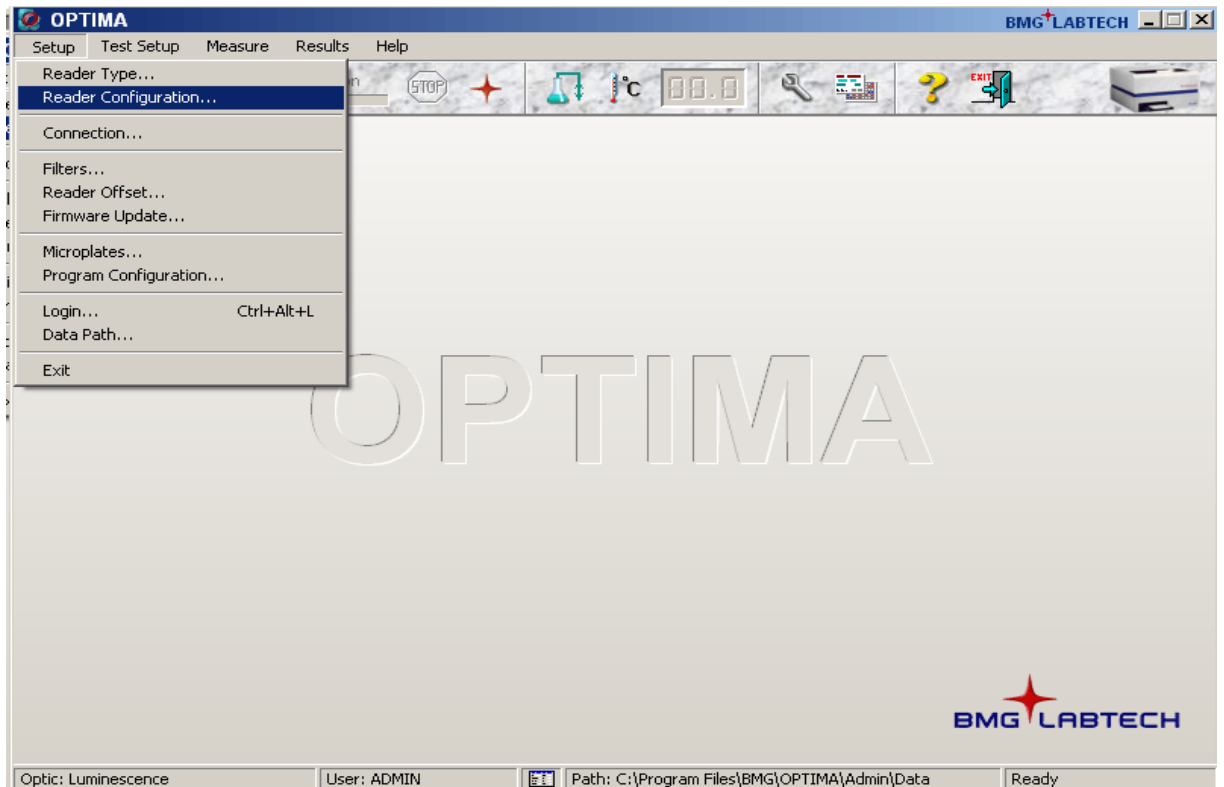
PIKAOHJE mittaaminen ja tulostaminen OPTIMA-monileimalukijalla

Aloitukset ja kirjautuminen

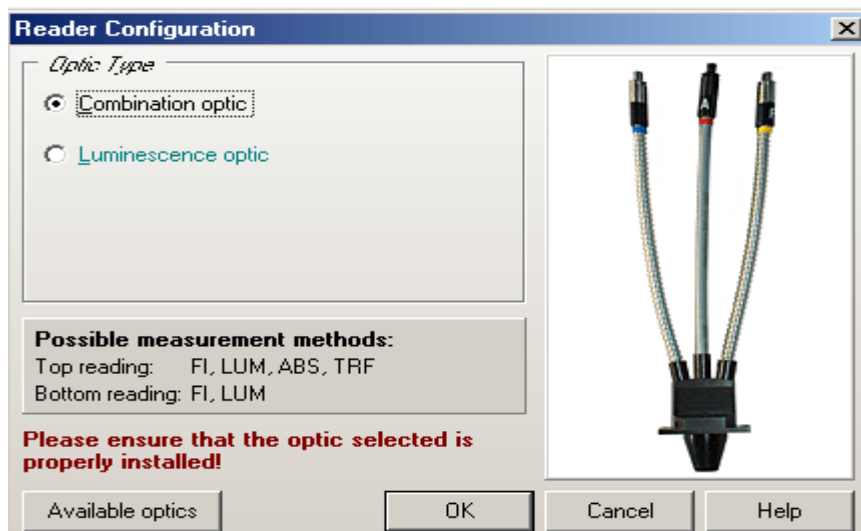
1. Tarkasta, että lukijassa on oikea ”lukupää” asennettuna. spektrofotometriaan käytetään Lukupäätä, jossa on kolme liitäntää, sininen värikoodi emissiolle, ja punainen A-kirjain sekä F-kirjain eksitaatiolle. Vaihda tarvittaessa.
2. Kytke virta sekä lukijaan että tietokoneeseen. Lukijan virtakytkin laitteen takareunassa, oikeassa laidassa.
3. Kirjaudu tietokoneeseen omilla xp-tunnuksilla. Varmista että sinulla on yhteysviros- asemalle. (\\helmeifs03\hel_huslab_viros)
4. Kaksoisklikkaa OPTIMA-kuvaketta työpöydällä.
5. Valitse käyttäjäksi ”admin” , salasanaksi ”bmg” ja klikkaa ”RUN”.



Kun olet vaihtanut mittauspään, Siirry ”Setup”-valikkoon, kohtaan ”Reader Configuration”-.



Valitse ”Optic Type”-> ”Combination optic”.



Mittausalueen määrittäminen

Huom! Pohjana on edellisen mittauksen pohja

Määritä mittausalue ohjeen mukaan

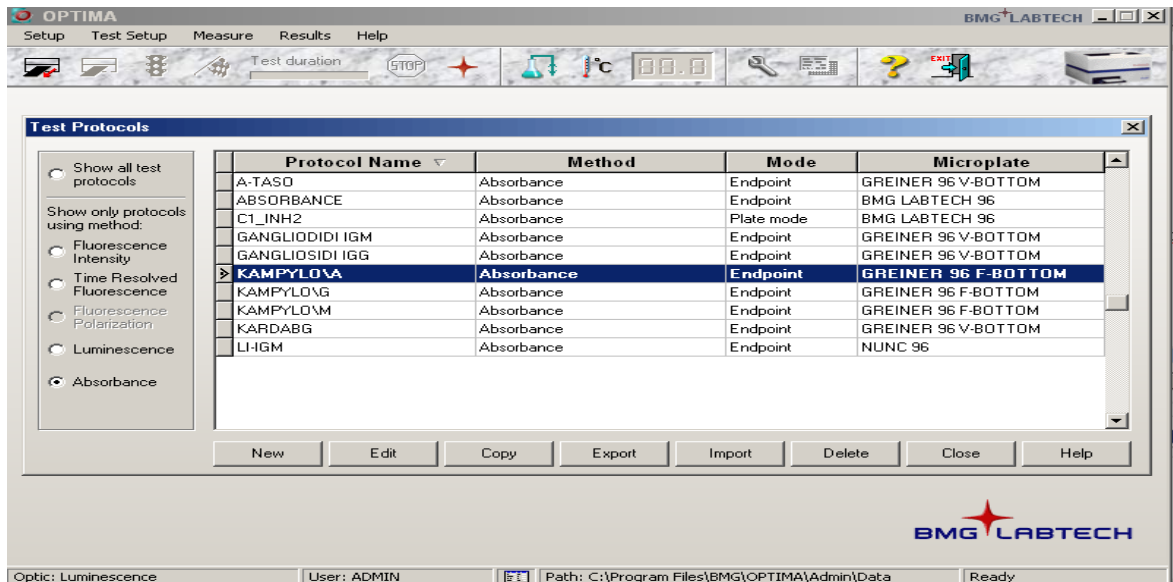
6. Valitse OPTIMA-kuvakkeen ylävalikosta ”Test Setup” ja edelleen ”Test Protocol”.

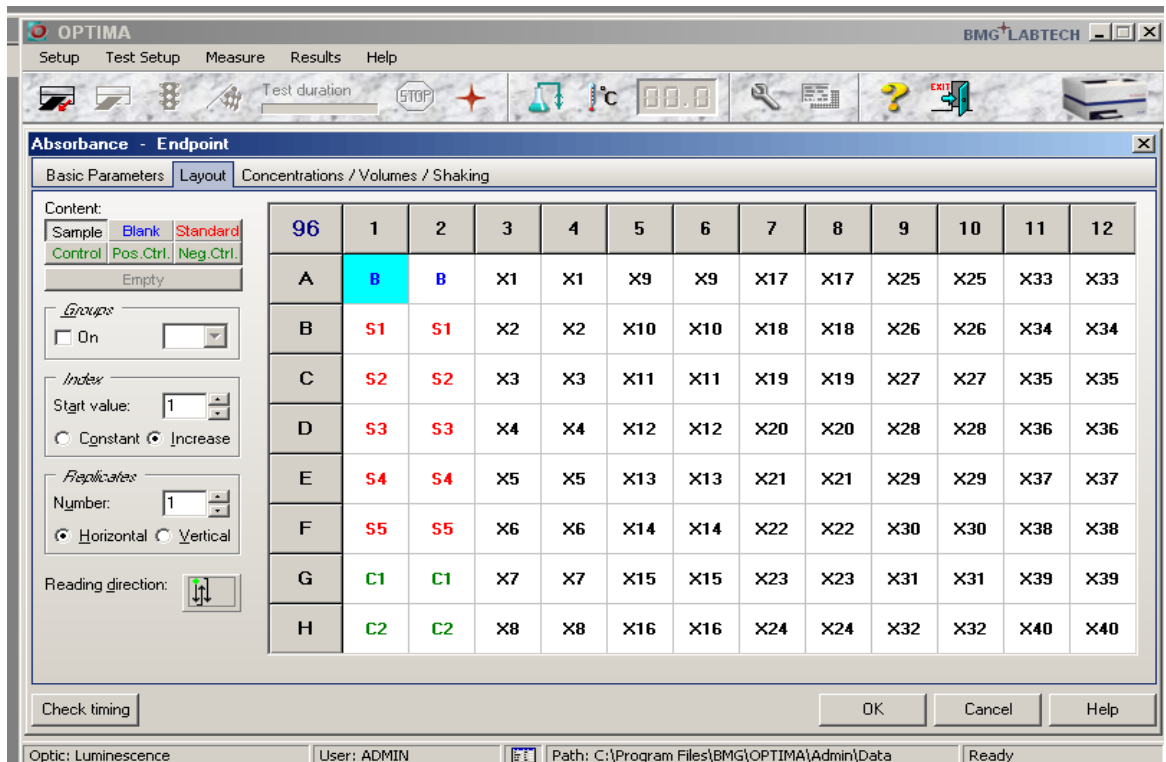
7. Valitse vasemmasta reunasta menetelmäksi ”Absorbance” ja ”Protocol Name”-luettelosta haluamasi tutkimus.

8. Klikkaa Edit- valikkoa ja valitse välilehti ”Layout”.

9. Poista ylimääräiset näytteet aktivoimalla ne ja klikkaamalla ”delete”. Lähtökohtaisesti Optima mittaa koko levyn muuten.

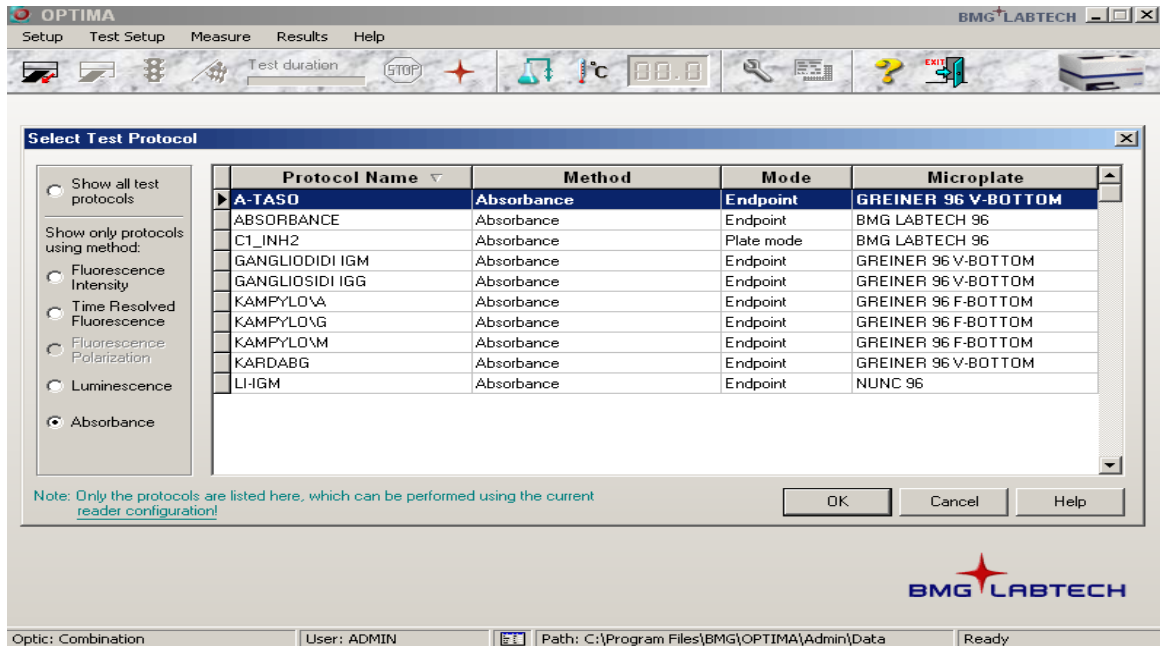
10. Poistu painamalla OK.



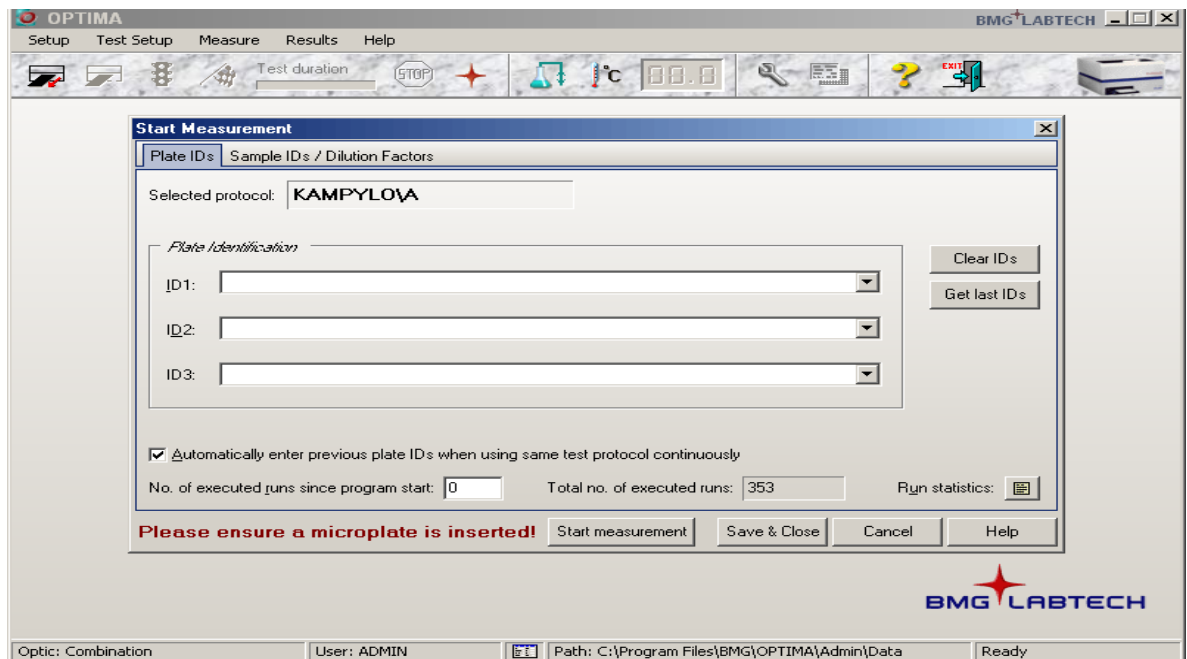


Mittaaminen

11. Aseta mitattava levy lukijaan painamalla mustaa pientä nappulaa lukijan vasemmassa reunassa tai klikkaamalla OPTIMA-kuvakkeen vasemmasta yläreunasta, ”setup”-valikon alta musta-punaista kuvaketta. Levytaso tulee esille, aseta levy ja paina uudelleen mustaa nappia tai klikkaa OPTIMA kuvakkeen vasemmasta yläreunasta, ”Test Setup”-valikon alta musta-punaista kuvaketta. Levy menee sisään.
12. Valitse OPTIMA-kuvakkeen yläreunasta valikko ”Measure” ja edelleen ”Measure”.
13. Valitse Protocol name-luettelosta mittaamasi tutkimus ja paina OK.



14. Valitse välilehti "Plate IDs" ja kirjaa ID1-riville esim päivämäärä.



16 Voit aloittaa mittauksen painamalla "Start measurement".

17. Mittauksen jälkeen sulje seurantaikkuna "close".

18. Tulos tallentuu automaattisesti.

Tulostaminen

17. Valitse OPTIMA-kuvakkeen ylävalikosta ”Result”-välilehti ja edelleen ”open last test run”.

18. Tulos-sivu aukeaa ”plate view”-muodossa.

OPTIMA - MARS BMG LABTECH

Home View Calculations Templates Layout Formats and Settings

Open Close Print Export Close All Sign Wizard Calculations Ranges Layout Abs in OD Templates Add Button Change User

Test Runs Data Reduction Display Predefined Templates

Navigation Data Nodes Row

KAMPYLO IGA (117)

Test Settings

Layout

Standard

Dilutions

Data

Raw Data (ABS410)

Blank corrected

Standards calculations

Cubic spline fit

Statistics

%CV

Average

Test Name: KAMPYLO IGA (based on Template: KAMPYLO IGA)

ID1: 190811_0,5s

Absorbance

Display legend in first column

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	1	1	500	500	500	500	500	500	1	1	0.0
	0.157	0.156	0.296	0.294	1.917	1.976	0.309	0.313	0.358		
	<< Y range	<< Y range	733	720	10027	10485	823	2	2		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	n.a.	n.a.	733	720	10027	10485	823	2	2		
B	1	1	500	500	500	500	500	1	1		
	3.3	3.284	0.462	0.459	0.332	0.332	1.412	1.398	0.341	0.3	
	>> Y range	49	1703	1685	981	979	6582	13	2		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	49	49	1703	1685	981	979	6582	13	2		
C	1	1	500	500	500	500	500	1	1		
	1.665	1.647	0.276	0.278	0.243	0.247	0.547	0.554	0.295	0.3	
	16	16	591	601	396	412	2120	4	1		
	1	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	16	16	591	601	396	412	2120	4	1		
D	1	1	500	500	500	500	500	1	1		
	0.684	0.661	0.379	0.373	0.28	0.279	0.201	0.187	0.268	0.2	
	6	5	1263	1228	616	611	<< Y range	<< Y range	1		
	2.8	2.8	1263	1228	616	611	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	5	5	1263	1228	616	611	n.a.	n.a.	n.a.	1	
E	1	1	500	500	500	500	500	1	1		
	0.328	0.313	0.207	0.212	0.269	0.277	0.209	0.208	0.248	0.1	
	2	2	<< Y range	<< Y range	542	595	<< Y range	<< Y range	840.234E-3	856.849E	
	7.5	7.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	2	2	n.a.	n.a.	542	595	n.a.	n.a.	840.234E-3	856.849E	
F	1	1	500	500	500	500	500	1	1		
	0.217	0.208	0.21	0.206	0.245	0.253	0.337	0.394	0.291	0.2	
	622.543E-3	<< Y range	<< Y range	<< Y range	403	443	1009	2	1		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	622.543E-3	622.543E-3	n.a.	n.a.	403	443	1009	2	1		
G	500	500	500	500	500	500	500	1	1		
	0.568	0.585	0.252	0.25	0.859	0.881	0.267	0.269	0.424	0.4	
	2221	2304	436	429	3603	3709	528	1	3		
	2.6	2.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.	
	2263	2263	436	429	3603	3709	528	1	3		
H	500	500	500	500	500	500	500	1	1		
	1.735	1.735	0.287	0.279	0.311	0.316	0.202	0.197	0.229	0.2	

19. klikkaa ”Print”-kuvaketta tulostusivulla. Tämän jälkeen voit valita mitkä sivut haluat tulostaa.

