

Prokalsitoniini-pikatestin sovel- tuvuus vakavien infektioiden diagnostiikassa

Juho Soininen

OPINNÄYTETYÖ
Elokuu 2020

Bioanalytiikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikka

SOININEN, JUHO

Prokalsitoniini-pikatestin soveltuvuus vakavien infektioiden diagnostiikassa

Opinnäytetyö 29 sivua, joista liitteitä 0 sivua
Elokuu 2020

Sepsis on bakteeriperäinen ihmisen veressä oleva tulehdus, joka hoitamattomana voi johtaa sairastavan ihmisen kuolemaan. Vaikka potilas ei kuolisikaan, sepsis aiheuttaa joka tapauksessa laajoja elinvaurioita. Siihen kuolee vuosittain Suomessa 15 % infektion saaneista potilaista ja tämä luku sisältää asianmukaista hoitoa saaneet henkilöt. Maailmalla keskimääräinen kuolleisuusprosentti sepsiksessä on noin 30 %. Sepsiksen ennusteeseen ja hoidettavuuteen vaikuttaa ensisijaisesti se, kuinka nopeasti se voidaan diagnosoida ja hoito aloittaa. Mitä nopeammin hoito saadaan aloitettua, sitä parempi ennuste potilaalle on.

Diagnostiikassa käytetään nykyisin prokalsitoniini-biomarkkeria, joka on bakteeriperäisissä tulehduksissa erittyvä hormoni ja näin ollen spesifisempi kuin C-reaktiivinen proteiini. Prokalsitoniinia alkaa erittymään elimistöön myös nopeammin kuin C-reaktiivinen proteiini, joten prokalsitoniinia mittaamalla saadaan sepsis diagnosoitua nopeammin.

Seinäjoen keskussairaalan laboratoriossa on käytössä immunokemiallinen menetelmä prokalsitoniinin mittaukseen, mutta näytteen kirjauksessa, kulussa radan läpi ja itse mittauksessa kuluu useampi tunti. Tämän takia ratamenetelmän rinnalle on hankittu B.R.A.H.M.S- pikatestilaitteita, joilla voidaan mitata prokalsitoniini potilaan sormenpäästä otetulla näytteellä nopeasti. Ennen käyttöönottoa pikatestilaitteiden soveltuvuus piti tarkistaa. Tämä tehtiin vertailemalla pikatesteillä saatuja tuloksia ratamenetelmällä saatuihin tuloksiin. Näytteinä pikatesteissä käytettiin EDTA-putkiin otettuja näytteitä, jotka oli otettu potilailta samankaltaisesti ratamenetelmään sopivan näytteen kanssa.

Pikatestilaitteella saatujen tulosten korrelaatio ratamenetelmän tulosten kanssa oli 0,90, eli tulokset olivat yhteneväisiä toistensa kanssa. Saatujen tulosten perusteella laitteiden testauksessa voitiin siirtyä seuraavaan vaiheeseen, eli ottamaan näytteitä suoraan potilaista osastoilla.

Asiasanat: prokalsitoniini, C-reaktiivinen proteiini, sepsis

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Bioanalytics

SOININEN, JUHO

The feasibility of point of care test for procalcitonin in the diagnosis of severe infections

Bachelor's thesis 29 pages, appendices 0 pages
August 2020

Sepsis is a bacterial infection in a person's bloodstream, which, if left untreated, can easily lead to the affected individual's death. Even if the infection does not lead to the patient's death, sepsis will cause extensive organ damage. In Finland, around 15 % of all patients with sepsis, including those receiving appropriate treatment, die. The worldwide average rate for sepsis mortality is about 30%. The most significant contributing factor in sepsis prognosis and treatment is how fast the infection can be diagnosed and the treatment started. The faster the start of the treatment is, the better the patient's prognosis.

Currently in diagnosis the biomarker for sepsis is procalcitonin, which is a peptide that is secreted into the bloodstream during bacterial infections and is therefore more specific than C-reactive protein. The secretion also starts earlier in the infection than that of CRP, which allows sepsis to be diagnosed earlier.

In the laboratory of Seinäjoki Central Hospital, an immunochemical method for the measurement of procalcitonin is already in place, but with this method it takes several hours for the sample to be logged, for the sample to travel through the track and to be analyzed. That is why B.R.A.H.M.S.-point-of-care test devices, which can be used to measure procalcitonin far more quickly from samples collected from the patients' fingertips, were acquired. Before their introduction, the viability of the devices needed to be verified. This was done by comparing results from the track method to the results acquired with the new devices. The samples used in the tests were blood samples collected in EDTA-vials that were taken simultaneously with the sample for the track method.

After 60 samples had been analyzed and compared, the correlation between the results from the point-of-care devices and the track method was 0,90. As such, the results were in the same range. Based on these results, the next phase of testing, where the devices would be moved to the wards and tested with samples taken directly from patients, could be started.

Key words: sepsis, C-reactive protein, procalcitonin

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	Teoria.....	7
2.1	Prokalsitoniini ja sen merkitys diagnostiikassa.....	7
2.2	Prokalsitoniinin mittauksessa käytetyt määrittämenetelmät.....	9
2.2.1	B.R.A.H.M.S PCT Tuotemerkki	9
2.2.2	Immunokromatografia ja B.R.A.H.M.S PCT Direct-laite	10
2.2.3	Elektrokemiluminenssi ja COBAS 8500.....	13
2.3	Kvantitatiivinen analyysi laitetestauksessa.....	15
3	Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus	17
4	Testauksen kulku ja raportointi	18
4.1	Testauksen suunnittelu	18
4.2	Testaukseen otettavien näytteiden laatuvaatimukset.....	18
4.3	Testauksen toteutus.....	19
5	Tulokset ja tulkinta	21
5.1	Potilasnäytteet.....	21
5.2	Toistettavuus ja käytettävyys	21
6	Johtopäätökset.....	24
7	POHDINTA	25
	LÄHTEET	28

ERITYISSANASTO

Sandwich	Menetelmä tai molekyylikompleksi, jossa analyytti jää kahden eri reagenssin väliin
Sepsis	Verenkierrossa leviävä ja kasvava infektio
Immunokromatografia	Molekyylien immunologisiin ominaisuuksiin perustuva kromatografinen menetelmä
Biomarkkeri	Elimistön tietyn taudin yhteydessä erittämä aine tai yhdiste, jonka perusteella tauti voidaan todeta

1 JOHDANTO

Ihmisen terveydestä huolehtiminen on tehtävä, joka voi parhaimmissakin tapauksissa olla suuri haaste. Joka päivä ihmiset altistuvat erilaisille taudinaiheuttajille ja muille terveyttä vaarantaville tekijöille. Taudinaiheuttajia vastaan elimistöllä on jo valmiiksi olemassa omat puolustuskeinot, mutta joskus tämä puolustus pettää. Yksi vaarallisimmista tällaisista tapauksista on sepsis eli verenmyrkytys. Verenmyrkytyksessä haavan, kuten leikkaushaavan tai pistohaavan, kautta pääsee verenkiertoon bakteereja, jotka lähtevät lisääntymään siellä. Sepsis pitää tunnistaa ja hoitaa nopeasti, koska hoitamattomana se johtaa laajaan elinvaurioon. Sepsiksen nopeaa tunnistamista varten Seinäjoen keskussairaalalle tehtiin tutkimus prokalsitoniini-pikatestilaitteesta. Prokalsitoniini on elimistössä bakteeritulehdusten yhteydessä erittyvä aine, jonka pitoisuutta seuraamalla voidaan todeta potilaan sepsis. Työn tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko kyseinen laite sepsiksen pikatestaukseen. Soveltuvuutta arvioitiin vertailemalla laitteella saatuja tuloksia toisella, jo testatulla laitteella, saatuihin tuloksiin.

Ennen BRAHMS-pikatestilaitteen hankintaa Seinäjoen keskussairaalalla oli jo käytössä immunokemiallinen laboratoriomenetelmä prokalsitoniinin mittaamiseen, mutta kyseinen tutkimus pitää suorittaa laboratoriossa ja analyysin tekemiseen menee paljon aikaa. Analysoitava näyte pitää myös ottaa suoniverinäytteenä. Näytteen kulussa esikäsittelystä vastaukseen kestää päivystysnäytteenäkin lähes tunti. Pikatestillä prokalsitoniinia voidaan mitata nopeammin. Pikatestille suunniteltua analysaattoria voitaisiin myös käyttää osastolla, mikä nopeuttaisi diagnoosia vielä entisestään. Otettaessa uutta testiä käyttöön sen toimivuus tulee kuitenkin aina testata ennen käyttöönottoa. Tutkimuksessa toimivuutta testattiin vertaamalla näitä kahta menetelmää keskenään. Laboratorioon tuoduista näytteistä mitattiin sekä laboratoriomenetelmällä että pikatestilaitteella prokalsitoniini-pitoisuus ja näitä verrattiin toisiinsa.

Näytteistä saatujen tulosten perusteella laitteen tarkkuus ja soveltuvuus toivottuun tarkoitukseen pystyttiin määrittämään. Laitteen tarkkuuden lisäksi testattiin käytön mukavuutta ja helppoutta, jotka ovat tärkeitä osatekijöitä nopeiden tulosten saamiseksi.

2 Teoria

2.1 Prokalsitoniini ja sen merkitys diagnostiikassa

Prokalsitoniini (PCT) on peptidi, josta muodostuu kalsiumin homeostaasissa käytettävää hormonia kalsitoniinia. Kyseinen proteiini koostuu 116 aminohaposta ja sen molekyylipaino 14,5 kDa. Molekyyli luokitellaan kalsitoniinimolekyylien sukuun ja sen rakenteen toiminnalliset alueet ovat aminoterminen epäkypsä kalsitoniini ja kalsitoniinin karboksyyli terminen peptidi (Deftos, L. J., Roos, B. A., & Parthemore, J. G. 1975). Tarkkaa rakennetta prokalsitoniinille ei vielä tunneta, koska sen kristallirakennetta ei ole saatu vielä selvitettyä (Floriańczyk, Bolesław. 2003). Terveessä henkilössä prokalsitoniinin määrä verenkierrossa on hyvin alhainen (alle 0,1 µg/L) (thermoscientific B.R.A.H.M.S. Direct 2019). Sitä on parafollikkelisoluissa, kilpirauhasissa ja neuroendokriinisissä soluissa, joissa se myös muunnetaan aktiiviseksi kalsitoniini-hormoniksi. Muunnoksen takia prokalsitoniinin määrä elimistössä on terveillä ihmisillä alhainen. Tulehdusreaktiossa prokalsitoniinin tuotanto ja kypsymisreaktio häiriintyvät ja PCT:n määrä verenkierrossa lähtee kasvuun.

Häiriöttömässä kalsitoniinin tuotannossa CALC-1-hormonia (prokalsitoniinin esimuoto) alkaa muodostua kalsiumin määrän noustessa elimistön endokriinisissa soluissa. Tämä tyroïdinen PCT muunnetaan soluissa peptideiksi ja kypsäksi kalsitoniiniksi. Kalsitoniini varastoituu rauhasiin, joista sitä päästetään elimistöön kalsiumin määrän säätelyä varten (Jeon, K., Suh, J. K., Jang, E. J., Cho, S., Ryu, H. G., Na, S., Hong, S. B., Lee, H. J., Kim, J. Y., & Lee, S. M. 2019). Prokalsitoniinin määrän kasvu veressä on spesifinen bakteereista johtuvilla tulehdusreaktioilla. Viruksista, parasiiteista ja sienistä aiheutuvat infektiot eivät lauke kalsitoniinin eritystä häiritsevää reaktiota. Muutos tapahtuu prokalsitoniinin eritystä ohjaavassa CALC-1 geenissä. Kun elimistössä on bakteeriperäinen infektio, CALC-1 geenin ekspressio lisääntyy merkittävästi, jolloin PCT:n määrä verenkierrossa lähtee nopeasti nousuun. Vielä ei tiedetä, miksi elimistö alkaa tuottaa PCT:tä bakteeritulehduksissa, mutta tällä reaktiolla on merkittäviä diagnostisia käyttötapoja.

Perinteisesti ihmiseltä on mitattu tulehduksen toteamiseksi CRP-arvot, eli C-reaktiivisten proteiinien määrä verenkierrassa. Kyseessä on yleisin tulehdusten diagnosointiin käytettävä menetelmä tänäkin päivänä, mutta sillä on ongelmansa. C-reaktiivista proteiinia erittyy kaikkien tulehdusreaktioiden yhteydessä, olivat ne sitten bakteeri-, virus- tai sieniperäisiä. Tästä syystä hoitoa on pelkän CRP-arvon perusteella vaikea määrätä, koska ilman muita tutkimuksia ei voida tietää, mikä mikrobi aiheuttaa tulehduksen. Toinen ongelma on arvojen nousun nopeus: CRP-arvot eivät ala nousta elimistössä ennen kuin infektion alkamisesta on kuusi tuntia, kun taas PCT-arvot nousevat jo kolmen tunnin jälkeen. Tämä on erityinen ongelma sepsiksen kanssa, joka kehittyy nopeasti. Bakteerit ehtivät lisääntyä jo muutamassa tunnissa vaaralliselle tasolle (Vijayan, A. L., Vanimaya, Ravindran, S., Saikant, R., Lakshmi, S., Kartik, R., & G, M. 2017)

Sepsis, eli verenmyrkytys, on yleisimmin bakteeriperäinen infektio, jossa tulehduksella ei ole kohdistunutta pesäkettä elimistössä. Sen sijaan bakteerit kasvavat ja lisääntyvät verenkierrassa. Ihminen saa sepsiksen tyypillisesti tulehtuneen haavan kautta, josta se leviää verenkiertoon. Kyseessä on erityinen ongelma leikkauspotilailla, koska potilaiden iholla ja ympäristössä on bakteereja, jotka voivat päästä leikkaushaavoihin. Sepsis on hoitamattomana tappava ja siihen kuolee tänäkin päivänä keskimäärin 30 % infektion saaneista potilaista. Joissakin maissa kuolleisuus voi olla jopa 50 %. Suomessa kuolleisuusprosentti on 15 % (Terveyskirjasto). Potilaan selviämismahdollisuuksien parantamiseksi infektion hoito pitäisi aloittaa mahdollisimman pian, koska mitä kauemmin hoidon aloittaminen viivästyy, sitä enemmän bakteerit ehtivät lisääntyä verenkierrassa. Hoitamaton sepsis johtaa ennen pitkään laajaan elinvaurioon.

PCT-arvojen mittaaminen on sepsiksen diagnosointiin sopiva menetelmä, ensinnäkin koska PCT on spesifinen bakteeriperäisille tulehduksille. Toiseksi PCT:tä mittaamalla saadaan tulehdus todettua nopeammin, koska PCT:tä alkaa erittyä nopeammin kuin CRP:llä mitattavaa C-reaktiivista proteiinia. (Vijayan, A. L., Vanimaya, Ravindran, S., Saikant, R., Lakshmi, S., Kartik, R., & G, M. 2017)

Sepsiksen diagnosoinnin lisäksi PCT-mittauksia voidaan käyttää muiden bakteeriperäisten infektioiden seuraamisessa. Yksi tärkeimmistä on hengitystieinfektioiden seuraaminen, jossa PCT-arvoja mittaamalla voidaan seurata antibi-

oottikuurin tehoa ja etenemistä. Näin varmistetaan ensinnäkin se, että kuuri tehoaa ja toiseksi se, että infektio on saatu tuhottua ennen kuin kuuri lopetetaan (Huang, D. T., Yealy, D. M., Filbin, M. R., Brown, A. M., Chang, C. H., Doi, Y., Donnino, M. W., Fine, J., Fine, M. J., Fischer, M. A., Holst, J. M., Hou, P. C., Kellum, J. A., Khan, F., Kurz, M. C., Lotfipour, S., LoVecchio, F., Peck-Palmer, O. M., Pike, F., Prunty, H., ... ProACT Investigators 2018).

Prokalsitoniinilla on hyvistä puolistaan huolimatta yksi merkittävä haittapuoli biomarkkerina. Jotta sillä voitaisiin saada sepsis tai muu bakteeritulehdus tunnistettua, prokalsitoniinin määrän veressä pitäisi olla ennen tulehdusta nollassa. Viime vuosina tehdyissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että kroonista tulehdusta sairastavilla henkilöillä PCT-arvot voivat olla valmiiksi koholla. Tämä on merkittävä ongelma, koska kroonisia tulehduksia sairastaville henkilöille voidaan diagnosoida väärä positiivisia tuloksia, jos aikaisemman tulehduksen vaikutusta ei osata ottaa huomioon.

Terveillä ihmisillä PCT-taso laitteella mitattuna on 0,20 µg/L. Tätä isompi arvo, mutta pienempi kuin 0,5, tarkoittaa mahdollisesti paikallista infektiota ja pientä sepsiksen riskiä. PCT-tasolla 0,5–2 µg/L sepsis on mahdollinen, mutta koska PCT-taso voi muuttua muiden fysiologisten tekijöiden vuoksi, on suositeltavaa laittaa potilas valvontaan ja uusia koe 6–24 tunnin sisällä diagnoosin varmistamiseksi. PCT-tasolla 2–10 µg/L sepsis on todennäköinen. Suurempi taso kuin 10 µg/L tarkoittaa vakavaa sepsistä tai septistä. Näin korkea taso voi syntyä ainoastaan em. seikkojen seurauksena (B.R.A.H.M.S PCT Direct 2019).

2.2 Prokalsitoniinin mittauksessa käytetyt määrittämenetelmät

2.2.1 B.R.A.H.M.S PCT Tuotemerkki

Verrattavat menetelmät ovat molemmat Thermofisher Scientific-yhtiön suunnittelema ja valmistama. Tarkemmin kyseessä on B.R.A.H.M.S PCT- tuoteryhmän menetelmiä. Kyseisen tuotemerkin alla valmistetaan näiden kahden menetelmän ja niiden reagenssien ja laitteiden lisäksi muitakin prokalsitoniinin mit-

taukseen sopivia menetelmiä. Esimerkkinä on PCT-Q, joka on immunokromatografinen testiliuska, jota käytetään pikatestinä laboratorioissa, joissa ei ole tarvittavaa laitteistoa ja siinä käytettäviä testikasetteja.

Koska prokalsitoniinista on tullut terveydenhuollossa niin keskeinen tapa diagnosoida sepsistä, sitä pitää pystyä myös mittaamaan tarkasti ja kyseiset menetelmät on suunniteltu juuri tätä varten. Tällä hetkellä käytössä olevat menetelmät ovat pääasiassa ratamenetelmiä, jollainen on käytössä Seinäjoen Keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa. Laboratorion menetelmä perustuu elektrokemiluminenssiin.

Vierianalytiikka, eli osastolla tehtävä pikadiagnostiikka, PCT-mittauksissa ei ole vielä pitkälle kehittyntä, minkä vuoksi kyseessä oleva tutkimus tehtiin. Sairaalalle koekäyttöön saadun pikatestilaitteen toiminta perustuu immunokromatografiaan.

2.2.2 Immunokromatografia ja B.R.A.H.M.S PCT Direct-laite

Testattava uusi vieritestilaite on Thermo scientific B.R.A.H.M.S PCT direct -vieritestauslaite. Laite testaa immunokromatografisella menetelmällä veren prokalsitoniinin pitoisuuden. Laite hyödyntää analyysissä samoja reagensseja kuin sairaalassa jo käytössä oleva saman valmistajan laite. Yhteiset reagenssit ovat menetelmissä käytettävät vasta-aineet, joihin PCT kiinnitetään. Menetelmissä käytetyt vasta-aineen leimausaineet ja detektointitapa ovat erilaiset.

Näytteenä menetelmässä voidaan käyttää sekä ihopistosnäytteenä otettua kapillaarinäytettä että EDTA-putkeen otettua laskimoverinäytettä. Ihopistoksessa pistoskohtaan puristetaan pisara, josta näyteliuskan kärkeen otetaan riittävä määrä verta. Veri imeytyy kapillaarivoimalla liuskan kalvon alle. Laskimoverta käytettäessä tarvitaan 20 µl kokoverta. Kummassakin tilanteessa liuska pitää analysoida heti (10 min näytteen otosta). Kun liuska on laitettu laitteeseen ja laitteen kansi suljettu, laite alkaa analysoida näytettä automaattisesti. Laite valaisee näyteliuskan näytealuetta kahdella valodiodilla ja liuskasta heijastunut

valo luetaan sensorilla. Heijastuneen valon määrä on suoraan verrannollinen sitoutuneen analyytti-markkerikompleksin määrään (thermoscientific B.R.A.H.M.S. Direct ohjekirja (2019).

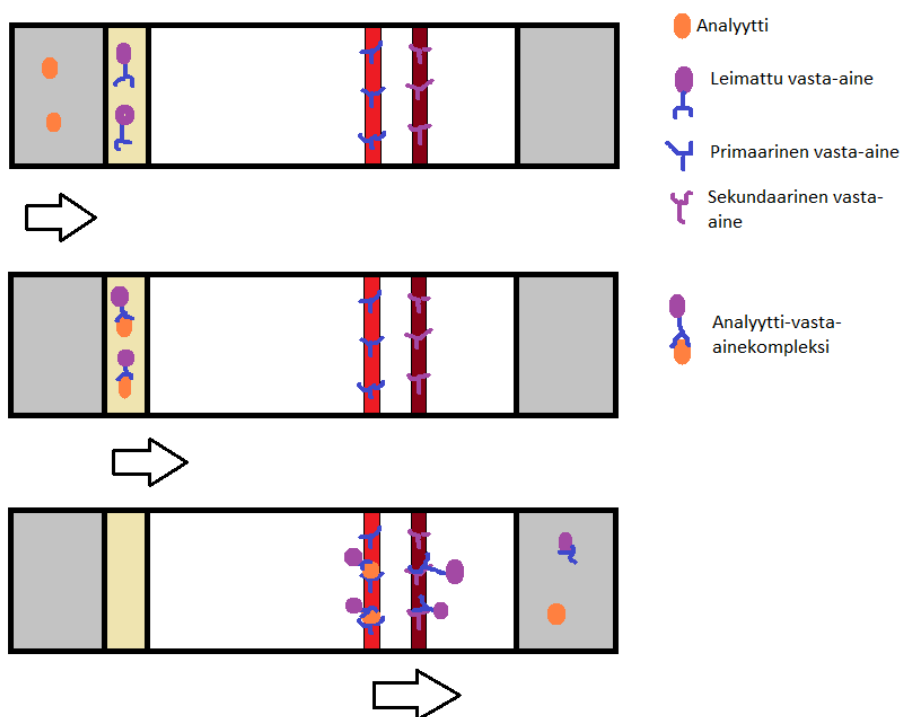
Laitteessa käytetään testiliuskaa, jossa on reagenssina vasta-aine ja siihen kiinnitetty kolloidaalinen kultaleima väriaineena. Kolloidaalinen kulta on kullan nanopartikkeleja, jotka suspensoituneena nesteeseen muodostavat partikkelien koon mukaan joko punaisen tai sinisen värin (Yang X, Yang M, Pang B, Vara M, Xia Y 2015). Väriaine-vasta-aine sitoutuu prokalsitoniiniin ja muodostunut kompleksiksi kulkeutuu testilinjalle, jossa se muodostaa toisen vasta-aineen kanssa sandwich-kompleksin (DirectReader ohjekirja).

Liуска koostuu kahdesta erillisestä osasta: kiinteän faasin sisältävä testiosa ja ajopuskuria sisältävä kapseli. Otettaessa näytettä liuska taitetaan kapselin ja testiosan välistä auki, jolloin välissä oleva näytekaivo saadaan esille. Verinäyte imeytetään kaivon sormenpäästä tai pipetoimalla laskimoverinäytteestä. Kun näyte on saatu ja veri imeytynyt kiinteään faasiin, liuska taitetaan kiinni ja ladataan laitteeseen. Ajon aikana ajopuskurin kapseli rutistetaan laitteessa, jolloin liuskalle saadaan enemmän nestettä ja näyte kulkee nopeammin faasin läpi.

Kromatografia, johon menetelmä perustuu, on kemiallisten analyysien alue, jossa yhdisteitä analysoidaan erottamalla niitä toisistaan niiden fyysisten ja kemiallisten ominaisuuksien avulla. Tutkittavat näytteet kromatografiassa ovat yleisesti eri yhdisteiden seoksia, joista halutaan tunnistaa tai löytää yksi tai useampi yhdiste. Kiinteä faasi on tavallisimmin tehty aineksesta, joka hidastaa yhdisteiden kulkua faasissa, jolloin ne erottuvat toisistaan koon tai kemikaalisten ominaisuuksien mukaan.

Immunokromatografiassa käytetään kiinteää faasia, jonka läpi näyte ajetaan. Tavallisesta kromatografiasta poiketen immunokromatografiassa ei pyritä erottamaan yhdisteitä niiden molekyylikoon perusteella, vaan immunologisten ominaisuuksien perusteella (Koczula, K. M., & Gallotta, A. 2016). Kiinteässä faasissa on määritettävälle aineelle spesifisiä antigeenejä ja markkereita, jotka yhdessä muodostavat komplekseja ja aiheuttavat silmämääräisesti havaittavan

värireaktion. Immunokromatografiset faasit on suunniteltu tiettyjä biologisia yhdisteitä varten ja niiden spesifinen toiminta perustuu immunologisiin reaktioihin, joissa syntyy vasta-aine-antigeenikomplekseja. Faaseissa on pieni vyöhyke, jossa on määritettävälle antigeenille spesifistä vasta-ainetta. Kulkiessaan faasin läpi näytteessä olevat antigeenit ensiksi reagoivat merkkiaineena olevan kullalla merkityn vasta-aineen kanssa muodostaen värillisen kompleksin. Värjäytyneet vasta-ainekompleksit kulkevat eteenpäin ja jäävät testiliuskan reaktioalueella kiinni toiseen vasta-aineeseen. Antigeenin vasta-aineiden lisäksi liuskoissa on kontrolli, joka reagoi väriaineen kanssa varmistaen, että liuska toimii odotetulla tavalla. Liuskan toisessa päässä on filteri, johon kaikki ylimääräinen reagenssi ja neste kulkeutuvat. Tällä tavalla estetään reagenssien ylimäärästä johtuvaa liiallista reaktiota (Koczula, K. M., & Gallotta, A. 2016).



Kuva 1. Sandwich- menetelmään perustuva immunokromatografinen liuska (työn tekijän piirtämä).

Määrittäminen pystytään tekemään myös käänteisesti: sandwich-tyylisen reaktion sijaan käytetään kompetitiivista reaktiota. Liuskassa oleva antigeenialue on määrittävän aineen sijaan spesifinen väriaineelle. Väriaine taas on spesifinen sekä antigeenille että määrittävälle yhdisteelle. Negatiivisessa näytteessä väriaine pääsee sitoutumaan antigeenin kanssa, mikä saa aikaiseksi mitattavan reaktion. Positiivisessa reaktiossa taas väriaine on sitoutunut analyysiin, jolloin ei tapahdu antigeeniin sitoutumista ja reaktiota ei tapahdu. Käänteistä reaktiota käytetään silloin, kun vasta-ainepareja ei ole saatavilla tai analyysi on liian pieni usempaa sitoutumista varten (nanoComposix, Introduction to Lateral Flow Rapid Test Diagnostics).

Etuna immunokromatografiassa on se, että sillä pystytään tekemään hyvin spesifisiä analyyseja. Kromatografiselle liuskalle voidaan annostella näyte ilman monimutkaista erottelua ja pesua, mikä säästää aikaa. Kromatografiset liuskat testit ovat myös halpoja, helppokäyttöisiä ja säilyvät hyvin erilaisissa olosuhteissa. Tästä syystä ne ovat hyvin hyödyllisiä kehittyvissä maissa, pienillä klinikoilla ja sota- tai onnettomuusalueilla, jonne kallista analyysikalustoa olisi vaikea saada. Haittapuolena näissä määrittäyksissä on perinteisesti kuitenkin ollut, se että niillä ei ole voitu kvalitatiivisen analyysin lisäksi pystyttyä tekemään kvantitatiivista määrittäystä. Parantuneiden menetelmien ansiosta monella menetelmällä pystytään kuitenkin nykyisin tekemään kvantitatiivisia määrittäyksiä. Kvantitatiiviset määrittäykset vaativat kuitenkin laitteistoa avuksi, koska silmäämällä analyysin määrää ei voida määrittää. Tämä voidaan tehdä joko laserin avulla, fluoresenssimittauksella tai fotometrisesti (Koczula, K. M., & Gallotta, A. 2016).

2.2.3 Elektrokemiluminenssi ja COBAS 8500

B.R.A.H.M.S PCT direct -vieritestilaitetta verrataan jo käytössä olleeseen COBAS 8500-laitteeseen, joka käyttää Thermo Fisherin Elecsys® BRAHMS Procalcitonin (PCT) menetelmää. Menetelmällä pystytään määrittämään PCT-arvot 0,2–100 µg/L välillä. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on kerätty potilasnäytteistä, joista on tehty PCT-määrittäminen ensiksi automaatiolinjaston Cobas 8500-analysaattorilla. Näytemuoto on ollut hepariiniplasma (Roche, Elecsys®, BRAHMS Procalcitonin (PCT) 2020).

Cobas-menetelmän toiminta perustuu elektrokemiluminenssiin, jossa prokalsito-niini muodostaa jatkuvalla reaktiolla komplekseja vasta-aineiden kanssa. Vasta-aine on leimattu ruteniumilla. Rutenium hapettuu herkästi ja hapettajana käytetään tripropyylianiinia. Jatkuvan reaktiosyklin vuoksi valo on tasainen ja riippuvainen muodostuneen kompleksin määrästä, joten mitatun valon intensiteettiä mittaamalla voidaan mitata myös mitattavan aineen tarkka pitoisuus (Huangxian Ju, Guosong Lai, Feng Yan 2017).

Elektrokemiluminenssi on molekyylien elektrokemiallisia ominaisuuksia hyödyntävä kvantitatiivinen mittaussmenetelmä. Mittausmenetelmä perustuu varautuneiden molekyylien varauksen purkautumisessa syntyvän luminenssin mittaamiseen. Voimakkaiden hapettumis-/pelkistämisreaktioiden kautta analyysissä käytettävät yhdisteet saadaan elektrodien avulla tuottamaan luminenssia. Hapettumis- ja pelkistämisreaktiot tapahtuvat jatkuvalla kierrolla, minkä takia saatua reaktiota voidaan mitata kauemmin ja tulokset ovat luotettavampia (Shen, J., Zhou, T., & Huang, R. 2019).

Elektrokemiluminenssia hyödyntävässä tutkimuksessa nestemediumissa olevaan elektrodiin kiinnitetään tutkittavan aineen vasta-aineita, joihin tutkittava aine kiinnittyy. Tämän jälkeen liuokseen lisätään tutkittava näyte, jossa oleva tutkittava antigeeni sitoutuu vasta-aineisiin. Kun antigeeni-vasta-aine kompleksit ovat muodostuneet, mediumiin lisätään reaktiiviset väliaineet. Ensimmäinen lisättävistä reagensseista (radikaali kationi) reagoi elektrodin ja veden kanssa ottaen itseensä protonin muodostaen positiivisen ionin itsestään.

Toinen reagensseista (anioni) on valmiiksi positiivisesti varautunut, mutta ottaa vastaan protonin kationilta, jolloin siitä tulee entistä positiivisemmin varautunut. Tämä hyvin positiivisesti varautunut molekyyli sitoutuu antigeeni-vasta-ainekompleksiin ja vapauttaa varauksensa synnyttäen luminenssireaktion. Varauksen purkautuessa anioni irtautuu kompleksista ja vapauttaa protoninsa varauksettomalle kationille. Anioni palautuu alkutilaansa ja sykli alkaa uudestaan (Huangxian Ju, Guosong Lai, Feng Yan 2017).

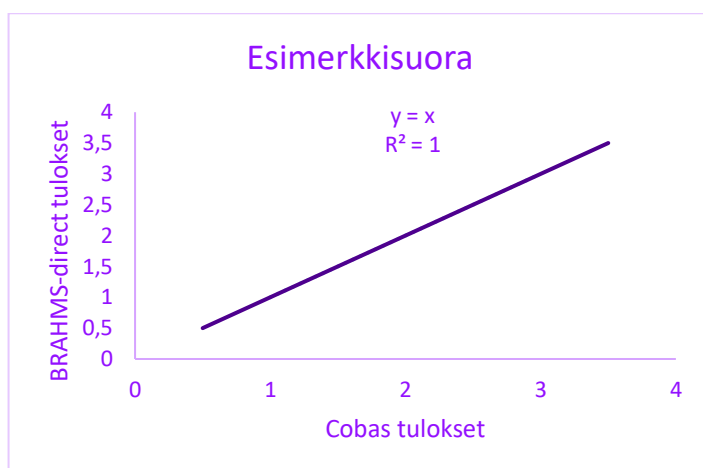
Koska reaktionopeus on vakio, luminenssin intensiteetti on riippuvainen muodostuneiden vasta-ainekompleksien määrästä. Mitä enemmän näytteessä on määritettävää antigeenia, sitä enemmän komplekseja muodostuu ja valoreaktio on voimakkaampi. Elektrokemiallinen luminenssi on hyvin tarkka ja spesifinen menetelmä, minkä takia se sopii tarkkuutta ja spesifisyyttä vaativiin määrittäisiin (Rizwan, M., Mohd-Naim, N. F., & Ahmed, M. U. 2018).

2.3 Kvantitatiivinen analyysi laitetestauksessa

Analytiikassa ei riitä, että todetaan määritettävän yhdisteen läsnäolo, vaan halutaan tietää myös sen määrä tai pitoisuus. Ihmisen elimistössä on eri yhdisteille ja aineille luonnolliset pitoisuudet, jotka eivät muutu juurikaan terveillä ihmisillä. Se, kuinka paljon näitä yhdisteitä on, kertoo paljon kehon terveystilasta. Näin ollen tarkan terveydentilan määrittämiseksi pitää pystyä myös tarkasti määrittämään näitä pitoisuuksia, koska väärät tulokset johtavat vääriin diagnooseihin.

Prokalsitoniinin määrä on suoraan verrannollinen sepsiksen vakavuuteen, minkä takia sen käyttö biomarkkerina sepsikselle on yleistynyt niin nopeasti. Koska PCT:n määrään kuitenkin vaikuttaa sepsiksen vakavuus ja mahdolliset krooniset taudit, menetelmällä pitää pystyä määrittämään sen tarkka pitoisuus verenkierrossa. Pelkän PCT:n kannalta positiivisen tuloksen perusteella ei diagnoosia voida tehdä.

Tässä tutkimuksessa laitteilla saatuja tuloksia vertailtiin laatimalla suora, jossa x-arvona on Cobas 8500-laitteella saadut tulokset ja y-arvona pikatestilaitteella saadut tulokset. Odotuksena on se, että kummallakin laitteella saataisiin samanlaisia tuloksia, jolloin tulokset vastaisivat toisiaan ja osuisivat siististi suoralle. Suorasta lasketaan korrelaatio R^2 , eli kuinka hyvin pikatestilaitteen tulokset osuvat ennustelulle suoralle. Suuri korrelaatio tarkoittaa sitä, että tulokset nousevat x-akselin arvojen mukaisesti lineaarisesti.



Kuva 2. Esimerkki halutusta suorasta.

Korrelaation lisäksi on tarpeen selvittää toistettavuus. Toistettavuus selvitetään kolmella tunnetulla näytteellä. Näytteiden pitoisuudet ovat erilaiset ja niitä mitataan suunnitelman mukaan 10 kertaa. Toistettavuudella tarkoitetaan miten paljon samojen näytteiden arvot vaihtelevat eri mittauksilla. Jos saman näytteen eri tuloksissa on suurta vaihtelua, mahdollisen antibioottihoidon tehoa ei voida seurata hyvin. Toistettavuuden tuloksista lasketaan keskiarvo ja keskihajonta. Keskiarvo kertoo tulosten keskimääräisen tuloksen ja keskihajonta keskimääräisen hajonnan. Näiden tulokset kertovat kuinka hyvä toistettavuus on. Mitä pienempi keskihajonta on, sitä parempi toistettavuus on.

Laskentakaavat

Keskiarvo:
$$\bar{X} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n}$$

x_1 = ensimmäinen arvo

x_n = sarjan viimeinen arvo

n = sarjan arvojen kokonaismäärä

Keskihajonta:
$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{X})^2 + (x_2 - \bar{X})^2 + (x_3 - \bar{X})^2 + \dots + (x_n - \bar{X})^2}{n}}$$

Kvalitatiivista analyysiä menetelmälle ei tehdä, koska menetelmässä käytetyt antigeenit ovat prokalsitoniinille spesifisiä ja niiden spesifisyys tunnetaan jo.

3 Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus

Tämän opinnäytetyön tavoite on testata, miten hyvin pikatestausmenetelmän tulokset ovat verrattavissa ratamenetelmän tuloksiin. Käytössä olevalla menetelmällä pystytään mittaamaan PCT-arvoja hyvin, mutta mittausaika sentrifugoinnin kanssa on 30 minuuttia, minkä lisäksi tulisi huomioida näytteenottoaika. Näyte tulee myös kirjata sisään laboratorion järjestelmään ja koska analyysilaitteella analysoidaan muitakin näytteitä, voi tulosten saamisessa mennä tuntikin. Tämä viivästyttää hoidon aloittamista merkittävästi.

Näytteiden nopeaa analyysiä varten testattava pikamenetelmä on niin tärkeä. Pikatestillä pystytään mittaamaan PCT kahdessakymmenessä minuutissa. Lisäksi testi voidaan tehdä potilaan läheisyydessä samassa yksikössä. Lyhyt analyysiaika nopeuttaisi hoidon aloittamista merkittävästi, koska lyhyt analyysiaika nopeuttaa sepsiksen ja sen vakavuuden diagnosointia. Samalla potilaan ennuste paranisi nopeammin alkavan hoidon ansiosta. B.R.A.H.M.S PCT direct on laitteena ja menetelmänä uusi, minkä vuoksi sen toimivuutta ei ole aikaisemmin testattu Seinäjoen keskussairaalan laboratoriossa.

Helppokäyttöinen laite on analyysien nopeuden kannalta olennainen tekijä potilaan hoidossa sen takia, että tällaisella laitteella ei tarvitse jokaisella analyysilla tarkistaa työohjeita ja analysoinnissa tapahtuu vähemmän virheitä. Tämän lisäksi pitää huomioida, mikäli jotkin laitteen ominaisuudet haittaavat käytettävyyttä tai vaikeuttavat luotettavan tuloksen saantia.

Testauksen kautta on tarkoitus selvittää seuraavat asiat:

1. Menetelmän ja tulosten luotettavuus
2. Menetelmän riittävä spesifisyys mahdollisen sepsiksen vakavuusasteen määrittelyyn
3. Testiliuskojen ja laitteen riittävä selkeys ja helppokäyttöisyys, jotta hoito henkilökunta pystyy ottamaan näytteen oikein ja riittävän nopeasti

4 Testauksen kulku ja raportointi

4.1 Testauksen suunnittelu

Testauksen suunnittelu tehtiin jo lokakuussa ennen kuin laitteet oli saatu testattaviksi. Testaussuunnitelman laati Seinäjoen Keskussairaalan laboratorion ylikemisti. Menetelmiä oli tarkoitus testata niin paljon, että saatiin riittävästi tuloksia, jotta pikatestilaitteen oikeellisuus ja toistettavuus voitiin määrittää tarkasti. Tutkimusta varten saaduista potilasnäytteistä tehtiin tutkimukset sekä Cobasilla että BRAHMS direct -laitteella, joiden tuloksia vertailtiin keskenään. Suunnitelman kulku oli seuraava: potilasnäytteistä analysoitiin prokalsitoniini vieritestauslaitteella ja automaattioradan Cobas -laitteella. Testaukseen sopivia näytteitä oli 63 kappaletta. Potilaista oli otettu samaan aikaan PCT-näyte ja vieritestaukseen sopiva EDTA-näyte. Vierilaitteen tarkkuutta tarkastellaan saatujen tulosten perusteella. Toistettavuus testataan kahdella eri pitoisuutta olevalla näytteellä. Molemmista näytteistä tehdään vierilaitteella kymmenen rinnakkaisajoa. Saaduista tuloksista lasketaan tämän jälkeen keskiarvo ja keskihajonta.

Laiteen valmistajan ja Seinäjoen keskussairaalan laboratorion kemistin toiveena oli myös tarkastella laitteen käytettävyyttä, tehdä siitä havaintoja ja esittää parannusehdotuksia: kuinka helppoa laitetta on käyttää, sen käytön oppiminen ja käyttömukavuus. Lisäksi piti huomioida, mikäli jotkin laitteen ominaisuudet haittasivat käytettävyyttä tai vaikeuttivat luotettavan tuloksen saantia.

4.2 Testaukseen otettavien näytteiden laatuvaatimukset

Otokseen kuului 63 potilasnäytettä seuraavissa pitoisuusluokissa:

20 alle 0,5 µg/L näytettä

20 0,5–2,0 µg/L näytettä

20 2,0–10,0 µg/L näytettä

3 yli 10,0 µg/L näytettä.

Kokoverinäytteinä käytettiin PVK-näytteitä (pieni verenkuvä), eli EDTA-kokovertä. Näytteet oli otettu potilaista samaan aikaan kuin Cobas –laitteella analysoitu PCT-näyte. Erillistä näytettä vierilaitteen toiminnan testaamiseen olisi ollut hankala saada. Laitteilla saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa. Tuloksista laskettu korrelaatiokerroin kertoo menetelmien tulosten yhtenevyyden. Vieritestauslaitteita oli käytössä kolme.

Jo etukäteen tiedettiin, että vierilaitteen antamaan tulokseen voi vaikuttaa näytteiden tuoreus. Sepsistä sairastavia potilaita tuli tutkimuksiin melko harvoin, minkä takia osa näytteistä oli säilytyksessä muutamasta tunnista päivään saakka. Ennen analysointia näytteet tuli lämmittää huoneenlämpöön, jotta lämpötila ei vaikuta reaktioon.

4.3 Testauksen toteutus

Testauksessa käytetyt näytteet tulivat potilailta, joilta oli otettu samanaikaisesti PCT-näyte ja PVK-näyte. Sepsiksen nopean etenemisen vuoksi näytteet tuli ottaa yhtäaikaaisesti. Vierilaitteista vastaava henkilö tarkisti jokaisen päivän lopuksi tehdyt PCT-tutkimukset ja sen, oliko potilaalta otettu PVK-näyte samalla. Kaikki PCT-näytteiden kanssa otetut EDTA-näytteet tuotiin analysoitavaksi vierilaittehuoneeseen. Opinnäytetyön tekijä haki tullessaan itse paikalle kontrollit ja testiliuskat jääkaapista ja antoi niiden lämmetä huoneenlämmössä kaksikymmentä minuuttia ennen analysointia, jotta lämpötila ei vaikuttaisi reaktioihin.

Näytteiden numerot, COBASilla mitatut pitoisuudet ja testin päivämäärä merkittiin kunkin laitteen omaan seurantataulukoon. Näihin taulukkoihin merkittiin vierilaitteilla saatujen näytteiden ja kontrollien tulokset. Ennen näyteanalyysia kaikilla tiettynä päivänä käytetyillä laitteilla ajettiin ensiksi kontrollit. Ensimmäisenä oli Reader-kontrolli, jolla tarkistettiin, että laite tunnistaa näyteliuskan. Tämän jälkeen laitteilla ajettiin sekoitetut kontrolliliuokset ja saadut tulokset merkittiin ylös. Jos kontrollien tulokset olivat hyviä ja niitä ei tarvinnut uusia, näytteiden ajo voitiin aloittaa. Näytteet olivat sekoituksessa koko sen ajan, kun ne odottivat testausajoa. Näyteputken viivakoodi luettiin laitteeseen, minkä jälkeen näyteputki ja testiliuskan suojuus avattiin. Näytteestä pipetoitiin laitteen mukana tulleella pipetillä käänteistä menetelmää käyttäen 20 µl verta liuskan suuaukolle.

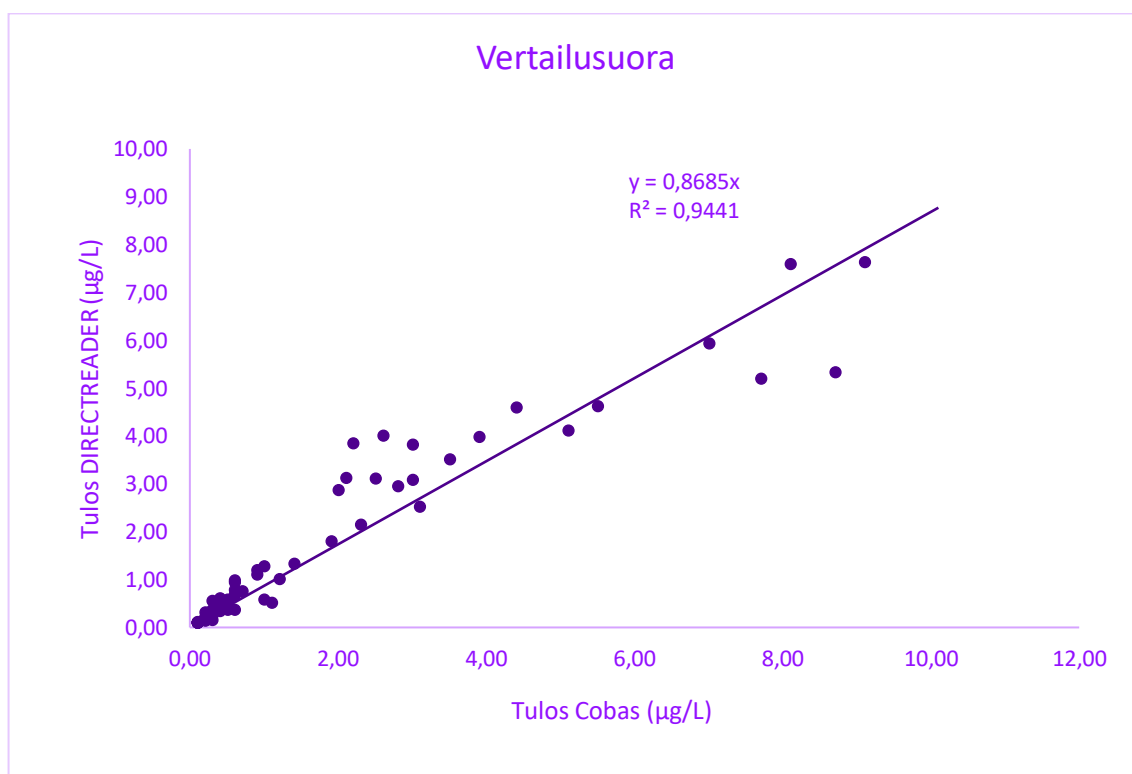
Tässä käytettiin käänteistä menetelmää, koska veren viskositeetin takia suoralla menetelmällä ei aina saatu tarvittua määrää pipetoitua tarkasti. Liuskan suojusta suljettiin ja liuska laitettiin laitteeseen.

Yhdessä näyteajossa kesti kaksikymmentä minuuttia, joten ajojen nopeuttamiseksi käytettyjä laitteita käynnistettiin näytteiden määrän mukaan, jotta näytteitä voitaisiin ajaa useampi samanaikaisesti. Koska potilailta oli mitattu PCT aikaisemmin, näytteitä pystyttiin valikoimaan niin, että pitoisuusalueille suunnitellut näytemäärät saatiin kerättyä. Näytteitä ei tarvinnut myöskään hylätä, koska ne olivat jo todettu positiivisiksi.

5 Tulokset ja tulkinta

5.1 Potilasnäytteet

Tulosten analysointia varten tulokset muunnettiin kuvaajaksi aikaisemmin kuvulla tavalla. Tulosten tarkkuus voidaan määrittää sen mukaan, kuinka hyvin Directreaderilla saadut tulokset asettuivat kuvaajan suoralle. Kuvaajasta on jätetty pois yli 10,0 µg/L tulokset, koska ne ovat DIRECTREADER-laitteen määrittysrajan yläpuolella, eivätkä anna muuta tulosta kuin >10,0.



Kuvaaja 1: Cobas ja DIRECTREADER korrelaatio-suora

Tulosten perusteella lasketun kuvaajan korrelaatiokerroin on 0,9.

5.2 Toistettavuus ja käytettävyys

Toistettavuuden määrittämiseksi laitteilla yksi ja kolme ajettiin potilasnäytteitä, joiden pitoisuudet olivat 2,50 ja 0,50 µg/L. Alun perin näytteitä oli tarkoitus ajaa kymmenen kertaa, mutta koska tulokset vaihtelivat selvästi, niitä ajettiin vielä kolme kertaa lisää paremman otoksen saamiseksi. Tämän lisäksi samat näytteet, sekä 7,0 µg/L näyte, ajettiin kaikilla kolmella käytössä olevalla laitteella,

jotta nähtäisiin, kuinka paljon samojen näytteiden tulokset vaihtelevat eri laitteilla.

Taulukko 1. Toistettavuustestit

0,50 µg/L	laite 1	2,50 µg/L	laite 3
1	0,75	1	2,87
2	0,56	2	3,54
3	0,47	3	2,49
4	0,41	4	2,24
5	0,56	5	2,99
6	0,56	6	2,91
7	0,54	7	3,16
8	0,42	8	2,97
9	0,41	9	2,88
10	0,28	10	2,77
11	0,54	11	3,04
12	0,55	12	3,06
13	0,37	13	2,81
keskiarvo		keskiarvo	2,90
keskihajonta		keskihajonta	0,31
hajonta %		hajonta %	11

Taulukko 2. Rinnakkaistestit

Näyte	laite 1	laite 2	laite 3
2,50	3,19	3,23	2,90
7,00	6,63	7,99	6,25
0,50	0,49	0,56	0,38

Potilasnäytteiden lisäksi toistettavuutta testattiin kontrollien kautta. Jokainen päivä, kun laitteilla ajettiin näytteitä, niillä ajettiin ensiksi laitteen kontrollit. Kontrollit oli valmistettu siten, että niillä pitäisi olla periaatteessa spesifiset pitoisuudet. Kontrolli 1 oli 0,60 µg/L (0,30–0,90) ja kontrolli 2 3,00 µg/L (2,00–4,00) (tulosten sallitut heittelyrajat kerrottu suluissa).

Testauksen yhteydessä huomio kiinnitettiin jatkuvasti myös laitteiden käytettävyyteen. Ensimmäinen huomioitava asia käytettävyyden kannalta testattavissa laitteissa oli se, miten laite laitetaan päälle. Toisin kuin useimmissa laitteissa, näissä laitteissa virtakytkin ei jää tiettyyn asentoon, kun virta laitetaan päälle.

Tämän takia tottumattomat käyttäjät voivat joutua painamaan virtanappia useamman kerran, ennen kuin laitteen käytön oppii kunnolla. Toiseksi laitteet eivät mittaa näytteitä aivan luotettavasti. Kaikilla laitteilla (erityisesti laite numero 2:lla) tuli testauksen aikana vähintään kerran vastaan tilanne, jossa laite ei tunnistanut sisälle laitettua näyteliuskaa eikä sen takia mitannut näytettä. Ennen testauksen aloitusta laitteet oli pitänyt myös lähettää takaisin valmistajalle ohjelmointivirheen takia. Käytettävyydessä huomioitava tekijä oli myös käytettyjen liuskojen säilyvyys. Testauksessa käytetyt liuskat säilytettiin jääkaapissa ja tuotiin sieltä aina lämpiämään huoneenlämpöön ennen ajoja. Tämä hidasti analyysien tekoa noin kymmenellä minuutilla.

Parannusalueiden löytäminen oli hankalaa, koska käytetty menetelmä oli sen verran helppokäyttöinen, ettei mitään merkittävää parannusta vaativaa tekijää huomannut. Huomattavin osa-alue, johon tulee kiinnittää huomiota, on laitteen käyttäjän työtavat, koska kontrollien ja näytteiden lämmitys ja sekoitus tulee tehdä hyvin. Sekoittamalla näytteitä ennen analyysia saatiin tuloksia, jotka olivat lähempänä odotettuja arvoja. Huomattavaa oli myös se, että näytteitä annostellessa pipetillä on parempi käyttää käänteistä pipetointimenetelmää, jolloin voitiin välttää ilmakuplia ja oikea määrä näytettä saatiin annosteltua paremmin.

6 Johtopäätökset

Analyysejä varten saatiin kerättyä suunniteltu määrä näytteitä ja halutuissa pitoisuuksissa. Asetettuja parametreja päästiin testaamaan ja laitteen käytettävyydestä pystyttiin tekemään huomioita.

Tulosten korrelaatiokerroin oli 0,90. Toistettavuustesteistä saatiin seuraavat tulokset: 0,50 µg/L pitoisuudella keskiarvo oli 0,49 µg/L, keskihajonta oli 0,12 µg/L ja hajontaprosentti oli 24 %. 2,50 µg/L näytteellä tulosten keskiarvo oli 2,90 µg/L, keskihajonta oli 0,31 µg/L ja hajontaprosentti 11 %. Rinnakkaistesteissä käytettiin 0,50 µg/L, 2,50 µg/L ja 7,00 µg/L näytteitä. Laitteella 1 saatiin tulokset 0,49 µg/L, 3,19 µg/L, ja 6,63 µg/L. Laitteella 2 saatiin tulokset 0,56 µg/L, 3,23 µg/L ja 7,99 µg/L. Ja laitteella 3 saatiin tulokset 0,38 µg/L, 2,90 µg/L ja 6,25 µg/L.

Laitteen käyttö oli helppo oppia. Ongelmia käytössä tuli virheellisten ajojen kautta: laitteet eivät aina analysoineet näytteitä ja analyysi piti aloittaa uudestaan.

7 POHDINTA

Keskeisimmät tuloksiin vaikuttavat tekijät laitteiden testauksessa liittyvät näytteisiin. Koska oli mahdotonta ennustaa, koska näytteitä oli mahdollisuus saada, tutkimuksessa käytetyt näytteet eivät olleet kaikkein tuoreimpia ja olivat olleet säilytyksessä kylmässä tunneista jopa päivään saakka. Vaikkakin PVK-näytteet on otettu EDTA-putkiin, joissa näytteen kuuluisi säilyä, pitkä seisomisaika voi vaikuttaa tuloksiin. Näytteiden piti antaa myös lämmetä ennen analyysiä, koska lämpötila voi vaikuttaa reaktioon.

Tutkimuksen tässä vaiheessa ei päästy ottamaan varta vasten näytteitä potilailta ja käytetyt näytteet oli otettu muita tutkimuksia varten. Tärkein tekijä oli huolehtia siitä, että potilaalta on otettu samanaikaisesti sekä PCT-näyte COBAS:ia varten, että QUICKREAD:ille sopiva EDTA-verinäyte. Aikaisemmin tai myöhemmin otetut näytteet eivät kelvanneet, koska potilaan PCT-arvot voivat vaihdella hyvinkin rajusti lyhyen ajan sisällä.

Laitetta käytettäessä tehtiin huomioita sen käytettävyydestä: kuinka helppoa laitetta on käyttää, sen käytön oppiminen ja käyttömukavuus. Yksi käyttöön ja tuloksiin vaikuttava ominaisuus oli esimerkiksi liuskojen ja kontrollien lämmitys. Liuskoja ja kontrolleja ei voinut käyttää kylminä, mikä hidasti analyysien tekoa. Kontrollien kanssa tämä ei ole jatkuvassa käytössä ongelma, koska niitä ei tarvitse ajaa ennen jokaista käyttökertaa. Liuskojen kannalta tämä voi olla ongelma tosin, sillä liuskat säilyvät viikon verran huoneenlämmössä, mutta pitkäaikainen säilytys vaatii kylmäsäilytyksen. Liuskoja ei voi siis säilyttää huoneenlämmössä, minkä takia niitä pitää ottaa tarpeen mukaan lämpiämään. Nopean diagnoosin kannalta olisi kuitenkin hyvä, että liuskoja olisi valmiina käytettäväksi. Laitteen käytön tarvetta pitää siis ennakoida, jotta liuskoja olisi tarpeen mukaan valmiina.

Laitteen laadukas käyttö vaatii oikeat työskentelytavat. Verinäytteitä ja kontrolleja annostellessa liuskalle oli esimerkiksi parempi käyttää käänteistä pipetointimenetelmää, koska silloin ilmakuplia ei syntynyt niin herkästi ja oikea tilavuus tuli pipetoitua tarkemmin. Laitteilla ainakin vaikutti tulevan vähemmän virheitä tällä tavalla. Toinen tärkeä tekijä oli antaa kontrollien lisäksi näytteiden lämmetä

huoneenlämmössä riittävän kauan ja niiden pitää olla hyvin sekoitettuja. Näillä kahdella tekijällä oli merkitystä siihen, kuinka lähelle odotettuja arvoja analysointorilla päästiin.

Saaduista tuloksista on vaikea päätellä, kuinka hyvin menetelmä toimii. Toistettavuuden perusteella tätä päätöstä ei voi henkilökohtaisesti tehdä, koska laitteella on kontrollien odotettujen arvojen perusteella niin suuri vaihteluraja. Tulokset heittelevät jo siis käytetyn laitteen vuoksi. Sillä ei siis voida tarkasti määrittää potilaan PCT-arvoja ja näin ollen sepsiksen tilaa.

Toisaalta suurta tarkkuutta kyseiseltä laitteelta ei välttämättä vaaditakaan. Kyseinen laite on pikatestilaite, eli laite, jolla on tarkoitus nopeasti mitata PCT-arvot ja todeta, onko potilaalla sepsis. Tietenkin laitteella voidaan kokeilla määrittää sepsiksen tarkka vakavuus, mutta koska kaikki yli 10,0 PCT-arvot vaativat pikaista hoitoa, ei suurta tarkkuutta vaadita. Ja tämän arvon ylittävät tulokset eivät näytäkään muuta kuin >10 . Laitteen pääasiallinen tarkoitus on olla laite, jolla pystytään nopeasti määrittämään, että onko potilaalla sepsis ja näin aloittaa vaadittava antibioottikuuri mahdollisimman pian.

Tähän edellä mainittuun tarkoitukseen testattu laite sopiikin, koska testattu laite on tarkkuudeltaan sen verran hyvä, että sillä pystytään toteamaan sepsis ja todeta, koska antibioottikuuri on alkanut tehot. Tarkemmat analyysit voidaan tarpeen tullen tehdä jo käytössä olevalla Cobas-menetelmällä. Muissa sairaaloissa tehdyissä tutkimuksissa on päästy n. 90 %:n tarkkuuksiin, eli tässä tutkimuksessa saadut tulokset eivät ole välttämättä poikkeavia (Vijayan, A. L., Vanimaya, Ravindran, S., Saikant, R., Lakshmi, S., Kartik, R., & G, M. 2017). Direktreader-laitteet toimivat laite numero 2:ta lukuun ottamatta hyvin ja tälläkin laitteella voitiin näytteitä analysoida. Näytteet piti vain laittaa uudestaan ajoin, kun laitteeseen tuli virhe. Sitä ei tarvinnut käynnistää uudelleen tai vastaavaa. Tämä tietenkin hidasti analyysia, mutta mitään laitteen käyttöä estävää vikaa ei tullut vastaan ainakaan tässä tutkimuksessa. Tulosten perusteella laitteita voidaan käyttää ainakin sepsiksen toteamisessa, mutta Direktreader-laitteen lopullisesta käyttöönotosta tehdään päätös toimeenpanelevassa laboratoriossa.

Tilastollisesti saadut tulokset ovat suuntaa antavia ja eivätkä kovin tarkkoja. Tulosten hyvä puoli on kuitenkin se, että ne noudattelevat ennakoitua suoraa. Laitteen mahdollisen määrittelyalueen ylärajalla näyttäisi olevan epätarkkuutta todennäköisesti johtuen siitä, ettei menetelmällä saada tarkkoja tuloksia yli 10,0 µg/L näytteistä. Tämän lisäksi laitteilla saatuihin tuloksiin vaikuttaa varmasti myös toistettavuus. Jos samoilla näytteillä saadaan hyvin erilaisia tuloksia, ei tarkkaa suoraa voida saada. Testattavilla laitteilla tehtiin näyteajojen lisäksi kontrolliajoja, joista saatiin myös paljon tuloksia. Ja koska kontrollit ovat kaupallisesti valmistettuja liuoksia, joiden pitoisuudet on ilmoitettu ja tiedetään varmasti, ne ovat luotettavampia kuin potilasnäytteet. Kontrollien ajossa havaittiin, että niiden tuloksilla oli määritelty suuret raja-arvot, joiden sisällä olevat, vaikkakin ilmoitetuista pitoisuudesta poikkeavat, tulokset voitiin hyväksyä. Tuleekin pohtia, johtuuko tulosten vaihtelu huonosta näytelaadusta vai onko kyseessä analyysilaitteelle tyypillinen ominaisuus.

Tutkimus ei kuitenkaan lopu tähän, vaan tehtyjen analyysien perusteella toimeenpaneva laboratorio tekee päätöksen siitä, otetaanko laitteet testattaviksi osastolle, jossa analyysit tehdään suoraan potilaiden sormenpäistä otetuista näytteistä. Laitteiden lopullinen käytettävyys päätetään näiden analyysien ja testien perusteella.

LÄHTEET

Waterfield, T., Maney, J. A., Hanna, M., Fairley, D., & Shields, M. D. (2018). Point-of-care testing for procalcitonin in identifying bacterial infections in young infants: a diagnostic accuracy study. *BMC pediatrics*, 18(1), 387. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1349-7>

Vijayan, A. L., Vanimaya, Ravindran, S., Saikant, R., Lakshmi, S., Kartik, R., & G, M. (2017). Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *Journal of intensive care*, 5, 51. <https://doi.org/10.1186/s40560-017-0246-8>

Ming Jin, Adil I. Khan, Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis, *Laboratory Medicine*, Volume 41, Issue 3, March 2010, Pages 173–177, <https://doi.org/10.1309/LMQ2GRR4QLFKHCH9>

Yunus, I., Fasih, A., & Wang, Y. (2018). The use of procalcitonin in the determination of severity of sepsis, patient outcomes and infection characteristics. *PloS one*, 13(11), e0206527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206527>

Gluck, E., Nguyen, H. B., Yalamanchili, K., McCusker, M., Madala, J., Corvino, F. A., Zhu, X., & Balk, R. (2018). Real-world use of procalcitonin and other biomarkers among sepsis hospitalizations in the United States: A retrospective, observational study. *PloS one*, 13(10), e0205924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205924>

Jeon, K., Suh, J. K., Jang, E. J., Cho, S., Ryu, H. G., Na, S., Hong, S. B., Lee, H. J., Kim, J. Y., & Lee, S. M. (2019). Procalcitonin-Guided Treatment on Duration of Antibiotic Therapy and Cost in Septic Patients (PRODA): a Multi-Center Randomized Controlled Trial. *Journal of Korean medical science*, 34(14), e110. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e110>

Huang, D. T., Yealy, D. M., Filbin, M. R., Brown, A. M., Chang, C. H., Doi, Y., Donnino, M. W., Fine, J., Fine, M. J., Fischer, M. A., Holst, J. M., Hou, P. C., Kellum, J. A., Khan, F., Kurz, M. C., Lotfipour, S., LoVecchio, F., Peck-Palmer, O. M., Pike, F., Prunty, H., ... ProACT Investigators (2018). Procalcitonin-Guided Use of Antibiotics for Lower Respiratory Tract Infection. *The New England journal of medicine*, 379(3), 236–249. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802670>

Mendelson, F., Griesel, R., Tiffin, N., Rangaka, M., Boulle, A., Mendelson, M., & Maartens, G. (2018). C-reactive protein and procalcitonin to discriminate between tuberculosis, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, and bacterial pneumonia in HIV-infected inpatients meeting WHO criteria for seriously ill: a prospective cohort study. *BMC infectious diseases*, 18(1), 399. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3303-6>

Andriolo, B. N., Andriolo, R. B., Salomão, R., & Atallah, Á. N. (2017). Effectiveness and safety of procalcitonin evaluation for reducing mortality in adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. *The Cochrane database of systematic reviews*, 1(1), CD010959. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010959.pub2>

Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 60(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>

Yang X, Yang M, Pang B, Vara M, Xia Y (October 2015). "Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine". *Chemical Reviews*. **115** (19): 10410–88.

<https://nanocomposix.com/pages/introduction-to-lateral-flow-rapid-test-diagnostics#target> (luettu 30.10.2020)

<https://diagnostics.roche.com/fi/en/products/params/electsys-brahms-procalcitonin-pct.html> (luettu 16.4.2020)

Huangxian Ju, Guosong Lai, Feng Yan (2017). Electrochemiluminescent immunosensing. *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers*, 171-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101999-3.00006-2>

Shen, J., Zhou, T., & Huang, R. (2019). Recent Advances in Electrochemiluminescence Sensors for Pathogenic Bacteria Detection. *Micromachines*, 10(8), 532. <https://doi.org/10.3390/mi10080532>

Rizwan, M., Mohd-Naim, N. F., & Ahmed, M. U. (2018). Trends and Advances in Electrochemiluminescence Nanobiosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(1), 166. <https://doi.org/10.3390/s18010166>

Deftos, L. J., Roos, B. A., & Parthemore, J. G. (1975). Calcium and skeletal metabolism. *The Western journal of medicine*, 123(6), 447–458.

Floriańczyk, Bolesław. (2003). Structure and diagnostic value of procalcitonin. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina*. 58. 338-42.

Thermo Scientific B.R.A.H.M.S PCT Direct-ohjekirja