

Opinnäytetyö (AMK)

Hoitotyön koulutusohjelma

Bioanalyttikko

2013

Anna Karvonen ja Satu Leinonen

LIKVORIN CXCL13- MÄÄRITYKSEN VALIDOINTI

– uusi työkalu neuroborreliainfektion
diagnostiikkaan



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Anna Karvonen ja Satu Leinonen

LIKVORIN CXCL13-MÄÄRITYKSEN VALIDOINTI – UUSI TYÖKALU NEUROBORRELIAINFEKTION DIAGNOSTIIKKAAN

Tämän opinnäytetyön tavoite on parantaa neuroborreliainfektion laboratoriodiagnostiikkaa. Tarkoituksena oli validoida likvorin CXCL13-määritys ja laatia validointiraportti Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen diagnostiselle palvelutoiminnalle, jotta CXCL13-määritystä voitaisiin käyttää osana neuroborreliainfektion diagnostiikkaa. Tutkimustehtävänä oli selvittää soveltuuko likvorin CXCL13-määritys neuroborreliainfektion diagnostiikkaan sekä antibiootihoidon vaikutus likvorin CXCL13-pitoisuuteen.

Neuroborreliainfektio aiheutuu *Borrelia burgdorferi* -bakteerista. Neuroborreliainfektiossa borreliabakteeri infektoi perifeeristä hermostoa tai keskushermostoa. Yleisimpiä neuroborreliainfektion oireita ovat aivokalvontulehdus, hermojuurentulehdus ja aivohermojen halvaus, erityisesti kasvohermoalvaus.

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kaupallista (R&D Systems) ELISA-menetelmää. Kyseessä on immunologinen menetelmä, jossa hyödynnetään vasta-aineiden kykyä sitoa ja sitoutua spesifisti antigeeneihin. Opinnäytetyön tutkimusaineisto koostui likvornäytteistä. Näytteistä määritettiin CXCL13-pitoisuudet. Näytteiden avulla tehtiin CXCL13-määrityksen validointi, joka sisälsi spesifisyyden, toistettavuuden ja lineaarisuuden testaukset.

Tuoretta neuroborreliainfektiota sairastavien potilaiden likvoreiden CXCL13-pitoisuudet olivat 424 – 158030 pg/ml. Neurosyfilispotilaan likvorin CXCL13-pitoisuus oli 36998 pg/ml. MS-tautiin viittaavissa näytteissä ja keskushermoston virusinfektiota (VZV, HSV, HHV-6, entero ja TBE) sairastavien näytteissä CXCL13-pitoisuudet olivat välillä <7,8-406 pg/ml. Neuroborreliainfektioon viittaavana alarajana voidaan pitää likvorin CXCL13-pitoisuutta 500 pg/ml.

Tämän opinnäytetyön tulokset osoittavat, että likvorin CXCL13-määritys soveltuu neuroborreliainfektion diagnostiikkaan. CXCL13-pitoisuudet likvorissa laskevat antibiootihoidon myötä. Lisäksi voidaan todeta R&D Systemsin CXCL13-määrityksen olevan validi spesifisyyden, toistettavuuden ja lineaarisuuden suhteen.

ASIASANAT:

Neuroborreliainfektio, likvor, CXCL13 ja validointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in nursing | Biomedical Laboratory Science

December 2013 | 40 pages

Anna Karvonen and Satu Leinonen

VALIDATION OF DETECTING CXCL13 FROM CEREBROSPINAL FLUID – A NEW TOOL FOR DIAGNOSING NEUROBORRELIOSIS

The aim of this bachelor's thesis is to improve laboratory diagnosis of neuroborreliosis. The purpose was to make a validation of detecting CXCL13 from cerebrospinal fluid and make a validation report to the department of medical microbiology and immunology of Turku University so that the detection of CXCL13 could become part of diagnosis of neuroborreliosis. The task was to find out if CXCL13 in cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for neuroborreliosis and how CXCL13 levels in cerebrospinal fluid react to antibiotic treatment.

Neuroborreliosis is caused by *Borrelia burgdorferi*. In neuroborreliosis it infects peripheral or central nervous system. The most typical symptoms are meningitis, radiculoneuritis and cranial neuritis, particularly involving the facial nerve.

The assay used in this bachelor's thesis was ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) by R&D System. ELISA assay is an immunological method in which an antibody's ability to bind to specific antigen is exploited. The material of this bachelor's thesis was cerebrospinal fluid samples. CXCL13 was detected from samples. Validation included testing of specificity, repeatability and linearity.

Concentrations of CXCL13 in acute neuroborreliosis were 424 – 158030 pg/ml. In neurosyphilis concentration of CXCL13 was 36998 pg/ml. In other inflammatory diseases of nervous system (MS-disease, VZV, HSV, HHV-6, entero and TBE) concentrations of CXCL13 were <7,8-406 pg/ml. A CXCL13 concentration of 500 pg/ml is a marker of neuroborreliosis.

The results of this bachelor's thesis show that detection of CXCL13 can be part of diagnosing neuroborreliosis. Concentration of CXCL13 in cerebrospinal fluid decreases due to antibiotic treatment. It can also be shown that ELISA assay for detecting CXCL13 by R&D System is valid with regards to specificity, repeatability and linearity.

KEYWORDS:

Neuroborreliosis, cerebrospinal fluid, CXCL13, validation

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 NEUROBORRELIAINFEKTIO JA DIAGNOSTIIKKA	8
2.1 Borreliainfektio	8
2.1.1 Neuroborreliainfektio	10
2.1.2 Hoito	11
2.2 Likvor	11
2.3 CXCL13	12
2.3.1 Kemokiinit	13
2.3.2 CXCL13:n yhteys neuroborreliainfektioon	13
2.4 Validointi	14
2.5 ELISA -menetelmä	16
3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	18
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	19
4.1 Tutkimusaineiston kuvaus	19
4.2 Opinnäytetyön metodologia	20
4.3 Opinnäytetyön eettisyys	21
4.4 CXCL13-määrittäminen	23
4.5 Validointi	26
4.5.1 Spesifisyyden testaus	26
4.5.2 Toistettavuuden ja lineaarisuuden testaus	26
5 TULOKSET	28
5.1 Spesifisyyden testaus	28
5.2 Toistettavuuden ja lineaarisuuden testaus	31
6 TULOSTEN TULKINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	34
7 POHDINTA	36
LÄHTEET	39

LIITTEET

Liite 1. Menetelmän validointi. CXCL13-pitoisuuden määrittäminen likvorista.
Liite 2. Toimeksiantosopimus

1 JOHDANTO

Suomessa borreliainfektio on yleisempi ja esiintyvyys laajempi kuin yleisesti ajatellaan. Punkit eli puutiaiset ovat borreliainfektion levittäjiä. Borreliainfektio voi levitä neuroborreliainfektioksi. (Lounamo 2010, 17-19.)

Neuroborreliainfektiossa borreliabakteeri infektoi perifeeristä hermostoa tai keskushermostoa (Rupprecht ym. 2008, 205). Neuroborreliainfektion yleisin oire on kasvohermohalvaus (Oksi ym. 2010, 251). Muita neuroborreliainfektion oireita ovat muiden aivohermojen halvaukset, aivokalvontulehdus ja hermojuurentulehdus (Hytönen ym. 2008, 163).

CXCL13 -pitoisuus likvorissa nousee nopeasti neuroborreliainfektiossa. CXCL13:n pitoisuus nousee ennen vasta-ainepitoisuuden nousua ja laskee antibiootihoidon myötä. (Schmidt ym. 2011, 1051.)

Neuroborreliainfektion diagnosointi voi olla haastavaa, sillä diagnoosin tulee perustua sekä potilaan kliiniseen tilaan että laboratoriotestien tuloksiin. (Mygland ym. 2010, 12.) Neuroborreliainfektioon sopivien oireiden lisäksi potilaan likvorissa tulee olla suurentunut määrä valkosoluja tai siinä tulee näkyä merkkejä likvorin toiminnan häiriöstä. Lisäksi likvorista tulee löytyä borreliabakteerille spesifejä vasta-aineita. Likvorin kohonnut valkosolupitoisuus ei kuitenkaan ole neuroborreliainfektiolle spesifi löydös, vaan sitä voi esiintyä myös muissa hermoston tulehdustiloissa. (Tumani & Cadavid 2011, 1034.) Vasta-ainetuotanto käynnistyy vasta muutaman viikon kuluttua infektiosta, joten vasta-aineiden määrittäminen ei sovellu käytettäväksi infektion alkuvaiheessa (Mygland ym. 2010, 11).

Validointi tarkoittaa menettelyprosessia, jolla osoitetaan määritysmenetelmän soveltuvuus aiotussa käyttötarkoituksessa. Menettelyprosessista laaditaan kirjallinen validointiraportti, joka kuvaa ko. menetelmän. Validointiraportti on pysyvästi arkistoitava dokumentti. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11, 14.)

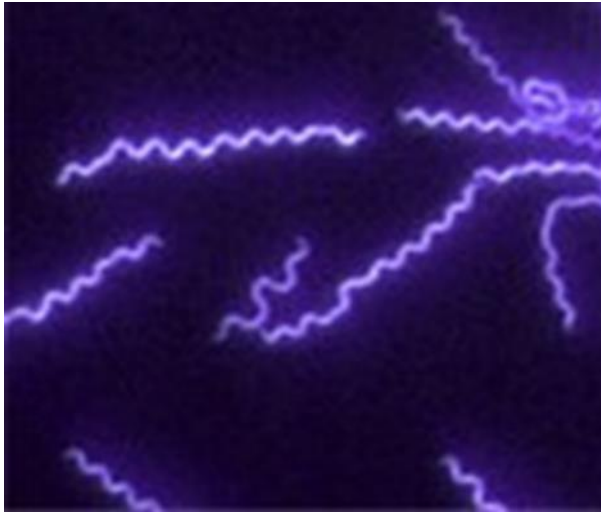
Tämän opinnäytetyön tavoite on parantaa neuroborreliainfektion laboratorio-diagnostiikkaa. Tarkoituksena on validoida likvorin CXCL13-määritys ja laatia validointiraportti Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen diagnostiselle palvelutoiminnalle, jotta CXCL13-määritystä voitaisiin käyttää osana neuroborreliainfektion diagnostiikkaa.

2 NEUROBORRELIAINFEKTIO JA DIAGNOSTIIKKA

Neuroborreliainfektion kehittyminen on monimuotoinen ja pitkäaikainen ketju tapahtumia. Tapahtumaketjun ensimmäinen askel on puutiaisen purema ja siitä aiheutuva borreliainfektio. Borreliainfektion hoitamattomuus tai hoidon riittämättömyys saattaa johtaa neuroborreliainfektioon. (Lounamo 2010, 17-19.) Laboratoriodiagnostiikka on haastavaa. Diagnoosi varmistetaan likvorista. (Lahdenne ym. 2001, 1425.)

2.1 Borreliainfektio

Borreliainfektion aiheuttaa *Borrelia burgdorferi* sensu lato –ryhmän bakteeri. Sensu lato merkitsee ”laajassa mielessä”. Tämä *Borrelia burgdorferi* sensu lato –ryhmä jaetaan useisiin eri alalajeihin, joista tärkeimmät ihmiselle tautia aiheuttavat alalajit ovat *B. burgdorferi* sensu stricto (”kapeassa mielessä”), *B. garinii*, ja *B. afzelii*. Taudin aiheuttaja, *Borrelia burgdorferi* (Kuvio 1), löytyi vuonna 1982 ja sai nimen löytäjänsä Willy Burgdorferin mukaan. (Oksi ym. 2010, 248.) Vaikka taudilla ja taudin aiheuttajalla on ollut nimi vasta muutaman vuosikymmenen, on kyseessä vanha tauti. Borrelian DNA:ta on löydetty tuhansia vuosia sitten kuolleesta muumiosta. (Meri & Meri 2013, 43.)



Kuvio 1. Pimeäkenttämikroskooppikuva *Borrelia burgdorferi* –bakteerista. (ASM Microbe Library.org©Nelson)

Borreliat kuuluvat spirokeettoihin ja ovat muodoltaan korkkiruuvimaisia. Niiden pituus on 10-30 mikrometriä ja paksuus noin 0,5 mikrometriä. (Lounamo 2010,18; Oksi ym. 2010, 247-248; Wormser ym. 2006, 1089-1134.) Toinen lääketieteellisesti tärkeä spirokeettasuku ovat *Treponemat* (Oksi ym. 2010, 247). *Treponema pallidum* aiheuttaa syfilistä eli kuppaa (Oksi ym. 2010, 257).

Borreliabakteeri tarttuu ihmiseen puutiaisen pureman välityksellä. Puutiainen on punkkiryhmään kuuluva hämähäkkieläin. Suomessa *Ixodes ricinus* on laajimmin tavattava puutiaislaji. Puutiainen on aikuisena muodoltaan soikea ja litteä, pinnaltaan kova, kooltaan 0,5 – 3,5 mm. Puutiainen käy läpi elämässään kolme kehitysvaihetta (toukka, nymfi ja aikuinen) ja tarvitsee joka kehitysvaiheessa veriaterian kehittyäkseen seuraavaan vaiheeseen. Verta se imee esimerkiksi pienistä jyrsijöistä, joiden veressä borreliabakteerit lisääntyvät. Veriaterian yhteydessä borreliabakteereita siirtyy puutiaisen suoleen. Jos puutiainen imee seuraavan tarvitsemansa veriaterian ihmisestä, puutiaisen suolessa olevat borreliabakteerit siirtyvät sen sylkirauhasiin ja syljen mukana ihmisen ihoon. Puutiaisen levinneisyys Suomessa on Etelä- ja Keski-Suomi. Puutiainen elää aluskasvillisuudessa ja tarvitsee riittävän kostean ja lämpimän elinympäristön. (Oksi ym. 2010, 248; Ståhlberg ym. 1994, 6-7.)

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen keräämään Tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin Suomessa vuonna 2012 1587 borreliainfektiotapausta. Koko maassa ilmaantuvuus oli keskimäärin 29 tapausta/100 000 asukasta. Ilmoitettujen tapausten määrä on pysynyt samalla tasolla viime vuodet. Eri alueiden välillä ilmaantuvuus vaihtelee suuresti. Suhteessa asukaslukuun borreliainfektiota tavataan eniten Ahvenanmaalla, jossa todettiin vuonna 2012 kolmannes koko maan tapauksista. Myös lounais- ja etelärannikolla sekä Keski-Pohjanmaan rannikolla tavataan tautia runsaasti (>20 tapausta /100 000 asukasta). (Jaakola ym. 2013, 41-42.)

Borreliainfektion varhaisvaiheen tyypillisin oire on puutiaisen puremakohdan ympärille ilmaantuva punoitus, joka päivien tai viikkojen aikana laajenee jopa kymmenien senttimetrien laajuiseksi. Tätä punoitusta kutsutaan erythema migransiksi. Tyypillisesti erythema migrans on rengasmainen, eli keskiosa on vaalea ja reunat punoittavat, mutta se voi olla myös koko alueelta punoittava. Punoitus voi olla myös niin vaalea, että sitä on vaikea havaita. Noin 30-40%:lle tartunnan saaneista ei kehity erythema migransia lainkaan. (Oksi ym. 2010, 250; Lounamo 2010, 19.)

Laajalle levinneen borreliainfektion oireita ovat nivelestä toiseen siirtyvät kivut. Niveltulehduksen kehittyminen vie yleensä kuukausia. Vain yksi tai korkeintaan muutama nivel kerrallaan tulehtuu ja ne ovat yleensä suuria niveliä. Eri borreliajajeista erityisesti *Borrelia burgdorferi* sensu stricto aiheuttaa niveloireita. Borreliainfektio voi aiheuttaa oireita myös sydämeen. Siellä se voi aiheuttaa eteiskammiokatkoksen tai sydänlihaks- tai sydänpussin tulehduksen. Silmäoireet ja maksatulehdus ovat myös mahdollisia. (Oksi ym. 2010, 250; Lounamo 2010, 18-19.)

2.1.1 Neuroborreliainfektio

Neuroborreliainfektiossa borreliabakteeri infektoi ääreishermostoa tai keskushermostoa (Rupprecht ym. 2008, 205). Eri borreliajajeista erityisesti *Borrelia garinii* aiheuttaa neuroborreliainfektioita (Oksi ym. 2010, 250; Lounamo

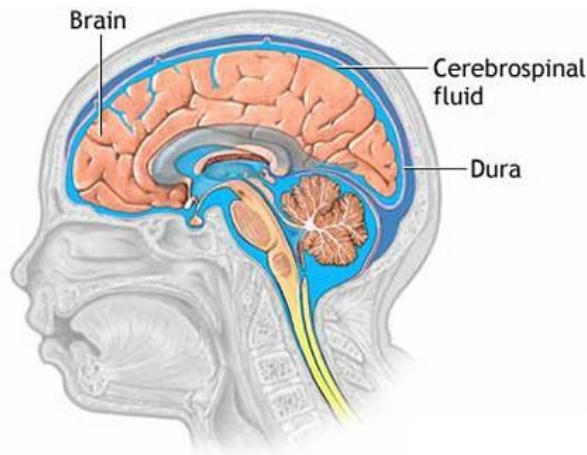
2010,18). Yleisimpiä neuroborreliainfektion oireita ovat aivokalvontulehdus, hermojuurentulehdus ja aivohermohalvaus, erityisesti kasvohermohalvaus (Hytönen ym. 2008, 163). Näistä yleisin on kasvohermohalvaus. Borrelian aiheuttama aivokalvontulehdus on hitaasti kehittyvä ja voi olla lievä, pitkäkestoinen ja esiintyä jopa ilman päänsärkyä. Bannwarthin oireyhtymä on yleinen aikuisilla. Se on aivokalvojen ja hermojuurten tulehdus, jonka oireita ovat polttava kipu, tuntuu muutokset tai halvaukset raajassa tai vartalolla. Pitkänkin oireettoman ajan jälkeen voi ilmaantua etenevä aivojen ja selkäytimen tulehdus (enkefalomyeliitti), MS-tautiin sopivia oireita, rakon toimintahäiriöitä, epileptisiä kohtauksia jopa dementiaa. Borreliainfektio voi aiheuttaa ääreishermostoon toimintahäiriön, joka ilmenee puutumisena, kihelmöintinä tai tunnottomuutena. (Oksi ym. 2010, 251.) Tavallisesti neuroborreliainfektion oireiden kehittyminen vie viikkoja tai kuukausia (Hytönen ym. 2008, 163).

2.1.2 Hoito

Diagnostisoitu borreliainfektio hoidetaan antibiooteilla. Jos ainoa oire on erythema migrans, hoito on kahden viikon antibioottikuuri suun kautta amoksisilliiniä, doksisykliiniä, kefuroksiimiaksetiiliä tai atsitromysiiniä. Laajalle levinneessä infektiossa, kuten esimerkiksi neuroborreliainfektiossa, on antibiootti perinteisesti annettu suoneen 2-3 viikon ajan. Tällöin ensisijainen antibioottivaihtoehto on keftriaksoni. (Oksi ym. 2010, 254.)

2.2 Likvor

Neuroborreliainfektion diagnoosi varmistetaan likvornäyteestä. Likvor eli aivo-selkäydinneste (Kuvio 2) on kirkasta ja väritöntä aivoja ja selkäydintä ympäröivää nestettä. Normaalisti siinä ei ole soluja eikä bakteereita. (Kairisto 2010, 50.) Likvorin tehtävänä on suojata aivoja iskuilta, pitää yllä kallonsisäistä painetta sekä kuljettaa ravintoaineita aivoille ja selkäytimelle ja poistaa niiden myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita (Jerrard ym. 2001, 171).



Kuvio 2. Likvorin (cerebrospinal fluid) sijainti aivojen (brain) ympärillä kovakalvon (dura) sisäpuolella. (<http://www.medicinabih.info/2011/07/15/poremecajidinamike-cerbrospinalnog-likvora/>)

Likvoria on aivokammioissa ja subaraknoidaaliontelossa 100 – 150 ml. Aivokammioita on neljä ja ne ovat isoaivojen molemmissa puoliskoissa olevat sivukammiot, väliaivojen alueella oleva aivokammio sekä ydinjatkeen ja pikkuaivojen välissä oleva aivokammio. Kaikissa neljässä aivokammiossa syntyy koko ajan likvoria niihin työntyneiden suonipunoksien toiminnan ansiosta. Suonipunokset ovat epiteeliverhottuja tupsuja, joissa on pieniä hiussuonia ja valtimoita. Likvorivirtaus etenee hiljalleen sivukammioista kolmannen aivokammion kautta neljänteen aivonesteviemärin läpi. Neljännessä aivokammiossa on kolme aukkoa, joiden kautta likvor päättyy subaraknoidaalitilaan. Subaraknoidaalitilasta likvor poistuu verenkiertoon veriviemäreiden araknoidaalivillusten avulla. Veriviemärit ovat laskimoita, joiden kallon sisällä oleva verenpaine on lähellä nollaa, mikä mahdollistaa nesteiden siirtymisen. Likvornäyte otetaan subaraknoidaalitilasta näytteenottoneulalla joko niskapunktiona tai lannepistona. (Nienstedt ym. 2009, 535-536.)

2.3 CXCL13

Neuroborreliainfektiossa valkosolujen määrä likvorissa kasvaa (Lahdenne ym. 2001, 1425). Valkosolujen tehtävä on puolustaa elimistöä taudinaiheuttajia vas-

taan (Nienstedt ym. 2009, 173-175). CXCL13 houkuttelee valkosoluja kudoksiin. CXCL13 on kemokiini. (Seppälä & Meri 2011a, 202-203.)

2.3.1 Kemokiinit

Kemokiinit ovat elimistön molekyylejä, joiden tehtävä on houkutella valkosoluja kudoksiin erityisesti tulehdusreaktion aikana (Seppälä & Meri 2011a, 202-203). Valkosolut puolustavat elimistöä taudinaiheuttajia vastaan. Valkosoluja on kolme päätyyppiä: lymfosyytit, granulosyytit ja monosyytit. Eri valkosolutyypit osallistuvat elimistön puolustamiseen eri tavoin. Esimerkiksi lymfosyyteillä on merkittävä rooli immuunireaktioissa ja vasta-aineiden tuottamisessa taudinaiheuttajia vastaan. (Nienstedt ym. 2009, 173-175.)

Eri kemokiinit houkuttelevat erityyppisiä valkosoluja. Valikoivuus perustuu erityisiin kemokiinireseptoreihin, joita on eri valkosolutyypin pinnalla. Kun kemokiini on sitoutunut valkosolun pinnalla olevaan kemokiinireseptoriin, solun aktivatio ja muoto muuttuvat nopeasti. Tämän seurauksena valkosolun on mahdollista tunkeutua verisuonen seinämän solujen välistä kudokseen. (Meri & Julkunen 2011, 48.)

Kemokiineja tunnetaan tällä hetkellä 48, ja ne jaetaan neljään ryhmään (kemokiiniperheeseen) rakenteensa perusteella (Meri & Julkunen 2011, 48; Seppälä & Meri 2011a, 202). CXCL13 kuuluu CXC-kemokiiniperheeseen ja sen tehtävä on houkutella tulehduspaikalle B- ja B-auttaja-T-soluja (Seppälä & Meri 2011a, 202; van Burgel ym. 2011, 2027). B- ja T-solut kuuluvat lymfosyytteihin (Nienstedt ym. 2009, 250).

2.3.2 CXCL13:n yhteys neuroborreliainfekioon

Vuonna 2002 Pachner ja Steiner totesivat, että kemokiini CXCL13:n pitoisuus oli korkea borreliabakteerilla infektoitujen rhesus apinoiden kudoksissa ja että pitoisuus korreloi hyvin bakteereiden määrään (Pachner & Steiner 2007, 549). Myöhemmin huomattiin likvorin CXCL13:n pitoisuuden määrityksen käyttökel-

poisuus diagnostisena apuvälineenä neuroborreliainfektiossa (Rupprecht ym. 2005, 448). CXCL13-määritys todettiin hyödylliseksi, kun diagnosoidaan tuoretta neuroborreliainfektiota (Ljøstad & Mygland 2008, 737). Antibioottihoidon seurauksena likvorin CXCL13-pitoisuus laskee nopeasti (Rupprecht ym. 2005, 448; Senel ym. 2010, 932).

EFNS (European federation of neurological societies) antoi vuonna 2010 ohjeen neuroborreliainfektion diagnosoinnista. Tässä ohjeessa ei suositeltu likvorin CXCL13-määritystä rutiinidiagnostiikkaan tai hoidon tehon seurantaan, koska menetelmästä ei ollut vielä tuossa vaiheessa tarpeeksi näyttöä. (Mygland ym. 2010, 11.) Tämän jälkeen on kuitenkin julkaistu lisää tutkimuksia CXCL13-määrityksen hyödyntämisestä.

Neuroborreliainfektiossa likvorin CXCL13-pitoisuus kohoaa huomattavasti korkeammalle kuin keskushermoston virusinfektioissa, esim. virusmeningiiteissä, tai MS-taudissa (Schmidt ym. 2011, 1054-1057). Myös neurosyfilis aiheuttaa korkeita likvorin CXCL13-pitoisuuksia. Tämä saattaa joissain tapauksissa vaikeuttaa erotusdiagnostiikkaa. Syfiliksen aiheuttaa *Treponema pallidum* –bakteeri, joka kuuluu spirokeettoihin, aivan kuten borreliabakteerikin. (Senel ym. 2010, 932; Rupprecht ym. 2009, 6.)

Likvorin CXCL13-määrityksen on todettu olevan mahdollisesti hyvä lisä neuroborreliainfektion diagnostiikkaan etenkin taudin alkuvaiheessa. Määrityksen herkkyys ja spesifisyys on todettu hyviksi. (Djukic ym. 2012, 631.)

2.4 Validointi

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyprosessia, jolla osoitetaan määritysmenetelmän soveltuvuus aiotussa käyttötarkoituksessa. Menettelyprosessista laaditaan kirjallinen validointiraportti, joka kuvaa ko. menetelmän. Validointiraportti on pysyvästi arkistoitava dokumentti. Validointi uusitaan menetelmän muuttuessa tai määritystulosten niin vaatiessa. Tällöin laaditaan myös uusi validointiraportti. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11, 14.)

Validoinnissa määritellään mille tutkimukselle se tehdään sekä mikä on validoinnin tarve ja taso. Validointiprosessiin valitaan riittävän kokemuksen omaava henkilöstö, määritellään laitteet, mitattavat parametrit sekä materiaalityyppi, materiaalin määrä sekä materiaalin summittaiset nimellisarvot. Validoinnista tehdään yhteenveto, joka sisältää validointitietojen, toimivuusjohtopäätöksen sekä pohdinnan käyttöönnotosta. (UTULab laatukäsikirja.)

Hyvä kliininen laboratoriokäytäntö on validoinnin perusta. Validoinnin päätarkoitus on osoittaa metodin luotettavuus valitulle analyylille ja näytejoukolle. Validoinnissa sekä näytteiden mittauksissa on tärkeää, että mukana on joko kaupallisia tai sisäisiä standardeja ja kontrollinäytteitä. Standardit sekä kontrollinäytteet tulee olla testattuja luotettavuudeltaan. (European Medicines Agency, 2011, 3.)

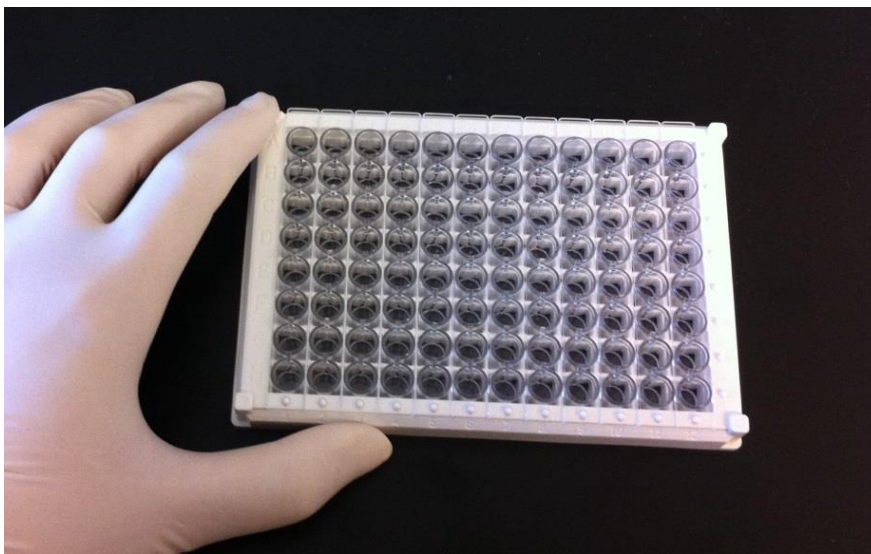
Lineaarisuus (linearity) kertoo, että tutkittavan aineen näytepitoisuudella ja tuloksen välillä on korrelaatio. Mittalaitteen herkkyys on vakio lineaarisella mittausalueella. Herkkyys (sensitivity) kuvaa mittalaitteen signaalin arvon muutosta suhteessa analyytin eli tutkittavan aineen pitoisuuden muutokseen. (Jaarinen & Niiranen 2008, 13.)

Toistettavuus (repeatability) kertoo mittaussarjan sisäisestä (intra-assay) tai mittaussarjojen välisestä (inter-assay) mittaustulosten keskihajonnoista. Mittaussarjan sisäinen tulosten keskihajonta on hieman pienempää kuin mittaussarjojen välisissä tuloksissa. Mittausolosuhteet, mittalaitteiden väliset erot sekä menetelmät vaikuttavat toistuvuustuloksiin. (Jaarinen & Niiranen 2008, 13.)

Spesifinen määritysmenetelmä tarkoittaa, että mittauksesta saatava signaali kuvaa ja on peräisin vain tutkittavasta aineesta, analyytistä. Spesifisyyteen olennaisesti liittyy termi selektiivisyys ja täysin selektiivisessä tilanteessa analytti pystytään spesifisti mittaamaan näytteen muiden yhdisteiden joukosta. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11.)

2.5 ELISA -menetelmä

ELISA on lyhenne sanoista enzyme-linked immunosorbent assay. Kyseessä on immunologinen menetelmä, jossa hyödynnetään vasta-aineiden kykyä sitoa ja sitoutua spesifisti antigeeneihin. Sitoutuminen voidaan havaita ja mitata entsyymillä leimattujen vasta-aineiden avulla. ELISA -menetelmässä käytetään hyväksi ilmiötä, jossa proteiineilla on taipumus tarttua lujasti muovin pintaan kiinni. (Seppälä & Meri 2011b, 95-96.)



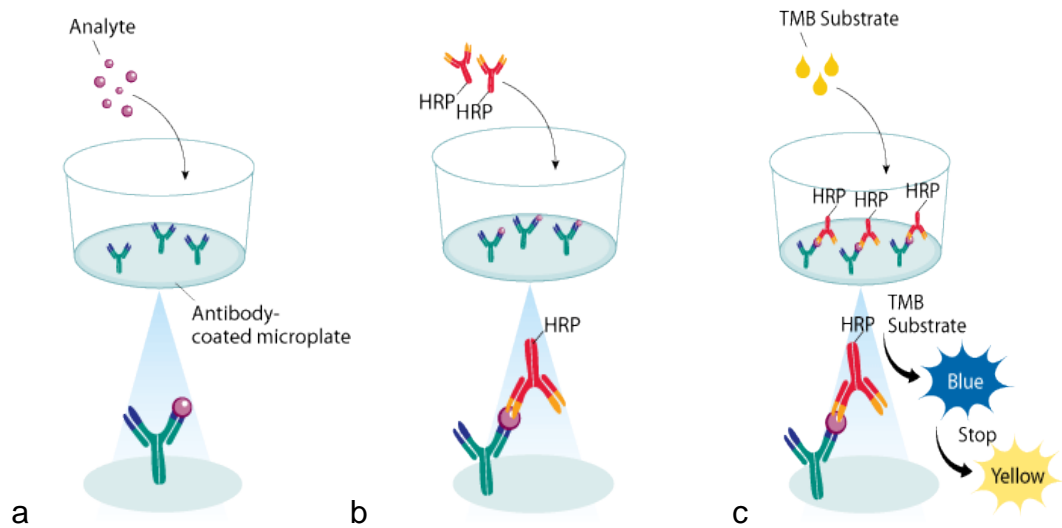
Kuvio 3. 96-kuoppalevy

Tässä opinnäytetyössä 96-kuoppalevyn (Kuvio 3) kuopat oli päällystetty mitattavaa ainetta vastaan olevalla vasta-aineella. Tämän jälkeen lisätään näyte (Kuvio 4a). Mitattavaa ainetta kutsutaan analyytiksi (engl. analyte). Jos näyte sisältää analyyttiä (Kuvio 4a, violetit pallot), se sitoutuu kuoppalevyn pintaan tarttuneeseen vasta-aineeseen. Sitoutumaton materiaali pestään pois.

Seuraavaksi lisätään sopivalla merkkiaineella leimattua sekundaarivasta-ainetta (HRP). Sekundaarivasta-aine sitoutuu analyyttiin (Kuvio 4b). Sitoutumaton sekundaarivasta-aine pestään pois.

Substraatin (TMB) lisäys saa aikaan entsyymireaktion, joka voidaan havaita värin muodostumisena (engl. blue, kuvio 4c). Värin muodostuminen on sitä

voimakkaampaa, mitä enemmän näytteessä on ollut analyyttiä. Lopuksi lisätään lopetusliuos (engl. stop), joka lopettaa värinmuodostusreaktion ja muuttaa värin mitattavalle aallonpituudelle. Muodostuneen värin voimakkuus mitataan fotometrillä. (rndsystems.)



Kuvio 4. ELISA-menetelmän vaiheet (rndsystems)

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on parantaa neuroborreliainfektion laboratoriodiagnostiikkaa. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida CXCL13-määritys likvorista ja laatia validointiraportti Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen diagnostiselle palvelutoiminnalle.

Opinnäytetyö toteutettiin määrittämällä likvornäytteistä CXCL13-pitoisuuksia. Määritykset tehtiin R&D Systemsin Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 ELISA –kitillä.

Tutkimustehtävänä oli selvittää soveltuuko likvorin CXCL13-määritys neuroborreliainfektion diagnostiikkaan ja antibioottihoidon vaikutus likvorin CXCL13-pitoisuuteen.

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen diagnostiselle palvelutoiminnalle. Oppiaine oli tämän opinnäytetyön toimeksiantaja ja antoi käyttöön tilojen lisäksi tutkimusaineiston, CXCL13-määritysten tekoon tarvittavat välineet ja reagenssit. Opinnäytetyön tutkimusaineisto koostui lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineelle lähetetyistä likvornäytteistä. Opinnäytetyössä analysoitiin likvornäytteistä CXCL13-pitoisuudet. Määritykset tehtiin R&D Systemsin Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 ELISA –kitillä. Kyseinen kitti valittiin, koska sitä oli käytetty niissä tutkimuksissa, joissa oli määritetty likvorin CXCL13-pitoisuutta. Opinnäytetyön tulosten perusteella laadittiin validointiraportti toimeksiantajalle.

4.1 Tutkimusaineiston kuvaus

Tutkimusaineisto koostui likvornäytteistä. Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja antoi tekijöille käyttöön näytearkistonsa, josta tekijät toimeksiantajan edustajan ohjauksella poimivat tässä tutkimuksessa tarvittavan tutkimusaineiston. Tutkimusaineisto oli yhteensä 160 likvornäytettä. Tutkimusaineisto kerättiin vuosina 2011 ja 2012 toimeksiantajan näytearkistoon tallennetuista likvornäytteistä. Arkistoinnin yhteydessä näytteet oli identifioitu juoksevalla numeroinnilla, joten henkilötietoja ei tarvinnut käyttää. Identifiointinumeroinnin ansiosta näytteet oli helppo löytää arkistosta. Näytteet oli säilytetty pakastettuna -20°C:ssa lämpötilaseurannassa olevassa näytearkistossa.

Neuroborreliainfektiodiagnoosiin liittyviä näytteitä (Taulukko 1) oli yhteensä 68. Näistä 28 oli näytteitä, joissa potilaalla oli todettu akuutti neuroborreliainfektio. Näistä neuroborreliainfektiopotilaista 21:ltä oli otettu seurantanäyte antibiottihoidon jälkeen. Kliinisen kuvan perusteella 19 potilaalla oli epäilty neuroborreliainfektiota, mutta vasta-ainemäärityksellä tätä diagnoosia ei oltu saatu varmistettua.

Keskushermoston virusinfektiopotilaiden likvornäytteitä oli yhteensä 54. Näistä kolme oli näytettä, joissa potilaalla oli nukleinihapon osoituksella todettu ihmisen herpesvirus 6 (HHV6) –infektio. Näytteistä 18 oli potilailta, joilla oli nukleinihapon osoituksella todettu Varizella Zoster -infektio ja kahdeksan oli potilailta, joilla oli todettu enterovirusinfektio. Herpes simplex -infektio oli nukleinihapon osoituksella todettu 15 näytteestä. Kymmenen näytteistä oli potilailta, joilla oli vasta-ainemäärityksellä todettu puutiaisaivokuume (TBE).

Tutkimusaineistossa oli yksi neurosyfilispotilaan likvornäyte. Lisäksi mukana oli 37 likvornäytettä, joista oli löydetty oligoklonaalisia IgG-vasta-aineita (Li-OC-IgG). Tämä viittaa MS-tautiin.

Taulukko 1. Tutkimusaineisto

Sairaus	Näytteiden lukumäärä
Neuroborreliainfektio	68
<i>akuutti infektio</i>	28
<i>hoidon jälkeen</i>	21
<i>epäily klinisen kuvan perusteella</i>	19
Neurosyfilis	1
MS-tauti (Li-OC-IgG)	37
VZV	18
HSV	15
HHV6	3
enterovirus	8
TBE	10

Kaikista näytteistä määritettiin CXCL13-pitoisuus. Jos tulos ylitti reagenssikitin valmistajan määrittämän ylärajan (500pg/ml), näyte analysoitiin uudelleen 1:10 tai 1:100 laimennettuna.

4.2 Opinnäytetyön metodologia

Metodin määritelmä on, että se on sääntöihin perustuva menetelmätapa. Tämän sääntöihin perustuvan menetelmätavan tarkoituksena on tieteessä etsiä tietoa ja ratkoa käytännön ongelma. (Hirsjärvi ym. 2012, 170-171.)

Tämä opinnäytetyö on menetelmältään kvantitatiivinen, sillä keskeiset tämän opinnäytetyön sisällön rakenteelliset kohdat tukivat kvantitatiivisuutta voimakkaasti. Hirsjärven mukaan kvantitatiiviseen tutkimusotteeseen kuuluvat mm. johtopäätökset edellisistä tutkimuksista, käsitteiden määrittely, numeeriseen mittaamiseen soveltuva koejärjestely, taulukkomuotoinen muuttujajoukko sekä edellisestä jatkumona aineiston tilastollinen käsittely sekä päätelmien ja havaintojenteko tilastollisiin analyyseihin perustuen (Hirsjärvi ym. 2012, 140-141). Tämä opinnäytetyö on lisäksi otteeltaan toiminnallinen, sillä tuotoksena syntyi validointiraportti toimeksiantajalle. Toiminnallisuus tässä opinnäytetyössä vastaa käytännöstä kumpuavaan tarpeeseen ja toimeksiannosta teorian kautta syntyi tuotos vastaamaan tätä tarvetta (Vilkka & Airaksinen 2003, 9).

Aiemmat tutkimukset aiheesta ovat päätyneet johtopäätökseen, että neuroborreliainfektion diagnostiikassa CXCL13-määritys on nopea ja tarkka menetelmä. Samoin on päädytty siihen, että erotusdiagnostiikassa ko. määritys on yleensä pätevä. Tämän opinnäytetyön keskeiset käsitteet ovat neuroborreliainfektio, likvor, CXCL13 ja validointi, jotka on kuvattu opinnäytetyössä. Tämän opinnäytetyön tutkimusaineiston laajuuteen ei pystytty vaikuttamaan. Työn empiirisen osan aikana saadut tulokset taulukoitiin ja käsiteltiin tilastollisesti. Tämän opinnäytetyön määritysten tuloksina ja johtopäätöksenä voidaan todeta soveltuuko CXCL13-määritys neuroborreliainfektion diagnostiikkaan lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineessa ja onko määritys luotettava.

4.3 Opinnäytetyön eettisyys

Tutkimuseettinen toimikunta on ohjeessaan listannut hyvän tieteellisen käytännön perusteiksi seuraavat arvot: rehellisyys, avoimuus, kunnioitus, vaatimusten noudattaminen, lupalähtöisyys, oikeuksien kartoitus, sidonnaisuuksien ilmoittaminen, esteellisyyspykälän käyttö sekä hyvä henkilöstö- ja taloushallinto ja tietosuojan toteuttaminen. Pääsääntö vastuusta hyvän tieteellisen käytännön noudattamisessa kuuluu tutkijalle itselleen, mutta hän on vastuullinen myös huolehtimaan tutkimusryhmiensä toimista. Tiedeyhteisön hyvä tieteellinen käytäntö on

kollegiaalista, vastuu on koko yhteisöllä. Tieteellisen käytännön opettaminen ja siihen perehdytys kuuluvat yliopistojen ja ammattikorkeakoulujen vastuuseen. Tutkimuslaitokset puolestaan ovat vastuussa eettisen opetuksen saatavuudesta henkilökunnan koulutuksina. (Tutkimuseettisen toimikunnan ohje 2012, 3-4.)

Tutkimushankkeen valinta, tutkimuksen toteuttaminen ja saatujen tutkimustulosten julkaiseminen ovat ne asiat, joita kutsutaan tutkimusetiikaksi. Tutkimuksen pohjalta sovellettavan tiedon käyttö ja saavutettujen hyötyjen ja haittojen tarkastelu yhteiskunnallisella sekä yksilötasolla kuuluvat myös olennaisesti etikan piiriin. (Ryynänen & Myllykangas 2000, 75.)

Henkilötietolaki 22.4.1999/523 määrittelee yksityiselämän suojan turvaavat perusoikeudet sekä hyvän tietojenkäsittelytavan. Laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta 21.5.1999/621 määrittelee vaitiolovelvollisuuden, asiakirjojen ja muiden tietojen salassapidon ja viranomaisten velvollisuuden lain toteutumisen valvonnasta. (Finlex.)

Tämä opinnäytetyö on suunniteltu ja toteutettu eettisten periaatteiden mukaisesti hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Tutkimushankkeen valinta nousi lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen käytännön tarpeen pohjalta. Oppiaineen edustaja ja tämän opinnäytetyön tekijät solmivat toimeksiantosopimuksen (liite 2). Potilailta ei ole erikseen tätä opinnäytetyötä varten kerätty likvornäytteitä. Analysoidut näytteet olivat peräisin lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen näytearkistosta, joka koostuu oppiaineelle lähetetyistä näytteistä. Lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineella on lupa käyttää näytearkistoaan tutkimustoimintaan. Opinnäytetyöntekijät tunnustavat toimineensa tutkimuseettisen toimikunnan listaamien arvojen mukaisesti ja tunteneensa vastuun hyvän tieteellisen käytännön vaatimista toimista käytännön työskentelyssään.

Opinnäytetyön tekijöitä sitoo vaitiolovelvollisuus koskien analysoitujen näytteiden potilastietoja. Analyysien tuloksia ei yhdistetty yksittäisiin potilaisiin ja potilastietojen ja saatujen määritystulosten säilyttämisessä noudatettiin tietosuojaa kunnioittavaa tapaa. Opinnäytetyöntekijät noudattivat henkilötietolaissa ja laissa

viranomaisten toiminnasta julkisuudessa säädettyjä opinnäytetyöhön liittyviä kohtia.

4.4 CXCL13-määritys

Tämän opinnäytetyön empiirisessä vaiheessa määritettiin CXCL13-pitoisuuksia R&D Systemsin Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 ELISA –kitillä (tuotenumero: DCX130) (Kuvio 5). Kitti sisälsi määrittämiin tarvittavat reagenssit sekä 96-kuoppalevyn, jonka kuopat oli päällystetty CXCL13:n vasta-aineella. CXCL13-määrittämissä noudatettiin kitin mukana toimitettua valmistajan työohjetta.

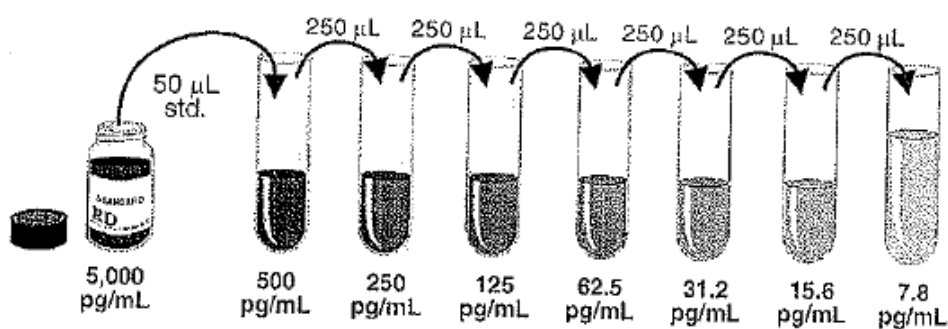


Kuvio 5. R&D Systemsin Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 ELISA –kitin sisältö.

Reagensseja säilytettiin ohjeen mukaisesti +4°C:ssa. Näytteet olivat -20°C:ssa lämpötilaseurannassa olevassa näytearkistossa. Näytearkiston lämpötilaa seurataan säännöllisesti kalibroidulla lämpömittarilla ja seurantadokumentit arkis-

toidaan. Ennen määrittämisen aloittamista näytteiden annettiin sulaa huoneenlämmössä ja reagenssien annettiin lämmetä huoneenlämpöön. Sulaneet näytteet sekoitettiin koeputkiravistelijalla, jotta näytteet saatiin tasalaatuisiksi. Kylmäkuivattu BLC/BCA-1 standardi liuotettiin 1 ml:aan ionivaihdettua vettä. Liuos valmistettiin vähintään 15 minuuttia ennen käyttöä. Saadun liuoksen pitoisuus oli 5000 pg/ml.

CXCL13-standardisuoraa varten tehtiin laimennussarja (Kuvio 6). Aluksi otettiin kahdeksan 4ml:n koeputkea ja merkittiin ne seuraavasti: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml ja 0 pg/ml. Sitten pipetoitiin 450 µl Calibrator Diluent RD6-41:ia ensimmäiseen (500 pg/ml) koeputkeen. Seuraavaksi pipetoitiin 250 µl Calibrator Diluent RD6-41:ia seitsemään jäljelle jääneeseen putkeen. BLC/BCA-1 standardipullo sekoitettiin huolellisesti ja pipetoitiin siitä 50 µl ensimmäiseen (500 pg/ml) putkeen. Tämä putki huolellisesti ja pipetoitiin siitä 250 µl seuraavaan (125 pg/ml) putkeen. Tästä putkesta siirrettiin huolellisen sekoituksen jälkeen 250 µl taas seuraavaan ja näin jatkettiin toiseksi viimeiseen putkeen saakka. Viimeiseen putkeen (0 pg/ml) ei pipetoitu enää mitään, vaan siinä oli pelkästään Calibrator Diluent RD6-41 –liuosta.



Kuvio 6. Laimennussarjan teko standardisuoraa varten (R&D Systems 2010, 6)

Seuraavaksi otettiin tarvittava määrä 96-kuoppalevyn kuoppia ja laitettiin ne levykehikkoon. Ylimääräiset liuskat suljettiin takaisin säilytyspussiinsa ja palautettiin +4°C:een.

Kuoppalevyn kaikkiin kuoppiin pipetoitiin 100 µl Assay Diluent RD1S – laimennusliuosta. Tämän jälkeen pipetoitiin 50 µl standardilaimennuksia ja näytteitä kuopille ennalta laaditun pipetointisuunnitelman mukaisesti, jossa standardit ja näytteet olivat tietyillä paikoilla. Kuoppalevy peitettiin kitin mukana tulleella levyteipillä ja inkuboitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä. Inkubaation aikana laimennettiin pesuneste mittaamalla 20 ml pesupuskuritiivistettä 500 ml:n lasipulloon ja laimentamalla se 480 ml:lla ionivaihdettua vettä. Pesunestettä ei tehty joka määrityskerralle uutta, vaan sitä säilytettiin +4°C:ssa, jossa se säilyi kuu-kauden laimennuspäivästä.

Inkubaation jälkeen standardi- ja näytelaimennokset kaadettiin kuopista pois pesualtaaseen. Kuopat pestiin pipetoimalla niihin monikanavapipetillä 300 µl laimennettua pesunestettä. Pesuneste kaadettiin kuopista pesualtaaseen. Pesunestettä pipetoitiin kuoppiin vielä kolme kertaa. Kuopat pestiin yhteensä neljä kertaa. Viimeisen pesunesteen kaatamisen jälkeen kuoppalevyä taputettiin napakasti käsipaperiin muutaman kerran, jotta kaikki pesunesteet saatiin pois.

Pesujen jälkeen kaikkiin kuoppiin pipetoitiin 200 µl BLC/BCA-1 konjugaattia. Levy peitettiin uudella levyteipillä ja inkuboitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä. Aivan inkubaation lopussa valmistettiin substraattiliuos sekoittamalla väri-reagenssit A ja B keskenään 50 ml:n lasipullossa. Substraattiliuos säilytettiin valolta suojattuna kuoppiin pipetointiin saakka, sillä se oli valoherkkää.

Konjugaatti-inkubaation jälkeen toistettiin levyn pesut kuten edellä (neljä kertaa). Pesujen jälkeen kuoppiin pipetoitiin 200 µl substraattiliuosta. Levyä ei enää peitetty levyteipillä. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä, pimeässä 30 minuuttia.

Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 50 µl lopetusliuosta, jolloin kuopissa olevan liuoksen väri muuttui sinisestä keltaiseksi. Kuoppien absorbanssi mitattiin MultiScan –laitteella aallonpituudella 450 nm. Laitteeseen oli tehty ohjelma, joka laski näytteiden CXCL13-pitoisuudet. (R&D Systems 2010, 4-7.)

Valmistajan ilmoittama mittausalue CXCL13-määritykselle on 7,8-500 pg/ml. Tämä tarkoittaa, että käytetyllä kitillä voitiin määrittää CXCL13-pitoisuus niistä

näytteistä, joiden pitoisuus oli välillä 7,8-500 pg/ml. Näytteet määritettiin laimentamattomina. Jos laimentamattoman näytteen pitoisuus oli yli 500 pg/ml, se laimennettiin 1:10 tai 1:100 Calibrator Diluent RD6-41-laimennuspuskurilla. Laimennuksen avulla voitiin määrittää todellinen CXCL13-pitoisuus kertomalla tulos laimennuskertoimella.

4.5 Validointi

4.5.1 Spesifisyyden testaus

CXCL13-määrittämisen soveltumista spesifisti neuroborreliainfektion diagnostiikkaan testattiin määrittämällä neuroborreliainfektiopotilaiden likvornäytteitä ja muita keskushermoston tulehdustiloja sairastavien potilaiden likvornäytteitä. Määrittäytuloksia vertailtiin keskenään. Muita tulehdustiloja olivat eri keskushermoston virusinfektiot (VZV-, HSV-, HHV6-, TBE-, ja enterovirusinfektiot), neurosyfilis ja MS-tauti. Antibioottihoidon vaikutusta CXCL13-pitoisuuteen tutkittiin määrittämällä CXCL13-pitoisuus pariliqvoreista, joista ensimmäinen näyte oli otettu ennen hoitoa ja toinen näyte hoidon jälkeen.

4.5.2 Toistettavuuden ja lineaarisuuden testaus

CXCL13-määrittämisen toistettavuutta testattiin sarjan sisällä (intra-assay) siten, että samaa näytettä analysoitiin samassa sarjassa neljänä rinnakkaisena määrittäytksenä. Toistettavuutta testattiin kahdella näytteellä, joiden pitoisuudet olivat n. 200 pg/ml ja yli 500 pg/ml. Näin tehtiin, koska haluttiin testata onko menetelmä toistettava eri pitoisuuksissa. Toistettavuusnäytteet laimennettiin 1:10, jotta näytteen, jonka pitoisuus on yli 500 pg/ml, tulos laskisi valmistajan ilmoittamalle mittausalueelle (7,8-500 pg/ml). Sarjan sisäistä toistettavuutta testattiin kolme kertaa.

Sarjojen välistä toistettavuutta (inter-assay) testattiin siten, että sama näyte analysoitiin kuudessa eri sarjassa. Molemmat tämän opinnäytetyöntekijät tekivät em. sarjojen määritykset. Molemmat määrittivät sarjan kolme kertaa.

Menetelmän lineaarisuutta testattiin tekemällä pitoisuudeltaan yli 500 pg/ml olevasta CXCL13-näytteestä laimennossarja (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 ja 1:128) ja määrittämällä se. Lineaarisuutta testattiin kolme eri kertaa.

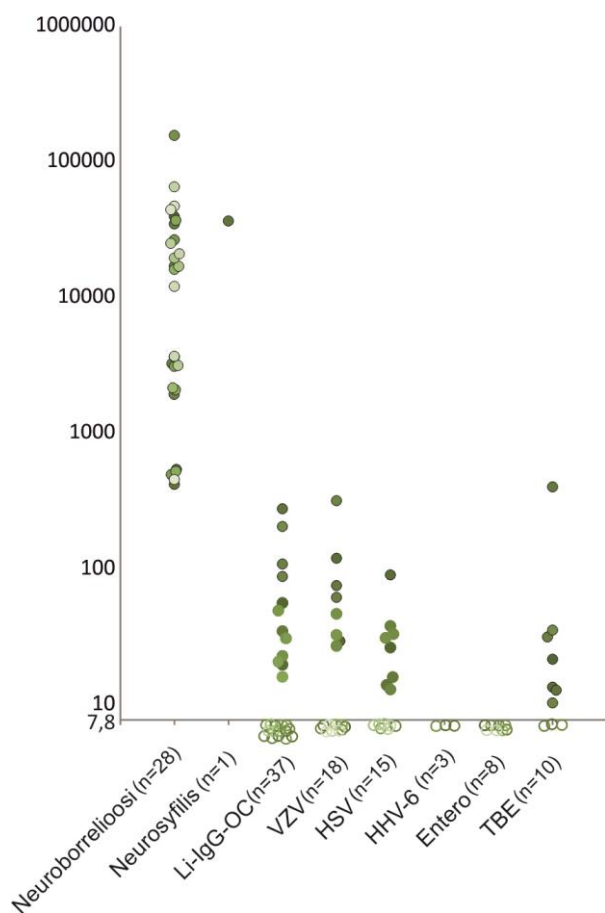
5 TULOKSET

5.1 Spesifisyyden testaus

Spesifisyyttä testattiin määrittämällä CXCL13-pitoisuuksia neuroborreliainfektiopotilaiden likvornäytteistä ja muita keskushermoston tulehdustiloja sairastavien potilaiden likvornäytteistä. Tuoretta neuroborreliainfektiota sairastavien potilaiden näytteitä oli 28. Näiden näytteiden CXCL13-pitoisuudet olivat välillä 424 – 158030 pg/ml. Neurosyfilispotilaiden näytteitä oli yksi. Sen CXCL13-pitoisuus oli 36998 pg/ml. MS-tautiin viittaavia näytteitä (Li-IgG-OC) oli 37 ja keskushermoston virusinfektiota sairastavien näytteitä (VZV, HSV, HHV-6, entero ja TBE) oli yhteensä 54. Näissä tautitiloissa likvorin CXCL13-pitoisuudet olivat välillä <7,8-406 pg/ml. 7,8 pg/ml oli reagenssikitin valmistajan ilmoittama mittausalueen alaraja. Tätä pienempiä pitoisuuksia ei kitillä voitu luotettavasti määrittää. Neuroborreliainfektioon viittaavana voidaan pitää likvorin CXCL13-pitoisuutta 500 pg/ml. (Taulukko 2., Kuvio 7.)

Taulukko 2. CXCL13-pitoisuudet neuroborreliainfektiossa sekä muissa keskushermoston tulehdustiloissa.

	Neuroborreliainfektio	Virukset ja Li-IgG-OC
ka	21925,6	28,1
sd	32132,4	66,1
min	424	<7,8
max	158030	406,4
ka+3sd		226,6

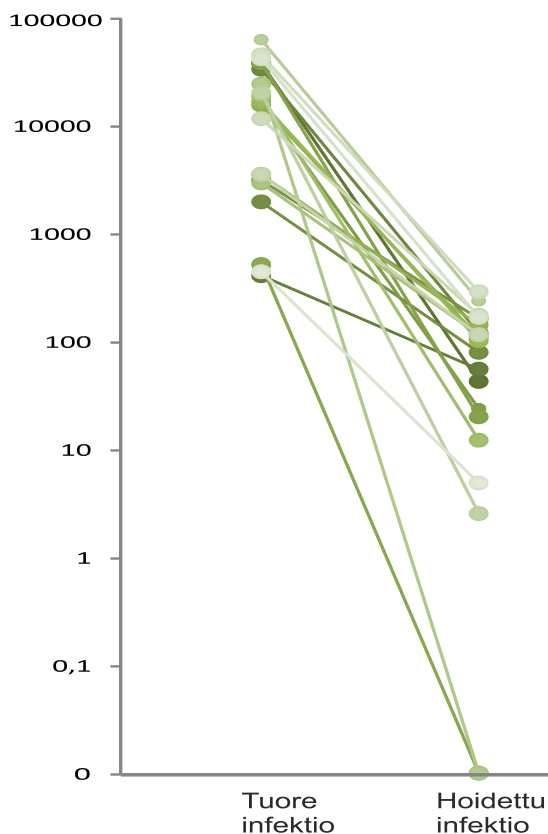


Kuvio 7. Likvorin CXCL13-pitoisuudet keskushermoston eri tulehdustiloissa.

Antibiootihoidon vaikutusta testattiin määrittämällä pariliikvoroita, joita oli 21. Ensimmäisen ja toisen näytteen otossa eroa oli 17-225 vrk (ka 55 vrk) (Taulukko 3). Jokaisen hoidon jälkeen otetun näytteen CXCL13-pitoisuus oli ennen hoitoa otetun näytteen pitoisuutta matalampi. Hoidon myötä neuroborreliainfektiopotilaiden likvorin CXCL13-pitoisuudet laskivat selvästi. (Kuvio 8).

Taulukko 3. Antibioottihoidon vaikutus likvorin CXCL13-pitoisuuteen ja ensimmäisen näytteen ja seurantanäytteen oton välinen aika.

CXCL13-pitoisuus		näytteiden väli (vrk)
Tuore LNB-infektio	Hoidettu LNB-infektio	
40012	44	21
424	57	19
35170	124	27
2051	82	21
3270	168	25
17241	24,5	20
40476	20,6	137
536,7	0,01	112
16300	113	22
3683,9	147	20
17562	105	26
19745	12,5	30
3072	119,5	29
25653	0,01	225
66108	246,7	25
21212	2,6	110
3715,1	119,6	20
12203	181,3	17
47670	299,9	22
43944	173	29
460,1	5	195
ka	20024	55



Kuvio 8. Hoidon vaikutus likvorin CXCL13-pitoisuuteen neuroborreliainfektiossa.

5.2 Toistettavuuden ja lineaarisuuden testaus

Toistettavuus ilmaistaan samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä saatujen tulosten suhteellisen keskihajontana (CV%). CV% määritetään kaavalla keskihajonta/keskiarvo \times 100. Tulosten suhteellisen keskihajonnan tulisi olla alle 20%. Lähellä pitoisuudenmääritysrajaa suhteellisen keskihajonnan tulisi olla alle 30%. (Guidance for Industry, Biological Method Validation 2011, 5.)

Sarjan sisäistä toistettavuutta (intra-assay) testattiin kolme kertaa kahdella eri näytteellä (Näyte 1 ja Näyte 2, taulukko 4). Näytteen 1 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli ensimmäisellä määrittyskerralla 185,8 pg/ml. Keskihajonta oli 5,6 pg/ml ja CV% 3,0. Toisella määrittyskerralla näytteen 1 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli 92,5 pg/ml, keskihajonta 3,1 pg/ml ja CV% 3,4. Kolmannella kerralla näytteen 1 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli 200,7 pg/ml, keskihajonta 38,7 pg/ml ja CV% 19,3. Näytteen 2 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli ensimmäisel-

lä määrittyskerralla 4240,3 pg/ml. Keskihajonta oli 332,9 pg/ml ja CV% 7,9. Toisella määrittyskerralla näytteen 2 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli 3147,9 pg/ml, keskihajonta oli 114,0 pg/ml ja CV% 3,6. Kolmannella määrittyskerralla näytteen 2 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli 2784,3 pg/ml, keskihajonta 59,7 pg/ml, CV% 2,1. Molemmilla näytteillä CV% oli jokaisella kerralla alle suositetun 20%.

Taulukko 4. Sarjan sisäisen toistettavuuden testauksen tulokset

Sarjan sisäinen toistettavuus						
	Näyte 1			Näyte 2		
ka	185,8	92,5	200,7	4240,3	3147,9	2784,3
sd	5,6	3,1	38,7	332,9	114,0	59,7
CV%	3,0	3,4	19,3	7,9	3,6	2,1

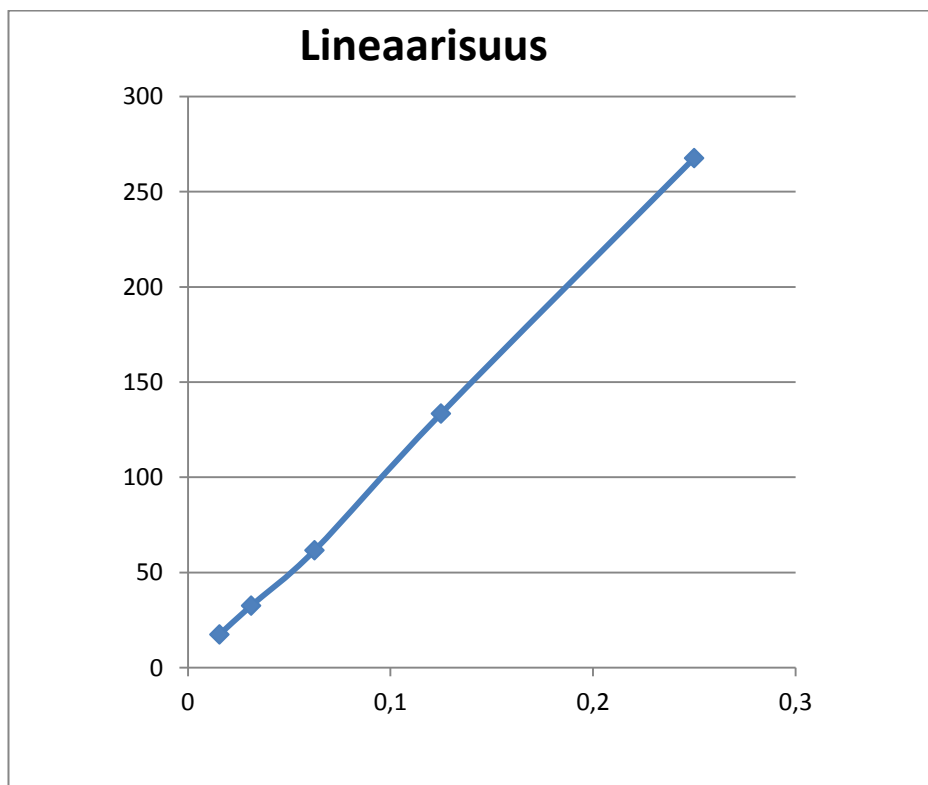
Sarjojen välistä toistettavuutta (inter-assay) testattiin määrittämällä näyte 2 kuudessa eri sarjassa. Näissä määrittäyksissä näytteen 2 CXCL13-pitoisuuden keskiarvo oli 2921 pg/ml, keskihajonta oli 779,7 pg/ml ja CV% 26,7 (taulukko 5). Se on yli suositetun 20%.

Taulukko 5. Sarjojen välisen toistettavuuden testauksen tulokset

Sarjojen välinen toistettavuus	
Näyte 2	
ka	2921
sd	779,7
CV%	26,7

Lineaarisuuden testauksen tuloksista piirrettiin kuvaaja pitoisuus vs. laimennos (Kuvio 9). Lineaarisuutta testattiin kahdeksan laimennoksen sarjalla. Näistä

kahden vahvimman (1:1 ja 1:2) pitoisuudet olivat yli reagenssikitin valmistajan ilmoittaman määritysrajan (500 pg/ml) ja laimein (1:128) oli alle alimman määritysrajan (7,8 pg/ml). Tämän vuoksi näitä laimennoksia ei ole käytetty lineaarisuutta kuvaavassa kuvaajassa. Kuvaajassa vallitsee lineaarinen korrelaatio, joten menetelmän voidaan todeta olevan lineaarinen.



Kuvio 9. Lineaarisuuden testauksen tulokset

Tämän opinnäytetyön tutkimuksen tulokset on esitetty myös toimeksiantajalle laaditussa validointiraportissa (Liite 1).

6 TULOSTEN TULKINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän opinnäytetyön tulokset osoittavat, että likvorin CXCL13-määritys soveltuu neuroborreliainfektion diagnostiikkaan. Tämän opinnäytetyön tulokset vastaavat tuloksia, joita Rupprecht ym., Ljøstad ja Mygland sekä Schmidt ja van Burgel kollegoineen ovat raportoineet (Rupprecht ym. 2005, 448; Ljøstad & Mygland 2008, 737; Schmidt ym. 2011, 1057; van Burgel ym. 2011, 2029). Schmidt ym. tutkivat likvorin CXCL13-pitoisuuksia erilaisissa keskushermoston sairauksissa (Schmidt ym. 2011, 1054). Tässä opinnäytetyössä määritettiin CXCL13-pitoisuuksia osittain samoissa sairauksissa (hoitamaton ja hoidettu neuroborreliainfektio, VZV-, HSV-, HHV6-, enterovirus- ja TBE-meningiitit, MS-tauti). Tämän opinnäytetyön tulokset ovat samanlaiset Schmidtin ym. esittämien tulosten kanssa. CXCL13-pitoisuudet nousevat neuroborreliainfektiossa huomattavasti korkeammalle tasolle, kuin keskushermoston virusinfektioissa ja MS-taudissa. Neuroborreliainfektioon viittaa, jos likvorin CXCL13-pitoisuus on 500 pg/ml tai yli.

Tässä opinnäytetyössä havaittiin antibioottihoidon vaikutus likvorin CXCL13-pitoisuuteen (Kuvio 8). Havainto oli samansuuntainen Rupprechtin ym. sekä Senelin ym. kanssa. CXCL13-pitoisuudet likvorissa laskevat hoidon myötä. (Rupprecht ym. 2005, 448; Senel ym. 2010, 932.)

Neurosyfiliksen on todettu myös nostavan likvorin CXCL13-pitoisuuksia. Syfiliksen aiheuttaja on *Treponema pallidum* –bakteeri ja se kuuluu spirokeettoihin, aivan kuten borrelia–bakteerikin. (Senel ym. 2009, 932; Rupprecht ym. 2009, 6). Neurosyfilispotilaan korkea CXCL13-pitoisuus todettiin myös tässä opinnäytetyössä (Kuvio 7).

R&D Systems on CXCL13-määrityksen reagenssikitin valmistajana tehnyt omat toistettavuus- ja lineaarisuustestauksensa. Valmistaja on todennut menetelmän lineaariseksi pitoisuusalueella 7,8-500 pg/ml. Samoin valmistaja on todennut menetelmän toistettavaksi sekä sarjojen sisällä että niiden välillä. (R&D Systems 2010, 4-7.) Hyvään laboratoriotointaan kuitenkin kuuluu aina tehdä uu-

den menetelmän validointi ennen sen käyttöön ottoa. Toistettavuus- ja lineaarisuustestaukset ovat osa validointia. Tässä työssä R&D Systemsin CXCL13-määritys todettiin lineaariseksi pitoisuusalueella 7,8-500 pg/ml. Jos näytteen pitoisuus on yli 500 pg/ml, se tulee laimentaa, jotta saadaan selville näytteen todellinen CXCL13-pitoisuus.

Tämän työn tulosten perusteella voidaan todeta R&D Systemsin CXCL13-määrityksen olevan toistettava. Sarjan sisäistä toistettavuutta testattaessa CV%:t olivat joka kerta alle 20%. Sarjojen välisen toistettavuuden CV% oli yli suositetun 20%. Se oli 26,7%. Tätä voidaan kuitenkin pitää vielä hyväksyttävänä. Valmistajan saamat CV%:t ovat olleet alle 10%. Kokonaisuutena menetelmän voidaan todeta olevan toistettava ja toimeksiantajan edustaja hyväksyi toistettavuustuloksen sekä opinnäytetyön muut tulokset.

7 POHDINTA

Tämä opinnäytetyö onnistui tarkoituksessaan validoida likvorin CXCL13-määritys. Tutkimustehtävät saatiin suoritettua. Voitiin todeta, että CXCL13-määritys soveltuu neuroborreliainfektion diagnostiikkaan. Tässä opinnäytetyössä todettiin, että antibiootihoidon myötä CXCL13-pitoisuudet likvorissa laskevat. Validoinnista laadittiin validointiraportti toimeksiantajalle, Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian oppiaineen diagnostiselle palvelutoiminnalle. Validoinnin perusteella toimeksiantaja saattoi ottaa likvorin CXCL13-määrityksen tutkimusvalikoimaansa. Tämä parantaa neuroborreliainfektion laboratoriodiagnostiikkaa. Tämän opinnäytetyön tavoitetta lähennyttiin.

Yhteistyö toimeksiantajan ja opinnäytetyön tekijöiden kesken sujui hyvin. Toimeksiantaja tarjosi opinnäytetyön tekijöiden käyttöön laboratoriotilan, välineet ja reagenssikitit, joilla suoritettiin validoinnissa tarvittavat CXCL13-määritykset. Lisäksi toimeksiantajan edustajalta saatiin tarvittaessa apua CXCL13-määrityksiin liittyvissä kysymyksissä. Opinnäytetyön tehneen työparin kesken yhteistyö sujui hyvin. Työnjakoon liittyvät kysymykset ratkaistiin yhteisymmärryksessä.

Aikataulussa pysyttiin laboratoriotöiden osalta. Laboratoriotyöt toteutettiin tammi-kesäkuussa 2013. Opinnäytetyön toimeksiantaja toivoi, että validointiraportti oli valmis kesäkuun lopussa. Validointiraportti oli valmis 27.6.2013. Toimeksiantaja otti likvorin CXCL13-määrityksen tutkimusvalikoimaansa 1.7.2013. Opinnäytetyön raportille laadittu aikataulu oli liian tiukka. Alkuperäisen suunnitelman mukaan opinnäytetyön raportin piti olla valmis kesällä 2013. Tämä ei toteutunut. Opinnäytetyön raportti valmistui marraskuussa 2013.

Opinnäytetyö toteutettiin eettisten periaatteiden mukaisesti huomioiden hyvän tieteellisen käytännön perusteiden arvot. Opinnäytetyön tekijät ovat noudattaneet eettisiä periaatteita harkitessaan opinnäytetyön hyötyjä ja haittoja. Opinnäytetyön tekijät ovat vaitiolovelvollisia koskien määritettyjen näytteiden potilas-

tietoja. Määritysten tuloksia ei tässä opinnäytetyössä yhdistetty yksittäisiin potilaisiin.

Opinnäytetyön tuloksien luotettavuutta lisää se, että molemmat opinnäytetyöntekijät ovat laillistettuja laboratoriohoitajia, joilla on vankka kokemus tässä opinnäytetyössä käytetystä ELISA -tekniikasta. Molemmat opinnäytetyöntekijät ovat myös työskennelleet Turun yliopistolla tieteellisen tutkimuksen parissa ja ovat perehtyneet yliopiston laatujärjestelmään sekä hyvään tieteelliseen käytäntöön. CXCL13-määritysten huolellinen suorittaminen ja dokumentointi lisäävät osaltaan opinnäytetyön tulosten luotettavuutta. Näiden dokumenttien perusteella on mahdollista toistaa tämän opinnäytetyön empiirinen osa. Tässä opinnäytetyössä käytetyt CXCL13-reagenssikitit oli säilytetty valmistajan ohjeiden mukaan. Kaikki määritykset tehtiin reagenssikitin valmistajan ohjeiden mukaan. Käytetyt välineet olivat asianmukaisesti kalibroituja ja huollettuja.

CXCL13-määritysten tulosten luotettavuutta olisi voitu parantaa määrittämällä näytteet rinnakkaisina. Tähän seikkaan opinnäytetyöntekijät eivät voineet vaikuttaa. Määritysten koeasetelmat olivat toimeksiantajan määrittelemiä. CXCL13-reagenssikitin valmistajan valikoimissa on myös positiivinen kontrolli CXCL13-määrityksiin. Tämän käyttö olisi voinut lisätä määritysten luotettavuutta entisestään.

Jatkoksi tämän opinnäytetyön tutkimukselle voisi olla tutkimus pitkäaikaisen jääkaapissa säilyttämisen vaikutus likvornäytteen CXCL13-pitoisuuteen. Viive näytteenoton ja näytteen laboratorioon saapumisen välillä voi joskus olla jopa päiviä. Lisäksi näyte voi joutua odottamaan laboratoriossa ennen analysointia. Oikeat lähetys- ja säilytysolosuhteet ovat tärkeitä määrittelyn luotettavan tuloksen kannalta.

Toinen jatkotutkimusehdotus liittyy uusien neuroborreliainfektiioon liittyvien laboratoriotutkimusten etsimiseen. Neuroborreliainfektion diagnosointi voi olla vaikeaa. Oikea diagnoosi muodostuu useammasta tekijästä (potilaan esitiedot ja oireet, erilaisten laboratoriotestien tulokset). Jotta oikea diagnoosi saadaan luotettavasti muodostettua, tulisi eri osatekijöiden viitata samaan diagnoosiin. Mitä

useampi osatekijä viittaa samaan diagnoosiin, sitä luotettavammin voidaan diagnoosi muodostaa. Joskus yksittäinen osatekijä voi olla ristiriidassa muiden kanssa, esim. vasta-ainetulos voi olla negatiivinen. Yksittäisen osatekijän merkitys pienenee, jos niitä on monta. Yksi uusi osatekijä neuroborreliainfektion diagnostiikkaan voisi olla likvorin neopterin-määritys, jonka soveltumista siihen kannattaisi tutkia.

LÄHTEET

- Djukic, M.; Schmidt-Samoa, C.; Lange, P.; Spreer, A.; Neubieser, K.; Eiffert, H.; Nau, R.; Schmidt, H. 2012. Cerebrospinal fluid findings in adult with acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neurology* 259, 630-636.
- European Medicines Agency. 2011. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2012. Tutki ja kirjoita. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy.
- Hytönen, J.; Hartiala, P.; Oksi, J.; Viljanen, M.K. 2008. Borreliosis: recent research, diagnosis, and management. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 37, 161-172.
- Jaakola, S.; Lyytikäinen, O.; Rimhanen-Finne, R.; Salmenlinna, S.; Vuopio, J.; Roivainen, M.; Nohynek, H.; Löflund, J.-E.; Kuusi, M.; Ruutu, P. (toim.) 2013. Tartuntataudit Suomessa 2012. Terveystieteiden tutkimuskeskus. Raportti 10/2013.
- Jaarinen, S.; Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Jerrard, D.; Hanna, J.; Schindelhof, G. 2001. Cerebrospinal fluid. *The Journal of Emergency medicine* 21, 171-178.
- Kairisto, V. (toim.) 2010. TYKSLAB ja patologia ohjekirja 2010. Lahdenne, P.; Seppälä, I.J.T.; Peltomaa, M. 2001. Neuroborreliosis. *Duodecim* 117, 1425-1435.
- Lahdenne P.; Seppälä I.; Peltomaa M. 2001. Neuroborreliosis. *Duodecim*, 117, 1425-1435.
- Ljøstad, U.; Mygland, Å. 2008. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neurology* 255, 732-737.
- Lounamo, K. 2010. Punkkitaudit. Takiainen, tartuntatautiliitto ry:n lehti 2/2010, 16-25.
- Meri, S. & Julkunen, I. 2011. Luontaiset puolustusmekanismit. Teoksessa *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 2. Porvoo: Duodecim.
- Meri, T. & Meri, S. 2013. *Borrelia* kieroilee. *Tiede* 8/2013, 42-45.
- Mygland, Å.; Ljøstad, U.; Fingerle, V.; Rupprecht, T.; Schmutzhard, E.; Steiner I. 2010. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European journal of Neurology* 17, 8-16.
- Nienstedt, W.; Hänninen, O.; Arstila, A.; Björkqvist, S.-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia, 18. uudistettu painos, Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.
- Oksi, J.; Seppälä, I.; Hytönen, J. 2010. Borreliat, treponemat ja leptospiirit. Teoksessa *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Jyväskylä: Duodecim.
- Pachner, A.R.; Steiner, I. 2007. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. *Lancet Neurol* 6, June, 544-552.
- Rupprecht, T.A.; Plate, A.; Adam, M.; Wick, M.; Kastenbauer, S.; Schmidt, C.; Klein, M.; Pfister, H.-W.; Koedel, U. 2009. The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation* vol.6, 42, 1-11.

Rupprecht, T.A.; Koedel, U.; Fingerle, V.; Pfister, H-W. 2008. The pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation. *Molecular Medicine* vol.14, 3-4, 205-212.

Rupprecht, T.A.; Pfister, H.W.; Angele, B.; Kastenbauer, S.; Wilske, B.; Koedel, U. 2005. The chemokine CXCL13 (BLC): A putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology* vol. 65, 448-450.

Ryynänen, O-P; Myllykangas, M. 2000. Terveysthuollon etiikka. Juva: Werner Söderström Osakeyhtiö.

Schmidt, C.; Plate, A.; Angele, B.; Pfister, H-W.; Wick, M., Koedel, U., Rupprecht, T.A. 2011. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* vol. 76, 1051-1058.

Senel, M.; Rupprecht, T.A.; Tumani, H.; Pfister, H.W.; Ludolph, A.C.; Brettschneider, J. 2010. The chemokine CXCL13 in acute neuroborreliosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* vol 81, 8, 929-933.

Seppälä, I. & Meri, S. 2011a. Tulehdusreaktio. Teoksessa *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 2. Porvoo: Duodecim.

Seppälä, I. & Meri, S. 2011b. Immunologiset tutkimukset. Teoksessa *Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 3. Porvoo: Duodecim.

Ståhlberg, T.; Junnila, A. & Leppäkoski, E. 1994. Apua! Punkki, puutiainen ja sen levittämät taudit. Turku: Arkipelagia-seura.

Tumani, H.; Cadavid, D. 2011. Are high CSF levels of CXCL13 helpful for diagnosis of Lyme neuroborreliosis? *Neurology* vol. 76, 1034-1035.

van Burgel, N.D.; Bakels, F.; Kroes, A.C.M.; van Dam, A.P. 2011. Discriminating Lyme Neuroborreliosis from other diseases by level of CXCL13 in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical microbiology* Vol. 49, No 5, 2027-2030.

Sähköiset lähteet

ASM Microbe Library viitattu 3.10.2013

<http://www.microbelibrary.org/component/resource/search/1-microbe-library-objects>

www.finlex.fi viitattu 30.8.2013

Guidance for Industry, Biological Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug, Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) 2011

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> viitattu 3.10.2013

<http://www.medicinabih.info/2011/07/15/poremecaji-dinamike-cerbrospinalnog-likvora/> Viitattu 3.10.2013

http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_quantikineelisaassayprinciple.aspx viitattu 24.8.2013

Tutkimuseettinen toimikunta, ohje, 2012 Liite Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje (2012).pdf viitattu 5.7.2013

Utulab, laatuksikirja


MENETELMÄN VALIDOINTI
 (13361)

Tutkimus: Li-CXCL13

Raportti

27.6.2013

VALIDOITAVA MENETELMÄ

CXCL13-pitoisuuden määrittäminen likvorista

TAUSTAA

Neuroborreliosisin likvorista tehtävä laboratoriodiagnostiikka UTULabissa perustuu *Borrelia burgdorferi*-bakteerille spesifisten vasta-aineiden intratekaalisen tuotannon osoittamiseen potilaan likvornäytteessä. Neuroborreliosisin alkuvaiheessa intratekaaliset vasta-ainepitoisuudet eivät ole välttämättä ehtineet nousta mitattavalle tasolle. Toisaalta hoidetun neuroborreliosisin jälkeen vasta-aineet voivat pysyä koholla ainakin kuukausia, mikä vaikeuttaa mm. myöhemmin saadun uuden neuroborreliosisin diagnostiikkaa. CXCL13 on kemokiini, jonka pitoisuus nousee likvorissa todennäköisesti muutamia päiviä ennen vasta-ainetuotannon käynnistymistä. Pitoisuudet laskevat jyrkästi neuroborreliosisin antibiootihoidon myötä.

Validoitava menetelmä on entsyymi-immunologinen (sandwich EIA) ja perustuu kaupalliseen Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 Immunoassay –kittiin (R&D Systems, Inc.)

Kuoppalevyn kuopat on päällystetty CXCL13- spesifisillä monoklonaalisilla vasta-aineilla, johon näytteen CXCL13 sitoutuu. Sitoutunut CXCL13 havaitaan lisäämällä konjugaattia (entsyymileimattu CXCL13-spesifinen monoklonaalinen vasta-aine). Entsyymispesifisen substraatin lisäyksen jälkeen kuopat, joissa CXCL13 on sitoutunut vasta-aineisiinsa, muuttaa väriä. Värin kehitys lopetetaan lisäämällä kuoppiin rikkihappoa.

VALMISTAJAN VALIDOINNIT

Valmistajan ilmoittama toteamisraja on 1,64 pg/ml (vaihteluväli 0,43-3,97 pg/ml).

Valmistajan ilmoittama sarjan sisäinen sekä sarjojen välinen toistettavuus:

	CV -%
Sarjan sisäinen	2,7 – 4,3
Sarjojen välinen	8,7 – 9,6

**MENETELMÄN VALIDOINTI**

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

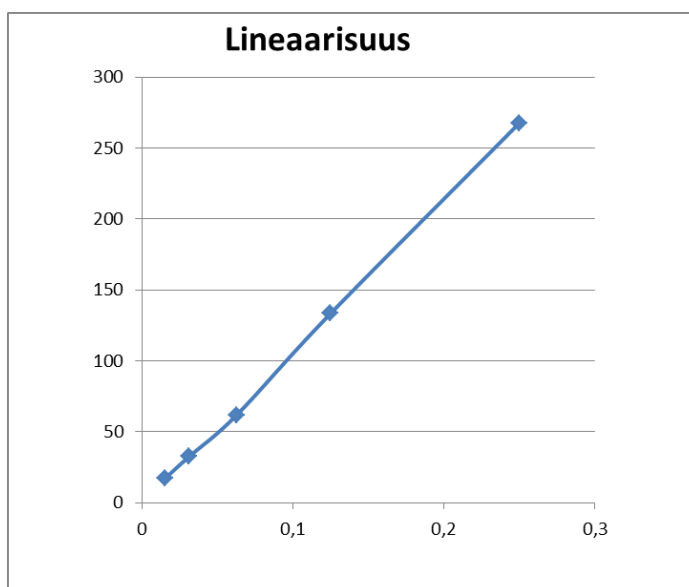
MATERIAALI

- Quantikine ELISA, Human CXCL13/BLC/BCA-1, R&D Systems, DCX130, lot 301299
- 160 potilaslikvornäytettä

VALIDOITAVAT PARAMETRIT**Lineaarisuus (linearity)**

Lineaarisuusalueella analyytin pitoisuuden ja mittaussignaalin välillä on lineaarinen riippuvuus. CXCL13-pitoisuuden määrittämisen lineaarisuutta testattiin valmistamalla positiivisesta näytteestä (CXCL13-pitoisuus >500pg/ml) laimennossarja (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 ja 1:128) ja analysoimalla se. Lineaarisuus testattiin kolmessa sarjassa.

Lineaarisuuden testauksen tuloksista piirrettiin kuvaaja pitoisuus vs. laimennos. Kahden vahvimman laimennoksen (1:1 ja 1:2) pitoisuudet olivat yli standardisuoran mittausalueen (7,8-500 pg/ml) ja laimein (1:128) oli tämän alle. Tämän vuoksi niitä ei ole käytetty lineaarisuutta kuvaavassa kuvaajassa. Kuvaajasta voidaan todeta, että pitoisuuden ja laimennosten välillä vallitsee hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio ja menetelmä on lineaarinen standardisuoran alueella.

Kuva 1. CXCL13 pitoisuus vs. laimennos


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Täsmällisyys (precision)

Täsmällisyys, sisäinen tarkkuus, toistotarkkuus (engl. precision) on yleistermi, joka kuvaa testien välistä vaihtelua, toistettavuutta ja uusittavuutta. Täsmällisyys voidaan jakaa sarjan sisäiseen toistettavuuteen (intra assay precision; within-run precision), jolla arvioidaan täsmällisyyttä yhden sarjan sisällä, ja sarjojen väliseen toistettavuuteen (inter assay precision; between-run precision), joka kuvaa täsmällisyyttä pidemmällä ajalla. Sarjojen välinen toistettavuus sisältää analyysit eri päivinä suoritettuna sekä eri tekijöiden suorittamana.

Toistotarkkuus (toistettavuus) ilmaistaan samoissa mittaolosuhteissa, samasta näytteestä, samalla menetelmällä saatujen koetulosten suhteellisen keskihajontana (CV %). CV % määritetään kaavalla keskihajonta/keskiarvo x 100. Koetulosten suhteellinen keskihajonnan tulisi eri konsentraatiosuhteilla olla alle 20 %, paitsi lähellä määritysrajaa olevan konsentraation suhteellisen keskihajonnan tulisi olla alle 30 %.

CXCL13-määrityksen toistettavuutta sarjan sisällä (intra assay) testattiin siten, että samaa näytettä analysoitiin neljänä rinnakkaisena määrityksenä. Tämä tehtiin kahta eritasoista pitoisuutta (n.200 pg/ml ja yli 500 pg/ml) oleville näytteille. Analyysia varten näytteet laimennettiin 1:10, jotta näytteen, jonka pitoisuus on yli 500 pg/ml, tulos laskisi standardisuoran mittausalueelle. Sarjan sisäinen toistettavuus testattiin kolme kertaa.

Sarjojen välistä toistettavuutta (inter-assay) testattiin analysoimalla korkeamman pitoisuuden (yli 500pg/ml) näyte kuudessa eri sarjassa. Näyte laimennettiin 1:10. Kaksi eri henkilöä analysoi sarjat. Molemmat analysoivat kolme sarjaa.

Taulukko 1. CXCL13-pitoisuus, sarjan sisäinen toistettavuus

	Intra-assay					
	12BB6757			12BB6343		
ka	185,8	92,5	200,7	4240,3	3147,9	2784,3
sd	5,6	3,1	38,7	332,9	114,0	59,7
CV%	3,0	3,4	19,3	7,9	3,6	2,1

Taulukko 2. CXCL13-pitoisuus, sarjojen välinen toistettavuus

Inter-assay	
12BB6343	
ka	2921
sd	779,7305
CV%	26,69396


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Sarjan sisäistä toistettavuutta testattaessa CV%:t olivat joka kerta alle 20%. Sarjojen välisen toistettavuuden CV% oli yli suositun 20%. Se oli 26,7%. Tätä voidaan kuitenkin pitää vielä hyväksyttävänä, koska valmistajan saamat CV%:t ovat olleet alle 10%. Kokonaisuutena menetelmän toistettavuus voidaan todeta validiksi.

Spesifisyys

CXCL13-määrittämisen soveltumista spesifisti neuroborreliosisin diagnostiikkaan testattiin määrittämällä neuroborreliosisipotilaiden sekä muita keskushermoston tulehdustiloja sairastavien potilaiden likvoreita. Neuroborreliosisi-diagnoosiin liittyviä näytteitä oli yhteensä 67. Näistä 28 oli näytteitä, joissa potilaalla oli juuri todettu neuroborreliosisi. 20 oli näiden neuroborreliosisipotilaiden seurantanäytteitä. 19 näytteistä oli potilailta, joilla oli kliinisen kuvan perusteella epäilty neuroborreliosisia, mutta vastainemäärityksellä tätä diagnoosia ei oltu varmistettu.

Keskushermoston virusinfektiopotilaiden likvornäytteitä oli yhteensä 55. Näistä kolme oli näytettä, joissa potilaalla oli PCR:llä todettu ihmisen herpesvirus 6 (HHV6) –infektio. Näytteistä 20 oli potilaista, joilla oli PCR:llä todettu Varizella Zoster -infektio ja kahdeksan, joilla oli todettu enterovirusinfektio. Herpes simplex -infektio oli PCR:llä todettu 14 näytteestä. Kymmenen näytteistä oli potilailta, joilla oli vastainemäärityksellä todettu puutiaisaivokuume (TBE).

Tutkimusaineistossa oli yksi neurosyfilisipotilaan likvornäyte. Lisäksi mukana oli 37 likvornäytettä, joista oli löydetty oligoklonaalisia IgG-vasta-aineita.

Neuroborreliosisissa likvorin CXCL13-pitoisuudet olivat välillä 424 – 158030 pg/ml. Neurosyfiliksessä CXCL13-pitoisuus oli 36998 pg/ml. Muissa tulehdustiloissa likvorin CXCL13-pitoisuudet jäivät alle 500 pg/ml.

Taulukko 3. CXCL13-pitoisuudet neuroborreliosisissa sekä muissa tautitiloissa

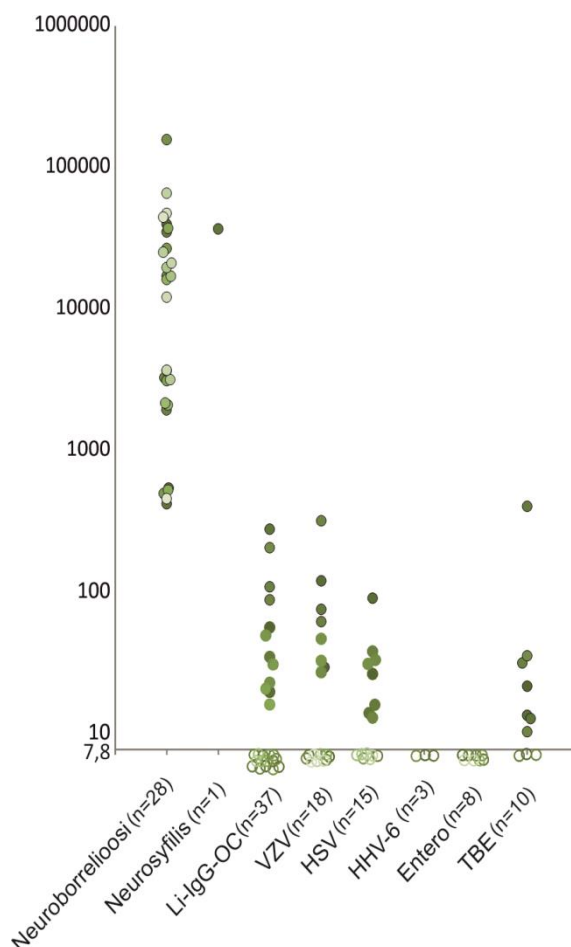
	Neuroborreliosisi	Virukset ja Li-IgG-OC
ka	21925,6	28,1
std	32132,4	66,1
min	424	<7,8
max	158030	406,4
ka+3std		226,6


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Kuva 2. Likvorin CXCL13-pitoisuudet keskushermoston eri tautitiloissa


Neuroborrelioosissa CXCL13-pitoisuudet ovat selvästi muita tautitiloja korkeammat. Poikkeuksena kuitenkin neurosyfiliis, jossa CXCL13-pitoisuus nousee myös selvästi. Todetaan CXCL13-määrityksen soveltuvan neuroborrelioosin diagnostiikkaan. Raja-arvona voidaan pitää tulosta yli 500pg/ml.

Hoidon vaikutus

Hoidon vaikutusta testattiin määrittämällä CXCL13-pitoisuus pariliikvoroista, joita oli 20.

1. ja 2. näytteen otossa oli eroa 17-225 vrk (ka 55 vrk).


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Taulukko 4. Hoidon vaikutus CXCL13-pitoisuuteen

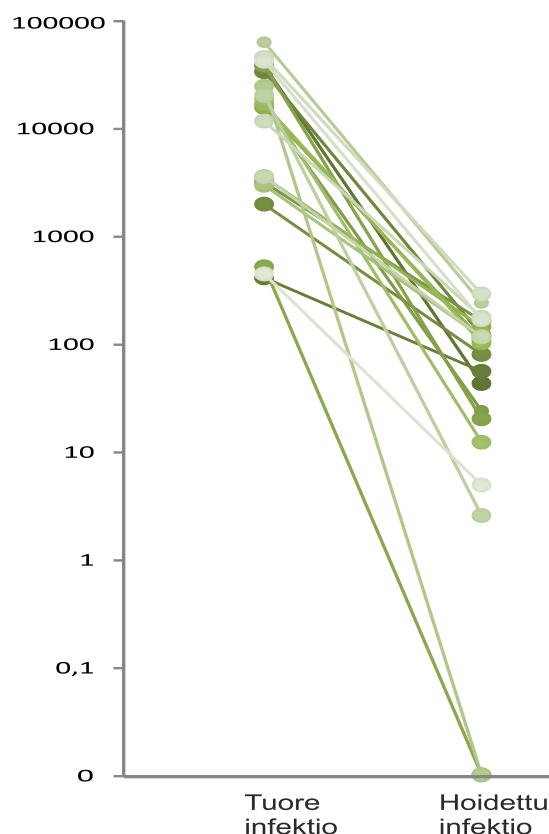
	CXCL13-pitoisuus		
	Tuore LNB-infektio	Hoidettu LNB-infektio	näytteen väli (vrk)
	40012	44	21
	424	57	19
	35170	124	27
	2051	82	21
	3270	168	25
	17241	24,5	20
	40476	20,6	137
	536,7	negat.	112
	16300	113	22
	3683,9	147	20
	17562	105	26
	19745	12,5	30
	3072	119,5	29
	25653	negat.	225
	66108	246,7	25
	21212	2,6	110
	3715,1	119,6	20
	12203	181,3	17
	47670	299,9	22
	43944	173	29
	460,1	5	195
ka	20024	97	55


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Kuva 3. Hoidon vaikutus CXCL-pitoisuuteen


Jokaisen 2.näytteen CXCL13-pitoisuus oli 1.näytettä matalampi. Voidaan todeta CXCL13-pitoisuuden laskevan hoidon myötä.

Pakastuksen ja sulatuksen vaikutus

Pakastus- ja sulatuskertojen vaikutusta näytteen CXCL 13-pitoisuuteen tutkittiin jakamalla yksi likvornäyte viiteen erään, jotka pakastettiin. Ensimmäinen erä sulatettiin vain kerran juuri ennen analyysiä. Toinen erä sulatettiin ja pakastettiin uudelleen kerran ennen analyysiä edeltävää sulatusta. Kolmas erä sulatettiin ja pakastettiin kaksi kertaa ennen analyysiä edeltävää sulatusta. Neljäs erä sulatettiin ja pakastettiin kolme kertaa ja viides erä neljä kertaa ennen analyysiä edeltävää sulatusta.


MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

Taulukko 3. Pakastuskertojen vaikutuksen testauksen tulokset

Pakastus-sulatus	
1 kerta	1684,4 pg/ml
2 kertaa	1770,4 pg/ml
3 kertaa	1580,8 pg/ml
4 kertaa	1810,1 pg/ml
5 kertaa	1560,9 pg/ml
ka	1681,32 pg/ml
sd	110,8
CV%	6,59

Näytteen uudelleen pakastuksella ja sulatuksella ei ole vaikutusta CXCL13-pitoisuuteen.

AJANKOHTA JA RESURSSIT (validointiaika, tekijät)

Tammi - Kesäkuu 2013, Anna Karvonen ja Satu Leinonen

Kaikki testin validointiin liittyvä materiaali löytyy verkkolevyltä:
<\\utu.fi\verkkolevyt\Sero\yleinen\Serologia\Borreliakokeilut\CXCL13>

Raportin laatija:

Anna Karvonen

Hyväksyjä:

Jukka Hytönen



TURUN YLIOPISTO
UTULAB

MENETELMÄN VALIDOINTI

Tutkimus: Li-CXCL13 (13361)

Raportti

27.6.2013

KIRJALLISUUS

Guidance for Industry, Biological Method Validation

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug, Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107>

Quantikine® ELISA Human CXCL13/BLC/BCA-1 (R&D Systems, Inc.) kitin työohje

Schmidt et al. Neurology 2011. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis

van Burgel et al. Journal of Clinical Microbiology 2011. Discriminating Lyme Neuroborreliosis from Other Neuroinflammatory Diseases by Levels of CXCL13 in Cerebrospinal Fluid



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

1

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi ANNA KARVONEN SATU LEINONEN
 Osoite VIENOLANRINNE 1 F42 AAPONKUJA 17
20210 TURKU 21200 RAISIO
 Puhelin koti- 050 59105265 Puhelin työ- 0400 835000
 Sähköposti anna.m.karvonen@students.turkuamk.fi satu.m.leinonen@students.turkuamk.fi
 Koulutusohjelma HOITOTYÖN KOULUTUSOHJELMA
BIOANALYTIKAN SUUNTAUTUMISVAIHTOEHTO

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi AIVO-SOLKÄYDINNESTEEN CXCL13 -PITOISUUDEN MÄÄRITYKSEN VALIDOINTI

Aikataulu LABORATORIOANALYYSIT VALMIIT TUKUKUUN 2013
ALKUUN MONNESSÄ

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio TURUN YLIOPISTO, LÄÄKETIETEELLINEN MIKROBIOLOGIA JA IMMUNOLOGIA
 Työn ohjaaja / yhteyshenkilö JUKKA HYTÖNEN
 Osoite KIINAMYYLLINKATU 13, 20520 TURKU
 Puhelin 02 333 7428 Sähköposti jukka.hytönen@utu.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja RAINI TUOMINEN
 Puhelin 044 907 9173 Sähköposti Raini.Tuominen@turkuamk.fi

Turun ammattikorkeakoulu
 Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
 puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
 sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi



OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

2

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT*

OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki- osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammatillisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljättä (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammatillisuudet, joita ei julkaista.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETYLLE TAVALLA

21/3 2013

21/3 2013

Opiskelija

Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan alettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

Turun ammattikorkeakoulu
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
posti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi