



Annastiina Ylitalo

CRP-MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI

CRP-MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI

Annastiina Ylitalo
Opinnäytetyö
Syksy 2012
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Annastiina Ylitalo

Opinnäytetyön nimi: CRP-määritysmenetelmän validointi

Työn ohjaaja: Elsa Kumpulainen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2012 Sivumäärä: 57 + 14 liitesivua

Opinnäytetyön aiheena oli CRP-määritysmenetelmän validointi. Työn tavoitteena oli selvittää, onko validoitava menetelmä vertailukelpoinen referenssimenetelmään verrattuna. Työssä tutkittiin validoitavan menetelmän lineaarisuutta, tarkkuutta ja toistettavuutta. Lisäksi selvitettiin, antavatko menetelmät samoja tuloksia.

Validoitavana menetelmänä oli Human hsCRP ELISA. Tämä menetelmä on entsyymi-immunologinen määritysmenetelmä, joka perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon. Menetelmällä määritettiin ihmisen seeruminäytteistä C-reaktiivisen proteiinin pitoisuutta (CRP). CRP on maksan proteiinisynteesin tuottama akuutin faasin proteiini, jonka pitoisuus veressä nousee tulehduksen tai kudoksen vaurion synnyttämien välittäjäaineiden vaikutuksesta. Tuloksia analysoitiin tilastollisten testien avulla.

Tilastollisten testien avulla saatujen tulosten mukaan menetelmä antaa samoja tuloksia kuin referenssimenetelmä. Validoitavan menetelmän lineaarisuus on hyvä, mutta tarkkuutta ja toistettavuutta olisi syytä tutkia lisää.

Asiasanat: C-reaktiivinen proteiini, ELISA, validointi

SISÄLTÖ

CRP-MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI.....	1
CRP-MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI.....	2
TIIVISTELMÄ	3
SISÄLTÖ	4
1 JOHDANTO.....	6
2 IMMUUNIJÄRJESTELMÄ	7
2.1 Luontainen immunitetti.....	7
2.2 Hankittu immunitetti	8
2.3 Immuunijärjestelmän toiminta	9
3 TULEHDUS.....	11
3.1 Tulehdusreaktio	11
3.2 Välittäjäaineet eli sytokiinit	12
4 CRP (C-reaktiivinen proteiini)	13
4.1 CRP:n rakenteesta.....	13
4.2 CRP:n merkitys tulehdusreaktion toteamisessa.....	14
4.3 CRP:n viiteväli	14
5 CRP:N MÄÄRITYSMENETELMÄT	16
5.1 Lasko eli senkka	16
5.2 CRP:n määrittämismenetelmät.....	17
5.2.1 Herkät hs-CRP-mittausmenetelmät	18
5.2.2 Vieritestit	18
5.3 Menetelmien vertailu.....	18
6 ENTSYYMI-IMMUNOLOGISET MÄÄRITYSMENETELMÄT	20
6.1 Antigeenin ja vasta-aineen tehtävä immuunireaktiossa	20
6.2 Enzyme Immune assay (EIA)	22
6.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	22
7 MENETELMÄN VALIDOINTI.....	24
7.1 Validoinnin parametrit	24
7.1.1 Selektiivisyys ja spesifisyys	24
7.1.2 Toistotarkkuus, toistettavuus	25
7.1.3 Tarkkuus, oikeellisuus.....	25
7.1.4 Lineaarisuus ja mittausalue	26

7.1.5 Toteamis- ja määrittäysraja.....	27
7.1.6 Mittausepävarmuus.....	27
7.1.7 Herkkyys	28
7.1.8 Häiriöalttius	28
7.1.9 Saanto	28
7.1.10 Analyysivirheet.....	29
7.2 Tilastolliset testit.....	29
7.2.1 F-testi.....	30
7.2.2 T-testi.....	30
7.2.3 Luottamusvälitarkastelu	31
7.2.4 Varianssianalyysi	32
7.2.5 Regressioanalyysi.....	32
8 HUMAN HSCRP ELISA -MENETELMÄN VALIDOINTI.....	34
8.1 Menetelmän periaate	34
8.2 Menetelmässä käytetyt reagenssit.....	35
8.3 Näytteet	35
8.4 Human hsCRP ELISA -menetelmän mittausten suoritus.....	36
9 TULOKSET	39
9.1 Toteamis- ja määrittäysraja.....	39
9.2 Lineaarisuus ja mittausalue	39
9.3 Tarkkuus	40
9.4 Toistotarkkuus (täsmällisyys), toistettavuus.....	43
9.5 Menetelmien vertailu.....	45
9.5.1 Regressioanalyysi.....	45
9.5.2 Parillinen t-testi	50
10 YHTEENVETO	52
10 YHTEENVETO	52
LÄHTEET	54
LIITTEET	
Liite 1. Mittaustulokset	
Liite 2. Varianssianalyysien tulokset	
Liite 3. Uudet varianssianalyysien tulokset	

1 JOHDANTO

Immunologiset määrittämenetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon. Entsyymi-immunologisista määrittämenetelmistä ELISA-menetelmiä on kahta lajia: suora ja epäsuora menetelmä. Suoralla menetelmällä voidaan mitata seerumissa olevaa antigeenin pitoisuutta, ja epäsuoralla menetelmällä voidaan mitata seerumista vasta-aineen pitoisuutta. Työssä käytettävä Human hsCRP ELISA -menetelmä on suora menetelmä, joka mittaa antigeenin (CRP) pitoisuutta seerumissa. Tämä menetelmä on herkistetty mittaamaan pieniä pitoisuuksia seerumista (alle 10 mg/l). (20, s. 20–27; 16.)

Kemiallisen mittausmenetelmän validoinnissa arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä sekä soveltuvuutta tiettyyn tarkoitukseen. Validoinnissa tutkittavia ominaisuuksia ovat: selektiivisyys ja spesifisyys, mittausalue, lineaarisuus, herkkyys, toteamis- ja määrittärajat, häiriöalttius, saanto, tarkkuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus. Aina ei ole tarkoituksenmukaista tai mahdollista suorittaa kaikkia toimenpiteitä. Tässä työssä tutkitaan menetelmän lineaarisuutta, tarkkuutta ja toistettavuutta sekä selvitetään, antavatko menetelmät samoja tuloksia. (24.)

Opinnäytetyön tavoitteena on validoida C-reaktiivisen proteiinin (CRP) määrittämenetelmä. Validoitavana menetelmänä on entsyymi-immunologinen määrittämenetelmä Human hsCRP ELISA, jolla määritetään ihmisen seerumista CRP-pitoisuus. Validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia verrataan vertailumenetelmällä saatuihin tuloksiin. Vertailumenetelmänä työssä on automaattinen Architect c8000 -analysaattori, jolla on aikaisemmin määritetty CRP-pitoisuudet näytteistä. Työ suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen neuvolaserologian laboratoriossa Oulussa syksyllä 2012.

2 IMMUUNIJÄRJESTELMÄ

Immuunijärjestelmä on elimistön puolustusjärjestelmä vieraita taudinaiheuttajia eli patogeenejä, esimerkiksi viruksia ja bakteereja vastaan. Immunologisissa järjestelmissä esiintyvät häiriöt, kuten puutokset tai liiallinen tai väärin kohdistunut toiminta, altistavat infektioille tai aiheuttavat immuunitauteja. Immuunijärjestelmän solut ja molekyylit kykenevät erottelemaan omia ja vieraita rakenteita. Poikkeuksena ovat autoimmuunisairaudet, joissa elimistön immuunijärjestelmä hyökkää omia soluja vastaan. Immuunijärjestelmän tunnistusrepertuaari on laaja, ja tunnistuksesta jää muistijälki. Mikrobin vastainen puolustus jaetaan luontaiseen ja hankittuun immunitettiin. (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan.)

2.1 Luontainen immunitetti

Luontainen immunitetti on synnynnäinen ja epäspesifinen puolustusjärjestelmä. Luontaiselle immunitetille on tyypillistä, että sen reaktiot ovat nopeita ja toistuvat samankaltaisina. Luontaiseen immunitettijärjestelmään kuuluu normaalifloora eli ihon, suoliston ja limakalvojen mikrobisto, molekyylit ja fagosytoosi. Järjestelmän molekyylejä ovat muun muassa komplementtijärjestelmä, tunnistinmolekyylit, mikrobeja tuhoavat peptidit, monet viestittäjä-molekyylit, tulehduksen välittäjäaineet (sytokiinit) ja muut tulehdukseen liittyvät biologiset tuotteet, esimerkiksi CRP. Komplementti on joukko proteiineja, jotka tunnistavat ja tuhoavat patogeenejä. Fagosytoosi on tärkein epäspesifinen infektioilta suojaava mekanismi. Fagosytoivia soluja ovat erilaiset valkosolut, kuten granulosyytit, monosyytit ja makrofagit. Fagosytoivat solut pystyvät tuhoamaan vieraat solut "nielemällä" ne sisäänsä ja eliminoimaan ne solun sisällä. Luontaisen puolustuksen molekyyleillä on vain rajallinen kyky tunnistaa kohderakenteita. Luontainen immunitetti toimii nopeasti ja komplementtijärjestelmä ja fagosyytit voivatkin tuhota kohteensa minuuteissa siitä kun immuunipuolustus on nämä tunnistanut. Mikäli luontainen immunitetti pettää, tarvitaan hankinnaista immuunivastetta,

spesifistä puolustusmekanismia. (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan; 19, hakusana luonnollinen immunitetti; 20, s. 1; 21.)

2.2 Hankittu immunitetti

Hankitulla immunitetilla on opittu spesifinen kyky tunnistaa antigeenejä. Hankitun immunitetin pääosat ovat B-lymfosyyteistä kehittyneiden plasmasolujen tuottamat vasta-aineet ja T-lymfosyytit. T-solulinja vastaa soluvälitteisestä immunitetistä. T-soluja muodostuu kolmea eri tyyppiä: sytotoksinen T-lymfosyytti, auttaja-T-lymfosyytti ja supressori-T-lymfosyytti. Sytotoksinen T-lymfosyytti on tappajasolu, joka tuhoaa kohdesolun suoraan. Auttaja-T-lymfosyytti aktivoituu kohdatessaan vieraan antigeenin ja aktivoi myös muita immunojärjestelmän soluja. Auttaja-T-lymfosyytti on immunojärjestelmän tärkein solu, koska B-solut eivät aktivoidu tuottamaan vasta-ainetta ilman auttaja-T-soluja. Supressori-T-lymfosyytit kontrolloivat immunojärjestelmää ja huolehtivat, että immunoreaktio loppuu, kun antigeeni on eliminoitu. Supressori-T-lymfosyytit huolehtivat myös immunotoleranssista, eli keho ei hyökkää omia soluja eikä omia antigeeneja vastaan. Humoraalisia eli liukoisia vasta-aineita tuottavat B-lymfosyytit, jotka antigeenikontaktin jälkeen auttaja-T-lymfosyyttien avulla alkavat jakautua ja muuttuvat plasmasoluiksi, jotka tuottavat liukoisia vasta-aineita verenkiertoon. (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan; 20, s. 5–6.)

Ensimmäisen antigeenikontaktin yhteydessä spesifisen immuunivasteen muodostuminen vie oman aikansa (1–2 viikkoa), mutta seuraavan kontaktin yhteydessä reaktiot tapahtuvat jo nopeammin ja voimakkaampina. Tähän perustuu hankittu immunitetti eli suoja saman mikrobin aiheuttamaa uusintainfektiota vastaan. Spesifinen puolustus kehittyy jatkuvasti sen mukaan millaisten antigeenien kanssa elimistö joutuu kosketuksiin. Passiivisessa immunisaatiossa henkilölle annetaan valmiita vasta-aineita, esimerkiksi väkrokotukset. (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan; 20, s. 5–6.)

2.3 Immuunijärjestelmän toiminta

Luontainen ja opittu immuunijärjestelmä eivät toimi toisistaan erillään. Luontainen immuunijärjestelmä kohtaa yleensä ensimmäisenä kehoon tunkeutuvan mikrobin tai vaurioituneen kudusrakenteen. Omat rakenteet fagositoidaan, mutta vieraat rakenteet kuljetetaan imusolmukkeisiin, jossa ne esitellään lymfosyyteille. Opittu immuunijärjestelmä reagoi vieraille rakenteille ja syntyy antigeeneille spesifisiä vasta-aineita ja T-soluja. Tämän jälkeen ryhtyvät luontaisen järjestelmän mekanismit, esimerkiksi komplementti ja valkosolut, tuhoamaan vasta-aineiden tunnistamaa kohdemikrobia tai toteuttamaan muita tehtäviä, joihin ne ovat ohjelmoituneet. Immuunireaktioita sekä edeltää että seuraa tulehdusreaktio. Spesifisten tunnistemolekyylien (vasta-aineet ja T-solureseptorit) reagoitua kohteidensa kanssa vapautuu välittäjämolekyyliä eli sytokiineja, aktivoituu tulehdussoluja, komplementtijärjestelmä ja muita tulehduksen välittäjämekanismeja. Vapautuvien tai syntyvien eri välittäjämolekyylien toiminnan seurauksena välitetään viestejä kudosten muille soluille. Näin esimerkiksi verisuonet laajenevat, niiden läpäisevyys lisääntyy ja sileät lihakset voivat supistua. Seurauksena ovat tulehdusreaktiolle tyypilliset punoitus, turvotus, kipu ja kuumotus. (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan.) Luontaisen ja opitun immuniteetin eroja nähdään taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Luontaisen ja opitun immunitetin eroja (1, linkit -> yleisimmunologia -> johdanto immunologiaan)

Luontainen eli synnynnäinen immunitetti	Adaptiivinen eli opittu immunitetti
Komponentit Fagosyytit Komplementti Toistokuvioita tunnistavat (pattern recognition) molekyylit Yleispuolustusmekanismit	Komponentit B-solut (vasta-aineet) T-solut
Ominaisuudet Nopea Epäspesifinen, karkea erottelu Suppea tunnistusvalikoima Toistuu samankaltasena Ei muistia Ei muokkaudu (genomien määrä)	Ominaisuudet Hidas Spesifinen Laaja tunnistusvalikoima Aiempi kontakti tehostaa reaktiota (oppiminen) Muisti Muokkautuu (geenien uudelleenjärjestely, somaattiset mutaatiot)

3 TULEHDUS

Immunologinen puolustustoiminta havaitaan tavallisesti tulehdusreaktiona, joka on seurausta immuunipuolustuksen aikana erittyvien välittäjäaineiden vaikutuksesta elimistössä. Tulehduksella eli inflammaatiolla tarkoitetaan ärsyyntymisreaktiota ulkoihin tai sisäisiin ärsykkeisiin. Tulehdusreaktion tarkoituksena on eliminoida vieraita tai omia haitallisiksi käyneitä rakenteita, viestittää uhkasta ja käynnistyneistä reaktioista muille kehon osille ja käynnistää paraneminen. (1, linkit -> infektioimmunologia -> tulehdusreaktio -> johdanto.)

3.1 Tulehdusreaktio

Patogeenin tunkeutuminen kudoksiin, fysikaaliset ärsykkeet ja kudostuho laukaisevat elimistössä tulehdusreaktion, jonka tarkoitus on tuhota taudinaiheuttaja. Kun tulehdusvaste käynnistyy ja toimii asianmukaisesti, seurauksena on joko aggressiivinen ja nopeasti paraneva vaurio tai vähäoireinen reaktio, jossa patogeeni eliminoiduu tehokkaasti jo tunkeutumisen alkuvaiheessa. Tulehdusreaktio on aiheuttajasta riippumatta hyvin samankaltainen. Tämä johtuu elimistössä syntyvistä tulehduksen välittäjäaineista eli sytokiineista, jotka säätelevät tulehduksen eri vaiheita. Tulehdusreaktio voidaan jakaa akuuttiin epäspesifiseen vaiheeseen ja lymfosyyttien välittämään spesifiseen immuunivasteeseen. Akuutin tulehduksen klassiset oireet ovat punoitus, kuumotus, turvotus, kipu ja häiriintynyt toiminta. Usein tulehdusreaktioon liittyy myös väsymystä, kuumetta ja muita yleisoreita. (2, linkit systemaattinen farmakologia -> tulehdus- ja immunologisia reaktioita vaimentavat lääkeaineet -> tulehdusreaktio.)

3.2 Välittäjäaineet eli sytokiinit

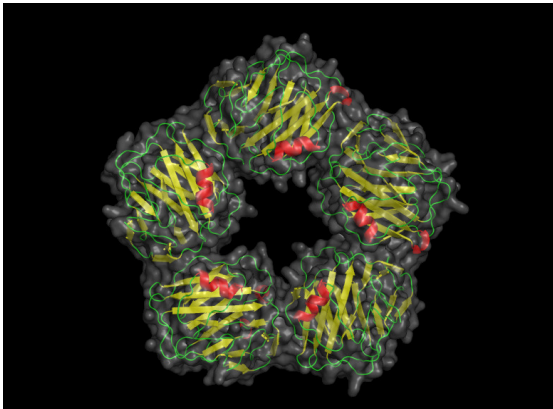
Sytokiinit ovat proteiini- tai glykoproteiinirakenteisia tulehdusreaktiota ja immuunivastetta sääteleviä välittäjäaineita, joiden vaikutus kohdistuu erityisesti tulehdussoluihin. Sytokiinit ovat pääosin tulehdussolujen itsensä tuottamia. Osa sytokiineista voimistaa tulehdusta ja välittää kudostuhoa, osa rauhoittaa tulehdusreaktiota tai käynnistää paranemisprosesseja. Tunnetuimpia akuutin vaiheen reaktion välittäjiä ovat interleukiinit 1 ja 6 (IL-1, IL-6), joita tuottavat tulehduspaikan solut, erityisesti makrofagit. Nämä sytokiinit vaikuttavat myös luuytimeen, hypotalamukseen ja maksaan. Ne laittavat neutrofiitit liikkeelle, aikaansaavat tulehduksen yleisoireet (kuume, kivun arkuus, väsymys) ja akuutin vaiheen proteiinien synteesin maksassa, jonka tuotteena on esimerkiksi C-reaktiivinen proteiini. (2, linkit farmakologian yleisperiaatteet -> kemialliset välittäjäaineet -> paikalliset välittäjäaineet -> sytokiinit; 1, linkit -> yleisimmunologia -> luontaiset puolustusmekanismit -> akuutin vaiheen proteiinit; 3, hakusana akuutin tulehdusreaktion immunologinen säätely.)

4 CRP (C-reaktiivinen proteiini)

C-reaktiivinen proteiini eli CRP on maksan proteiinisynteesin tuottama akuutin faasin proteiini, jonka pitoisuus veressä nousee tulehduksen tai kudoksen vaurion synnyttämien välittäjäaineiden interleukiini 1:n ja interleukiini 6:n vaikutuksesta (4, s. 15).

4.1 CRP:n rakenteesta

CRP on pentraksiini, jonka perusyksikkönä on viidestä identtisestä alayksiköstä koostuva rakenne. Jokainen alayksikkö koostuu 206 aminohaposta. Kokonaisen CRP-molekyylin molekyylimassa on n. 120 000 Da. (5, hakusana C-reaktiivinen proteiini; 6, s. 3.) C-reaktiivinen proteiini on kuvassa 1.



KUVA 1. C-reaktiivinen proteiini (6, hakusana C-reaktiivinen proteiini)

CRP:n määrittäminen on hyödyllistä, koska sen pitoisuus kasvaa infektion, tulehduksen, kudostuhoon yhteydessä. Seerumin CRP-pitoisuuksien muutokset ovat suuria. Kun muiden akuutin vaiheen proteiinien pitoisuudet kasvavat kaksin- tai kolminkertaisiksi, CRP:n pitoisuus voi kasvaa tulehduksen yhteydessä 100–1000-kertaiseksi. Lisäksi seerumin CRP-pitoisuus kasvaa yleensä aikaisemmin kuin muiden akuutin vaiheen proteiinien pitoisuudet. CRP-arvo kohoaa yli viitealueen ylärajan 6–12 tunnissa tulehduksen tai kudostuhoon alusta ja saavuttaa huippuarvonsa 1–2 vrk:n kuluessa. CRP:n määrittäminen

seerumista on halpaa, joten se on osoittautunut käteväksi diagnostiseksi työvälineeksi. (7; 4, s. 15; 1, linkit -> yleisimmunologia -> luontaiset puolustusmekanismit -> akuutin vaiheen proteiinit.)

4.2 CRP:n merkitys tulehdusreaktion toteamisessa

Yleensä CRP:n määrittystä käytetään infektioiden toteamiseen, virus- ja bakteeri-infektioiden erottamiseen toisistaan ja hoitovasteen seurantaan. CRP:n mittausta auttaa selvittämään, onko kuume ja sen syynä oleva tulehdus viruksen vai bakteerin aiheuttama. CRP-arvo suurenee herkästi bakteerien aiheuttamissa tulehduksissa, mutta virustaudeissa vain vähän. CRP suurenee bakteeri-infektioissa usein arvoon 100 tai yli, kun se virustaudeissa on korkeintaan muutama kymmenen. Erottelu on tärkeää siksi, että virustulehduksia ei yleensä tarvitse hoitaa lääkkeillä, mutta bakteeritulehduksia pitää hoitaa antibiooteilla. Yksi CRP:n merkittävä käyttöalue on hoitovasteen seuranta eli kuinka mikrobilääkkeet tehoavat. Kun toipuminen on normaalia, CRP:n pitoisuus pienenee seurannan aikana. Suurena pysyvä CRP-pitoisuus viittaa komplikaatioiden kehittymiseen. CRP:n määrittystä voidaan pitää tällä hetkellä käyttökelpoisimpana bakteerikeuhkokuumeen diagnostiikassa, bakteeri-infektioiden hoitovasteen seurannassa, leikkauksen jälkeisten infektiokomplikaatioiden toteamisessa, neutropeenisen (neutrofiilien poikkeuksellinen alhainen määrä veressä) potilaan verenmyrkytyksen toteamisessa sekä tulehduksellisten suolistosairauksien ja nivelreuman aktiivisuuden mittaamisessa. Krooniseen lievään tulehdukseen voi liittyä jatkuvasti hieman koholla oleva CRP-taso, joka voidaan todeta herkällä CRP-testillä. (4, s. 16; 8; 9, s. 42; 1, linkit -> yleisimmunologia -> luontaiset puolustusmekanismit -> akuutin vaiheen proteiinit.)

4.3 CRP:n viiteväli

Seerumin CRP:n viitealueen yläraja on 10 mg/l. Bakteeri-infektioissa CRP-arvo on yleensä korkea ja virusinfektioissa matala tai mittaamattomissa. CRP-arvo

voi nousta myös tiloissa, joissa syntyy kudostuhoa tai voimakasta tulehdusta esimerkiksi sydäninfarkti tai akuutti kihtikohtaus. Suurimmat CRP:n pitoisuudet (100–600 mg/l) liittyvät verenmyrkytykseen. Muissakin vakavissa bakteerinfektioissa CRP:n pitoisuudet ovat suuria. CRP:n pitoisuus kuvastaa lähinnä infektion voimakkuutta, infektiin liittyvää kudostuhoa ja tulehdussolujen toimintaa, eikä ole spesifinen infektion aiheuttajan suhteen. Tavallisten leikkausten jälkeen CRP-pitoisuus nousee kahden–kolmen päivän aikana n. 150:n tasolle, ja ellei tilanne komplisoidu, pitoisuus laskee nopeasti alas ja on viitealueella neljäntenä–kuudentena päivänä. Terveillä ihmisillä CRP-pitoisuus on 0,1–3,7 mg/l. Näin pieniä pitoisuuksia ei kuitenkaan yleensä mitata tarkasti, koska tulehdukseen viittaavat CRP-pitoisuudet ovat suurempia kuin 10 mg/l. Useat laboratoriot ilmoittavatkin terveiden CRP-pitoisuudeksi "alle 10 mg/l". Krooniseen lievään tulehdukseen voi liittyä jatkuvasti hieman koholla oleva CRP-taso, joka voidaan todeta erityisen herkällä CRP-testillä. (4, s. 16; 10; 11; 1, linkit -> yleisimmunologia -> luontaiset puolustusmekanismit -> akuutin vaiheen proteiinit.)

5 CRP:N MÄÄRITYSMENETELMÄT

Tulehdussairauksia on ennen määritetty laskon avulla, mutta nykyään CRP:n määrittäminen on syrjäyttänyt sen. CRP on helppo ja nopea määrittää, ja sen voi nykyään määrittää myös laboratorion ulkopuolella.

5.1 Lasko eli senkka

Lasko eli senkka oli ensimmäisiä verikokeita, joita alettiin käyttää potilaiden tutkimisessa. Ruotsalainen tutkija Robin Fåhræus keksi vuonna 1917, että putkeen imetty veri kerrostuu seistessään. Silloin veren hyytyminen ennen tutkimusta estettiin sitraatilla, jota edelleenkin käytetään samaan tarkoitukseen. Pystysuorassa olevassa lasiputkessa veren punasolut laskeutuvat hiljalleen alemmaksi ja pintaan jää kirkas plasmakerros. Terveillä ihmisillä punasolut laskeutuivat hitaasti, enintään noin 10 mm/h. Potilailla, joilla oli tulehdussairauksia, punasolut laskeutuivat nopeammin, jopa 100mm/h. Veri koostuu suolaisesta valkuaisaineliuksesta eli plasmasta ja soluista, joista valtaenemmistö on punasoluja. Tulehduksen aikana vereen ilmaantuu valkuaisaineita, joiden vaikutuksesta punasolut pyrkivät liimautumaan toisiinsa. Mukana reaktiossa on myös hyytymiseen osallistuva fibrinogeeniproteiini. Yhteen liimautuneet punasolut kokkaroituvat putkessa, ja kokkaroitunut solumassa valuu putkessa alaspäin. (9, s. 34; 13.)

Ennen lasko mitattiin sekoittamalla neljä osaa verta yhteen osaan sitraattia. Näin saatu laimennettu veri imettiin lasiputkeen, johon on merkitty millimetriasteikko. Putken annettiin seistä pystyasennossa tunnin ajan, ja sitten katsottiin, kuinka monta millimetriä punasolupatsaan yläpinta on maan vetovoiman vaikutuksesta laskenut. Tämä lukema on lasko. Laskon yksikkö on laskeutumisvauhdin yksikkö millimetriä tunnissa. Nykyään veri otetaan suoraan veriputkeen, jossa on sitraatti valmiina. Putket asetetaan laitteeseen, joka lukee

tuloksen 30 min kuluttua. Aikaa on lyhennetty vastauksen nopeuttamiseksi, mutta tulos kerrotaan kahdella, sillä laskon yksikkö on mm/h. (12; 9, s. 35.)

Lasko suurenee herkästi eri syistä johtuvissa tulehduksissa. Se suurenee sekä bakteerien aiheuttamissa tulehduksissa että muista syistä, joissa elimistön kudoksissa todetaan tulehdusreaktiota. Laskoon vaikuttaa punasolujen ja plasman tiheyksien välinen ero, plasman sisäinen kitkaisuus eli viskositeetti ja punasolujen muoto. Tulehdusvastetta säätelevien immunoglobuliinien ja veren hyytymiseen osallistuvan fibrinogeenin lisääntyminen suurentavat laskoa herkästi. Näitä valkuaisaineita tulee vereen paljon tulehduksen yhteydessä. (12.) Laskon viitearvot ovat taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Laskon viitearvot (13)

Ikä	Naiset	Miehet
17 - 29- vuotiaat	< 15 mm	< 10 mm
30 - 39- vuotiaat	< 25 mm	< 15 mm
40 - 49- vuotiaat	< 25 mm	< 20 mm
50 - 59- vuotiaat	< 30 mm	< 25 mm
60 - 69- vuotiaat	< 35mm	< 25 mm
70 - 79- vuotiaat	< 40 mm	< 30 mm

5.2 CRP:n määritysmenetelmät

CRP:n määrittäminen perustuu immunokemialliseen reaktioon. Näytteessä oleva CRP reagoi CRP:lle spesifisen vasta-aineen kanssa muodostaen liukenemattoman kompleksin (antigeeni–vasta-aine), jonka määrä voidaan havaita ja mitata. Nykyisin CRP määritetään laboratorioissa kliinisen kemian analyyseillä tai laboratorion ulkopuolella vieritestin avulla. (7.)

5.2.1 Herkät hs-CRP-mittausmenetelmät

Herkkää CRP-mittausmenetelmää käyttämällä voidaan mitata luotettavasti pienempiä CRP-pitoisuuksia kuin rutiinikokeella. Lievästi koholla olevan CRP:n rajana käytetään usein arvoa 2 mg/l. Matalien CRP-pitoisuuksien määrittämisellä pystytään arvioimaan riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. Herkkä CRP-mittausmenetelmä soveltuu myös erinomaisesti tulehduksien toteamiseen vastasyntyneillä. Koska herkkä CRP:n määrittäminen on herkistetty mittaamaan hyvin matalia CRP-pitoisuuksia (alle 10 mg/l), sitä ei voi käyttää akuuttien infektioiden arvioimiseen. (14; 15; 16.)

5.2.2 Vieritesti

Vieritesti (point of care-test, POCT) on hoitoyksikössä tai muualla varsinaisen laboratorion ulkopuolella tehtävä testi. Testin voi suorittaa paitsi laboratorioalan ammattilainen myös siihen koulutettu muu terveydenhuollon työntekijä. Näytteeksi riittää sormenpäästä otettava pisara verta ja tulos saadaan muutamassa minuutissa. (7.)

5.3 Menetelmien vertailu

Lasko suurenee melko hitaasti, jopa päivien kuluessa. Tästä syystä lasko ei ole kovin hyvä tulehduksen merkkiaine äkillisesti alkaneissa tulehdussairauksissa, vaan nopeammin reagoiva CRP on silloin käyttökelpoisempi. Lasko on hyvä tulehduksen aktiivisuuden mittari pitkäaikaisissa tulehdussairauksissa, esimerkiksi nivelreumassa, jossa suurentunut lasko merkitsee käynnissä olevaa nivelkalvon tulehdusta. Joskus CRP saattaa olla kroonisessa tulehduksessa jopa normaali, mutta lasko on lähellä sataa. Aikaisemmin laskoa käytettiin paljon, mutta nyt käyttökelpoisempi CRP on paljolti syrjäyttänyt sen. Seerumin CRP-pitoisuuden määrittäminen on osoittautunut monin tavoin kliinisesti

käyttökelpoiseksi: CRP on stabiili, se säilyy hyvin seeruminäytteissä, ja sen pitoisuuden muutokset eri tautitiloissa ovat suuria. Lisäksi pitoisuudet korreloivat hyvin taudin kliiniseen kuvaan. Vieritestin hyötynä CRP:tä mitattaessa on sen nopeus. Pikamittauksen tulos saadaan heti. Laboratoriosta tuloksen saaminen kestää pitempään, ainakin seuraavaan päivään ja monesti useita päiviä, jos näyte on lähetetty muualle tutkittavaksi. (9, s. 41; 13; 17; 18.)

6 ENTSYymi-IMMUNOLOGiset MÄÄRITYSMENETELMÄT

Elimistölle vieraat yhdisteet eli antigeenit aktivoivat elimistön puolustusjärjestelmän. Antigeeniä tai antigeeniä vastaan muodostunutta vasta-ainetta voidaan määrittää immunologisten määritysmenetelmien avulla. Immunologisia määritysmenetelmiä käytetään laajasti kliinisissä laboratorioissa. Määritysmenetelmiä on monia, mutta myöhemmin tarkastelun kohteena ovat entsyymi-immunologiset määritysmenetelmät.

6.1 Antigeenin ja vasta-aineen tehtävä immuunireaktiossa

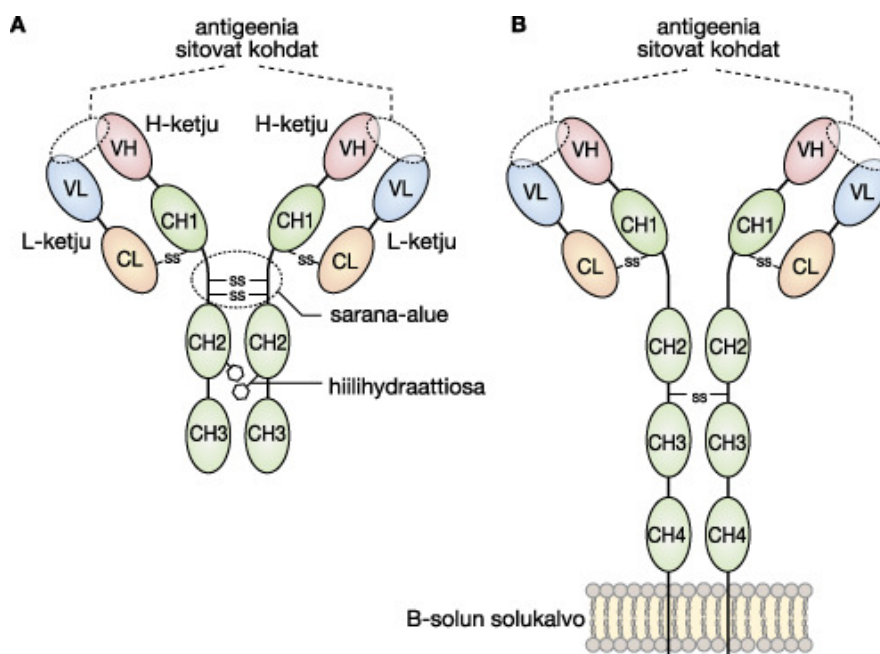
Immunologiset määritysmenetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon. Vasta-aine kiinnittyy antigeeniin palautuvalla ja spesifisellä sidoksella (avain-lukko-periaate). Sidoksen lujuutta voidaan kuvata termillä affiniteetti. Jos antigeenin ja vasta-aineen välinen sidos on heikko, on affiniteetti heikko. Jos sidos on luja, on affiniteetti suuri. Affiniteetti on immunoreaktion tasapainovakio. (20, s. 7–8.)

Antigeeni on elimistölle vieras yhdiste, esimerkiksi mikrobi tai virus. Antigeeni aiheuttaa elimistössä vasta-aineiden eli immunoglobuliinien muodostumisen tai soluvälitteisen immuunivasteen. Vasta-aineet muodostuvat antigeenin pinnalla olevaa epitooppia vastaan, johon ne kiinnittyvät ja eliminoivat antigeenin. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat usean vasta-aineen seos ja ne sitoutuvat antigeenin eri epitooppeihin. Monoklonaaliset vasta-aineet ovat spesifisiä ja sitoutuvat yhteen antigeenin epitooppiin. Epitooppien määrä vaihtelee antigeenin koon ja kemiallisen rakenteen mukaan. (20, s. 7–8; 24.)

Vasta-aineet ovat selkärankaisten eliöiden immunojärjestelmän tuottamia proteiineja, joita sanotaan immunoglobuliineiksi. Ne kykenevät tunnistamaan ja reagoimaan antigeenien kanssa ja tekemään ne toimintakyvyttömiksi. Reaktio on nopea ja spesifinen. Vasta-aineet ovat vapaina ja liukoisina veren

seerumissa. Vasta-ainemolekyyli on Y-kirjaimen muotoinen natiivi immunoglobuliinimolekyyli. Siinä on proteiinirunko, johon on liittynyt pieni hiilihydraattiosa. Runko sisältää kaksi H-alayksikköä (heavy chain) ja kaksi L-alayksikköä (light chain). (20, s. 9–12.)

Sekä H- että L-ketjut koostuvat soikeista rakenteellisista perusyksiköistä, joita kutsutaan immunoglobuliinidomeeneiksi. Tyypillisessä H-ketjussa on kaikkiaan neljä domeenia ja L-ketjussa kaksi domeenia. Alayksiköt pysyvät koossa rikkisiltojen avulla. Kummankin käsivarren päässä on tarttumiskohta, jonka avulla vasta-aine kiinnittyy antigeeniin. Tätä aluetta kutsutaan v-alueeksi (variable), ja se tekee kustakin vasta-aineesta spesifisen tietylle antigeenille. Y:n jalkaosa on c-alue (constant), ja se on erilainen vasta-aineluokasta riippuen. Vasta-aineet jaetaan viiteen eri luokkaan: IgA, IgM, IgE, IgG ja IgD. Kuvassa 2 näkyy vasta-aineen rakenne. (20, s. 9–12; 1, linkit yleisimmunologia -> vasta-aine välitteinen immunitetti -> vasta-aineiden rakenteen ja toiminnan perusteet.)

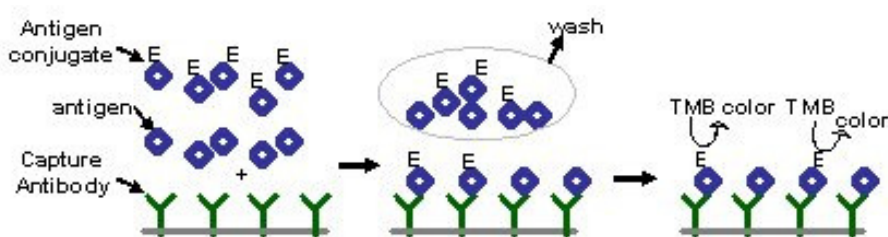


KUVA 2. Vasta-aineen rakenne (1, linkit yleisimmunologia -> vasta-aine välitteinen immunitetti -> vasta-aineiden rakenteen ja toiminnan perusteet)

Kuvassa 2 (A) on tyypillisen vasta-aineen perusyksikön rakenne. Kukin domeeni on esitetty soikiona. Siniset ja punaiset soikiot kuvaavat vaihtelevia eli v-domeeneja ja keltaiset ja vihreät soikiot vakio- eli c-domeeneja.

6.2 Enzyme Immune assay (EIA)

Kompetetiivisessä entsyymi-immunomenetelmässä entsyymillä leimattu antigeeni kilpailee näytteen mitattavan antigeenin kanssa rajoitetusta määrästä vasta-aineen antigeenin sitoutumiskohtia. Vasta-aine on yleensä koutattu kiinteään faasiin, esimerkiksi mikrotiitterilevyn kaivojen pintaan. Ylimääräinen entsyymileima pestään pois ja kaivoihin lisätään substraatti, jolloin lopputuotteeksi muodostuu värillinen yhdiste, joka mitataan spektrofotometrillä. Näytteestä mitattava absorbanssi on kääntäen verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. Mitä suurempi absorbanssi, sitä pienempi mitattavan antigeenin pitoisuus ja päinvastoin. Mitä enemmän näytteessä on määritettävää antigeenia, sitä tehokkaammin se kilpailee vasta-aineen sitoutumiskohdista leimatun antigeenin kanssa. (20, s. 25–26.) Kompetetiivinen entsyymi-immunomenetelmä on kuvassa 3.

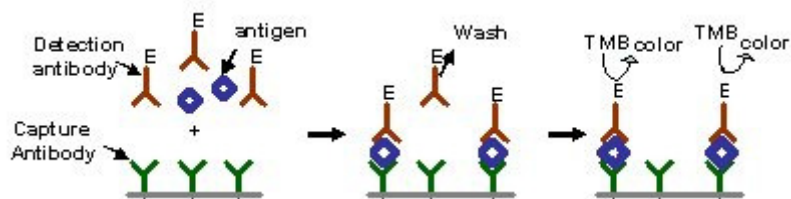


KUVA 3. Kompetetiivinen entsyymi-immunomenetelmä (23)

6.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

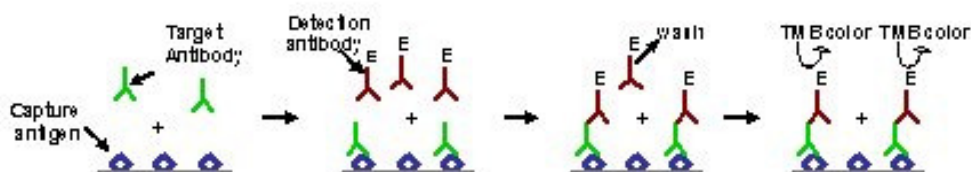
ELISA-menetelmiä on kahta lajia: suora ja epäsuora menetelmä. Suora menetelmä mittaa seerumissa olevaa antigeenin pitoisuutta. Vasta-aine on koutattu kiinteään faasiin (mikrotiitterilevy), johon mitattava antigeeni tarttuu. Entsyymillä leimattu spesifinen vasta-aine tarttuu antigeeniin ja muodostaa

”sandwich”-immunokompleksin. Ylimääräiset entsyymi-leimatut vasta-aineet pestään pois. Entsyymien substraatin lisäyksen jälkeen muodostuu värillinen lopputuote, joka mitataan spektrofotometrillä. Sitoutuneen leiman määrä on suoraan verrannollinen mitattavan analyytin määrään, eli saatu absorbanssi on suoraan verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. (20, s. 26.) Suora ELISA-menetelmä on kuvassa 4.



KUVA 4. Suora ELISA (23)

Epäsuora ELISA-menetelmä mittaa seerumista vasta-aineen pitoisuutta. Antigeeni on koutattuna kiinteään faasiin (mikrotiitterilevy), johon mitattava vasta-aine sitoutuu. Leimana toimii entsyymillä leimattu kaksoisvasta-aine, joka tarttuu mitattavaan vasta-aineeseen. Ylimääräiset entsyymi-leimatut vasta-aineet pestään pois. Substraatin lisäyksen jälkeen muodostuu värillinen yhdiste, joka mitataan spektrofotometrillä. Saatu absorbanssi on suoraan verrannollinen vasta-aineen pitoisuuteen. (20, s. 26–27.) Epäsuora ELISA-menetelmä on kuvassa 5.



KUVA 5. Epäsuora ELISA (23)

7 MENETELMÄN VALIDOINTI

Kemiallisen mittausmenetelmän validoinnissa arvioidaan mittausmenetelmän suorituskkyä sekä soveltuvuutta tiettyyn tarkoitukseen. Validoinnissa selvitetään, täyttääkö menetelmä aikaisemmin asetetut laatuvaatimukset. Validoinnin tarve on suuri ei-standardisoiduille menetelmille, laboratorion sisäisille menetelmille sekä standardimenetelmille, kun niiden käyttöaluetta laajennetaan. Validoinnin laajuus riippuu tulosten käyttötarkoituksesta, asiakkaiden tarpeista ja menetelmän luonteesta. Aina ei ole tarkoituksenmukaista tai mahdollista suorittaa kaikkia toimenpiteitä, mutta validoinnista pyritään tekemään aina mahdollisimman kattava. Kaikki validointiin liittyvät tulokset kirjataan niin, että niiden perusteella voidaan sanoa, soveltuuko menetelmä käyttötarkoitukseensa vai ei. (24; 25.)

7.1 Validoinnin parametrit

Menetelmän validointi koostuu validointisunnitelmasta, validointimittauksista, tulosten käsittelystä ja raportoinnista. Validoinnissa tutkittavia ominaisuuksia ovat: selektiivisyys ja spesifisyys, mittausalue, lineaarisuus, herkkyys, toteamis- ja määrittäysraja, häiriöalttius, saanto, tarkkuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus. (24.)

7.1.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

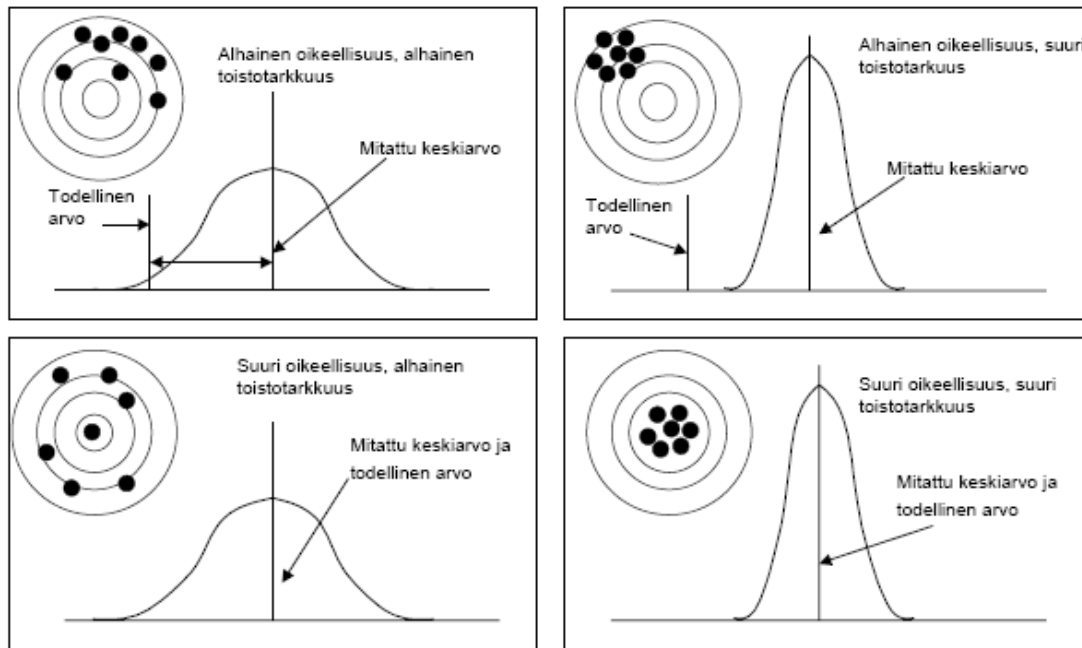
Mittausmenetelmän selektiivisyys tarkoittaa menetelmän kykyä määrittää tarkasti ja spesifisesti kysymyksessä oleva analyytti, kun näytematriisissa esiintyy muita komponentteja määrättyissä testiolosuhteissa. Menetelmä on spesifinen, jos se on täysin selektiivinen analysoitavalle aineelle tai aineryhmälle. Spesifisyys- ja selektiivisyyskokeilla varmistetaan, että menetelmällä mitataan ainoastaan haluttua komponenttia. Eri analyysimenetelmillä on omat spesifisyys- ja selektiivisyysongelmansa. (24; 25.)

7.1.2 Toistotarkkuus, toistettavuus

Menetelmän toistotarkkuus ilmaisee keskenään riippumattomien tulosten vastaavuuden. Se ilmoitetaan normaalisti suhteellisenä keskihajontana. Toistettavuus on toistotarkkuuden laji, missä mittaukset on tehty toistettavissa olosuhteissa eli samalla menetelmällä, samasta materiaalista, saman analysoijan toimesta, samassa laboratoriossa ja lyhyellä aikavälillä. Toistotarkkuus voidaan suorittaa tekemällä useista pitoisuudeltaan erilaisista näytteistä rinnakkaismääryksiä useana päivänä. Analysoimalla tulokset yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) saadaan selville sarjojen sisäinen, sarjojen välinen ja mittausten kokonaishajonta. (24.)

7.1.3 Tarkkuus, oikeellisuus

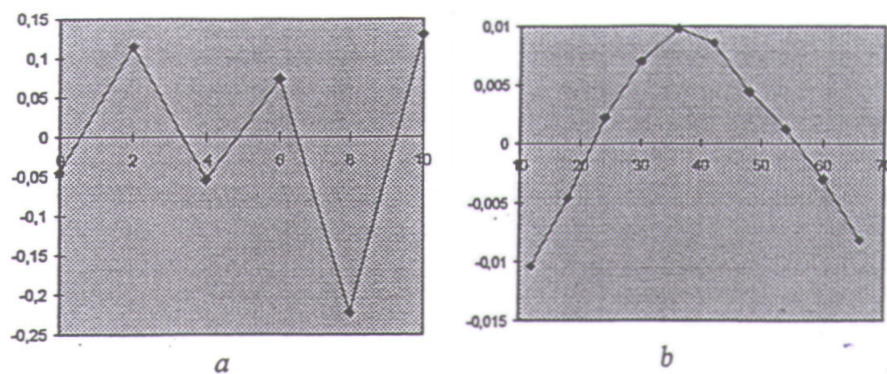
Menetelmän tarkkuus on mitatun tuloksen ja oikean arvon läheisyys. Menetelmän tarkkuus saadaan arvioimalla menetelmän systemaattista ja satunnaisvirhettä. Menetelmän oikeellisuus pitää sisällään ainoastaan systemaattisen virheen, eli se kertoo miten oikea mitattu tulos on. Mittauksen oikeellisuus ilmaistaan yleensä poikkeamana eli systemaattisena virheenä. Poikkeama on mitattavan suureen oletetun mittaustuloksen ja tosiarvon tai sovitun arvon välinen ero. Oikeellisuus määritetään vertaamalla menetelmällä saatuja mittaustuloksia tiettyyn referenssiarvoon, joka on saatu tunnetusta vertailumateriaalista tai toisen tunnetun menetelmän avulla. Menetelmän toistotarkkuus, tarkkuus ja oikeellisuus on havainnollistettu kuvassa 6. (24; 25.)



KUVA 6. Menetelmän toistotarkkuus, tarkkuus ja oikeellisuus (24)

7.1.4 Lineaarisuus ja mitta-alue

Lineaarinen määrittämisalue on se pitoisuusalue, jolla kalibrointikäyrän kaartumista ei vielä havaita. Määrittämisalue voidaan määrittää analysoimalla laajalla pitoisuusalueella olevia standardeja. Tarkastelussa käytetään apuvälineenä residuaalitarkastelua. Residuaali on mallin ennustamien ja todellisten pitoisuuksien erotuksia. Täysin lineaarisessa tilanteessa residuaalit jakautuvat tasaisesti nollassa molemmille puolille. Residuaalikuvaajista on esimerkit kuvassa 7. Kuvassa 7 (a) residuaalit ovat jakautuneet tasaisesti nollassa kummallekin puolelle, jolloin sovitusta on lineaarinen. Kuvassa 7 (b) sovitusta on epälineaarinen.



KUVA 7. Residuaalikuvaaja (24)

Mittausalue on se pitoisuusalue, jolla menetelmä pystyy tuottamaan tuloksia hyväksyttävällä tarkkuudella ja toistotarkkuudella. (24.)

7.1.5 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisraja on pienin analyysimenetelmällä havaittava pitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti. Määrittysraja on pienin analyysin pitoisuus, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Sekä toteamisraja että määrittysraja voidaan määrittää nollanäytteiden tulosten keskihajonnan avulla. (24; 25.)

Toteamisraja on nollanäytteen keskiarvo + 3 x (nollanäytteen keskihajonta).

Määrittysraja on nollanäytteen keskiarvo + 10 x (nollanäytteen keskihajonta).

7.1.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on testitulokseen liittyvä arvio, joka ilmoittaa rajat, joiden välissä todellisen arvon katsotaan tietyllä todennäköisyydellä olevan. Mittausepävarmuuden ilmoittaminen tulosten yhteydessä on tärkeää, sillä sitä tarvitaan muun muassa arvioitaessa tulosten luotettavuutta, verrattaessa tuloksia ja menetelmiä keskenään tai tehtäessä johtopäätöksiä tuloksista.

Mittausepävarmuus ilmoitetaan tavallisesti suhteellisena keskihajontana tai sen laskennallisena kerrannaisena (laajennettu mittausepävarmuus). Mittausepävarmuutta voidaan arvioida esimerkiksi hyödyntämällä aikaisempia rutiininäytteiden mittaustuloksia. Epävarmuustekijöitä analytiikassa ovat esimerkiksi näytteenotto, kontaminaatiot näytteenotossa tai sen valmistuksessa, häiriöt mittausvaiheessa ja tulosten tulkinta. (24.)

7.1.7 Herkkyys

Herkkyys on pienin ero analyytin pitoisuudessa, joka vastaa pienintä havaittavissa olevaa eroa menetelmän vasteessa. Tavallisesti herkkyyden mittana on pienimmän neliösumman menetelmällä laskettu kalibrointikäyrän kulmakerroin. (24.)

7.1.8 Häiriöalttius

Samaa menetelmää käyttävien laboratorioden menettelytavat poikkeavat yleensä toisistaan jonkin verran. Menetelmän häiriöalttius tutkitaan tekemällä pieniä muutoksia menetelmään ja tutkimalla niiden vaikutukset. Yleensä menetelmän häiriöalttiuden tutkii jo menetelmän kehittäjänä toimiva laboratorio. Esimerkiksi standardoitujen menetelmien häiriöalttius on hyvin dokumentoitu, eikä menetelmän käyttäjän tarvitse enää puuttua siihen. (24.)

7.1.9 Saanto

Saanto on koko analyysimenetelmän teho havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä. Määritettävän aineen saantoa voidaan tutkia vertaamalla saatua tulosta saannoltaan tunnetun menetelmän tuloksiin. Saantoa voidaan tutkia myös vertaamalla saatua tulosta sertifioidulla matriisipohjaisella vertailumateriaalilla saatuihin tuloksiin. (25.)

7.1.10 Analyysivirheet

Määrittelyissä pyritään, että mittaus antaisi mahdollisimman hyvän ennusteen määritettävän komponentin oikeasta pitoisuudesta näytteessä. Menetelmässä esiintyvien virheiden vuoksi ei koskaan saada täysin oikeaa tulosta. Analyttiset virheet voidaan jakaa satunnaisiin ja systemaattisiin virheisiin. Satunnaisvirheet ovat epätarkkuuksia ja systemaattiset virheet ovat poikkeamia. Virhetyyppien vaikutukset tulosten tulkinnassa ovat erilaiset. (24.)

Kun on kyse satunnaisvirheistä, mittaustulokset jakautuvat satunnaisesti oikean tuloksen ympärille. Systemaattinen virhe on usean tuloksen keskiarvon poikkeama oikeasta arvosta. Tämä määrää analyysin oikeellisuuden. Systemaattinen virhe saadaan kaavasta 1. Menetelmän systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen määrittäminen kuuluu aina menetelmän validointiin. (24.)

$$e = x - \mu$$

KAAVA 1

e = systemaattinen virhe

x = rinnakkaismääritysten keskiarvo

μ = oikea arvo

7.2 Tilastolliset testit

Tilastolliset testit ovat apuvälineitä, jotka helpottavat johtopäätösten tekoa tilanteessa, jossa käytettävissä oleviin tietoihin sisältyy epävarmuutta. Tilastollisia testejä tehtäessä asetetaan nollahypoteesi (H_0) ja vastahypoteesi (H_1) eli kysymykset, joihin testillä haetaan vastausta. Esimerkiksi nollahypoteesina oletetaan, että koesarjojen keskiarvot eivät poikkea toisistaan. Vastahypoteesina oletetaan, että koesarjojen keskiarvot poikkeavat toisistaan, eli tällöin esiintyy systemaattinen virhe. Seuraavaksi päätetään merkitsevyystaso ja lasketaan testisuure. Luottamustaso on 1 - merkitsevyystaso. Kun testisuure on laskettu, verrataan sen arvoa

taulukkoarvoihin. Lasketun arvon ja taulukkoarvon perusteella nollahypoteesi joko hylätään tai pidetään voimassa. Testiä tehtäessä ei usein ole tiedossa, poikkeako kokeellinen tulos oikeasta positiiviseen vai negatiiviseen suuntaan. Tällöin testi täytyy tehdä 2-suuntaisena. Jos tiedetään, että kokeellinen tulos poikkeaa oikeasta joko positiiviseen tai negatiiviseen suuntaan, testi tehdään 1-suuntaisena. Validoinnissa käytettäviä tilastollisia testejä ovat muun muassa f-testi, t-testi, luottamusvälitarkastelu, varianssianalyysi ja regressioanalyysi. Kaikki tilastolliset perusmenetelmät löytyvät MS Excel -analyysityökaluista. (24.)

7.2.1 F-testi

F-testillä testataan, ovatko kahden menetelmän varianssit yhtä suuria. Nollahypoteesina oletetaan, että varianssit ovat yhtä suuria. Haluttua merkitsevyystasoa vastaavasta F-tilastokodista luetaan testisuureen kriittinen arvo. Jos lasketun testisuureen arvo on suurempi kuin taulukkoarvo, nollahypoteesi hylätään valitulla riskitasolla. F-testillä verrataan menetelmien toistotarkkuutta, esimerkiksi onko menetelmien A ja B toistotarkkuuksissa eroja. (24.)

7.2.2 T-testi

T-testillä testataan, eroako mittaustulosten keskiarvo tunnetusta arvosta tai toisen mittausjärjestelmän keskiarvosta. Yhden keskiarvon testauksessa verrataan mittausjärjestelmän keskiarvoa teoreettiseen oikeaan arvoon. Nollahypoteesissa oletetaan, että mittausjärjestelmän keskiarvo ei poikkea oikeasta arvosta. Testisuureen arvoa verrataan t-jakauman kriittiseen arvoon halutulla merkitsevyystasolla ja vapausasteilla $n - 1$. Jos testisuure on suurempi kuin t-kriittinen, nollahypoteesi hylätään. Tällöin menetelmien välillä esiintyy systemaattinen virhe. (24.)

Kahden keskiarvon testauksessa verrataan kahden koesarjan keskiarvojen yhtä suuruutta. Testi soveltuu esimerkiksi kahdella eri menetelmällä mitattujen pitoisuuksien vertailuun. Nollahypoteesissa oletetaan, että koesarjojen

keskiarvot eivät poikkea toisistaan. Testisuureen arvoa verrataan t-jakauman kriittiseen arvoon halutulla merkitsevyystasolla ja vapausasteilla $n_1 + n_2 - 2$. Jos testisuure on suurempi kuin t-kriittinen, nollahypoteesi hylätään ja menetelmien välillä esiintyy systemaattinen virhe. (24.)

Parillista t-testiä voidaan käyttää, kun verrataan kahden näytesarjan tuloksia toisiinsa, esimerkiksi analysoidaan useita näytteitä kahdella eri menetelmällä. Nollahypoteesissa oletetaan, että tulosparien erotusten keskiarvo on 0. Testisuureen arvoa verrataan t-jakauman kriittiseen arvoon halutulla merkitsevyystasolla ja vapausasteilla $n - 1$. Jos testisuure on suurempi kuin t-kriittinen, nollahypoteesi hylätään. Menetelmien välillä esiintyy systemaattinen virhe. (24.)

7.2.3 Luottamusvälitarkastelu

Kokeellisen keskiarvon ympärille voidaan asettaa väli, millä oikea tulos tietyllä todennäköisyydellä sijaitsee. Luottamusvälitarkastelu on periaatteessa kaksisuuntainen t -testi. Luottamusväli saadaan kaavasta 2. (24.)

$$\mu = x \pm t_{0,05} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

KAAVA 2

μ = todellinen arvo

x = rinnakkaismääritysten keskiarvo

$t_{0,05}$ = kaksisuuntaisen t-jakauman arvo 95 % luottamustasolla, kun vapausasteiden lukumäärä on $n-1$

s = keskihajonta

n = rinnakkaismääritysten lukumäärä

7.2.4 Varianssianalyysi

Kun täytyy verrata useampia keskiarvoja, esimerkiksi useammalla menetelmällä saatuja tuloksia tai toistotarkkuutta tutkittaessa useana päivänä saatuja tuloksia, vertaaminen tapahtuu varianssianalyysin (ANOVA) avulla. Varianssianalyysillä selvitetään, mikä osuus havaitusta vaihtelusta on satunnaisvirheillä ja mikä osuus systemaattisilla tekijöillä eli faktoreilla. Jos mittauksessa aiheutuu vaihtelua satunnaisvirheiden lisäksi yhdestä ylimääräisestä muuttujasta, kyseessä on yksisuuntainen varianssianalyysi. (24.)

Yksisuuntaisen varianssianalyysin nollahypoteesina oletetaan, että kaikkien menetelmien keskiarvot ovat samoja. Kokonaisvaihtelu hajotetaan kahteen komponenttiin, ryhmien sisäiseen ja ryhmien väliseen vaihteluun. Ryhmät eroavat toisistaan sitä merkittävämmiin, mitä pienempi ryhmien sisäinen vaihtelu on ja mitä suurempi ryhmien välinen vaihtelu on. Varianssianalyysi on kätevä tehdä MS Excel:n analyysityökaluilla. Jos lasketun testisuureen arvo on isompi kuin taulukkoarvo, nollahypoteesi hylätään. (24.)

7.2.5 Regressioanalyysi

Regressioanalyysiä käytetään verrattaessa kahta analyysimenetelmää toisiinsa. Jos näytteitä on paljon ja niiden pitoisuudet vaihtelevat laajalla alueella, ei esimerkiksi t-testi anna luotettavaa kuvaa menetelmien toimivuudesta, ja tällöin vertailu on suoritettava regressioanalyysillä. Regressioanalyysissä toistotarkempi menetelmä asetetaan x-akselille ja tulosten perusteella lasketaan pienimmän neliösumman menetelmällä regressiosuoran yhtälö, jonka muoto on kaavassa 3. Ideaalitulanteessa menetelmät antavat täysin identtiset tulokset. Tällöin suoran kulmakerroin on 1 ja y-akselin leikkauspiste on 0. Regressiosuoran yhtälön kertoimien luotettavuus voidaan analysoida merkitsevyystesteillä, esimerkiksi t-testillä tai luottamusvälitarkastelulla. Jos kertoimet eivät poikke merkittävästi odotusarvosta, saadaan menetelmillä samoja tuloksia. (24.)

$$y = b + ax$$

KAAVA 3

8 HUMAN hSCRIP ELISA -MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimuksen tarkoituksena oli validoida CRP-määritysmenetelmä. Validoitavaksi menetelmäksi valittiin Biovendorin valmistama Human hsCRP ELISA -menetelmä. Valmistajan mukaan tämä menetelmä on herkkä CRP:n määritysmenetelmä, jota ei tule käyttää akuutin tulehduksen arviointiin. Herkkä CRP on hyvä menetelmä, kun arvioidaan sydän- ja verisuonitautien riskiä ihmisillä, joilla ei ole ollut tuoretta infektiota tai muuta vakavaa sairautta. Työssä selvitettiin, onko menetelmä vertailukelpoinen referenssinä käytettyyn menetelmään. Referenssimenetelmänä oli klinisen kemian automaattinen analysaattori Architect c8000, jonka on valmistanut Abbot. Validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin, ja selvitettiin antavatko menetelmät samoja tuloksia. Lisäksi tarkasteltiin, onko menetelmä lineaarinen, tarkka ja toistettava. Tutkimus suoritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksella syksyllä 2012. (6, s. 3.)

8.1 Menetelmän periaate

Human hsCRP ELISA -menetelmässä mikrotiitterilevyn kaivot ovat koutattu anti-CRP- vasta-aineella. Kaivoihin lisätään standardit ja näytteet, minkä jälkeen inkuboidaan. Inkuboinnin aikana antigeeni (CRP) kiinnittyy spesifisesti kaivoissa oleviin vasta-aineisiin. Sitoutumattomat CRP-proteiinit pestään pois, ja lisätään kaivoihin spesifiset peroksidaasi-konjukoidut vasta-aineet, jotka sitoutuvat inkuboinnin aikana antigeeneihin. Sitoutumattomat konjugaatit pestään pois, ja kaivoja inkuboidaan substraattilla, joka sisältää tetrametylibenzidiiniä ja vetyperoksidia. Substraatti saa aikaan sinisen värin (entsyymi + substraatti). Entsyymireaktio pysäytetään lisäämällä 0,5 M rikkihappoa (H_2SO_4), jolloin väri muuttuu keltaiseksi. Värillinen lopputuote mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Standardikuvaajaan saadaan absorbanssi-arvot vastaaviin standardien pitoisuuksiin. CRP-pitoisuus näytteissä on suoraan

verrannollinen saatuihin absorbansseihin. Pitoisuudet saadaan laskettua standardikuvaajan avulla. (6, s. 3.)

8.2 Menetelmässä käytetyt reagenssit

Human hsCRP ELISA -menetelmä sisältää mikrotiitterilevyn, standardit, konjugaatin, laimennuspuskurin, pesupuskurin, substraatin ja pysäytysliuoksen. Mikrotiitterilevyssä on 12 x 8 kaivoa, jotka on koutattu ihmisen CRP:tä vastaan olevilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Standardeja on viittä eri pitoisuutta (0; 0,4; 1; 5; 10 µg/ml). Standardit on esilaimennettu 1/10. Konjugaatti on peroksidaasi-konjugoitua monoklonaalista anti-human CRP -vasta-ainetta (kaksoisvasta-aine). Peroksidaasi toimii entsyymileimana. Substraattiliuos sisältää vetyperoksidia (H₂O₂) ja tetrametyylibenzidiiniä. Pesuliuos on fosfaattipuskuria, ja pysäytysliuos on 0,5 M rikkihappoa. Käytetyn menetelmän eränumero oli X12-098. (6, s. 4.)

Pesuliuos ja laimennuspuskuri laimennetaan ennen käyttöä. Konsentroitua pesuliuosta laimennetaan 50 ml 1000 ml:aan tislattulla vedellä. Laimennettua pesuliuosta voidaan säilyttää kuukauden 2–8 °C:ssa. Konsentroitua laimennuspuskuria laimennetaan 40 ml 200 ml:aan tislattulla vedellä. Laimennuspuskuria voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa kolme kuukautta tai niin kauan kuin liuos pysyy kirkkaana. (6, s. 5.)

8.3 Näytteet

Human hsCRP ELISA -menetelmässä näytteenä voidaan käyttää ihmisen seerumia tai plasmaa. Seerumi saadaan erilleen verisoluista sentrifugoimalla verinäytettä kymmenen minuuttia 4000 rpm. Verisolut menevät putken pohjalle ja seerumi jää putken yläosaan, jolloin se saadaan siirrettyä uuteen puhtaaseen putkeen. Näytteitä voi säilyttää 2–8 °C:ssa muutaman päivän tai ne voidaan pakastaa pitemmäksi aikaa.

Tässä työssä käytettiin aikaisemmin määritettyjä pakastettuja näytteitä. Pakastetut näytteet sulatettiin ja sekoitettiin kääntelemällä ne 15–20 kertaa ylösalaisin. Hemolysoitunu näyte voi aiheuttaa testissä virheellisen tuloksen.

8.4 Human hsCRP ELISA -menetelmän mittausten suoritus

Human hsCRP ELISA -kittejä hankittiin kolme kappaletta. Jokaisella kitillä voitiin ajaa yksi mikrotiitterilevy, jossa oli käytettävänä 96 kaivoa. Ajot suoritettiin kolmena eri päivänä (1 levy/päivä). Työ aloitettiin poimimalla mitattavat näytteet, joita oli 234 kpl.

Työhön valittiin näytteitä eri pitoisuusalueilta. Tasoja oli 5, ja niiden pitoisuusalueet ovat taulukossa 3. Taulukosta näkee myös, kuinka monta näytettä tietyistä tasosta on otettu mukaan mittauksiin. Human hsCRP ELISA -kitin standardit kattoivat pitoisuusalueen 0–10 µg/ml. Koska tason 5 näytteiden pitoisuudet menevät yli 10 µg/ml, niitä otettiin kappalemäärältään vähemmän mukaan mittauksiin.

TAULUKKO 3. Tasojen pitoisuusalueet

		kpl
Taso 1	0-1 µg/ml	55
Taso 2	1-5 µg/ml	55
Taso 3	5-7,5 µg/ml	58
Taso 4	7,5-10 µg/ml	42
Taso 5	yli 10 µg/ml	24

Mittauksissa testattiin Human hsCRP ELISA -mittausmenetelmän toistotarkkuutta ja tarkkuutta. Toistotarkkuuskoetta varten valittiin kuusi näytettä, jotka ajettiin jokaisella levyllä. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaismääritystä. Tarkkuuskoetta varten valittiin yksi näyte, josta tehtiin yhdellä levyllä kymmenen rinnakkaismääritystä. Lisäksi levyillä ajettiin 227 muuta näytettä, joiden tulosten avulla vertailtiin menetelmää referenssimenetelmään.

Mittauksissa käytettiin Multiskan EX FOTOMETRI LK-25 -spektrofotometriä. Spektrofotometrille tehtiin ennen mittauksia mittauskartat jokaiselle levyille. Spektrofotometri ajaa mittauskartan mukaan levyn absorbanssit. Mittauskartalla näkyy, missä kaivossa mikäkin näyte on. Tämän kartan avulla voitiin pipetoida näytteet oikeille paikoille. Mittauskartasta on esimerkki kuvassa 8.

LEVY 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Cal_1	1 350 006 884	1 350 009 708	1 350 093 937	1 350 098 374	1 350 007 300	1 350 002 865	1 350 010 227	1 350 004 062	1 350 013 225	1 350 008 076	1 350 015 807	
B Cal_2	1 350 006 605	1 350 089 803	1 350 009 000	1 350 010 419	1 350 007 333	1 350 003 170	1 350 010 249	1 350 002 236	1 350 000 471	1 350 012 108	1 350 016 525	
C Cal_3	1 350 006 605	1 350 001 194	1 350 094 376	1 350 014 767	1 350 016 102	1 350 003 215	1 350 010 270	1 350 002 126	1 350 000 687	1 350 013 975	1 350 017 584	
D Cal_4	1 350 018 044	1 350 001 172	1 350 096 521	1 350 091 021	1 350 015 791	1 350 003 105	1 350 013 137	1 350 091 256	1 350 096 889	1 350 014 407	1 350 011 206	
E Cal_5	1 350 018 044	1 350 008 672	1 350 008 892	1 350 101 160	1 350 089 904	1 350 093 553	1 350 000 107	1 350 091 469	1 350 100 235	1 350 015 403	1 350 096 408	
F 1 350 096 360	1 350 012 940	1 350 006 196	1 350 094 067	1 350 097 437	1 350 004 408	1 350 093 402	1 350 018 395	1 350 091 518	1 350 093 674	1 350 014 696	1 350 007 935	
G 1 350 096 360	1 350 012 940	1 350 000 061	1 350 089 612	1 350 018 000	1 350 005 079	1 350 089 511	1 350 011 698	1 350 091 529	1 350 000 036	1 350 015 477	1 350 098 759	
H 1 350 006 884	1 350 009 708	1 350 008 991	1 350 098 614	1 350 001 614	1 350 002 667	1 350 009 953	1 350 016 178	1 350 091 636	1 350 007 874	1 350 015 947	1 350 098 800	

KUVA 8. Levyn 3 mittauskartta

Standardit ja näytteet laimennettiin ennen käyttöä. Esilaimennetut (1/10) standardit laimennettiin 1/100. Jokaista standardia pipetoitiin 10 µl erilliseen putkeen ja lisättiin 990 µl laimennuspuskuria. Näytteet laimennettiin 1/1000 kahdessa vaiheessa. Ensin tehtiin 1/100 laimennos, jossa pipetoitiin 10 µl jokaista näytettä erilliseen putkeen ja lisättiin 990 µl laimennuspuskuria. Näitä laimennoksia pipetoitiin 40 µl ja lisättiin 360 µl laimennuspuskuria (1/10). Viimeiset laimennokset tehtiin tyhjälle kuoppalevyille, johon näytteet pipetoitiin samalle paikalle kuin oikealle levyille tultiin pipetoimaan. Tarkkuusmittaukseen valitusta näytteestä tehtiin suurempi määrä lopullista laimennosta (150 µl + 1350 µl), jotta näytettä riitti kaikkiin kymmeneen kaivoon.

Reagenssit sekoitettiin ja tuotiin huoneenlämpöön ennen käyttöä. Kaikki mittaukset suoritettiin samalla tavalla. Ensin laimennettiin standardit ja näytteet. Seuraavaksi pipetoitiin mittauskartan mukaan mikrotiitterilevyn kaivoihin 100 µl laimennettuja standardeja ja näytteitä. Kaivot peitettiin tarralla ja inkuboitiin huoneenlämmössä 30 ± 2 min. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin kolme kertaa pesuliuksella erillisen pesuohjeen mukaan. Kolmannen pesukerran aikana pesuliuosta pidettiin kaivoissa 2–3 min, minkä jälkeen tyhjennettiin kaivot

pesuliuoksesta. Seuraavaksi kaivoihin lisättiin 100 µl konjugaattia, ja inkuboitiin tarralla peitettyjä kaivoja 30 ± 2 min huoneenlämmössä. Pesu tehtiin samalla tavalla kuin aikaisemmin. Sitten lisättiin 100 µl substraattia kaivoihin, ja inkuboitiin 10 ± 2 min huoneenlämmössä. Tämän kohdan aikana välteltiin valolle altistumista. Lopuksi lisättiin 50 µl pysäytysliuosta kaivoihin, ja mitattiin absorbanssit aallonpituudella 450 nm. (6, s. 6.)

Kaivojen pesu suoritettiin niin, että ensin kaadettiin rivakalla liikkeellä neste pois kaivoista. Kun kaivot olivat tyhjät, taputeltiin levyä varovasti kuivaksi sellun päällä. Kaivot täytettiin pipetoimalla niihin 300 µl pesuliuosta, jonka annettiin vaikuttaa 30 sekuntia. Liuos poistettiin kuten edellä. Nämä vaiheet toistettiin kolme kertaa. Kolmannella kerralla pesuliuoksen annettiin vaikuttaa 2–3 min.

Tulosten avulla määritettiin menetelmän toistettavuus, tarkkuus, lineaarisuus ja mittausalue. Menetelmiä verrattiin tilastollisten testien avulla. Tilastollisista testeistä validointiin käytettiin luottamusvälitarkastelua, yksisuuntaista varianssianalyysiä, regressioanalyysiä ja t-testiä.

9 TULOKSET

Mittaustulokset ovat liitteessä 1. Näytteiden tulokset laskettiin standardisuoran yhtälön avulla (kaava 4). Yhtälöstä määritettiin x eli pitoisuus sijoittamalla y :n paikalle mitattu absorbanssiarvo. Levyn 1 ja 2 näytteiden pitoisuudet laskettiin levyn 1 standardisuoran yhtälön avulla, koska levyllä 2 standardien absorbanssit olivat liian pieniä. Levyn 3 näytteiden tulokset laskettiin levyn 3 standardisuoran yhtälön avulla.

$$y = b + ax$$

KAAVA 4

9.1 Toteamis- ja määrittäysraja

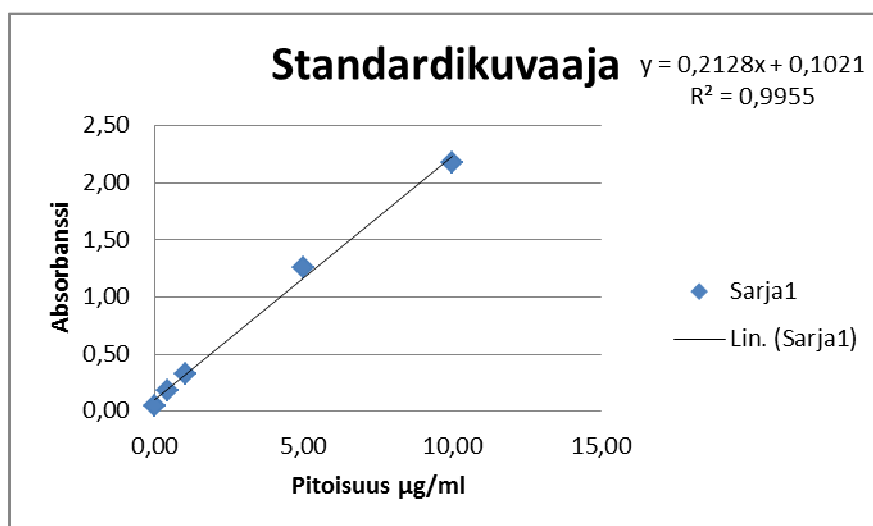
Toteamis- ja määrittäysrajaa ei alettu tässä työssä testata, koska menetelmäohjeessa kerrotaan, että tällä menetelmällä pienin määritettävä pitoisuus on 0,02 µg/ml.

9.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuus ja mittausalue määritettiin ELISA-kittien standardien avulla. Jokaisessa kitissä oli omat standardit. Standardeilla oli sama eränumero, minkä vuoksi ensimmäisellä ja toisella levyllä ajettiin samat standardit. Jostain syystä toisella levyllä standardit antoivat pienemmät absorbanssit kuin ensimmäisellä levyllä. Tämän vuoksi lineaarisuutta määritettäessä ei oteta huomioon toisen levyn standardien tuloksia. Määrittäykseen otetaan ensimmäisen ja kolmannen levyn standardien tulokset, joista laskettiin keskiarvot. Tulokset ovat taulukossa 4. Tulosten avulla piirrettiin standardikuvaaja, joka on kuvassa 9.

TAULUKKO 4. Standardien tulokset.

	Conc.(µg/ml)	Meas.(Abs 450 nm)	Meas.(Abs 450 nm)	Keskiarvo
Cal_1	0,00	0,05	0,05	0,05
Cal_2	0,40	0,19	0,17	0,18
Cal_3	1,00	0,36	0,31	0,33
Cal_4	5,00	1,25	1,28	1,26
Cal_5	10,00	2,36	2,00	2,18



KUVA 9. Standardikuvaja

Korrelaatiokerroin R^2 kuvaa lineaarisuutta. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on lukua 1, sitä lineaarisempi suora on. Standardikuvajan perusteella mittausalue on lineaarinen. Korrelaatiokerroin 0,9955 on hyvä. Kun otetaan huomioon määrittäysraja, mittausalueeksi saadaan 0,02–10 µg/ml. Tällä alueella menetelmä kykenee tuottamaan tuloksia hyväksyttävällä tarkkuudella ja toistotarkkuudella. Joidenkin näytteiden pitoisuudet menevät yli standardoidun mittausalueen.

9.3 Tarkkuus

Tarkkuutta analysoitaessa tehtiin yhdestä näytteestä kymmenen rinnakkaismäärittystä. Tulokset näkyvät taulukossa 5. Viitearvona on Architect c8000:lla mitattu arvo samasta näytteestä.

TAULUKKO 5. Tarkkuustulokset

Näyte			Viitearvo
1 350 005 068	9,10	µg/ml	7,50 µg/ml
	8,59	µg/ml	
	9,18	µg/ml	
	8,18	µg/ml	
	8,36	µg/ml	
	8,54	µg/ml	
	9,01	µg/ml	
	7,02	µg/ml	
	7,73	µg/ml	
	8,46	µg/ml	
Keskiarvo (x)	8,42	µg/ml	
Keskihajonta (s)	0,66	µg/ml	
CV%	7,84		

Tarkkuutta eli mitatun tuloksen ja oikean arvon (viitearvon) läheisyyttä analysoitiin laskemalla tarkkuus-%. Tarkkuus-% laskettiin kaavan 5 avulla.

$$\text{Tarkkuus-\%} = \frac{100(x-\mu)}{\mu}$$

KAAVA 5

x = keskiarvo

μ = viitearvo

Tulokseksi saatiin, että Human hsCRP ELISA -menetelmän tarkkuus on 12,21 % eli mitattu keskiarvo poikkeaa 12,21 % viitearvosta. Menetelmän tarkkuutta analysoitaessa hyväksyttävänä rajana pidetään 5–10 %. Näin voidaan päätellä, että menetelmää pitäisi tutkia lisää, ja tällä hetkellä se ei olisi tarkka.

Menetelmän tarkkuutta analysoitiin myös t-testin avulla, jossa mittaustulosten keskiarvoa verrattiin viitearvoon. Testisuure laskettiin kaavan 6 avulla. Nollahypoteesina oletetaan, että arvot olisivat yhtä suuret $x = \mu$. Laskettua testisuureen arvoa verrattiin t-kriittiseen arvoon 95 %:n luottamustasolla, kun vapausasteiden määrä oli $n - 1$.

$$t = |x - \mu| / (s/\sqrt{n})$$

KAAVA 6

x = rinnakkaismääritysten keskiarvo

μ = viitearvo

s = keskihajonta

n = rinnakkaismääritysten lukumäärä

Tulokseksi saatiin: $t = 4,39$

t -kriittinen = 2,262

Koska $t > t$ -kriittinen, nollahypoteesi hylätään, eli mittaustulosten keskiarvo ja viitearvo eivät ole yhtä suuria. Arvot poikkeavat toisistaan, eli menetelmä ei ole tarkka.

Tarkkuustuloksissa käytetylle näytteelle tehtiin myös luottamusvälitarkastelu. Luottamusvälitarkastelussa laskettiin kaavan 7 avulla, mille alueelle todellinen arvo sijoittuu 95 %:n todennäköisyydellä. Tulokset ovat taulukossa 8.

$$\mu = x \pm t_{0,05} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

KAAVA 7

μ = todellinen arvo

x = rinnakkaismääritysten keskiarvo

$t_{0,05}$ = kaksisuuntaisen t -jakauman arvo 95 %:n luottamustasolla, kun vapausasteiden lukumäärä on $n - 1$

s = keskihajonta

n = rinnakkaismääritysten lukumäärä

TAULUKKO 8. Luottamusvälitarkastelun tulokset

ELISA hsCRP	Vapausaste	$t_{0,05}$	Luottamusväli \pm ($\mu\text{g/ml}$)	Luottamusväli	min	max
	9,00	2,262	0,472	$8,42 \pm 0,472 \mu\text{g/ml}$	7,944	8,888

Luottamusvälitarkastelun mukaan Human hsCRP ELISA -menetelmällä todellinen arvo sijoittuu välille $8,42 \pm 0,472 \mu\text{g/ml}$. Viitearvo $7,50 \mu\text{g/ml}$ ei mahdu

tälle välille, jolloin voidaan todeta, että luottamusvälitarkastelunkaan mukaan menetelmä ei ole tarkka.

9.4 Toistotarkkuus (täsmällisyys), toistettavuus

Toistotarkkuutta ja toistettavuutta analysoitiin varianssianalyysin (ANOVA) avulla. Analyysissä oli mukana kuusi eri näytettä, joista tehtiin kolmella eri levyllä kaksi rinnakkaismäärittystä. Nollahypoteesina oletetaan, että jokaisella levyllä saadut näytteen keskiarvot ovat yhtä suuria. Varianssianalyysien tulokset ovat liitteessä 2. Tulosten avulla laskettiin kaikille näytteille sarjan sisäinen hajonta, sarjojen välinen hajonta ja kokonaishajonta sekä verrattiin saatuja F-arvoja F-kriittisiin arvoihin luottamusvälillä 0,05. Laskut suoritettiin kaavojen 8, 9 ja 10 avulla. Tulokset ovat taulukossa 6.

$$S_w = \sqrt{M_0} \quad \text{KAAVA 8}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{(M_0 - M_1)}{n}} \quad \text{KAAVA 9}$$

$$S_t = \sqrt{S_w^2 + S_b^2} \quad \text{KAAVA 10}$$

S_w = sarjan sisäinen hajonta

S_b = sarjojen välinen hajonta

S_t = kokonaishajonta

M_0 = keskineliö (varianssianalyysituloksissa KN ryhmissä)

M_1 = keskineliö (varianssianalyysituloksissa KN luokkien välissä)

n = rinnakkaismäärittysten lukumäärä

TAULUKKO 6. Toistotarkkuuden tulokset

Näyte	F laskettu 0,05	F kriittinen 0,05	S_w	$S_w\%$	S_b	$S_b\%$	S_t	$S_t\%$	Merkitsevyys	Keskiarvo
N1: 1350096360	18,61	9,55	0,08	17,99	0,13	30,82	0,15	35,69	S	0,43
N2: 1350006884	1,02	9,55	0,55	14,94	0,03	0,78	0,55	14,96	NS	3,66
N3: 1350006605	2322,19	9,55	0,06	1,00	1,23	19,58	1,24	19,60	S	6,31
N4: 1350018044	21,91	9,55	0,26	2,75	0,48	5,13	0,55	5,82	S	9,43
N5: 1350012940	68,49	9,55	0,56	5,81	1,88	19,48	1,96	20,33	S	9,64
N6: 1350009708	34,58	9,55	0,79	6,96	1,86	16,47	2,02	17,89	S	11,31

Näyte 2 oli ainoa, jolla sarjojen välinen hajonta ei ollut tilastollisesti merkittävä (NS) eli $F < F$ -kriittinen. Kaikilla muilla näytteillä sarjojen välinen hajonta oli tilastollisesti merkittävä. Kokonaishajonta liikkui välillä 5,82–35,69 %. Suurin kokonaishajonta oli näytteellä 1. Mitä pienempi pitoisuus on, sitä suurempi hajonta voi olla. Suuri kokonaishajonta näytteellä 1 voi johtua siitä, että sen pitoisuus on pienin (0,43 µg/ml). Sarjojen sisäiset hajonnat ovat suurimmaksi osaksi pienempiä kuin sarjojen väliset hajonnat.

Jos analysoitiin toistettavuutta käyttäen vain levyn 1 ja levyn 3 tuloksia, saatiin parempia tuloksia. Uudet varianssianalyysien tulokset ovat liitteessä 3. Tulosten avulla lasketut hajontatulokset ovat taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Toistotarkkuuden tulokset

Näyte	Flaskettu 0,05	F kriittinen 0,05	S_w	$S_w\%$	S_b	$S_b\%$	S_t	$S_t\%$	Merkitsevyys	Keskiarvo
N1: 1350096360	13,87	18,51	0,08	15,58	0,15	27,95	0,17	31,99	NS	0,54
N2: 1350006884	5,00	18,51	0,31	8,16	0,31	8,17	0,43	11,55	NS	3,76
N3: 1350006605	109,78	18,51	0,07	0,96	0,38	5,01	0,38	5,10	S	7,52
N4: 1350018044	52,65	18,51	0,11	1,16	0,41	4,16	0,43	4,32	S	9,86
N5: 1350012940	38,46	18,51	0,67	6,02	2,04	18,42	2,15	19,38	S	11,10
N6: 1350009708	53,82	18,51	0,44	3,37	1,59	12,25	1,65	12,71	S	12,95

Näytteellä 1 ja näytteellä 2 sarjojen välinen hajonta ei ole tilastollisesti merkittävä ($F < F$ -kriittinen), mutta kaikilla muilla näytteillä on. Kokonaishajonnat liikkuvat välillä 4,32–31,99 %. Suurin hajonta oli jälleen näytteellä 1.

Molempien tulosten mukaan voidaan todeta, että menetelmän toistettavuus ei ole hyvä. Hajonta ei ollut tilastollisesti merkittävä näytteellä 1 ja 2, joiden pitoisuudet olivat pienimmät. Menetelmän toistettavuus on parempi pienillä pitoisuuksilla. Toistettavuustutkimuksiin toistoja oli hieman liian vähän. Näiden tulosten mukaan menetelmää olisi syytä tutkia lisää.

9.5 Menetelmien vertailu

Menetelmiä vertailtiin toisiinsa regressioanalyysin ja parillisen t-testin avulla.

9.5.1 Regressioanalyysi

Regressioanalyysin avulla verrattiin kahdella eri menetelmällä saatuja tuloksia toisiinsa. Regressioanalyysi suoritettiin MS Excel -analyysityökaluohjelmalla. Analyysi tehtiin 95 %:n luottamustasolla. Regressioanalyysin tulokset ovat taulukossa 9. Kahdella eri menetelmällä saaduista tuloksista voitiin tehdä myös regressiokuvaaja, joka on kuvassa 10.

TAULUKKO 9. Regressioanalyysin tulokset

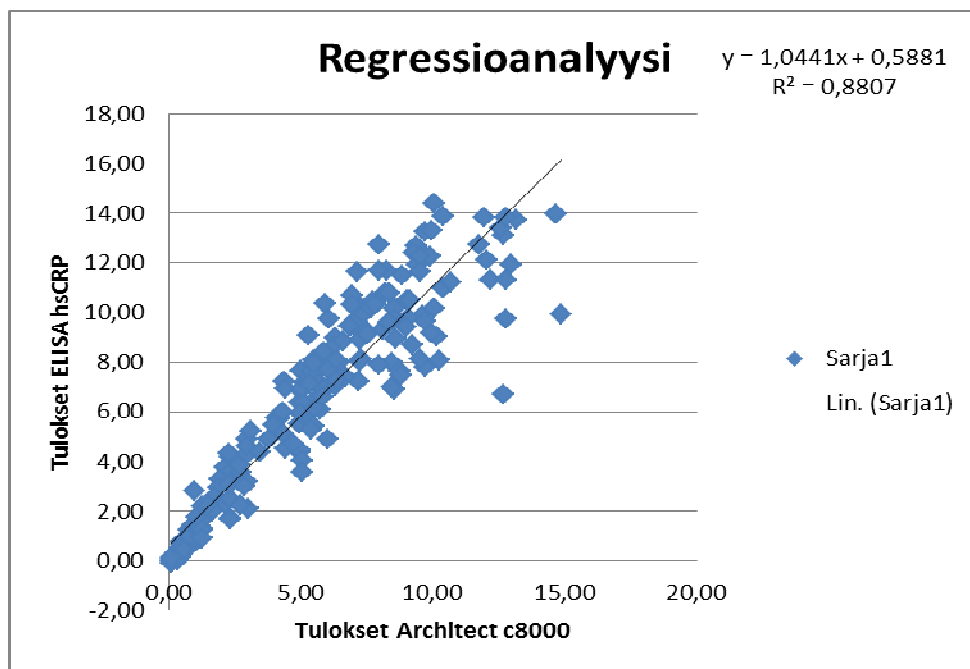
Regressiotunnusluvut	
Kerroin R	0,938448982
Korrelaatiokerroin	0,880686491
Tarkistettu	
korrelaatiokerroin	0,880156209
Keskivirhe	1,450029929
Havainnot	227

ANOVA					
	va	NS	KN	F	F:n tarkkuus
Regressio	1	3491,951214	3491,951214	1660,788142	7,5906E-106
Jäännös	225	473,0820285	2,102586794		
Yhteensä	226	3965,033243			

	Kertoimet	Keskivirhe	<i>t</i> Tunnusluvut	P-arvo
Leikkauspiste	0,588083017	0,161563851	3,639941812	0,000338325
Muuttuja X 1	1,044132261	0,025621137	40,75276852	7,5906E-106
	Alin 95%	Ylin 95%	Alin 95,0%	Ylin 95,0%
Leikkauspiste	0,269711207	0,906454827	0,269711207	0,906454827
Muuttuja X 1	0,993644186	1,094620335	0,993644186	1,094620335

Regressioanalyysin tuloksista nähdään, että regressiosuoran selitysaste on 0,881. Selitysaste osoittaa, että tulosten välillä on positiivinen riippuvuus ja malli pystyy selittämään 88 % tulosten vaihtelusta. Selitysaste olisi 1, kun menetelmät vastaisivat täydellisesti toisiaan. Suoran y-akselin leikkauspisteen

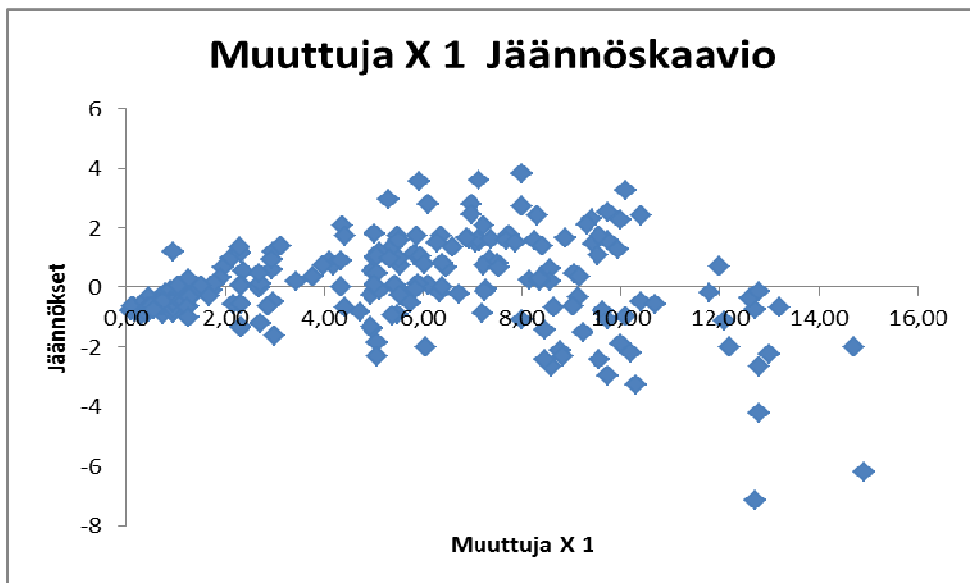
ja kulmakertoimen luottamusvälitarkastelusta (95 %:n luottamustasolla) nähdään, että leikkauspiste on välillä 0,27–0,9 ja kulmakerroin välillä 0,99–1,09. Menetelmät antavat täysin samoja tuloksia, jos leikkauspiste on 0 ja kulmakerroin 1. Regressioanalyysitulosten mukaan voidaan sanoa, että menetelmät antavat samoja tuloksia.



KUVA 10. Regressioanalyysin kuvaaja

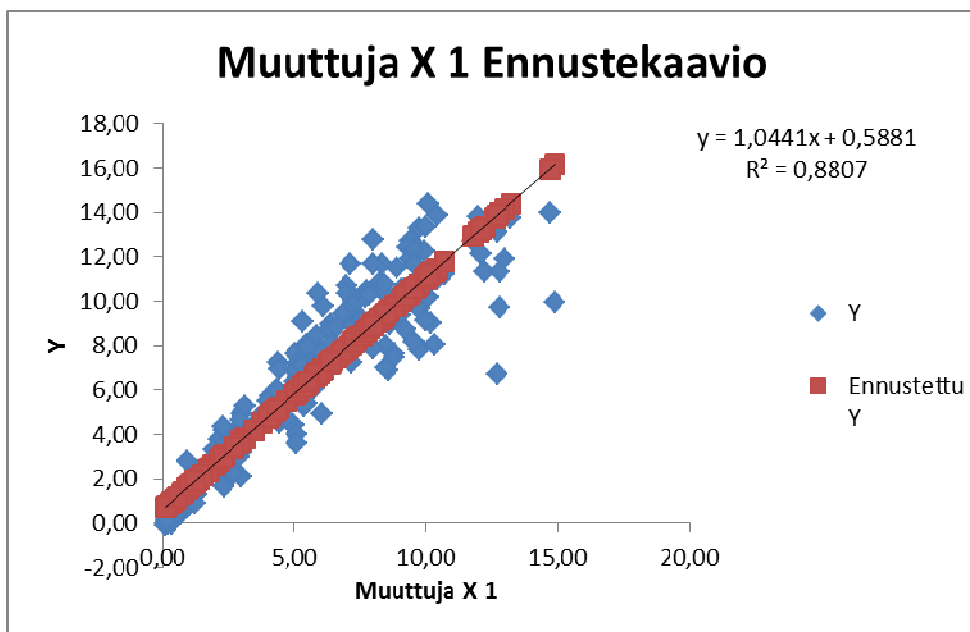
Kuvaajassa referenssimenetelmän tulokset ovat x-akselilla ja validoitavan menetelmän tulokset ovat y-akselilla. Tulosten perusteella regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y = 1,0441x + 0,5881$. Jotta menetelmät antaisivat täysin identtiset tulokset, regressiosuoran kulmakerroin olisi 1 ja y-akselin leikkauspiste olisi 0. Tässä analyysissä kulmakerroin on lähellä yhtä ja leikkauspiste on melko lähellä nollaa.

Arvioitaessa regressiomallin hyvyttä, valittiin regressiotulostuksen yhteydessä lisäksi jäännöskaavio ja ennustekaavio, jotka ovat kuvissa 11 ja 12.



KUVA 11. Jäännöskaavio

Jäännöskaaviossa on mallin ennustamien ja havaittujen pitoisuuksien erotukset eli residuaalit. Kuvasta huomataan, että jäännökset jakautuvat hieman enemmän nollatason positiiviselle puolelle ja mittausalueen ylärajan 10 µg/ml jälkeen negatiiviselle puolelle.



KUVA 12. Ennustekaavio

Ennustekaaviossa punaiset pisteet kuvaavat niitä tuloksia, mitä menetelmällä pitäisi saada, ja siniset pisteet niitä tuloksia, mitä todellisuudessa saatiin. Kaaviosta nähdään, että tulokset ovat molemmiin puolin ennustekuvaajaa. Korrelaatiokerroin 0,8807 on ihan hyvä, jolloin voidaan todeta, että menetelmät korreloivat toisiaan, eli antavat samoja tuloksia. Menetelmällä saadaan suurempia tuloksia, koska tulokset jakautuvat enemmän ennustekuvaajan yläpuolelle. Tulokset alkavat hajota enemmän, kun pitoisuus nousee yli 8 µg/ml.

Tuloksista tehtiin uusi regressioanalyysi, josta jätettiin pois kaikki tulokset, jotka olivat yli 8 µg/ml. Uuden regressioanalyysin tulokset ovat taulukossa 10. Tuloksista, jotka ovat välillä 0–8 µg/ml, tehtiin myös uusi regressioanalyysin kuvaaja, joka on kuvassa 13.

TAULUKKO 10. Uuden regressioanalyysin tulokset

YHTEENVETO TULOSTUS

<i>Regressiotunnusluvut</i>	
Kerroyin R	0,956781612
Korrelaatiokerroin	0,915431052
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,914818234
Keskivirhe	0,745001257
Havainnot	140

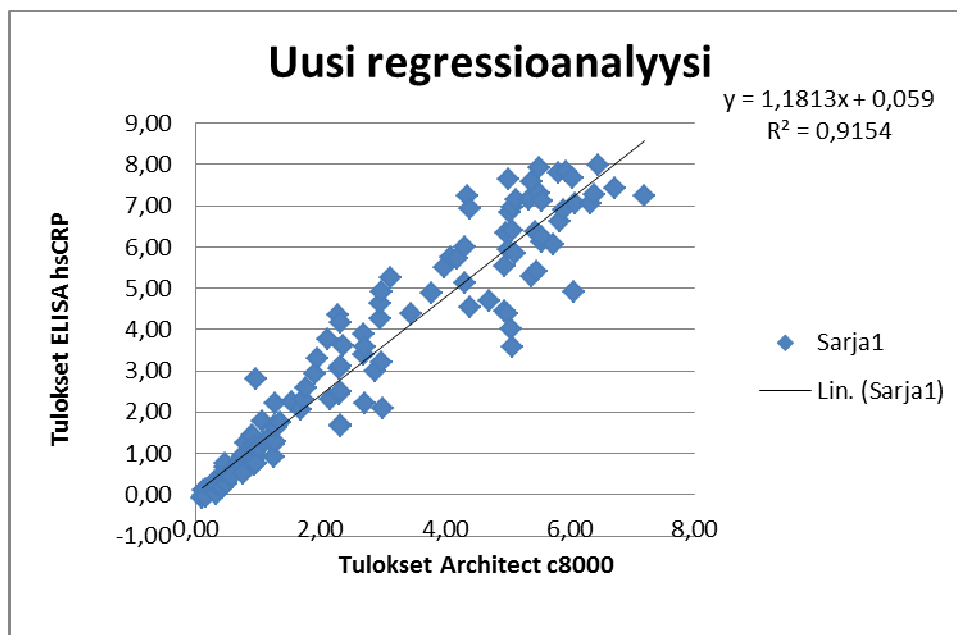
ANOVA

	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	829,1017077	829,1017077	1493,805	6,72464E-76
Jäännös	138	76,59370843	0,555026873		
Yhteensä	139	905,6954161			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>
Leikkauspiste	0,059011195	0,101347642	0,582265105	0,561338
Muuttuja X 1	1,181318004	0,030564685	38,64976872	6,72E-76
	<i>Alin 95%</i>	<i>Ylin 95%</i>	<i>Alin 95,0%</i>	<i>Ylin 95,0%</i>
Leikkauspiste	-			
Muuttuja X 1	0,141383852	0,259406243	-0,141383852	0,259406
	1,120882345	1,241753663	1,120882345	1,241754

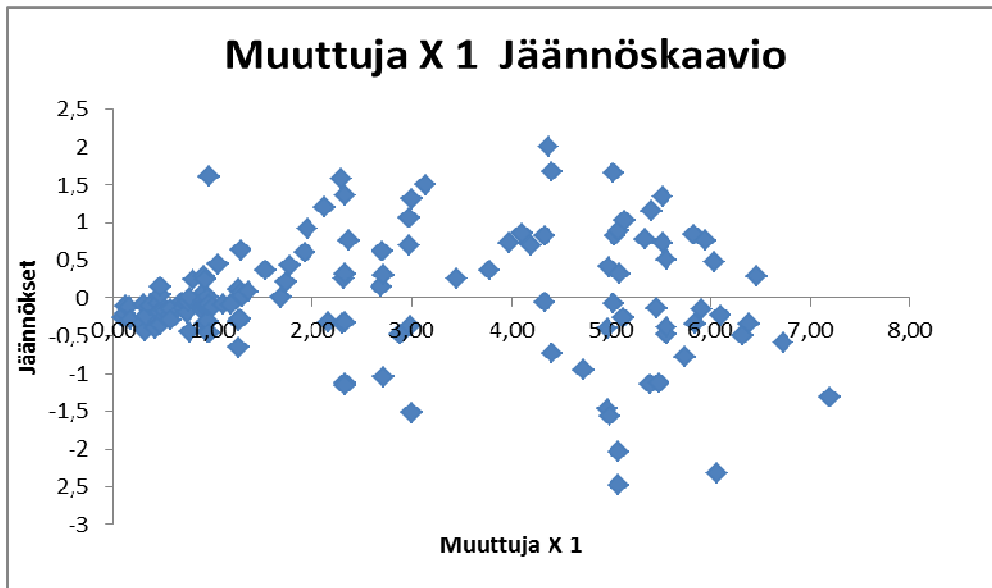
Uusista regressioanalyysin tuloksista nähdään, että uusi regressiosuoran selitysaste on 0,915, joka on parempi kuin aikaisemmilla tuloksilla. Malli pystyy

selittämään 92 % tulosten vaihtelusta. Suoran y-akselin leikkauspisteen ja kulmakertoimen luottamusvälitarkastelusta (95 %:n luottamustasolla) nähdään, että leikkauspiste on välillä 0,14–0,25 ja kulmakerroin välillä 1,12–1,24. Leikkauspiste on lähellä nollaa ja kulmakerroin lähellä yhtä. Tulokset paranivat, kun jätettiin pois tulokset, jotka olivat yli 8 µg/ml.



KUVA 13. Uusi regressioanalyysi kuvaaja

Uusien tulosten perusteella regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y = 1,1813x + 0,059$. Kulmakerroin on edelleen lähellä yhtä ja leikkauspiste on lähempänä nollaa kuin aikaisemmin. Korrelaatiokerroin 0,9154 on hyvä, ja sen mukaan menetelmät korreloivat toisiaan, eli antavat samoja tuloksia. Uusi jäännöskaavio on kuvassa 14.



KUVA 14. Uusi jäännöskaavio

Uudessa jäännöskaaviossa jäännökset jakautuvat paremmin nollatason molemmille puolille. Uuden jäännöskaavion malli on hyvä.

9.5.2 Parillinen t-testi

Myös parillisella t-testillä voidaan verrata kahdella eri menetelmällä mitattuja tuloksia toisiinsa. Nollahypoteesina oletetaan, että erotusten keskiarvo on 0. T-testissä oletetaan, etteivät satunnais- ja systemaattiset virheet riipu konsentraatiosta. Parillinen t-testi suoritettiin 95 %:n luottamustasolla MS Excel -analyysityökaluohjelmalla. Tulokset näkyvät taulukossa 10.

TAULUKKO 10. Parillisen t-testin tulokset

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
	<i>Muuttuja 1</i>	<i>Muuttuja 2</i>
Keskiarvo	5,87658992	5,064977974
Varianssi	17,54439488	14,1725729
Havainnot	227	227
Pearsonin korrelaatio	0,938448982	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	226	
t Tunnusluvut	8,396583935	
P(T<=t) yksisuuntainen	2,53752E-15	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,65162386	
P(T<=t) kaksisuuntainen	5,07504E-15	
t-kriittinen kaksisuuntainen	1,970516191	

Testisuureen arvoa verrataan t-kriittiseen arvoon. Molemmat testisuureet ovat hyvin paljon pienempiä kuin t-kriittiset arvot. Näin ollen testi tukee nollahypoteesia, eli kahdella eri menetelmällä saatujen tulosten erotusten keskiarvo on nolla. Menetelmillä saadaan samoja tuloksia.

10 YHTEENVETO

Tutkimuksen tarkoituksena oli validoida Human hsCRP ELISA -määritysmenetelmä. Tämä menetelmä on herkkä CRP:n määritysmenetelmä, jolla mitataan CRP:n pieniä pitoisuuksia. ELISA on käsin suoritettava immunologinen määritysmenetelmä, joka perustuu antigeenin ja vasta-aineen spesifiseen reaktioon. CRP kiinnittyy spesifisesti mikrotiitterilevyn kaivoissa oleviin vasta-aineisiin. Kaivoihin lisätyt spesifiset entsyymi-konjugoidut vasta-aineet sitoutuvat antigeeneihin. Substraatin lisäys saa entsyymin kanssa aikaan värinmuodostuksen, joka mitataan spektrofotometrillä. Tutkimus suoritettiin Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksella syksyllä 2012.

Menetelmällä määritettiin näytteistä CRP-pitoisuutta. Näytteinä oli ihmisen seeruminäytteitä, joista oli aikaisemmin määritetty CRP-pitoisuus automaattisella Architect c8000 -analysaattorilla. Human hsCRP ELISA -menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin Architect c8000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin, ja selvitettiin, antavatko menetelmät samoja tuloksia. Lisäksi tarkasteltiin, onko menetelmä lineaarinen, tarkka ja toistettava.

Menetelmän lineaarisuutta analysoitiin ELISA-pakkauksissa olevien standardien avulla. Tuloksista tehtiin standardikuvaaja, jonka avulla voitiin analysoida lineaarisuutta. Kuvaajan korrelaatiokerroin R^2 kuvaa lineaarisuutta, joka oli 0,9955. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on lukua 1, sitä lineaarisempi suora on. Standardikuvaajan perusteella mittausalue on lineaarinen. Kun otetaan huomioon määrittämisraja, joka kerrottiin menetelmäohjeessa, mittausalueeksi saadaan 0,02–10 µg/ml. Tällä alueella menetelmä kykenee tuottamaan tuloksia hyväksyttävällä tarkkuudella ja toistotarkkuudella.

Tarkkuutta analysoitaessa ajettiin 10 rinnakkaismäärittystä yhdestä näytteestä. Näytteen viiterajana pidettiin referenssimenetelmällä saatua arvoa samasta näytteestä. Viiteraja oli 7,50 µg/ml. Tarkkuutta analysoitiin kolmella eri tavalla. Laskettiin tarkkuus-%, tehtiin t-testi ja lisäksi tarkasteltiin tuloksia luottamusvälitarkastelun avulla. Kaikilla analyyseilla saatiin tulokseksi, että

menetelmä ei ole tarkka, eli mitattu tulos poikkeaa liikaa viitearvosta. Tarkkuutta voitaisiin analysoida lisää. Tällöin voitaisiin käyttää näytteenä standardoitua kontrollinäytettä, jonka CRP-pitoisuus on riittävän vakaa ja tunnettu. Tutkimuksessa olisi voitu käyttää myös näytettä, jonka pitoisuus olisi pienempi, koska herkkä menetelmä on valmistettu mittaamaan pieniä pitoisuuksia.

Toistotarkkuutta ja toistettavuutta analysoitiin varianssianalyysin (ANOVA) avulla. Analyysissä oli mukana kuusi eri näytettä, joista tehtiin kolmella eri levyllä kaksi rinnakkaismäärittystä. Varianssianalyysitulosten avulla laskettujen hajontojen avulla analysoitiin menetelmän toistettavuutta. Sarjojen välisissä hajonnoissa esiintyi tilastollista merkittävyyttä eli systemaattista virhettä. Tulokset levyjen välillä eivät olleet tarpeeksi lähellä toisiaan. Pienemmillä pitoisuuksilla systemaattista virhettä ei esiintynyt. Toistettavuustutkimuksiin toistoja oli liian vähän. Näiden tulosten mukaan menetelmää olisi syytä tutkia lisää.

Menetelmiä vertailtiin regressioanalyysin ja parillisen t-testin avulla. Molempien testien mukaan menetelmät antavat samoja tuloksia. Regressioanalyysi tehtiin kahteen kertaan. Toisessa analyysissä oli mukana kaikki tulokset, ja toisessa analyysissä tulokset pitoisuusalueelta 0–8 µg/ml. Jälkimmäisen analyysin mukaan havaitaan, että menetelmät antavat pienemmillä pitoisuuksilla samoja tuloksia paremmalla korrelaatiolla.

Tuloksiin voi aiheuttaa epävarmuutta menetelmän suoritus, koska menetelmä on käsin suoritettava menetelmä, jolloin työntekijällä voi sattua virhe esimerkiksi pipetoinnissa. Epävarmuutta voi aiheuttaa myös välineiden, kuten pipettien, mittausepävarmuus. Myöskään antigeenit ja vasta-aineet eivät aina sitoudu täydellisesti, mikä voi aiheuttaa virhettä tulokseen.

Yhteenvedona voidaan todeta, että menetelmä on lineaarinen ja antaa samoja tuloksia kuin referenssimenetelmä. Menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta olisi kuitenkin syytä tutkia lisää.

LÄHTEET

1. Meri, Seppo – Julkunen, Ilkka 2011. Immunologia. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04492&p_selaus=19142. Hakupäivä 10.10.2012.
2. Moilanen, Eeva – Vapaatalo, Heikki 2003. Farmakologia ja toksikologia. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04499&p_selaus=15354. Hakupäivä 10.10.2012.
3. Hänninen, Arno 2011. Akuutin tulehdusreaktion immunologinen säätely. Duodecim. Saatavissa: <http://www.duodecimlehti.fi>. Hakupäivä 10.10.2012.
4. Huovinen, Pentti – Ahola, Tero 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim.
5. C-reaktiivinen proteiini. 2012. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/Crp>. Hakupäivä: 10.10.2012.
6. Human hsCRP ELISA. Menetelmäohje. 2012. Biovendor.
7. Rautakorpi, Ulla-Maija – Saijonkari, Maija – Carlson, Petteri – Isojärvi, Jaana – Phja.Nylander, Paula – Pulkki, Kari – Mäkelä, Marjukka 2008. CRP-vieritesti kotisyntyisen keuhkokuumeen diagnostiikassa perusterveydenhuollossa. Finohta. Saatavissa: http://finohta.stakes.fi/NR/rdonlyres/F63CED74-224A-4D8D-BAC3-EA1124398316/0/nk_2008_02.pdf. Hakupäivä 10.10.2012.
8. Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. CRP (P-CRP). Duodecim. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03052. Hakupäivä 10.10.2012.

9. Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2002. Senkka ja 100 muuta tutkimusta. Helsinki: Duodecim.

10. Proteiinitutkimukset. Moniste. 2012. C-reaktiivinen proteiini.

11. C- reaktiivinen proteiini CRP. 2012. Hyvä terveys. Saatavissa: <http://hyvaterveys.fi/artikkelit/C-reaktiivinen-proteiini-CRP/78/?c=Laboratoriokokeet>. Hakupäivä: 10.10.2012.

12. Lasko eli senkka. 2012. Hyvä terveys. Saatavissa: <http://hyvaterveys.fi/artikkelit/Lasko-eli-senkka/84/?c=Laboratoriokokeet>. Hakupäivä: 10.10.2012.

13. Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. Lasko (B-La). Duodecim. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03051. Hakupäivä 10.10 2012.

14. Herkkä CRP. 2012. Suomen sydänliitto ry. Saatavissa: <http://www.sydanliitto.fi/herkka-crp>. Hakupäivä 10.10.2012.

15. C-reaktiivisen proteiinin (CRP) määrittäminen. 2012. Orion diagnostica. Saatavissa: <http://www.oriondiagnostica.fi/tuoteryhmat?group=2.02.01.02>. Hakupäivä 10.10.2012.

16. Valkonen, Pia 2006. Herkkä CRP-määritys paljastaa sydän- ja verisuonitautien vaaran. Diabetesliitto. Saatavissa: http://www.diabetes.fi/diabetesliitto/lehdet/diabetes-lehden_juttuarkisto/diabetes_ja_muut_sairaudet/herkka_crp-maaritys_paljastaa_sydan-_ja_verisuonitautien_varaan.756.news. Hakupäivä 10.10.2012.

17. Rintala, Esa – Tertti, Risto – Nikoskelainen, Jukka 1995. CRP-määrityksen kliininen käyttö. Duodecim. Saatavissa: http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo50035. Hakupäivä 10.10.2012.
18. Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. Vieritestit (hoitopaikkatestit). Duodecim. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03204. Hakupäivä 10.10.2012.
19. Luonnollinen immunitetti. 2012. Saatavissa: http://fi.wikipedia.org/wiki/Luonnollinen_immunitetti. Hakupäivä 10.10.2012.
20. Kumpulainen, Elsa 2012. T460503 Immunologia, 3 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2012. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.
21. Immunofarmakologian perusteita. 2012. Saatavissa: <http://www.medicina.fi/fato/49.pdf>. Hakupäivä 10.10.2012.
22. Antigeeni. 2012. Duodecim. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00236. Hakupäivä 10.10.2012.
23. Immunoassay- A Powerful Analytical Technique. 2009. Saatavissa: <http://immunoassays.blogspot.fi/2009/03/immunoassay-powerful-analytical.html>. Hakupäivä 10.10.2012.

24. Välimäki, Ilkka 2011. T440203 Laboratorion laatutoiminta, 3op. Opintojakson luentomateriaali 2011. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

25. Ehder, Tapio 2005. Kemian metrologian opas. Saatavissa: http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf. Hakupäivä 10.10.2012.

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 089 803	0,10	-0,08
1 350 000 263	0,12	-0,01
1 350 100 776	0,12	0,10
1 350 088 865	0,16	0,13
1 350 014 767	0,17	-0,04
1 350 000 471	0,30	0,08
1 350 092 607	0,31	0,33
1 350 005 079	0,32	-0,01
1 350 008 076	0,34	0,22
1 350 012 108	0,37	0,38
1 350 093 674	0,42	0,16
1 350 009 953	0,46	0,53
1 350 091 021	0,46	0,29
1 350 099 439	0,46	0,41
1 350 017 590	0,47	0,65
1 350 019 276	0,47	0,75
1 350 100 614	0,47	0,42
1 350 008 991	0,48	0,28
1 350 011 698	0,48	0,26
1 350 004 062	0,53	0,43
1 350 100 765	0,53	0,50
1 350 094 745	0,57	0,50
1 350 097 437	0,57	0,58
1 350 101 294	0,57	0,44
1 350 089 612	0,69	0,81
1 350 100 235	0,70	0,75
1 350 093 937	0,73	0,85
1 350 018 395	0,74	0,74
1 350 000 107	0,75	0,92
1 350 100 688	0,75	0,89
1 350 013 247	0,76	0,50
1 350 096 889	0,77	0,9

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 003 170	0,80	1,24
1 350 010 543	0,91	0,97
1 350 017 709	0,91	1,43
1 350 090 141	0,91	0,99
1 350 091 256	0,91	1,09
1 350 007 333	0,92	1,21
1 350 011 460	0,92	0,96
1 350 015 554	0,92	1,03
1 350 009 203	0,93	1,39
1 350 014 522	0,93	0,82
1 350 017 114	0,93	1,07
1 350 097 967	0,93	1,07
1 350 000 061	0,95	1,12
1 350 012 578	0,95	1,19
1 350 016 386	0,95	0,74
1 350 091 636	0,95	1,06
1 350 093 861	0,95	0,88
1 350 100 161	0,95	1,07
1 350 092 159	0,96	1,11
1 350 098 054	0,96	2,81
1 350 014 490	0,97	0,74
1 350 015 807	1,00	1,12
1 350 096 408	1,06	1,76
1 350 014 407	1,11	1,28
1 350 017 608	1,18	1,36
1 350 097 566	1,25	1,22
1 350 011 280	1,26	1,67
1 350 100 449	1,26	0,89
1 350 013 596	1,27	1,28
1 350 015 791	1,28	2,21
1 350 096 216	1,28	1,64
1 350 096 326	1,29	1,61

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 013 975	1,36	1,75
1 350 098 800	1,53	2,23
1 350 015 403	1,69	2,07
1 350 010 227	1,73	2,31
1 350 013 613	1,77	2,58
1 350 008 619	1,92	2,93
1 350 005 243	1,95	3,29
1 350 000 687	2,12	3,76
1 350 015 477	2,16	2,29
1 350 094 376	2,29	4,34
1 350 001 822	2,30	2,44
1 350 090 583	2,31	3,04
1 350 008 892	2,33	4,17
1 350 011 913	2,33	1,69
1 350 016 459	2,33	1,65
1 350 018 635	2,33	2,48
1 350 089 511	2,33	3,13
1 350 005 691	2,37	3,61
1 350 008 584	2,69	3,38
1 350 098 614	2,70	3,87
1 350 014 325	2,72	3,57
1 350 099 843	2,72	2,22
1 350 098 759	2,88	2,98
1 350 002 865	2,97	4,27
1 350 007 626	2,97	4,62
1 350 088 534	2,98	3,21
1 350 001 194	2,99	4,90
1 350 001 172	3,00	2,09
1 350 013 225	3,13	5,25
1 350 016 839	3,45	4,39
1 350 015 947	3,78	4,89
1 350 016 525	3,98	5,48

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 007 874	4,10	5,75
1 350 007 935	4,19	5,71
1 350 088 876	4,33	5,12
1 350 095 308	4,33	6,00
1 350 005 489	4,37	7,22
1 350 012 317	4,41	4,53
1 350 016 102	4,41	6,93
1 350 090 781	4,72	4,69
1 350 016 397	4,96	5,52
1 350 090 212	4,96	4,45
1 350 006 041	4,97	6,35
1 350 007 077	4,99	4,39
1 350 003 105	5,02	7,65
1 350 092 750	5,03	5,93
1 350 002 126	5,04	6,84
1 350 094 554	5,07	4,02
1 350 095 383	5,08	6,94
1 350 097 047	5,08	3,58
1 350 015 078	5,09	6,39
1 350 018 860	5,13	5,85
1 350 009 378	5,14	7,15
1 350 010 419	5,32	9,10
1 350 099 859	5,34	7,14
1 350 093 402	5,39	5,29
1 350 008 155	5,40	7,58
1 350 011 493	5,45	6,36
1 350 010 587	5,48	5,40
1 350 007 300	5,49	8,06
1 350 006 297	5,52	7,31
1 350 100 218	5,52	7,93
1 350 003 215	5,55	7,12
1 350 098 438	5,55	6,13

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 010 824	5,56	6,25
1 350 000 036	5,75	6,07
1 350 001 699	5,83	7,79
1 350 015 310	5,84	6,62
1 350 098 374	5,87	8,43
1 350 012 811	5,91	6,88
1 350 094 509	5,92	10,35
1 350 005 883	5,94	7,83
1 350 011 930	6,04	7,68
1 350 013 126	6,06	4,90
1 350 002 667	6,10	9,74
1 350 010 600	6,10	7,04
1 350 011 206	6,28	8,66
1 350 017 155	6,33	7,04
1 350 009 618	6,35	8,96
1 350 098 798	6,39	7,26
1 350 014 308	6,40	8,08
1 350 006 873	6,46	7,98
1 350 017 584	6,60	8,84
1 350 014 696	6,73	7,42
1 350 018 949	6,87	9,44
1 350 011 274	6,92	9,45
1 350 007 386	6,97	10,32
1 350 005 746	6,98	10,67
1 350 008 368	7,05	9,46
1 350 018 000	7,10	9,63
1 350 007 753	7,14	11,65
1 350 004 408	7,16	9,61
1 350 011 896	7,20	7,25
1 350 002 236	7,24	10,21
1 350 092 341	7,24	8,89
1 350 095 910	7,27	8,03

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 006 717	7,29	8,14
1 350 015 041	7,37	9,23
1 350 093 553	7,39	9,92
1 350 091 469	7,52	9,27
1 350 016 178	7,54	9,11
1 350 096 521	7,69	10,18
1 350 009 662	7,74	10,46
1 350 099 193	7,86	10,29
1 350 101 160	7,99	12,75
1 350 009 719	8,00	11,68
1 350 090 637	8,01	7,87
1 350 012 082	8,15	9,33
1 350 091 529	8,25	10,79
1 350 000 118	8,30	11,69
1 350 015 112	8,37	9,54
1 350 015 509	8,37	9,61
1 350 090 285	8,37	9,60
1 350 095 713	8,40	10,77
1 350 100 125	8,45	6,98
1 350 006 310	8,46	7,99
1 350 004 270	8,57	10,16
1 350 010 701	8,57	9,75
1 350 096 895	8,58	6,90
1 350 008 043	8,63	8,94
1 350 018 288	8,78	7,63
1 350 099 887	8,81	7,47
1 350 005 538	8,87	11,52
1 350 099 092	9,02	9,39
1 350 011 588	9,06	10,51
1 350 097 978	9,12	9,77
1 350 014 910	9,15	10,52
1 350 100 453	9,23	8,71

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 013 137	9,30	12,40
1 350 006 196	9,40	12,70
1 350 091 199	9,43	11,91
1 350 100 642	9,54	11,64
1 350 094 067	9,55	12,28
1 350 016 536	9,56	8,14
1 350 016 749	9,63	9,86
1 350 007 099	9,73	7,79
1 350 001 614	9,74	12,32
1 350 009 000	9,74	13,28
1 350 088 678	9,75	9,67
1 350 010 270	9,94	12,24
1 350 005 355	10,00	13,32
1 350 088 911	10,00	9,15
1 350 089 904	10,10	14,38
1 350 099 335	10,10	10,18
1 350 008 952	10,20	9,04
1 350 007 178	10,30	8,07
1 350 000 542	10,40	10,96
1 350 008 672	10,40	13,86
1 350 011 700	10,70	11,20
1 350 014 209	11,80	12,73
1 350 011 924	12,00	13,81
1 350 099 362	12,10	12,11
1 350 000 370	12,20	11,33
1 350 012 875	12,60	13,39
1 350 000 503	12,70	13,12
1 350 096 740	12,70	6,70
1 350 018 927	12,80	11,30
1 350 091 518	12,80	13,83
1 350 093 790	12,80	9,73
1 350 017 816	13,00	11,93

Näytenumero	CRP(c8000)	CRP(ELISA)
1 350 010 249	13,20	13,72
1 350 088 523	14,70	13,95
1 350 008 760	14,90	9,94

Näyte 1	1.Päivä	2.Päivä	3.Päivä
1 350 096 360	0,776	0,180	0,389
	0,610	0,272	0,374

Näyte 2	1.Päivä	2.Päivä	3.Päivä
1 350 006 884	3,237	2,851	3,859
	3,601	4,039	4,354

Näyte 3	1.Päivä/levy	2.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 006 605	7,180	3,904	7,965
	7,110	3,851	7,838

Näyte 4	1.Päivä/levy	2.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 018 044	10,364	8,860	9,525
	10,193	8,268	9,374

Näyte 5	1.Päivä/levy	2.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 012 940	9,320	6,553	13,773
	8,737	6,860	12,571

Näyte 6	1.Päivä/levy	2.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 009 708	11,228	8,868	14,136
	11,474	7,149	14,975

Anova: yksisuuntainen, Näyte 1 : 1 350 096 360

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	1,385964912	0,692982456	0,0139
Sarake 2	2	0,451754386	0,225877193	0,0042
Sarake 3	2	0,762626263	0,381313131	0,0001

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	0,226323617	2	0,113161809	18,607	0,02	9,5520945
Ryhmissä M0	0,018245363	3	0,006081788			
Yhteensä	0,24456898	5				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 2: 1 350 006 884

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
Sarake 1	2	6,837719298	3,418859649	0,0663
Sarake 2	2	6,890350877	3,445175439	0,7064
Sarake 3	2	8,212121212	4,106060606	0,1225

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä M1	0,606471254	2	0,303235627	1,0163	0,46	9,5520945
Ryhmissä M0	0,895129083	3	0,298376361			
Yhteensä	1,501600337	5				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 3: 1 350 006 605

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
Sarake 1	2	14,28947368	7,144736842	0,0025
Sarake 2	2	7,754385965	3,877192982	0,0014
Sarake 3	2	15,8030303	7,901515152	0,008

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä M1	18,29648347	2	9,148241735	2322,2	2E-05	9,5520945
Ryhmissä M0	0,011818463	3	0,003939488			
Yhteensä	18,30830193	5				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 4: 1 350 018 044

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
Sarake 1	2	20,55701754	10,27850877	0,0146
Sarake 2	2	17,12719298	8,563596491	0,1753
Sarake 3	2	18,8989899	9,449494949	0,0115

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä M1	2,942002751	2	1,471001376	21,911	0,016	9,5520945
Ryhmissä M0	0,201402243	3	0,067134081			
Yhteensä	3,143404994	5				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 5: 1 350 012 940

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
Sarake 1	2	18,05701754	9,028508772	0,1701
Sarake 2	2	13,4122807	6,706140351	0,0471
Sarake 3	2	26,34343434	13,17171717	0,7224

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä M1	42,90883637	2	21,45441818	68,494	0,003	9,5520945
Ryhmissä M0	0,939695058	3	0,313231686			
Yhteensä	43,84853143	5				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 6: 1 350 009 708

YHTEENVETO

<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>
Sarake 1	2	22,70175439	11,35087719	0,0302
Sarake 2	2	16,01754386	8,00877193	1,478
Sarake 3	2	29,11111111	14,55555556	0,3514

ANOVA

<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä M1	42,86667123	2	21,43333561	34,577	0,008	9,5520945
Ryhmissä M0	1,859600086	3	0,619866695			
Yhteensä	44,72627131	5				

Näyte 1	1.Päivä	3.Päivä
1 350 096 360	0,776	0,389
	0,610	0,374

Näyte 2	1.Päivä	3.Päivä
1 350 006 884	3,237	3,859
	3,601	4,354

Näyte 3	1.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 006 605	7,180	7,965
	7,110	7,838

Näyte 4	1.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 018 044	10,364	9,525
	10,193	9,374

Näyte 5	1.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 012 940	9,320	13,773
	8,737	12,571

Näyte 6	1.Päivä/levy	3.Päivä/levy
1 350 009 708	11,228	14,136
	11,474	14,975

Anova: yksisuuntainen, Näyte 1: 1350096360

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	1,385964912	0,69	0,0139
Sarake 2	2	0,762626263	0,38	0,0001

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	0,097137768	1	0,1	13,873	0,065	18,512821
Ryhmissä M0	0,014003673	2	0,01			
Yhteensä	0,111141441	3				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 2: 1350006884

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	6,837719298	3,42	0,0663
Sarake 2	2	8,212121212	4,11	0,1225

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	0,472245155	1	0,47	5,004	0,155	18,512821
Ryhmissä M0	0,188748274	2	0,09			
Yhteensä	0,660993429	3				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 3: 1350006605

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	14,28947368	7,14	0,0025
Sarake 2	2	15,8030303	7,9	0,008

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	0,57271341	1	0,57	109,78	0,009	18,512821
Ryhmissä M0	0,010433421	2	0,01			
Yhteensä	0,583146831	3				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 4: 1350018044

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	20,55701754	10,3	0,0146
Sarake 2	2	18,8989899	9,45	0,0115

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	0,687263918	1	0,69	52,648	0,018	18,512821
Ryhmissä M0	0,026107922	2	0,01			
Yhteensä	0.71337184	3				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 5: 1350012940

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	18,05701754	9,03	0,1701
Sarake 2	2	26,34343434	13,2	0,7224

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	17,16617584	1	17,2	38,465	0,025	18,512821
Ryhmissä M0	0,892565172	2	0,45			
Yhteensä	18,05874102	3				

Anova: yksisuuntainen, Näyte 6: 1350009708

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Sarake 1	2	22,70175439	11,4	0,0302
Sarake 2	2	29,11111111	14,6	0,3514

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä M1	10,26996341	1	10,3	53,825	0,018	18,512821
Ryhmissä M0	0,381606857	2	0,19			
Yhteensä	10,65157026	3				

