



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Mira Heikkilä

## Parodontiitin havaitseminen uudella Elisa DS2 -automaatilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

6.4.2020

Tekijä Otsikko	Mira Heikkilä Parodontiitin havaitseminen uudella Elisa DS2 -automaatilla
Sivumäärä Aika	52 sivua + 3 liitettä 6.4.2020
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tutkija Milla Pietiäinen Laboratoriokoordinaattori Anne Kivimäki Lehtori Carola Fortelius-Sarén
<p>Insinööriä tehtiin Helsingin yliopiston suu- ja leukasairauksien osastolla. Tutkimusryhmä tutkii suun tulehduksien ja niitä aiheuttavien bakteerien yhteyttä sydän- ja verisuonitautien sekä myös muiden yleissairauksien kehittymiseen. Työn tavoitteena oli automatisoida käytössä olevat käsin suoritettavat pipetointi menetelmät uudelle Elisa DS2 -automaatille sopiviksi. 96-kuoppalevyn kuopat on päällystetty yhdellä bakteerilla, mutta tavoitteena olisi päällystää levyt useammalla bakteerilla, esimerkiksi kolmella. Aikataulusyistä käytettiin vain yhtä bakteeria, joka on <i>Porphyromonous gingivalis</i> (Pg).</p> <p>Kokeellinen osio koostui seuraavista vaiheista: Elisa-levyn pipetointi käsin ja DS2-automaatin käyttöönotto. Elisa-testit aloitettiin käsinpipetointimenetelmällä. Levyjä valmistettiin yhteensä 10 kpl, joista IgG:tä oli 5 kpl ja IgA:ta oli 5 kpl. Automaatilla oli sama toteutustapa. Automaatille valmistettiin kaksi eri laimennossarjaa, joita vertailtiin automaatissa käytettävään laimennossarjaan, joka on sama kuin käsinpipetointimenetelmässä.</p> <p>Tuloksilla selvitettiin sopiva standardi automaatille, jotta pipetointi onnistuisi Pg-bakteerilevyillä samalla laimennostavalla. Sarja 3 oli lähempänä käsin-pipetointi-menetelmällä tehtyä laimennossarjaa kuin Sarja 4. Automaatilla saatiin samankaltaisia tuloksia verrattuna käsin pipetoituun Elisa-menetelmään. DS2-automaatti voidaan ottaa käyttöön Helsingin yliopiston suu- ja leukasairauksien osastolla.</p>	
Avainsanat	parodontiitti, sydän- ja verisuonitaudit, Elisa, IgG, IgA

Author Title	Mira Heikkilä Detection of periodontitis with the new Elisa DS2 -automat
Number of Pages Date	52 pages + 3 appendices 6 April 2020
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Milla Pietiäinen, a medical researcher Anne Kivimäki, laboratory coordinator Carola Fortelius-Sarén, Lecturer
<p>The thesis was done for the Department of Oral and Jaw Diseases at the University of Helsinki. The research team is studying the connection of oral infections and the bacteria that cause them with the development of cardiovascular disease and other common diseases. The aim of the thesis was to automate the manual pipetting methods used to fit the new Elisa automat. The wells of a 96-well plate are coated with one bacterium, but the goal would be to coat the plates with more bacteria, for example three. For scheduling reasons, only one bacterium, Porphyromonous gingivalis (Pg) was used.</p> <p>The experimental part consisted of the following steps: Manual pipetting of the Elisa plate and setting up the automat. Elisa tests were started by hand pipetting. A total of 10 plates were made, of which 5 were IgG and 5 were IgA. The automat had the same implementation. Two different dilution series were prepared for the automated machine and compared to the automated dilution series, which is the same as the manual pipetting method.</p> <p>The results determined the appropriate standard for the automat to allow pipetting to succeed on all bacterial plates in the same dilution. Series 3 was closer to the dilution series by hand pipetting than Series 4. The automat gave similar results to the hand pipetted Elisa method. The machine can be used at the Department of Oral and Jaw Diseases at the University of Helsinki.</p>	
Keywords	Periodontitis, Cardiovascular diseases, Elisa, IgG, IgA

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn tarkoitus, tavoitteet ja toteutus	3
3	Parodontiitti	4
3.1	Mikä on parodontiitti?	4
3.2	Parodontiitin hoitokeinot	5
3.3	Parodontiitin yhteys sydän- ja verisuonitauteihin	6
4	Suu	8
4.1	Hampaat	8
4.1.1	Hampaan rakenne	8
4.1.2	Hammasydin	8
4.2	Ien	9
4.2.1	Ientaskun muodostuminen	9
4.2.2	Immuunipuolustus ikenessä	10
4.3	Sylki	11
4.3.1	Sylkirauhaset	11
4.3.2	Syljen tehtävät	12
4.4	Seerumi	13
5	Elisa-menetelmä	14
5.1	Mikä on Elisa-menetelmä?	14
5.2	Elisa-menetelmän vaiheet	15
6	Materiaalit	16
6.1	Käytetyt aineet ja liuokset	16
6.1.1	Näytteet	16
6.1.2	Anti-human IgG ja IgA	17
6.1.3	Elisa-pesupuskuri	17
6.1.4	Substraattiliuos	17
6.1.5	Elisa Stop -liuos	18

6.1.6	Antibodypuskuri	18
6.2	Elisa-levyt	18
6.2.1	IgG-levy	18
6.2.2	IgA-levy	18
7	Manuaalisen Elisa-analyysin kuvaus	19
7.1	Näytteiden pipetointi	19
7.2	Detektio	20
7.3	Multiscan RC -laite	21
7.4	Elisa-levyissä tapahtuvat reaktiot lisättäessä eri liuoksia	22
8	DS2-automaatti	25
8.1	Testi-ajot ennen varsinaisen Elisa-testin suoritusta	25
8.2	Elisa-testi ohjelmien tekeminen	26
8.3	Elisa-testin suoritus	30
8.4	Automaatin osat ja niiden tehtävät	33
9	Tulokset	34
9.1	Levyn tulosten koostumus	34
9.2	Levyjen tulosten laskeminen	34
9.3	Manuaalisesti tehdyn Elisa-testin tulokset	35
9.4	Automaatilla tehdyn Elisa-testin tulokset	38
9.5	Automaatilla tehdyt Elisa-testit verrattuna käsin pipetoituihin Elisa-testeihin	43
10	Tulosten tarkastelu	45
10.1	IgG-levyn tulokset automaatilla ja manuaalisella menetelmällä	45
10.2	IgA-levyn tulokset automaatilla ja manuaalisella menetelmällä	46
11	Johtopäätökset ja jatkotoimenpiteet	48
	Lähteet	49
	Liitteet	
	Liite 1. Käsin pipetoidut Elisa-levyt	
	Liite 2. Automaatilla pipetoidut Elisa-levyt IgA	
	Liite 3. Automaatilla pipetoidut Elisa-levyt IgG	

## Lyhenteet ja käsitteet

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> on eksogeeninen (ulkosyntyinen) bakteeri, joka aiheuttaa infektoita. Gramnegatiivinen.
Baby	Kontrollinäyte, jossa on vähän vasta-aineita tutkittavia bakteereita vastaan. Näyte on kerätty napaverinäytteistä.
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay. Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i> on anaerobinen ja periodontaalinen patogeeni, joka liittyy ihmisten sairauksiin. Gramnegatiivinen.
IgA	Immunoglobuliini A vasta-aineita esiintyy eritteissä (mm. sylki), jotka suojaavat limakalvoja reagoimalla virusten, bakteerien ja toisten antigeenien kanssa.
IgG	Yleisin immunoglobuliinityyppi, joka sitoo komplementtia ja joka siirtyy sikiöön istukan läpi.
Pe	<i>Porphyromonas endodontalis</i> on anaerobinen gramnegatiivinen sauva.
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i> on gramnegatiivinen anaerobinen bakteeri.
Pi	<i>Prevotella intermedia</i> on anaerobinen gramnegatiivinen sauva.
TCC	Ihmisen terminaalisen komplementin kompleksi.
Tf	<i>Tannerella forsythia</i> on gramnegatiivinen anaerobinen organismi.
Wilma	Kontrolli on seeruminäyte, jossa on korkea pitoisuus vasta-aineita, jotka tunnistavat tutkittavia bakteereja.

## 1 Johdanto

Insinööriö tehtiin Helsingin yliopiston suu- ja leukasairauksien osastolla. Tutkimusryhmä tutkii suun tulehduksien ja niitä aiheuttavien bakteerien yhteyttä sydän- ja verisuonitautien sekä myös muiden yleissairauksien kehittymiseen. Työn arvo on seuraava: 1) Elisa-testi nopeutuu, 2) käytettäviä liuoksia ei mene hukkaan, 3) Elisa-testin tekemiseen ei tarvita niin suurta tilaa kuin aikaisemmin ja 4) automaatti suorittaa koko testin itsenäisesti.

Parodontiitti on hampaiden kiinnityskudosten tulehdus, joka johtaa hampaiden irtoamiseen ilman tarpeellista hoitoa. Eri bakteerit ja parodontiitille alttiiden ihmisten immuunipuolustus aiheuttavat yhdessä tulehduksen. Suu- ja leukasairauksien osastolla tehdyt aiemmat tutkimukset osoittivat, että parodontiitin sekä suun bakteerien ja niitä vastaan tuotettujen vasta-aineiden määrän on todettu olevan yhteydessä kohonneeseen riskiin sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin. [1].

Suu- ja leukasairauksien osastolla vasta-ainepitoisuuksien määrittäminen seerumista on yksi laboratorion perusmenetelmä. Tällä hetkellä on käytössä Elisa-assayt kuudelle eri bakteerille. Niillä voidaan mitata IgA ja IgG-luokan vasta-aineet, jotka tunnistavat seuraavia suun bakteereita: *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythia* (Tf), *Prevotella intermedia* (Pi), *Porphyromonas endodontalis* (Pe) sekä *Fusobacterium nucleatum* (Fn). Jokainen edellä mainittu bakteeri on gram-negatiivinen, joilla on yhteys parodontiitin muodostumiseen. Bakteerit ovat anaerobisia eli hapettomissa oloissa viihtyviä. Aa liittyy aggressiiviseen parodontiitiin. Pg sekä Tf liittyvät taudissa ilmenevään ientaskujen syventymiseen sekä ienverenvuotoon. Bakteerit Pg, Aa, Tf, Pi, Pe ja Fn vaikuttavat yhdessä parodontiitin kehittymiseen. Jotkin parodontiitin patogeeneit, esim. Pg, välttävät immuunijärjestelmän liittymällä endoteelisoluihin, makrofaageihin ja dendriittisoluihin. Bakteerit kulkeutuvat joko irtonaisina verenkierrosta tai valkosoluihin piiloutuneina valtimon seinämiin. Bakteereilla on valtimon seinämässä monia ateroskleroosia edistäviä vaikutuksia: 1) bakteerit lisäävät monosyyttien aktivointia, 2) endoteelisolujen adheesiomolekyylien tuotantoa, 3) LDL-lipoproteiinien hapettumista, 4) vaahtosolujen muodostumista verisuonten seinämissä, 5) sileiden lihassolujen proliferaatiota ja 6) endoteelisolujen apoptoosia. [1; 2; 3.]

Menetelmässä 96-kuoppalevyn kuoppien pohjat on päällystetty jollakin edellä mainituista bakteereista ja ennen päällystämistä bakteerit on tapettu. Levyn kuoppiin lisätään laimennettua seeruminäytettä. Jos näytteessä on kyseistä bakteeria vastaan tuotettuja vasta-aineita, ne tunnistavat ja sitoutuvat kuopan pohjalla oleviin bakteerin pintarakenteisiin. Sitoutuneen vasta-aineen määrä saadaan selville, kun ns. sekundaarinen vasta-aine, johon on liitetty peroksidaasientsyymi, sitoutuu bakteerin pintarakenteisiin tarttuneisiin ns. primaarivasta-ainemolekyyleihin. Peroksidaasientsyymi hapettaa näytteeseen lisätyn substraatin, jolloin syntyy värireaktio, jonka voimakkuutta voidaan mitata. Mitä enemmän näytteessä on mitattavaa vasta-ainetta, sitä voimakkaampi on värireaktio. [1.]

Immunologia tarkoittaa kehon puolustusjärjestelmää, joka suojaa elimistöä infektioilta. Vasta-ainevälitteisen immuniteetin hyödyntämisessä on kaksi eri luokkaa: passiivinen immunisaatio ja aktiivinen immunisaatio. Passiivisessa immunisaatiossa annetaan vasta-aineita yksilölle siten, että oma vasta-ainetuotanto ei ala. Aktiivisessa immunisaatiossa käynnistyy tiettyä antigeenia vastaan vasta-ainetuotanto, joka käynnistyy yksilössä itsessään. Vasta-ainevälitteinen immuniteetti kuuluu humoraaliseen immuniteettiin. Humoraalinen immuniteetissa leviää elimistön solunulkoinen nestefaasi. Immunglobuliinien (Ig) eli vasta-aineiden toiminta siirtyy vasta-ainevälitteisen immuniteetin avulla. B-imusolut eli B-lymfosyytit tuottavat vasta-aineita ja niitä kehittyä luuytimessä koko elämän ajan. Valmiilla B-solulla on antigeenille spesifisiä reseptoreita pinnallaan. Reseptoreista käytetään nimitystä B-solureseptori tai vasta-aineksi, joka on kiinni solukalvossa. [4, s.101, 134–135.]

Immunglobuliinien (Ig) yleinen rakenne on Y-kirjaimen muotoinen. Immunglobuliinimolekyylien perusrakenne ilmenee monomeerina eli molekyylinä. Proteiinerunkoon sisältyy hiilihydraattiosa. Runko-osassa on kaksi identtistä H-polypeptidiketjua (heavy eli raskas) ja kahdesta L-polypeptidiketjusta (light eli kevyt), jotka ovat identtisiä keskenään. Ig:tä valmistavat solut syntetisoivat H- ja L-ketjut erikseen ja kokoavat ketjut yhteen ennen kuin ne siirtyvät solun ulkopuolelle. H-ketjut ovat yhdessä kovalenttisilla kysteiiniaminohappojen muodostamalla rikkisillalla, ja muitakin sidoksia esiintyy. Molemmat L-ketjut liittyvät H-ketjuun epäkovalenteilla sidoksilla ja rikkisillalla. [4, s.102.]



## 2 Työn tarkoitus, tavoitteet ja toteutus

Työn tarkoituksena on saada korvattua käytössä olevat vanhat menetelmät. Insinööri-työssä otetaan käyttöön Dynexin DS2 Elisa -automaatti. Laite tekee kaikki työssä tarvittavat pipetoinnit sekä myös mittaa tulokset. Tutkimusta tehdään rinnan vanhalla menetelmällä eli käsin pipetoimalla ja uudella menetelmällä, DS2- automaatilla. [1.]

Tällä hetkellä käytössä on analyysejä, joissa kuoppalevyn kaikki kuopat on päällystetty samalla bakteerilla. Tutkittavista näytteistä on aina tehty kaksi eri laimennosta, ja ne on pipetoitu duplikaatteina. Samaa näytettä on neljässä eri kuopassa, ja tulos on laskettu neljän kuopan keskiarvona. Tällä pyritään vähentämään kuoppien välisten bakteeripäällystyksestä johtuvien erojen vaikutuksesta mittaustulokseen. Jokaisella levyllä on kaksi kontrollia, joiden avulla tulokset normalisoidaan. Kaikki pipetoinnit on tehty käsin. [1.]

Työ aloitetaan kolmella bakteerilla Pg, Pi ja Tf. 96-kuoppalevyt on päällystetty valmiiksi bakteereilla. Insinööriä on tarkoitus tehdä vanhalla menetelmällä (pipetointi käsin) ja uudella menetelmällä (DS2-automaatti). Aikataulusyistä työ tehtiin yhdellä bakteerilla, joka on *Porphyromonous gingivalis*. [1.]

Tavoite 1: Voidaanko saada vanhaan systeemiin verrattavia tuloksia käyttämällä yhtä laimennosta /näyte kohden? Tällä tavoin olisi mahdollista, että tulos voidaan laskea vain kahden kuopan keskiarvona. Lisäksi piti selvittää työn tarkoitukseen sopiva näytteen laimennos sekä myös, miten kuoppien väliset erot vaikuttavat saatuihin tuloksiin. Menetelmän etuna on reagenssien sekä tarvikkeiden säästäminen ja näyteaineistojen nopeampi analysointi. [1.]

Tavoite 2: Tällä hetkellä levyt on päällystetty vain yhdellä bakteerilla. Tavoitteena on, että levyt voitaisiin päällystää useammalla bakteerilla esim. kolmella. Levyt tulisi valmistaa huolellisesti. Analyysissä käytettävät protokollat tulisi optimoida kaikille levyillä oleville bakteereille optimaaliseksi. Menetelmän etuna on tutkittavien näytteiden sulatuskerrojen vähentäminen sekä tulosten tasaisuuden parantaminen. [1.]

### 3 Parodontiitti

#### 3.1 Mikä on parodontiitti?

Parodontiitti on iensairaus, joka ilmenee hampaiden kiinnityskudoksessa. Oireita ovat ikenien punoitus, turvotus ja verenvuoto ikenissä. Hampaiden irtoaminen on mahdollista, jos parodontiitin aiheuttamaa tulehdusta ei hoideta ajoissa. Taudin pidentyessä esiintyy hampaiden siirtymistä ja liikkuvuutta sekä märkävuotoa ientaskuista. Lisäoireina saattaa esiintyä pahanhajuista hengitystä ja suussa ilmenevää pahaa makua. Parodontiitti voi olla pitkään oireeton. Harvoin aiheutuu kipua. Tulehdus syntyy monien eri bakteerien sekä myös parodontiitille alttiiden henkilöiden immuunipuolustuksen yhteisvaikutuksesta. [1; 5.]

Parodontiitin aiheuttajabakteereita elää suun mikrobistossa normaalisti, vaikka kyseisellä henkilöllä ei ole todettu iensairautta. Bakteerit kiinnittyvät ikenen läheisyyteen, ientaskuun muodostuneeseen plakkiin ja hammaskiveen. Mikrobit käynnistävät tulehdusreaktion siellä, jonne ovat kiinnittyneet. Ienkudoksesta vapautuu tulehdusreaktion vuoksi monenlaisia tulehdusvälittäjäaineita. Kyseiset välittäjäaineet tuhoavat hampaan ympärillä olevaa pehmytkudosta sekä luuta. Kudostuho syventää ientaskuja, joiden hapetomissa olosuhteissa parodontiittia aiheuttavat bakteerit viihtyvät muodostaen kroonisen tulehduksen. [6.]

Iensairauden ilmenemiseen liittyy kaksi tekijää, jotka ovat 1) ientaskun bakteerikasvuston koostumus ja 2) elimistön vastustuskyky parodontiitin taudinaiheuttajabakteereille. Ientaskusta havaitaan tietyn tyyppisiä taudinaiheuttajabakteereita, vaikka parodontiitti ei olisikaan kehittynyt henkilölle. Samoja bakteereita esiintyy suun mikrobistossa henkilöillä, jotka eivät ole sairastuneet kyseiseen iensairauteen. On monia riskitekijöitä, jotka vaikuttavat parodontiitin muodostumiseen eivätkä bakteerit ole ainoita vaikuttajia. Geeniperimä vaikuttaa siihen, millainen vastustuskyky kyseisellä henkilöllä on. Huono vastustuskyky edesauttaa parodontiitin kehittymistä. [7.]

Suuret arvot seerumin IgA- ja IgG-tasojen periopatoogeneissa liittyvät parodontiittiin. Kroonisessa parodontiitissa esiintyy myös korkeita subgingivaalisia eli ikenenalaisia periopatogeenitasoja. Myös akuuttissa sepevaltimotaudissa esiintyy seerumin kohonneita

vasta-ainepitoisuuksia edellä mainituille patogeeneille. Yhteys sepelvaltimotaudin ja parodontiitin välillä selittyy osittain immunologisella vasteella. Infektiot, jotka ilmenevät suussa, ovat riski akuuteille sepelvaltimotaudin tapahtumille. [8.]

Korkeat ikenenalaisten bakteerien tasot sekä IgA- ja IgG-vasteen suuruudet olivat tunnusomaisia piirteitä potilailla, joilla oli aktiivinen parodontiitti. Parodontiittiin sairastumista edeltää vain ientulehdus. Ientulehdus etenee monimutkaisena vuorovaikutuksena parodontaalisten patogeeneiden ja isäntävasteen välillä herkillä yksilöillä. Parodontiitin aiheuttamat ikävät haittavaikutukset eivät ilmene ainoastaan suuontelossa. Vahingolliset vaikutukset ilmenevät bakteremiana, endotoksemiana sekä systeemisenä matala-asteisenä tulehduksena. [8.]

### 3.2 Parodontiitin hoitokeinot

Hammashoidon ammattilaiset määrittelevät taudin syyt ennen kuin tekevät varsinaisen hoitosuunnitelman. Hammaslääkäri tekee kliiniset sekä röntgenologiset tutkimukset. Ienten päälle ja alle kehittyneen plakin sekä hammaskiven poistaminen on ensimmäinen toimenpide, joka auttaa suurimmassa osassa tapauksia. Hyviä toimenpiteitä hammaskiven ja plakin poistamiseen ovat soodapesu, ultraäänilaite ja käsi-instrumentit. Parodontologisia kirurgisia toimenpiteitä suoritetaan silloin kun parodontiitti on krooninen tai pitkälle kehittynyt sairaus. [9.]

Parodontiitille herkistäviä tekijöitä on huono suuhygienia, tupakointi ja diabetes huonosti hoidettuna. Tupakoimattomuus on yksi tärkeimmistä toimista parodontiitin hoidossa sekä sen ehkäisyssä kaikenikäisillä potilailla. Suun bakteerien määrä ja laatu sekä hampaan kiinnityskudosten (parodontium) puolustuskyky vaikuttavat parodontiitin kehittymiseen ja etenemiseen. Ikävältä iensairaudelta vältytään, kun pidetään huolta suun, hampaiden ja hampaan kiinnityskudosten hyvinvoinnista. [3; 10.]

Tulehdusta aiheuttavaa parodontiittia voidaan ehkäistä hyvällä suuhygienialla: 1) hampaat tulisi harjata fluorihammastahnalla kahdesti päivässä, ja 2) hammasvälit on syytä puhdistaa päivittäin. Yksilöllisten tarpeiden mukaan valitaan puhdistusväline. 3) Hammaslääkärin vastaanotolla suun ja hampaiden tarkastuksessa tulisi käydä säännöllisesti

sekä myös ammattilaisen hampaiden puhdistuksessa. 4) Tupakoinnin lopettaminen ja savuttomuus edesauttavat suun terveyttä. [11; 12.]

Hoito toteutetaan niin, että biofilmiä, hammaskiveä sekä täyteylimääriä poistetaan suun hoidon ammattilaisen avulla. Parodontologisella hoidolla on parantavia vaikutuksia yleisterveyden kannalta. Potilaiden kuuluessa riskiryhmään on heidän pidettävä erityisen hyvää huolta suunsa terveydestä, jottei suu-infektioita kehity. [11; 12.]

### 3.3 Parodontiitin yhteys sydän- ja verisuonitauteihin

Parodontiitti iensairaus on riskitekijä sydän- ja verisuonitauteihin. Valtimonkovettumataudin eli ateroskleroosin ja iensairauden yhteydestä on paljon tehty tutkimusta. Vaikuttavia tekijöitä sairauksien kehittymiselle on potilaan tupakointi, ikä, sukupuoli, taloudellinen asema ja ylipaino. Potilaan tulehtuneiden ientaskujen kautta verenkiertoon kulkeutuu bakteerit sekä niiden eri osat. Parodontiittipatogeeni saa valtimon seinämistä valtimonkovettumatautia nopeuttavia vaikutuksia. Parodontiitti muodostaa systeemisen matalasteisen tulehduksen, joka vaikuttaa ateroskleroosin kehittymiseen. Parodontiitti muuttaa elimistön hormonaalista säätelyä ja veren rasva-ainetasoja. Geneettiset tekijät altistavat iensairaudelle sekä sydän- ja verisuonisairauksille. Parodontologisella hoidolla on mahdollista vaikuttaa riskitekijöihin. Hoito parantaa plasman inflammatoristen, trombotisten ja metabolisten markkereiden tasoja ja verisuonten endoteelista toimintaa. [3.]

Suun infektiot ovat yhteydessä sydän- ja verisuonisairauksiin mekanismeilla, jotka ovat joko suoria tai epäsuoria. Suoraan mekanismiin liitetään parodontiittibakteerien ja niiden virulenssitekijöiden vaikutukset verisuonten seinämiin. Iensairaus aiheuttaa lisäksi systeemisen tulehdustilan ja metabolisia muutoksia, jotka liittyvät epäsuoriin mekanismeihin. Tulehdusreaktio on merkittävä tekijä sairauksien ilmenemiselle, niin suun infektioidissa kuin sydän- ja verisuonisairauksissa. [3.]

Hampaiden kiinnityskudosten hyvinvointi vaikuttaa yleisterveyteen. Hoitamaton parodontiitti pitää yllä kehon tulehdustilaa, jonka takia verenkiertoon pääsee lisää bakteereita. Edellä mainituista syistä parodontiitti pahentaisi reumaattisia sairauksia ja lisää sydän- ja verisuonisairauksien sekä aivohalvauksen riskiä. Yhteys diabeteksen ja parodontiitin välillä on havaittu. Tekonivelleikkaus- ja sytostaattihoidopotilaille parodontiitti on

muodostunut merkittäväksi riskitekijäksi. Suun tulehduspesäkkeet on tärkeää hoitaa kuntoon ennen leikkauksia tai syöpähoitoja. [13.]

CRP on tulehduskoe, jossa mitataan C-reaktiivista proteiinia verestä. Parodontiittipotilailla esiintyy hsCRP-tason nousua, jota ilmenee myös sydän- ja verisuonitauteja sairastavilla. Proteiinin pitoisuus nousee veressä tulehdistilojen alkuvaiheessa hyvin nopeasti. [16] Henkilöt, joilla todettu parodontiitti hsCRP arvo oli 2,6 mg/l. Terveillä henkilöillä arvo oli 1,78 mg/l. Riski sairastua sepelvaltimotautiin, sydäninfarktiin tai aivoinfarktiin on pieni, kun hsCRP-arvo on alle 1,0 mg/l, keskitasoa hsCRP-arvoilla 1,0–3,0 mg/l ja suuri hsCRP-arvon ollessa yli 3,0 mg/l. Potilailla esiintyy matala-asteista tulehdusta, johon liittyy veren rasva-aineenvaihdunnan häiriöitä, kohonneet valkosolumäärät sekä myös kohonnut seerumin glukoosipitoisuus. [3.]

Parodontiitilla on vaikutusta tulehdustekijöihin, jotka ovat C-reaktiivinen proteiini, fibrinogeeni, leukosyytti ja tulehdusta aiheuttaviin sytokiineihin sekä lipoproteiiniprofiiliin. Kaikki edellä mainitut ovat yhteydessä sepelvaltimotaudin, sydäninfarktin ja aivohalvauksen kehittymiseen ihmisillä. Seerumin kasvaneet vasta-ainepitoisuudet Pg-bakteerille vaikuttavat sydäninfarktin ja aivohalvauksen saamiseen. Sydän- ja verisuonisairauksien yksi riskitekijöistä on lipopolysakkaridin pääsy verenkierron mukana elimistöön. [15.]

## 4 Suu

### 4.1 Hampaat

Aikuisella ihmisellä on yhteensä 32 hammasta viisaudenhampaat mukaan lukien. Hampaiden tärkein tehtävä on ruoan hienontaminen. Hampaat edesauttavat myös puheen tuottamista. [16.]

#### 4.1.1 Hampaan rakenne

Hammas koostuu näkyvästä osasta eli kruunusta ja ikenen alla olevasta juuresta. Kruunua peittää kova kiille, joka samalla suojaa hammasta. Kiille on kovaa ainesta, koska se muodostuu 95-prosenttisesti kivennäissuoloista. Kun pysyvät hampaat ovat puhjenneet, niistä on pidettävä erityisen hyvää huolta, koska vastapuhjenneet hampaat reikiintyvät hyvin helposti. Hampaiden kiille kovettuu lopullisesti suussa. Hammasluu eli dentiini sijaitsee kiilteen alla. Dentiinin väritys on tummempi kuin kiilteen väri. Juuri kiinnittyy leukaluuhun, joka on ikenen peitossa. Välihampaissa on ainoastaan yksi juuri. Kaksi juurta on yläneloshampaissa sekä alatakahampaissa. Kolme juurta esiintyy ainoastaan ylätakahampaissa. Juurisementti on ohut ja vaalea ja peittää hampaan juuren. Juuri on kiinnittynyt leukaluuhun kiinnityssäikeillä. [16; 17; 18.]

#### 4.1.2 Hammasydin

Hampaan sisällä sijaitsee hammasydin, joka ulottuu kruunusta juureen asti. Ytimessä on pieniä valtimoita, laskimoita sekä hermosäikeitä. Leuan verisuonten ja hammasjuurien kärjissä olevien aukkojen kautta kulkevat valtimot, laskimot ja hermosäikeet. Hammasydin muodostaa yhteyden kehon verenkiertoon ja hermoihin. Ravinteet ja happi kulkeutuvat hampaiden eri osiin ytimessä olevien verisuonten kautta. [16; 17.]

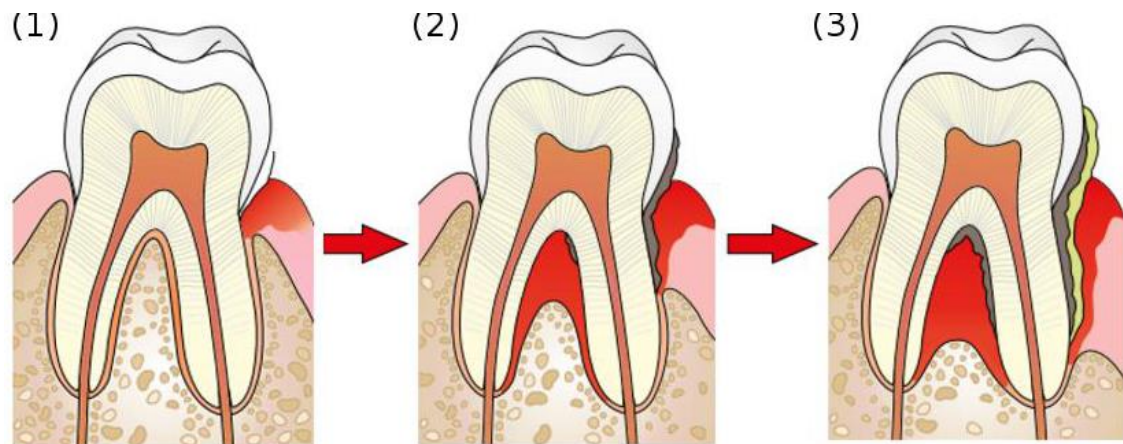
## 4.2 Ien

Hampaassa on kaulaosa, johon ien on kiinnittynyt. Ikenen tehtävänä on hampaiden kiinnityskudosten suojaaminen. Hyvinvoivat ikenet ovat kiinteät ja väritykseltään vaaleanpunaiset. Terveiden ienten tunnusmerkkeinä on ohuet reunat, jotka ovat hampaiden ympärillä tiukasti kiinnittyneinä. Hampaan ja ikenen muodostama liitos tuhoutuu suuhygienian laiminlyömisestä. Tällöin bakteerit pääsevät kasvamaan hampaan pinnan kautta ja muodostavat jokaiseen parodontiumin kudokseen leviävän tulehduksen, jota kutsutaan parodontiitiksi. Parodontium on hampaan vieruskudos. Kudokset, jotka kiinnittävät hampaita, tuhoutuvat, jonka vuoksi hampaan sekä ikenen väliin jää ientasku. Ientasku on tila, joka on otollinen bakteerien kasvulle. [19.]

### 4.2.1 Ientaskun muodostuminen

Kiinnityskudossairaudet ovat yleistyneet suomalaisilla. 76 %:lla miehistä, jotka ovat iältään 55–64-vuotiaita, esiintyy yli 4 mm:n syvyisiä ientaskuja. Naisilla syventyneitä ientaskuja on 63 %:lla. Infektiosairautena tunnettu parodontiitti pitää yllä aktiivista tulehdusreaktiota. Tulehduksen muodostaa mikrobikasvusto, joka on kehittynyt ienrajaan. Parodontiitti tuhoaa hitaasti hampaan kiinnityskudoksia, alveoliolua sekä kudossäikeitä, jotka kiinnittävät hampaita. Hampaissa olevat bakteeripeitteet koostuvat spesifisistä virulenteista patogeeneistä. Hampaat on puhdistettava säännöllisesti ja huolellisesti jotta ienrajaan ei muodostu bakteeripeitteitä. Bakteeripeitteet saavat aikaan ientulehduksen eli gingiviitin. [20.]

Ien kiinnittyy keratinisoitumattomalla epiteelillä hampaan pintaan. Liitosepiteeli on ensimmäinen puolustusmekanismi suun mikrobeja vastaan. Ientulehdus on hoidettava, koska muuten ien-hammasliitos pettää ja ikenen alle alkaa kasvamaan bakteeriplakkia. Näin kehittyy syventynyt ientasku hampaan ja ikenen välille. Syventyneet ientaskut tarjoavat ihanteelliset lisääntymisolosuhteet bakteereille, jotka tarvitsevat hapettomat olosuhteet siihen. Näin muodostuu biofilmi ienrajaan. Biofilmi vastustaa erilaisia puolustusmekanismeja, jotka elimistö on kehittänyt. [20.] Kuvassa 1 on kuvattu parodontiitin ja ientaskun muodostuminen.



Kuva 1. Parodontiitin eteneminen ja ientaskun muodostuminen. 1) Ien on tulehtunut, jonka vuoksi ikenen väri on muuttunut vaaleanpunaisesta punoittavaksi. Tulehtunut ien on aristava. Veren vuoto on myös mahdollista, jos ientä rasittaa mekaanisesti. 2) Hampaan ja ikenen väliin kehittyy syventynyt ientasku, kun ientulehdus etenee. 3) Tulehdus tuhoaa alveoliluuta, joka ympäröi hammasta. Hampaan kiinnityskudoksen vaurioituminen voi lopulta aiheuttaa hampaan irtoamisen. [21.]

#### 4.2.2 Immuunipuolustus ikenessä

Immuunipuolustuksen tärkeimmän osan muodostavat neutrofiilit leukosyytit, jotka tuhoavat taudinaiheuttajabakteereja. Leukosyytit eli valkosolut torjuvat elimistön tulehdustiloja. Enemmistö kehon valkosoluista on neutrofiileja. Veren valkosolumäärät kohoavat, koska keho nostaa valkosolujen tuotantoa bakteeritulehduksissa. Leukosytoosiksi kutsutaan tilaa, jossa valkosolujen määrä on suurentunut huomattavasti normaalista. Viivästynyt immuunivaste aloittaa taudinaiheuttajien tuhoamisen, jos taudinaiheuttajat eivät tuhoudu välittömän immuunivasteen toimesta. Viivästyneessä immuunivasteessa T-solut siirtyvät antigeenien luokse. Kyseisessä immuunivasteessa solulinjat alkavat tuottamaan sytokiineja. B-solut sekä plasmakolut ovat mukana viivästyneen immuunivasteen toiminnassa. [20; 22.]

Ikenet muodostavat proteaasia, jota elimistö tuottaa omana puolustusmekanisminaan kehoon. Elimistö rajoittaa tulehdustilaa erilaisilla puolustusmekanismeilla. Mekanismin ansiosta alkaa kaskadireaktio. Reaktiossa aineet, jotka ovat peräisin bakteereista sekä ienkudoksesta, alkavat aktivoimaan luuta hajottavia soluja. [20.]



### 4.3 Sylki

Sylki on suun nesteiden muodostama sekoitus. Sylki on vettä, joka koostuu epäorgaanisista suoloista, proteiineista sekä rasva-aineista. Sylki on suurten ja pienten sylkirauhasten tuottamaa limaista mukoosia ja juoksevampaa seroosia eritettä, ientaskunestettä, seerumia ja verisoluja, suun mikrobeja ja niiden tuotteita, keuhkoputkien eritteitä, jään-teitä ruuasta sekä hilseilleitä epiteelisoluja. Suun nesteen tehtävät ovat suojata suuta, ruuan käsittely sekä puheeseen liittyvät toimet. [23.]

Suussa on erinomainen puolustusjärjestelmä. Syljen virtaus ja syljessä olevat antimikrobiset aineet ovat tärkeä osa puolustusjärjestelmää. Antimikrobiset aineita ovat peroksi-daasit, lysosyymit, laktoferriini sekä vasta-aineet. Sylkirauhaset muodostavat IgA-vasta-aineita. Vasta-ainetyyppejä IgG ja IgM muodostuu ientaskunesteestä nestevirtauksen avulla sylkeen. [19.]

#### 4.3.1 Sylkirauhaset

Sylkeä erittyy eniten suurista sylkirauhasista, joita on kolme paria. Rauhasparit ovat korvasylkirauhaset (parotisrauhaset), leuanalussylkirauhaset (submandibulaarirauhaset) sekä kielenalussylkirauhaset (sublinguaalirauhaset). Suuret sylkirauhaset sijaitsevat korvan edessä (korvasylkirauhaset) ja suun pohjassa (leuanalus- ja kielenalussylkirauhaset). Sylkeä muodostuu vuorokaudessa noin 0,5–1 litraa sylkirauhasten tuottamana. Korvasylkirauhasessa muodostuu eniten sylkeä, joka on koostumukseltaan vesimäisen juoksevaa. Kyseinen rauhanen muodostaa eniten sylkeä ruokailun aikana. Kielenalusrauhasen valmistava sylki on erittäin paksua. [23; 24.]

Poskien limakalvoilla poskihampaan kohdalla avautuvat korvasylkirauhasten tiehyet. Kielen eteen avautuu kielen- ja leuanalussylkirauhasten tiehyet. Tiehye tarkoittaa sitä, että pienessä putkessa virtaa elimistöön eritettä tai jotain muuta nestettä. [25.] Kuvassa 2 on kuvattu sylkirauhasten sijainnit.



Kuva 2. Sylkirauhasten sijainti. 1. Korvasylkirauhanen, 2. Leuanalussylkirauhanen ja 3. Kielenalussylkirauhanen. [24.]

Enemmistö pieniä sylkirauhasia sijaitsee suulaessa sekä alahuulen sisäpinnoilla. Pieniä sylkirauhasia on kuitenkin kaikkialla suun limakalvoilla. Kielen-, leuanalus- ja pienet sylkirauhaset erittävät sylkeä koko ajan pitäen suun kosteana ja kielen liukkaana. Ainoastaan pienet sylkirauhaset tuottavat sylkeä yöllä, joten suu saattaa tuntua sen vuoksi aamulla kuivalta. Hampaat on syytä puhdistaa illalla, koska syljen muodostuminen on vähäistä yön aikana. Sylki ei huuhtele eikä kostuta suuta tarpeeksi yön aikana. Puhtain hampain nukkumaan mentäessä estetään hammas- ja iensairauksien mahdollinen eteneminen yön aikana. [23; 25.]

#### 4.3.2 Syljen tehtävät

Syljellä on monenlaisia tehtäviä suun hyvinvoinnin ylläpitämisessä. Syljessä olevien entsyymien avulla ruoka alkaa pilkkoutua suussa. Ruuan pureskelun aikana sylki liuottaa eri makuja ravintoaineista, joita kielessä olevat makunystyrät aistivat. Jos ihmisellä on kuiva suu, niin makujen havaitseminen heikkenee. Syljellä on tärkeä tehtävä ruuan pureskelussa sekä sen nielemisessä. Sylki huuhtoo suuta sekä samalla suojelee limakalvoja. Elimistön puolustukseen osallistuminen kuuluu syljen tehtäviin. Se hajottaa ruuan mukana tulleita bakteereita ja viruksia, jotka ovat haitallisia. Sylki estää virusten, bakteerien sekä muiden taudinaiheuttajien etenemisen elimistöön. [23.]

Suussa syljen muodostuminen on tärkeää monestakin syystä. Sylki kosteuttaa suuta, helpottaa puhumista, pureskelua sekä nielemistä. Syljen määrällä ja ominaisuuksilla on suuri merkitys limakalvojen sekä hampaiden terveyden hyvinvoinnin ylläpitämisessä. Limakalvoille kehittyy suojaava kerros. Jos suojakerrosta ei ole suuhun kehittyy haavaumia sekä kielessä ja limakalvoilla saattaa tuntua kirvelyä. Sylki suojaa hampaita reikiintymiseltä ja kulumiselta. Useita eri suoja-aineita esiintyy syljessä, jotka kehittävät luonnollisen suojan sekä puolustuksen ulkoisia ärsykejä, bakteereja ja viruksia vastaan. Jos syljen erityis vähenee, niin sen seurauksena ilmenee hampaiden reikiintymistä, ientulehdusta ja suun infektioiden riski suurenee. [26.]

#### 4.4 Seerumi

Seerumi on neste, joka muodostuu, kun verihyytymä eristetään verestä. Seerumi on verta, josta puuttuvat solut, fibrinogeeni sekä muita hyytymistekijöitä. Seerumi on veren osa, jossa ei ole soluja, koska veren hyytyessä punasolut erottuvat. Näyteputkessa oleva veri hyytyy nopeasti muutamissa minuuteissa. Putki sisältää verihyytymän ja seerumia, joka on väritykseltään kellertävää. Verihyytymä on muodostunut punertavista soluista. Plasman ja seerumin ero on se, että seerumista puuttuu hyytymistekijöitä. Seerumin merkkiaineita hyödynnetään sepelvaltimokohtauksen, sydän- ja verisuonisairauksien sekä aivoinfarktin havaitsemisessa potilaalla. Tupakointi heikensi seerumin merkkiaineiden arvoja. Merkkiaineisiin vaikuttivat tupakoinnin määrä, kesto ja aika tupakoinnin lopettamisesta kokonaan. [27; 28.]

Veren koostumuksen selvittämisen helpottamiseksi näyte on sentrifugoitava ensin. Ennen sentrifugointia vereen lisätään hyytymisenestoainetta. Veri säilyy tasaisena nesteenä, kun hyytymisenestoainetta on lisätty, jottei veri hyydy näyteputkessa. Näyteputken pohjaan laskeutuu painavat verisolut, kun näytettä pyöritetään kovalla vauhdilla sentrifugissa. Näyteputkessa on kaksi kerrosta, joissa on vaaleankellertävää nestettä sekä punaista nestettä. [28.]

Veressä on entuudestaan tunnettuja biomarkkereita, joita havaitaan verinäytteistä. Biomarkkerit ovat eliöitä, molekyyliä tai fysikaalisia ilmiöitä, jotka kuvaavat jotakin tilaa, esimerkiksi sairautta. Verinäytteistä löydetään eri sairauksien välisiä yhteyksiä ja erilaisten molekyylien muutoksia. [28.]

## 5 Elisa-menetelmä

### 5.1 Mikä on Elisa-menetelmä?

Enzyme-linked immunosorbent assay on immunologinen menetelmä, jossa vasta-aineita kiinnitetään kiinteään pintaan, esimerkiksi Elisa-kuoppalevyyn. Kiinteään pintaan kiinnitetään vasta-aine tai antigeeni. Entsyymileima on laitettu vasta-aineeseen tai antigeeniin. Reaktiotuote saadaan, kun substraatti reagoi vasta-aineen ja antigeenin kanssa. Substraatin ja entsyymien reagoitessa keskenään muodostuu värireaktio, joka mitataan spektrofotometrillä. Värireaktion avulla saadaan selville analyytin määrä kyseisessä testissä. Immunologisissa menetelmissä järjestys milloin mikäkin vasta-aine lisätään, vaihtelee tehdyissä kokeissa. Potilasnäytteissä oleva antigeeni kilpailee vasta-aineiden sitoutumispaikoista samanlaisen antigeenin kanssa. Antigeenien eroina on se, että toinen on entsyymileimattu ja toinen ei. [29; 31.]

Elisa on laajasti käytetty, herkkä sekä helppokäyttöinen testi menetelmä, jota käytetään antigeenien kvalitatiiviseen tai kvantitatiiviseen määrittämiseen. Kvalitatiivisessa analyysissä määritetään, mistä tuntematon aine koostuu. Kvantitatiivisessa analyysissä tutkitaan prosentuaalinen koostumus näytteessä. [21; 30; 31.]

Elisa-menetelmää käytetään periodontaalisten patogeenien vasta-aineiden mittaamiseen laajoissa epidemiologisissa tutkimuksissa periodontiitin roolin arvioimiseksi muiden sairauksien riskitekijänä. Parodontiittia seuraa systeeminen vasta-ainevaste parodontaalisia patogeeneja vastaan. Kyseiset patogeenit voidaan mitata immunomäärityksellä. Periodontiitin havaitseminen mahdollisena riskitekijänä erilaisille sairauksille havaitaan, kun periodontaalin patogeenien vasta-aineen tasot seerumissa nousevat. Vasta-aineet ovat usein käytettyjä markkereita periodontaaliseen infektiin sekä muihin yleisiin virus- ja bakteeri-infektioihin. [31.]

Elisa-menetelmällä kyetään mittaamaan seerumin IgG-luokan vasta-ainevasteita *A. actinomycetemcomitans* ja *P. gingivalis* -bakteerien suhteen. Antigeeneinä voidaan käyttää patogeenien useita serotyyppejä seoksina. Immunomääritystä käytetään parodontiitin serologisena merkkiaineena laajoissa tutkimuksissa. Tutkimuksissa ei ole kliinistä tai radiografista tietoa potilaiden parodontiittitilasta. [31.]

## 5.2 Elisa-menetelmän vaiheet

Elisa, jossa käytetään kaksoisvasta-ainetekniikkaa, on eniten käytetty Elisa menetelmä. Kuoppalevyn pohjaan on kiinnittynyt jokin tunnettu vasta-aine. Alustan on oltava kiinteä, johon vasta-aine kiinnittyy. Levylle lisätään tutkittavat näytteet. Inkuboinnin aikana haluttu antigeeni kiinnittyy levyn pohjaan kiinnittyneeseen vasta-aineeseen. Inkubointiajat vaihtelevat, joten on hyvä tarkistaa ohjeista, kuinka kauan inkubointi kestää suoritettavassa testissä. [29; 31.]

Antigeeni on sitoutunut vasta-aineeseen. Levylle suoritetaan Elisa-pesu. Pesukertojen määrä vaihtelee, mutta kyseisessä testissä pesu tapahtuu kolme kertaa. Pesun avulla levytä poistuu kaikki aineet, jotka eivät sitoutuneet mihinkään. Viimeisen pesun jälkeen levylle laitetaan sekundaarinen vasta-aine, joka kiinnittyy antigeeniin inkuboinnin aikana. [29; 31.]

Inkuboitumisen jälkeen levyn kuoppiin lisätään substraattiliuos. Ennen substraattiliuoksen lisäystä suoritetaan Elisa-pesu kolme kertaa. Värireaktio syntyy, kun substraatti ja entsyymi reagoivat keskenään. Levy laitetaan inkuboitumaan folion alle pimeään, jotta substraatti ei reagoi valon kanssa. Lopuksi levylle lisätään stop-liuos substraatin lisäksi. Levyn tulokset mitataan spektrofotometrillä. Tulokset on mitattava puolen tunnin kuluessa stop-liuoksen lisäyksen jälkeen. [29; 31.]

## 6 Materiaalit

### 6.1 Käytetyt aineet ja liuokset

#### 6.1.1 Näytteet

Näytteitä on yhteensä 8 kpl. Kontrollinäytteitä eli Wilmaa ja Babyä on 2 kpl. Wilma-kontrolli on seeruminäyte, jossa on korkea pitoisuus vasta-aineita, jotka tunnistavat tutkittavia bakteereita. Babyssä on vähän vasta-aineita tutkittavia bakteereita vastaan. Baby-kontrolli on kerätty napaverinäytteistä. Vasta-aineita eli IgA ja IgG on 2 kpl. Näytteet on numeroitu 4, 11, 32, 40, 75, 79, 87 ja 105. Kontrollit koostuvat Wilmasta ja Babystä. Eppendorffputkiin laitettiin valmiiksi 30 µl näytettä sekä Wilma ja Baby näytettä, jokainen omaan eppendorffputkeen. Muita aineita ei lisätty. Putki sisälsi ainoastaan näytettä, Wilmaa tai Babyä. Näytteistä valmistettiin 10 sarjoja, jotka numeroitiin seuraavasti A, B, C, D, E, F, G, H, I ja J. Käsien pipetoitavat sarjat ovat A, B, C, D ja E. Automaatilla tehtävät sarjat ovat F, G, H, I ja J. Jokaisesta sarjasta valmistettiin kaksi eri levyä IgG ja IgA.

Valmiit näytteet laitetaan pakastimeen, jonka lämpötila on – 80 °C. Näytteet jaettiin 10 sarjaan, koska näin vältetään näytteiden liialta sulattamiselta. Näytteet on kaikki sulatettu yhtä monta kertaa.

Tutkittava näyte koostui seerumista. Näyte laimennettiin antibodypuskuriin. Seerumia käytettiin 14 µl ja antibodypuskuriä 1 385 µl. Näyteputkina käytettiin 1,5 ml:n eppendorffputkia. Putkien nesteseokset sekoitettiin sentrifugissa aina pipetoinnin jälkeen, jotta näytteet sekoittuvat toisiinsa. [32.]

Wilma ja Baby ovat kontrolleja, jotka on nimetty edellä mainitulla tavalla. Wilma ja Baby laimennetaan antibodypuskuriin, mutta ne laitetaan eri eppendorffputkiin. Kontrolleilla on oma tehtävänsä Elisa-testissä. Kontrollia käytettiin 14 µl ja antibodypuskuriä 1 385 µl.

### 6.1.2 Anti-human IgG ja IgA

Vasta-aineet ovat IgG ja IgA. Vasta-aineita laitettiin putkeen 3 µl. Vasta-aineita valmistettiin 10:n sarjoihin, jotka numeroitiin seuraavasti A, B, C, D, E, F, G, H, I ja J. Jokaiseen sarjaan tuli sekä IgG ja IgA vasta-ainetta sisältävä eppendorffputki. Vasta-aineet ovat Sigmaalta. IgA on Goat Anti-Human IgA Antibody, HRP conjugate, Sigma-Aldrich. IgG on Goat Anti-Human IgG Antibody, HRP conjugate, Sigma-Aldrich.

Aineet ovat vasta-aineita, joita käytetään eri levyille. IgA-levylle tulee IgA-vasta-ainetta. IgG-levylle laitetaan IgG-vasta-ainetta. Anti-human IgG ja IgA laimennettiin antibodypuskuriin. Laimennussuhde on 1:30 000. Molempia vasta-aineita laitettiin omiin putkiinsa 0,4 µl ja antibodypuskuriä 12 ml. IgG-vasta-aineella on pitkäaikainen vaikutus kehossa. IgG viittaa siihen, että immunologinen vaste tietylle patogeenille on kohdattu jossakin elämän vaiheessa. IgA-vasta-aineella on lyhytaikainen vaikutus. Kun IgA:n arvot ovat koholla, se kertoo toistuvasta tai hiljattain tapahtuneesta altistuksesta patogeenille. [32; 33.]

### 6.1.3 Elisa-pesupuskuri

Pesupuskurin valmistukseen käytettiin yksi litra ionivaihdettua vettä, johon oli sekoitettu yksi Phosphate-buffered saline -tabletti (PBS) sekä Tween 20, 500 µl. PBS:n tuotenumero on 09-9400-100 ja valmistaja on Sigma Life Science. Elisa-pesupuskuria valmistettiin yhden litran pulloihin. Automaatin pesupuskurisäiliöön meni yksi litra, joten liuosta tehtiin kolme litraa. [32.]

### 6.1.4 Substraattiliuos

Substraattiliuos sisältää ionivaihdettua vettä 22 ml, yhden OPD-tabletin ja yhden Urea hydrogen peroxidase -tabletin. Tabletit ovat Sigma Life Sciencen valmistamia ja tuotenumero on 1002272750 P9187-50SET. Putki laitetaan ravistelijalle, jotta tabletit liukenevat kokonaan ionivaihdettuun veteen. Jos tabletit eivät ole lienneet veteen, niin pitää vain odottaa, että ne ovat lienneet täysin. Liuosta ei voi käyttää, jos tabletit eivät ole lienneet. Substraattiliuos on käytettävä 30 minuutin sisällä valmistamisesta, koska muuten liuos menettää tehonsa. [32.]

### 6.1.5 Elisa Stop -liuos

Elisa Stop -liuos sisältää 300 ml ionivaihdettua vettä ja 100 ml väkevää vetykloridia (HCl). [32].

### 6.1.6 Antibodypuskuri

Puskuri sisältää Bovine serum albumin -jauhetta (BSA) (5 g), ionivaihdettua vettä (1 l), PBS-tabletin (1 kpl) ja Tween 20:tä (500 µl). BSA-tablettien tuotenumero on 1002243204 ja valmistaja on Sigma Life Science. Antibodypuskuriä valmistettiin yhden litran verran. Jos puskuria valmistaisi ylimäärin, niin pulloon alkaa muodostua kasvustoa, kun neste ei ole käytössä. Pulloa oli aina syytä tarkastella, jotta kasvustoa ei ole muodostunut. [32.]

## 6.2 Elisa-levyt

### 6.2.1 IgG-levy

Levyn pohjalle on lisätty *Porphyromonous gingivalis* -bakteeri. Pg-bakteerit on tapettu ennen kuin ne on päällystetty kuoppalevyn kuoppiin. Elisa-levy on 96-kuoppalevy. IgG-vasta-aineella on pitkäaikainen vaikutus kehossa. IgG-levylle laitetaan vasta-aine anti-human IgG. Levyjä säilytetään -80 °C:n pakastimessa. [1; 33.]

### 6.2.2 IgA-levy

Levyn pohjalle on lisätty *Porphyromonous gingivalis* -bakteeri. Pg-bakteeri on tapettu ennen kuin ne on päällystetty kuoppalevyn kuoppiin. Elisa-levy on 96-kuoppalevy. IgA-vasta-aineella on lyhytaikainen vaikutus kehossa. IgA-levylle laitetaan vasta-aine anti-human IgA. Levyjä säilytetään -80 °C:een pakastimessa. [1; 33.]



## 7 Manuaalisen Elisa-analyysin kuvaus

### 7.1 Näytteiden pipetointi

Näytteet laimennetaan antibodypuskuriin eppendorffputkissa. Laimennos on 1:100. Näytteet pipetoidaan rinnakkaisina ja laimennokset tehdään suoraan levyille. Laimennokset ovat erilaisia eri bakteereilla. Pg-bakteeri ja IgG-vasta-ainelevyllä laimennos on 1:100 ja 1:200. Pg-bakteeri ja IgA-vasta-ainelevyllä on 1:100 ja 1:200. Merkkiaineliuos tunnistaa vasta-aineet näytteistä. [32.]

Näytteet pipetoidaan pipetointikartan suunnitelman mukaisesti. Pipetoinnin jälkeen levy peitetään kannella tai foliolla. Levyä inkuboidaan huoneenlämmössä 2 tunnin ajan. Näytteitä ja standardeja inkuboidaan levyn kuopissa, jotka on päällystetty vasta-aineella eli bakteerilla. Elisa-analyysin avulla tunnistetaan Pg-bakteeria vastaan tuotettuja vasta-aineita. [32.] Taulukossa 1 on esitelty pipetointijärjestys Elisa-levyille IgG ja IgA.

Taulukko 1. Pipetointikaavio. Riveille B, D, F ja H laitetaan antibodypuskuria 50 µl. Näytteet, Wilma ja Baby tulevat riveille A, C, E ja G 150 µl. Blank, joka sisältää antibodypuskuria lisätään sarakkeiden 5, 6, 11 ja 12 kuoppiin riveille E ja G yhteensä 150 µl. Riveiltä A, C, E ja G siirretään 50 µl laimennettua seerumia riveille B, D, F ja H. Yhdessä kaivossa on 100 µl nestettä pipetoinnin päätyttyä.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	4	75	75	Wilma	Wilma	4	4	75	75	Wilma	Wilma
B	laim. 4	laim. 4	laim. 75	laim. 75	laim. Wilma	laim. Wilma	laim. 4	laim. 4	laim. 75	laim. 75	laim. Wilma	laim. Wilma
C	11	11	79	79	Baby	Baby	11	11	79	79	Baby	Baby
D	laim. 11	laim. 11	laim. 79	laim. 79	laim. Baby	laim. Baby	laim. 11	laim. 11	laim. 79	laim. 79	laim. Baby	laim. Baby
E	32	32	87	87	Blank	Blank	32	32	87	87	Blank	Blank
F	laim. 32	laim. 32	laim. 87	laim. 87	Blank	Blank	laim. 32	laim. 32	laim. 87	laim. 87	Blank	Blank
G	40	40	105	105	Blank	Blank	40	40	105	105	Blank	Blank
H	laim. 40	laim. 40	laim. 105	laim. 105	Blank	Blank	laim. 40	laim. 40	laim. 105	laim. 105	Blank	Blank

Inkuboinnin jälkeen levyt pestään 3 kertaa Elisa-pesupuskurilla. Pesujen välissä kuopat taputellaan tyhjiksi imupaperille. Elisa-pesupuskurilla suoritetaan pesu 3 kertaa. Levy tyhjennetään aluksi pesuastiaan. Pesuastian yläpuolella heilutellaan levyä napakoilla ranteen heilutuksilla. Pesupuskuria laitetaan Elisa-levyn jokaisen kaivon 200 µl. [32.]

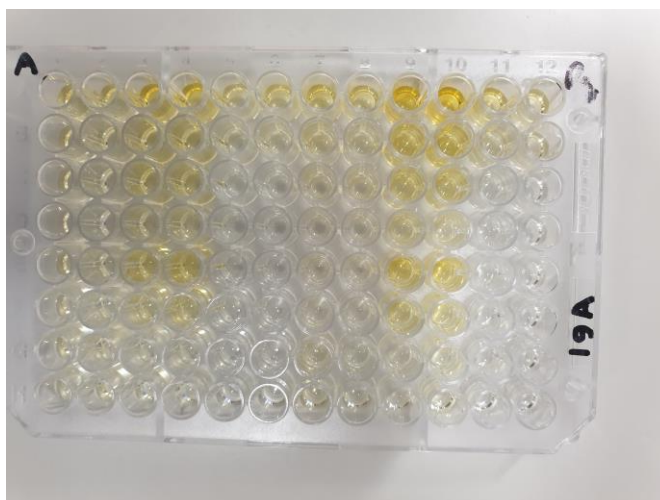
## 7.2 Detektio

Anti-human IgG sekä myös Anti-human IgA laimennetaan antibodypuskuriin. Laimennokset valmistetaan eppendorffputkiin. Molemmille IgG:lle sekä IgA:lle tehdään omat putket. IgG:n laimennos sisältää antibodypuskuria ja IgG-vasta-ainetta. IgA:n laimennos taas sisältää antibodypuskuria ja IgA-vasta-ainetta. [32.]

IgG-levylle pipetoidaan 100 µl anti-human IgG:tä jokaiseen Elisa-levyn kaivoon. IgA-levylle pipetoidaan 100 µl anti-human IgA:ta kaivoihin. Levyjä inkuboidaan huoneenlämmössä 1 h verran. Inkuboinnin jälkeen levyt pestään 3 kertaa Elisa-pesupuskurilla. Pesujen välissä kuopat taputellaan tyhjiksi paperille. [32.]

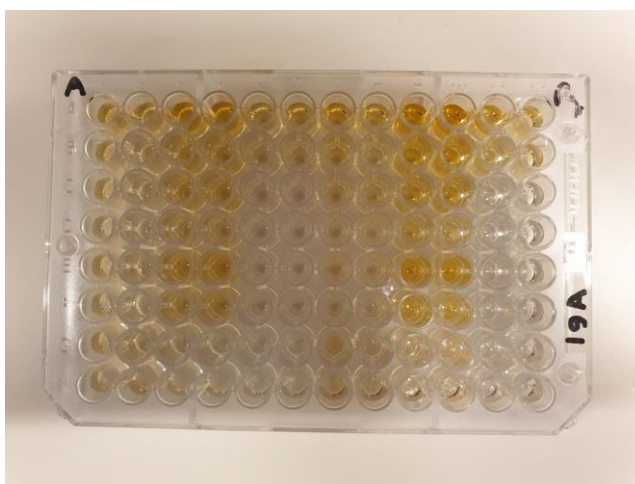
Substraattiliuos valmistetaan ennen Elisa-pesuja, jotta liuos on valmiina käytettäväksi. Liuotetaan 1 OPD-tabletti ja 1 Urea hydrogen peroxidase -tabletti tislattuun veteen. Falcon-putken ympärille on laitettava folio, sillä putkessa olevat aineet ovat hyvin valoherkkiä. Jotta tabletit liukenevat tislattuun veteen, niin putki laitetaan ravistelijaan. Tablettien pitää olla täysin liuenneet, jotta substraattiliuosta voi käyttää. Liuos tulee käyttää puolen tunnin aikana sen valmistamisesta. Substraattiliuos muuttuu kellertäväksi. [32.]

Substraattiliuosta lisätään jokaiseen Elisa-levyn kaivoon 100 µl. Levyä inkuboidaan huoneenlämmössä 45 minuutin ajan. Levyn päälle laitetaan folio. Inkubaatio tehdään pimeässä, mutta folion päälle laittaminen riittää, koska folio ei läpäise valoa. Substraattiliuos on erittäin valoherkkä. [32.] Kuvassa 3 on lisätty substraattiliuos Elisa-levylle.



Kuva 3. Levylle lisätty substraattiliuos. Substraattiliuos aiheuttaa levyn kuoppiin keltaisen värin, koska substraatti ja entsyymi reagoivat keskenään. Määrityksessä käytetään hyödyksi peroksidaasin taitoa hapettaa substraattia.

45 minuutin kuluttua pysäytetään levyn kuoppien reaktiot lisäämällä Elisa-stopliuosta levyn kaivoihin 50 µl. Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen on 30 minuuttia aikaa mitata Multiscan RC-laitteella tulokset Elisa-levyltä. Entsyymireaktio pysäytetään lisäämällä Elisa Stop -liuosta, joka sisältää väkevää vetykloridia eli HCl:ää. [32.] Kuvassa 4 on lisätty Elisa stop -liuos Elisa-levylle.



Kuva 4. Levylle lisätty Elisa stop -liuos. Stop-liuos hapettaa näytteeseen lisätyn substraatin, jonka takia värireaktio levyllä muodostuu. Stop-liuos pysäyttää substraattiliuoksen reaktion. Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen kuopan värit muuttuvat oranssiksi.

### 7.3 Multiscan RC -laite

Mittaus tapahtuu absorbanssilla 490 nm. Laite on Viktor™ X4, jonka malli on 2030 Multilabel Reader. Laitetta valmistaa Perkin Elmer. Absorbanssi 490 nm:ssä mitataan spektrofotometrillä. Elisa-analysillä määritetään Pg-bakteeria vastaan tuotettuja vasta-aineita. [32] Elisa-levy laitetaan laitteeseen, jonka jälkeen valitaan absorbanssi 490 nm. Painetaan Start-painiketta ja mittaus käynnistyy. Saadut tulokset tallennetaan muistitikulle.

#### 7.4 Elisa-levyssä tapahtuvat reaktiot lisättäessä eri liuoksia

*Bakteeri levyn pohjassa:* Kuoppalevyn pohjassa on vasta-aine, joka tunnetaan. Pohjassa oleva bakteeri on lajiltaan *Porphyromonous gingivalis*, joka toimii vasta-aineena. Vasta-aine kiinnittyy ainoastaan kiinteään alustaan. Elisa-testissä antigeeni on laimennettu seeruminäyte, joka sisältää seerumia ja antibodypuskuria. Inkuboinnin aikana haluttu antigeeni kiinnittyy vasta-aineeseen, joka on levyn pohjalla. Kun antigeeni on sitoutunut, niin suoritetaan Elisa-pesu. [29; 33.]

Kuoppaan kiinnitetyt vasta-aineet helpottavat antigeenien löytämistä ja niiden määrän mittaamista. Elisa-levyn kuoppaan pipetoidaan näytettä. Näyte kiinnittyy kuopan seinämiin tarttuneisiin vasta-aineisiin. Kun tutkittavaa näytettä pipetoidaan kuoppaan siitä seuraa, että näyte tarttuu kuopan seinämiin kiinnitettyyn vasta-aineeseen. Tällöin tutkittava antigeeni kiinnittyy vasta-aineeseen, kun muut näytteessä olevat komponentit jäävät irrallisiksi kuoppaan. Irtonaiset komponentit huuhdellaan pois Elisa-pesupuskurilla. [33.]

*Elisa-pesu:* Elisa-pesu suoritetaan, koska pesulla saadaan levyn kuopista pois ne aineet, jotka eivät sitoudu toisiin aineisiin. Ylimääräiset aineet saadaan levyiltä pois. Elisa-pesuliemi sisältää PBS:ää, Tween 20:tä ja ionivaihdettua vettä. Elisa-pesuliemi on fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos. Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) on päällyspuskuri Elisa-menetelmässä. Päällystyspuskurit eivät sisällä proteiineja, koska muuten ne voisivat kilpailla antigeenin tai vasta-aineen sitoutumisesta levyille. Levy on tärkeää pesujen välissä taputella kuivaksi, koska pisarat voivat häiritä seuraavia reaktioita. [34.]

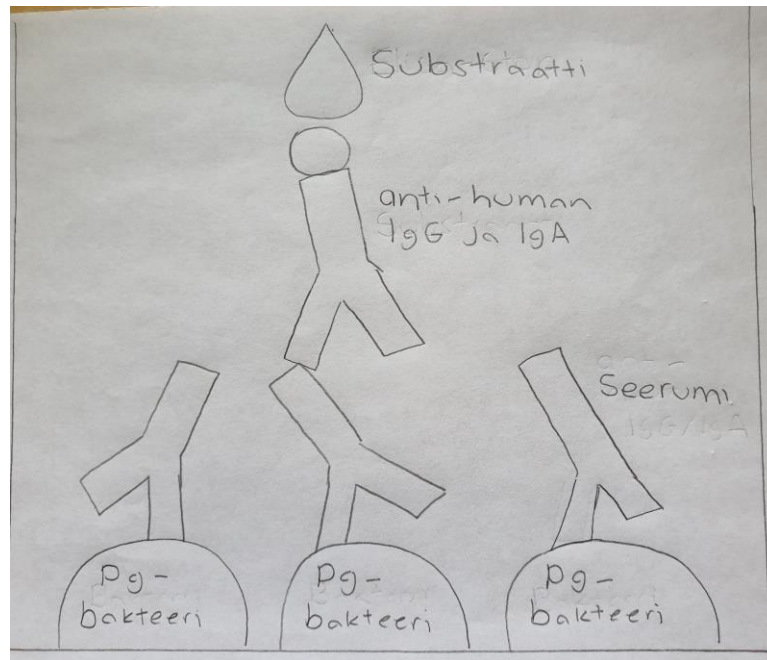
*Anti-human IgG ja IgA:* Sekundaariset vasta-aineet Anti-human IgG ja IgA laitetaan Elisa-pesun jälkeen. Vasta-aine kiinnittyy antigeeniin inkuboinnin aikana. Antibodypuskuri sisältää proteiinia, joka edesauttaa tunnistamaan vasta-aineita. Seeruminäytteet laimennetaan antibodypuskuriin. IgG ja IgA vasta-ainetta lisätään Elisa-levyn kuoppiin. Jos näytteessä ilmenee olevan bakteeria vastaan tuotettuja vasta-aineita, ne tunnistavat sekä sitoutuvat kuopan pohjalla sijaitseviin bakteerin pintarakenteisiin. Elisa-testissä on kaksi vasta-ainetta, koska toista käytetään sieppaamiseen ja toista hyödynnetään bakteerien havaitsemiseen. [29; 33.]

Sekundaarivasta-aineeseen on lisätty peroksidaasijohdannainen. Antigeeniin spesifisesti sitoutuva sekundaarivasta-aine on kiinnittynyt kuopan pohjalle kiinnitettyyn vasta-aineeseen eli Pg-bakteeriin. Sekundaarivasta-aineet, jotka eivät ole kiinnittyneet mihinkään, pestään pois Elisa-pesupuskurilla. [29; 33.]

*Substraattiliuos:* Substraattiliuos aiheuttaa levyn kuoppiin keltaisen värin, koska substraatti ja entsyymi reagoivat keskenään. Määrityksessä käytetään hyödyksi peroksidaasin taitoa hapettaa substraattia. Tässä menetelmässä hyödynnetään substraattissa olevia aineita, jotka ovat OPD- ja Urea hydrogen peroxidase -tabletti. Tabletit muodostavat OPD-liuoksen. OPD-liuos muuttaa levyn kuopat keltaisiksi, mutta Elisa Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen kuopat muuttuvat oransseiksi, koska Stop-liuos sisältää happoa. Keltainen väri on intensiteetiltään verrannollinen antigeenin ja siihen sitoutuneen sekundaarivasta-aineen määrälle. [29; 33.]

*Elisa Stop -liuos:* Elisa Stop-liuos hapettaa näytteeseen lisätyn substraatin, jonka takia värireaktio levyllä muodostuu. Stop-liuos pysäyttää substraattiliuoksen reaktion. Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen kuopan värit muuttuvat oranssiksi. Värireaktion voimakkuutta mitataan Multiscan RC-laitteella. Mitä voimakkaampi värireaktio, sitä enemmän näytteessä on mitattavaa vasta-ainetta. Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen tulokset tulee mitata puolentunnin sisällä liuoksen lisäyksen jälkeen. [29; 33.]

Määrityksen tulos saadaan vertaamalla näytteen kehittämän värimuutoksen intensiteettiä standardinäytteisiin. Mitattavan aineen eli tutkittavan antigeenin pitoisuus tiedetään. Kun hyödynnetään vasta-aineita, joilla on riittävä spesifisyys ja affiniteetti, niin menetelmän määrittäysraja on alle 1 ng/ml. [33.] Kuvassa 5 kuvataan Elisa-levyn reaktioita lisätyihin nesteisiin.



Kuva 5. Elisa-levyn reaktiot liuosten lisäyksen jälkeen. 1) Levyn pohjassa oleva bakteeri, joka toimii Elisa testin tunnettuna vasta-aineena. 2) Näyte, joka koostuu seerumista ja antibodypuskurista lisätään Elisa-levyn kuoppiin. 3) Anti-human IgG ja IgA ovat vasta-aineita. Jos näytteessä ilmenee olevan bakteeria vastaan tuotettuja vasta-aineita. Vasta-aineet tunnistavat sekä sitoutuvat kuopan pohjalla sijaitseviin bakteerin pintarakenteisiin. 4) Substraattiliuos aiheuttaa levyn kuoppiin keltaisen värin, koska substraatti ja entsyymi reagoivat keskenään. Määrityksessä käytetään hyödyksi peroksidaasin taitoa hapettaa substraattia. Keltainen väri on intensiteetiltään verrannollinen antigeenin ja siihen sitoutuneen sekundaarivasta-aineen määrälle. 5) Elisa Stop-liuos pysäyttää substraattiliuoksen reaktion. Stop-liuoksen lisäyksen jälkeen kuopan värit muuttuvat oranssiksi. Värireaktion voimakkuutta mitataan Multiscan RC-laitteella. Sitä voimakkaampi värireaktio mitä enemmän näytteessä on mitattavaa vasta-ainetta.

## 8 DS2-automaatti

### 8.1 Testi-ajot ennen varsinaisen Elisa-testin suoritusta

Automaatin pesuohjelmat löytyvät seuraavasti:

File --> Worklist editor --> Sample batch (new sample batch), anna levyille nimi --> start of day – Washer aspirate

File --> Worklist editor --> Sample batch (new sample batch), anna levyille nimi --> start of day – Washer dispense

Ennen varsinaista testiä Elisa-automaatilla tehdään aina kaksi pesuohjelmaa, jotka ovat Washer aspirate sekä Washer dispense. Automaatti suorittaa levyn pesemisen Elisa-pesupuskurilla. Washer aspirate ja dispense ohjelmat tehdään erikseen. Ohjelmat ovat testimenetelmiä, joten automaatti tekee vain puolet levystä eli kuusi kuoppaa. Levyn pesun jälkeen automaatti tyhjentää levyn pesupuskurista. Levy otetaan pois automaatista ja annetaan kuivua hetken paperin päällä. Levyn on oltava pisaraton, jotta se ei haittaa mittaustuloksia.

Washer aspirate -ohjelmassa automaatti pesee levyn Elisa-pesupuskurilla. Automaatti myös imee nesteen kuopasta ja laittaa tilalle pesupuskuria. Pesu-ohjelman loppuksi automaatti imee Elisa-pesupuskurin pois kuopista. Washer dispense -ohjelmassa automaatti laittaa pesupuskuria levyn kuoppiin. Automaatin pesujärjestelmässä imetään neste pois ja laitetaan tilalle pesupuskuria. Dispense- ohjelman loppuksi automaatti jättää Elisa pesupuskurin kuoppiin. Levy tyhjenetään lavuaariin ja jätetään kuivumaan. Testiohjelmissa käytetään aina testilevyä.

## 8.2 Elisa-testi ohjelmien tekeminen

Automaatin Elisa-testi ohjelmia pääsee tekemään seuraavasti:

File --> Assay editor

Assay editor kohdassa voi tehdä sellaisen Elisa-testiohjelman, kuin on tarpeellista. Uusien ohjelmointien tekeminen on helppoa, kun käyttää toimintoa vedä ja pudota-kuvakkeita. Automaatti alkaa suorittamaan testiä. Automaattiin kytketty tietokoneen ruudulla on aikajana sekä simulaattori, joka näyttää tarkalleen, missä vaiheessa prosessi on ja kuinka paljon on aikaa seuraaviin vaiheisiin. [35.]

*The Assay Editor.* Määrityseditorin avulla näytteille määritellään ohjelman suorittamat toiminnot, jotka ovat sekvenssi, pipetointi, inkubaatio, annostelu (näytteiden pipetointi tilavuus), pesu ja tulosten lukeminen. Ensimmäinen vaihe uuden määrittämisen ohjelmoinnissa on määrittämisen määrittäminen. Jokaisessa määrittämisessä on aina kolme testinäytössä näkyvää oletuskuvaketta, jotka ovat määrittämisen otsikkosivu, mikrolevyn pipetointimalli ja raportin muodon kokoonpano. Määrittämisessä on oltava myös vähintään yksi toimenpide esimerkiksi luku- tai annosteluvaihe. Määrittämisoperaatiokuvakkeet on vedettävä Operations-työkaluriviltä Ohjelmointi-työkaluriville niiden oikeassa järjestyksessä. Oikea järjestyksessä on määrittämisen otsikko, mikrolevyn pipetointimalli, toimintojen työkalurivi, raportin muodon asetukset ja ohjelmointityökalurivi. [36.]

*Operaatioiden lisääminen automaatille:* Toiminnot lisätään valitsemalla toimintokuvake, joka halutaan asettaa työkaluriville. Toimintokuvake lisätään ohjelmoinnin työkaluriville siihen kohtaan, johon kuvake halutaan laittaa. Ohjelmien järjestyksistä voi muuttaa siirtämällä toimintokuvaketta toisten kuvakkeiden eteen. Kuvakkeet poistetaan ohjelmointi työkaluriviltä vetämällä kuvake roskakoriin. [36.]

*The Worklist:* Luettelo löytyy Matriisi-valikkopalkista, jossa on kohta Worklist editor. Työluettelossa voidaan määrittää näytteen tunnus, joka vastaa jokaista eri näyteputkea ja kussakin näyteputkessa suoritettavia määrittämiä. Automaatti pystyy suorittamaan levyille useampia määrittämiä kuin vain yhden. Määrittämisillä on kuitenkin oltava samantyyppiset inkubaatio-, pesu-, lukemis- ja ravistusmäärittämiset. Työluettelon avulla automaatille



kerrotaan, mitkä testit suoritetaan kullekin näytteelle. Luettelossa voi määrittellä näytteiden sijainnit näytetelineessä. Ohjelma sisältää määrittämiä, jotka tehdään yhdelle tai kahdelle eri Elisa-levylle. Yhdelle levylle on mahdollista suorittaa korkeintaan 12 määrittämiä, jos niillä on samanlainen inkubaatio, lukeminen, pesu ja ravistelu. Jokaisella määrittämisellä tulee olla sama määrä operaatioita. Näyte-eräluettelosta löytyy uusi tai tallennettu testiohjelma levylle. Näyte-erän määrittämiin vaikuttavat sen koko eli syötettyjen näytteiden lukumäärä ja näyteputkien sijainti automaatissa. Työluettelo tehdään valitsemalla ensiksi näytteiden lukumäärä klikkaamalla näyteputken kuvaketta. Näyteputken kuvake liittyy putkeen sisältävään viimeiseen telinepaikkaan tai muuttamalla numeroa näytteiden lukumäärä ruudussa. Telinepaikat muuttuvat näytöllä vihreiksi, jos ne sisältävät näyteputken. Käyttämättömät telineet ovat harmaita. [36.]

*Sample Batch ID:* Näytölle kirjoitetaan näyte-erän nimi tai jokin muu selkeä tunnistus. Määrittäminen on valmis, kun Näyte-ID:lle on annettu nimi. Valitaan levylle suoritettava testi ja napsautetaan Lisää Testi -painiketta tai kaksoisklikkaamalla määrittämiä nimeä. Oranssi valintaruutu ilmestyy näytölle näyte-ID:n vierelle. Uusia määrittämiä voi lisätä korostamalla määrittämiä nimeä ja painamalla Lisää Määrittäminen -painiketta tai kaksoisnapsauttamalla määrittämiä nimeä. DS-Matrix- ohjelmisto laittaa kaikki määrittämit eri levylle automaattisesti. Työluettelo tallennetaan automaattisesti: Tiedosto --> tallenna työluettelo. Kun testit on valittu, työluettelolle annetaan nimi ja painetaan Valmis-painiketta. [36.]

*Annostelu toiminta:* Toimintoa hyödynnetään, kun määrittämiä paljonko Elisa-levylle pipetoidaan kutakin reagenssia. Valkoiset pipetinkärjet ovat reagenssikärkiä joita automaatti käyttää aineiden annostelussa levyn kaivoihin. Automaatin annostelu ohjelmassa valitaan kaivo, johon valittu reagenssi pipetoidaan. Kaivon valinta tapahtuu niin, että napsautetaan hiirellä kyseistä kaivoa. Jokaista kaivoa on napsautettava erikseen tai napsauttamalla Valitse kaikki -painiketta. Valittuihin kaivoihin ilmestyy keltainen V-merkki. Annosteltava reagenssi valitaan avautuvasta Neste-luettelosta. Neste-luetteloon voi lisätä uusia nesteitä painamalla Nesteet-painiketta. Kun painiketta on klikattu, avautuu taulukko, johon syötetään annosteltavan reagenssinesteen tilavuus. Validate -painikkeella tallennetaan toiminnot ohjelmalle. [36.]

*Pipetointi:* Toiminnossa on tietoja näytteiden laimentamisesta. Pipetointitoimintoa kuvaava kuvake vedetään hiirellä ohjelmoinnin työkaluriville. Napsautetaan kuoppaa, jossa

on laimennettu näyte, kontrolli (Wilma tai Baby) tai standardi eli blankki. Laimennos tapahtuu levyn kaivossa, kun napsautetaan kahdesti levyn kuoppaa, johon ilmestyy vihreä ympyrä. Kun automaatti annostelee levyn kuoppiin nesteitä, niin kone käyttää aina uutta kärkeä pipetoinnissa kuoppiin. Multishot- näytteiden kärkeä automaatti käyttää jokaisen kaivon pipetoimisessa. Eli automaatti ei vaihda kärkeä pipetoinnin aikana. Jos nestettä annostellaan useammalle kuin yhdelle kaivolle, niin automaatti voi imeä pipettiin yhdellä kertaa tarvittavan määrän ja pipetoida nesteen kaivoihin. Yksi laimennos tehdään yksittäiselle näytteelle. Rinnakkaisten näytteiden määryyksissä käytetään samaa laimennosta. Laimennoskuopat jaetaan useisiin määryyksiin. Laimennosta käytetään pipetoinnin toistoihin jokaisessa työluettelon määryyksessä, jossa on sama laimennos. [36.]

*Pipetointi ilman laimennosta:* Pipetointiohjelmassa automaatti pipetoi sille ohjelmoidun määrän haluttua nestettä valittuihin kaivoihin. Pipetointi tapahtuu suoraan näyteputkesta levyille. Automaattiin laitetaan jokaiselle näytteelle omat näyteputket, jotka sisältävät kontrolliainetta, standardia tai itse näytettä. Pipetointikuvake laitetaan vetämällä hiirellä kuvake määrysohjelmapalkkiin. Valikosta valitaan neste, jota laite pipetoi. Uuden nesteen lisääminen luetteloon onnistuu Neste-painiketta painamalla. Nesteen tilavuus tarkoittaa puhtaan nesteen määrää, jota pipetoidaan suoraan levyjen kuoppiin. Nesteen tilavuus määritellään automaatille kirjoittamalla tilavuus tekstiruutuun mikrolitroina ( $\mu\text{l}$ ). [36.]

*Inkubaatio ja ravistelu:* Kyseisissä toiminnoissa määritetään lämpötila ja aika levyn inkuboinnille. Lämpötilaksi voi valita huoneenlämmön tai lämpötilan voi kirjoittaa ruudulle. Inkuboinnin ajaksi voi valita tunteja, minuutteja ja sekunteja. Inkuboinnin aikana automaatti voi ravistella levyä, jos on tarve. Ravistelutoiminto- valintanappi löytyy toimintovalikohdasta. Oletusarvo ravistelun käyttöön on päällä tai älä ravista inkuboinnin aikana. Ravistelu ei ole välttämätöntä. Ravisteluajaksi voi myös valita tunteja, minuutteja ja sekunteja. Matala, keskitaso tai korkea ovat ravistelunopeuksia, joita on mahdollista valita toiminnolle. [36.]

*Pesuhjelma:* Annostelussa pesupää imee kaivon sisällön, minkä jälkeen nestettä annostellaan levyn kuoppiin valittu määrä. Laite imee nesteen kaivojen pohjasta vahingoittamatta levyn pohjassa olevaa bakteeria. Aspiraatioissa pesupää poistaa nesteen kaivosta asettamalla pesutapit sopivalle korkeudelle, josta automaatti imee nesteen pois.

Automaatille ohjelmoidaan puhdistuksen tilavuus ja valitaan pesupuskuri. Huuhtelussa letkut täyttyvät valitulla pesupuskurilla ennen pesuohjelman käynnistymistä. Huuhtelu estää ilman tai kuplien joutumisen nesteeseen. Pesuohjelmassa määritetään aluksi, kuinka paljon automaatti annostelee pesupuskuria. Annostelumäärät ovat 50–1000 µl. Pesunesteiden tietokannasta löytyvät pesupuskurit, josta valitaan käytettävä pesupuskuri. Uusi pesupuskuri lisätään pesunesteiden tietokantaan Nesteet-painiketta napsauttamalla. Nesteiden oikeanlaisesta nimeämisestä ja määrittämisestä automaatin tietokoneohjelma antaa ohjeita. [36.]

*Aikajana*: Työkalurivissä on kuvakkeet testin käynnistämiseen, lopettamiseen, näytön muuttaminen ja ajoasetusten määrittäminen. Aikajanassa on painikkeet, joista voi tehdä muutoksia testin kulkuun. Aktiiviset painikkeet vilkkuvat, kun taas passiiviset painikkeet ovat harmaita. Aikajana on toimittomassa tilassa, mutta hyväksyttäessä aikajanana toiminnot se siirtyy aktiiviseen tilaan. Testi voi alkaa. Jokaisen määritystoiminnan aikataulu näkyy aikajanana rivillä. Aikataulussa näkyy, milloin toiminto tapahtuu (tarvikkeiden laitto), paljonko on aikaa jäljellä testin päättymiseen ja käynnissä olevan määrittäsvaiheen tilanteen. [36.]

*Accept* tarkoittaa hyväksyä kyseinen toiminto. Aikajanana toiminnot on hyväksyttävä ennen kuin painaa Käynnistä-painiketta. Kun automaatti alkaa suorittamaan testiä, niin aikajanana toimintoja ei voi enää muuttaa. *Add* mahdollistaa lisäyksen. Toiminnossa voi lisätä uuden työluettelon aikajanalle. *Pause*-painiketta painamalla voi laittaa testin pysähdyksiin ja jatkaa sitä myöhemmin. *Pause* pysäyttää aikajanana toiminnon aikana, joka on käynnissä sillä hetkellä. *Play*-painikkeella toiminto jatkuu siitä mihin testi pysähtyi. *Abort* keskeyttää testin sopivassa pysäytyskohdassa. Toiminto näyttää valintaikkunan, jossa on kyllä- tai ei-vaihtoehdot. Valintaikkunan vaihtoehtojen avulla voi valita keskeyttääkö levyn vai koko työluettelon toiminnot. *Skip* ohittaa odotusajat. Testi ohittaa aikajanana odotusajat ja siirtyy suoritettavan toiminnon alkuun. Jokaista odotusaikaa ei ole kuitenkaan mahdollista ohittaa. Esimerkiksi inkubointi ajat täytyy suorittaa, koska ne ovat välttämättömiä testin onnistumisen kannalta. *Zoom*-toiminnon avulla näytön kokoa voi suurentaa tai pienentää. [36.]

### 8.3 Elisa-testin suoritus

Automaatin Elisa-testiohjelmat löytyvät seuraavasti:

File --> Assay editor --> File --> Open --> Open Assay --> PgOptimointilgG ja PgOptimointilgA

Valitaan ohjelmat, joita käytetään Elisa-testissä. Ohjelmat on aina syytä tarkistaa ennen kuin niitä käyttää, jotta molemmat ohjelmat ovat samanlaisia. Jos niissä on eroavaisuuksia tehty ohjelma ei lähde etenemään. Automaatti alkaa kertomaan, mihin kohtaan laitetaan näytteet, Elisa-levyt, tarvittavat liuokset ja pipetin kärjet. Laite ilmoittaa, kuinka paljon tarvitaan kutakin liuosta. Tarvittavat liuokset ovat samat kuin käsin pipetoinnissa eli anti-human IgG, anti-human IgA, substraatti- ja Elisa Stop-liuos. Testiin tarvittavat väliaineet laitetaan paikoilleen. Kuvassa 6 on kuvattu mihin kohtaan laitetaan Elisa-testiä varten tarvittavat tarvikkeet mm. Elisa-levyt, näytteet ja pipetinkärjet.



Kuva 6. Automaattiin on laitettu kaikki näytteet, reagenssit, pipetointikärjet sekä myös Elisa-levyt niille kuuluville paikoille. Testi alkaa, kun kaikki on asetettu paikoilleen ja painetaan Accept-painiketta.

*Ohjelman käynnistys:* Ajettava ohjelma valitaan Matriisin päänäytön työlistatiedoista nimellä Työluettelo. Valintaikkuna ilmestyy näytölle, jossa laite pyytää valitsemaan näyteerän testiä varten. Määrittystä varten luodaan uusi näyte-erä. Ok-painiketta painamalla Työluettelon sivulle ilmestyy muokkausnäyttö, jossa voi tehdä muutoksia. Uuden näyteerän luomisessa valitaan käytettävät näytteet napsauttamalla yksittäisiä putkia tai määrittämällä tekstikenttään näytteiden lukumäärä. Yksittäiset putket valitaan niin, että napsautetaan näytetelineen viimeistä paikkaa putkelle. Tällä tavoin valitaan koko putkiteline. Näytteen nimeämisessä käytetään oletusnimiä, jotka ovat tässä tilanteessa 4-1,4-2, 11-1, 11-2 ja niin edelleen. Näytteitä on 4, 11, 32, 40, 75, 79, 87 ja 105. Jokainen näyte nimettiin 1, 2, 3 ja 4:n sarjoihin. Yhteensä näytteitä laitetaan 32 paikalle. Kaikki näytteet kirjattiin tekstikenttää 1 ja 2:n sarjoihin. Sen jälkeen jokainen näyte kirjattiin 3 ja 4:n sarjoihin, jotka kirjattiin tekstikenttään. Näytteen tunnukset määritellään siten, että DS-Matrix-ohjelmisto luo automaattisesti näytteiden tunnukset. Näytteen tunnukset hyväksytään Next-painiketta painamalla. [36.]

Luettelosta avautuu kaikki määrittymiset kohta. Tehtävät määrittymiset valitaan korostamalla määrittystä ja klikkaamalla Lisää määrittymis -painiketta. Näyte-tunnusten viereen ilmestyy oranssi palkki, jossa lukee suoritettavan testin nimi. Palkeissa lukee IgG ja IgA. Automaattilla tehdään kaksi määrittystä, jotka ovat IgG ja IgA. Näytölle luodaan kaksi oranssia palkkia. Ensin valitaan IgG ja seuraavaksi IgA. Tunnuksen vieressä on valintaruutu. Jos ruutu on valittu, niin näytteet ajetaan määrittymisen kanssa. Automaatti tekee testin ensiksi IgG-levylle, koska IgG:n oranssi palkki on valittu ensiksi. Määrittymis voidaan poistaa klikkaamalla punaista X:ää oranssin palkin kulmassa. Jos haluaa tarkastella edellisen sivun näyttöä, painetaan Edellinen. Näin voi muuttaa näytteiden määrää. Kun lopullinen Työluettelo on valmis, niin klikataan Valmis-painiketta. Näytölle ilmestyy Aikajana. [36.]

*Aikajana ja lataa ohjattu toiminto:* Aikajanalla näkyvät kaikki testin määrittymisvaiheet ja niiden kestot sekä myös, milloin työvaiheet alkavat ja päättyvät. Automaatin käyttäjän tulee hyväksyä työvaiheet, jotta ajon voi aloittaa. Ennen hyväksymistä kannattaa valmistaa kaikki reagenssit, näytteet ja muut tarvikkeet valmiiksi. Pipetointikärjet sekä näyteputket laitetaan automaattiin niille kuuluville paikoille ennen kuin painetaan hyväksy. Aikajanalle voi tulla virheitä, jos reagenssit lataa liian nopeasti. Kun aikajana on hyväksytty, niin ohjelmisto pyytää laittamaan näyteputket ja muut tarvikkeet niiden omille paikoille. Automaatti näyttää näytöllä, mitä pitää laittaa mihinkin kohtaan ja kuinka paljon tai montako

kappaletta. Näyteputket on kuitenkin mahdollista laittaa ennen aikajanan hyväksymistä. Load Tube Rack -näytössä ilmenee työlistassa olevien näytteiden määrä sekä DS2-kaavio. Putkitelineet ovat korostettuina DS2-kaaviossa, jonka avulla käyttäjä tietää asettaa näyteputket oikeille paikoille. Kun näytteet on laitettu niille tarkoitetuille paikoille, painetaan Seuraava-nappia. [36.]

*Tarvikkeiden lataaminen:* Reagenssit laitetaan niille tarkoitetuille paikoille automaatin vaatimassa järjestyksessä. Ensimmäisessä näytössä on taulukko, joka kertoo ajoon tarvittavat reagenssit (IgG, IgA substraattiliuos ja Elisa Stop -liuos), standardit (blankki sisältää antibodypuskuria) sekä kontrollit (Wilma ja Baby). Automaatti pyytää laittamaan tarvittavat tarvikkeet oikeaan paikkaan. Reagenssit tulee laittaa niille tarkoitettuihin putkiin. Kun automaatin pyytämä tarvike on laitettu paikoilleen ja tarvittavat tiedot on annettu, niin seuraavaan vaiheeseen pääsee painikkeella V. [36.]

Kaikki näytteet ja liuokset on laitettu automaattiin, niin seuraavaksi näytössä pyydetään laittamaan levyt paikoilleen. Levyille annetaan nimet. Nimi koostui bakteerista, vasta-aineesta ja päivämäärästä, jolloin testi tehtiin. Esimerkki nimeämisestä on PglgG200120 ja PglgA200120. Oranssi palkki edellisessä vaiheessa kertoi, kumpi vasta-aine (IgG ja IgA) tulee ensin. Ensin laitettiin IgG, joten IgG-levy laitetaan ensin automaatille. Yksilöivä levytunnus on syytä antaa, jotta levyjen tunnistus on helpompaa. [36.]

Automaatin ohjelma pyytää tarkistamaan linjan tilan, laittamaan pesupuskurin pesusäiliöön ja tyhjentämään jätesäiliön. Elisa-pesupuskuria laitetaan pesusäiliöön yksi litra. Kun kaikki tarvikkeet on laitettu paikoilleen ja kaikki on oikein, niin testin voi käynnistää. [38.]

*Aikajana – ajon tila:* Näytössä näkyy jokaisen yksittäisen toiminnon aikataulu. Janalla näkyy, milloin määrittäminen alkaa, milloin päättyy ja kauanko kyseinen vaihe kestää. Aikajanan näyttöä voi suurentaa + -painikkeella. Näkymää voi pienentää klikkaamalla – . [36.]

Automaatti aloittaa pipetoimaan Wilma-, Baby- ja Blankki-aineet IgG-levylle. Aineilla on omat kuoppansa, jotka on merkitty testi-ohjelmaa tehtäessä. Pipetti alkaa pipetoimaan näytteitä levylle. Pipetointi tapahtuu niin, että näytettä laitetaan vierekkäisiin kuoppiin. Kun kaikki näytteet ovat levyllä, niin seuraavaksi alkaa kahden tunnin inkubaatio. IgA-

levylle tehdään pipetointi, jonka jälkeen alkaa kahden tunnin inkubaatio. IgA-levy pipetoidaan heti IgG-levyn pipetoinnin päätyttyä. [29.]

Inkuboitumisen jälkeen IgG-levylle suoritetaan Elisa-pesupuskurilla pesu. Automaatti suorittaa pesupuskurin annostelun ja kuoppien kuivauksen, joka tapahtuu kolme kertaa. Pesun jälkeen lisätään anti-human IgG, jonka jälkeen alkaa tunnin inkubaatio. IgA-levylle tehdään myös Elisa-pesu. Levylle pipetoidaan anti-human IgA josta alkaa inkubaatio, joka on tunnin mittainen. [32.]

Tunnin inkubaation jälkeen molemmille levyille suoritetaan Elisa-pesu. Kummallekin levyille annostellaan substraattiliuosta. Inkubaatio kestää 45 minuuttia, joka suoritetaan pimeässä. Automaatin kansi suljetaan inkuboinnin ajaksi. Reaktio pysäytetään Elisa Stop-liuoksella, jonka jälkeen automaatti mittaa tulokset ja tallentaa ne etusivulle. Testi on päättynyt, jonka jälkeen tulokset tallennetaan muistitikulle. [32.]

#### 8.4 Automaatin osat ja niiden tehtävät

*Pesupää:* Automaatin pesupää koostuu kahdesta sarjasta tappeja, jotka ovat aspiraatio- ja annostelutappi. Lyhyemmät tapit ovat annostelutappeja, jotka annostelevat nestettä levyn kuoppiin. Aspiraatiotapit ovat pidempiä tappeja. Niiden tehtävä on imeä nestettä levyistä ja kuivata kuopat. Tapit on sijoitettu pesupäähän siten, että neste voidaan imeä ja annostella sujuvasti Elisa-levylle. [36.]

*Pesupuskurisäiliö:* Automaatissa voi käyttää kahta eri pesupuskuria, mutta yleensä on käytössä vain yksi. Pesupuskureille on varattu kaksi eri säiliötä. Yhden säiliön enimmäistilavuus on kaksi litraa. Jotta ohjelma käynnistyy, tulee säiliössä olla pesupuskuria 500 ml. Ohjelma ei käynnisty, jos pesupuskuria ei ole tarpeeksi säiliössä. [36.]

*Jätesäiliö ja roskakori:* Pesu-ohjelmassa käytetty pesupuskuri kerätään sille tarkoitettuun jäteastiaan. Nesteille tarkoitettujen jäteastian tilavuus on kaksi litraa. Säiliön tasoanturit hälyttävät, kun säiliö alkaa olemaan täynnä. Automaatin käyttäjän on tällöin tyhjennettävä säiliö. Jos säiliötä ei tyhjennetä, niin jätevettä voi joutua automaatin sensoreihin ja tämän jälkeen automaatti on puhdistettava. Automaatin voi ottaa huolellisen puhdistuksen

jälkeen uudelleen käyttöön. Jätessäiliö on syytä tyhjentää usein, vaikka anturit eivät olisikaan hälyttäneet.

Käytetyille näyte- ja reagenssipipetinkärjille on oma roska-astia. Automaatin pipetti tuo pipetinkärjet roska-astiaan. Ajon jälkeen tulee tyhjentää roskakori. [36.]

## 9 Tulokset

### 9.1 Levyn tulosten koostumus

Näytteitä on yhteensä kahdeksan. Käsipipetoimalla tutkittavista näytteistä valmistetaan kaksi eri laimennosta. Vierekkäiset näytteet on pipetoitu samasta näytteestä. Samaa näytettä on neljässä kuopassa. Työn tulokset lasketaan neljän kuopan keskiarvona. Näin minimoidaan kuopissa olevien bakteeripäälystyksestä johtuvien erojen vaikutusta mitaustuloksiin. Kaikilla levyillä on kaksi kontrollia, jotka ovat Wilma- ja Baby-näytteet. Kontrolli näytteillä tulokset normalisoidaan. [1.] Automaatilla tutkittavista näytteistä valmistetaan kolme eri laimennosta. Sama laimennos, jota käytetään käsipipetoinnissa eli 1:100. Sarja 3:n laimennossuhde on 1:125 ja sarja 4:n laimennossuhde on 1:150. Samaa näytettä on kahdessa vierekkäisessä kuopassa. Tulokset saadaan kahden kuopan keskiarvona ja sarjaa 3 ja 4 verrataan automaatin laimennokseen, joka on sama kuin manuaalisessa pipetoinnissa. Wilma- ja Baby-näytteille tehdään laimennokset 1:100, 1:125 ja 1:150.

### 9.2 Levyjen tulosten laskeminen

Tulokset lasketaan Excel-ohjelman avulla. Spectrofotometrin avulla lasketut arvot tuodaan Excel-tiedostoon. Laitteesta saadut arvot koostuvat absorbansseista, jotka ovat liuoksen muodostama väriyhdistelmä. Levyillä on blankkeja, joiden keskiarvo lasketaan. Saatu keskiarvo vähennetään absorbanssiarvoista. Lasketaan keskiarvot neljästä kuopasta kustakin näytteestä ja sen laimennoksista. [37.] Seuraavaksi lasketaan kontrollien eli Wilma- ja Baby-näytteiden keskiarvot. Baby-näytteen keskiarvolla ei ole merkitystä tulosten tulkinnassa. Wilma-näyte on merkityksellisempi tulosten tulkinnassa ja



laskemisessa. Kun on kaksi tai useampi levy, niin lasketaan kaikkien levyjen Wilmojen keskiarvo. IgA-levylle lasketaan oma keskiarvo Wilmoista ja IgG-levylle tehdään samoin. Levyjä ei voi yhdistää, koska ne mittaavat eri asioita. [37.] IgG-levyn kaikista Wilmoista lasketaan keskiarvo. Korjauskerroin lasketaan niin, että kaikkien Wilmojen keskiarvo jaetaan yhden levyn Wilman keskiarvolla. Jokaiselle levylle lasketaan korjauskerroin. Sama laskutoimitus tehdään IgA-levylle. Korjauskertoimen avulla lasketaan neljästä kuopasta uudet keskiarvot. Uudet keskiarvot lasketaan kertomalla korjauskerroin jo lasketuilla neljän kuopan keskiarvoilla. [37.]

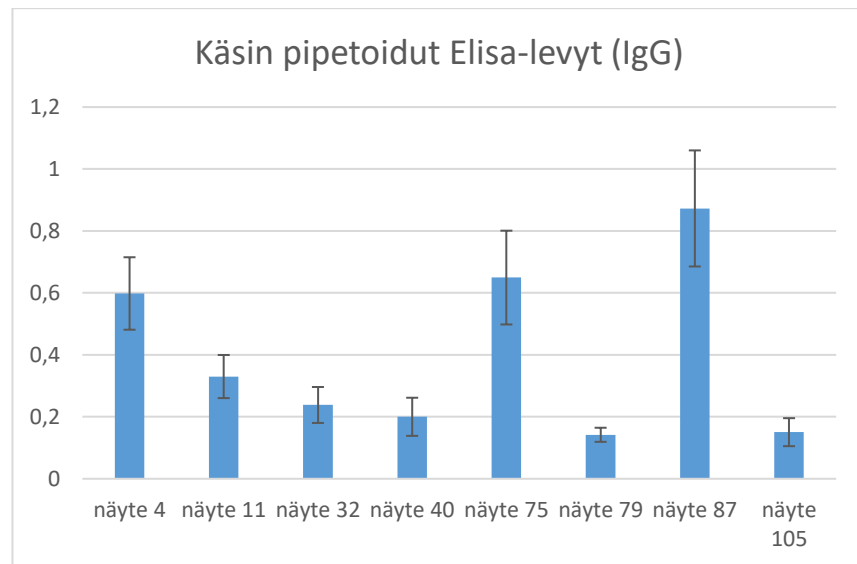
### 9.3 Manuaalisesti tehdyn Elisa-testin tulokset

Taulukossa 2 on kuvattu käsinpipetointimenetelmällä valmistetun IgG-levyn keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen.

Taulukko 2. IgG-levyn keskiarvot ja keskihajonnat manuaalisella Elisa-testillä.

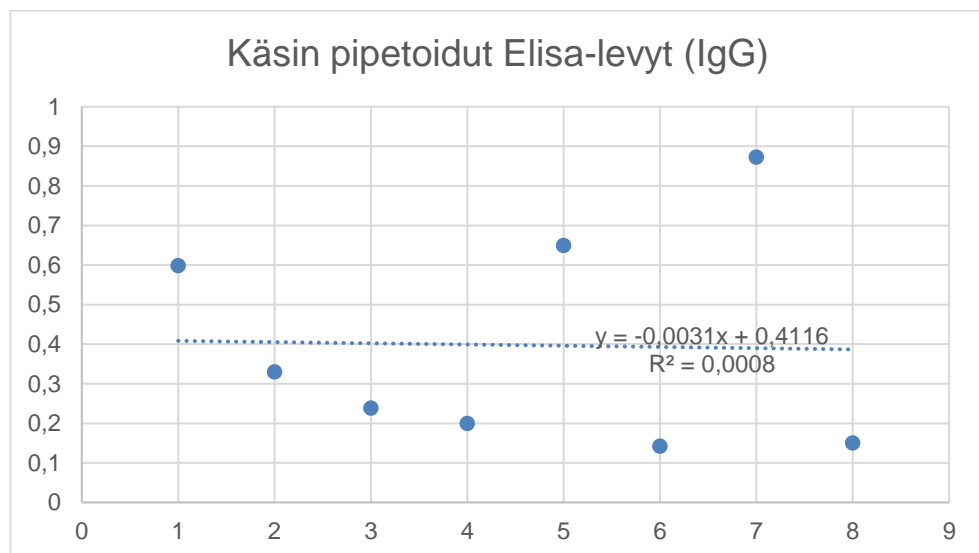
	Näyte kaikki levyt	Näytteet
Näyte	Keskiarvo	Keskihajonta
4	0,598	0,117
11	0,330	0,070
32	0,238	0,058
40	0,200	0,062
75	0,650	0,151
79	0,142	0,023
87	0,873	0,187
105	0,150	0,045

Kuvassa 7 on esitelty käsinpipetointimenetelmällä valmistetun IgG-levyn keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen pylväsdiagrammeina.



Kuva 7. Manuaalisesti pipetoidut Elisa-levyt. Kuvaajassa on näytteiden keskiarvot ja keskihajonnat.

Kuvassa 8 kuvattu käsinpipetointimenetelmällä valmistetun IgG-levyn keskiarvot. Keskiarvot eivät ole suoralla kovinkaan hyvin. Korrelaatiokerroin on heikko, koska se on noin pieni ja kerroin ei ole lähellä arvoa 1.



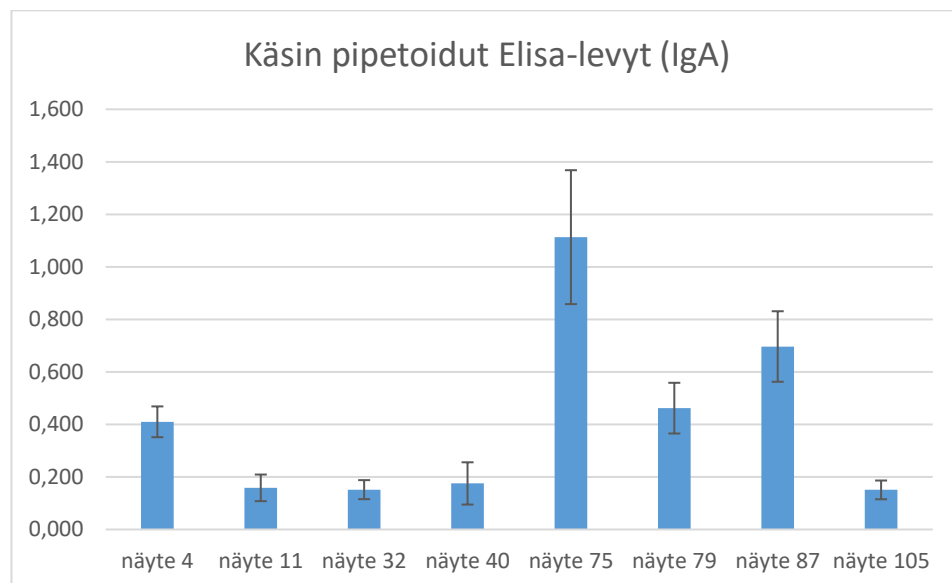
Kuva 8. Manuaalisesti pipetoitu Elisa-levy IgG- vasta-aineella.

Taulukossa 3 on kuvattu käsinpipetointimenetelmällä valmistetun IgA-levyn keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen.

Taulukko 3. IgA-levyn keskiarvot ja keskihajonnat manuaalisella Elisa-testillä.

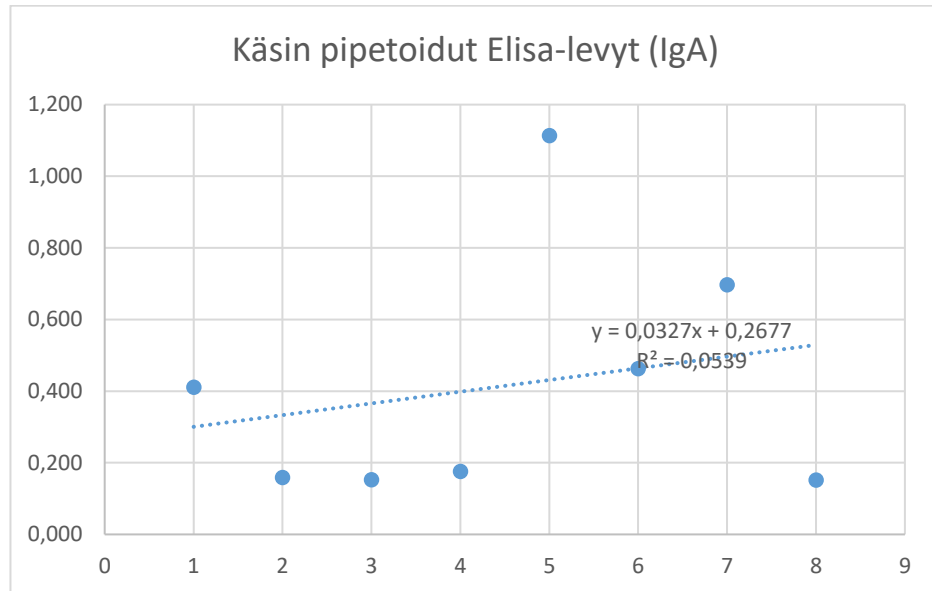
	Näyte kaikki levyt	Näytteet
Näyte	Keskiarvo	Keskihajonta
4	0,410	0,059
11	0,159	0,051
32	0,152	0,036
40	0,175	0,080
75	1,113	0,255
79	0,462	0,097
87	0,697	0,134
105	0,151	0,036

Kuvassa 9 on kuvattu käsinpipetointimenetelmällä valmistetun IgA-levyn keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen pylväsdiagrammeina.



Kuva 9. Manuaalisesti pipetoidut Elisa-levyt. Kuvaajassa on näytteiden keskiarvot ja keskihajonnat.

Kuvassa 10 on käsin pipetointimenetelmällä valmistetut Elisa-levyt IgA- vasta-aineella. Keskiarvot eivät ole suoralla kovinkaan hyvin. Korrelaatiokerroin on huono, koska ei ole lähellä arvoa 1.



Kuva 10. Manuaalisesti pipetoitu Elisa-levy IgA vasta-aineella.

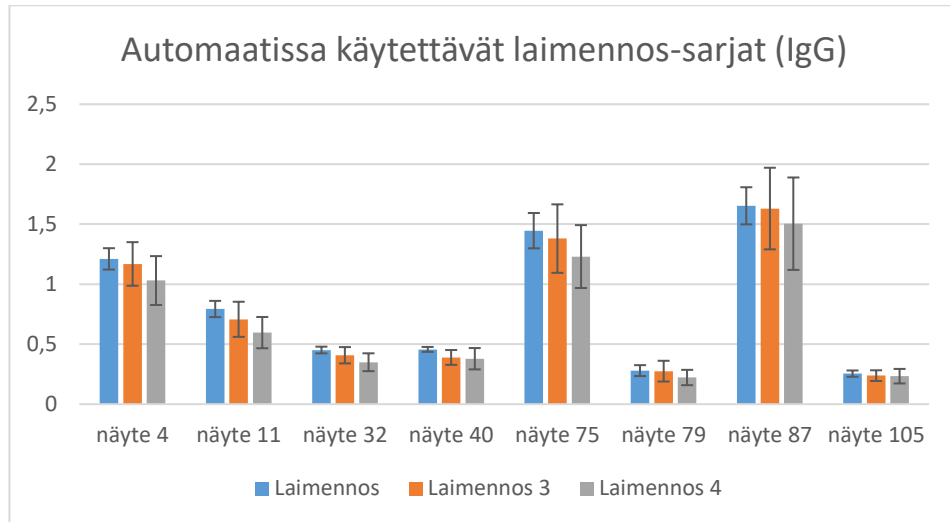
#### 9.4 Automaatilla tehdyn Elisa-testin tulokset

Taulukossa 4 on kuvattu automaattilla valmistettujen IgG-levyjen keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen.

Taulukko 4. IgG-levyn keskiarvot ja keskihajonnat automaattilla tehdyllä Elisa-testillä.

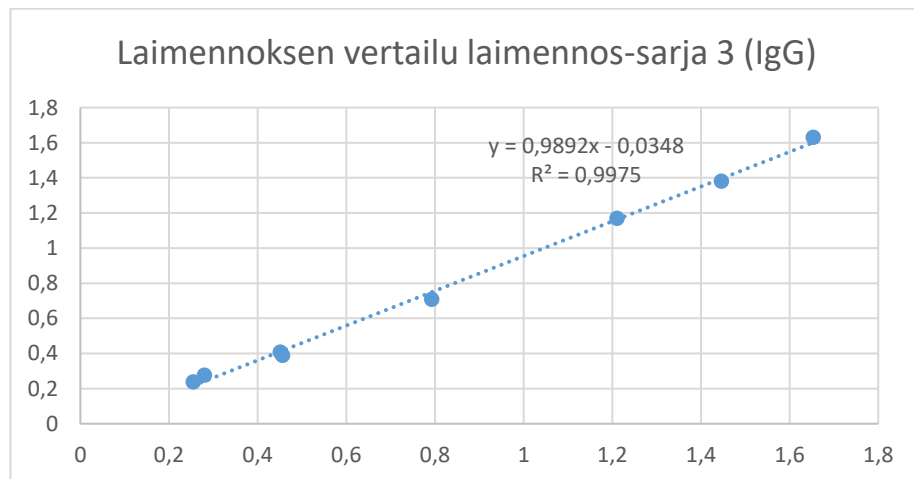
Näyte	Näyte kaikki levyt		Sarja 3 kaikki levyt		Sarja 4 kaikki levyt	
	Keskiarvo	Keskihajonta	Keskiarvo	Keskihajonta	Keskiarvo	Keskihajonta
4	1,211	0,089	1,169	0,182	1,030	0,204
11	0,793	0,068	0,707	0,146	0,596	0,130
32	0,451	0,028	0,408	0,068	0,350	0,074
40	0,457	0,020	0,390	0,062	0,379	0,089
75	1,446	0,147	1,380	0,285	1,230	0,262
79	0,280	0,045	0,275	0,086	0,222	0,064
87	1,654	0,155	1,631	0,340	1,504	0,385
105	0,255	0,026	0,238	0,045	0,233	0,061

Kuvassa 11 on kuvattu automaattissa käytettävät laimennossarjat, joita vertaillaan käsin pipetointimenetelmän laimennossarjaan. Laimennosta 3 ja 4 verrataan laimennokseen (sininen pylväs), jotta tiedetään kumpaa sarjaa kannattaa hyödyntää jatkossa automaattia käytettäessä.



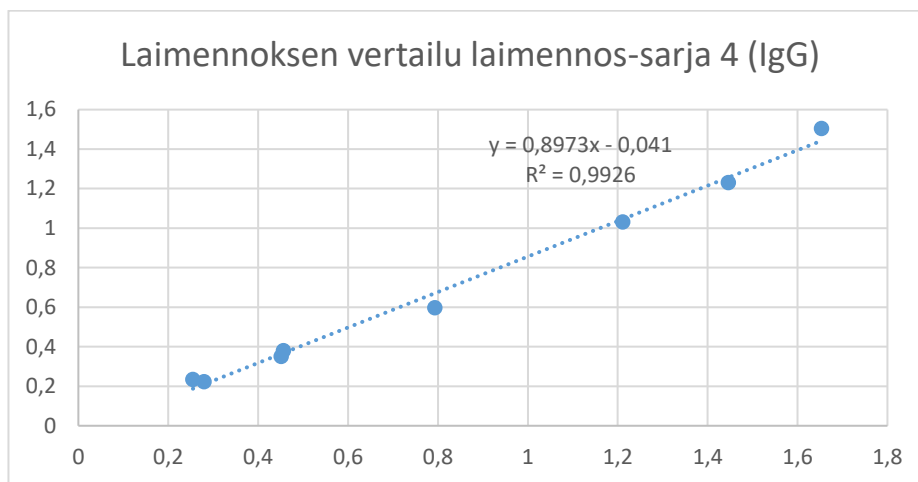
Kuva 11. Laimennos on sama kuin käsin pipetoiduissa testeissä. Laimennosta vertaillaan sarja 3:n ja sarja 4:n kanssa keskenään.

Kuvassa 12 on havainnollistettu käsin pipetoinnissa käytetyn laimennossarjan samankaltaisuutta sarja 3:n kanssa. Korrelaatiokerroin on erinomainen, kun vertaillaan laimennosta laimennossarja 3:n kanssa.



Kuva 12. Laimennosta vertaillaan laimennossarja 3:n kanssa keskenään.

Kuvassa 13 on havainnollistettu käsinpipetoinnissa käytetyn laimennossarjan samankaltaisuutta sarja 4:n kanssa. Korrelaatiokerroin on erinomainen, kun vertaillaan laimennosta laimennossarja 4:n kanssa.



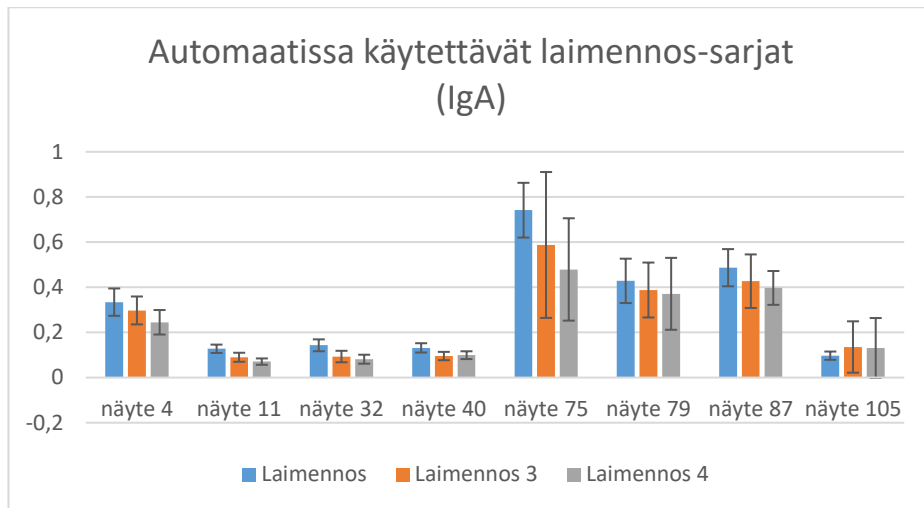
Kuva 13. Laimennosta vertaillaan laimennossarja 4:n kanssa keskenään keskenään.

Taulukossa 5 on kuvattu automaattilla valmistettujen IgA-levyjen keskiarvot ja keskihajonnat kaikista näytteistä erikseen. Sarja 3:ta ja sarja 4:ta on laskettu jokaisesta näytteestä erikseen keskiarvot ja keskihajonnat.

Taulukko 5. IgA-levyn keskiarvot ja keskihajonnat automaattilla tehdyllä Elisa-testillä.

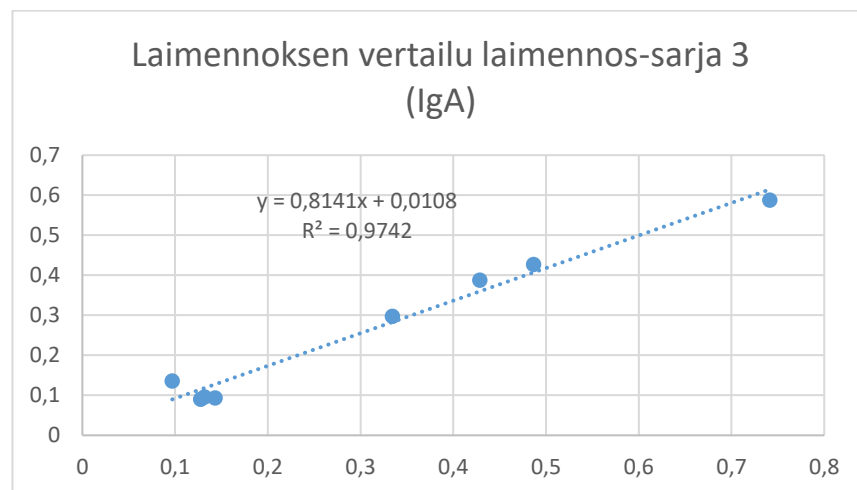
Näyte	Näyte kaikki levyt	Näytteet	Sarja 3 kaikki levyt	Sarja 3	Sarja 4 kaikki levyt	Sarja 4
	Laimennos 1 ja 2	Keskihajonta	Laimennos 3	Keskihajonta	Laimennos 4	Keskihajonta
näyte 4	0,334	0,061	0,297	0,062	0,245	0,054
näyte 11	0,128	0,019	0,090	0,020	0,071	0,014
näyte32	0,143	0,026	0,093	0,026	0,081	0,020
näyte 40	0,132	0,021	0,095	0,018	0,099	0,017
näyte 75	0,741	0,121	0,587	0,323	0,479	0,227
näyte 79	0,428	0,098	0,388	0,122	0,371	0,159
näyte 87	0,487	0,082	0,427	0,119	0,397	0,075
näyte 105	0,097	0,018	0,135	0,114	0,131	0,133

Kuvassa 14 on kuvattu automaattissa käytettävät laimennossarjat, joita vertaillaan käsinpipetointimenetelmän laimennossarjaan. Elisa-levy on IgA. Laimennos on sama kuin käsinpipetoiduissa testeissä. Laimennossarja 3:ta ja 4:ta verrataan laimennokseen, jotta tiedetään kumpaa sarjaa kannattaa hyödyntää jatkossa automaattia käytettäessä.



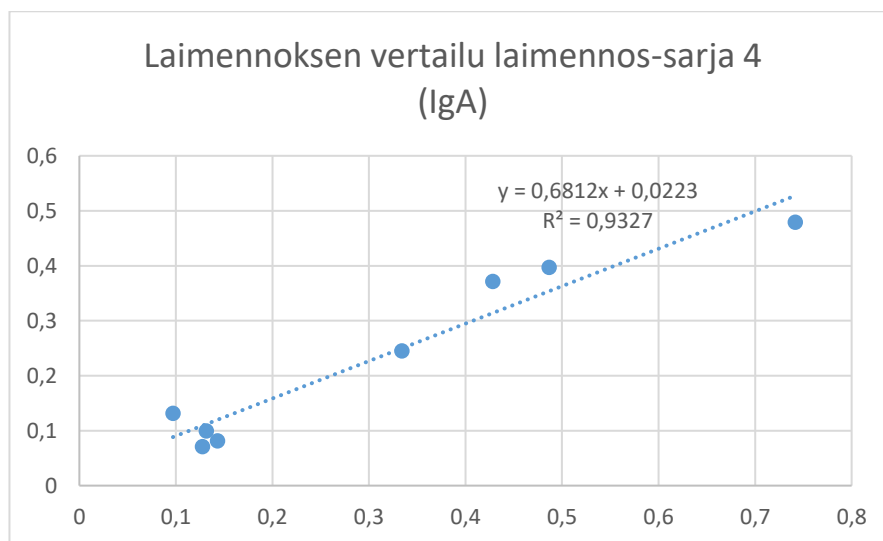
Kuva 14. Laimennos on sama kuin käsin pipetoiduissa testeissä. Laimennosta vertaillaan sarja 3:n ja sarja 4:n kanssa keskenään.

Kuvassa 15 on havainnollistettu käsinpipetoinnissa käytetyn laimennossarjan samankaltaisuutta sarja 3:n kanssa. Korrelaatio on erinomainen, kun vertaillaan laimennosta laimennossarja 3:n kanssa.



Kuva 15. Laimennosta vertaillaan laimennossarja 3:n kanssa keskenään.

Kuvassa 16 on havainnollistettu käsinpipetoinnissa käytetyn laimennossarjan samankaltaisuutta sarja 4:n kanssa. Laimennosten korrelaatiot ovat tasaisesti suoralla, kun laimennosta vertaillaan laimennossarja 4:n kanssa keskenään. Elisa-testit on suoritettu automaattilla.

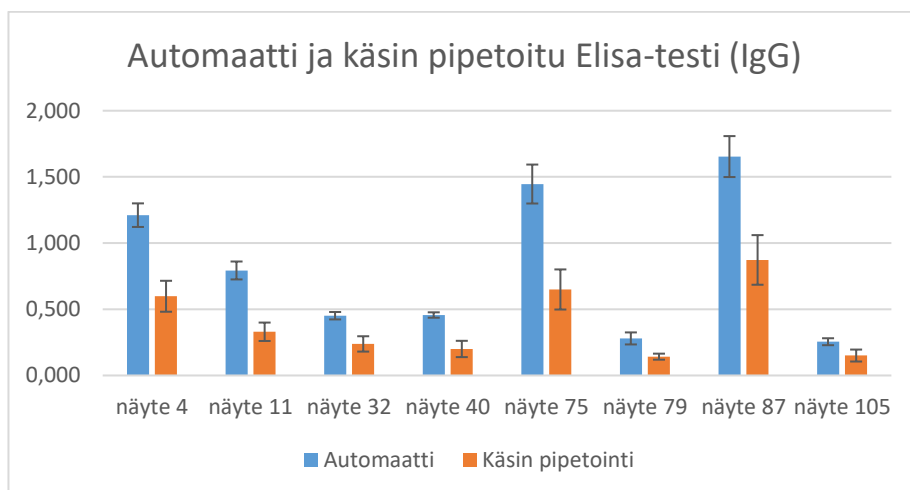


Kuva 16. Laimennosta vertaillaan laimennossarja 4:n kanssa keskenään.



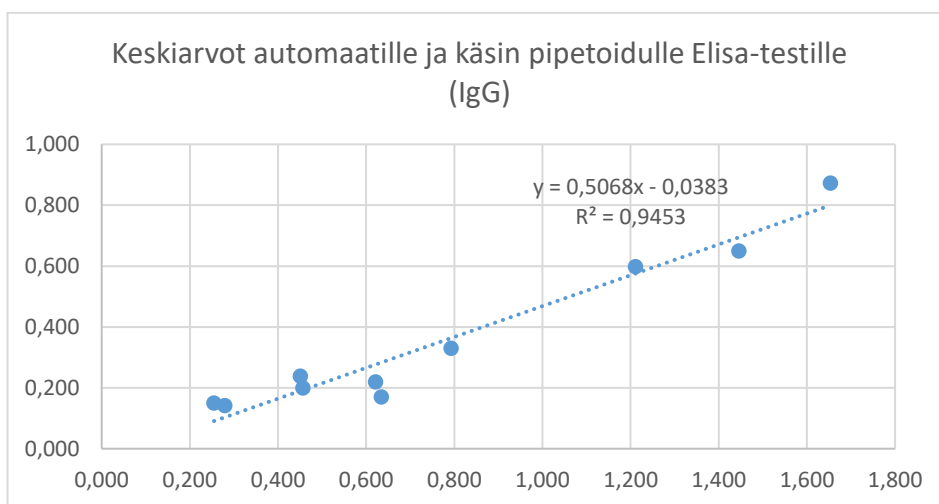
## 9.5 Automaatilla tehdyt Elisa-testit verrattuna käsin pipetoituihin Elisa-testeihin

Kuvassa 17 näytteet eroavat toisistaan, kun ne on mitattu eri menetelmillä. Arvojen tulisi olla samanlaisia, jotta voidaan siirtyä käsin pipetoinnista käyttämään Elisa-automaattia. Saadut arvot eroavat verrattaessa automaatin tuloksia käsin pipetoinnin arvoihin.



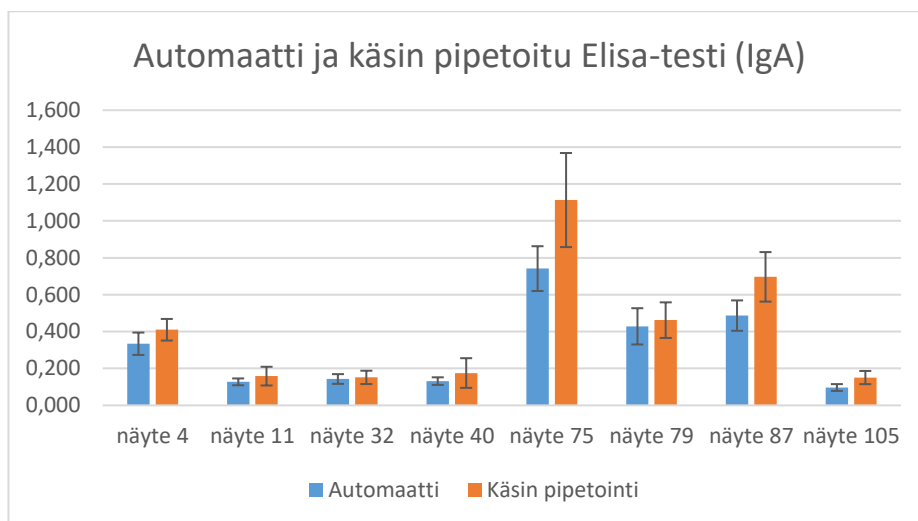
Kuva 17. Automaatin ja käsinpipetointimenetelmän eroavaisuudet.

Kuvassa 18 kerrotaan IgG-levyn automaatin- ja käsinpipetointimenetelmän keskiarvot. Hyvä korrelaatio, koska pisteet ovat tasaisesti suoralla.



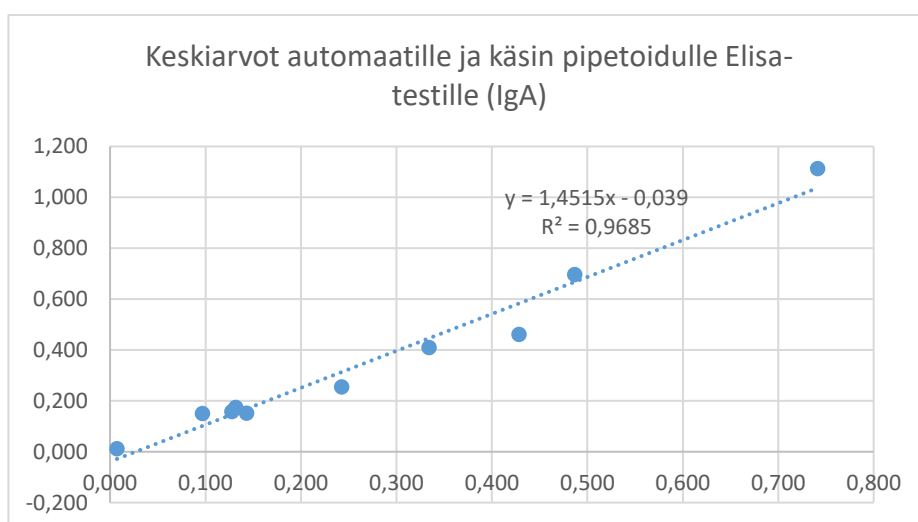
Kuva 18. Pisteet kertovat näytteiden keskiarvoja, jotka ovat hyvin lineaarisesti suoralla.

Kuvassa 19 on kuvattu automaattissa käytettävät laimennossarjat, joita vertaillaan käsinpipetointimenetelmän laimennossarjaan. Elisa-levy on IgA. Näytteet ovat samanlaisia, vaikka ne onkin mitattu eri menetelmillä. Keskihajonta on pientä suurimmalla osalla näytteistä.



Kuva 19. Automaatin ja käsinpipetointimenetelmän eroavaisuudet.

Kuvassa 20 on kuvattu automaattilla ja käsinpipetointimenetelmällä mitattujen Elisa-testi levyjen keskiarvojen samankaltaisuutta. Hyvä korrelaatio molempien menetelmien välillä. Pisteet kertovat näytteiden keskiarvoja, jotka ovat lineaarisesti suoralla.



Kuva 20. Korrelaatio on hyvä molempien menetelmien välillä.

## 10 Tulosten tarkastelu

### 10.1 IgG-levyn tulokset automaattilla ja manuaalisella menetelmällä

*Käsin pipetoitu menetelmä:* Seeruminäytteiden laimennossuhde on 1:100. Näytteiden keskiarvoissa on hajontaa. Tämä kertoo Elisa-levyjen eroista, jotka johtuvat pipetointitarkkuudesta. Keskihajonnassa on pieniä eroja näytteiden välillä. Näytteissä 11, 32, 40, 79 ja 105 on hyvin pienet erot keskiarvon ja keskihajonnan välillä. Tämä kertoo siitä, että näytteet on pipetoitu tasaisesti. Kaikkien levyjen keskiarvot ovat hyvin lähellä toisiaan, kun jokaisesta levystä on laskettu eri näytteille omat keskiarvonsa. Näytteillä 4, 75 ja 87 keskihajonta on hieman suurempi kuin muissa näytteissä. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 4, 75 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 11, 32, 40, 79 ja 105. Katso Taulukko 2 ja Kuva 7.

Korrelaatiokerroin on 0,0008. Kerroin on huono, koska se ei ole lähelläkään arvoa 1. Pisteet kertovat näytteiden keskiarvoja. Pisteet ovat epätasaisesti kaaviossa. Keskiarvopisteet eivät ole lineaarisesti suoralla. Katso Kuva 8.

*Automaatti:* Laimennos on sama, jota käytettiin manuaalisessa menetelmässä. Laimennosta vertaamalla sarjan 3 ja 4 laimennoksiin löydetään sopiva laimennossarja, jota käytetään jatkossa automaattia käytettäessä. Laimennossuhteet ovat seuraavanlaiset: sarja 3 on 1:125, sarja 4 on 1:150 ja vertailulaimennos on 1:100. Sarja 3 on lähempänä vertailtavaa laimennosta kuin sarja 4. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 4, 75 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 11, 32, 40, 79 ja 105. Katso Taulukko 4 ja Kuva 11.

Keskihajonta on pieni näytteissä jokaisessa näytteen kohdalla. Mitatut muuttujat ovat samansuuruisia keskenään. Etäisyys keskiarvon ja keskihajonnan välillä on pieni, joten muuttujat ovat keskenään melko samansuuruisia. Näytteiden pylväät ovat hyvin tasaisesti lähellä toisiaan. Laimennos 3 on vertailulaimennoksen kanssa samankaltaisia. Keskihajonta on hyvin pieni, jokaisessa näytteessä. Laimennossarja 3:n korrelaatiokerroin on 0,9975. Sarja 4:n kerroin on 0,9926. Molempien sarjojen kertoimet ovat erinomaiset, koska sarjat ovat lähellä arvoa 1. Kummankin sarjan keskiarvot pisteinä ovat lineaarisesti suoralla. Pisteet ovat suoran lähellä. Katso Kuva 12 ja Kuva 13.

*Automaatti ja käsinpipetointimenetelmän vertailu:* Elisa-testin näytteiden absorbanssien arvot eroavat toisistaan, kun ne on mitattu eri menetelmällä. Automaatilla tulee korkeampia arvoja näytteiden keskiarvoihin kuin käsin pipetoinnissa. Molempien menetelmien välillä on hyvä korrelaatio. Automaatin sekä manuaalisen Elisa-testin keskiarvot menevät lineaarisesti pisteinä taulukossa 10. Korrelaatiokerroin on 0,9453. Kerroin on hyvä, koska se on lähellä arvoa 1, mikä kertoo Elisa-testin onnistumisesta. Absorbanssien keskiarvot automaatilla ovat korkeampia kuin manuaalisella menetelmällä saadut keskiarvot. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 4, 11, 75 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 32, 40, 79 ja 105. Katso Kuva 17 ja Kuva 18.

Näytteillä on pieni keskihajonta sekä automaatilla ja manuaalisella menetelmällä. Automaatilla ja käsin pipetoimalla saadut tulokset ovat tasaisia, mikä kertoo Elisa testien taseisuudesta. Kun keskihajonta on pieni, mitatut muuttujat eli näytteet ovat keskenään samansuuruisia. Näytteiden 32, 40, 79 ja 105 keskihajonnat ovat erityisen pieniä kummassakin sarjassa automaatti- ja manuaalinenmenetelmä. Näytteillä 4, 11, 75 ja 87 on hiukan suuremmat erot kuin näytteillä 32, 40, 79 ja 105. Erot voivat johtua pipetointitarkkuudesta. Katso Kuva 17 ja Kuva 18.

## 10.2 IgA-levyn tulokset automaatilla ja manuaalisella menetelmällä

*Käsinpipetoitumenetelmä:* Seeruminäytteiden laimennossuhde on 1:100. Näytteiden keskiarvoissa on hajontaa. Tämä kertoo Elisa-levyjen eroista, jotka johtuvat pipetointitarkkuudesta. Keskihajonnassa on pieniä eroja näytteiden välillä. Näytteiden 4, 11, 32, 40, 79 ja 105 on hyvin pienet erot keskiarvon ja keskihajonnan välillä. Kaikkien levyjen keskiarvot ovat hyvin lähellä toisiaan, kun jokaisesta levystä on laskettu eri näytteille omat keskiarvonsa. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 75, 79 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 4, 11, 32, 40 ja 105. Katso Taulukko 3 ja Kuva 9.

Korrelaatiokerroin on 0,0539. Kerroin on huono, koska se ei ole lähellä arvoa 1. Pisteet kuvaavat näytteiden keskiarvoja. Pisteet ovat epätasaisesti kaaviossa. Keskiarvopisteet eivät ole lineaarisesti suoralla. Katso Kuva 10.

*Automaatti:* Laimennos on sama, jota käytettiin manuaalisessa menetelmässä. Laimennosta vertaamalla sarjan 3 ja 4 laimennoksiin löydetään sopiva laimennossarja, jota käytetään jatkossa automaattia käytettäessä. Laimennossuhteet ovat seuraavanlaiset: sarja 3 on 1:125, sarja 4 on 1:150 ja vertailulaimennos on 1:100. Sarja 3 on lähempänä vertailtavaa laimennosta kuin sarja 4. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 4, 75, 79 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 11, 32, 40 ja 105. Katso Taulukko 5 ja Kuva 14.

Keskihajonta on pieni näytteissä 4, 11, 32 ja 40. Mitatut muuttujat ovat keskenään melko samansuuruisia. Etäisyys keskiarvon ja keskihajonnan välillä on pieni, joten muuttujat ovat keskenään melko samansuuruisia. Näytteiden 75, 79, 87 ja 105 keskihajonta on suuri. Muuttujat eivät ole keskenään samankokoisia. Näyte 75:n pylväät ovat erikokoisia ja keskihajonta on hyvin suuri. Näytteiden 79, 87 ja 105 pylväät ovat tasaisempia ja keskihajonnassa ei ole suuria eroja. Katso Kuva 15 ja Kuva 16.

*Automaatti ja käsinpipetointimenetelmän vertailu:* Näytteiden absorbanssien arvot ovat hyvin samankaltaisia, vaikka ne on mitattu eri menetelmillä. Automaatilla ja käsin pipetoidulla menetelmällä saatiin hyvin samanlaisia tuloksia. Keskiarvoista saadut pylväät ovat lähellä toisiaan. Automaatin keskiarvot ja käsin pipetoimalla saadut keskiarvot menevät pisteinä lineaarisesti. Pisteet ovat sijoittuneet tasaisesti suoralle. Korrelaatiokerroin on 0,9685, joka on hyvä arvo. Kerroin on hyvä, koska se on lähellä arvoa 1. Keskiarvot automaatilla ovat hiukan pienempiä kuin käsin pipetoimalla saadut keskiarvot, koska automaatti on tarkempi menetelmä kuin käsin pipetointi. Käsin pipetoimalla voi tulla pipetointivirheitä enemmän. Keskiarvot ovat korkeimmat näytteissä 4, 75, 79 ja 87. Matalat keskiarvot ovat näytteillä 11, 32, 40 ja 105. Katso Kuva 17 ja Kuva 18.

Näytteillä 4, 11, 32, 40, 79 ja 105 on pieni keskihajonta sekä automaatilla ja manuaalisella menetelmällä. Automaatilla ja käsin pipetoimalla saadut tulokset ovat tasaisia, mikä kertoo Elisatestien tasaisuudesta. Manuaalisen menetelmän palkit ovat hiukan matalampia kuin automaatin palkit. Palkit kertovat kaikkien mitattujen Elisa-levyjen keskiarvot. Näytteillä 75 ja 87 on keskihajonnoilla sekä myös keskiarvoilla eroa. Katso Kuva 17 ja Kuva 18.

## 11 Johtopäätökset ja jatkotoimenpiteet

Insinööriyön tarkoituksena oli saada korvattua käytössä olevat vanhat menetelmät. Työssä otettiin käyttöön Dynexin DS2 Elisa -automaatti. Laite tekee kaikki työssä tarvittavat pipetoinnit sekä myös mittaa tulokset. Tutkimusta tehdään rinnan vanhalla menetelmällä eli käsin pipetoimalla ja uudella menetelmällä, DS2-automaatilla.

Tavoite 1: Voidaanko saada vanhaan systeemiin verrattavia tuloksia käyttämällä yhtä laimennosta/näyte? Vanhaan systeemiin verrattavia tuloksia saadaan uudella Elisa-automaatilla. Automaatilla saatuja levyn tuloksia lasketaan kahden kuopan keskiarvona, kun aikaisemmin vanhalla menetelmällä laskettiin neljän kuopan keskiarvona tulokset. Työssä testattiin kahta eri laimennosta, Sarja 3:a (1:125) ja Sarja 4:ää (1:150), joita verrattiin laimennossarjaan, jota käytetään käsin pipetoinnissa (1:100). Sarja 3:n laimennos on kaikkein lähimpänä laimennosta, jota verrataan vanhan menetelmän laimennokseen. Reagenssien sekä tarvikkeiden säästäminen ja näytteiden nopeampi analysointi ovat merkittäviä etuja automaattia käytettäessä Elisa-testeissä.

Tavoite 2: Voiko levyt päällystää useammalla bakteerilla, esim. kolmella bakteerilla yhden sijaan. Täytyy varmistaa levyjen huolellinen valmistus sekä muodostaa analyysissä käytetyt protokollat kaikille levyillä oleville bakteereille sopiviksi. Emme päässeet kokeilemaan Elisa-levyn päällystämistä useammalla bakteerilla aikataulusyiden vuoksi. Levyt on päällystetty yhdellä bakteerilla, joka on Pg. Tutkittavien näytteiden sulatuskertojen vähentäminen ja tulosten tasaisuuden parantaminen on menetelmän etu, joka onnistui Elisa-testejä tehdessä.

Biomedicumien Suu- ja leukasairauksien osastolla voidaan ottaa Elisa DS2 -automaatti käyttöön. Automaatti nopeuttaa työskentelyä ja on tarkempi menetelmä kuin käsinpipetointitesti. Elisa-testissä käytettävät näytteet on laimennettava itse, koska automaatti ei tee sitä. Kun laimennokset valmistetaan, saadaan kaikille näytteille sama laimennosuhde. Biomedicumilla voidaan jatkossa tehdä Elisa-testejä muiden bakteerilajien kanssa.

## Lähteet

- 1 Pietiäinen, Milla. 2019. Insinööriyön suunnitelma. HY, Suu- ja leukasairaudet. Luettu 11.11.2019
- 2 Nyberg, Rosa. 27.8.2016. Lipopolysakkaridin merkitys ihmisen parodontaalilehduksessa, Tutkielma, HLK, HY, Lääketieteellinen tiedekunta, Helsinki
- 3 Salminen, Aino; Kopra, Elisa; Lähderanta, Laura; Liljestrand, John & Paju Susanna. Suun infektioiden sekä sydän- ja verisuonisairauksien yhteys. Suu- ja leukasairaudet, Helsingin yliopisto, Helsingin yliopistollinen sairaala. Yliopiston sisäinen dokumentti.
- 4 Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti; Järvinen, Asko; Meri, Seppo; Vaara, Martti (toim.). Immunologia; Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Duodecim painos 2011.
- 5 Kauhaniemi, Mari. 2019. Parodontiitti on yhteydessä sydämen terveyteen. Verkkoaineisto. <https://sydan.fi/fact/parodontiitti-ja-sydanterveys/> . 2.4.2019. Luettu 6.4.2020.
- 6 Parodontiitti. Verkkoaineisto. Kotihammas. <https://www.kotihammas.fi/hammas-hoitopalvelut/suun-terveys/parodontiitti.html> . Luettu 6.4.2020.
- 7 Parodontiitti irrottaa hampaat. Verkkoaineisto. Plusterveys Turun hammaskulma. <http://www.hammaskulma.com/tietoa-suun-terveydesta/parodontiitti/> . Luettu 6.4.2020.
- 8 Liljestrand, John M.; Paju, Susanna; Pietiäinen, Milla; Buhlin, Kåre; Persson, G. Rutger; Nieminen, Markku S.; Sinisalo, Juha; Mäntylä, Päivi & Pussinen, Pirkko J. Atherosclerosis immunologic burden links periodontitis to acute coronary syndrome. Science direct. Luettu 12.1.2020
- 9 Iensairauksien hoito eli parodontologinen hoito. Verkkoaineisto. Nordic Ham-bakliinik. <http://nhk.ee/fi/hambaravi-tallinnas/hammaslaakaripalvelut/igeme-haiquste-ravi>. Luettu 12.1.2020
- 10 Könönen, Eija; Nuutinen, Erja; Pöllänen, Marja; Suomalainen, Kimmo & Ylöstalo, Pekka. Parodontiitti. Käypä hoitosuositus. Duodecim 2017.
- 11 Kauhaniemi, Mari. 2019. Parodontiitti on yhteydessä sydämen terveyteen. Verkkoaineisto. <https://sydan.fi/fact/parodontiitti-ja-sydanterveys/> . Luettu 6.4.2020.

- 12 7 asiaa, jotka kannattaa tietää parodontiitista. Verkkoaineisto. Amemori. <https://fi.webdento.com/parodontiitti/> . Luettu 6.4.2020.
- 13 Parodontiitti. Verkkoaineisto. Kotihammas. <https://www.kotihammas.fi/hammas-hoitopalvelut/suun-terveys/parodontiitti.html> . Luettu 6.4.2020.
- 14 Tietopankki. C-reaktiivinen proteiini, CRP herkkä (S-hsCRP) ja CRP (S-CRP). Verkkoaineisto. Synlab. <https://www.synlab.fi/tietopankki/c-reaktiivinen-proteiini-crp-herkka-s-hs-crp-ja-crp-s-crp/> . Luettu 6.4.2020
- 15 Ketola Kinnula, Tanja; Pussinen, Pirkko & Seppänen, Riitta. 2015. Suun infektioiden vaikutus yleisterveyteen. Suomen lääkärilehti 2015 vol.70 no.45 s. 3015-3022
- 16 Sonninen, Katja. 2015. Hampaat: aikuisella on 32 hammasta. Verkkoaineisto. Avainapteekit. <https://www.avainapteekit.fi/terveys/suu-ja-hampaat/hampaat-aikuisella-on-32-hammasta> . 16.11.2015. Luettu 6.4.2020.
- 17 Hampaisto – rakenne ja toiminta. Verkkoaineisto. Suomen Hammaslääkäriiliitto. <https://www.hammaslaakariliitto.fi/fi/suunterveys/yleistietoa-suunterveydesta/hampaisto-rakenne-ja-toiminta#.XirN6SNS9PY>. Luettu 6.4.2020.
- 18 Pysyvät hampaat. Verkkoaineisto. Päijät-Hämeen hyvinvointiyhtymä. <https://www.phhyky.fi/fi/terveyspalvelut/suun-terveydenhuolto/lapsen-hampaat/katso-myos/pysyvät-hampaat/> . Päivitetty 7.12.2018. Luettu 6.4.2020.
- 19 Uitto, Veli-Jukka; Nylund, Karita & Pussinen, Pirkko. Suun mikrobien yhteys yleisterveyteen. vol. 128 no. 12 s. 1232-1237. Duodecim 2012.
- 20 Meurman, Jukka H & Ruokonen, Hellevi. 2018 (17/2018). Mitä lääkärin tulee tietää parodontiitista? Verkkoaineisto. Medic. Lääkärilehti. <https://www-laakari-lehti-fi.ezproxy.metropolia.fi/tieteessa/katsausartikkeli/mita-laakarin-tulee-tietaa-parodontiitista/> . 27.4.2018. vsk 73, s.1051-1054. Luettu 6.4.2020
- 21 Heiskanen, Vladimir. 2017. Seerumin lipopolysakkaridiaktiivisuus ja parodontiitibakteerien vasta-aineet sydäninfarktissa: tapaus – verokkitutkimus. Tutkielma. Lääketieteellinen tiedekunta. Helsingin yliopisto. Helda-tietokanta.
- 22 Eskelinen, Seija. 2016. Leukosyytit (fB-Leuk). Aiemmat kirjoittajat Mustajoki, Pertti & Kaukua, Jarmo. Verkkoaineisto. Laboratoriotutkimusten tulkinta. Duodecim Terveyskirjasto. [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_arikkeli=snk03034](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_arikkeli=snk03034) . Päivitetty 30.8.2016. Luettu 6.4.2020



- 23 Honkala, Sisko. 2019. Sylki ja sylkirauhaset. Verkkoaineisto. Duodecim Terveyskirjasto. [https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p\\_artikkeli=trv00009](https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=trv00009) . 19.12.2019. Luettu 6.4.2020.
- 24 Sylki – hampaiston puolustaja. Verkkoaineisto. Suomen Hammaslääkäriliitto. <https://www.hammaslaakariliitto.fi/fi/suunterveys/yleistietoa-suunterveydesta/suun-ja-hampaiden-rakenne-kehittyminen-ja-toiminta/sylki#.XetrcvxS9PY> . Luettu 6.4.2020.
- 25 Mitä suun kuivuminen eli kserostomia aiheuttaa? Verkkoaineisto. Amemori. <https://fi.webdento.com/suun-kuivuminen-kuiva-suu/> . Luettu 6.4.2020.
- 26 Kuiva suu. Verkkoaineisto. Kotihammas. <https://www.kotihammas.fi/hammas-hoitopalvelut/suun-terveys/kuiva-suu.html> . Luettu 6.4.2020.
- 27 Suomen Hammaslääkärilehti. Hammaslääkäri 1.2.2019 (2/19). [https://www.lehtiluukku.fi/lehti/hammaslaakarilehti/read/02\\_2019/202874.html](https://www.lehtiluukku.fi/lehti/hammaslaakarilehti/read/02_2019/202874.html) . 1.2.2019. Luettu 6.4.2020.
- 28 Eskelinen, Seija. 2016. Veren aineosat. Verkkoaineisto. Laboratoriotutkimusten tulkinta. Duodecim Terveyskirjasto. Aiemmat kirjoittajat Mustajoki, Pertti & Kaukua, Jarmo. Verkkoaineisto. [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk02011](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02011) . 6.5.2016. Luettu 6.4.2020
- 29 Janatuinen, Emmi. 2015. Western Blot- ja Elisa-menetelmät mikrobiologian laboratoriossa, Opinnäytetyö. Savonia-Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 30 Laboratorioanalyysit - analyysimenetelmät. Verkkoaineisto. Opetushallitus. [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_1\\_johdanto.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_1_johdanto.html) . Luettu 6.4.2020
- 31 Pussinen, P. J; Vilkkuna-Rautiainen, T; Alfthan, G; Mattila, K. & Asikainen, S. 2001. Multiserotype enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic aid for periodontitis in large-scale studies Multiserotype enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic aid for periodontitis in large-scale studies.
- 32 Pussinen, Pirkko. Elisa-testin työohje. Biomedicum. Helsingin yliopisto. Suu- ja leukasairauksien osasto.
- 33 Torvi, Paula. 2015. Parodontiitin biomarkkerit syljessä. Tutkielma. Lääketieteellinen tiedekunta. Helsingin yliopisto. Helda-tietokanta.
- 34 Principle of ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Test. Verkkoaineisto. Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=Elisa-how-it-works> . Luettu 6.4.2020.

- 35 Principle of ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Test. Verkkoaineisto. Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=Elisa-how-it-works> . Luettu 6.4.2020
- 36 Dynex Technologies. DS2 Automated Elisa System, Operator´s Manual. Ohjekirja. Google.fi.
- 37 Kivimäki, Anne. 2020. Laboratoriokoordinaattori. Biomedicum. Suu- ja leukasairauksien osasto. Helsinki. Haastattelu tulosten laskemisesta. Keskustelu 13.11.2019.

## Käsin pipetoidut Elisa-levyt

Käsin pipetoidut IgA-levyn keskiarvot, jokaiselta levyltä

Keskiarvot 4 kuopasta, korjauskertoimella										
	4.12.2019		5.12.2019		9.12.2019		10.12.2019		11.12.2019	
Näyte	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
4	0,436	0,497	0,424	0,435	0,324	0,427	0,447	0,443	0,337	0,330
11	0,232	0,251	0,147	0,119	0,132	0,166	0,123	0,152	0,105	0,086
32	0,235	0,192	0,131	0,150	0,136	0,119	0,155	0,123	0,150	0,126
40	0,252	0,375	0,153	0,159	0,150	0,155	0,109	0,161	0,117	0,123
75	1,087	1,670	1,107	1,135	0,754	1,305	1,042	1,158	0,798	1,075
79	0,410	0,887	0,475	0,660	0,384	0,513	0,419	0,451	0,326	0,520
87	0,812	0,941	0,637	0,657	0,561	0,748	0,547	0,777	0,524	0,763
105	0,200	0,213	0,122	0,161	0,014	0,143	0,084	0,119	0,111	0,169
Wilma	0,259	0,259	0,252	0,252	0,279	0,279	0,314	0,314	0,170	0,170
Baby	0,029	0,029	0,017	0,017	0,005	0,005	0,011	0,011	0,003	0,003

Käsin pipetoitu IgG-levyn keskiarvot, jokaiselta levyltä

Keskiarvot 4 kuopasta, korjauskertoimella										
	4.12.2019		5.12.2019		9.12.2019		10.12.2019		11.12.2019	
Näyte	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
4	0,757	0,527	0,646	0,627	0,712	0,701	0,436	0,455	0,523	0,455
11	0,484	0,103	0,334	0,331	0,378	0,342	0,290	0,280	0,273	0,258
32	0,330	0,042	0,194	0,170	0,325	0,270	0,202	0,199	0,238	0,216
40	0,304	0,100	0,222	0,216	0,272	0,230	0,142	0,154	0,190	0,171
75	0,862	0,187	0,683	0,714	0,774	0,812	0,511	0,531	0,484	0,475
79	0,171	0,057	0,130	0,133	0,180	0,157	0,108	0,135	0,133	0,131
87	1,071	0,267	0,839	0,946	1,121	1,075	0,648	0,700	0,798	0,657
105	0,254	0,078	0,142	0,134	0,174	0,145	0,094	0,121	0,162	0,128
Wilma	0,097	0,097	0,297	0,297	0,234	0,234	0,337	0,337	0,134	0,134
Baby	0,059	0,059	0,208	0,208	0,206	0,206	0,278	0,278	0,101	0,101

## Automaatilla pipetoidut Elisa-levyt IgA

### Automaatilla tehty IgA-levy

Keskiarvot 2 kuopasta, korjauskertoimella									
	8.1.2020			13.1.2020			15.1.2020		
Näyte	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4
4	0,366	0,243	0,232	0,326	0,351	0,239	0,332	0,354	0,241
11	0,153	0,080	0,082	0,120	0,114	0,074	0,125	0,098	0,062
32	0,168	0,079	0,090	0,117	0,110	0,086	0,123	0,102	0,083
40	0,143	0,085	0,118	0,117	0,109	0,109	0,119	0,109	0,093
75	0,769	0,511	0,634	0,775	0,802	0,638	0,811	0,873	0,586
79	0,523	0,318	0,349	0,421	0,407	0,312	0,460	0,480	0,346
87	0,521	0,335	0,367	0,486	0,470	0,450	0,515	0,540	0,433
105	0,115	0,083	0,102	0,091	0,114	0,076	0,097	0,087	0,079
Wilma	0,151	0,058	0,140	0,227	0,231	0,192	0,272	0,267	0,235
Baby	0,008	0,008	0,006	0,006	0,016	0,014	0,007	0,013	0,009

	20.1.2020			21.1.2020		
Näyte	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4
4	0,243	0,221	0,181	0,406	0,318	0,332
11	0,104	0,061	0,051	0,136	0,097	0,085
32	0,095	0,056	0,048	0,164	0,118	0,100
40	0,115	0,068	0,073	0,163	0,106	0,103
75	0,528	0,451	0,396	0,824	0,725	0,657
79	0,265	0,208	0,204	0,473	0,333	0,359
87	0,348	0,284	0,290	0,563	0,523	0,464
105	0,070	0,052	0,051	0,112	0,090	0,081
Wilma	0,333	0,433	0,315	0,231	0,274	0,184
Baby	0,010	0,032	0,014	0,005	0,004	0,007

## Automaatilla pipetoidut Elisa-levyt IgG

### Automaatilla valmistettu IgG-levy

Keskiarvot 2 kuopasta, korjauskertoin									
	8.1.2020			13.1.2020			15.1.2020		
Näyte	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4
4	1,161	0,917	0,768	1,306	1,303	1,168	1,251	1,310	1,228
11	0,789	0,544	0,468	0,850	0,863	0,681	0,807	0,780	0,731
32	0,465	0,336	0,273	0,449	0,487	0,371	0,407	0,442	0,455
40	0,471	0,318	0,297	0,446	0,433	0,353	0,464	0,462	0,516
75	1,440	1,085	1,001	1,592	1,639	1,498	1,539	1,666	1,472
79	0,292	0,228	0,180	0,304	0,387	0,236	0,298	0,327	0,312
87	1,636	1,299	1,090	1,754	1,906	1,751	1,728	1,978	1,969
105	0,290	0,209	0,199	0,241	0,305	0,266	0,263	0,253	0,318
Wilma	0,474	0,027	0,265	0,762	0,811	0,713	0,595	0,649	0,548
Baby	0,446	0,110	0,326	0,968	0,993	0,810	0,734	0,643	0,649

	20.1.2020			21.1.2020		
Näyte	keskiarvo	sarja 3	sarja 4	keskiarvo	sarja 3	sarja 4
4	1,082	1,034	0,860	1,255	1,281	1,128
11	0,673	0,558	0,446	0,819	0,792	0,657
32	0,452	0,337	0,283	0,483	0,437	0,367
40	0,424	0,335	0,314	0,479	0,400	0,415
75	1,208	1,084	0,928	1,453	1,427	1,253
79	0,199	0,163	0,144	0,306	0,271	0,239
87	1,391	1,246	1,131	1,758	1,724	1,580
105	0,220	0,188	0,161	0,262	0,236	0,223
Wilma	0,815	0,835	0,744	0,463	0,545	0,464
Baby	0,505	0,554	0,492	0,520	0,579	0,491