

Minna Huovinen

Valkosolusopivuuskokeen pystytys ja validointi Beckman Coulterin Navios™-virtaussytometrille

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikko AMK
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
18.11.2013

Tekijä(t) Otsikko	Minna Huovinen Valkosolusopivuuskokeen pystytys ja validointi Beckman Coulterin Navios™ virtausytometrille
Sivumäärä Aika	38 sivua + 2 liitettä 18.11.2013
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Yliopettaja Riitta Lumme, Metropolia Lehtori Marita Saros, Metropolia Laboratorioasiantuntija Juha Peräsaari FM, SPR Veripalvelu
<p>Opinnäytetyö tehtiin Punaisen Ristin Veripalvelulle. Työn tavoitteena oli pystyttää ja validoida valkosolusopivuuskokeen menetelmä Beckman Coulterin Navios™ -virtausytometrille. Menetelmää hyödynnetään mm. munuaisensiirron jälkeisessä hoidossa, jos siirretty munuaisten ei käynnisty normaalilla tavalla tai epäillään hyljintää.</p> <p>Tarkoituksena oli luoda Navios™ -virtausytometrille oikeat asetukset valkosolusopivuuskokeen menetelmälle ja määrittää positiiviset raja-arvot (T- ja B-IgG sekä T-IgM). Valittiin uudet T- ja B-solumerkkiaineet, jotka fluoresoivat selkeästi eri aallonpituutta, jolloin vältetään hankalilta ajoasetusten säädöiltä. Pystytyksen jälkeen menetelmä validoitiin.</p> <p>Aineistona käytettiin perifeerisen veren soluja, syväjäässä säilytettyjä elinluovuttajan pernan soluja sekä pakastettuja munuaispotilaiden seeruminäytteitä. Seerumit oli valittu siten, että mukana oli negatiivisia, heikosti positiivisia ja vahvasti positiivisia näytteitä. Analyysisarjoissa oli mukana myös tunnettu negatiivinen kontrolli sekä tunnettu positiivinen kontrolli, joiden perusteella analysoitiin menetelmän toistotarkkuutta.</p> <p>Asetettujen hyväksymiskriteerien ja tavoitteiden avulla, validoinnissa saadut tulokset herkkyys (sensitiivisyys) ja tarkkuus (spesifisyys) oli tavoitteiden mukaiset. Tulokset vastasivat käytössä olevalla menetelmällä saatuja alkuperäisiä tuloksia ja menetelmä voitiin ottaa käyttöön.</p>	
Avainsanat	elinsiirto, munuaisensiirto, virtausytometria, fluoresenssi, valkosolusopivuuskoe,

Author(s) Title	Minna Huovinen Leucocyte Cross Matching Established and Validated for Beckman Coulter Navios™ Flow Cytometry
Number of Pages Date	38 pages + 2 appendices 18 Nov 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	
Instructor(s)	Riitta Lumme, Principal Lecturer Marita Saros, Senior Lecturer Clinical Laboratory Specialist, Juha Peräsaari M.Sc.
<p>This study was done for the Red Cross Blood Service. The aim of this study was to set up and validate white blood cell compatibility test using Beckman Coulter's Navios™ flow cytometer. This method is used i.a. in post-transplant treatment, if the transferred kidney does not reach normal functioning levels, or is suspected of rejection.</p> <p>The test started with the calibration of Navios™ flow cytometer: right settings were made and positive limits (T, B -IgG, and T -IgM) were defined. New T and B cell markers were selected that fluoresce clearly different wavelengths, thus avoiding the unwieldy test run adjustments. The method was validated after the setup.</p> <p>As test material, three (different) samples were used: peripheral blood cells, organ donor spleen cells stored in deep freeze, and kidney patients' frozen serum samples. Serums were selected so that there were negative, weakly positive, and strongly positive samples. Each series included negative and positive controls. These control results received methods RSD detail.</p> <p>The results received in validation indicated that sensitivity (sensitivity) and accuracy (specificity) were in line with the originally objectives. The results that were obtained with this method were similar to the results originally received when this method was first used, and therefore it indicates that the test/procedure/method could be implemented.</p>	
Keywords	transplantation, kidney transplantation, flow cytometry, fluorescence, cross match

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Valkosolusopivuuskoe munuaisensiirtopotilaiden hoidossa	2
3	Virtaussytometriä valkosolusopivuuskokeen määrittämisessä	3
3.1	Beckman Coulterin Navios™-virtaussytometri	6
3.2	Valkosoluvasta-aineiden tutkiminen virtaussytometrillä	7
4	Laboratoriomenetelmän validointi	9
5	Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset	11
6	Valkosolusopivuuskoemenetelmän pystytys Navios™-virtaussytometrille	12
6.1	Työprosessin kuvaus	12
6.2	Reagenssit ja näyteaineisto	13
6.3	Fluoresoivien merkkiaineiden valinta	14
6.4	Asetusten säätäminen Naviokselle™	17
6.5	Raja-arvon asettaminen	20
7	Valkosolusopivuuskokeen validointi Navios™-virtaussytometrille	21
7.1	Validoinnin suunnittelu ja parametrien valinta	21
7.2	Laatukontrollit ja validointiaineisto	23
7.3	Validointinäytteiden analysointi	24
8	Tulokset	25
8.1	Validointitulosten tarkastelu	25
8.2	yhteenveto ja johtopäätökset	30
9	Tulosten luotettavuus	32
10	Pohdinta	33
	Lähteet	37
	Liitteet	
	Liite 1. Valkosolusopivuuskoemenetelmän primääritulokset raja-arvon asettamiseksi BC Navios™ virtaussytometrille	

Liite 2. Valkosolusopivuuskoemenetelmän validointiin liittyvät primaaritulokset BC Navios™ virtausytometrille

1 Johdanto

Elinsiirto parantaa vakavasti sairaan potilaan elämänlaatua oleellisesti ja vähentää kuolleisuutta. Joissakin tapauksissa se on viimeinen ja ainoa mahdollisuus elämän jatkumiseen. Tärkeimpiä kriteerejä onnistuneelle munuaisensiirrolle ovat veriryhmäsopivuus ja vasta-aineiden puuttuminen luovuttajan HLA-tekijöitä (Human Leucocyte Antigen) vastaan. Suomessa munuaisensiirtoja tehdään nykyään vuosittain noin 150 - 210 ja tähän mennessä niitä on tehty Suomessa yli 6000.

Äkillisten (akuuttien) ja välittömien (hyperakuuttien) hyljintöjen (rejekioiden) välttämiseksi ennen elinsiirtoa tehdään valkosolujen sopivuuskokeet sytotoksisella (solua hajotavalla) menetelmällä. Elinsiirron jälkeen ongelmatapauksissa tutkitaan valkosolujen sopivuuskokeella saajan seerumiin mahdollisesti muodostuneita vasta-aineita elimenluovuttajan lymfosyyttivalkosoluja kohtaan. Tällainen ns. valkosolujen seurantasopivuuskoe tehdään mm. silloin, jos siirretty munuainen ei käynnisty normaalilla tavalla siirron jälkeen tai epäillään hyljintää.

Sopivuuskoemenetelmiä on monia, joista virtaussytometria on herkimpiä menetelmiä todeta vasta-aineiden muodostumista. Testissä käytetään joko luovuttajan pernan soluja tai perifeerisen veren soluja ja potilaan seerumia. Solut leimataan T- ja B-soluspesifisillä (soluominaisilla) merkkiaineilla, vasta-aineiden tarttuminen osoitetaan toisella merkkiaineilla ja määritetään (kvantitoidaan) virtaussytometrillä.

Tutkimusmenetelmä on käytössä Veripalvelun kudossopeutuvuustutkimukset laboratoriossa, joka on tiiviissä yhteistyössä elinsiirtoa suorittavien sairaaloiden kanssa. Veripalvelulla on ainutlaatuinen rooli elinsiirtoprosessissa tehtävissä tutkimuksissa Suomessa. Vasta-aineiden muodostuminen siirrännäistä vastaan on tärkeä todeta ja se antaa ensiarvoista tietoa klinikoille potilaan hoidossa elinsiirron jälkeen. Tämä on yksi tutkimus muiden tutkimusten joukossa, jolla SPR Veripalvelu tarjoaa palvelua hoitavalle sairaalalle potilaan hoidossa.

Tämä työ tehdään Punaisen Ristin Veripalvelun potilaslaboratoriolle. Työn tarkoituksena on ottaa nykyistä vastaava menetelmä käyttöön, ja validoida se uudelle Beckman Coulterin Navios™ -virtaussytometrille. Nykyään menetelmä tehdään Becton Dickinson-

nin FACScan™ -virtaussytometrillä. Pitkään käytössä olleen laitteen toimintavarmuus on heikentynyt ja siksi tarvitaan vastaava menetelmä uudelle virtaussytometrille. Tässä työssä luodaan uudelle virtaussytometrille oikeat valkosolujen sopivuuskokeen asetukset ja raja-arvot, sekä tarkistetaan positiivisten tulosten raja-arvot uusien merkkiaineiden avulla.

Tämän opinnäytetyön ohjaajina toimivat Metropolia Ammattikorkeakoulun yliopettaja Riitta Lumme, lehtori Marita Saros ja SPR Veripalvelun asiantuntija Juha Peräsaari.

Käytännön työt, ajoasetusten luomisesta validointinäytteiden ajamiseen suoritin itse, tiiviissä yhteistyössä asiantuntija Juha Peräsaaren kanssa. Tähän työhön sisältyy myös innovaatio-osuus, joka toteutui validoinnin yhteydessä validointisuunnitelman (KT-90-3669-3S) ja validointiraportin (KT-90-3669-3R) sekä menetelmäohjeen (KT-3669, painos 11. luonnos) kirjoittamisessa, yhdessä asiantuntija Juha Peräsaaren kanssa.

2 Valkosolusopivuuskoe munuaisensiirtopotilaiden hoidossa

Munuaisensiirto on vakavasti sairaan potilaan elämänlaatua merkittävästi parantava hoitomuoto ja lisäksi se vähentää kuolleisuutta. Munuaissairaat voivat selviytyä vuosien ajan dialyysihoidon avulla, mutta munuaisen loppuvaiheen vajaatoiminnassa elinsiirto tulee ajankohtaiseksi. (Jalanko, Hannu – Sairanen, Heikki 2011:2321–2326.)

Tärkeitä kriteerejä onnistuneelle elinsiirrolle ovat hyvä kudossopeutuvuus (HLA-A, -B, ja – DRB1) luovuttajan ja saajan kesken, vasta-aineiden puuttuminen luovuttajan HLA:ta eli valkosoluantigeenejä vastaan ja veriryhmäsopivuus. Hyvin onnistunut munuaisensiirto mahdollistaa paremman elämänlaadun ilman dialyysihoitoja ja munuaisen toimintaennuste on jopa yli 20 vuotta. (Helanterä, Ilkka – Kyllönen, Lauri – Salmela, Kaija – Koskinen, Petri 2011:1371–1377.)

Suomessa munuaisensiirtoja tehdään nykyään vuosittain noin 150 - 210 ja vuodesta 1964 lähtien siirtoja on tehty jo yli 6000. (Munuais- ja maksaliitto). Suurin osa (95 %) elimistä saadaan aivokuolleilta elinluovuttajilta ja noin 5 % omaisluovuttajilta. Hyljinnäestolääkitys (immunosuppressiolääkitys) estää tehokkaasti akuutin hyljintäreaktion, jota ilmeneekin vain alle 10 %:lla potilaista. (Helanterä ym. 2011:1371–1377.)

Siirretty munuainen käynnistyy parhaassa tapauksessa heti leikkauksen jälkeen. Tällöin virtsaneritys alkaa toimia, eikä dialyysihoitoja enää tarvita. Aina siirre ei kuitenkaan käynnisty oletusten mukaisesti, vaan saattaa mennä useita viikkoja ennen kuin munuainen toimii vakaasti. Hitaasti käynnistyvä munuainen voi olla myös merkki hyljinnästä tai munuaisen kärsimästä kylmäyskemiasta (elin kehon ulkopuolella ilman verenkiertoa) elimen irrotuksen ja uudelleen kiinnityksen välillä. (Helanterä ym. 2011:1371–1377.)

Hyljinnänestolääkityksellä pyritään estämään akuuttia soluvälitteistä hyljintää ja myös estämään kroonisen hyljinnän kehittymistä. Oikean lääkeyksityksen tarkoituksena on pitää munuaissiiirre mahdollisimman pitkään toimintakykyisenä. Akuutit hyljintäreaktiot ovat usein lieviä, ja ne ovat useimmiten hoidettavissa lääkeyksityksellä. Pitkäaikainen (krooninen) hyljintä kehittyy vuosien kuluessa, eikä sitä pystytä nykyllä lääkeyksityksellä kokonaan estämään. (Helanterä ym. 2011:1371–1377.)

Valkosoluvasta-ainetutkimuksella, voidaan seurata luovuttajakohtaisten IgG- ja IgM-luokan HLA-vasta-aineiden muodostumista. Tuloksia hyödynnetään vasta-ainevälitteisen hyljinnän diagnostiikassa. (SPR Veripalvelu 2011.)

3 Virtausytometria valkosolusopivuuskokeen määrittämisessä

Virtausytometria on herkkä menetelmä, jolla saadaan määritettyä monia erilaisia asioita esim. soluista. Tähän työhön liittyen, virtausytometrillä määritetään elinluovuttajan T- ja B-lymfosyytit sekä niihin sitoutuneet elimensaajan vasta-aineet, tarkasti valikoitujen fluoresoivien merkkiaineiden avulla.

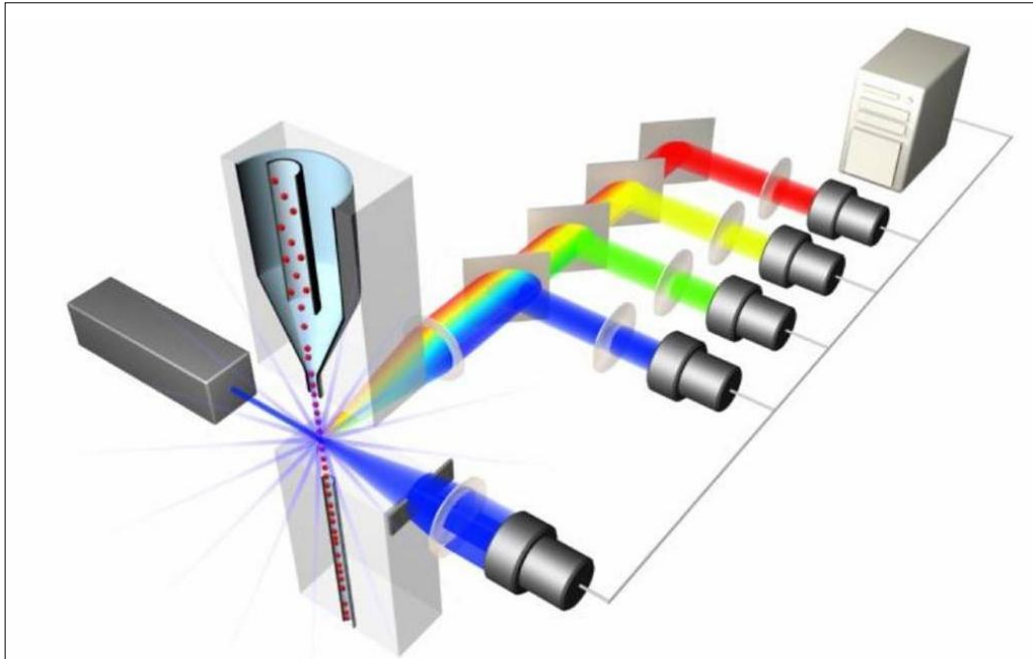
PubMed tietokannasta löytyy artikkeleita, joissa on tutkittu valkosolusopivuuskoe menetelmien eroja ja on osoitettu, että virtausytometrinen menetelmä on selkeästi herkempi, kuin muut menetelmät (esimerkiksi sytotoksiset menetelmät). Beckman Coulterin Navios™ -virtausytometrille ei löytynyt tätä opinnäytetyötä vastaavaa tutkimusta.

Theseus tietokannasta löytyi kaksi, vuonna 2012 tehtyä, BC Navios™ virtausytometriin liittyvää opinnäytetyötä. Toinen on tehty SPR Veripalvelulle, jossa Navios™ -

virtaussytometreille validoitiin menetelmä jäännösvalkosolujen määrittämiseksi veri- ja soluvalmisteista. Toinen opinnäytetyö on tehty Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:n hematologian laboratorioon. Siinä erilaisten leukemia-, jäännöstauti-, kantasolu- sekä immuunipuutostilatutkimuksiin liittyvien solujen immunofenotyypitys tapahtuu Navios™ -virtaussytometreilla. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä perehdytysohje Beckman Coulterin Navios™ -virtaussytometrille.

Virtaussytometriä FCM (Flow Cytometry) avulla solut analysoidaan valon sironnan sekä fluoresenssin perusteella. Toiminta perustuu yksittäisten solujen virtaukseen nestevirrassa valonlähteen (laserin) ohi, jolloin solusta saadaan etu- ja sivusirontasignaalit (Scatter) ja värjäytyneistä soluista fluoresenssisignaalit. Näin eri solupopulaatiot voidaan erottaa toisistaan. (Hawley, Teresa S. – Hawley, Robert G. 2004:1-32).

Näyte imetään näyteputkesta kapeaksi virtaukseksi, joka johdetaan virtauskyvettiin. Siellä vaipanesteen avulla saadaan solut kulkemaan yksitellen lasersäteen ohi. Valon osuessa soluun siitä siroaa valoa kaikkiin suuntiin. Suoraan mennyt sironta (FSC, forward scatter) kertoo solun koon ja sivusironta (SSC, side scatter) kertoo solun partikkeleiden eli sisäisen rakenteen määrän. Fluoresoivat yhdisteet virittyvät laservalon säteilystä korkeampaan energiatilaan (eksitoituvat). Lähes saman tien fluoresoivat molekyylit palautuvat perustilaansa säteillen (emittoiden) korkeammalla aallonpituudella. Tätä tapahtumaa (fluoresenssia) nimitetään Stokesin siirtymäksi. Siten saadaan mitattua vaihteleva määrä solun fluoresensseja, eli fluoresenssikanavia. Säteily ohjataan puoliläpäisevien peilien ja suodattimien avulla detektoreille, jotka muuttavat valosignaalin sähköiseksi signaaliksi tietokoneelle (kuvio 1).



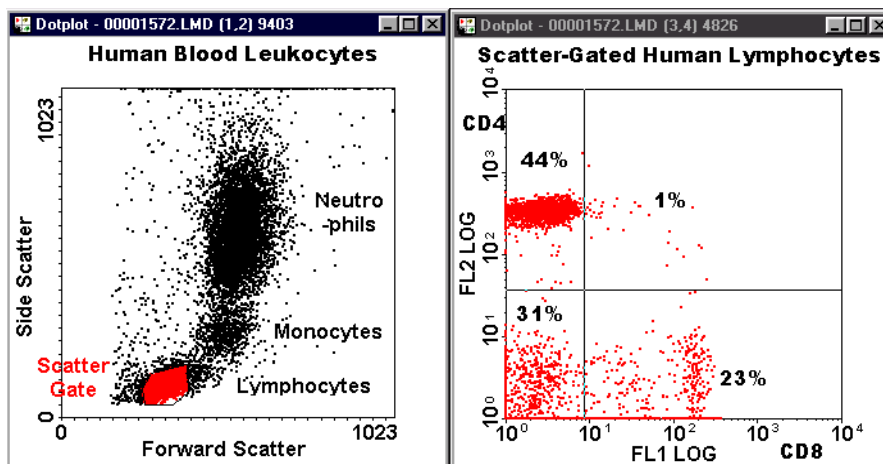
Kuvio 1. Fluoresenssi signaalit (FL1, FL2, FL3, jne.). (MUSC Department of Regenerative Medicine And Cell Biology.)

Fluoresoivia väriaineita voidaan käyttää useammalla tavalla. Ne voidaan kiinnittää esim. vasta-aineisiin, lektiineihin, sytokiineihin, cDNA:han, eli molekyyliin jota sitoutuvat spesifisesti solurakenteisiin. Fluoresoivat väriaineet voidaan myös sitouttaa suoraan solun pinnan tai sisäosan rakenteisiin. Voidaan myös käyttää substraatteja, jotka muuttuvat fluoresoiviksi jonkin entsyymin vuorovaikutuksen alaisena. Fluoresenssi on säteilytettäessä sitä kirkkaampaa, mitä enemmän fluoresoivaa yhdistettä on tarttuneena soluun. (Hawley, Teresa S. – Hawley, Robert G. 2004:1-32.)

Virtaussytometreissa voi olla myös lajittelu (sorttaus) ominaisuus. Solujen erottelu tapahtuu virtauksen aikana mitattavien solun ominaisuuksien perusteella. Virtaus hajotetaan pisaroiksi, jossa kussakin pisarassa on enintään yksi solu. Suutin kohdistaa pisaraan sähköisen varauksen, jos havaitaan partikkeli joka sopii ennalta määrättyihin lajittelukriteereihin. Pisarot voidaan siis varata positiivisiksi tai negatiivisiksi. Suuttimelta pisarat kulkeutuvat poikkeutuslevyjen ohi, jotka vetävät varautuneita pisaroita puoleensa ja saa ne poikkeamaan suorasta linjasta ja johdetaan ne talteen esim. putkiin tai kuoppalevyille. Varauksettomat pisarat kulkeutuvat suoraan jäteastiaan. (Hawley, Teresa S. – Hawley, Robert G. 2004:1-32.)

Tätä menetelmää sovelletaan mm. solun pintareseptorien kartoituksessa, sisäisten rakenteiden analyyseissä, solun sisäisten ionien ja pH:n määrittämisessä, solujen jakautumisanalyyseissä, solusyklianalyyseissä, DNA ja RNA – analyyseissä, fagosytoosissa ja immunologisissa määrittämisissä. Eli menetelmää käytetään hyväksi biolääketieteessä, diagnostiikassa ja perustutkimuksissa. Virtausytometri on herkkä menetelmä tunnistamaan solun pinnalle sitoutuvia valkosoluvasta-aineita. (Hawley, Teresa S. – Hawley, Robert G. 2004:1-32.)

Tietokoneohjelmalla saadaan aikaan graafisia esitystapoja. Sirontaparametreja tutkitaan lineaarisella tai logaritmisella asteikolla ja fluoresenssikanavia yleensä logaritmisella asteikolla. Saadaan kahden leiman detektio (Dot Plot) kuvaaja, jossa jokainen tapahtuma näkyy yksittäisenä pisteinä. Valitaan haluttu populaatioalue (gate) ja tarkastellaan sitä Dot Plot kuvaajilta (kuvio 2.).



Kuvio 2. Esimerkki Dot Plot kuvaajista. (Joan 2007.)

3.1 Beckman Coulter Navios™-virtausytometri

Navios™ -virtausytometri on automaattinen soluanalysointilaitteisto. Virtausytometrin oheislaitteita ovat keskusyksikkö DTX, näyttö LG Flatron 30" ja tulostin HP Colour Laserjet CP 2025 (kuvio 3). Laite on herkkä, tarkka ja tiedonkeruu on nopeaa. Navios™ ohjelmisto on helppokäyttöinen päivittäisissä mittauksissa, sekä ohjelmien luomisessa (parametroinnissa) ja säätämisessä. Elektroniikka mahdollistaa tarkan ja tehokkaan digitaalisen signaalien käsittelyn laajalta fluoresenssialueelta. (Navios.)



Kuvio 3. SPR Veripalvelun Beckman Coulter Navios™-virtaussytometri.

Herkkä laite erottaa jopa 0,4 µm partikkelit. Partikkelin koon perustella voidaan valita kolme FSC kulmaa (FSC Forward Scatter eli suorasirota). Sironnalla erotetaan lymfositit, monosyytit ja granulositit. Laitteessa on 1 048 576 kanavaa, joten populaatioiden erotuskyky on tehokkaampaa. Laitteessa on kolme laservaloa (punainen, sininen ja violetti) jotka mahdollistavat 6, 8 tai 10 erilaisen leiman käyttämisen fluoresenssimittauksessa samanaikaisesti, lisäksi voidaan mitata suorasirota (FSC) ja sivusirota (SSC Side Scatter). Tehokkaat ja luotettavat laservalot mahdollistavat paremman tarkkuuden partikkeleiden tunnistamisessa. Analyysia kohden voi olla 62 mitattavaa parametria ja tapahtumien määrä on nopeimmillaan 25000 tapahtumaa sekunnissa. Ohjelmistoa voi hallita monta käyttäjää. Tuloksia voi tarkastella näytöllä sujuvasti ”vedä ja palauta” –periaatteella. Populaatioiden rajaus on helppoa ja loogista ja väreillä voidaan selkeyttää visuaalista havainnointia. Tuloksista voidaan luoda automaattisesti pdf- tai excel-tiedostoja. Led valot osoittavat selvästi laitteen senhetkisen tilan. Navioksen™ eduksi FACScan™ -laitteeseen verrattuna on se, että ajon jälkeen Navioksella™ on suuremmat mahdollisuudet muuttaa analyysiasetuksia, kuin FacScanilla™. (Navios).

3.2 Valkosoluvasta-aineiden tutkiminen virtaussytometrillä

Elinsiirron jälkeen tutkitaan valkosolujen sopivuuskokeella saajan seerumiin mahdollisesti muodostuneita vasta-aineita elimenluovuttajan T- ja B-lymfosyyttejä kohtaan.

Tällainen valkosolujen sopivuuskoe tehdään mm. silloin, jos siirretty munuainen ei käynnisty normaalilla tavalla siirron jälkeen tai aiheuttaa hyljintäreaktion tai seurataan hoitovastetta siirron jälkeen. Verinäyte otetaan hyljintää epäiltäessä aikaisintaan kahden viikon kuluttua siirteen saamisesta.

Sopivuuskoemenetelmiä on monia, joista virtausytometria on herkin. Muita menetelmiä ovat esimerkiksi sytotoksinen menetelmä ja Luminex -teknologiaan -perustuva menetelmä. Sytotoksisessa menetelmässä tutkittavassa seeruminäytteessä oleva spesifinen (ominainen) vasta-aine tarttuu lymfosyyttien pinnalla oleviin HLA-molekyyleihin. Solujen joukkoon lisätään komplementtia, joka aktivoituu vasta-aine - antigenei - kompleksista. Aktivaatio tuotteet vaurioittavat solukalvoa ja solu kuolee. Solut värjätään kaksoisvärjäyksellä akridiini-oranssi - etidiumbromidilla. Akridiini-oranssi värjää kaikkien solujen solukalvot vihreiksi. Etidiumbromidi tunkeutuu vaurioituneen solun sisälle sitoutuen solun nukleiinihappoihin (RNA ja DNA), jolloin sen väri voimistuu 25 kertaiseksi ja solu värjäytyy punaiseksi. Solut tunnistetaan fluoresenssimikroskoopilla. Testillä mitataan kuolleiden ja elävien solujen määrää, joka on verrannollinen vasta-aineiden sitoutumiseen kohdesoluun. (Milford, Edgar 1992:831-834). Luminex tekniikka on virtausytometriaan perustuva menetelmä. Menetelmässä elinluovuttajan (donorin) solut hajotetaan (lyysataan) ja donorin HLA-antigeenit sidotaan Luminex -kuulien pinnalle. Kuulia inkuboidaan potilaan vasta-aineiden kanssa ja sitoutuneet vasta-aineet tunnistetaan fluoresoivilla sekundaarivasta-aineella. (Immucor.)

Virtausytometrisessä testissä käytetään joko luovuttajan pakastettuja pernan soluja tai perifeerisen veren soluja, sekä potilaan seerumia. Solut leimataan T-soluspesifisellä merkkiainetta sisältävällä vasta-aineella (esim. anti-CD3-PE, CD3-APC) ja B-soluspesifisellä merkkiainetta sisältävällä vasta-aineella (esim. anti-CD19-PE, CD19-PC7). T- ja B-soluja seisoitetaan (inkuboidaan) potilaan seerumin kanssa, jolloin mahdollinen vasta-aine tarttuu näihin soluihin. Seisotuksen jälkeen lisätään toinen merkkiaine (FITC-konjugoitu anti-human IgG tai IgM), joka sitoutuu tarttuneisiin IgG- ja IgM-luokan vasta-aineisiin. Lopuksi merkkiaineita sisältävät solut tunnistetaan virtausytometrillä. (Holcomb, Joan E. – Lebeck, Lauralynn K. 2000).

Määritys tapahtuu tällä hetkellä Becton Dickinson FACScan™ -virtausytometrillä. Tulos saadaan fluoresenssikuvaaajan mediaanipiikin siirtymänä oikealle, näytteen antamaa

fluoresenssikuvaajan mediaanikanava-arvoa verrataan negatiivisen kontrolliseerumin vastaavaan mediaaniarvoon. Siirtymän ylittäessä positiiviselle tulokselle määritetyn raja-arvon sopivuuskoe tulkitaan positiiviseksi. (Menetelmäohje KT-3669 2010.)

4 Laboratoriomenetelmän validointi

Ennen tutkimusmenetelmän validoinnin suunnittelua, arvioidaan tutkimusprosessi. Valokosolusopivuuskoe tulee jatkossakin olemaan menetelmä, jota tarjotaan elinsiirtopotilaan hoidon tueksi klinikoille, joten menetelmän pystyttäminen on järkevää ja perusteltua. Arvioidaan uuden menetelmän käyttö, riskit ja ajantasaisuus. Validoinnilla halutaan osoittaa menetelmän toimivuus. Selvitetään soveltuuko menetelmä käyttötarkoitukseensa ja antaako se oikeita tuloksia. Tutkimuksen kohteena on muutetun tutkimusmenetelmän toimivuus, näytematriisin vaikutus ja uusi laite. Validoinnista laaditaan validointisuunnitelma ja – raportti. Akkreditointistandardit, SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 ja SFS-EN-ISO 15189:2007 huomioidaan validoinnissa. Validointi aloitetaan vasta, kun menetelmä on pystytetty ja käytössä on laadittu menetelmäohje (luonnos). (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Uuden tutkimusmenetelmän validoinnin laajuus riippuu tutkimusmenetelmästä ja käyttötarkoituksesta. Opinnäytetyöhön liittyvä menetelmä on kvalitatiivinen (biologinen) tutkimusmenetelmä. Validoitava tutkimusmenetelmä voi olla myös kvantitatiivinen. Jos menetelmä on CE-merkitty tai muuten virallinen standardimenetelmä (vakioitu menetelmä), ei vaadita täydellistä validointia. Esimerkkinä vaikka menetelmän siirto laboratorion toiseen. Tällaisissa tapauksissa osoitetaan tulosten oikeellisuus omilla näytteillä, ja näytemäärät voivat olla pienempiä. Tutkitaan vain tärkeimmät parametrit. (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Validoinnissa voidaan käyttää hyväksi valmistajalta, julkaisuista tai vertailututkimuksista saatuja tietoja, jos menetelmä on kehitetty ja validoitu siihen muotoon, jona sitä tullaan käyttämään. Tämän lisäksi tutkitaan omia näytteitä omissa olosuhteissa, joilla osoitetaan tutkimusmenetelmän antavan oikeita tuloksia. (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Itse kehitetyt menetelmät eli ns. in-house (laboratoriokohtaiset) menetelmät ja modifioidut (muokatut) tutkimusmenetelmät validoidaan laajemmin. Näille määritetään myös toimintavarmuus. Validoitavan näytemäärän on oltava riittävän laaja, jotta mittausepävarmuuteen liittyvät tekijät tulevat esille. (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Vanhaa, pitkään käytössä ollutta menetelmää ei ole tarpeen validoida uudelleen, jos ulkoisen laadunarvioinnin ja sisäisen laadunohjauksen tulokset osoittavat tulosten oikeellisuuden. Mikäli tutkimusmenetelmässä tapahtuu oleellinen muutos, esim. mittausperiaate muuttuu, validoidaan se kokonaan uudelleen. Toisinaan myös reagenssin tai kemikaalin pitoisuudessa/laadussa tapahtuu muutoksia, silloin voi olla tarpeen tehdä osittainen uudelleen validointi. (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Laitteen muuttuminen toisen tyyppiseksi vaatii vain suorituskyvyn tarkastuksen. Se tehdään tutkimusmenetelmän avulla. Näytematriisin muuttuessa tai uuden näytematriisin käyttöönotossa, varmistetaan tutkimusmenetelmän sopivuus niille melko suppealla validoinnilla. Validointi suunnitellaan ja dokumentoidaan. Ennen varsinaista validointia, laaditaan validointisuunnitelma ja lopuksi tehdään validointiraportti. (Heikkilä, Ritva 2008; Yleisohje LP-YO-011 2008.)

Tämän opinnäytetyön validointisuunnitelmassa (KT-90-3669-3S) kerrotaan minkälaisesta menetelmästä on kysymys, ja mikä on validoinnin tarkoitus. Kerrotaan mikä tutkimusmenetelmän ohjeluonnosta noudatetaan ja mitä reagensseja validoinnissa tullaan käyttämään. Suunnitelmasta selviää mitä näytematriisia käytetään, minkälaisia kontrollinäytteitä ja tutkittavia näytteitä on valittu ja kuinka laajasti. Validointisuunnitelmassa on suunniteltu validoinnin toteutus, tulosten käsittely ja hyväksymiskriteerit. Suunnitelmassa mietitään myös muutoshallinta, eli menetelmäohjeiden päivitystarve, menetelmän perehdyttäminen ja validointitulosten säilyttäminen.

Validointiraporttiin (KT-90-3669-3R) kootaan validoinnin toteutuminen. Raporttiin kirjaan samoja asioita, mitä validointisuunnitelmassakin, mutta tarkemmin. Validoinnin toteutusvaiheessa tehdyt muutokset kirjataan tarkasti raporttiin. Raportissa keskeistä on saadut validointitulokset, joiden perusteella arvioidaan hyväksymiskriteerien toteutuminen ja validoinnin onnistuminen.

5 Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Tämä työ tehdään Punaisen Ristin Veripalvelun potilaslaboratoriolle. Työn tarkoituksena on siirtää menetelmä uudelle Beckman Coulterin Navios™ virtausytometrille. Ensin menetelmä pystytetään Navioksella™, sen jälkeen tehdään menetelmän validointi ja käyttöönotto. Nykyään menetelmä tehdään Becton Dincinsonin FACScan™ virtausytometrillä. Pitkään käytössä olleen laitteen toimintavarmuus on heikentynyt ja tarvitaan vastaava menetelmä uudelle virtausytometrille. Tarkoituksena on saada näytteille samat lopputulokset uudella virtausytometrillä, verrattuna nykyisellä menetelmällä saattuihin tuloksiin. Menetelmän on oltava potilastuloksien suhteen vertailukelpoinen uuden ja vanhan laitteen kanssa.

Tutkimuskysymykset:

Saako laitteen asetukset säädettyä siten, että löydetään halutut solupopulaatiot ja erotuskyky on mahdollisimman hyvä näytteestä toiseen? Ongelmana näytemateriaalin suhteen ovat elinluovuttajien väliset erot pernan solupopulaatioissa. Ongelmia aiheuttaa myös se, että valkosolujen sopivuuskokeissa tulee esille myös muita kuin HLA-vasta-aineita. Nämä vasta-aineet voivat muodostua mitä tahansa vierasta luovuttajan antigeneita vastaan ja ne eivät tule esiin käytössä olevilla HLA-spesifeillä valkosoluvasta-aineiden seulontamenetelmillä.

Validoinnilla selvitetään pystytetyn menetelmän toimivuutta sekä soveltuuko menetelmä käyttötarkoitukseensa. Virtausytometrinen Beckman Coulterin Navios™ on huomattavasti herkempi, kuin käytössä oleva Becton Dincinsonin FACScan™ -virtausytometri. Saadaanko negatiiviset ja positiiviset raja-arvot määritettyä siten, että tulokset vastaa aiemmin saatuja tuloksia?

Tutkimuskysymykset tiivistäen:

1. Löytyvätkö oikeat asetukset Naviokselle, jotta saadaan määritettyä negatiivisten ja positiivisten tulosten raja-arvot, oikeiden tulosten määrittämiseksi halutusta solupopulaatiosta?

2. Vastaavatko virtausytometrien, Navios™ ja FACScan™, tulokset toisiaan?

6 Valkosolusopivuuskoemenetelmän pystytys Beckman Coulter Navios™-virtausytometrille

Valkosolujen sopivuuskoe on edelleen tarpeellinen tutkimus munuaisensiirron saaneen hoidon seurannassa. Sillä saadaan käsitys siirretyn munuaisen toiminnasta ja onko kyseessä hyljintäreaktio, tai jokin muu syy munuaisen viivästyneeseen käynnistymiseen. Virtausytometrinen vasta-ainemääritys on edelleen herkimpiä menetelmiä todeta, onko elimensaajalle muodostunut spesifiä vasta-aineita luovuttajan HLA:ta vastaan. Navios™ on nykyaikainen, herkkä virtausytometri. Samasta näytematriisista saadaan suurempi määrä tapahtumia, kuin käytössä olevalla FACScan™ -virtausytometrillä. Kehitys on selkeästi parantanut virtausytometriä herkkyyksiä.

Navios™ virtausytometri antaa mahdollisuuden käyttää useita merkkiaineita samanaikaisesti, koska laitteessa on useita lasereita tunnistamassa eri aallonpituudella säteileviä merkkiaineita. Tämä ominaisuus mahdollistaa merkkiaineiden valinnan siten, että asetusten tarkistamisilta (kompensaatioilta) vältytään, opinnäytetyöhön liittyvän menetelmän osalta.

Reagenssit pysyvät samoina nykyiseen menetelmään verrattuna, ainoastaan T- ja B-solumerkkiaineet vaihdetaan. Uusi menetelmä saattaa vähentää reagenssikustannuksia, sillä työprosessimuutoksen (määritysputkien väheneminen, T- ja B-solumerkkiaineiden määrän pieneneminen) osalta työaika sekä reagenssien kulutus vähenee.

6.1 Työprosessin kuvaus

Beckman Coulterin Navios™ virtausytometreja hankittiin kaksi kappaletta SPR Veripalveluun vuonna 2011. Laitevalmistaja järjesti pienelle joukolle asiantuntijoita koulutusta laitteen toimintaperiaatteesta ja käytöstä, asetusten luomisesta omien protokollien mukaisesti jne.. Em. asiantuntijoiden ja laitevalmistajan edustajan avulla luotiin perusasetukset ja parametrit valkosolujen sopivuuskokeelle. Asetusten säätäminen tapahtui

verensolujen avulla. Käytössä oli alusta asti uudet valitut CD3-APC (T-solu) ja CD19-PC7 (B-solu) -fluoresoivat merkkiaineet. Asiantuntija valitsi uudet merkkiaineet fluoresoivien ominaisuuksien ja tunnistusominaisuuksien perusteella, joilla erotetaan T- ja B-lymfosyytit solupopulaatiosta. Tarkoitus oli valita sellaiset merkkiaineet, jotka fluoresoivat aallonpituutta mahdollisimman etäällä toisistaan. Merkkiaineiden käytettävä määrä testattiin usealla eri määrällä ja erotuskyvyn perusteella valittiin käytettävä määrä. Lisäksi laimennettiin (titrattiin) myös käytössä olevat FITC IgG- ja IgM -merkkiaineiden pitoisuudet Navios™ laitteelle. FITC merkkiaineella leimattuja IgG- ja IgM -luokan vasta-aineita tarvitaan osoittamaan mahdollisesti potilaan seerumissa olevia elinluovuttajaa vastaan muodostuneita vasta-aineita, jotka sitoutuvat näytteen T- ja B-lymfosyytteihin.

Asetuksia ja parametreja säädettiin tarvittaessa lisää, kun saatiin enemmän informaatiota tuloksista. Haluttujen solupilvien etsiminen koko solupopulaatiosta tarkentui matkan varrella. Oikean informaation antavat parametrit tarkentuivat myös matkan varrella. Tarkoituksena oli saada mahdollisimman hyvä tulosten variaatiokerroin (cv=coefficient of variation). Variaatiokerroin määrittää tulosten keskihajonnan keskiarvostaan ja se ilmaistaan prosentteina. Negatiivisten ja positiivisten näytteiden avulla määritettiin negatiivisuuden ja positiivisuuden raja-arvot.

Kun menetelmä oli pystytetty Naviokselle™, tehtiin menetelmän validointi. Validoinnilla hyväksytään menetelmä käyttöön sopivaksi ja määritetään lopullisesti negatiiviset ja positiiviset raja-arvot. Menetelmä on valmis potilasnäytteiden analysointiin, vasta hyväksytyjen validointitulosten jälkeen.

6.2 Reagenssit ja näyteaineisto

Solujen sulatukseen liittyvät reagenssit:

- RPMI (Hyclone Europe Ltd B-9006-L)
- Antibioottiliuos (Penisilliini 100 000 IU/ml, streptomysiini 25 mg/ml)
- FBS seerumi (inaktivoitu fetaalivasikanseerumi, Gibco 10106-078)

Valkosolusopivuuskokeeseen liittyvät reagenssit:

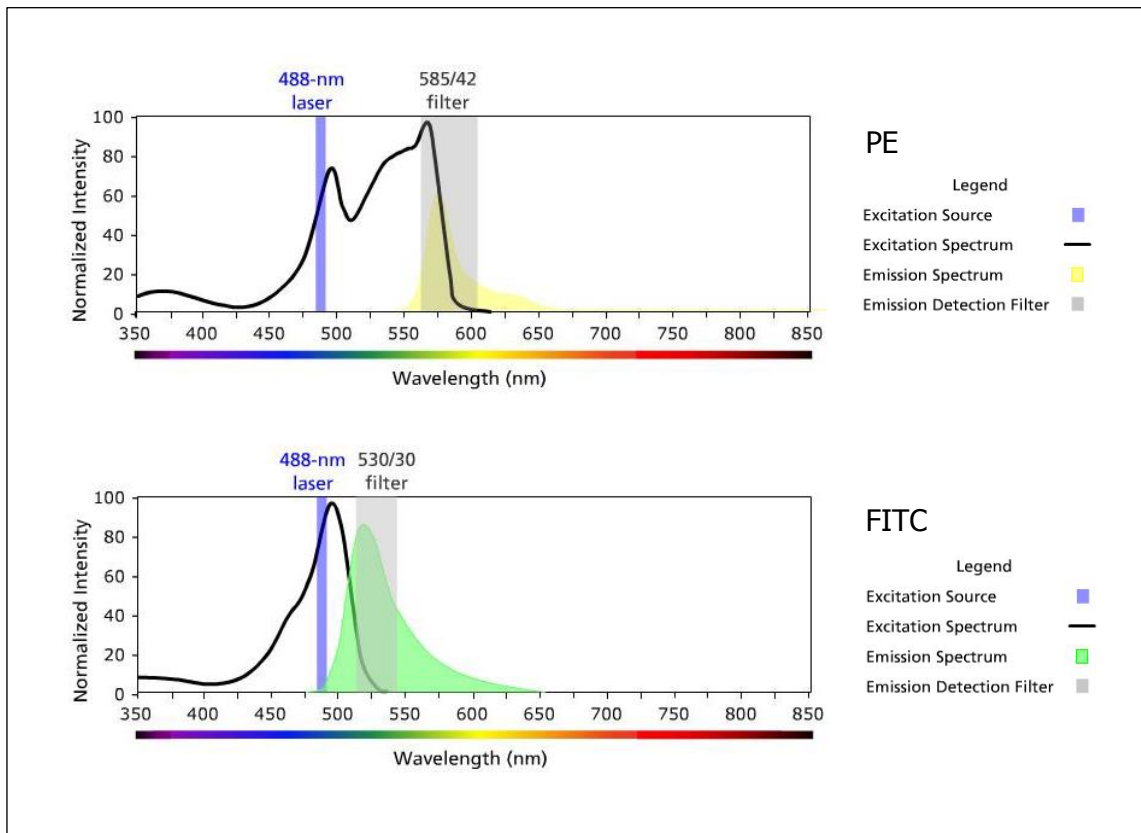
- FITC-IgG (Fluorescein conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, Fc_γ Fragment specific, Jackson ImmunoResearch 109-096-098)
- FITC-IgM (Fluorescein conjugated rabbit anti-human IgM spesific for MU - chains
- Dako/Algol F 0203)
- CD3-APC, T-solumerkkiaine (APC-leimattu (Allophycocyanin) anti CD3 hiiren monoklonaalinen IgG1-luokan vasta-aine, Beckman Coulter, REF IM2467)
- CD19-PC7, B-solumerkkiaine (PC7-leimattu (R Phycoerythrin-Cyanine 7) anti-CD19 hiiren monoklonaalinen IgG1 kappa-luokan vasta-aine, Beckman Coulter, REF IM3628)
- 20 % natriumatsidi
- PBS-liuos, 0,0067 M PBS (Fosfaattipuskurikonsentraatti, 25 ml 2,632 M, SNBTS Diagnostics, Edinburgh, Scotland Z332)
- Natriumklorid 9 mg/ml (Fresenius Kabi Norge AS 88 32 64)
- Punasolujen hajoituspuskuri (10xkantaliuos)

Asetusten säätämiseen käytettiin perifeerisen veren soluja ja positiivista (IgM ja IgG) ja negatiivista kontrolliseerumia (AB seerumia). Näytemateriaalina käytettiin syväjässä olevia elinluovuttajien pernan soluja sekä seeruminäytteenä vanhoja, säilössä olevia munuaispotilaiden seeruminäytteitä. Näytteet valittiin riittävän laajalta alueelta, jotta saatiin määritetyksi positiivisten tulosten raja-arvot. Valittiin 11 potilasta ja osasta useampia eri ajankohdan seerumeita, yhteensä 16 eri seerumia ja 6:n eri elinluovuttajan pernan soluja. Näytteet numeroitiin juoksevilla numeroinnilla 11-21, joka vastasi potilasta. Potilaiden eri seerumit oli numeroitu erikseen.

6.3 Fluoresoivien merkkiaineiden valinta

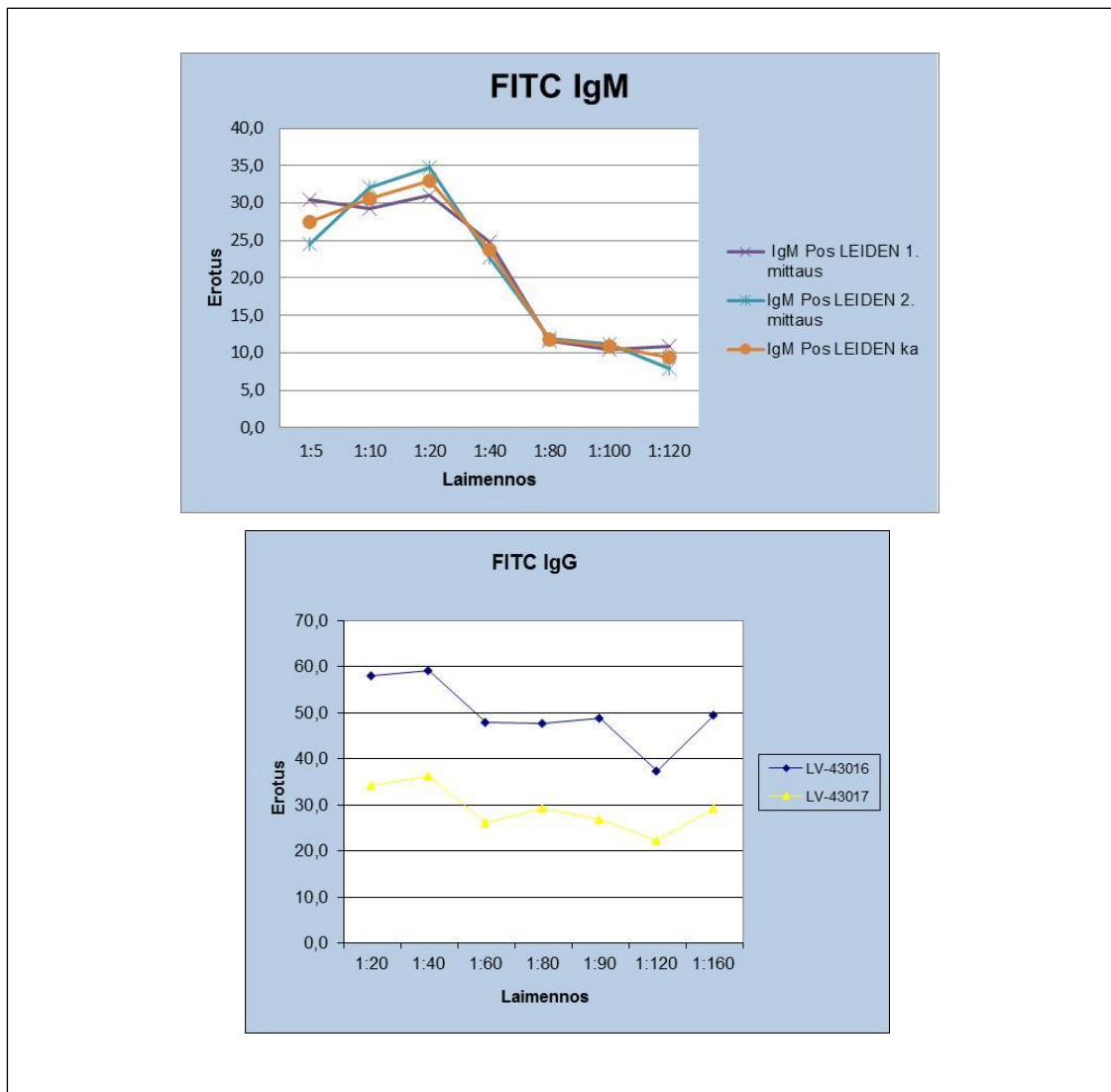
Perinteisesti tässä menetelmässä on käytetty T-soluja tunnistavaa CD3-PE merkkiainetta ja B-soluja tunnistavaa CD19-PE merkkiainetta (kuvio 4.). Kyseessä olevien merkkiaineiden emissiokirjo (emissiospektri) on varsin lähellä FITC merkkiaineen emissiokirjoa, jolloin voi tapahtua fluoresenssin vuotoa väärälle kanavalle. Näillä merkkiaineilla asetusten tarkastaminen (kompensaatio) olisi todennäköistä Navios™ laitteelle tehtävien huoltojen jälkeen tai mahdollisten volttien muuttamisten jälkeen. Asetusten tarkastamisen avulla poistetaan vuotanut fluoresenssi väärältä kanavalta eli vuotaneen sig-

naalin osuus vähennetään automaattisesti pois toiselta kanavalta. Käytännön työn helpottamiseksi etsittiin merkkiaineita, jotka fluoresoivat selkeästi eri aallonpituutta.



Kuvio 4. Becton Dickinson FACScanilla™ käytettävien merkkiaineiden fluoresenssit. (BD Biosciences.)

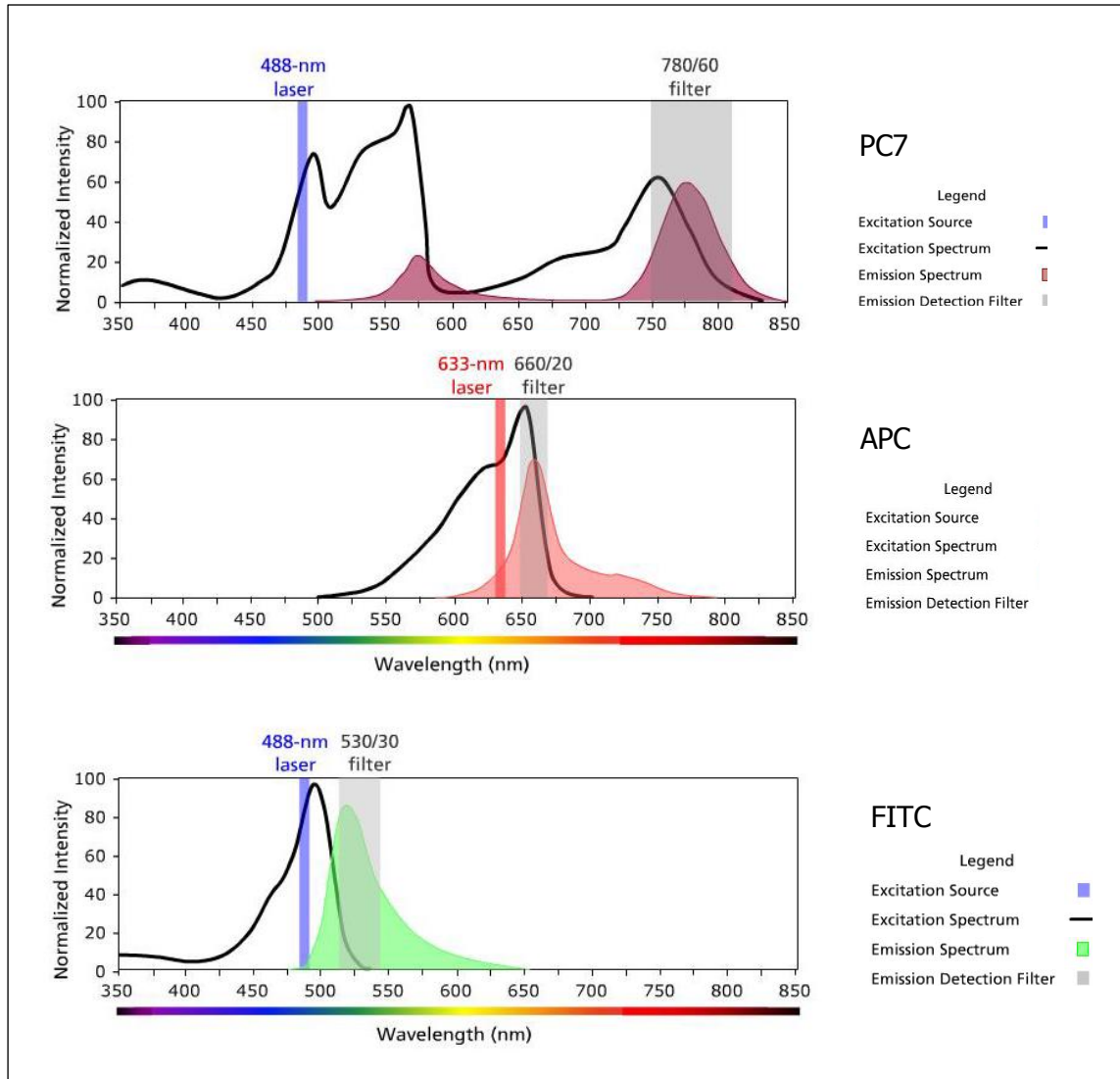
FITC (HLA Luokka I fluoreskeiini-isotiosyanaatti) konjugoidut IgG- ja IgM-monoklonaliset vasta-aineet pysyvät samoina, kuin FACScanilla™ tehtävällä valkosolusopivuuskoemenetelmällä. Tämä merkkiaine sitoutuu potilaan IgG- ja IgM-luokan vasta-aineisiin, jotka ovat tarttuneet elinluovuttajan pernan T- ja B-lymfosyytteihin. Fluoresenssin säteilyhuippu (Emission Peak) tapahtuu 530 nm aallonpituudessa. Pitoisuudet analysoitiin laimennossarjojen avulla ja valittiin matalin pitoisuus, jolla riittävä erotuskyky saavutettiin (kuvio 5).



Kuvio 5. FITC IgG ja -IGM laimennossarjoilla saadut tulokset. Erotus laskettu vähentämällä positiivisesta kontrollista AB-seerumilla saatu tulos. Tulosten perusteella valittiin FITC IgM:lle käyttöläimennökseksi 1:20 ja FITC IgG:llä käyttöläimennökseksi 1:40.

T- ja B-solujen merkkiaineiksi valittiin CD3-APC ja CD19-PC7. CD3-APC on APC (Allophycocyanin)-fluorokromilla konjugoitua spesifistä IgG luokan vasta-ainetta, joka tunnistaa CD3 antigeenin omaavat solut. Tätä antigeenia löytyy ihmisen kypsien T-lymfosyyttien pinnalta. Merkkiaineen säteilyhuippu tapahtuu n. 660 nm aallonpituudella, tämä saadaan aikaiseksi punaisella 633 nanometrillä laservalolla aikaiseksi.

CD19-PC7 on PC7 (Phycoerythrin-Cyanine 7)-fluorokromilla konjugoitua spesifistä IgG luokan vasta-ainetta, joka tunnistaa CD19 antigeenin omaavat solut. B-lymfosyyttien pinnalta löytyy kyseistä CD-19 antigeenia. Merkkiaineen säteilyhuippu tapahtuu n. 780 nm aallonpituudella, tämä saadaan aikaiseksi sinisellä 488 nm laservalolla aikaiseksi (kuvio 6).

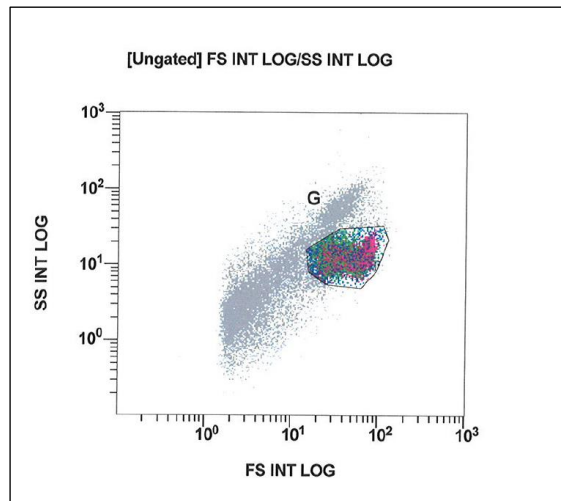


Kuvio 6. Navioksella™ käytävien T- ja B-solumerkkiaineiden fluoresenssit, sekä edelleen käytettävän FITC merkkiaineen fluoresenssit. (BD Biosciences.)

6.4 Asetusten säätäminen Naviokselle™

Ensin luotiin nykyistä virtausytometriä vastaavat asetukset. Dot Plot – taulukkoon valittiin x- ja y-akselille lineaariset asteikot. Kertymät sijoittuivat hyvin hajanaisesti ja oikean solupopulaation, eli lymfositien rajaaminen (geittaus) pakastetuilla pernasoluilla muodostui hankalaksi. Kanava-arvot osoittivat uuden laitteen olevan huomattavasti herkempi, kuin käytössä olevan virtausytometrin kanava-arvot.

Siirryttiin logaritmiseen asteikkoon, jolloin löydettiin helpommin halutut solupopulaatiot. Kokonaissolupopulaatiosta rajattiin alue, jolla T- ja B-solut näyttivät sijaitsevan. Tietyt rajaukset valittiin tietyn värisiksi, jolloin ko. solujen sijainnit löytyivät helpommin (kuvio 7).

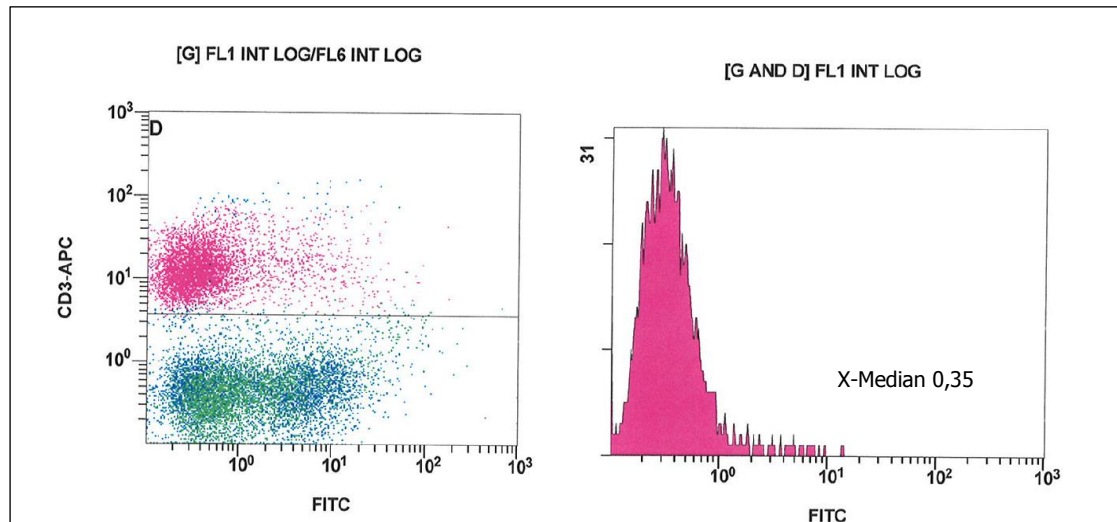


Kuvio 7. Dot Plot tauluko, jossa on rajattuna T- ja B-lymfosyyttialue G.

Histogrammitaulukoiden avulla saadaan valittujen T- ja B-solupopulaatioiden kertymät histogrammin muotoon. Taulukon parametreiksi valittiin aluksi vain X-mean eli koko populaation keskiarvo. Rinnakkaisia näytteitä mitattaessa, hajontaa esiintyi varsin paljon, X-mean RSD 16,2 %. Siksi otettiin mukaan myös X-median, joka kuvaa paremmin jakauman tyypillisintä arvoa. X-medianilla rinnakkaisten RSD oli 8,7 %. X-meanin ja X-medianin välinen ero tulostasoissa oli selkeä. X-median oli T IgG-soluilla 30,4 % korkeampaa ja B IgG-soluilla 27,4 % korkeampaa kuin X-mean tuloksiin verrattuna. T IgM-soluilla tulostasoero pysyi keskimäärin samana (0,01 %). Kaikkien pystytysvaiheessa ajettavien näytteiden (27 kpl) T IgG RSD X-median tuloksilla oli 7,4 % ja X-mean tuloksilla 15,7 %. B IgG – tulosten RSD X-median oli n. 11,7 % ja X-mean 12,1 %. Lisäksi T IgM tulosten RSD X-median tuloksilla oli 7,1 % ja X-mean tuloksilla 16,2 %. Näiden perusteella validoinnissa käytettäväksi parametriksi valittiin X-median (liite 1).

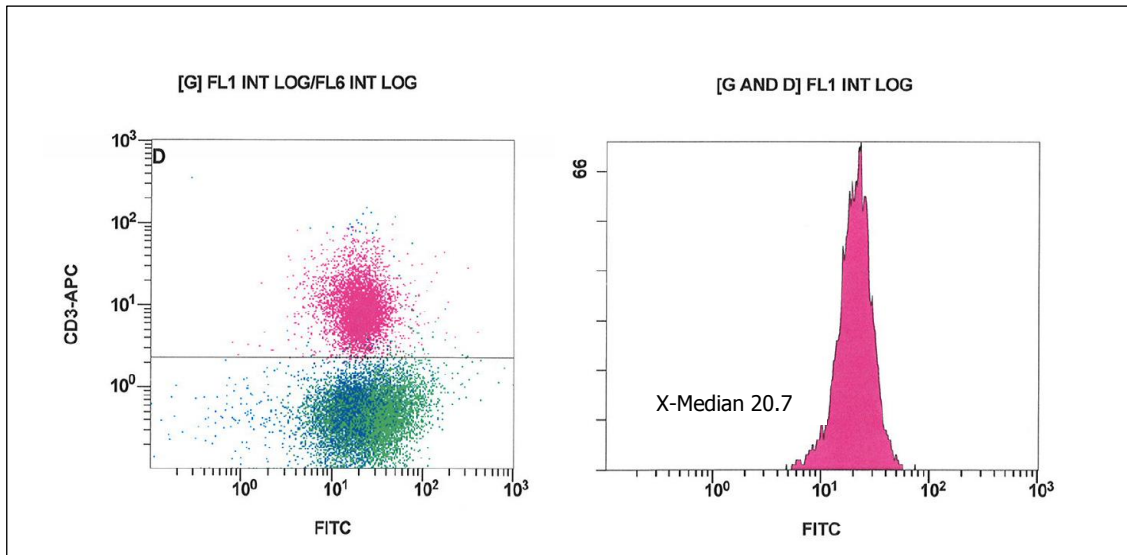
Histogrammin sijainti taulukossa säädettiin volttien avulla. Negatiivisen histogrammin sijainnin tulee olla mahdollisimman lähellä 0-kohtaa eli ns. taulukon vasenta reunaa. Positiivisen histogrammin tulee erottua selkeästi negatiivisesta, jotta voidaan luotetta-

vasti tulkita tulos negatiiviseksi tai positiiviseksi. Tarkoituksena oli saada molemmat Navios™ -laitteet yhteneviksi tulosten osalta. Perusasetukset olivat samat molemmilla Navios™ -virtaussytometreilla. Rinnakkaislaitteiden tulostasoiissa oli asetusten säätämishetkessä eroja ja voltteja säätämällä saatiin tulostasot vastaamaan toisiaan.



Kuvio 8. Negatiivinen näyte. T-lymfosyytipilvi näkyy punaisella värillä vasemman puoleisessa Dot Plot -taulukossa ja siitä on muodostettu histogrammi oikeanpuoleiseen taulukoon. Näytteessä ei ole IgG -luokan vasta-aineita elinluovuttajan lymfosyyttejä kohtaan.

Kuviossa 8. on näytteenä negatiivinen kontrollinäyte, joka sijoittuu molemmissa taulukoissa aivan vasempaan reunaan. Vastaavasti positiivisen kontrollinäytteen sijainti kuviossa 9. on siirtynyt asteikolla selkeästi eteenpäin, molemmissa taulukoissa. Tulos X-Median ilmaisee sen, missä kohtaa asteikkoa on tyypillisesti eniten soluja. Mitä isompi luku on, sitä enemmän näytteessä on IgG- tai IGM -luokan vasta-aineita sitoutuneena elinluovuttajan pernan soluihin. Toisin sanoen, näytteessä on silloin vasta-aineita elinluovuttajan lymfosyyttejä kohtaan.



Kuvio 9. Positiivinen näyte. T-lymfosyyttipilvi näkyy punaisella värillä vasemman puoleisessa Dot Plot -taulukossa ja siitä on muodostettu histogrammi oikeanpuoleiseen taulukoon. Näytteessä on IgG -luokan vasta-aineita elinluovuttajan lymfosyyttejä kohtaan.

Ajettaessa näytteitä verensoluilla, joutui ajopohjaa säätämään, jotta tulostaso saatiin negatiivisen AB kontrollin osalta samalle tasolle, kuin pernan soluilla ajettaessa. Siksi verensoluja varten luotiin oma ajopohja. Näytematriisista johtuen, negatiiviset arvot molemmilla näytematriiseilla olivat verrannollisia, mutta positiivisissa arvoissa oli eroavaisuutta näytematriisien välillä. Lopulliset tulokset vastasivat kuitenkin toisiaan.

6.5 Raja-arvon asettaminen

Ajamalla tunnettuja negatiivisia munuaispotilaiden seeruminäytteitä, voitiin määrittää negatiivisen tuloksen raja-arvo. Lisäksi toistettiin muutamia, nykyisellä menetelmällä tehtyjä valkosolusopivuuskokeita, tulostason vertaamiseksi ja alustavien raja-arvojen määrittämiseksi. Aiemmin saadut tulokset eivät täysin vastanneet Navioksella™ saatuja tuloksia. Näytteiden vasta-ainemääritystulosten ja toisella menetelmällä tehtyjen sopivuuskoetulosten perusteella, asiantuntija arvioi oliko tulosten eroavuuteen perusteet.

T-solu IgG ja IgM, sekä B-solu IgG raja-arvoksi valittiin 1,4. Raja-arvon valinnassa käytetyt tulokset löytyvät liitteestä 1. Pernalle asetettu 1,4 raja-arvo soveltuu myös veren soluille.

7 Valkosolusopivuuskokeen validointi Navios™-virtaussytometrille

Biologisen menetelmän validoinnissa täsmällisten tulosten saaminen on vaikeaa, joka johtuu mm. näytematriisista. Tutkitaan elävää organismia ja silloin tulosten tulkintaan vaikuttaa moni asia. Tuloksissa on huomioitava non-HLA-vasta-aineet (ei-HLA-vasta-aineet). Tästä johtuen selkeästi positiiviset tulokset HLA-vasta-ainenegatiivisista näytteistä, ei käytetä raja-arvon määrittämisessä. Tähän työhön liittyvä menetelmä on kvalitatiivinen. Validoinnissa noudatetaan Punaisen Ristin Veripalvelun validointiohjeita, LP-YO-011 Tutkimusmenetelmien validointi ja LP-YO-023 Kvalitatiivisten tutkimusmenetelmien validointi ja reagenssien toimivuuden tarkastus.

7.1 Validoinnin suunnittelu ja parametrien valinta

Tässä työssä validoinnin tarkoituksena on luoda Navios™ virtaussytometreille oikeat valkosolusopivuuskokeen asetukset, sekä määrittää negatiivisten ja positiivisten tulosten raja-arvot uusien T- ja B-solumerkkiaineiden avulla. Varsinaisena validointilaitteena käytetään LV-43016 Naviosta™ ja varalaitteena LV-43017 Naviosta™. Osa ajoista suoritetaan myös varalaitteella, jotta tulostasot voidaan määrittää yhteneviksi.

Validoinnissa käytetään Valkosoluristikoe virtaussytometrillä pernan tai veren soluilla, KT-3669, painos 11. luonnos, menetelmäohjetta. Näytematriisina käytetään verenkierron olevan (perifeerisen) veren soluja, positiivisia (IgM ja IgG) ja negatiivisia (AB) kontrolliseerumeita. Lisäksi käytetään syväjäässä olevia elinluovuttajien pernan soluja sekä pakastettuja munuaispotilaiden seerumeita. Näytteet valitaan riittävän laajalta alueelta, positiivisten tulosten raja-arvoasetusta varten. (liite 1)

Validointia varten luodaan ajopohjat ja tarkastetaan asetukset, sekä etsitään sopivat käyttölaimennokset uusille T- ja B-solumerkkiaineille ja vanhoille FITC IgM ja FIT IgG merkkiaineille. Tunnetuilla negatiivisilla näytteillä määritetään negatiivisen tuloksen raja-arvo. Lisäksi validoitavia parametreja ovat herkkyys, spesifisyys ja toistettavuus (rinnakkaisten ja sarjojen välinen), keskiarvo ja keskihajonta (liite 1).

- Keskiarvo (\bar{x}), on samaa laatua kuin mittaustulokset.
 - Aritmeettinen keskiarvo määritellään kaavalla, missä n on havaintojen lukumäärä ja x_i on i :nnes havaintoarvo:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- Keskihajonta (s), on samaa laatua kuin mittaustulokset.
 - englanniksi standard deviation (SD), määritellään kaavalla:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

- Toistettavuus määritetään suhteellisella keskihajonnalla (RSD) tai variaatiokerrotoimella (CV).
 - Suhteellinen keskihajonta RSD (engl. relative standard deviation) on laaduton luku, jota käytetään silloin kun vertailtavien ryhmien keskiarvot ovat eri suurusluokkaa. Suhteellisesta keskihajonnasta voidaan käyttää myös variaatiokerroin nimitystä (engl. coefficient of variation, CV)
 - RSD määrittelyyn tarvitaan keskiarvo- ja keskihajontatuloksia.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}, \quad RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

- Herkkyys eli sensitiivisyys viittaa testin kykyä tunnistaa oikeat positiiviset (P) tulokset. Herkkyys lasketaan kaavalla:

$$\text{Herkkyys (P) \%} = \frac{\text{oikea positiivinen}}{\text{oikea positiivinen} + \text{väärä negatiivinen}} \times 100$$

(LP-YO-023. 3.)

- Tarkkuus eli spesifisyys viittaa testin kykyä tunnistaa oikeat negatiiviset (N) tulokset. Tarkkuus lasketaan kaavalla:

$$\text{Tarkkuus (N) \%} = \frac{\text{oikea negatiivinen}}{\text{oikea negatiivinen} + \text{väärä positiivinen}} \times 100$$

(LP-YO-023. 3.)

Hyväksymiskriteereinä tulosten pitää olla vähintään yhtä hyviä, kuin vanhalla menetelmällä saadut tulokset. Positiivisen tuloksen raja-arvo määritetään vastainenegatiivisilla seerumeilla siten, että negatiivisille näytteille tulee mahdollisimman vähän vääriä positiivisia tuloksia. Tavoitteena saavuttaa vähintään 75% herkkyys (sensiivisyys) ja tarkkuus (spesifisyys) käytössä olevaan menetelmään verrattuna. Tulokset

ten täytyy olla myös toistettavia. Negatiiviselle kontrollille hyväksymiskriteerinä maksimissaan 20 % eroavuus rinnakkaisten RSD tuloksessa. (liite 1)

Validointiin liittyvä muutoshallinta toteutetaan siten, että nykyinen menetelmäohje päivitetään Navios virtausytometrillä ja uusien reagenssien sekä mahdollisten työtapamuutosten suhteen, ennen menetelmän käyttöönottoa. Lisäksi menetelmän käyttöönotto rutiiniin vaatii vähintään kahden työntekijän hyväksytyä perehdytys ko. menetelmään.

7.2 Laatu- ja validointiaineisto

Jokaiseen sarjaan sisällytetään positiiviset ja negatiiviset kontrollit ja niiden pitää erottua selvästi toisistaan.

Negatiivisina kontrolleina toimivat kaupallinen AB-seerumipooli (AB sera male HUT) sekä itse valmistettu AB pooli (AB yhdistetyt seerumit). Seerumit ovat AB-veriryhmää olevista miehistä kerättyä seerumia. Tärkeää, että seerumin luovuttajat eivät ole immunisoituneita. Naisilla voi olla immunisoitumista, mm. raskauksien takia.

- Kaupallinen negatiivinen AB-seerumipooli. AB sera male, Quest Biomedical, erä HUT 5005.
- Oma AB kontrolli on tehty yhdistämällä neljän AB negatiivisen miesverenluovuttajan plasmayksiköt. Kontrolli on vasta testausvaiheessa ja tämän validoinnin yhteydessä testataan kontrollin käyttökelpoisuutta tähän menetelmään, tulevaa käyttöä ajatellen.

IgG ja IgM-positiiviset kontrollit ovat monispesifisiä (multispesifisiä) HLA-vasta-aineita omaavien potilaiden näytteistä yhdistetty (poolattu) seerumi.

- IgG multispesifisiä HLA-vasta-aineita omaavien potilaiden näytteistä yhdistetty seerumi.
- IgM-luokan HLA-vasta-aineita omaavien potilaiden näytteistä yhdistetty seerumi.

Näytteinä käytetään perifeerisen veren soluja, -70 °C syväjäässä säilytettyjä, 10 eri elinluovuttajan pernan soluja sekä -20 °C pakastettuja, 10 eri munuaispotilaiden see-

ruminäytteitä. Jokaisesta potilaasta on kolme seurantaseerumia, eli yhteensä tutkitaan 30 eri seeruminäytettä. Seerumit valitaan siten, että mukana on negatiivisia sekä heikosti ja vahvasti positiivisia näytteitä. Validoinnissa valitaan tuoreita näytteitä, sillä pitkäaikainen säilytys pakkasessa saattaa vaikuttaa epäedullisesti pernan soluihin. Pernan solut ovat hyvin erilaisia, riippuen elinluovuttajan tilasta, saaduista ylläpitohoidoista ennen elinten irrotusta ja pernan tuoreudesta. Näytteet käsitellään anonyymeinä, potilaan tunnistuksen välttämiseksi. Näytteet numeroidaan juoksevilla numeroinnilla. Yhdessä sarjassa testataan näytteitä sekä pernan, että veren soluilla.

7.3 Validointinäytteiden analysointi

Validoinnissa noudatettiin KT-3669, painos 11. luonnos Valkosoluristikoe virtausytometrillä pernan tai veren soluilla -menetelmäohjetta. Aiempaan vastaavaan menetelmäohjeeseen, painos 10. verrattuna, T- ja B-solumerkkiaineet vaihtuivat CD 3-APC ja CD 19-PC7 merkkiaineiksi. Kaikki merkkiaineet lisättiin yhtenä seoksena ja inkubointiaikaa muutettiin 15 minuutista 30 minuuttiin. Lisäksi loppuun lisättiin yksi pesu lisää, jolloin analyysia haittaavat sitoutumattomat merkkiaineet saatiin poistettua.

Näytteiden käsittely tiivistettynä:

Suoritus pernan soluilla:

- 1 Seerumit sentrifugoidaan.
- 2 Pakastetut pernan solut sulatetaan nopeasti ja tehdään solususpensio.
- 3 Pipetoidaan solususpensiota koeputkiin.
- 4 Pestään solut ja poistetaan supernatantti.
- 5 Pipetoidaan kontrolleja ja näytteitä koeputkiin. Inkuboidaan.
- 6 Toistetaan pesu kaksi kertaa.
- 7 Lisätään merkkiaineet putkiin inkuboidaan.
- 8 Pesut kaksi kertaa.
- 9 Soluputket valmiina mittaukseen.

Punasolujen hajotus tehdään ensin ja sen jälkeen suoritus veren soluilla kuten pernan soluilla.

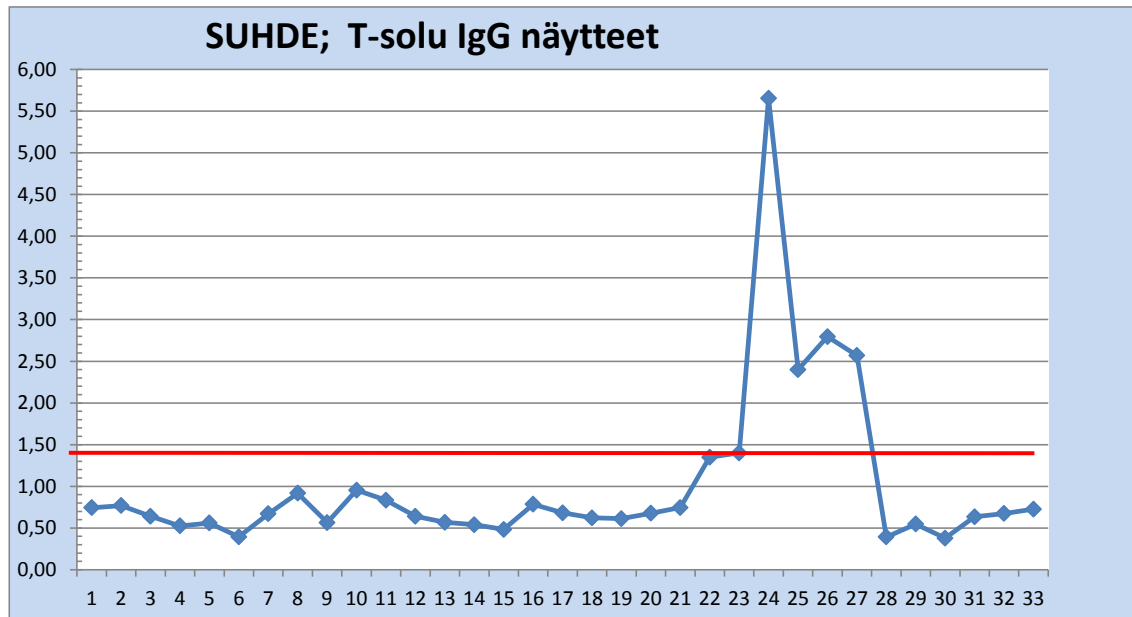
Näytteet ajettiin Navios™ -virtaussytometrillä samana päivänä, kun näytteet oli valmistettu. Ajo aloitettiin AB kontrollinäytteillä, joiden perusteella tehtiin tarvittavia muutoksia ajopohjaan. Muutokset olivat lähinnä rajausten muuttamisia, sillä eri pernan soluissa on eroja. Menetelmä ei ole HLA spesifinen, joka tarkoittaa sitä, että solupilvissä saattaa näkyä ei spesifistä sitoutumista epämääräisinä pilvinä tai aiheuttaa ylimääräistä hajontaa tuloksissa. Poikkeavissa tapauksissa lopullisen päätöksen ja tuloksen tulkinnan teki asiantuntija, joka suhteutti ne potilaan taustatietoihin. Näytteiden ajaminen ajoittui kuudelle päivälle.

8 Tulokset

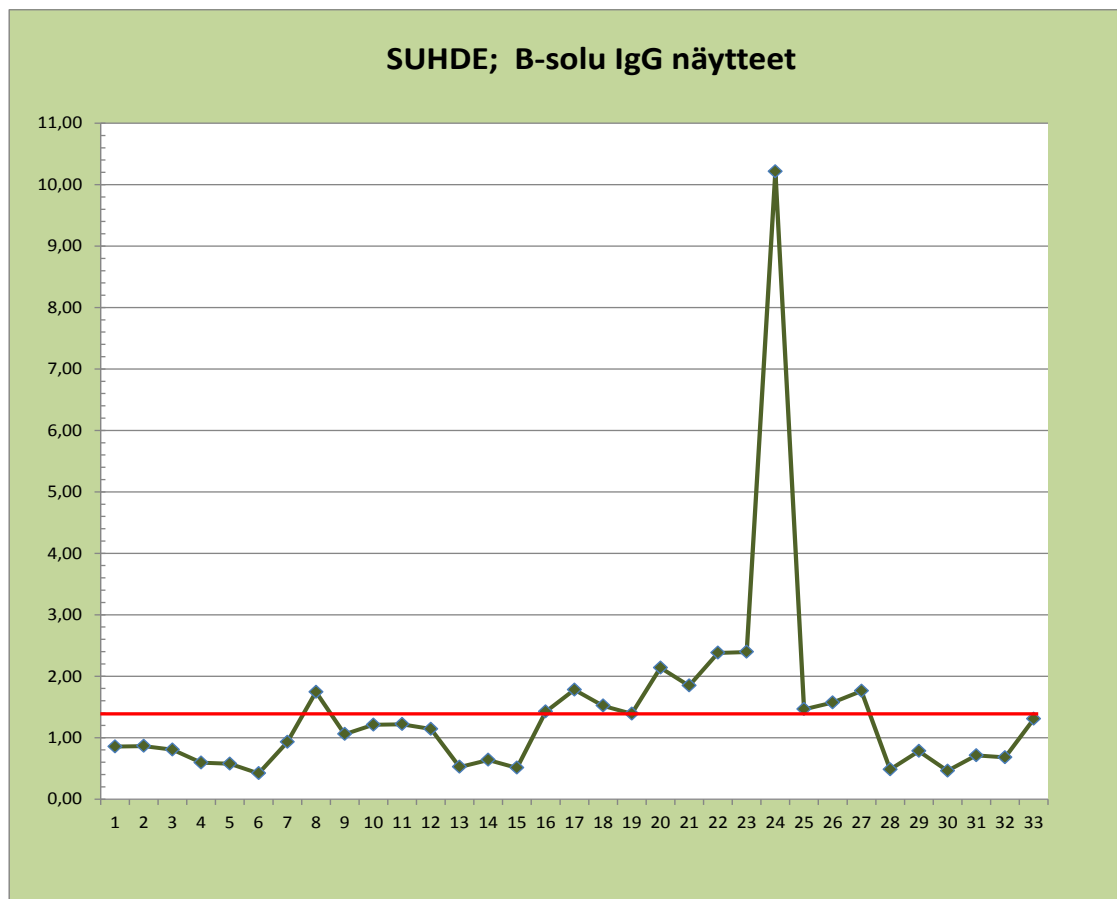
Työn tarkoituksena oli luoda oikeat valkosolusopivuuskokeen asetukset Navios™ virtaussytometrille sekä määrittää oikea positiivisten tulosten raja-arvo, käyttäen uusia – T- ja B-solumerkkiaineita. Tarkoitus oli osoittaa uuden menetelmän toimivuus ja soveltuvuus käyttöön. Tulosten tulee olla yhteneväiset käytössä olevan FACScan™ tulosten kanssa. Tulokset käsiteltiin Microsoft Excel 2010 taulukkolaskentaohjelmalla (versio 14.0.6106.5005).

8.1 Validointitulosten tarkastelu

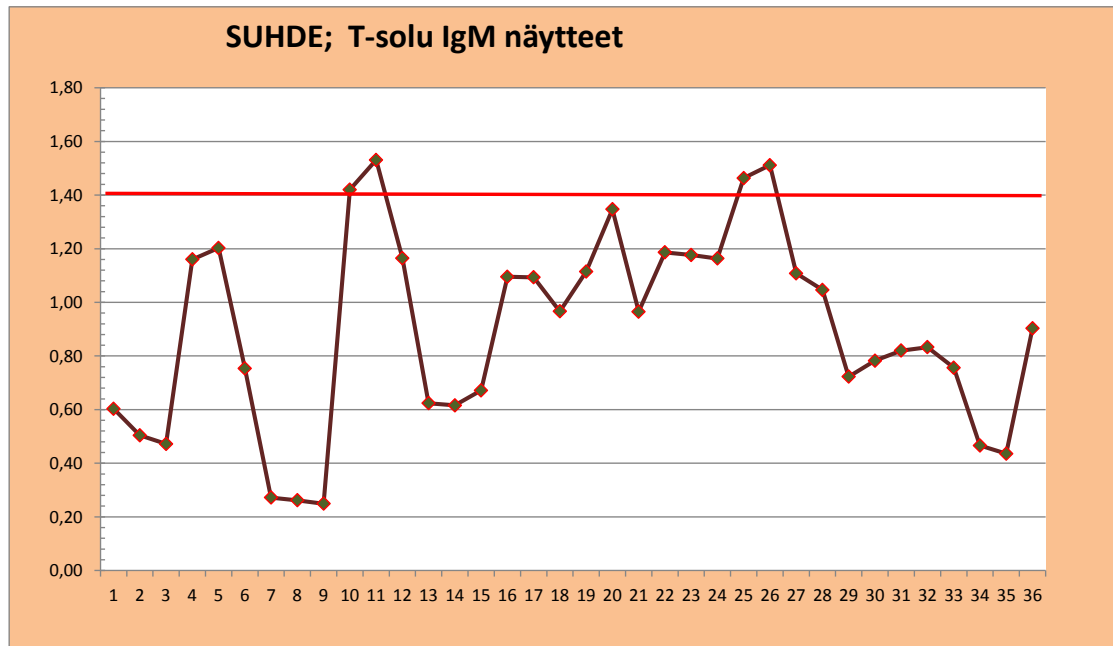
Kaikki näytteet ajettiin rinnakkaisina. Tulokset syötettiin Excel-taulukkoon, jossa laskettiin rinnakkaistulosten keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta sekä suhde negatiiviseen AB seerumiin. Pystytyksen yhteydessä, suhdeluvun avulla luotiin positiivinen raja-arvo menetelmälle. Saatujen valikointitulosten perusteella, asetettu raja-arvo näytti olevan oikein asetettu (Kuviot 10-12). Menetelmä on kvalitatiivinen, siksi tuloksia tarkasteltiin suhdelukuina, kun verrattiin Navioksen™ tuloksia FACScan™ tuloksiin ja tarkasteltiin neg/pos yhtenevyyttä. Positiiviset tulokset pysyivät pääsääntöisesti positiivisina aiempaan verrattuna. Mitä suurempi kanavatulos oli saatu FACScanilla™, saatiin myös Navioksella™ suurempi X-median tulos muihin tuloksiin verrattuna.



Kuvio 10. T IgG näytteiden tulokset, jossa punaisella on merkitty positiivisuuden raja-arvo 1,4.



Kuvio 11. B IgG näytteiden tulokset, jossa punaisella on merkitty positiivisuuden raja-arvo 1,4.



Kuvio 12. T IgM näytteiden tulokset, jossa punaisella on merkitty positiivisuuden raja-arvo 1,4.

Sarjojen välinen toistotarkkuus määritettiin tarkastelemalla suhteellista keskihajontaa (RSD), joka saatiin laskettua jokaiseen sarjaan kuuluvien kontrollien tulosten avulla. Hyväksymiskriteeriksi negatiiviselle kontrollille annettiin 20 % eroavuus rinnakkaisten X-median arvossa.

RSD %	T IgG	B IgG	T IgM
AB HUT	6,6	6,3	5,0
POS (IgG / IgM)	8,3	7,0	10,5
Oma AB	4,5	14,1	5,9

Lisäksi laskettiin 33 rinnakkain määritetyille näytteelle sarjojen välinen toistuvuus erillisen kaavan avulla, T IgG 16,7 %, B IgG 11,2 % ja T IgM 8,3 % (liite 2).

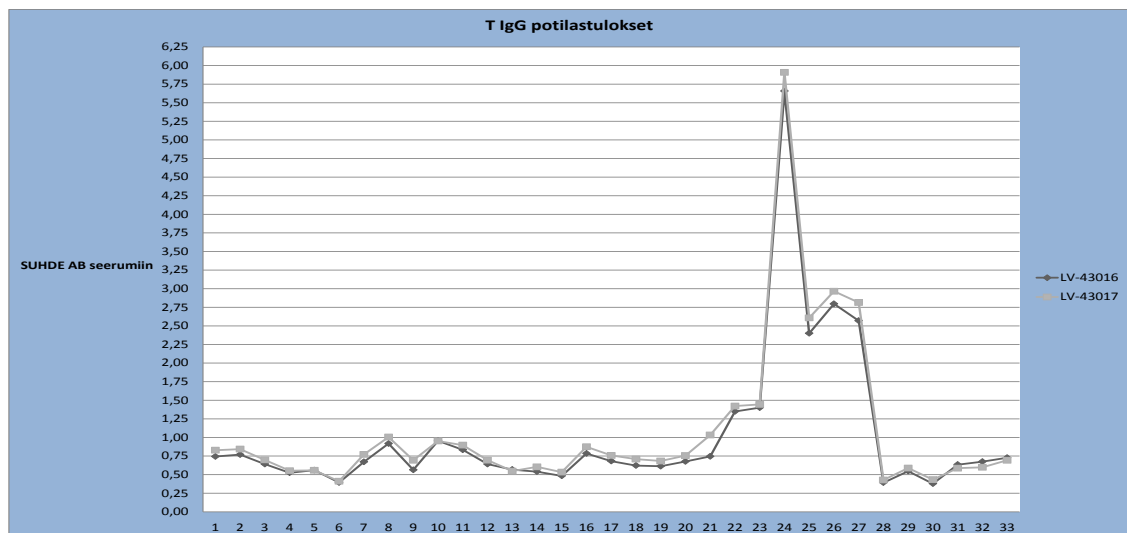
Tulosten herkkyys eli sensitiivisyys, sekä tarkkuus eli spesifisyys, saatiin vertaamalla Navioksella saatuja tuloksia aiempiin FACScanin tuloksiin. T-solu IgG:n sensitiivisyydeksi saatiin 83 % ja spesifisyydeksi 100 %. B-solu IgG:n sensitiivisyydeksi saatiin 91 % ja spesifisyydeksi 86 %. T-solu IgM:n spesifisyydeksi tuli 100 % ja sensitiivisyydeksi 67 % (kuvio 10). T-solu IgM:n sensitiivisyys jäi alle tavoitteesta, tämä johtuu siitä, että verokkimenetelmän positiiviset tulokset olivat raja-arvoisia. Myös uudella menetelmällä

tulokset jäivät negatiivisiksi, vaikka olivat negatiivista AB-kontrollia positiivisempia (kuvio 13).

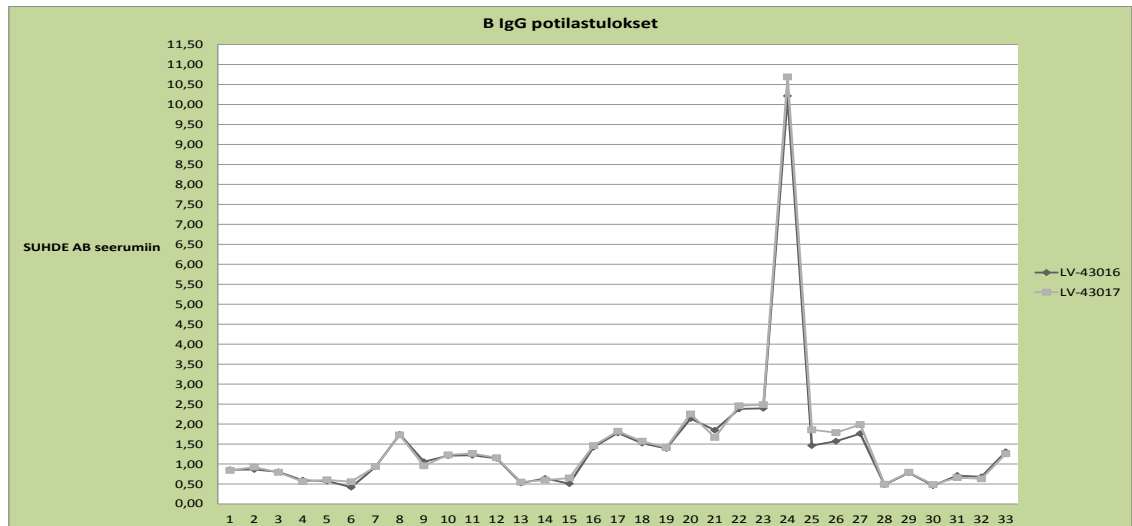
Sensiitivisyys: Oikeat positiiviset/(oikeat positiiviset+väärät negatiiviset)							
Spesifisyys: Oikeat negatiiviset/(oikeat negatiiviset+väärät positiiviset)							
oikeat positiiviset	väärät positiiviset	väärät negatiiviset	oikeat negatiiviset	sensiitivisyys	spesifisyys	sensiitivisyys prosenttina	spesifisyys prosenttina
T-IgG 5	0	1	27	0,833333333	1	83,3	100,0
T-IgM 2	0	1	28	0,666666667	1	66,7	100,0
B-IgG 10	3	1	19	0,909090909	0,863636364	90,9	86,4

Kuvio 13. BC Navios™ (LV-43016) validointitulosten herkkyys (sensiitivisyys) ja tarkkuus (spesifisyys) tulokset.

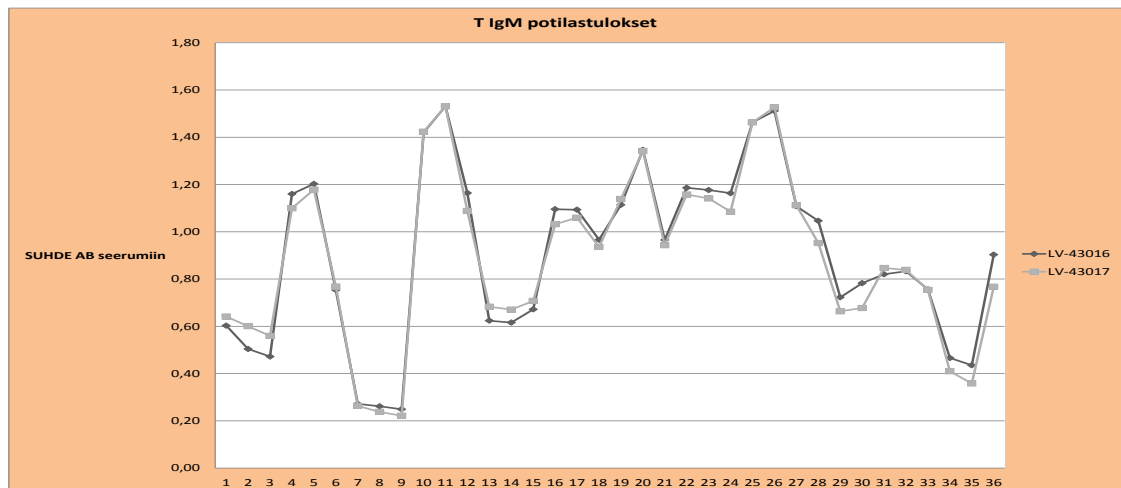
Validointinäytteet määritettiin molemmilla Navios™ laitteilla. Varalaitteella (LV-43017) saatu tulostasoa vastaa varsinaisella laitteella (LV-43016) saatuja tuloksia, joten positiivisuuden raja-arvo on riittävä myös varalaitteelle (kuviot 14-16).



Kuvio 14. T IgG validointitulokset molemmilta BC Navios virtausytometreilta.

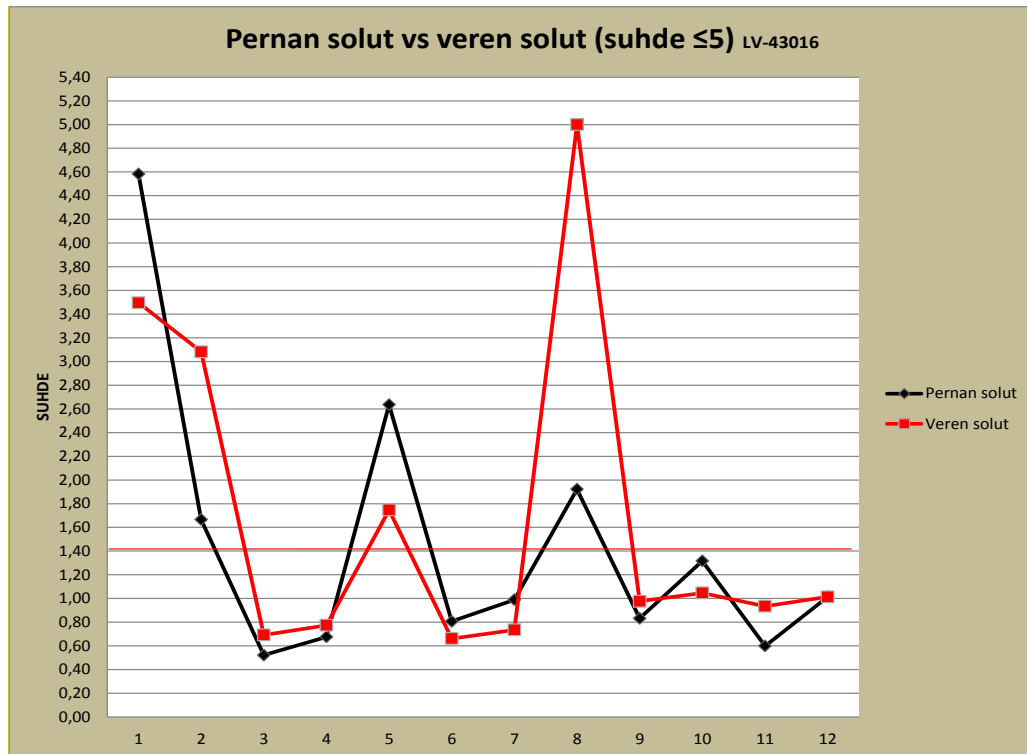


Kuvio 15. B IgG validointitulokset molemmilta BC Navios virtausytometreilta.



Kuvio 16. T IgM validointitulokset molemmilta BC Navios virtausytometreilta.

Yhdessä sarjassa ajettiin näytteitä sekä veren soluilla, että pernan soluilla. Verensoluja varten oli luotu oma ajopohja, joka oli säädetty negatiivisen AB kontrollin osalta vastaamaan pernan soluilla saatua tulostasoa. Raja-arvona käytettiin samaa lukua kuin pernan soluilla. Eroavuutta oli jonkin verran, joka johtuu näytematriisin eroavuudesta. Lopulliset tulokset kuitenkin vastasivat pernan soluilla saatuja tuloksia (kuvio 17).



Kuvio 17. Eri näyttematriisien (pernan solut vs veren solut) tulokset. Suhde ≤ 5 .

8.2 Yhteenveto ja johtopäätökset

Positiivisuuden raja-arvon 1,4 asettaminen osoittautui validointitulosten perusteella oikeaksi. Validoinnissa saatujen tulosten herkkyys (sensitiivisyys) ja tarkkuus (spesifiisyys) oli asetettujen tavoitteiden mukaiset. Ainoastaan T-solu IgM:n herkkyys jäi tavoitteen (75 %) alapuolelle. Tämä johtuu verrokkimenetelmän raja-arvoisista tuloksista. Alentuneen T IgM sensitiivisyyden merkitys on vähäinen, koska ainoastaan IgG-luokan vasta-aineilla on kliinistä merkitystä. Positiivinen T-solu IgM sopivuuskokeen tulos ennustaa sitä, että IgM-luokan vasta-aineet voivat muuttua ajan kuluessa IgG-luokan vasta-aineiksi. Tulos on vain suuntaa antava, sillä IgM-luokan vasta-aineiden spesifiteetin määrittämiseksi ei ole luotettavaa menetelmää.

Veren soluilla saadut tulokset vastasivat pernan soluilla saatuja tuloksia negatiivisuuden ja positiivisuuden osalta. Näyttematriisien välillä oli arvojen heittelyä, joka johtuu näyttematriisin erosta. Veren soluilla ajettaessa, käytetään eri ajopohjaa. Raja-arvo on sama, kuin pernan soluilla ajettaessa.

Rinnakkaistulosten toistettavuutta arvioitiin X-medianin suhteellisella keskihajonnalla (RSD). Hyväksymiskriteerinä käytettiin enintään 20 % eroavuutta rinnakkaisten X-median arvossa, joka oli sama kuin negatiiviselle kontrollille annettu hyväksymiskriteeri. Mikäli RSD oli suurempi kuin 20 %, tulos hyväksyttiin, jos molemmat tulokset olivat joko negatiivisia tai positiivisia. Sarjojen välinen toistettavuus vaihteli potilasnäytteiden osalta 8,3-16,8 % ja kontrollien osalta 6,3-13,4 %.

Tulokset olivat toistettavia molemmilla Navios™ -laitteilla. Siten menetelmä soveltuu käytettäväksi molemmilla laitteilla samalla raja-arvolla. Sarjan sisäinen toistettavuus testattiin yhden sarjan osalta, joka toistettiin. Saadut tulokset vastasivat alkuperäisiä tuloksia.

Johtopäätöksenä valkosolujen sopivuuskoemenetelmä täyttää validoinnissa sille asetetut vaatimukset ja tekniset hyväksymiskriteerit ja se voidaan hyväksyä käyttöön.

Vastaukset tutkimuskysymyksiin tiivistäen:

1. Löytyvätkö oikeat asetukset Naviokselle™, jotta saadaan määritettyä negatiivisten ja positiivisten tulosten raja-arvot, oikeiden tulosten määrittämiseksi halutusta solupopulaatiosta?
 - ✓ Siirryttäessä logaritmiseen Dot Plot -taulukkoon, saatiin solupopulaatiot tiiviimpään muotoon ja haluttujen T- ja B- lymfosyyttisolujen sijainti saatiin rajattua näytematriisista. Voltteja säätämällä saatiin haluttu solupilvi sijoitettua optimaalisesti histogrammitaulukkoon. Lisäksi FITC IgG ja IgM merkkiaineiden pitoisuudet analysoitiin laimennossarjojen avulla ja valittiin matalin pitoisuus, jolla riittävä erotuskyky saavutettiin.
 - ✓ Asetusten säätämisen jälkeen ajettiin tunnettuja negatiivisia ja positiivisia näytteitä. Tulosten perusteella löydettiin positiivisuuden raja-arvoksi 1,4 x negatiivisen AB kontrollin tulos.
2. Vastaavatko virtausytometrien tulokset toisiaan?
 - ✓ BC Navioksella saatujen tulosten herkkyyden ja tarkkuuden perusteella voidaan todeta tulosten vastaavan alkuperäisiä FACScanilla saatuja tuloksia. Asetetut tavoitteet saavutettiin.

Tämän työn suorituksen aikana havaittiin, että uudet solumerkkiaineet (T-solumerkkiaine CD3-APC ja B-solumerkkiaine CD19-PC7) mahdollistavat eri solupopulaatioiden (T- ja B-leukosyytit) määrytykset samasta koeputkesta. Ne valittiin siten, että merkkiaineet eivät fluoresoi samoilla aallonpituuksilla, näin välttyttiin kompensatiomäärytyksiltä. Asetusten tarkistus (kompensatio) tehdään yleensä aina laitteen isompien huoltojen jälkeen, mikäli menetelmän merkkiaineet fluoresoivat osittain samoilla aallonpituuksilla. Näytteiden käsittely tehtiin suunnitellulla tavalla ja määrytykset onnistuivat odotetulla tavalla. Ajopohja saatiin luotua siten, että samanaikaisesti voitiin määrittää sekä T-solu IgG- että B-solu IgG parametrit.

9 Tulosten luotettavuus

Tuloksia voidaan arvioida reliabiliteetilla eli menetelmän kyvyllä saavuttaa tarkoitettuja tuloksia. Tässä opinnäytetyössä käsittelen reliabiliteettia tarkastelemalla tulosten herkkyyttä sekä tarkkuutta. Opinnäytetyö on kvalitatiivinen, siksi herkkyyttä ja tarkkuutta tarkasteltiin Beckman Coulter Navioksen™ tulosten ja Becton Dickinson FACScan™ tulosten neg/pos yhtenevyydellä. Positiiviset tulokset pysyivät pääsääntöisesti positiivisina aiempaan verrattuna. Lisäksi näytteiden rinnakkaismäärytykset sekä sarjojen välinen toistettavuus pysyi annettujen rajojen sisällä. Näytematriisina oli biologinen materiaali, jotka ovat useilta eri potilailta ja elinluovuttajilta. Elinluovuttajan (donorin) pernan soluihin vaikuttaa donorin aivokuolemaan johtanut tila, sekä hoidot ennen elimen irrottamista. Vastaavasti saajien perussairaudet ja hoidot vaikuttavat heidän immuunijärjestelmän aktiivisuuteen ja vasta-aineiden tuotantoon. Näytteiden käsittelyssä pyrin samankaltaiseen toimintatapaan joka näytteen kohdalla, parantaakseni työn luotettavuutta. Suoritin itse kaikki tähän opinnäytetyöhön liittyvät mittaukset, sillä osin opinnäytetyö ei ole täysin reaabeli. Kokonaisuuden perusteella, tulokset ovat varsin reliabelit. (Vilka 2007: 177.)

Toinen tapa arvioida opinnäytetyön luotettavuutta on validiteetti. Validiteetti tutkimusmenetelmä selvittää sitä, mitä sillä on tarkoitus selvittää. Toisin sanoen opinnäytetyö on validi, kun saadut mittaustulokset tukevat vallalla olevaa teoriaa eikä siihen sisälly systemaattista virhettä. Menetelmävertailun avulla voidaan todeta, että valkosolusopi-

vuuskoemääritystä BC Navios™ -virtaussytometrilla voidaan käyttää suunniteltuun käyttötarkoitukseen. Menetelmän oikeellisuutta arvioidaan myös ulkoisen laadunarvioinnin avulla. Mitään systemaattista virhettä ei havaittu kummankaan Navioksen™ kohdalla. Opinnäytetyön validiteetti on hyvä. (Vilkkä 2007: 179.)

Navios™ -virtaussytometrien toimintakunto tarkastettiin päivittäin laitevalmistajan suositusten mukaisesti. Tulokset dokumentoitiin ja kirjattiin virallisiin huoltodokumentteihin, jotka säilytetään SPR Veripalvelun ohjeistuksen mukaisesti.

Näytteiden käsittelyssä noudatin tarkasti menetelmäohjeluonnoksessa annettuja aikoja ja lämpötiloja. Fluoresoivien merkkiaineiden suojaaminen valolta, varmistaa niiden toimimisen analyysikelpoisina annettujen kelpoisuusaikojen ajan. Näytteiden seisottaminen jäähauteella ennen määritystä, usean tunnin ajan, vaikutti erotuskykyyn. Siksi pyrittiin mahdollisimman samankaltaisiin toimintatapoihin validoinnin aikana. Pipetointivaihe vaati huolellisuutta ja kokemusta, sekä suositusten mukaisesti kalibroituja pipettejä, luotettavien tulosten saamiseksi. Joka mittausarjassa oli mukana negatiivinen ja positiivinen kontrolli, joilla arvioitiin myös menetelmän luotettavuutta.

Tulokset siirsin Excel-taulukoihin manuaalisesti lähes reaaliaikaisesti. Tulosten siirtämisessä piti olla huolellinen ja tarkka. Loin itse taulukkomallit ja tarvittavat laskentakavat. Primaaritulokset keräsin järjestelmällisesti selkeästi merkittyihin kansioihin, päivämäärän mukaisessa järjestyksessä. Validointituloksille on omat kansiot.

Kokonaisuutena opinnäytetyö on reaabeli ja validi. Käyttööntovaiheeseen liittyvien useiden näytteiden käsittelyjen sekä mittausten jälkeen, pystyin minimoimaan virhelähteet varsinaisten validointianalyysien aikana. Tulokset olivat odotetun kaltaisia ja menetelmä voitiin ottaa rutiinikäyttöön. Lisäksi validointi antoi vastaukset asetettuihin tutkimuskysymyksiin.

10 Pohdinta

Työn tavoitteena oli pystyttää valkosolusopivuuskoemenetelmä Beckman Coulterin Navios virtaussytometrille ja validoida se käyttöön. Vastaava menetelmä on ollut käytössä

SPR Veripalvelun potilaslaboratoriossa useita vuosia Becton Dickinsonin FACScan virtausytometrillä. Uuden BC Navios laitteen myötä, tarkoituksena oli ottaa myös uudet T- ja B -lymfosyyttien solumerkkiaineet (CD3 (T-solu) ja CD-19 (B-solu) -fluoresoivat merkkiaineet) käyttöön, joiden oletettiin tuovan helpotusta käytännön suoritukseen. Menetelmää hyödynnetään mm. munuaisensiirron jälkeisessä hoidossa, jos siirretty munuainen ei käynnisty normaalilla tavalla tai epäillään hyljintää.

Beckman Coulter Navios™ -virtausytometrissa on kolme laservaloa, jotka mahdollistavat jopa 10 erilaisen leiman käyttämisen fluoresenssimittauksissa samanaikaisesti. Lisäksi mitataan suora- ja sivusirontaa. Näiden avulla havainnoitavat partikkelit tunnustetaan tarkasti. Näiden ominaisuuksien perusteella, suunniteltujen leimojen käyttöönotto toimi odotetulla tavalla. Samasta IgG -näyteputkesta voidaan määrittää sekä T- että B-solut. Merkkiaineet fluoresoivat selkeästi eri aallonpituutta, jolloin päällekkäisyyttä ei synny eikä tarvita erillistä asetusten säätämistä eli kompensatiota. Lisäksi merkkiaineiden lisääminen samaan näyteputkeen, vähentää näyteputkien lukumäärää ja helpottaa näytteiden esivalmistelua.

Optimaalisten ajoasetusten löytäminen oli haastavaa. Aluksi valittiin lineaarinen DotPlot- taulukkonäkymä, mikä oli käytössä myös BD FACScanilla. Navioksella vastaava taulukkomuoto, hajoitti solupilven hajanaiselle alueelle. Halutut T- ja B-solupopulaatiot oli vaikea löytää kokonaistapahtumasta. Testausvaiheessa kokeiltiin myös logaritmisia taulukkomallia, joka osoittautui informatiivisemmaksi. Solupilvi tiivistyi ja halutut T- ja B-solupopulaatiot saatiin rajattua. Ajoasetusten tarkentamiseksi merkkiaineet laimennettiin eri pitoisuuksiin, joilla löydettiin T- ja B-solupilvien riittävät erotuskyvyt. Voltteja säätämällä saatiin histogrammit sijoittumaan mahdollisimman lähelle nollatasoa eli histogrammitaulukon vasenta laitaa.

Ajoasetusten vakiinnuttua, ajettiin tunnettuja negatiivisia ja joitain positiivisia näytteitä ja määritettiin positiivisuuden raja-arvoa. Näytematriisista huolimatta, tulokset olivat välillä hyviä ja välillä tulokset heittelivät varsin paljonkin. Seurattavaksi parametriksi oli valittu X-mean eli koko T- ja B-solupopulaation keskiarvo. Rinnakkaisten eroavuus oli liian suurta, siksi päädyttiin ottamaan toinen parametri seurattavaksi. Valittiin X-median, eli tulos ilmaisee asteikon kohdan, jossa on tyypillisesti eniten T- tai B-soluja.

Rinnakkaisten tarkkuus parani sekä toistettavuus parani selkeästi, joten X-median valittiin seurattavaksi parametriksi.

Pystytysvaiheessa asetettu positiivisuuden raja-arvo (1,4 x negatiivinen kontrolli) osoitautui validoinnin aikana oikeaksi. Asetettujen hyväksymiskriteerien ja tavoitteiden avulla, validoinnissa saadut tulokset herkkyys (sensitiivisyys) ja tarkkuus (spesifisyys) oli asetettujen tavoitteiden mukaiset. Tulokset vastasivat käytössä olevalla menetelmällä saatuja alkuperäisiä tuloksia ja menetelmä otettiin käyttöön SPR Veripalvelun potilaslaboratoriossa.

Ajoasetusten saaminen optimaaliseksi vei oletettua enemmän aikaa. Näytteiden käsitteleminen oli varsin työlästä, eikä yhden päivän aikana pystynyt ajamaan montaa näytettä. Käytin työaikaani varsinaisten määritysten suorittamiseen, kirjoitustyö tapahtui omalla ajalla. Navioksilla™ validoitiin samanaikaisesti useita muita menetelmiä, joten laitteiden käyttöaika oli hankalasti saatavilla. Näiden takia, työn käytännön suorittaminen venyi useisiin kuukausiin.

Osallistuin validointisuunnitelman ja validointiraportin kirjoittamiseen, sekä menetelmäohjeen kirjoittamiseen yhdessä asiantuntija Juha Peräsaaren kanssa. Menetelmäohjeesta luotiin uusi painosversio, joka vastasi Naviokselle™ käyttöönotettavaa menetelmää. Nämä liittyvät olennaisesti tähän opinnäytetyöhön ja vastaavat innovaatio-osuutta tässä opinnäytetyössäni.

Tämä opinnäytetyön aihe oli erittäin mielenkiintoinen ja haastava. Virtaussatometrinen menetelmä oli minulle entuudestaan vieras, joten menetelmä ja laite tulivat erittäin tutuksi opinnäytetyön aikana. Asetusten löytäminen ja ajopohjien luominen tapahtui alusta asti pääasiassa yhdessä asiantuntija Juha Peräsaaren kanssa. Jonkin verran saimme apua Navioksen periaatteisiin koulutetuilta asiantuntijoilta Veripalvelussa sekä laite-edustajalta. Tämä opinnäytetyö oli hyödyllinen Veripalvelulle, jonka avulla saatiin menetelmä rutiinikäyttöön.

Omalta osaltani opinnäytetyön valmiiksi saattaminen kesti paljon suunniteltua kauemmin. Motivaationi laski sen jälkeen, kun käytännön suorittaminen viivästyi merkittävästi. Yhteistyö eri tahojen kanssa on ollut luontevaa. Erityisesti yhteistyö asiantuntija Ju-

ha Peräsaaren kanssa oli luontevaa ja vuorovaikutteista. Ongelmana oli Navios laitteiden asennus käyttökuntoon ja sen jälkeen aikataulutukset eri käyttäjille. Vapaan ajan löytäminen oli haasteellista. Opinnäytetyöprosessi on kehittänyt kokonaiskuvaa menetelmän käyttöönottamiseen ja sen validointiin. Toivonkin tulevaisuudessa olevani osa jostain uutta menetelmän käyttöönottoprosessia ja validointia.

Menetelmä on tällä hetkellä osa Core-toimintoa. Core-toiminto tarkoittaa käytännössä sitä, että näytemateriaali valmistellaan potilaslaboratoriossa ja mitataan Navios™ -virtaussytometreilla laadunvalvontalaboratoriossa, joka käytännössä huolehtii virtaussytometrien käytöistä ja huolloista. Ajatuksena Core-toiminnossa on laitteiden syvemmän osaamisen takaaminen pienemmän henkilöstön kesken, sekä päivittäisen käyttökapasiteetin maksimoiminen sujuvalla työsuunnittelulla. Kehitysnäkymänä voisi miettiä menetelmän käyttöönoton laajentamista elimen saajien seurantahoidoissa, tai kohonneen hyljintäriskipotilaiden osalta jo ennen elinsiirtoa. Olisiko saatavalla informaatiolla ennustettavuutta mahdollisten hyljintöjen synnyssä?

Lähteet

- Baeten, Dominique – Louis, Stephen – Braud, Christophe – Braudeau, Cécile – Ballet, Caroline – Moizant, Frédéric – Pallier, Annaik – Giral, magali – Brouard, Sophie – Soullilou, Jean-Paul. 2006. Phenotypically and Functionally Distinct CD8⁺ Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free Tolerance and Chronic Rejection in Human Kidney Graft Recipients. *Journal of the American Society of nephrology* 17. 294-304.
- BD Biosciences. Optical Measurements. Support Training, Internet course. Verkkodokumentti. < http://www.bd.com/videos/bdb/training/itf/optical_measurements/player.html>. Luettu 6.6.2012. Digilupa 24.11.2013.
- Elinsiirrot 2011. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki. Verkkodokumentti. <<http://veripalvelu.fi/www/2864>>. Luettu 21.1.2012.
- Hawley, Teresa S. – Hawley, Robert G. (edit) 2004. *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology. Second edition.* Humana Press Inc. 1-32. Digilupa 24.11.2013.
- Heikkilä, Ritva. 2008. Biologisten menetelmien validointi. Mittatekniikan keskus. Verkkodokumentti. < http://www.mikes.fi/documents/upload/finaspaiva2008_heikkila.pdf>. Luettu 6.6.2012.
- Helanterä, Ilkka – Kyllönen, Lauri – Salmela, Kaija – Koskinen, Petri 2011. Suomalainen munuaisensiirtopotilas. *Suomen Lääkärilehti* 16-17/2011. 1371–1377.
- Holcomb, Joan E. – Lebeck, Lauralynn K. (edit) 2000. *Flow Cytometry. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Fourth edition, volume II.*
- Höckerstedt, Krister – Hermanson, Terhi 2010. Lakiehdotuksilla pyritään lisäämään elinsiirtoja. *Duodecim* 2010:126. 993–995.
- Immucor. Products: Lifecodes Donor Specific Antibody. Verkkodokumentti. <<http://www.immucor.com/en-us/Products/Pages/LIFECODES-Donor-Specific-Antibody.aspx>> Luettu 17.11.2013.
- Impola, Ulla 2012. Virtaussytometria. Power Point -esitys. SPR Veripalvelu.
- Jalanko, Hannu – Sairanen, Heikki 2011. Lasten elinsiirrot. *Suomen Lääkärilehti* 33/2011. 2321–2326.
- Joan, 2007. 77th XiaoBianTai's Medical Street. Verkkodokumentti. <http://sevensseven77.blogspot.com-/2007/08/8th-week-of-sip-flow-cytometry_23.html>. Luettu 19.11.2011. Digilupa 24.11.2013.
- Jokinen, Mirva – Määttänen, Helena. Opinnäytetyö. FACSCalibur™-virtaussytometrillä ja Sysmex XE-5000™ -soluautomaatilla määritettyjen hematopoeettisten kantasolujen määritystulosten vertailu 2010. Tampere: Tampereen ammattikorkeakoulu.

- Lalkhen, Abdul Ghaaliq – McCluskey Anthony, 2008. Clinical tests: sensitivity and specificity. Oxford Journals, volume 8, Issue 6; 221-223. Verkkodokumentti. <<http://ceaccp.oxfordjournals.org/content/8/6/221.full>> Luettu 20.1.2013.
- Leppiniemi, Jenni. Virtaussytometria. Tampereen yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://www.laborantti.net/virtaussytometria.htm>. > Luettu 22.1.2012.
- Menetelmäohje KT-3669 2010. Valkosoluristikoe virtaussytometrillä penan tai veren soluilla. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.
- Munuais- ja maksaliitto. Munuaisensiirto. Verkkodokumentti. <http://www.musili.fi/munuaispotilaan_opas/munuaispotilaan_opas/munuaisen_munuai>. Luettu 15.1.2013.
- MUSC Department Of Regenerative Medicine And Cell Biology. What is Flow Cytometry?. Verkkodokumentti. <<http://cba.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>>. Luettu 19.11.2011. Digilupa 24.11.2013.
- Navios. Beckman Coulter, Inc, 2000-2013. Verkkodokumentti. <<http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/flow-cytometry/flow-cytometers/navios/index.htm>>. Luettu 16.3.2013.
- Saari, Leena. 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus. Evira. Verkkodokumentti. <http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoritoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf>. Luettu 5.6.2012.
- Taanila, Aki. 2011. Määrällisen aineiston kerääminen. Verkkodokumentti. <<http://my.helia.fi/~taaak/t/suunnittelu.pdf>>. Luettu 29.1.2012.
- Vilka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa: Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.
- Yleisohje LP-YO-011 2008. Tutkimusmenetelmän validointi. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.
- Yleisohje LP-YO-023 2008. Kvalitatiivisten tutkimusmenetelmien validointi ja reagenssien toimivuuden tarkastus. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Valkosolusopivuuskoemenetelmän primaaritulokset raja-arvon asettamiseksi BC Navios™ virtausytometrille

Virtausytometrinen valkosolujen sopivuuskoe, T-solu IgG primaaritulokset raja-arvon asettamiseksi.

näytteen nimi		1. näytteen X-Mean	1. näytteen X-Median	2. näytteen X-Mean	2. näytteen X-Median	X-median la s X-median la s	X-Median s X-Median s	subilo X-Mean	subilo X-Median	RSD X-Mean	RSD X-Median	FACSScan Tulosheet	X-Median subiloissa X-Median (n=10)
AD	kerä	1,37	0,40	5,26	0,56	3,10	0,53	10,33	20,34	5,15	6,33		%
IgG	kerä	35,50	20,70	31,10	20,90	34,35	31,30	0,78	0,80	26,33	4,43		82,59
202011	11	3,26	0,45	1,91	0,48	2,29	0,46	0,05	0,02	0,02	0,02		11,30
D-18/2011	12	1,92	0,41	1,82	0,48	1,87	0,44	0,05	0,04	0,04	0,05		31,03
	13	2,61	0,48	2,20	0,50	2,41	0,74	0,08	0,72	1,40	10,85		48,40
	14	1,49	0,65	3,63	0,64	2,46	0,94	0,02	0,80	1,22	10,21		34,22
AD	kerä	3,71	0,77	2,79	0,73	3,25	0,75	0,02	0,02	20,02	3,20		74,40
IgG	kerä	19,80	18,20	19,50	17,40	19,70	17,80	0,57	0,40	21,18	5,20		4,58
202011	15	1,05	0,28	1,42	0,31	1,34	0,30	0,02	0,30	14,35	0,63		-7,25
D-12/2011	16	0,93	0,22	1,14	0,22	1,04	0,22	0,02	0,32	20,34	5,76		91,03
AD	kerä	10,20	0,41	9,37	0,38	10,94	0,39	0,02	0,02	53,21	6,22		36,33
IgG	kerä	40,30	20,70	36,10	19,00	38,50	19,85	1,20	0,66	17,05	17,05		58,15
D-22/2011	17	2,66	0,34	6,51	0,37	4,59	0,25	2,44	0,42	41,93	6,44		-10,60
	18	4,04	0,36	3,69	0,38	3,87	0,34	0,06	0,87	21,58	18,79		26,86
	19	0,17	0,38	16,90	0,41	13,04	0,40	5,47	1,01	4,93	6,44		87,91
D-23/2011	11	9,17	0,28	7,00	0,38	7,32	0,38	0,46	0,96	6,09	6,86		29,99
202011	12	7,63	0,37	6,13	0,41	7,36	0,36	1,65	0,81	21,58	18,79		26,86
	13	8,46	0,31	6,13	0,41	7,36	0,36	1,65	0,81	21,58	18,79		26,86
AD	kerä	1,70	0,37	1,70	0,35	1,70	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00		76,54
IgG	kerä	20,30	20,30	19,50	17,50	21,20	19,00	2,40	0,79	11,34	12,85		3,29
D-16/2011	14	1,55	0,40	1,73	0,31	1,64	0,36	0,13	0,96	7,76	17,83		34,92
	15	1,09	0,37	1,00	0,30	1,04	0,34	0,06	0,61	6,16	15,29		-11,50
	16	2,15	0,37	1,80	0,37	1,98	0,37	0,25	1,04	12,53	0,57		31,97
	17	1,19	0,41	1,33	0,37	1,26	0,39	0,10	0,74	1,09	7,26		-14,44
	18	1,44	0,28	1,64	0,29	1,54	0,28	0,14	0,91	0,79	1,50		87,91
AD	kerä	55,80	0,97	64,2	0,73	62,11	0,65	5,22	2,89	11,31	16,02		-27,89
IgG	kerä	27,80	22,80	32,20	18,00	30,00	20,30	3,96	1,34	27,99	21,16		0,11
202011	21	2,10	1,21	15,40	0,90	19,20	1,05	5,37	1,80	22,71	5,55		-20,39
D-11/2011	21	10,30	1,47	10,30	0,94	10,20	1,53	4,85	1,04	21,06	8,91		82,59
	22	10,60	0,83	10,90	0,94	10,20	1,08	1,75	0,87	21,11	14,44		40,17
	23	4,37	0,55	3,30	0,45	3,94	0,50	0,78	0,69	20,29	1,99		-1,85
AD	kerä	17,80	17,80	19,00	16,30	19,00	17,10	1,13	4,93	6,73	6,62		78,81
IgG	kerä	3,03	0,65	2,66	0,59	2,85	0,62	0,54	0,74	9,20	6,64		40,17
202011	21	3,07	0,37	2,74	0,30	2,86	0,33	0,59	0,69	21,11	14,44		-1,85
D-11/2011	21	1,94	0,42	2,59	0,43	2,37	0,43	0,46	0,69	20,29	1,99		78,81
AD	kerä	24,30	21,40	24,00	21,20	24,00	21,30	0,14	10,60	0,00	0,66		40,17
IgG	kerä	1,67	0,40	1,19	0,47	1,43	0,48	0,14	0,63	1,12	2,52		40,17
D-12/2011	17	3,11	1,03	3,28	1,01	3,20	1,02	0,02	1,42	2,39	1,39		40,17
	18	3,01	0,89	2,77	0,93	2,89	0,91	0,17	1,28	3,13	3,19		40,17
	19	1,06	0,32	1,01	0,34	1,04	0,33	0,14	0,46	0,78	3,47		40,17
AD	kerä	1,03	0,37	1,02	0,34	1,03	0,36	0,11	0,46	0,83	0,69		40,17
pool	AD	2,18	0,36	2,05	0,35	2,12	0,35	0,09	0,89	4,35	1,20		-12,37
pool	AD	1,64	0,34	1,71	0,33	1,68	0,34	0,00	0,74	2,36	1,26		5,24

Virtaussytmetrinen valkosolujen sopivuuskoe, T-solu IgM primaaritulokset raja-arvon asettamiseksi.

näytteenro		F-nro	seenimi	1. näyte X-Mean	1. näyte X-Median	2. näyte X-Mean	2. näyte X-Median	X-mean ka	s X-Mean	s X-Median	subide X-Mean	subide X-Median	RSD X-Mean	RSD X-Median	X-Median suhteessa suhteessa X-Meaniin (subide)
kontr	AB		öjono 1	1,74	0,38	1,51	0,33	1,63	0,16	0,04	1,36	2,70	19,84	2,88	49,55
D-122/2010	IgM		xtr	2,52	1,12	1,90	1,03	2,21	0,44	0,06	1,36	2,70	19,84	2,88	-75,04
160512	16	3		1,78	0,29	1,93	0,30	1,86	0,11	0,01	1,14	0,65	5,72	0,50	
kontr	AB		öjono1	4,09	0,49	5,02	0,57	4,56	0,66	0,06			14,44	10,80	
kontr	IgM			9,06	1,43	5,08	1,25	7,07	2,81	0,13	1,55	2,53	39,81	9,50	38,55
	17	7		9,31	0,55	5,71	0,53	7,51	2,55	0,01	1,65	1,02	33,90	1,97	-62,42
D-21/2011	17	4		5,30	0,70	6,33	0,62	5,82	0,73	0,05	1,28	1,25	12,52	8,12	-2,30
	11	6		4,85	0,54	3,18	0,50	4,02	1,18	0,03	0,88	0,98	29,41	5,15	10,42
180512	12	1		3,00	0,38	2,30	0,44	2,65	0,41	0,04	0,58	0,78	18,68	10,25	25,45
	13	2		6,30	0,50	2,20	0,40	4,25	2,90	0,07	0,93	0,85	68,22	15,71	-10,00
kontr	AB		öjono2	1,56	0,42	2,53	0,52	2,05	0,69	0,07			33,54	15,14	
kontr	IgM			3,74	1,80	3,42	1,89	3,58	1,85	0,23	1,75	3,95	6,32	3,45	55,89
	14	2		1,73	0,41	1,83	0,49	1,78	0,45	0,06	0,87	0,96	3,97	13,43	9,17
	18	1		2,19	0,35	1,25	0,28	1,72	0,66	0,05	0,84	0,68	38,64	15,91	-24,50
	19	1		3,16	0,63	3,87	0,67	3,52	0,50	0,03	1,72	1,39	14,28	4,46	-23,40
	19	3		2,51	0,48	3,03	0,51	2,77	0,49	0,02	1,35	1,05	13,27	4,45	-28,44
	20	1		1,72	0,32	1,88	0,37	1,80	0,34	0,03	0,88	0,73	6,29	10,12	-20,01
kontr	AB			2,84	0,74	2,55	0,63	2,70	0,21	0,08			7,61	11,45	
kontr	IgG			3,02	1,00	2,09	0,92	2,56	0,66	0,06	0,95	1,40	25,74	5,76	32,16
15.5.2012	21	47		2,24	0,36	1,83	0,38	2,04	0,29	0,01	0,76	0,54	14,25	2,48	-39,71
D-116/2011	21	48		2,91	0,49	2,23	0,33	2,57	0,41	0,11	0,95	0,60	18,71	26,98	-58,86
kontr	AB			1,45	0,49	1,51	0,48	1,48	0,49	0,04			2,87	1,89	
kontr	IgM			2,61	1,51	2,49	1,63	2,55	1,57	0,08	1,72	3,22	3,33	5,40	46,50
	17	4		1,70	0,64	1,56	0,62	1,63	0,10	0,01	1,10	1,29	6,07	1,35	14,78
D-110/2011	13	2		2,22	0,68	1,96	0,70	2,09	0,69	0,01	1,41	1,41	8,80	1,33	0,16
	14	2		2,28	0,93	2,40	0,98	2,34	0,95	0,08	1,58	1,96	3,63	3,78	19,16
120512	19	1		2,62	0,94	2,61	0,94	2,62	0,94	0,00	1,77	1,92	0,27	0,00	7,97
	19	3		1,59	0,71	1,74	0,75	1,67	0,11	0,03	1,13	1,49	6,37	3,79	24,61
AB pooli				1,18	0,38	1,01	0,37	1,10	0,12	0,01	0,74	0,77	10,98	2,44	4,45
AB pooli				1,15	0,37	1,10	0,42	1,13	0,40	0,03	0,76	0,81	3,14	7,69	6,30
ka														0,01	
ka														16,23	
ka														7,11	
ka														0,01	
ka														27,6 %	
ka														korkeampi kuin X-Mean bilos	
ka														14,57	
ka														8,71	
ka														14,57	
ka														8,71	

Kuvio 2. B-solu IgG validointinäytteiden primaaritulokset (LV-43016).

			B-solu IgG/ Navios LV-43016						B-solu IgG / FACScan				
näyttenro	F-nro	seerumi	1. näyte X-Median	2. näyte X-Median	ka	s	RSD	suhde	1. näyte	2. näyte	ka	s	
kontr	AB		1,52	1,84	1,68	0,23	13,47		332	332	332	0,00	pos raja 392
kontr	IgG pos		27,30	29,10	28,20	1,27	4,51	16,79	751	743	747	5,66	
300712	1	12115909	1,42	1,45	1,44	0,02	1,48	0,85	336		336		neg
D-68/2012	1	12133437	1,42	1,48	1,45	0,04	2,93	0,86	346		346		neg
	1	12141131	1,44	1,26	1,35	0,13	9,43	0,80	305	302	304	2,12	neg
kontr	AB		2,78	2,91	2,85	0,09	3,23		362	371	367	6,36	pos raja 427
kontr	IgG pos		45,20	40,20	42,70	3,54	8,28	15,01	803	794	799	6,36	
10812	2	12025079	1,84	1,53	1,69	0,22	13,01	0,59	393		393		neg
D-34/2012	2	12071955	1,71	1,56	1,64	0,11	6,49	0,57	388		388		neg
	2	12081928	1,19	1,19	1,19	0,00	0,00	0,42	358	361	360	2,12	neg
oma pooli	AB		2,10	2,63	2,37	0,37	15,85	0,83					
kontr	AB		1,20	1,13	1,17	0,05	4,25		335	348	342	9,19	pos raja 402
kontr	IgG pos		41,30	39,80	40,55	1,06	2,62	34,81	804	800	802	2,83	
10812	3	12049420	1,15	1,01	1,08	0,10	9,17	0,93	306		306		neg
D-27/2012	3	12059338	2,10	1,96	2,03	0,10	4,88	1,74	442		442		pos
	3	12093907	1,44	1,02	1,23	0,30	24,15	1,06	314	322	318	5,66	neg
oma pooli	AB		0,99	0,92	0,95	0,05	5,12	0,82					
kontr	AB		1,87	1,52	1,70	0,25	14,60		335	330	333	3,54	pos raja 393
kontr	IgG pos		43,60	37,10	40,35	4,60	11,39	23,81	785	768	777	12,02	
20812	4	12071173	1,94	2,16	2,05	0,16	7,59	1,21	346		346		neg
D-41/2012	4	12082278	1,99	2,14	2,07	0,11	5,14	1,22	387		387		neg
	4	12090974	1,84	2,03	1,94	0,13	6,94	1,14	358	375	367	12,02	neg
oma pooli	AB		1,34	1,48	1,41	0,10	7,02	0,83					
kontr	AB		4,09	4,05	4,07	0,03	0,69		359	346	353	9,19	pos raja 413
kontr	IgG pos		42,40	40,50	41,45	1,34	3,24	10,18	801	796	799	3,54	
20812	5	12037586	2,30	1,96	2,13	0,24	11,29	0,52	340		340		neg
D-52/2012	5	12104565	3,18	2,01	2,60	0,83	31,88	0,64	374		374		neg
	5	12113998	2,52	1,61	2,07	0,64	31,16	0,51	358	344	351	9,90	neg
oma pooli	AB		3,21	5,51	4,36	1,63	37,30	1,07					
kontr	AB		2,66	2,63	2,65	0,02	0,80		399	412	406	9,19	pos raja 466
kontr	IgG pos		57,60	63,60	60,60	4,24	7,00	22,91	803	806	805	2,12	
30812	6	12069316	3,57	3,95	3,76	0,27	7,15	1,42	483		483		pos
D-49/2012	6	12102570	4,56	4,85	4,71	0,21	4,36	1,78	501		501		pos
	6	12107620	4,09	3,95	4,02	0,10	2,46	1,52	494	486	490	5,66	pos
oma pooli	AB		3,15	2,93	3,04	0,16	5,12	1,15					
kontr	AB		2,24	2,47	2,36	0,16	6,91						
kontr	IgG pos		53,60	55,50	54,55	1,34	2,46	23,16					
40812	6	12046531	3,21	3,33	3,27	0,08	2,59	1,39					pos
D-54/2012	6	12109139	5,51	4,56	5,04	0,67	13,34	2,14					pos
	6	12120086	4,52	4,17	4,35	0,25	5,70	1,85					pos
oma pooli	AB		1,90	1,77	1,84	0,09	5,01	0,78					
kontr	AB		1,71	1,59	1,65	0,08	5,14		346	357	352	7,78	pos raja 412
kontr	IgG pos		40,50	44,00	42,25	2,47	5,86	25,61	780	781	781	0,71	
30812	7	12046531	3,61	4,24	3,93	0,45	11,35	2,38	470		470		pos
D-54/2012	7	12109139	4,02	3,88	3,95	0,10	2,51	2,39	463		463		pos
	7	12120086	16,60	17,10	16,85	0,35	2,10	10,21	659	656	658	2,12	pos
oma pooli	AB		1,69	1,66	1,68	0,02	1,27	1,02					
kontr	AB		1,20	1,29	1,25	0,06	5,11		378	373	376	3,54	pos raja 436
kontr	IgG pos		10,90	15,10	13,00	2,97	22,84	10,44	766	760	763	4,24	
40812	8	12088696	2,08	1,56	1,82	0,37	20,20	1,46	407		407		neg
D-48/2012	8	12102554	1,65	2,26	1,96	0,43	22,06	1,57	397		397		neg
	8	12107623	1,89	2,49	2,19	0,42	19,37	1,76	373	350	362	16,26	neg
oma pooli	AB		2,78	3,12	2,95	0,24	8,15	2,37					
kontr	AB		1,32	1,68	1,50	0,25	16,97		310	300	305	7,07	pos raja 365
kontr	IgG pos		56,60	61,30	58,95	3,32	5,64	39,30	785	791	788	4,24	
40812	9	12112426	0,60	0,85	0,72	0,18	24,57	0,48	216		216		neg
D-69/2012	9	12135026	1,01	1,33	1,17	0,23	19,34	0,78	219		219		neg
	9	12143852	0,70	0,68	0,69	0,02	2,56	0,46	206	192	199	9,90	neg
oma pooli	AB		1,47	1,29	1,38	0,13	9,22	0,92					
kontr	AB		1,58	1,84	1,71	0,18	10,75		356	327	342	20,51	pos raja 402
kontr	IgG pos		67,10	56,10	61,60	7,78	12,63	36,02	796	797	797	0,71	
80812	10	8034772	1,26	1,17	1,22	0,06	5,24	0,71	274		274		neg
D-24/2008	10	8042566	1,21	1,11	1,16	0,07	6,10	0,68	272		272		neg
	10	12118199	2,10	2,36	2,23	0,18	8,24	1,30	442	425	434	12,02	pos
oma pooli	AB		1,96	1,58	1,77	0,27	15,18	1,04					

Kuvio 3. T-solu IgM validointinäytteiden primaaritulokset (LV-43016)

		T-solu IgM/ Navios LV-43016						T-solu IgM / FACScan						
		1. näyte		2. näyte		ka	cv	RSD	suhde	1. näyte	2. näyte	ka	cv	
		X-Median	X-Median											
seerumi														
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 246
300712	1	12115909	0,48	0,49	0,49	0,01	1,46			206	206	206	0,00	
D-68/2012	1	12133437	2,05	1,62	1,84	0,30	16,57			387	395	391	5,66	
	1	12141131	0,31	0,28	0,29	0,02	7,01	neg		175		175		neg
	1		0,27	0,22	0,24	0,04	15,33	neg		166		166		neg
	1		0,23	0,23	0,23	0,00	1,85	neg		151	149	150	1,41	neg
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 333
10812	2	12025079	0,72	0,75	0,73	0,03	3,75			292	293	293	0,71	
D-34/2012	2	12071955	2,78	2,75	2,77	0,02	0,77			434	442	438	5,66	
	2	12081928	0,87	0,83	0,85	0,03	3,15	neg		338		338		raja-arvoinen
	2		0,85	0,92	0,88	0,05	5,68	neg		345		345		raja-arvoinen
	2		0,54	0,57	0,55	0,02	4,47	neg		292	294	293	1,41	neg
oma pooli	AB		0,58	0,59	0,58	0,00	0,61							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 291
10812	3	12049420	0,70	0,75	0,72	0,03	4,39			249	252	251	2,12	
D-27/2012	3	12059338	1,49	1,38	1,44	0,08	5,42			359	366	363	4,95	
	3	12093907	0,21	0,18	0,20	0,02	10,77	neg		123		123		neg
	3		0,19	0,19	0,19	0,00	0,37	neg		131		131		neg
	3		0,18	0,18	0,18	0,00	1,18	neg		109	124	117	10,61	neg
oma pooli	AB		0,44	0,44	0,44	0,00	0,64							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 268
20812	4	12071173	0,45	0,49	0,47	0,03	6,33			229	227	228	1,41	
D-41/2012	4	12082278	1,69	1,66	1,68	0,02	1,27			424	418	421	4,24	
	4	12090974	0,63	0,70	0,67	0,05	7,64	pos		286		286		pos
	4		0,71	0,73	0,72	0,01	1,97	pos		297		297		pos
	4		0,56	0,53	0,55	0,02	3,89	neg		286	286	286	0,00	pos
oma pooli	AB		0,46	0,49	0,48	0,02	4,47							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 296
20812	5	12037586	0,61	0,52	0,57	0,06	10,76			253	258	256	3,54	
D-52/2012	5	12104565	1,52	1,76	1,64	0,17	10,35			441	420	431	14,85	
	5	12113998	0,36	0,35	0,35	0,01	1,81	neg		211		211		neg
	5		0,35	0,34	0,35	0,01	2,44	neg		202		202		neg
	5		0,36	0,40	0,38	0,03	6,89	neg		223	219	221	2,83	neg
oma pooli	AB		0,49	0,54	0,51	0,03	6,34							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 279
30812	6	12069316	0,49	0,51	0,50	0,01	2,53			241	237	239	2,83	
D-49/2012	6	12102570	1,59	1,85	1,72	0,18	10,69			371	384	378	9,19	
	6	12107620	0,57	0,53	0,55	0,03	5,13	neg		246		246		neg
	6		0,50	0,60	0,55	0,07	12,09	neg		256		256		neg
	6		0,46	0,51	0,49	0,04	7,57	neg		240	261	251	14,85	neg
oma pooli	AB		0,42	0,53	0,48	0,07	15,18							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													Suunniteltu UUSINTA
40812	6	12069316	0,37	0,35	0,36	0,01	3,93							
D-49/2012	6	12102570	1,33	1,61	1,47	0,20	13,47	neg						
	6	12107620	0,41	0,40	0,41	0,01	1,75	neg						
	6		0,50	0,46	0,48	0,03	5,89	neg						
	6		0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	neg						
oma pooli	AB		0,38	0,37	0,38	0,01	1,89							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 337
30812	7	12046531	0,75	0,73	0,74	0,01	1,90			289	304	297	10,61	
D-54/2012	7	12109139	1,26	1,82	1,54	0,40	25,71			404	401	403	2,12	
	7	12120086	0,96	0,80	0,88	0,11	12,74	neg		323		323		neg
	7		0,85	0,90	0,88	0,04	4,44	neg		312		312		neg
	7		0,93	0,80	0,87	0,09	10,21	neg		312	295	304	12,02	neg
oma pooli	AB		0,86	0,86	0,86	0,00	0,00							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 300
40812	8	12088696	0,58	0,55	0,56	0,02	3,78			264	255	260	6,36	
D-48/2012	8	12102554	1,58	1,12	1,35	0,33	24,09			375	362	369	9,19	
	8	12107623	0,56	0,62	0,59	0,05	7,71	neg		222		222		neg
	8		0,40	0,41	0,41	0,01	2,62	neg		207		207		neg
	8		0,49	0,38	0,44	0,08	17,72	neg		228	222	225	4,24	neg
oma pooli	AB		0,54	0,54	0,54	0,00	0,66							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 269
40812	9	12112426	0,53	0,50	0,51	0,02	3,16			232	225	229	4,95	
D-69/2012	9	12135026	0,60	0,70	0,65	0,07	10,83			289	286	288	2,12	
	9	12143852	0,42	0,42	0,42	0,00	0,67	neg		229		229		neg
	9		0,42	0,44	0,43	0,02	3,80	neg		210		210		neg
	9		0,42	0,36	0,39	0,04	10,18	neg		210	195	203	10,61	neg
oma pooli	AB		0,46	0,48	0,47	0,01	3,16							
kontr	AB													
kontr	IgM pos													pos raja 275
80812	10	8034772	0,68	0,56	0,62	0,08	13,25			229	241	235	8,49	
D-24/2008	10	8042566	0,86	0,85	0,85	0,00	0,58			312	306	309	4,24	
	10	12118199	0,30	0,27	0,29	0,02	7,60	neg		172		172		neg
	10		0,28	0,26	0,27	0,01	5,51	neg		178		178		neg
	10		0,59	0,53	0,56	0,05	8,35	neg		254	227	241	19,09	neg
oma pooli	AB		0,80	0,57	0,69	0,16	23,88							