



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Salla Mesimäki

Optilite-analysaattorin S -IgD-menetel- män verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

16.4.2019

Tekijä(t) Otsikko	Salla Mesimäki Optilite-analysointimenetelmän verifiointi
Sivumäärä Aika	33 sivua 16.4.2019
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Heidi Malava Teknis-analyttinen sairaalakemisti Pasi Nokelainen Prosessivastaava Outi Itkonen
<p>Immunoglobuliini D:n (IgD) funktio immuunipuolustuksen kannalta on ollut arvoituksellinen sen löyty- misestä vuonna 1965 viimeaikoihin asti. Aluksi IgD:tä pidettiin hiljattain kehittyneenä vasta-aineena, kunnes myöhemmin sitä löydettiin luu- ja rustokaloista, joista ensimmäiset elivät maapallomme 500 miljoonaa vuotta sitten. Immunoglobuliini D:n säilyminen läpi evoluution kaloista ihmisiin viittaa siihen, että sillä on tärkeitä immunologisia toimintoja. IgD-molekyylejä esiintyy B-solun solukalvolla sekä er- tetysässä muodossa muun muassa ihmisen ylempien hengitysteiden limakalvoilla. Sillä on todettu ole- van myös keskeinen rooli B-solun immunologisen toleranssin ja apoptoosin säätelyssä. IgD-pitoisuu- den nousua tavataan harvinaisissa IgD-myeloomassa ja hyper-IgD-syndroomassa (HIDS). IgD-pitoi- suus voi myös nousta akuuteissa tai kroonisissa infektioissa sekä autoimmuunisairauksissa ja aller- gioissa.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli verifioida Optilite-analysointimenetelmän seerumin immunoglobuliini D (S- IgD) menetelmä. Verifiointi on tärkeä osa menetelmän käyttöönottoa ja osa laboratorion toimintajär- jestelmää. Sen avulla varmistetaan, että käyttöönotettavalla menetelmällä saadaan luotettavia ja tois- tettavia tuloksia laboratorion omissa käyttöolosuhteissa. Verifiointi toteutetaan mittaamalla tiettyjä veri- fiointiparametreja ja tulosten perusteella arvioidaan menetelmän soveltuvuus diagnostiseen käyt- töön. Uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön vasta sen jälkeen kun verifiointi on hyväksytty ja johto- päätökset tehty.</p> <p>Opinnäytetyö oli työelämälähtöinen ja se toteutettiin yhteistyössä työelämän kanssa. Toimeksianta- jana oli HYKS-sairaanhoidon laboratoriotuloksikko HUSLAB ja työ laadittiin kliinisen kemian ja näytteenotto- ja analysointilinjaa kuuluvan erikoiskemian prosessin proteiini- ja analysointiosastolle. Proteiini- kemian laboratorioon saatiin vuonna 2018 kaksi täysautomaattista Optilite-proteiini-analysointimenetelmää seer- umin vapaiden kevytketjujen analysointia varten. Analysointimenetelmän tutkimusvalikoimaan kuuluu myös S-IgD. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida Optilite-analysointimenetelmä ja selvittää uuden menetelmän luotettavuutta ja sitä, onko kliinisesti perusteltua siirtää käytössä olevasta menetelmästä uuteen. Nykyinen menetelmä on radiaalinen immunodiffuusio (RID). Tämä menetelmä on manuaali- nen, tulosten saaminen kestää useita päiviä ja tulosten arviointi tapahtuu visuaalisesti. Optilite-analy- sointimenetelmä on täysautomaattinen ja sen käyttöönotto vähentäisi työn määrää, nopeuttaisi tulosten saa- mista ja luotettavuutta.</p> <p>Verifiointitulosten ja analysointimenetelmän laadun perusteella Optilite-analysointimenetelmä hyväk- syttiin käyttöönotettavaksi. Laiteliitännän virallisen testauksen ja tutkimustiedotteen julkaisun jälkeen menetelmä otetaan käyttöön toukokuun 2019 aikana.</p>	
Avainsanat	Vasta-ainevälitteinen immuniteti, immunoglobuliini IgD, verifi- ointi

Author(s) Title	Salla Mesimäki Verification of the Optilite-analyzer's IgD-method
Number of Pages Date	33 pages 16 April 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Heidi Malava, Senior Lecturer Pasi Nokelainen, Clinical Chemist Outi Itkonen, Process Owner
<p>The importance of immunoglobulin D (IgD) for immune defense system has been mysterious since its discovery in 1965 until recently. Initially, IgD was considered to be a newly developed antibody. However, it was later found in bone and cartilaginous fish, the first of which lived in earth 500 million years ago. Survival of IgD through evolution from fish to humans indicates that it has important immunological functions. In healthy adult serum, the concentration of IgD is very low. It represents about 0.25% of all serum immunoglobulins. IgD is co-expressed with IgM on the surface of the majority of antigen-naïve mature B cells prior to antigenic stimulation and functions as a transmembrane antigen receptor. In addition, secreted IgD also occurs in the circulation, mucosal secretions and on the surface of innate immune effector cell. It has been found to play a key role in regulating B-cell immunological tolerance and apoptosis. Increase of IgD concentration is found in rare IgD-myeloma and hyper-IgD- syndrome (HIDS). IgD-level can also increase in acute or chronic infections, as well as in autoimmune diseases and allergies.</p> <p>The purpose of this thesis was to verify serum immunoglobulin D (S-IgD) assay with Optilite-analyzers. Verification is part of the laboratory's quality management and ensures that the method to be implemented meets the requirements set for it and that the results are reliable and repeatable. During verification certain parameters are measured. Based on the results the suitability of the method for the intended use will be evaluated. The new method can only be introduced after the verification has been approved and the conclusions drawn.</p> <p>The thesis was commissioned by the HUSLAB laboratory unit of the Helsinki University Hospital and the work was prepared for the protein chemistry unit of the special chemistry process (the clinical chemistry and sampling services). In 2018, two Optilite analyzers were purchased for the analysis of free light chains in serum. The analyzer assay menu also included S-IgD. The aim was to verify the S-IgD method and determine the reliability of the method and whether it's clinically justified to replace the current method to the new one. Verification consists of designing the plan, the implementation phase of the verification, and the reporting phase. The report draws conclusions from the introduction or rejection of the method. The current method for determining IgD is radial immunodiffusion (RID) and the assay is performed in the HUSLAB virology unit. This method is manual and takes several days to obtain results. There was a need for a quicker, easier, and more reliable method. The turbidometry-based Optilite-analyzer is fully automated, so the deployment of the analyzer would reduce possibility for errors and also save resources.</p> <p>Based on the results of the verification and analytical quality, the Optilite-analyzer IgD method can be introduced. After the official testing of the device interface and the publication of the research report, the method will be introduced in May 2019.</p>	
Keywords	Antibody-mediated immunity, immunoglobulin D, verification

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Ihmisen immuunijärjestelmä	2
2.1	Vasta-ainevälitteinen immunitaetti	3
2.2	Vasta-aineiden rakenne ja toiminta	4
2.3	Immunoglobuliini D	5
3	IgD-sairaudet	7
3.1	IgD-myelooma	7
3.2	Hyper-IgD-syndrooma (HIDS)	8
4	Menetelmän verifiointi	9
4.1	Verifiointiparametrit	10
5	Opinnäytetyön menetelmät	11
5.1	Optilite-analysaattorin IgD-menetelmä	11
5.2	Vertailumenetelmä – radiaalinen immunodiffuusio	12
6	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	13
7	Opinnäytetyön toteutus	14
7.1	Kvantitatiivinen tutkimusmenetelmä	14
7.2	Tutkimusaineiston keruu ja käsittely	15
7.3	Tilastolliset menetelmät	16
8	Tulokset	18
8.1	Menetelmän toistuvuus	18
8.2	Määritys- eli kvantitointiraja	20
8.3	Lineaarisuus	20
8.4	Tulostason vertailu potilasnäytteillä	21
9	Tulosten tarkastelu	23
9.1	Menetelmien käytettävyyden vertailu	25
9.2	Tulosten luotettavuuden arviointi	26

10	Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu	27
11	Pohdinta	27
12	Lähdeluettelo	29

1 Johdanto

Immunoglobuliini D:n (IgD) merkitys immuunipuolustuksen kannalta on ollut arvoituksellinen sen löytymisestä vuonna 1965 viimeaikoihin asti. Aluksi IgD:tä pidettiin hiljattain kehittyneenä vasta-aineena, kunnes myöhemmin sitä löydettiin luu- ja rustokaloista, joista ensimmäiset elivät maapallomme 500 miljoonaa vuotta sitten. IgD:n säilyminen läpi evoluution kaloista ihmisiin viittaa siihen, että sillä on tärkeitä immunologisia toimintoja. (Gutzeit – Chen– Cerutti 2018.) Terveen aikuisen seerumissa IgD:n pitoisuus on hyvin pieni. Se edustaa noin 0,25 % kaikista seerumin immunoglobuliineista (Vladutiu 2000.) IgD-molekyylejä esiintyy naiivin antigeeniään kohtaamattoman B-solun solukalvolla, mutta myös eritettyssä muodossa muun muassa ihmisen ylempien hengitysteiden limakalvoilla. Sillä on todettu olevan keskeinen rooli B-solun immunologisen toleranssin ja apoptoosin säätelyssä. (Gutzeit ym. 2018.) IgD-pitoisuuden nousua tavataan harvinaisissa IgD-myeloomassa ja hyper-IgD-syndroomassa (HIDS), IgD-pitoisuus voi myös nousta akuuteissa tai kroonisissa infektioissa sekä autoimmuunisairauksissa ja allergioissa. (Vladutiu 2000.)

Opinnäytetyön tarkoitus oli verifioida Optilite-analysaattorin seerumin immunoglobuliini D (S-IgD) menetelmä. Verifiointi on osa laboratorion toimintajärjestelmää ja sen avulla varmistetaan, että käyttöönotettava menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset ja tulokset ovat luotettavia ja toistettavia. Verifiointissa mitataan tiettyjä parametreja ja tulosten perusteella arvioidaan menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön vasta sen jälkeen kun verifiointi on hyväksytty ja johdopäätökset tehty. (Hägg 2016: 6-7.)

Opinnäytetyön toimeksiantajana oli HYKS-sairaanhoidon alueen laboratoriotuloyksikkö HUSLAB ja työ laadittiin kliininen kemia ja näytteenottopalvelut -linjaan kuuluvan erikoiskemian prosessin proteiini-kemian yksikölle. Proteiini-kemialle hankittiin vuonna 2018 kaksi täysautomaattista Optilite-analysaattoria vapaiden kevytketjujen analytiikkaan. Analysaattorin tutkimusvalikoimaan kuuluu myös S-IgD. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida S-IgD-menetelmä ja selvittää menetelmän luotettavuutta ja sitä, onko kliinisesti perusteltua siirtyä nykyisestä menetelmästä uuteen. Verifiointi koostuu suunnitelman laatimisesta, verifiointin toteutusvaiheesta ja raportointivaiheesta. Raporttiin sisältyy johdopäätökset menetelmän käyttöönotosta tai hylkäämisestä. (Hägg 2016: 9-15.)

Tällä hetkellä käytössä oleva menetelmä seerumin IgD-pitoisuuden määrittämiseen on radiaalinen immunodiffuusio (RID) ja tutkimus tehdään HUSLABin virologian yksikössä. Tämä menetelmä on manuaalinen, tulosten saaminen kestää useita päiviä ja tulokset tulkitaan visuaalisesti. Optilite-analysaattori on täysautomaattinen ja sen käyttöönotto lisää tehokkuutta ja vähentäisi virheen lähteitä.

Tässä opinnäytetyössä selvitetään immunoglobuliini D:n teoriaa ja siihen liittyviä sairauksia, määritellään mitä menetelmän verifiointilla tarkoitetaan ja kerrotaan työssä testattavat verifiointiparametrit. Lisäksi kuvaillaan tutkimuksen suoritusta ja esitellään saatuja tuloksia. Lopuksi arvioidaan verifiointin onnistumista ja luotettavuutta.

2 Ihmisen immuunijärjestelmä

Ihmisen immuunijärjestelmä on elimistön puolustus- ja suojausjärjestelmä vieraita taudinaiheuttajia vastaan. Se osallistuu monin tavoin myös kehon puhtaanapitoon ja homeostaattiseen tasapainoon. Immuunijärjestelmän toiminta perustuu sen kykyyn erotella omia ja vieraita rakenteita. Järjestelmän eri osat toimivat dynaamisesti tietyssä järjestyksessä ja aikataulussa siten, että syntyvät reaktiot ovat tarkoituksenmukaisia ja tarkoin säädeltyjä. Immuunijärjestelmä voidaan karkeasti jakaa luontaiseen immunitettiin ja hankittuun immunitettiin, jotka täydentävät toisiaan. Luontaisen immunitetin reaktiot ovat nopeita ja ne toistuvat samankaltaisina. Kudosten yleispuolustusmekanismit, toistokuvioita tunnistavat molekyylit, komplementti ja fagosyytit ovat luontaiseen immuunijärjestelmään kuuluvia osia (Meri 2011: 12–13).

Hankitulla immuunijärjestelmällä on spesifinen kyky tunnistaa kohderakenteita eli anti-geeneja. Sen toiminnan keskeinen ominaisuus on immunologisen muistin kehittyminen. Ensimmäisen antigeenikontaktin yhteydessä spesifisen immuunivasteen syntyminen vie aikaa, mutta seuraavan kontaktin yhteydessä reaktiot tapahtuvat nopeammin ja voimakkaammin. Hankitun immunitettijärjestelmän pääosat ovat B-lymfosyyteistä kehittyneiden plasmakomien tuottamat vasta-aineet ja T-lymfosyytit, joiden pinnalla on antigeenia spesifisesti tunnistavia T-solureseptoreita (Meri 2011: 12–13). Hankittu immunitetti voidaan jakaa vasta-ainevälitteiseen ja soluvälitteiseen immunitettiin. Ero näiden välillä on siinä, levittäytyykö immunitetti eri osiin nestevirtausten liukoisten molekyylien vai spesifisten immuunisolujen suoran toiminnan välityksellä. (Mustjoki – Pettersson ym. 2015.)

2.1 Vasta-ainevälitteinen immuniteetti

Vasta-ainevälitteisellä immuniteetilla tarkoitetaan elimistön solunulkoisten nestefaasien mukana leviäviä immuunijärjestelmiä. Sen toiminta välittyy vasta-aineiden eli immunoglobuliinien (Ig) avulla, joita B-lymfosyytit erikoistuvat tuottamaan. Vasta-ainevälitteisen immuniteetin tavoitteina on estää infektioita ja auttaa poistamaan solunulkoisia mikrobeja, elimistölle vieraita rakenteita ja elimistön omia muuntuneita rakenteita. Tavoitteiden saavuttamiseksi vasta-aineet voivat tuhota mikrobin (sytolyyysi), päällystää mikrobin fagosytoosia varten (opsonisaatio), estää mikrobin tai sen osan sitoutumisen ihmisen soluihin tai molekyyliin (neutralisaatio) tai aiheuttaa välittömän yliherkkyysoireyksen yhdessä syöttösolujen kanssa. (Jokiranta – Seppälä 2011: 101–103.)

B-lymfosyytit kypsyvät luuytimen kantasoluista useiden kehitysvaiheiden kautta ensin pro-B-soluksi sitten pre-B-soluksi, epäkypsäksi B-soluksi, kypsäksi B-soluksi ja lopulta erilaistuneeksi B-soluksi (Jokiranta & Seppälä 2011: 114). Epäkypsä B-solu, jolla on pinnallaan B-solureseptoreita, lähtee luuytimeä verenkiertoon ja muualle sekundaariin imukudokseen ja kehittyy naiiviksi kypsäksi B-soluksi. Antigeenin kohdattuaan naiivi B-solu aktivoituu ja erikoistuu liukoisia vasta-aineita tuottavaksi lyhytikäiseksi plasmasoluksi, muistisoluksi tai pitkäikäiseksi plasmasoluksi. (Kantele Anu – Kantele Jussi – Arstila 2011: 149–151.)

B-solut kiertävät elimistössä verenkierrosta imusolmukkeisiin tai pernaan ja sieltä takaisin verenkiertoon. Imukudokseen virtaa antigeeneja laajoilta alueilta ja siellä yleensä tapahtuukin B-solun ensikontakti antigeenin kanssa. B-solu voi kohdata antigeeninsa imunesteessä vapaana molekyylinä tai dentriittisolujen tai makrofagiin esittelemänä. B-solun aktivoituminen on välttämätöntä vasta-ainevälitteisen immuunivasteen aikaansaamiseksi. Tavanomaisten B-solujen aktivoituminen edellyttää B-solureseptoreita ja samanaikaista kontaktia aktivoituneen auttaja-T-solun kanssa. Auttaja-T-solut tukevat B-solun aktivoitumista tunnistamalla B-solun sitoman antigeenin, antamalla aktivaatiosignaalin ligandille ja tuottamalla sytokiineja. Solun aktivoitumista tehostaa, jos antigeeniin on sitoutunut C3d-molekyyliä, jotka sitoutuvat B-solun CD21-komplementtiresptoriin. Eräät B-solut kykenevät aktivoitumaan ilman T-solukontaktia eli T-solusta riippumattomasti. Nämä tilanteet liittyvät yleensä antigeenin mitogeenisuuteen (jakautumista lisäävä vaikutus), joka aiheuttaa voimakkaan B-soluaktivaation. Haittana T-soluista riippuvaan tuotantoon verrattuna on se, ettei vasta-aineluokka yleensä vaihdu, affiniteetin kypsymistä ei tapahdu eikä muistisoluja synny. (Jokiranta – Seppälä 2011: 118–125.)

Aktivoituessaan B-solu alkaa jakaantua eli siitä syntyy nopeasti kasvava joukko soluja, joilla on samanlainen vasta-ainereseptori pinnallaan. Tätä ilmiötä kutsutaan klonaaliseksi lisääntymiseksi ja sen tarkoituksena on tuottaa vasta-aineita, jotta mikrobien aiheuttamat infektiot olisi mahdollista pysäyttää. B-solun solun vasta-aineita koodaavat geenit käyvät läpi somaattisen hypermutaation, joka lisää vasta-aineen affiniteettia eli sitoutumista antigeeniin kohtaan. B-solu voi myös vaihtaa tuottamiensa vasta-aineiden luokkaa. Luokanvaihdolla tarkoitetaan B-solun tuottaman vasta-aineen raskasketjun vakio-osan eli C-osan vaihtoa ja se liittyy siihen, että elimistö reagoi eri tavalla kohdatesaan antigeenin ensimmäisen kerran kuin tavatessaan tämän uudestaan. Luokanvaihtosignaaleina toimivat T-solujen erittämät sytokiinit, jotka käynnistävät uusien geenirekombinaatioiden muodostumisen. Onnistuneen rekombinaation jälkeen B-solu tuottaa pinnalleen uuteen vasta-aineluokkaan kuuluvan antigeenireseptorin. (Jokiranta – Seppälä 2011: 126–129.)

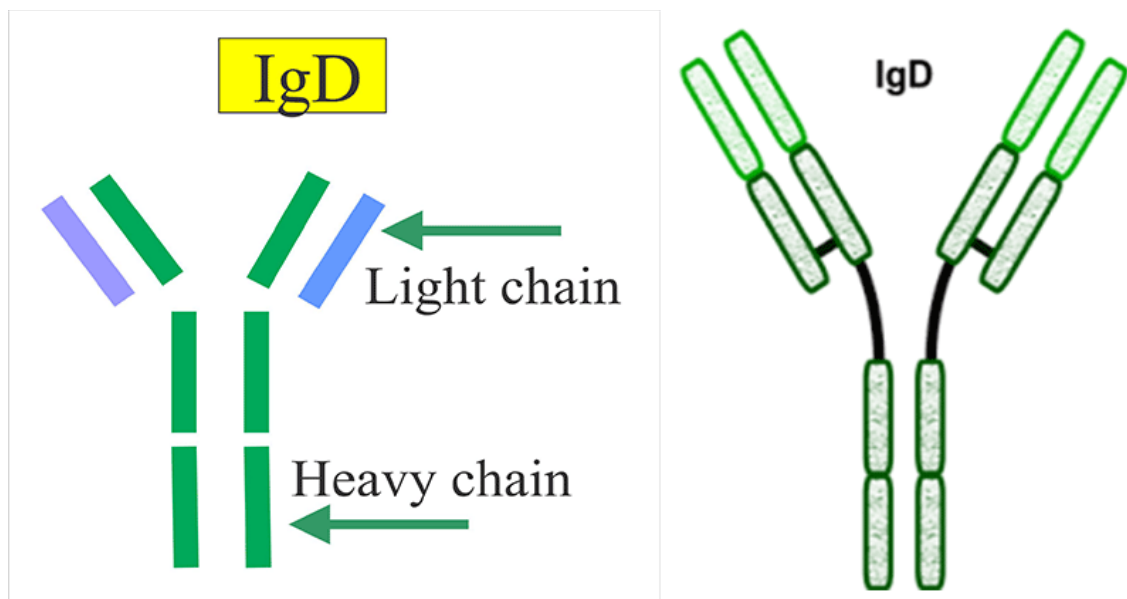
Aktivoitumisen ja sitä seuraavan affiniteetin kypsymisen ja mahdollisen luokanvaihdon jälkeen osa B-soluista erilaistuu plasmamuokiksi, jotka tuottavat vasta-aineita huomattavasti vilkkaammin kuin esiasteensa B-solut. Suurin osa plasmamuokista kuolee alle kahdessa viikossa, mutta osa plasmamuokista on kuitenkin pitkäikäisiä ja tuottaa vasta-aineita kuukausien tai vuosien ajan. Pääosa näistä pitkäikäisistä plasmamuokista on luuytimessä. Osa B-soluista erilaistuu muisti-B-soluiksi, jotka voivat elää jopa vuosia. Nämä solut aktivoituvat vasta-ainetuotantoon nopeammin ja tehokkaan kuin naiivit B-solut. (Kantele ym. 2011: 151.)

2.2 Vasta-aineiden rakenne ja toiminta

Vasta-ainevälitteisen immunitetin toiminta välittyy immunoglobuliinien eli vasta-aineina toimivien proteiinien avulla. Niiden keskeisin tehtävä on tunnistaa vieras antigeeni ja tarttua siihen, jotta muu immuunipuolustus voi tuhota vieraan aineksen ja poistaa sen elimistöstä. Immunoglobuliinit ovat antigeenille spesifisiä, joten ne pystyvät sitoutumaan vain yhteen spesifiseen antigeeniin (Jokiranta – Seppälä 2011: 102). Ne ilmenevät joko B-solun pintaan kiinnittyneinä B-solureseptoreina tai erittyneinä liukoosina molekyyleinä (Gutzeit ym. 2018).

Kaikilla vasta-aineilla on sama Y-kirjaimen muotoinen perusrakenne. Ne koostuvat neljästä polypeptidiketjusta; kahdesta keskenään identtisestä raskas (H-) ketjusta ja kahdesta keskenään identtisestä kevyt (L-) ketjusta (kuva 1).

Kevyt ketjut kiinnittyvät raskas ketjuihin ja raskas ketjut toisiinsa yhdellä tai useammalla rikkisillalla. Molemmat ketjut koostuvat soikeista rakenteellista perusyksiköistä, joita kutsutaan domeeneiksi. Yleensä raskasketjussa on kaikkiaan neljä domeenia, yksi vaihteleva osa (V-osa) ja kolme vakio-osaa, jota kutsutaan yhteisesti vakioalueeksi (C-alue). Kevytketjuissa on vain kaksi domeenia, yksi vakio-osa ja yksi vaihteleva osa. (Jokiranta & Seppälä 2011, 102–103.)



Kuva 1. IgD-molekyylin rakenne (Aryal 2018)

Vasta-aineet jaetaan luokkiin niiden raskasketjujen vakioalueiden mukaan. Luokkia on viisi: IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. Kevytketjut ryhmitellään joko kappaan tai lambdaan. Toiminnallisesti vasta-ainemolekyylin polypeptidiketjut voidaan jakaa kolmeen yksikköön. Molekyylin kärkiosissa on kaksi identtistä antigeenia sitovaa kohtaa, joita kutsutaan Fab-alueiksi. Molekyylin häntäosassa on Fc-alue, jossa on sitoutumiskohtia komplementin proteiineille ja erilaisille solupintareseptoreille. (Solunetti 2006.)

2.3 Immunoglobuliini D

Immunoglobuliini D (IgD) löydettiin vuonna 1965 (Vladutiu 2000). Sen merkitys immuunipuolustuksen kannalta on ollut viime aikoihin asti arvoituksellinen. Aluksi IgD:tä pidettiin hiljattain kehittyneenä vasta-aineena, kunnes myöhemmin sitä löydettiin luu- ja rus-

tokaloista, joista ensimmäiset ilmestyivät maapallollemme noin 500 miljoonaa vuotta sitten. Luu- ja rustokalat ovat vanhin eläinryhmä, joilla on nisäkkäiden kanssa samoihin molekyyleihin perustuva hankinnainen immuunijärjestelmä. IgD:n säilyminen läpi evoluution viittaa siihen, että sillä on tärkeitä immunologisia toimintoja. (Gutzeit ym. 2018.)

Immunoglobuliini D:n pitoisuus terveen aikuisen seerumissa on hyvin pieni, vain 0,003-0,5 g/l, ja se edustaa noin 0,25 % kaikista seerumin immunoglobuliineista. Erittyneen IgD:n suhteellinen molekyylimassa on 185 kDa (kilodaltonia) ja puoliintumisaika 2,8 vuorokautta. IgD:n puoliintumisaika on lyhyt verrattuna IgM-, IgG- ja IgA-luokan vasta-aineisiin, joiden puoliintumisaikat ovat 10, 20 ja 6 päivää, ja sitä esiintyy toiseksi vähiten kaikista vasta-aineista terveen aikuisen seerumissa. (Vladutiu 2000.) Seerumin IgD-pitoisuus vaihtelee suuresti yksilöiden välillä, mikä luultavasti johtuu geneettisten ja ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta sekä altistumisesta allergeeneille ja epäpuhtauksille (Gutzeit 2018).

Suurin osa naiiveista eli antigeeniaan kohtaamattomista kypsistä B-soluista ilmentävät solukalvolla sekä IgD- että IgM-luokan vasta-ainemolekyylejä eli B-solureseptoreita. Näillä kahdella on sama antigeenia sitova kohta (antigeeni spesifisyys) ja ne syntyvät samanlaisen mRNA-juosteen erilaisesta pilkonnasta. IgD- ja IgM-luokan B-solureseptorit toimivat signaalintireseptoreina aktivoimalla ja ohjaamalla B-solujen erilaistumista. IgD:tä tuotetaan myös eritetyssä muodossa. Vasta-aineen luokanvaihdon seurauksena B-solut, jotka tuottavat IgM- ja IgD-luokan vasta-aineita erilaistuvat IgD:tä erittäviksi plasmasoluiksi. Vasta-aineluokan vaihdos on mahdollinen raskasketjun vakio-osaa koodaavan DNA:n uudelleenjärjestäytymisen, geenirekombinaation, kautta. Erittyntä IgD:tä voidaan havaita ihmisen verenkierrossa, nenänielun limakalvolla, suun eritteissä ja kynnelneesteessä. Lisäksi IgD kykenee sitoutumaan basofiileihin ja syöttösoluihin sekä aktivoimaan näitä soluja tuottamaan monia mikrobeja estäviä antimikrobisia peptidejä (AMP). (Gutzeit ym. 2018.)

Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että IgD:llä on keskeinen rooli B-solun immunologisen toleranssin ja apoptoosin säätelyssä (Gutzeit ym. 2018). Immunologisella toleranssilla tarkoitetaan omien kudoksetien sietämistä ja kykyä olla reagoimatta silloin, kun tarvetta ei ole (Hänninen 2011, 159). Apoptoosissa B-solu pystyy inaktivoitumaan tai tuhoutumaan, jotta se ei reagoisi elimistön omaa kudosta kohtaan. (Jokiranta – Seppälä 2011). IgD:llä tiedetään olevan erilaisia toimintoja B-solun erilaistumisessa ja aktivoituvaiheessa. Erittyneen IgD:n on todettu parantavan limakalvon immuunivastetta

ja vaikuttavan immuunijärjestelmän homeostaasiin vahvistamalla sen vuorovaikutusta hyödyllisen mikrobiotan kanssa. (Gutzeit ym. 2018.)

Menetelmiä, joita käytetään immunoglobuliini D-pitoisuuden mittaamiseen, ovat radiaalinen immunodiffuusio (RID), radioimmunoanalyysi (RIA), entsyymi-immunoanalyysi (EIA) sekä nefelometria ja turbidometria. Radiaalinen immunodiffuusio on ensimmäinen IgD:n määrittämiseen käytetty menetelmä ja se on edelleen käytössä useissa kliinisen kemian laboratorioissa. Se on yksinkertainen menetelmä, joka perustuu antigeeni-vastaaine kompleksien saostumiseen agarosigeelissä (Vladutiu 2000). Radioimmunoanalyysissä antigeeni leimataan radioaktiivisella merkkiaineella ja se kilpailee analyytin kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Menetelmän käyttö on vähenemässä johtuen radioaktiivisten merkkiaineiden epäterveellisyydestä ja erillisten säteilytilojen ylläpitovaatimuksesta sekä reagenssien huonontuvan saatavuuden takia. Entsyymiaktiivisuuteen perustuvassa leimausmenetelmässä EIA:ssa käytetään entsyymejä merkkiaineina ja hyödynnetään niiden katalyyttisiä ominaisuuksia immunologisten reaktioiden havainnoinnissa ja mittaamisessa (Niemelä – Pulkki 2010, 65–67). Nefelometriset ja turbidometriset menetelmät ovat kehittyneet ja niiden käyttö proteiinianalytiikassa on laajentunut nopeasti viime vuosien aikana. Tässä opinnäytetyössä verifioitava menetelmä perustuu turbidometriaan ja vertailumenetelmänä on radiaalinen immunodiffuusio.

3 IgD-sairaudet

3.1 IgD-myelooma

Multippeli myelooma on pahanlaatuinen syöpäsairaus, jossa B-solulinjaan kuuluva monoklonaalinen plasmaselokko lisääntyy luuytimessä ja erittää vereen ja/tai virtsaan monoklonaalista immunoglobuliinia (raskas- ja kevytketjua) tai sen osaa (vain kevytketju). Plasmaselokloonin tuottamia immunoglobuliineja kutsutaan nimellä M-komponentti tai paraproteiini. Myelooma jaetaan erittyvän M-komponentin perusteella alaluokkiin; IgG, IgA, IgM, kevytketju, IgD ja nonsekretorinen. Näistä yleisin on IgG myelooma, jonka osuus kaikista myeloomista on 52 %, IgA-myeloomien osuus on 22 % ja IgM- ja kevytketju-myeloomien osuus on noin 10 %. Loput ovat harvinaisia IgD-myeloomia (2 %) tai nonsekretorisia myeloomia (1 %). Taudin kliiniset ilmenemismuodot vaihtelevat ja potilaiden taudin kulku on yksilöllistä. Yleisiä oireita ovat luustomuutoksista johtuva luustokipu ja anemiaan liittyvä heikkous ja väsymys. (Remes 2013.)

IgD-myelooma on hyvin harvinainen myelooman muoto ja sen esiintyvyys on noin 2 % kaikista myeloomatapauksista. Kuten kaikissa myeloomissa, myös IgD-myelooman kliininen kuva vaihtelee. Siihen liittyy usein monielinvaurio, jonka keskeisin piirre on munuaisten vajaatoiminta (Modi – Kamal – Eter – El-Sayegh – El Charabaty 2015). Muita tyypillisiä kliinisiä piirteitä ovat amyloidoosi, lyyttiset luustomuutokset, hyperkalsemia, anemia, imusolmukkeiden suureneminen (lymfadenopatia) ja taudin yleisiä oireita ovat luustokipu, väsymys, heikkous ja laihtuminen. Tyypillinen piirre IgD-myeloomassa on Bence Jones-proteinuria, jossa virtsaan erittyy kevytketjua (kappa tai lambda) sisältävää M-komponenttia. (Pandey – Kyle 2013).

IgD-paraproteiinin lisääntyminen merkitsee lähes aina pahanlaatuista plasmaseläutia. Diagnostivaiheessa IgD-myelooma on usein edennyt jo pitkälle ja taudin on todettu olevan aggressiivisempi ja ennusteeltaan heikompi kuin muut myeloomatyypit. Sitä on havaittu keskimääräistä nuoremmilla muihin myeloomatyyppeihin verrattuna. IgD-myelooman sairastumisen keski-ikä on 52–60 vuotta ja tauti on miehillä jonkin verran yleisempi kuin naisilla. Myelooman aiheuttajia ei tunneta, mutta todennäköisesti kyseessä on monen tekijän tapahtumasarja, jossa geneettiset muutokset johtavat taudin kehittymiseen. (Pandey – Kyle 2013.)

Plasmasolukloonin tuottama M-komponentti voidaan havaita seerumin tai virtsan elektroforeesissa ja M-komponentin varmentaminen ja tyypitys tehdään immunofiksatiolla. IgD-myeloomassa erittyneen M-komponentin määrä voi olla hyvin pieni ja näin ollen sen havaitseminen elektroforeesissa voi olla vaikeaa (Pandey – Kyle 2013). Myelooman diagnostiset kriteerit ovat: luuytimessä vähintään 10 % monoklonaalisia plasmajäluja, M-komponentti seerumissa ja/tai virtsassa sekä myeloomaan liittyvä elinvaurio. Parantavaa hoitoa myeloomaan ei ole, mutta lääke- ja tukihoidolla voidaan vähentää oireita ja pidentää elinikää. Hoito suunnitellaan yksilöllisesti ja hoidossa käytetään useita lääkkeitä ja niiden yhdistelmiä. Lääkehoitona käytetään muun muassa kortisonia, erilaisia myeloomaan spesifisesti tehoavia lääkkeitä ja solusalpaajia sekä muun hoidon lisäksi autologista kantasolusiirtoa. (Sinisalo – Laine 2018.)

3.2 Hyper-IgD-syndrooma (HIDS)

Hyper-IgD-syndrooma (HIDS) on metabolisen häiriön mevalonaattikinaasi-puutoksena tunnetun oireyhtymän lievempi muoto. HIDS-oireyhtymä on autonomissa peittyvästi peittyvä tauti ja sen taustalla on mevalonaattikinaasigeenin (MVK-geeni) mutaatio. MVK-

geeni koodaa mevalonaattikinaasi entsyymiä, joka mahdollistaa mevalohapon muuttamisen mevalonaatti-5-fosfaatiksi. MVK-geenien vaurioituminen johtaa entsyymin osittaiseen puutteeseen ja näin elimistöön kerääntyy mevalonihappoa, jota erittyy kuumekehauksien aikana virtsaan. (Hyper-IgD Syndrome, GARD, 2017.)

Hyper-IgD-syndrooma on autoinflammatorinen, elimistön poikkeavaan tulehdusvasteeseen liittyvä, sairaus, jossa esiintyy toistuvia kroonisia tai episodisia tulehduksia. Näille tulehduksille tunnusomaista on säännölliset tai epäsäännölliset 4-6 vuorokautta kestävät kuumejaksot ja muut oireet, kuten nivelkipu, imusolmukkeiden turpoaminen, ihottuma, päänsärky ja vatsakipu. Tyypillisessä tapauksessa kuumejaksot alkavat alle vuoden iässä ja niitä esiintyy säännöllisesti läpi elämän. Jaksojen esiintymistiheys ja vakavuus vaihtelee yksilöittäin. Nämä hyökkäykset tapahtuvat spontaanisti tai niitä laukaisevat erinäiset tekijät, kuten rokotukset, infektiot, fyysinen tai psyykinen rasitus ja stressi. Kasvuun ja kehitykseen Hyper-IgD-oireyhtymä ei yleensä vaikuta. (Hyper-IgD Syndrome, GARD, 2017.)

Hyper-IgD-syndroomassa potilaan seerumin IgD-pitoisuus on suurentunut. Lisäksi IgA-pitoisuus voi olla suurentunut ja virtsan mevalonaattipitoisuus kasvanut kuumevaiheen aikana. HIDS-oireyhtymään ei ole olemassa toistaiseksi parantavaa hoitoa. Taudin oireiden hoidon perustana pidetään anakinra-hoitoa, joka on biologinen reumalääke. Kaikilla potilailla ei ole täydellistä vastetta lääkkeelle, mutta se näyttäisi toimivan osalla potilaista. Myös tulehduskipulääkkeillä voidaan lievittää oireita tulehduksellisten hyökkäyksien aikana. HIDS-oireyhtymän ennuste on hyvä ja kuumejaksojen välillä potilaat ovat yleensä oireettomia. Kuumejaksot jatkuvat koko eliniän ajan, mutta iän karttuessa jaksot yleensä harvenevat ja lieviytyvät. HIDS-oireyhtymä ei lyhennä elinajanodotetta. (Hyper-IgD Syndrome, GARD, 2017.)

4 Menetelmän verifiointi

Validointi ja verifiointi ovat menetelmän luotettavuuteen liittyviä käsitteitä. Niiden tarkoituksena on osoittaa, että menetelmä on luotettava ja tarkoitukseen sopiva. Laboratorioiden laadun osoituksena tulee uusi menetelmä aina validoida ("kelpuuttaa") tai verifioida ("varmistaa") ennen käyttöönottoa. Validoinnilla ymmärretään menettelyä, jossa osoitetaan menetelmän olevan tieteellisesti pätevä ja jonka avulla arvioidaan menetelmän suorituskykyä ja soveltuvuutta suunniteltuun käyttötarkoitukseen. Validointia tarvitaan kun kehitetään uusi menetelmä tai jos käytössä olevaa menetelmää uudistetaan tai muute-

taan (Jaarinen – Niiranen 2018: 8-11). Verifiointi on validointia suppeampi ja siitä käytetään joskus nimitystä uudelleenvalidointi. Sen avulla varmistetaan, että käyttöön otettavalla menetelmällä saadaan luotettavia ja toistettavia tuloksia suunnitelluissa käyttöolosuhteissa. Verifiointi suoritetaan silloin, kun halutaan varmistaa, että jo validoitu menetelmä täyttää sille asetetut odotukset. Sen avulla tarkistetaan menetelmän käyttökelpoisuus laboratorion omissa olosuhteissa ja omilla näytteillä sekä oman henkilökunnan suorittamana (Hägg 2011: 7-8).

Optilite-analysaattorin IgD- menetelmän verifiointi toteutettiin HUSLABin validointi/verifiointisuunnitelman mukaisesti. Menetelmän verifiointiin sisältyy verifiointisuunnitelman laatiminen, josta ilmenee verifiointin kohde, tavoite, suorituspaikka, laajuus, laitteet, vastuhenkilöt, näyteaineisto, tavoiteaikataulu, verifiointin parametrit sekä laatutavoitteet. Verifiointiin ryhdytään suunnitelman mukaisesti ja toteutuksesta laaditaan verifiointiraportti, jossa käsitellään kaikki mitatut verifiointiparametrit. Optilite-analysaattorin IgD- menetelmän verifiointissa tutkittavia parametreja ovat toistettavuus, lineaarisuus ja määrittäysraja, lisäksi suoritettiin tulostasovertilu. Lopuksi arvioidaan täyttääkö menetelmä sille asetetut vaatimukset ja soveltuuko se aiottuun käyttötarkoitukseen. (Hägg 2016: 9–15.)

4.1 Verifiointiparametrit

Verifiointissa määritetään verifiointiparametrit suorittamalla erilaisia mittaussarjoja. Optilite-analysaattorin IgD-menetelmän verifiointissa tutkittavat parametrit olivat toistuvuus, lineaarisuus, määrittäysraja sekä tulostasovertilu. Mittausten syntyvä tieto kootaan ja tuloksien perusteella arvioidaan menetelmän luotettavuus.

Toistuvuus tarkoittaa menetelmän täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun määrittäminen tehdään toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Toistettavuus voidaan määrittää tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä eri pitoisista näytteistä. Sarjojen sisäinen toistuvuus on peräkkäisten mittaustulosten keskihajonta. Sarjojen välinen toistuvuus määritetään mittaamalla samaa näytettä useampana päivänä. Sarjojen sisäinen vaihtelu tulisi olla pienempi kuin sarjojen välinen vaihtelu. Mikäli sarjojen välinen vaihtelu on merkittävästi suurempi kuin sisäinen vaihtelu, on syy vaihteluun pyrittävä selvittämään. Aiheuttaja voi johtua tekijöistä, jotka pysyvät sarjan sisällä muuttumattomina, mutta saattavat vaihdella sarjojen välillä, esimerkiksi lämpötila tai säilyvyys. (Hiltunen – Linko – Hemminki – Hägg – Järvenpää – Simonen – Kärhä 2011: 19.)

Mittausalueella tarkoitetaan sitä tutkittavan aineen pitoisuusaluetta, jossa menetelmää voidaan käyttää käyttötarkoitukseen soveltuvalla tarkkuudella. Optimipitoisuusalueella kalibrintokuvaajan tulisi olla lineaarinen. Lineaarinen alue kuvaa sitä mittausaluetta, jolla analyytin vaste käyttäytyy lineaarisesti sen pitoisuuteen nähden. Mittausalueen alin pitoisuus on se, joka voidaan mitata luotettavasti ennalta määriteltyjen kriteerien perusteella. Lineaarinen alue määritetään tekemällä useita mittauksia standardinäytteistä, joiden analyytin pitoisuus tulisi olla mahdollisimman kattava vaadittavalla mittausalueella. Mittaustuloksista laaditaan regressiosuora ja graafisesta esityksestä voidaan arvioida menetelmän lineaarinen alue. (Hägg 2016: 23.)

Määritys- eli kvantitointirajalla tarkoitetaan mitatun analyytin pienintä pitoisuustasoa, jolle kvantitatiivisia mittauksia voidaan suorittaa tietyllä luotettavuustasolla (Jaarinen – Niiranen 2018: 13). Määritysraja voidaan määrittää käyttäen varmennettua vertailumateriaalia ja useimmiten suositellaan tekemään 6-10 mittauksen toistoja. Määritysraja on tavallisesti kalibrintikäyrän alhaisin piste nollanäyte pois lukien. Vaihtoehtoisesti määritysraja lasketaan 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonnasta. (Hiltunen ym. 2011: 13.)

5 Opinnäytetyön menetelmät

Opinnäytetyössä verifioitiin Optilite-proteiinianalyysaattorin immunoglobuliini D (IgD)-menetelmä. Vertailumenetelmänä toimi HUSLABissa käytössä oleva radiaalinen immunodiffuusio (RID). Näyteaineistona käytettiin pakastettuja ylijääneitä seeruminäytteitä ja saatuja tuloksia verrattiin radiaalisella immunodiffuusiolla samoista näytteistä saatuihin tuloksiin.

5.1 Optilite-analyysaattorin IgD-menetelmä

Optilite-analyysaattori on proteiinianalytiikkaan kehitetty täysautomaattinen analyysaattori. Sen toiminta perustuu turbidometriaan ja valon mittalaitteena on fotometri. Analyysaattorissa on yhteensä 54 paikkaa näytteille ja 36 reagensseille. Analyysaattorissa on viivakoodinlukija näytteille, reagensseille, kalibraattoreille ja kontrolleille. Analyysaattori tekee automaattilaimennokset korkean pitoisuuden omaaville näytteille. (The Binding Site 2016.)

Optiliten IgD-menetelmä liukoisten immunokompleksien havaitsemiseen perustuu turbiditeetin eli sameuden muutoksien mittaamiseen. Näytteessä oleva analyytti reagoi rea-

genssissa olevan spesifisen IgD-antiseerumin kanssa. Tällöin muodostuu suspensio, jossa on vasta-aineen ja antigeenin muodostamia liukenemattomia immunokomplekseja. Suspension sameutta mitataan fotometrisesti. Valo kulkee kyvetissä olevan näytteen läpi ja päätyy detektorille. Valon määrä on epäsuoraan verrannollinen IgD-pitoisuuden näytteenä ja menetelmä laskee automaattisesti pitoisuuden kalibroitikäyrän perusteella. (The Binding Site 2014)

Tutkimus suoritetaan Optilite-analysaattorilla Optilite IgD-kittiä käyttäen, joka sisältää IgD-reagenssin, kalibraattorin sekä korkean ja matalan laadunohjausnäytteen. Yksi pakkaus riittää 400 näytteen IgD-pitoisuuden määrittämiseen. Lisäksi tarvitaan menetelmälle tarkoitetut Optilite Diluent 1 ja 2-liuokset. Tarvittavia reagensseja tulee säilyttää jääkaapissa (2-8 Co), jossa avatut reagenssit, kalibraattorit ja kontrollit säilyvät kolme kuu-kautta. IgD-pitoisuus voidaan määrittää seerumista tai plasmasta. Näytteitä voidaan säilyttää kahden päivän ajan jääkaapissa, mutta pidempään kestävässä säilytyksessä näytteet tulee pakastaa. Reagenssivalmistajan mukaan voimakkaasti hemolyytiset tai lipeemisety näytteet voivat häiritä menetelmää. (The Binding Site 2014.)

5.2 Vertailumenetelmä – radiaalinen immunodiffuusio

Radiaalinen immunodiffuusio (RID) on kvantitatiivinen immunodiffuusio menetelmä, jota käytetään näytteen antigeenipitoisuuden määrittämisessä. Menetelmä perustuu näytteenä olevan antigeenin diffuusioon sylinterimäisestä pipetointikuopasta agarosigeeliin. Agarosigeeli sisältää monospesifistä vasta-ainetta (Ab). Antigeeni hajoaa agarosigeeliin ja reagoi vasta-aineen kanssa. Tuloksena muodostuu Ag-Ab komplekseja, jotka oikeissa olosuhteissa saostuvat renkaaksi pipetointikuopan ympärille. Muodostuneen renkaan halkaisija kasvaa kunnes saavutetaan tasapainotila Ag-Ab kompleksien muodostumisen ja hajoamisen välille. Muodostuneen renkaan halkaisija (mm) on suoraan verrannollinen antigeenipitoisuuden näytteessä. Näytteen antigeenipitoisuus saadaan suoraan kitin valmistajan tekemästä taulukosta mittaamalla reaktiossa muodostuneen renkaan halkaisija ja lukemalla vastaava pitoisuus taulukosta. Tuloksena on muodostuneen renkaan kokoa (mm) vastaava pitoisuus (mg/l).

Menetelmässä käytetään kaupallista kittiä: Human IgD NL BINDARID™ Kit. The Binding Site Group Ltd. Kitti sisältää agarosigeelilevyt (RID-levyt), laimennosliuoksen, geelinjakajia, kalibraattorin ja laadunohjausnäytteen. Lisäksi muodostuneen Ag-Ab renkaan koon mittaamiseen käytetään mittaviivainta ja valoa. (HUSLAB työohje 2017.)

Tutkimus tehdään kahdesti viikossa HUSLABin virologian laboratoriossa. Maanantaisin luetaan edellisen näytesarjan tulokset ja aloitetaan seuraava sarja. Tämä luetaan torstaisin ja aloitetaan taas uusi sarja. Tuloksien saaminen kestää vähintään neljä vuorokautta. Tutkimus suoritetaan manuaalisesti. Foliopussiin pakattu RID-levy avataan ja pipetointikuoppiin pipetoidaan 10µl näytettä ja laadunohjausnäytettä sekä levyn ensimmäisellä käyttökerralla myös kalibraattoria. Pipetoinnin jälkeen levyn kansi suljetaan ja laite-taan se takaisin foliopussiin, johon lisätään vedellä kostutettua mekasoft paperia. Foliopussi suljetaan ja RID-levyä inkuboidaan neljä vuorokautta tasaisella alustalla huoneen-lämmössä. Levyä tulee tarkastella jo yhden vuorokauden kuluttua näytteiden pipetoinnista, jolloin voidaan havaita erittäin suurteen renkaiden muodostuminen. Tämä tarkoittaa sitä, että näytteen IgD-pitoisuus on hyvin suuri ja näytteestä pitää tehdä laimennos. Vaaditun inkubointiajan jälkeen mitataan pipetointikuopan ympärille muodostuneen renkaan halkaisija 0,1 mm:n tarkkuudella mittaviivaimen ja kirkkaan valon avulla ja merkitään tulokset pipetointitaulukkoon. Mitattavien renkaiden tulee olla teräväreunaisia, muutoin inkubaatiota jatketaan vielä 1-2 vuorokautta. Kalibraattorin halkaisija tulee olla 8,0 mm ±0,3 mm ja positiivisen laadunohjaus tavoitearvo on merkitty kontrollipullon etikettiin. Jos kalibraattorin tai kontrollin tulokset ovat poikkeavat liikaa tavoitearvoista, on tutkimus tehtävä uudestaan. Jos näytteestä mitattu renkaan halkaisija on <4,5 mm, vastataan konsentraatioksi <4 mg/l, mikä on alin vastattava tulos. Jos näytteen muodostaman renkaan halkaisija on yli 8 mm, on näyte laimennettava ja tehtävä tutkimus uudestaan. (HUSLAB S-IgD 2017.)

6 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli verifioida Optilite-analysaattorin IgD-menetelmä. Verifiointi sisälsi suunnitelman laatimisen, toteutusvaiheen, raportointivaiheen sekä johtopäätöksien tekemisen siitä otetaanko uusi menetelmä käyttöön. Verifiointissa määritettiin tietyt verifiointiparametrit ja verrattiin verifioitavaa Optiliten IgD-menetelmää HUSLABissa käytössä olevaan radiaaliseen immunodiffuusioon. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää menetelmän luotettavuutta ja mahdollisuutta siirtyä nykyisestä menetelmästä Optilite IgD-menetelmään.

Tutkimuskysymykset

- 1) Kuinka luotettava Optiliten IgD-menetelmä on?

- 2) Mikä on IgD-tutkimukseen tarvittava työmäärä Optiliten IgD-menetelmällä ja radiaalisella immunodiffuusiolla?
- 3) Onko kliinisesti perusteltua siirtyä nykyisestä menetelmästä Optiliten IgD-menetelmään?

7 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyö toteutettiin HUSLABin Erikoiskemian prosessin proteiinikemian yksikössä. Työn tarkoituksena oli testata immunoglobuliini D:n määritysmenetelmää Optilite-analysaattorilla. Kyseessä oli menetelmän verifiointi ja pyrkimyksenä oli arvioida saatuja mitaustuloksia sekä vertailla niitä käytössä olevan menetelmän tulostasoon. Verifiointi toteutettiin HUSLABin validointi/verifiointisuunnitelman mukaisesti mittaamalla tiettyjä suorituskykyparametreja sekä vertaamalla saatuja tuloksia radiaalisella immunodiffuusiolla saatuihin tuloksiin. Tulosten perusteella arvioitiin täyttääkö menetelmä sille asetetut vaatimukset ja soveltuuko se aiottuun käyttötarkoitukseen.

Sain opinnäytetyön aiheen elokuussa 2018, jonka jälkeen aloin valmistella opinnäytetyön suunnitelmaa ja keräsin aiheeseen liittyvää kirjallisuutta. Suunnitelman hyväksymisen jälkeen opinnäytetyötä varten haettiin tutkimuslupa Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriltä (HUS) Tutkijan työpöytä-järjestelmässä. Kun tutkimuslupa myönnettiin, aloitettiin opinnäytetyön kokeellinen osuus marraskuun loppupuolella. Kokeellisen vaiheen aikana näytteet ajettiin Optilite-analysaattorilla Optilite IgD Kit-reagensseja käyttäen ja saadut tulokset kirjattiin ylös. Opinnäytetyön kokeellinen vaihe kesti noin viisi viikkoa, jonka jälkeen saatuja mitaustuloksia analysoitiin tilastollisin menetelmin ja kirjoitettiin opinnäytetyön raportti saaduista tuloksista ja verifiointin onnistumisesta.

7.1 Kvantitatiivinen tutkimusmenetelmä

Tämän opinnäytetyön tutkimusmenetelmä on kvantitatiivinen eli määrällinen menetelmä, joka perustuu mittaamiseen, tilastollisten menetelmien käyttöön ja muuttujien välisten yhteyksien tarkasteluun (Kankkunen 2009: 41). Olennaista kvantitatiivisessa tutkimuksessa on, että tutkittavia asioita ja niiden ominaisuuksia tarkastellaan numeerisesti ja tuloksia voidaan esittää taulukoiden ja kuvioiden avulla. Menetelmät perustuvat mittamiseen, jossa mitta yksikkö voi vaihdella ilmiön luonteen mukaan (Erätuuli – Leino –

Yliluoma 1994, 10). Kvantitatiivisessa tutkimuksessa usein selvitetään eri asioiden välisiä riippuvuuksia ja aineistosta saatuja tuloksia pyritään yleistämään tutkittavia havaintoyksiköitä laajempaan joukkoon tilastollisen päättelyn keinoin. Kvantitatiivinen tutkimus pyrkii vastaamaan kysymyksiin ”mikä?”, ”missä?”, ”paljonko?” ja ”kuinka usein?”. Se edellyttää tarpeeksi suurta ja edustavaa otosta tutkittavasta kohteesta (Heikkilä 2014: 16). Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeistä ovat aiemmat tutkimukset ja teoriat, joiden pohjalta voidaan tehdä johtopäätöksiä, olettamusten esittäminen, käsitteiden määrittely, aineiston keruun huolellinen suunnittelu, perusjoukon kattavuus, aineiston saattaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon ja johtopäätösten tekeminen tilastolliseen analysointiin perustuen. (Hirsijärvi – Remes – Sajavaara 2009: 140)

7.2 Tutkimusaineiston keruu ja käsittely

Tässä opinnäytetyössä tutkimusaineistona käytettiin HUSLABissa jo analysoituja ja pakastettuja potilasnäytteitä, joilla ei ollut enää arvoa potilaan hoidon kannalta. Näytteiden IgD-pitoisuus oli määritetty radiaalisella immunodiffuusiolla. Näin ollen osattiin poimia potilastietokantaa hyödyntäen mahdollisimman edustava otos eri pitoisia näytteitä. Työtä varten ei siis tarvinnut kerätä erikseen potilasnäytteitä. Työhön valittiin yhteensä 76 näytettä eri pitoisuusalueilta (taulukko 1) ja näytteet numeroitiin juoksevalla numeroinnilla.

Taulukko 1. Vertailunäytteiden pitoisuusalueet.

	mg/l	n
Taso 1	13–39 mg/l	24
Taso 2	40–200 mg/l	25
Taso 3	200–3000 mg/l	23

Opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin marras- ja joulukuun 2018 aikana. Ensin IgD-tutkimus aktivoitiin Optilite-analysointoreille. Tämän jälkeen suoritettiin kalibroinnit ja analysoitiin laadunohjausnäytteet eli ”kontrollit”. Potilasnäytteiden analysointi aloitettiin 26.11.2018 ja viimeinen näytesarja ajettiin 12.12.2018. Kaikki näytteet analysoitiin rinnakkaismäärityksinä ja sama näyte ajettiin saman päivän aikana molemmilla analysointoreilla. IgD-kontrollit ajettiin molemmilla analysointoreilla kahdesti päivässä näytesarjan alussa ja lopussa. Sarjojen välistä toistuvuutta varten kontroleja ajettiin 13 päivän ajan aikavälillä 26.11–28.12.2018. Määritysrajan luotettavuutta varmennettiin ajamalla lähellä valmistajan ilmoittamaa mittaussalarajaa oleva näyte rinnakkain 15 kertaa. Valmistajan ilmoittamaa lineaarisuutta varmennettiin tekemällä vertailunäytteestä laimennossarja ja

ajamalla näytteet rinnakkain molemmilla analysointilaitteilla sekä vertaamalla näitä tuloksia teoreettisiin mittaustuloksiin. Kaikki mittaustulokset kirjattiin heti analysointipäivänä Excel-
taulukoihin.

7.3 Tilastolliset menetelmät

Kun tutkimusaineisto oli kerätty ja tulokset kirjattu ylös, se analysoitiin tilastollisin menetelmin ja esitettiin tiivistetysti taulukkoina, graafisina kuvioina ja tilastollisina tunnuslu-
kuina. Kerätty aineisto analysoitiin Microsoft Excel-ohjelmalla ja siihen liitännäisellä Ana-
lyse It-ohjelmalla. Aineiston analysoinnista ja varsinaisesta tulkinnasta vastasi verifioin-
nin vastuuhenkilö Pasi Nokelainen. Seuraavaksi esitellään tässä työssä käytetyt tilastol-
liset tunnusluvut. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 46).

Tilastolliset tunnusluvut kuvaavat tilastoaineiston tunnusomaisia piirteitä. Tunnuslukujen
kaksi pääryhmää ovat sijainti- ja hajontaluvut. Sijaintiarvot kuvaavat havaintoarvojen si-
jaintia ja hajontaluvut kuvaavat arvojen vaihtelevuutta eli poikkeavuutta toisistaan. Muut-
tujien keskinäisen riippuvuuden olemassaolon toteamiseen ja voimakkuuden mittaami-
seen käytetään erilaisia menetelmiä ja kulloinkin käytettävä mittari määräytyy lähinnä
tutkittavien muuttujien mittaustason mukaan (Karjalainen 2010: 87,121)

Mediaani eli keskiluku ilmoittaa jakauman keskimmäisen arvon. Mediaanin molemmin
puolin jää yhtä monta havaintoa, kun havainnot järjestetään suuruusjärjestykseen. Jos
havaintoja on parillinen määrä, mediaani on kahden keskimmäisen arvon keskiarvo.
(Heikkilä 2014: 83).

Keskiarvolla tarkoitetaan yleensä aritmeettista keskiarvoa, joka saadaan jakamalla ha-
vaintoarvojen summa havaintoarvojen lukumäärällä. Keskiarvolla kuvataan havaintoar-
vojen keskimääräistä suuruutta. Se on hyvin herkkä poikkeaville havainnoille, joten kes-
kiarvo ei anna kovin tarkkaa kuvaa jakaumasta, jos aineistossa on yksikin hyvin suuri tai
pieni arvo (Vilka 2007:121).

Keskihajonta (SD) kuvaa sitä, kuinka kaukana yksittäisen muuttujan arvot ovat keski-
määräisen muuttujan arvosta. Toisin sanoen keskihajonta ilmaisee muuttujien etäisyyttä
suhteessa keskiarvoon. Rinnakkaismäärittämisestä keskihajonta lasketaan Dahlbergin
kaavalla. Variaatiokerrointa käytetään kun halutaan vertailla kahden eri otoksen keski-
hajontaa. Sillä saadaan esiin kahden muuttujan suhteellinen hajonta. (Vilka 2007: 124.)

Variaatiokerroin (CV %) ilmaistaan yleensä prosenttilukuna. Sen avulla voidaan vertailla eri suuruusluokkaa olevien muuttujien tai eri mittayksikköä käyttävien muuttujien arvojen hajontoja. Variaatiokerroin lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon suhteena ja se ilmoitetaan yleensä prosentteina. (Heikkilä 2008: 87.)

Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden muuttujan keskinäistä riippuvuutta, jota kuvaillaan korrelaatiokertoimella. Useimmiten käytetty korrelaatiokerroin on Pearsonin tulomomentti-korrelaatiokerroin. Sen symboli on otoksesta laskettuna r ja sen käyttö edellyttää, että molemmat muuttujat ovat vähintään välimatka-asteikollisia. Pearsonin korrelaatiokerroin mittaa vain lineaarista riippuvuutta. Kerroin vaihtelee $-1:n$ ja $+1:n$ välillä ja kertoimen arvo 0 ilmoittaa, ettei muuttujien välillä ole lineaarista riippuvuutta. Kun r on 1 , kaikki havaintopisteet sijaitsevat samalla nousevalla suoralla ja kun r on -1 , kaikki havaintopisteet sijaitsevat samalla laskevalla suoralla. Positiivinen korrelaatiokerroin tarkoittaa, että muuttujien muutokset tapahtuvat samaan suuntaan eli $x:n$ arvojen kasvaessa myös $y:n$ arvot kasvavat. Negatiivinen korrelaatiokerroin taas tarkoittaa, että muuttujien muutokset tapahtuvat eri suuntiin eli x -arvojen kasvaessa $y:n$ arvot pienenevät ja päinvastoin (Karjalainen 2010: 126). Havaintoarvojen lukumäärä vaikuttaa korrelaatiokertoimen merkitsevyyteen ja erityisesti pienissä aineistoissa kerroin on herkkä poikkeaville havainnoille. Ennen kuin voidaan sanoa muuttujien välillä olevan lineaarista riippuvuutta, korrelaatiokertoimen on poikettava selvästi nolasta. Se, kuinka suuri kertoimen pitää olla, riippuu havaintoparien lukumäärästä ja käytetystä merkitsevyytastasosta. (Heikkilä 2014: 195)

Kun tilastollisen riippuvuuden olemassaolo ja voimakkuus on havaittu, ryhdytään selvittämään, onko muuttujien välillä myös syy-yhteyttä. Tätä varten voidaan muodostaa matemaattinen malli, joka kuvaa muuttujien välistä suhdetta. Kun toisen muuttujan arvot tunnetaan, mallin avulla voidaan ennustaa toisen muuttujan arvoja. Jos muuttujien välinen riippuvuus on lineaarista, niin havaintopareja kuvaava malli voidaan kirjoittaa ensimmäisen asteen yhtälönä ja sen kuvaaja koordinaatistossa on regressiosuora. Regressiosuoran yhtälö on

$$y = a + bx$$

Regressiosuoran x on selittävä ja y selitettävä muuttuja. Tällöin pyritään löytämään sääntö, jonka mukaan muuttujan y arvot riippuvat muuttujan x arvoista. (Karjalainen 2014: 136) Regressiokerroin b ilmoittaa, kuinka paljon muuttuja y keskimäärin muuttuu,

kun x kasvaa yhden yksikön verran. Vakio a ilmaisee suoran ja y -akselin leikkauspisteen. (Heikkilä 2014: 223)

Regressiomallin hyvyttä eli sitä, miten luotettavina mallin avulla laskettuja ennusteita voidaan pitää, arvioidaan selityssasteen perusteella (Karjalainen 2010: 138). Selityssasteeksi kutsutaan korrelaatiokertoimen neliötä (r^2). Se ilmaisee kuinka suuren osan selitettävää muuttujaa (x) selittää selitettävän muuttujan (y) vaihtelusta. Jos selityssaste on korkea, voidaan mallin avulla laatia ennusteita selitettävälle muuttujalle. (Heikkilä 2014: 233.)

Korrelaatiokertoimen lisäksi vertailua kahden menetelmän välillä tehtiin Passing-Bablok-regressioanalyysin ja Bland-Altman-menetelmän avulla. Passing-Bablok-regressioanalyysi on non-parametrinen menetelmä, jota voidaan käyttää normaalijakaumaa noudattamattomien lukujen regressiosuoran piirtämiseen. Menetelmä ei huomioi vahvasti poikkeavia yksittäisiä lukuja ja antaa näin paremman kuvan todennäköisestä regressiosta (Bilić-Zulle L. 2011). Bland-Altman-metodi on kehitetty tarkastelemaan kahden samaa ominaisuutta mittaavan menetelmän välistä yhtenevyyttä (Giavarina 2015).

8 Tulokset

Opinnäytetyössä verifioitiin Optilite-analysointimen immunoglobuliini D:n määritysmenetelmä ja pyrkimyksenä oli arvioida analysointimen saatuja tuloksia sekä verrata niitä aikaisemmin käytössä olleen radiaalisen immunodiffuusion tuloksiin samoista näytteistä.

8.1 Menetelmän toistuvuus

Tässä työssä sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistuvuutta tarkasteltiin keskihajonnan (SD) ja variaatiokertoimen (CV %) avulla. Sarjan sisäinen toistuvuus määritettiin mittaamalla eri pitoisia potilasnäytteitä kahtena rinnakkaisena samana päivänä molemmilla Optilite-analysointimilla. Tulokset analysoitiin tilastollisin menetelmin ja niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti. Sarjan sisäisen keskihajonnan laskemisessa ja toistettavuuden ja luotettavuuden arvioinnissa hyödynnettiin Dahlbergin kaavaa. Mittaustuloksista lasketut tilastoarvot ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. IgD-menetelmän sarjan sisäinen toistettavuus potilasnäytteillä Optilite-analysaattoreilla.

Kontrolli	Laite	n	keski-arvo (mg/l)	SD	CV %	Binding siten spesifikaatio	Binding site CV %	HUSLAB tavoite
Potilasnäyte	Optilite 1	52	114,189	3,3	2,89 %	110,20 mg/l	2,1 %	-
Potilasnäyte	Optilite 2	54	125,99	5,64	4,48 %			

Sarjojen välinen toistettavuus määritettiin mittaamalla kahden tasoisia kontroleja (QC) kaksi kertaa päivässä yhteensä 13 päivän ajan. Mittaustuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti. Mittaustuloksista lasketut tilastoarvot ja valmistajan ilmoittamat spesifikaatiot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. IgD-menetelmän sarjojen välinen toistettavuus Optilite-analysaattoreilla.

Kontrolli	Laite	n	keski-arvo (mg/l)	SD	CV %	Binding siten spesif.	Binding site CV %	HUSLAB tavoite
Kitin matala IgD -QC	Optilite 1	28	23,29	1,66	7,1 %	23,27 mg/l	2,9 %	-
	Optilite 2	26	23,46	1,33	5,7 %			
Kitin korkea IgD -QC	Optilite 1	27	114,11	6,89	6,0 %	110,20 mg/l	1,6 %	
	Optilite 2	24	111,6	3,46	3,1 %			

Menetelmän kokonaisvariaatio (CV % tot) koostuu sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä variaatiosta ja se lasketaan kaavalla $CV_{tot} = \sqrt{CV(sis)^2 + CV(väl)^2}$. Taulukossa 4 on esitetty menetelmän kokonaisvariaatiot ja valmistajan ilmoittamat spesifikaatiot.

Taulukko 4. IgD-menetelmän kokonaisvariaatio Optilite-analysaattoreilla.

Näyte	Laite	CV %	Binding site CV %
Kitin matala IgD -QC	Optilite 1	7,7 %	4 %
	Optilite 2	7,3 %	4 %
Kitin korkea IgD -QC	Optilite 1	6,7 %	3,2 %
	Optilite 2	5,5 %	3,2 %

8.2 Määritys- eli kvantitointiraja

Valmistajan ilmoittama kvantitointiraja Optilite-analysaattorin IgD-menetelmälle on 12,37 mg/l. Näin ollen alle kvantitointirajan meneville mittaustuloksille ei saada numeerista tulosta. Valmistajan ilmoittaman kvantitointirajan luotettavuutta arvioitiin määrittämällä sarjan sisäinen toistettavuus matalasta potilasnäytteestä, jonka pitoisuus on mahdollisimman lähellä mittausalueen alarajaa. Menetelmän toistettavuutta mittausalarajan tuntumassa arvioitiin variaatiokertoimen (CV %) avulla. Menetelmän toistettavuus molemmilla laitteilla oli alle 2 %, mikä on erinomainen tulos (taulukko 5).

Taulukko 5. IgD-menetelmän sarjan sisäinen toistettavuus mittausalarajan tuntumassa.

Laite	n	ka. (mg/l)	CV %
Optilite 1	15	16,02	1,8 %
Optilite 2	15	15,75	1,9 %

8.3 Lineaarisuus

Valmistaja on ilmoittanut Optilite-analysaattorin IgD-menetelmän lineaarisuusalueeksi 12,37–248,11 mg/l. Menetelmän lineaarisuutta varmennettiin laimennossarjan avulla. Tätä varten valittiin vertailunäytteistä pitoisuudeltaan lähimpänä 200 mg/l oleva näyte, jonka analysaattori pystyy analysoimaan peruslaimennoksilla ja siitä tehtiin laimennossarja Optilite Diluent 1-liuokseen. Näytteen mitattu pitoisuus asetettiin laimennossarjan ensimmäiselle näytteelle myös teoreettiseksi pitoisuudeksi. Kukin laimennos mitattiin kahtena rinnakkaisena. Mitattuja tuloksia verrattiin teoreettiseen tulokseen ja arvoista laskettiin rinnakkaisten variaatiokerroin (CV %) ja mitatun arvon poikkeama teoreettisesta arvosta (RE %). Mitatun arvon poikkeama teoreettisesta arvosta saa olla enintään 20 %. Laimennussarjat jäivät molemmilla laitteilla hieman lyhyiksi, koska ei löytynyt näytettä, joka olisi ollut 190 – 250 mg/l ja josta laimennussarja olisi ulottunut lähemmäs mittausalarajaa (12,37 mg/l) (taulukko 6).

Taulukko 6. IgD-menetelmän lineaarisuusalueen varmentaminen.

OPTILITE 1				OPTILITE 2			
Laskettu (teoreettinen) mg/l	Mitattu (rinnakk. ka) mg/l	Rinnakkaisten CV	Tarkkuus %RE	Laskettu (teoreettinen) mg/l	Mitattu (rinnakk. ka) mg/l	Rinnakkaisten CV	Tarkkuus %RE
186,2	186,2	1,1 %	0,0 %	175,0	175,0	2,1 %	0,0 %
93,1	86,85	1,5 %	-6,7 %	87,48	92,55	1,3 %	5,8 %
46,55	43,6	2,3 %	-6,3 %	43,74	48,25	3,1 %	10,3 %
23,28	22,15	1,6 %	-4,8 %	21,87	23,8	0,6 %	8,8 %
CV% ja %RE:n tavoite: ≤ 20							
Valmistajan ilmoittama lineaarisuusalue 12,37-248,11 mg/l							

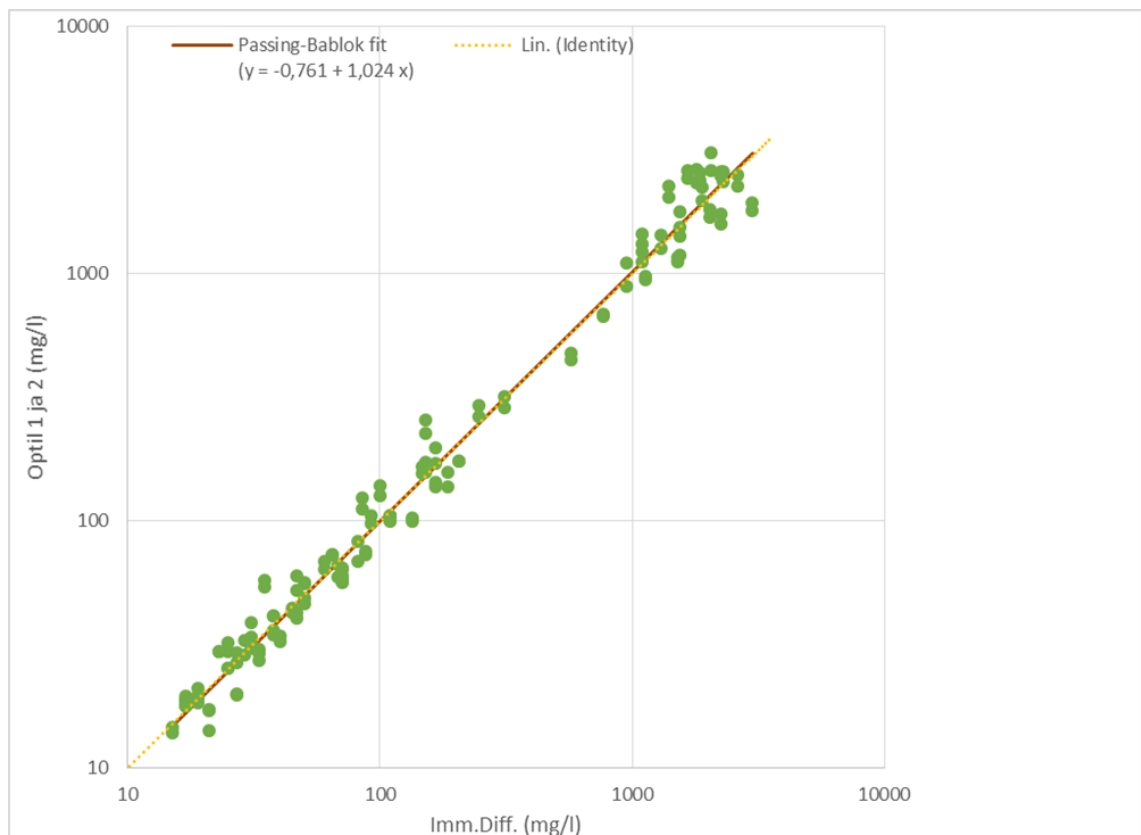
8.4 Tulostason vertailu potilasnäytteillä

Tulostasovertilu toteutettiin analysoimalla potilaiden seeruminäytteitä kahtena rinnakkaisena molemmilla Optilite-analysointilaitteilla ja vertaamalla näitä tuloksia radiaalisella immunodiffusiolla samasta näytteestä saatuihin tuloksiin. Vertailuun otettiin mukaan myös laitteen kokeilukäytön aikana tehdyt tulostasovertailut vuodelta 2017 (n=31). Optilite-analysointilaitteen ja vertailumenetelmän välistä riippuvuutta tutkittiin Pearsonin korrelaatiokertoimen ja selityssasteen avulla sekä graafisesti Passing-Bablok-regressioanalyysillä ja Bland-Altmanin analyysillä. Optilite-analysointilaitteella mitatut tulokset yhdistettiin menetelmävertailua varten. Näin on saatu keskimääräiset tulostasoverot käytössä olevaan menetelmään verrattuna. Taulukossa 7 on esitetty mittaustuloksista lasketut tilastoarvot sekä tässä työssä lasketut tilastoarvot yhdistettynä aikaisemmassa testauksessa pienemmällä näytemäärällä saatuihin tuloksiin. Optilite-analysointilaitteella saatujen tulosten keskiarvo oli 590,6 mg/l ja immunodiffusiolla 564,8 mg/l. Mittaustulosten välinen korrelaatio oli 0,949 ja selityssaste 0,901 ja Bland-Altmanin arvo on 1,1 %.

Taulukko 7. Yhteenveto IgD-menetelmän tulostaso vertailumittauksista (yhdistetty laitteiden 1 ja 2 tulokset).

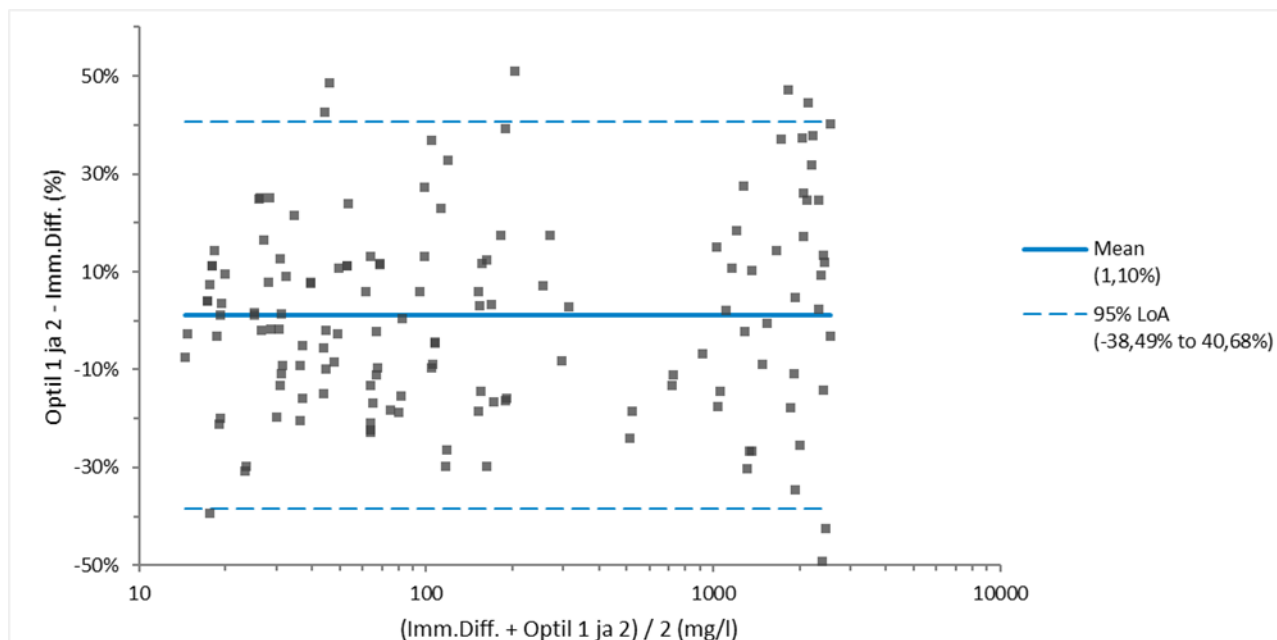
	Optilite 1 ja 2 (yhdistetty data)	Immunodiffuusio (Ref)	Optilite 1, 2 ja koestuslaite* (yhdistetty data)	Immunodiffuusio (Ref)
n	143		166	
keskiarvo	590,6	564,8	557,8	533,1
mediaani	99,8	92	89,2	85
min	13,9	15	13,9	14,7
max	3082,2	2990	3082,2	2990
R ² (Lin.Regr.)	0,901		0,904	
Passing-Bablok	Optil-1 ja 2 (mg/l) = - 0,761 + 1,024 Imm.Diff.(mg/l)		Optil-1,2, koestuslaite(mg/l) = - 0,1724 + 1,019x Imm.Diff.(mg/l)	
Bland-Altman	1,1 %		1,2 %	
95 % luottamus-väli	- 38,5 % - +40,7 %		- 38,7 % - +41,2 %	

Tulostason vertailumittaukset on myös esitetty graafisesti Passing-Bablok-kuvaajana (kuvio 1), joka kuvaa menetelmien välistä yhtenevyyttä. Passing-Bablok-regressiosuoran yhtälön avulla voidaan ennustaa y:n arvo, kun tiedetään x (taulukko 7).



Kuvio 1. Passing-Bablok -kuvaaja IgD-menetelmän tulostason vertailumittauksista Optilite vs. immuno-diffuusio.

Bland-Altmanin menetelmällä kuvataan kahden menetelmän keskimääräistä tulosta-soeroa. Tätä mallinnetaan Bland-Altmanin hajontakuviolla, jossa kahden mittaustuloksen erotus on y-akselilla ja keskiarvo x-akselilla (kuvio 2).



Kuvio 2. Bland-Altman – kuvaaja IgD-menetelmän tulostason vertailumittauksista Optilite vs. immunodiffuusio.

9 Tulosten tarkastelu

Optilite-analysaattorin IgD-menetelmän verifiointin tavoitteena oli selvittää, antaako menetelmä toistettavia ja vertailumenetelmän tulostasoon verrattavissa olevia tuloksia sekä sitä, onko kliinisesti perusteltua siirtyä nykyisestä menetelmästä uuteen menetelmään. Lisäksi selvitettiin Optilite-analysaattorilla kuluva työmäärä verrattuna käytössä olevaan immunodiffuusioon. Menetelmän verifiointiin sisältyi tutkimussuunnitelman laatiminen, mittausten suorittaminen, saatujen tulosten tilastolliset käsittelyt sekä tulosten arviointi ja raportointi. Tässä työssä testattavia verifiointiparametreja olivat toistettavuus, lineaarisuus ja kvantitointiraja lisäksi tarkasteltiin menetelmien välistä tulostaseroa.

Toistuvuus määritettiin tekemällä useita rinnakkaismäärytyksiä eri pitoisista näytteistä. Tässä työssä testattiin sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus sekä kokonaisvariaatio ja tuloksia tarkasteltiin keskihajonnan (SD) ja variaatiokertoimen (CV %) avulla. Sarjan sisäinen toistuvuus laskettiin potilasnäytteiden rinnakkaismäärytysten perusteella

ja variaatioprosentiksi saatiin toisella analysaattorilla 2,9 % ja toisella 4,5 %. Optilite-analysaattorin 1 osalta toistuvuus oli samaa tasoa kuin valmistajan ilmoittama spesifikaatio (2,1 %), mutta analysaattorin 2 osalta toistuvuus oli hieman huonompi. CV % nousee helposti, jos suuremmissa pitoisuuksissa tulosparien välillä on eroa. Jos Optilite 2-analysaattorin tuloksista poistetaan kaksi tulosparia, laskee variaatioprosentti 2,3 %.

Sarjojen välinen toistuvuus määritettiin mittaamalla matalan ja korkean tason kontrolleja. Matalan tason kontrollitulosten variaatioprosentiksi saatiin toisella analysaattorilla 7,1 % ja toisella 5,7 %, ja korkean tason kontrollitulosten variaatioprosenteiksi saatiin 6 % ja 2,9 %. Sarjojen välinen toistuvuus oli molemmilla analysaattoreilla huonompi kuin valmistajan ilmoittamat spesifikaatiot. Menetelmän kokonaisvariaatiot olivat 5,5–7,7 %. Sarjojen välinen toistuvuus ja kokonaisvariaatiot olivat molemmilla analysaattoreilla huonompia kuin valmistajan ilmoittamat spesifikaatiot. Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus sekä kokonaisvariaatio ovat hyväksyttävällä tasolla, vaikka saadut tulokset eivät yltäneet valmistajan ilmoittamalle tasolle.

Valmistajan ilmoittaman kvantitointirajan luotettavuutta arvioitiin määrittämällä toistuvuus mahdollisimman lähellä mittausalueen alarajaa olevasta potilasnäytteestä. Luotettavuutta arvioitiin variaatiokertoimen (CV %) avulla. Menetelmän toistuvuus mittausalarajan tuntumassa oli molemmilla analysaattoreilla alle 2 %, mikä on erinomainen tulos (taulukko 5). Valmistajan ilmoittaman kvantitointirajan voidaan todeta olevan luotettava.

Menetelmän lineaarisuutta varmennettiin laimennossarjan avulla. Mitattuja tuloksia verrattiin teoreettiseen tulokseen laskemalla tulosten välinen variaatiokerroin (CV %) ja mitatun arvon poikkeama teoreettisesta arvosta (RE %). Laimennossarjat jäivät molemmilla analysaattoreilla hieman vajaiksi, sillä ei löytynyt näytettä, josta laimennossarja olisi ulottunut lähemmäs mittausalarajaa (12,37 mg/l). Suppeiden laimennossarjojen perusteella voidaan todeta lineaarisuuden toteutuvan molemmilla analysaattoreilla hyvin (RE % < 20 %).

Tulostasovertilu toteutettiin analysoimalla potilasnäytteitä kahtena rinnakkaisena molemmilla analysaattoreilla ja vertaamalla näitä tuloksia vertailumenetelmällä samasta näytteistä saatuihin tuloksiin. Vertailumenetelmänä toimi HUSLABissa käytössä oleva radiaalinen immunodiffuusio. Mittaustulosten välinen korrelaatio oli 0,949 (R) ja selitysaste (R^2) oli 0,901. Tulosten välillä on voimakas positiivinen korrelaatio. Passing-

Bablok-lineaariregression kuvaaja ja yhtälö osoittavat menetelmien erinomaista yhtenevyyttä. Keskimääräistä tulostasoeroa (Bland-Altman) ei juuri ole, sillä Optilite-analyysaattorin IgD-menetelmällä saadaan keskimäärin vain 1,1 % korkeampia tuloksia immunodiffuusion verrattuna. Yksittäisissä näytteissä tulostasoero saattaa olla jopa lähes 50 %. Yksittäiset tasoerot voivat johtua eroavaisuuksista uuden menetelmän ja radiaalisen immunodiffuusion välillä. Immunodiffuusio on manuaalinen menetelmä ja tulokset arvioidaan visuaalisesti. Lisäksi menetelmät käyttävät eri vasta-aineita, mikä yksittäisten potilaiden kohdalla voi toimia eri tavalla.

Analyttisen laadun perusteella Optilite-analyysaattorin IgD-menetelmä voidaan ottaa käyttöön. Tulostasoero käytössä olevaan immunodiffuusion on keskimäärin pieni, mutta yksittäisten näytteiden kohdalla tulostasoero voi olla suuri, joten menetelmämuutoksesta tiedotetaan tutkimuksen tilaajille ja tilaajia kehoitetaan tutkimustiedotteessa aluksi normaalia tiheämpiin seurantamäärytyksiin.

9.1 Menetelmien käytettävyyden vertailu

Radiaalinen immunodiffuusio on manuaalinen menetelmä ja yhteen sarjaan kuluu aktiivista työaikaa noin 30 minuuttia. Sarjassa on keskimäärin 3-4 näytettä. Aikaa kuluu näytteiden käsin kirjaamiseen, aiempien mahdollisten IgD-tulosten tarkistamiseen ja laimennosten tekemiseen, jos potilaalla on aiempia korkeita positiivisia tuloksia sekä näytteiden pipetoimiseen RID-levylle. Tuloksien saaminen kestää vähintään neljä vuorokautta, jonka jälkeen visuaalinen tulkinta voidaan tehdä. Visuaalinen tulkinta sisältää muodostuneiden Ag-Ab-renkaiden tarkastelun ja mittaamisen, tulosten kirjaamisen ja syöttämisen potilastietojärjestelmään. Jos tulos on korkea, joudutaan näyte laimentamaan ja suorittamaan tutkimus alusta alkaen uudessa sarjassa.

Optilite-analyysaattori on täysautomaattinen ja sen käyttöönotto säästäisi työaikaa ja resursseja verrattaessa käytössä olevaan radiaaliseen immunodiffuusion. Analyysaattorin etuna on se, ettei automaattinen menetelmä sido työntekijää niin paljon kuin manuaalinen mittaaminen ja pitkälle viedyn automaation myötä tutkimukseen kuluva aktiivinen työaika vähentyisi. Analyysaattorin tärkeitä ominaisuuksia ovat muun muassa näytteiden, reagenssien ja kontrollien viivakooditunnistus sekä korkean pitoisuuden omaavan näytteen automaattinen laimennos. Optilite-analyysaattorilla näytteen valmisteluun ja ajon käynnistämiseen menee muutamia minuutteja ja yhden näytteen analysointiin kuluva aika on 8-

13 minuuttia, joten tulokset valmistuvat nopeasti samana päivänä. Tulokset myös siirtyvät automaattisesti potilastietojärjestelmään, josta ne hyväksytään joko automaattisesti tai manuaalisesti. Lisäksi automaattisen menetelmän käyttöön otolla voidaan minimoida virheen lähteitä, joita pipetointi ja tulosten visuaalinen tulkinta voi aiheuttaa.

9.2 Tulosten luotettavuuden arviointi

Onnistuneen tutkimuksen avulla saadaan luotettavia vastauksia tutkimuskysymyksiin. Tutkimuksen luotettavuutta voidaan kuvata kahdella käsitteellä, joista käytetään nimityksiä validiteetti ja reliabiliteetti. Validiteetilla tarkoitetaan tutkimuksen kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksessa oli tarkoituskin mitata. Validiteetissa on kyse tutkimuksen pätevyydestä ja siitä, onko se perusteellisesti tehty ja ovatko tehdyt johtopäätökset oikeita ja vastaavatko ne tutkimuskysymyksiin (Karjalainen 2010: 16). Tutkimuksen reliabiliteetti tarkoittaa tutkimuksen kykyä tuottaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Se ilmaisee, miten luotettavasti ja toistettavasti käytetty menetelmä mittaa haluttua ilmiötä. Reliabiliteettia voidaan arvioida esimerkiksi toistomittauksilla. Menetelmän reliabiliteetti on hyvä, jos eri mittauskerroilla saadaan samanlaisia tuloksia samasta aineistosta (Vilkkä 2007: 149).

Validiteettiin ja reliabiliteettiin vaikuttavat sekä systemaattiset että satunnaiset virheet. Systemaattiset virheet johtavat tuloksia harhaan ja heikentävät tutkimuksen validiteettia ja reliabiliteettia. Systemaattiset virheet johtuvat jostakin aineiston keräämiseen liittyvästä tekijästä, joka vaikuttaa koko aineistoon samansuuntaisesti. Systemaattiset virheet on pyrittävä löytämään ja korjaamaan. Puutteellinen reliabiliteetti johtuu usein satunnaisvirheistä. Satunnaisvirheitä aiheuttavat muun muassa erilaiset otanta-, mittaus- ja käsittelyvirheet (Heikkilä 2014: 177-178).

Verifioinnin onnistuminen pyrittiin varmistamaan perehtymällä huolellisesti analysaattorin käyttöön ja suunnittelemalla tutkimuksen kulku verifioinnin vastuuhenkilöiden kanssa. Verifioinnissa suoritettavat testit toteutettiin toimeksiantajan ohjeistuksella huolellisesti ja tarkasti. Saadut tulokset kirjattiin heti analysointipäivänä Excel-taulukoihin. Ennen jokaisesta näytesarjaa ja sarjojen lopuksi analysoitiin kontrollinäytteet, jotta voitiin varmistaa, että analyysit oli suoritettu onnistuneesti. Jos kontrollinäytteiden tulokset ovat annettujen rajojen sisällä, voidaan ajettujen näytteiden tuloksia pitää luotettavina. Luotettavuutta lisäsi myös työvaiheiden automatisointi. Optilite-analysaattorissa on viivakooditunnistus ja korkean analyttipitoisuuden sisältämät näytteet laimennetaan automaattisesti niin

pitkälle, että tulos saavutetaan. Reliabiliteettia pyrittiin takaamaan mittaamalla menetelmän toistuvuus ja vertaamalla saatuja tuloksia vertailumenetelmän tuloksiin. Reliabiliteettia lisäsi myös riittävä otoskoko sekä huolellinen dokumentaatio.

10 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Tutkimustyötä ohjaavat monet eettiset tekijät ja eettisesti hyvä tutkimus edellyttää, että tutkimuksen teossa noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Hyvään tieteelliseen käytäntöön sisältyy muun muassa rehelliset, huolelliset ja tarkat toimintatavat koko tutkimusprosessin ajan, eettiset tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmät sekä avoimuus tuloksia julkaistaessa. Toisen työn kunnioittaminen sekä tutkimuslupien hankkiminen kuuluvat myös hyvään tieteelliseen käytäntöön. Edellytyksenä tutkimuksessa tulee olla ihmisarvon kunnioittaminen. (Hirsijärvi 2009: 23–25). Kliinisen laboratorion eettisiin periaatteisiin kuuluu, että bioanalytikko sitoutuu noudattamaan salassapitovelvollisuutta ja laboratoriotutkimuksia varten hankitaan vain niiden suorittamisen kannalta välttämätön tieto, ei muuta. Kaikkea biologista näytemateriaalia tulee käsitellä näytteen luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017).

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin huomioimaan eettiset kysymykset ja toteuttamaan tutkimuseettisen neuvottelukunnan laatimaa hyvää tieteellistä käytäntöä. Opinnäytetyössä käytettiin jo aiemmin analysoituja ylijääneitä potilasnäytteitä, joilla ei ollut enää arvoa potilaan hoidon kannalta. Näytteitä käsiteltiin luottamuksellisesti potilaiden yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. Näytteitä tutkittiin anonymisti eikä potilastietoja tuotu julki tässä opinnäytetyössä. Opinnäytetyön toteuttamisessa ja kirjoittamisessa sekä saatuja tuloksia arvioitaessa on noudatettu rehellisyyttä ja huolellisuutta, tiedonhankinta opinnäytetyötä varten on ollut kriittistä ja lähteitä kunnioittavaa (Hirsijärvi ym. 2009: 23).

11 Pohdinta

Verifiointi on tärkeä osa menetelmän käyttöönottoa ja laboratorion laadunvarmistusta. Sen avulla varmistetaan, että uudella menetelmällä saadaan luotettavia ja toistettavia tuloksia laboratorion omissa käyttöolosuhteissa. Menetelmää verifioitaessa määritetään tapauskohtaisesti valittujen verifiointiparametrien arvot ja hyödyntämällä tilastollisia me-

netelmiä voidaan tunnistaa ne menetelmän kohdat, jotka ovat kriittisiä tuloksen luotettavuuden kannalta. Uusi menetelmä voidaan ottaa käyttöön vasta sen jälkeen, kun verifiointi on hyväksytty ja johtopäätökset on tehty. (Hägg 2016: 6-7.)

Tässä opinnäytetyössä verifioitiin Optilite-analysaattorin IgD-menetelmä. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka luotettavia ja toistettavia tuloksia Optilite-analysaattori antaa ja kuinka hyvin saadut tulokset täsmäävät vertailumenetelmän tulostasoa. Verifiointi toteutettiin määrittämällä arvot valituille verifiointiparametreille, jotka olivat toistuvuus, lineaarisuus, määrittämysraja ja tulostasovertilu. Tulokset analysoitiin tilastollisin menetelmin laskemalla niistä keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti sekä korrelaatiokerroin ja selitysaste. Numeerisen arvioinnin lisäksi tuloksia arvioitiin graafisesti. Numeerisen ja graafisen arvioinnin perusteella voidaan todeta Optilite-analysaattorin antavan luotettavia ja toistettavia tuloksia. Analyttisen laadun perusteella Optilite-analysaattorin IgD-menetelmä voidaan ottaa käyttöön. Laiteliitännän testauksen ja tutkimustiedotteen julkaisun jälkeen menetelmä otetaan käyttöön proteiinikemian yksikössä toukokuun 2019 aikana.

Opinnäytetyöprosessi oli kokonaisuudessaan opettavainen ja se kehitti tietojani ja taitojani kvantitatiivisen tutkimuksen alueella. Opin paljon uusia asioita sopivien teorialähteiden etsimisestä ja lähteiden kriittisestä arvioimisesta, aineistonkeruun suunnittelusta ja toteuttamisesta, aineistoin käsittelystä ja raportoinnista sekä aineistoon perustuvien päätelmien tekemisestä. Opinnäytetyön aihe oli mielestäni kiinnostava ja työtä tehdessä tietoni karttui etenkin validoinnin ja verifiointin osalta sekä vasta-ainevälitteisen immuniiteetin ja etenkin immunoglobuliini D:n ja siihen liittyvien sairauksien osalta. Myös englannin kielen taitoni ammattisanaston saralla kehittyi. Opinnäytetyön toteuttaminen alusta loppuun tuki ammatillista kehittymistäni ja sillä oli suuri merkitys tietämykseni syventämiselle ja tiedonhankintataitojeni kehittymiselle.

12 Lähdeluettelo

Arstila, Petteri. 2011. Soluvälitteinen immunitaetti. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Aryal Sagal. 2018. Immunoglobulin D (IgD) – Structure and Functions. Verkkodokumentti. Päivitetty 29.6.2018. <<https://microbenotes.com/immunoglobulin-d-igd-structure-and-functions/>>. Luettu 14.4.2019.

Bilić-Zulle L. 2011. Comparison of two methods: Passing and Bablok regression. Biochemia Medica. Julkaistu 15.2.2011. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/21/1/10.11613/BM.2011.010>>. Luettu 20.1.2019.

Giavarina, Davide. 2015. Understanding Bland Altman analysis. Biochemia Medica. Julkaistu 5.6.2015. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <<https://www.biochemia-medica.com/en/journal/25/2/10.11613/BM.2015.015>>. Luettu 20.1.2019.

Gutzeit, Cindy – Chen, Kang – Cerutti, Andrea. 2018. The enigmatic function of IgD: some answers at last. The European Journal of Immunology 48: 1101–1113. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201646547>>. Luettu 20.1.2019.

Ernvall, Reijo – Ernvall, Sirpa – Kaukkila, Hanna-Sisko. 1. painos. Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveysalalla. Helsinki: WSOY.

Erätuuli, Martti – Leino, Jarkko – Yliluoma, Pertti. 1994. Kvantitatiiviset analyysimenetelmät ihmistieteissä. Rauma: Kirjapaino Oy West Point.

Heikkilä, Tarja. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: Edita.

Hiltunen, Erkki – Linko, Linnéa – Hemminki, Sari – Hägg Margareta – Järvenpää, Eila – Simonen, Seppo – Kärhä, Petri. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Metrologian neuvottelukeskus. Espoo: Mittatekniikan keskus MIKES, Työ- ja elin-keinoministeriö TEM.

Hirsijärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Hämeenlinna: Kariston kirjapaino Oy.

Holopainen, Martti – Pulkkinen Pekka. 2008. Tilastolliset menetelmät. 5.-6. painos. Helsinki: WSOY oppimateriaalit Oy.

HUSLAB. Tutkimusohjekirja. 2017. Immunoglobuliini D, seerumista 1670 S-IgD. Verkkodokumentti: <<https://huslab.fi/ohjekirja/1670.html>>. Luettu 20.9.2018.

HUSLAB. 2017. Työohje. Kliininen mikrobiologia, Virologia ja immunologia, Infektioserologia. S-immunoglobuliini D, S-IgD.

Hyper-IgD-Syndrome. Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD). 2017. Verkkodokumentti: <<https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/2788/hyper-igd-syndrome>>. Luettu 15.1.2019.

Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnitteluopas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>. Luettu 1.3.2019.

Hänninen Arno. 2011. Immunologinen toleranssi. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka. 2018. Laboratorion analyysitekniikka. Kustannus Edita Publishing Oy.

Jokiranta, Sakari – Seppälä, Ilkka J.T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri. 2010. Tutkimus hoitotieteessä. 1.-2. painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Kantele, Anu – Kantele, Jussi M. – Arstila, Petteri. 2011. Immunologinen muisti. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Karjalainen, Leila. 2010. Tilastotieteen perusteet. 1. painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Meri, Seppo. 2011. Johdanto immunologiaan. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Modi, Jwalant – Kamal, Jeanne – Eter, Ahmad – El-Sayegh, Suzanne – El Charabaty, Elie. 2015. Immunoglobulin D Multiple Myeloma With Rapidly Progressing Renal Failure. *Journal of Clinical Medicine Research* 7(8): 653–655. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4471757/>>. Luettu 14.4.2019.

Mustjoki, Satu – Pettersson, Tom – Sinisalo, Marjatta – Vakkila, Jukka. 2015. Immunijärjestelmä. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.). 2010. Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Pandey, Shivlal– Kyle, Robert A. 2013. Unusual Myelomas: A Review of IgD and IgE Variants. Hematologic Malignancies, Oncology Journal. Volume: 27. Issue: 8. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <https://www.cancernetwork.com/hematologic-malignancies/unusual-myelomas-review-igd-and-ige-variants/page/0/1>. Luettu 15.1.2019.

Pettersson, Tom. 2011. Multippeli myelooma. Teoksessa: Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) Immunologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: 2014 Kustannus Oy Duodecim.

Remes, Kari. 2013. Multippeli myelooman luokittelu ja taudin kulku. Teoksessa: Joensuu, Heikki – Roberts Peter J. – Kellokumpu, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: 2013 Kustannus Oy Duodecim. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <http://www.oppoportti.fi/op/syt00654/do>. Luettu 29.9.2018.

Remes, Kari. 2013. Multippeli myelooman jaottelu, oireet ja löydökset. Teoksessa: Joensuu, Heikki – Roberts Peter J. – Kellokumpu, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: 2013 Kustannus Oy Duodecim. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: http://www.oppoportti.fi/op/syt00656/do?p_haku=multippeli%20myelooma#q=multippeli%20myelooma. Luettu 29.9.2018.

Sinisalo, Marjatta – Laine, Outi. 2018. Myelooma. Lääkärin käsikirja; 134: 2211–2212. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti: <<https://www-terveysportti-fi.ezproxy.metropolia.fi/xmedia/duo/duo14604.pdf>>. Luettu 13.4.2019.

Solunetti. 2006. Histologia. Vasta-aineet. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>>. Luettu 15.11.2018.

Vilkkä, Hanna. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

The Binding Site. 2014. Optilite IgD Kit -reagenssiohje.

The Binding Site. 2016. Optilite, optimised protein system. Käyttöopas.

Vladutiu, Adrian O. 2000. Immunoglobulin D: Properties, Measurement and Clinical Relevance. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7(2): 131–140. Luettavissa sähköisesti osoitteessa: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95839/>>. Luettu 20.9.2018.

