

S T a D I a

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Immunoturbidometrisen fibrinimonomeerimäärityksen menetelmätestaus

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
9.11.2006

Riia Heiskanen



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Heiskanen Riia			
Työn nimi			
Immunoturbidometrisen fibriniinimonomeerimäärityksen menetelmätestaus			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäyte	Syky 2006	38+ 2 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Fibriinimonomeerejä syntyy fibrinogeenistä veren hyytyessä. Fibriinimonomeerit muodostavat liukoisia komplekseja, joiden olemassaolo voidaan osoittaa plasmasta silloin, kun niitä esiintyy veressä suurina määrinä, kuten disseminoituneen intravaskulaarisen koagulaation (DIK) yhteydessä.</p> <p>HUSLABin Meilahden sairaalan laboratoriossa fibriniinimonomeerien olemassaolo todetaan tällä hetkellä hemagglutinaation perustuvalla kvalitatiivisella testillä, jossa tulos tulkitaan silmämääräisesti. Diagnostica Stago on tuonut markkinoille uuden kvantitatiivisen STA® - Liatest® FM immunoturbidometrisen testin, joka perustuu monoklonaaliseen fibriniinimonomeerivasta-aineeseen. Uusi testi on automatisoitavissa, mikä helpottaa testin suoritusta.</p> <p>Työssäni testasin immunoturbidometrisen menetelmän analyttisiä suorituskykyominaisuuksia määrittämällä Blood Coagulation System (BCS) -analysointorilla sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistuvuuden sekä lineaarisuuden. Tulosten perusteella menetelmä toimii toistettavasti, mutta lineaarisuus ei ole optimaalinen. Vertasin myös nykyisen ja uuden menetelmän tuloksia 40:stä potilasnäytteestä. Kaikki näytteet olivat agglutinaatiotestissä negatiivisia. Osa näistä antoi kuitenkin positiivisia tuloksia immunoturbidometrisellä testillä. Tulosten perusteella immunoturbidometrisen menetelmä ei mittaa ainoastaan fibriniinimonomeerejä.</p> <p>Lisäksi tarkastelin fibriniinimonomeeritulosten korrelaatiota saman näytteen fibrinogeeni- ja D-dimeerituloksiin. Fibriinimonomeeritulokset eivät korreloineet fibrinogeenitulosten kanssa, mutta D-dimeeritulosten kanssa korrelaatio oli voimakasta ja tilastollisesti merkitsevää. D-dimeeri mahdollisesti ristireagoi menetelmässä. Jos menetelmä halutaan ottaa käyttöön, se edellyttää lisätutkimuksia.</p>			
Avainsanat			
Veren hyytyminen, Fibriinimonomeeri, Blood Coagulation System -analysointori			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Heiskanen Riia			
Title			
Immuno-Turbidimetric Fibrin Monomer Determination: Method Testing			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2006	38+ 2 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Fibrin monomers are formed from fibrinogens as blood coagulates. This leads to the formation of soluble fibrin monomer complexes, the existence of which can be indicated when there are great amounts of them in the blood as in disseminated intravascular coagulation (DIC).</p> <p>At HUSLAB Meilahti hospital laboratory, the existence of fibrin monomer complexes is proved by using a hemagglutination test. The test is qualitative and the results are estimations only. Diagnostica Stago's new quantitative STA® - Liatest® FM immuno-turbidimetric test is based on a monoclonal fibrin monomer antibody. The test can be measured by using an analyzer, which makes the testing procedure easier.</p> <p>I tested the immuno-turbidimetric method's analytical ability by determining the intra- and inter-assay reproducibility and linearity using the Blood Coagulation System (BCS) -analyzer. The test results showed that the immuno-turbidimetric method was reproducible but its linearity was not optimal. Following this, I compared existing and new test results by analysing 40 samples. All samples were agglutination negative. However, parts of samples were positive in an immuno-turbidimetric test. The results indicated that the method wasn't specific for fibrin monomers.</p> <p>Furthermore, I examined the results of the fibrin monomer correlations to the same samples of fibrinogen and D-dimer results. The fibrin monomer results did not correlate with the fibrinogen. With the D-dimer, the correlation was strong and statistically significant. In addition, D-dimer might crossreact in the method, which can only be introduced with respect to further studies.</p>			
Keywords			
Blood coagulation, Fibrin monomer, Blood Coagulation System -analyzer			

	1
SISÄLLYS	
1 JOHDANTO	1
2 VEREN HYYTYMINEN	3
2.1 Suonen seinämä ja verihiutaleet hyytymistapahtumassa	3
2.2 Plasman hyytymistekijät ja niiden inhibiittorit	4
2.3 Fibrinolyysi	5
3 FIBRIINIMONOMEERI	5
3.1 Fibrinimonomeerin synty	5
3.2 Fibrinimonomeerien polymerisaatio	6
3.3 Fibrinimonomeerimäärityksen käyttö DIK:n diagnostiikassa	8
4 LABORATORIOMENETELMÄN VALIDOINTI	9
4.1 Validointiparametrit	10
4.2 Analyyttisen suorituskyvyn mittarit	10
5 FIBRIINIMONOMEERIEN MÄÄRITTÄMINEN	11
5.1 BCS-analysaattori	11
5.1.1 BCS:n toiminnalliset osat	12
5.1.2 Mittausmenetelmä	14
5.2 STA® - Liatest® FM – immunoturbidometrinen menetelmä	15
5.3 Vertailumenetelmä – agglutinaatiotesti	17
6 AIEMMAT TUTKIMUKSET	18
6.1. Uusi monoklonaalinen vasta-aine fibrinimonomeerien ja liukoisen fibriinin havaitsemiseksi plasmasta	18
6.2 Tutkimus liukoisten fibriinikompleksien lateksi-immunoturbidometrisestä määritysmenetelmästä	19
7 TYÖN TARKOITUS	20
8 TUTKIMUKSEN SUORITUS	21
8.1 Tutkimusmateriaali	22
8.2 Sarjan sisäinen toistuvuus	22
8.3 Sarjojen välinen toistuvuus	22
8.4 Menetelmän lineaarisuus	23
8.5 Tasovertailu	23
8.6 Fibrinimonomeeritulosten korrelaatio fibrinogeeni- ja D-dimeeripitoisuuteen	24
8.6.1 Fibrinogeeni	24
8.6.2 D-dimeeri	24
8.6.3 Ristireagointi	25
9 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA	25
9.1 Työssä tarkasteltavat tunnusluvut	25
9.2 Sarjan sisäinen toistuvuus	26
9.3 Sarjojen välinen toistuvuus	28
9.5 Tasovertailu	30
9.6 Fibrinimonomeeritulosten korrelaatio fibrinogeeni- ja D-dimeeripitoisuuteen	30
9.7 Tulosten yhteenveto	32
10 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	33

11 POHDINTA

35

LÄHTEET

LIITTEET

1 JOHDANTO

Veren hyytymisjärjestelmän tehtävänä on huolehtia, että veri säilyy suonessa normaali-tilanteessa juoksevana. Kun verisuonen seinämä vaurioituu on hyytymisjärjestelmän nopeasti pysäytettävä verenvuoto. Tällöin muodostuu hyytymä. (Mahlamäki 2004: 310.) Tällaisen järjestelmän on oltava tiukasti kontrolloitu, joten veren hyytymistä edistävien ja ehkäisevien aineiden sekä hyytymää liuottavan fibrinolyysin välillä vallitsee tärkeä tasapaino (Hoffbrand – Pettit – Moss 2001: 236).

Disseminoitunut intravakuolaarinen koagulaatio eli DIK on oireyhtymä, jossa elimistön hyytymisjärjestelmä ajautuu häiriötilaan. DIK:ssä hyytymismekanismi aktivoituu niin voimakkaasti, että sen säätelyjärjestelmän suorituskyky ylittyy. Tämä voi johtaa sekä tukos- että vuototaipumukseen, jotka pahimmillaan voivat aiheuttaa potilaan kuoleman. DIK:n osoittamiseen ei ole yhtä spesifistä laboratorionkoetta, mutta useita kokeita käytetään apuna diagnosoinnissa. (Rasi 2000: 553–556.) Yleisimmät kokeet ovat fibriinimonomeerien ja D-dimeerien osoittaminen plasmasta ja fibrinogeenipitoisuuden määrittäminen (HUSLAB 2006).

Veren normaalin hyytymistapahtuman aikana fibriinimonomeerejä syntyy fibrinogeenimolekyyleistä, kun trombiini pilkkoo niistä pois kaksi A- ja kaksi B-fibrinopeptidiä. Fibrinimonomeereistä syntyy edelleen liukenematonta fibriiniä, jolloin verenvuodon pysäyttämiseksi syntynyt veritulppa vahvistuu. Fibrinimonomeerit muodostavat komplekseja toistensa kanssa, mutta myös fibrinogeenin sekä fibrinogeenin ja fibriinin hajomistuotteiden kanssa. (Horan – Francis 2001: 659; Lassila 2000: 454–455.)

DIK:ssä fibriinimonomeerejä esiintyy veressä suuria määriä, jolloin niiden olemassaolo voidaan osoittaa laboratorionkokeella (Hoffbrand ym. 2001: 269; Diagnostica Stago, ohje 2003). Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorionliikelaitoksen (HUSLAB) Meilahden sairaalan laboratorio käyttää tällä hetkellä fibriinimonomeerikompleksien osoittamiseen Diagnostica Stagon hemagglutinaatioon perustuvaa kvalitatiivista menetelmää. Määrittäminen suoritetaan käsin testikortilla ja fibriinimonomeereillä päällystettyjen punasolujen agglutinointuminen eli yhteen tarttuminen todetaan silmämääräisesti.

Diagnostica Stago on tuonut markkinoille uuden STA® - Liatest® FM immunoturbidometrisen fibriinimonomeerikompleksien määrittämenetelmän, joka on kvantitatiivi-

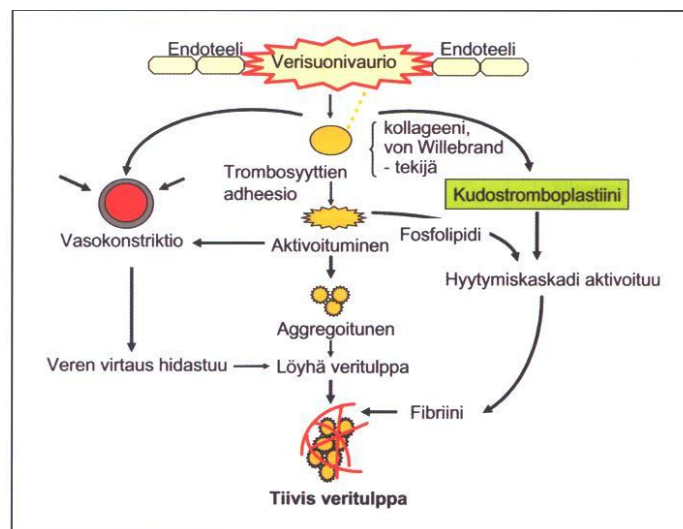
nen. Uusi menetelmä perustuu monoklonaaliseen fibriinimonomeerivasta-aineeseen, jota on kiinnitetty lateksipartikkeleihin. Näytteessä olevat fibriinimonomeerit tarttuvat vasta-aineisiin, mikä johtaa lateksipartikkelien agglutinaatioon. Tulos saadaan turbiditeetin eli sameuden muutoksesta, jota mitataan fotometrisesti. Tutkimus on automatisoitavissa hyytymisanalysaattorilla.

Opinnäytetyöni toimeksiantaja, HUSLABin Meilahden sairaalan kliinisen kemian ja hematologian laboratorio (myöhemmin työssäni käytän nimeä HUSLABin Meilahden sairaalan laboratorio), on kiinnostunut mahdollisuudesta korvata nykyinen menetelmä uudella. Silmämääräisesti tulkittavan kvalitatiivisen fibriinimonomeeritestin korvaaminen automatisoitavalla kvantitatiivisella määrittelyllä helpottaisi DIK-diagnostiikan suorittamista merkittävästi. Jos menetelmä osoittautuu käyttöön sopivaksi, tutkimus saatetaan ottaa käyttöön myös päivystystutkimukseksi.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on testata uuden menetelmän analyttisiä suorituskykyominaisuuksia sekä verrata nykyisen ja uuden menetelmän tuloksia. Tulosten perusteella pyritään selvittämään, toimiiko menetelmä luotettavasti BCS-hyytymisanalysaattorilla. Työn suorittamisen aikana tuli aiheelliseksi tarkastella myös menetelmän spesifisyyttä.

2 VEREN HYYTYMINEN

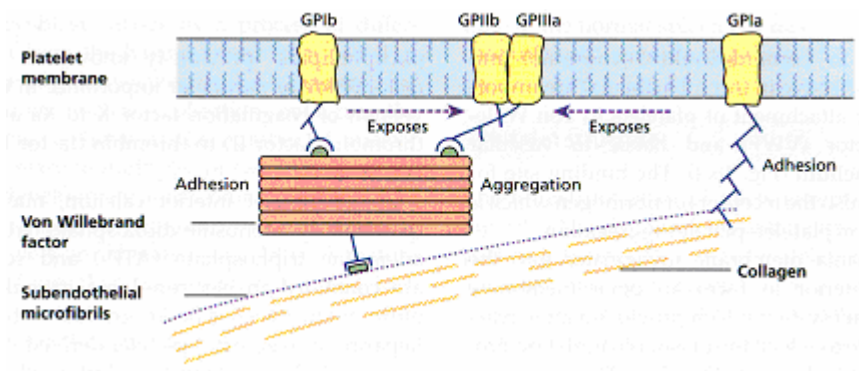
Veren hyytymisjärjestelmä huolehtii tärkeistä tehtävistä. Sen ansiosta veri säilyy verisuonissa normaalitilanteessa juoksevana. Jos verisuonen seinämä vaurioituu, hyytymisjärjestelmä pysäyttää verenvuodon muodostamalla hyytymän (kuvio 1). Kun vaurio on korjaantunut, järjestelmä hajottaa tarpeettomaksi käyneen hyytymän. (Mahlamäki 2004: 310.) Verisuonen seinämä, verihiutaleet, plasman hyytymistekijät ja niiden inhibiittorit sekä fibrinolyttinen systeemi ovat hyytymisjärjestelmän osia (Hoffbrand ym. 2001: 236).



KUVIO 1. Veren hyytyminen (Koski - Vilpo 2005: 160).

2.1 Suonen seinämä ja verihiutaleet hyytymistapahtumassa

Verisuonen sisäpintaa peittää yhden solukerroksen paksuinen endoteeli, jonka rakenteet estävät hyytymistä. Kun suoni vaurioituu, endoteelin alta paljastuu sekä verihiutaleita kiinnittäviä rakenteita että hyytymistä edistäviä tekijöitä. (Mahlamäki 2004: 310.) Kollageeni ja von Willebrand -tekijä ovat tärkeitä rakenteita, jotka mahdollistavat verihiutaleiden adheesion eli kiinnittymisen vauriokohtaan. Verihiutaleiden pinnalla on adheesioreseptoreita, jotka voivat tarttua näihin rakenteisiin. Tärkeimmät adheesioreseptorit ovat glykoproteiinit (GP) Ia/IIa ja Ib. GP Ia/IIa tarttuu kollageeniin ja GP Ib von Willebrand -tekijään. Verihiutale tunnistaa von Willebrand -tekijän lisäksi myös GPIIb/IIIa:n avulla (kuvio 2). (Lassila 2000: 450–451.)



KUVIO 2. Adheesioresseptorit GP Ib ja GP IIB/IIIa tarttuvat von Willebrand -tekijään. GPIa tarttuu kollageeniin. (Hoffbrand ym. 2001: 238.)

Verihiutaleadheesio seurauksena verihiutaleet aktivoituvat ja vapauttavat varastorakuloistaan muun muassa suonia supistavia tekijöitä ja molekyylejä, joiden välityksellä verihiutaleet voivat aggregoitua eli tarttua kiinni toisiinsa. Toisiinsa tarttuneet verihiutaleet muodostavat löyhän hyytymän, trombosyyttitulpan. (Koski – Vilpo 2005: 158–159.) Suonen supistuminen kasvattaa virtausvoimaa, joka painaa verihiutaleita voimakkaasti suonen seinämää vasten ja edistää uusien verihiutaleiden tarttumista vauriokohtaan (Lassila 2000: 453).

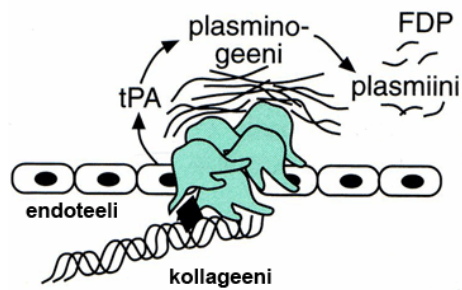
2.2 Plasman hyytymistekijät ja niiden inhibiittorit

Hyytymistekijät ovat proteiineja, jotka kiertävät plasmassa inaktiivisessa proentsyymi-muodossa (Lassila 2000: 453). Hyytymistekijäjärjestelmä toimii etenevänä reaktiosarjana, jossa aktivoitunut entsyymi muuttaa seuraavan inaktiivisen proentsyymin aktiiviseksi, joka jälleen aktivoi seuraavan proentsyymin ja niin edelleen. Ketjureaktion tavoitteena on protrombiinin muuttaminen trombiiniksi, joka muuttaa fibrinogeenin fibriiniksi. Fibriiniverkko vahvistaa löyhän trombosyyttitulpan tiiviiksi veritulpaksi. (Koski – Vilpo 2005: 160.)

Tärkein hyytymistekijäjärjestelmää aktivoiva tekijä on suonen vauriokohdasta vapautuva kudostromboplastiini. Myös verihiutaleiden solukalvojen tietyt fosfolipidit aktivoivat hyytymisjärjestelmää. (Koski – Vilpo 2005: 158–160.) Nämä fosfolipidit siirtyvät verihiutaleiden pinnalle niiden muuttaessa muotoaan verihiutaleaktivaatioissa (Lassila 2000: 452). Plasma sisältää myös hyytymistekijöiden inhibiittoreita eli estäjiä. Ne estävät veren hallitsemattoman hyytymisen. Inhibiittorit aktivoituvat samalla kun hyytyminen käynnistyy. (Koski – Vilpo 2005: 161.)

2.3 Fibrinolyysi

Kun veren hyytyminen käynnistyy, samalla käynnistyy myös sille vastakkainen reaktio, fibrinolyysi. Se liuottaa syntyneen hyytymän ja edistää haavan soluvälitteistä paranemista. Fibrinolyysi myös ylläpitää hyytymistasapainoa rajaamalla hyytymisreaktion vaurioalueelle. Fibrinolyysi käynnistyy, kun endoteelisoluista vapautuu hyytymän fibriinin ja trombiinin vaikutuksesta plasminogeenin kudosaaktivaattoria tPA:ta. Vapautunut tPA aiheuttaa plasminogeenin aktivoitumisen plasmiiniksi, joka pilkkoo fibriiniä (kuvio 3). (Lassila 2000: 451, 457.) Fibrinolyysissä fibriini pilkkoutuu erikokoisiksi fibriinin hajoamistuotteiksi (FDP). Yksi fibriinin hajoamistuotteista on D-dimeeri. (Kolde 2004: 48.)



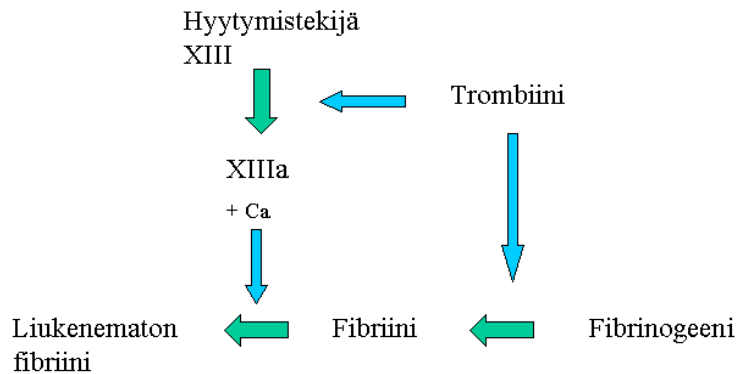
KUVIO 3. Fibrinolyysi hajottaa hyytymän. Endoteelistä vapautuva tPA aktivoi plasminogeenin plasmiiniksi, joka pilkkoo fibriinin erikokoisiksi fibriinin hajoamistuotteiksi (FDP). (Mukaillen Lassila 2000: 451.)

3 FIBRIINIMONOMEERI

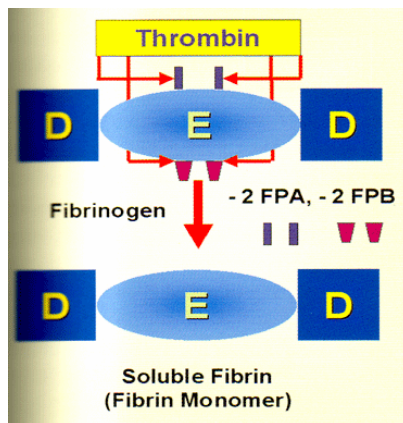
3.1 Fibriinimonomeerin synty

Hyytymän muodostumisen viimeisessä vaiheessa fibrinogeenistä muodostuu liukenevatonta fibriiniä. Tämä tapahtuu trombiini-entsyymin vaikutuksesta (kuvio 4). Trombiini muuttaa fibrinogeenin rakennetta proteolyttisesti polypeptidejä pilkkomalla. Fibrinogeeni on suuri plasman proteiini, joka koostuu kahdesta $A\alpha$ -, $B\beta$ -, ja γ -ketjusta. Proteiiniaketjut ovat toisissaan kiinni useilla disulfididisidoksilla. Fibrinogeenimolekyylä voidaan jakaa rakenteellisesti kolmeen osaan: keskellä on E-osa, jonka molemmilla sivuilla on D-osat. E-osassa sijaitsee kaksi A-fibrinopeptidiä (FPA) ja kaksi B-fibrinopeptidiä (FPB). Trombiinin vaikutuksesta fibrinopeptidit irtoavat. (Kolde 2004: 28–29 Tirri – Lehtonen – Lemmetyinen – Pihakaski – Portin, Biologian sanakirja 2001:

s.v. proteolyysi.) Siinä vaiheessa, kun molemmat A-fibrinopeptidit ovat irronneet, molekyyliä kutsutaan DesAA-fibriiniksi (Dempfle 1999: 676). Kun myös B- fibrinopeptidit irtoavat, reaktiotuotteena syntyy fibriinimonomeeri eli des-AB-fibriini (kuvio 5) (Kolde 2004: 29).



KUVIO 4. Trombiinin vaikutuksesta fibrinogeenistä syntyy liukenematonta fibriiniä (Mukaillen Lassila 2000: 454).



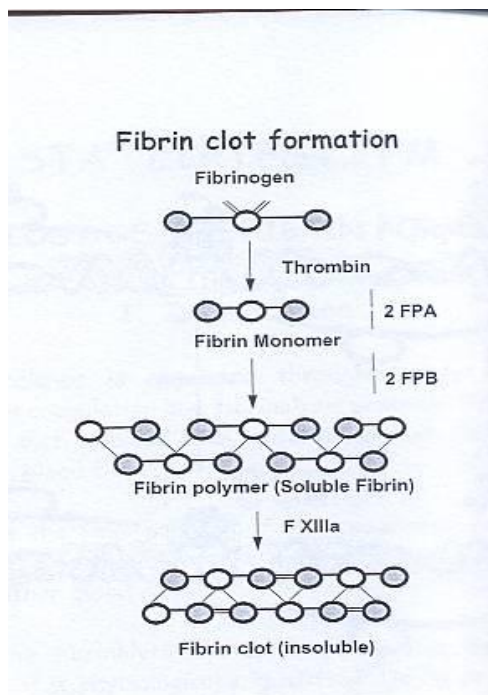
KUVIO 5. Fibriinimonomeeri syntyy, kun trombiini pilkkoo fibrinogeenistä kaksi fibrinopeptidi-A:ta ja kaksi -B:tä (Kolde 2004: 29).

3.2 Fibriinimonomeerien polymerisaatio

Fibrinopeptidien vapauduttua fibrinogeenistä, fibriinimonomeerimolekyyli osoittaa voimakasta taipumusta polymerisaatioon. Polymerisaatiossa fibriinimonomeerit liittyvät suuremmiksi kokonaisuuksiksi (kuvio 6). Tämä johtuu siitä, että fibrinopeptidien irtoaminen saa molekyylissä aikaan rakenteellisia muutoksia. Tällöin sen pinnalle paljastuu rakenne, johon muut fibriinimonomeerimolekyylit voivat sitoutua. (Horan – Francis 2001: 658; Tirri ym. Biologian sanakirja 2001: s.v. polymerisaatio) Fibriinimonomeerien yhdistyminen tapahtuu spontaanisti (Hoffbrand ym. 2001: 243).

Monomeerit polymerisoituvat muodostamalla monomeerien välille E-D ja D-D -sidoksia. Yhdistyvien monomeerien E- ja D-osat sitoutuvat toisiinsa E-D -sidoksilla. Muodostuvan ketjun molempiin päihin jää aina vapaat D-osat, joihin seuraavien monomeerien E-osat voivat liittyä. Peräkkäiset monomeerit yhdistyvät toisiinsa D-osien välillä D-D -sidoksilla. Ensin muodostuu ohutta kaksi säikeistä alkusäiettä. Vasta kun säikeet ovat muodostuneet riittävän pitkiksi, ne alkavat paksuuntua. (Furie – Furie 2005: 1946.)

Polymerisaation edetessä fibrini haaroittuu verkoksi auttaen tukoksen syntyä (Kolde 2004: 29). Yhteen liittyneet fibriniinimonomeerit ovat liukoista fibriniä kunnes trombiini aktivoi hyytymistekijä XIII:n, joka saa kovalenttisten sidosten avulla fibrinin muuttumaan liukenemattomaksi, stabiiliksi fibriniksi ja synnyttää lopullisen hyytymän (kuvio 6). Hyytymistekijä XIII:n lisäksi tähän tarvitaan kalsiumia. (Lassila 2000: 454–455.) Kovalenttiset kaksoissidokset muodostuvat kahden peräkkäisen fibriniinimonomeerin D-osien välille (Diagnostica Stago 2005a: 3).



KUVIO 6. Fibriniinimonomeerit liittyvät suuremmiksi kokonaisuuksiksi fibrinopeptidien irrottua. Aktivoitunut hyytymistekijä XIII saa aikaan hyytymän stabiloimalla liukoisen fibrinin liukenemattomaksi. (Diagnostica Stago 2005a: 4.)

Koska fibriniinimonomeereillä on voimakas taipumus polymerisoitua, fibriniinimonomeerejä esiintyy veressä sellaisenaan vain hyvin matalina pitoisuuksina. Fibriniinimonomeerien olemassaolo plasmassa voidaan havaita laboratorionkokeilla vain hyytymisjärjestelmän

ollessa häiriötilassa. Pieni osa fibriinimonomeereistä ei yhdistykään toisiinsa ja edesauta hyytymän muodostusta, vaan kiertää plasmassa yhdistyneenä fibrinogeeniin ja fibrinogeenin tai fibriinin hajoamistuotteisiin, joilla on pinnallaan samanlainen yhdistymisen mahdollistava sitoutumiskohta kuin fibriinimonomeereillä. Komplekseja, joissa fibriinimonomeerejä on liittynyt toisiinsa tai muihin tuotteisiin kutsutaan liukoiseksi fibriiniksi. (Horan – Francis 2001: 658–659.) Niitä nimitetään myös liukoiseksi fibriinimonomeerikomplekseiksi (Diagnostica Stago: 2005b).

3.3 Fibriinimonomeerimäärityksen käyttö DIK:n diagnostiikassa

Disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio eli DIK (suomennettuna laajalle levinnyt suonensisäinen hyytyminen) on elimistössä yleistynyt hyytymisjärjestelmän häiriötila. DIK:n taustalla voivat olla erilaiset sairaudet ja tilat, joita on esitetty taulukossa yksi. (Liebman – Weitz 2005: 2169.) DIK:n voi laukaista hyytymistä aktivoivien tekijöiden pääsy verenkiertoon tai laaja endoteelivaurio (Hoffbrand ym. 2001: 269).

TAULUKKO 1. Sairauksia ja tiloja, joihin usein liittyy DIK (Rasi 2000: 555).

Infektio	Gramnegatiivinen tai grampositiivinen sepsis, eräät viremiot, malaria
Obstetrinen komplikaatio	Istukan irtoaminen, lapsivesiembolia, kuollut sikiö -oireyhtymä, vaikea pre-eklampsia ja eklampsia, HELLP-oireyhtymä, septinen abortti
Pahanlaatuisen sairaus	Akuutti (promyelosyytti)leukemia, eturauhassyöpä, keuhkosityöpä, haimasyöpä, munasarjasyöpä
Trauma	Monivamma, aivovamma, palovamma
Antigeeni-vasta-ainereaktio	Anafylaktinen reaktio, ABO-sopimaton verensiirto
Verisuonianomalia	Aortan aneurysma, jättihemangioma
Muita	Sokkioireyhtymä, maligni hypertermia, lämpöhalvaus, hypotermia, haimatulehdus, akuutti maksanekroosi, elinsiirteen hyljintä

DIK:lle on ominaista sekä hyytymisjärjestelmän aktivoituminen, tukokset että verenvuodot. Hyytymisjärjestelmä aktivoituu niin voimakkaasti, että elimistö ei pysty säätelemään sitä. Seurauksena verisuoniin muodostuu fibriiniä, joka aiheuttaa hyytymien synnyn verenkiertoon. Hyytymät voivat tukkia mikroverisuonistoa ja aiheuttaa muun muassa hengitysvajausoireyhtymän, munuaisten vajaatoimintaa ja neurologisia häiriöitä. Tila kuluttaa hyytymistekijöitä ja niiden inhibiittoreita sekä trombosyyttejä. Kulutus lisää vielä fibrinolyysiä, joka käynnistyy puolustamaan elimistöä veren liialliselta hyytymiseltä. Tämä voi johtaa verenvuototaipumukseen. Vuodot voivat aiheuttaa esimerkiksi verenpaineen laskua, sokin tai aivoverenvuodon. (Rasi 2000: 553–556.)

DIK:n diagnosoimiseksi ei ole olemassa yhtä spesifistä koetta tai laboratoriokoeyhdistelmää. Laboratoriolöydökset toimivat diagnoosin teossa vain tukena ja tärkeintä on potilaan kliinisen kuvan arviointi. (Rasi 2000: 556.) Useita laboratoriokokeita käytetään kuitenkin apuna DIK-oireyhtymän toteamisessa. Esimerkiksi D-dimeerien ja trombiini-antitrombiinikompleksien määritykset ovat hyvin herkkiä tutkimuksia, mutta eivät spesifisiä DIK:lle, koska niiden määrän muutokset voivat olla seurausta monista muistakin tiloista kuin DIK:stä. (Hamano ym. 2005: 183)

Myös fibriinimonomeerimääritystä käytetään apuna DIK:n diagnosoinnissa (HUSLAB 2006). Trombiinin vaikutuksesta DIK:ssä syntyy suuria määriä fibriinimonomeerejä, jotka muodostavat komplekseja fibrinogeenin kanssa (Hoffbrand ym. 2001: 269). Liukoisten fibriinimonomeerikompleksien lisääntyneen määrän ajatellaan olevan merkki uhkaavasta tilanteesta, joka voi johtaa tukokseen. Kliinisessä käytössä ei kuitenkaan vielä ole nopeaa menetelmää liukoisten fibriinikompleksien määrittämiseksi plasmasta. (Hamano ym. 2005: 183.)

4 LABORATORIOMENETELMÄN VALIDOINTI

Laboratoriotoiminta perustuu validoitujen analyysimenetelmien käyttöön (Jaarinen – Niiranen 2005: 11). Validoinnilla tarkoitetaan prosessia, jonka avulla osoitetaan analyysimenetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Soveltuvuuden lisäksi validoinnissa arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä. Menetelmävalidointi on tärkeä toimenpide kemiallisen analyysin tulosten luotettavuuden kannalta. (Ehder 2005: 25.) Validoinnin tulosten sekä muiden taustatietojen perusteella voidaan todeta menetelmän luotettavuus. (Jaarinen – Niiranen 2005: 11).

Validoinnissa analyysimenetelmän suorituskyvystä otetaan selvää suunniteltujen mittausarjojen avulla (Jaarinen – Niiranen 2005: 11). Laboratorion teknis-analyyttinen tai kliininen vastuhenkilö päättää validoinnin laajuudesta ja toteutuksesta. Mittauksista saatuja tuloksia verrataan laatutavoitteisiin ja mahdollisiin muihin validointisuunnitelmassa mainittuihin kriteereihin. Samalla tarkistetaan viitearvojen oikeellisuus. Tuloksista tehdään yhteenvetoraportti johtopäätöksineen. HUSLABissa validointiraportit esitellään erikoisalojen asiantuntijaryhmissä ja raportit hyväksyy vastuualueen johtaja, vas-

tuuyksikön päällikkö tai asiantuntijaryhmän puheenjohtaja. (Toimintakäsikirja 2005: 19–20.)

4.1 Validointiparametrit

HUSLABin Toimintakäsikirja (2005: 19) määrittelee validointiparametreiksi laitteen teknisen suorituskyvyn vastaanottotarkastuksen ja asennuksen jälkeen, tietoliikenteen toimivuuden ja analyttisen suorituskyvyn. Analyttistä suorituskykyä mitataan useilla eri mittareilla.

4.2 Analyttisen suorituskyvyn mittarit

Toimintakäsikirjassa luetellaan analyttisen suorituskyvyn mittareiksi seuraavat:

- toistuvuus (repeatability)
- uusittavuus (reproducibility)
- lineaarisuus (linearity)
- mitta-alue (range of measurement)
- kvantitointiraja (limit of quantitation)
- toteamisraja (limit of detection)
- oikeellisuus (trueness)
- mitta-epävarmuus (uncertainty of measurement)

(Toimintakäsikirja 2005: 20)

Toistuvuudella tarkoitetaan peräkkäisten mittaustulosten yhtäpitävyyttä. Toistuvuutta tutkittaessa mittaukset tehdään lyhyellä aikavälillä, saman henkilön toimesta, samoissa olosuhteissa ja samalla laitteella. (Ehder 2005: 37.) Toistuvuus jaetaan sarjan sisäiseen ja sarjojen väliseen toistuvuuteen. Toistuvuuksia selvittäessä tulee käyttää vähintään kahta eritasoista näytettä, kun käytetään menetelmää, jossa sama näyte analysoidaan useaan kertaan peräkkäin. Sisäistä toistuvuutta voidaan tutkia myös parimenetelmän avulla tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä eripitoisista näytteistä. (Toimintakäsikirja 2005: 20) Sarjojen välinen hajonta on aina hieman suurempi kuin sarjan sisäinen hajonta (Jaarinen – Niiranen 2005: 12).

Uusittavuus kertoo mittaustulosten yhtäpitävyydestä muuttuneissa olosuhteissa. Muutunut olosuhde voi olla esimerkiksi mittauksen suorittaminen eri laboratorioissa. Tavallisimmin tutkitaan menetelmän sisäistä uusittavuutta. Tällöin sama näyte analysoidaan eri laboratorioissa, eri laitteella ja eri henkilöiden suorittamana. Uusittavuus on lukuarvoltaan aina suurempi kuin toistuvuus. (Jaarinen – Niiranen 2005: 12.)

Linearisella mittausalueella mittalaitteen herkkyys on vakio. Tällä alueella tulosten ja näytteestä tutkittavan aineen pitoisuuden välillä on lineaarinen korrelaatio. (Jaarinen – Niiranen 2005: 13.) Useimmiten lineaarisuuden kriteeriksi riittää, että menetelmä on lineaarinen jollain tietyllä mittausalueella (Lehtonen – Sihvonen 2004: 95). Lineaarisuuden määrittämiseksi suositellaan yleensä nollanäytteen lisäksi käytettäväksi vähintään viittä eripitoista näytettä, joiden pitoisuudet kattavat koko vaaditun mittausalueen. Lineaarisuustutkimuksen ohella saadaan myös määritettyä menetelmän luotettava mittausalue. Mittausalue on useimmiten lineaarista aluetta laajempi. (Ehder 2005: 28–29.)

Kvantitointiraja on pienin analyytin pitoisuustaso, jossa kvantitatiivisia mittauksia voidaan tietyllä luotettavuustasolla suorittaa. Toteamisraja taas on analyytin pienin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti, 95%:n tasolla, havaita. Oikeellisuudella tarkoitetaan sitä, kuinka lähellä saadut mittaustulokset ovat todellista arvoa. (Jaarinen – Niiranen 2005: 12–13).

Mittausepävarmuus ilmoittaa arvion rajoista, joiden välissä todellisen arvon katsotaan olevan. Mittaustulos sijoittuu mittausepävarmuuden ilmoittamaan vaihteluväliin tietyllä todennäköisyydellä. Yleensä todennäköisyys on 95%, jolloin tuloksista 95% on mittausepävarmuusrajojen sisällä. (Ehder 2005: 19.)

5 FIBRIINIMONOMEERIEN MÄÄRITTÄMINEN

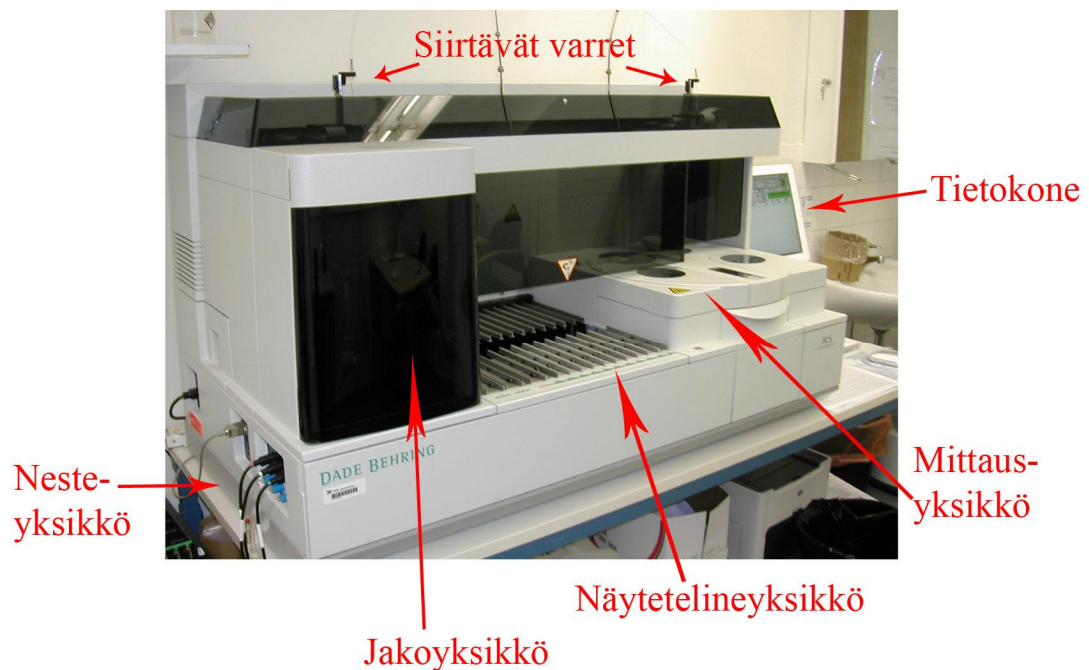
5.1 BCS-analysaattori

Behring Coagulation System (BCS) -analysaattori tekee koagulometrisiä, kromogeenisiä ja immunokemiallisia määrittäyksiä samanaikaisesti. Analysaattori tunnistaa näytteen, suorittaa esilaimennokset, mittaukset sekä kalibroinnin ja kontrollien mittaamisen. (Instruction Manual 2003: 3.) Diagnostica Stagon uuden STA® - Liatest® FM:n immu-

noturbidometriaan perustuvat fibriinimonomeerimääritykset on tässä työssä tarkoitus analysoida BCS-analysaattorilla.

5.1.1 BCS:n toiminnalliset osat

BCS koostuu analysaattorista ja tietokoneesta. Laitteen tärkeimmät toiminnalliset osat ovat tietokone, näytetelineyksikkö, jakoyksikkö, siirtävät varret, mittausyksikkö sekä nesteysyksikkö (kuvio 7). (Training Manual 4.0: 1.)



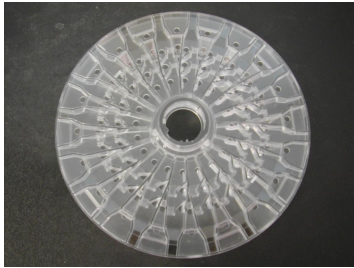
KUVIO 7. BCS-analysaattorin toiminnalliset osat (Heiskanen 2006; mukailten Training Manual 4.0: 1).

Näytetelineyksikkö koostuu 14:sta linjasta. Linjat yhdestä kolmeen ovat vain reagensseja varten. Reagenssilinjoista kaksi on jäädytetty +15 asteeseen. Muihin linjoihin voi laittaa joko näytteitä tai reagensseja. Yhteen näytetelineeseen mahtuu kymmenen näytettä. Reagensseille on omat telineensä, joihin sopii erikokoisia pulloja. Kuhunkin linjaan voi laittaa yhden näytetelineen kerrallaan. Viivakoodinlukija siirtyy automaattisesti lukemaan näytteen tai reagenssin viivakoodin. Jos viivakoodia ei pystytä lukemaan tai sitä ei ole, voidaan tiedot syöttää analysaattorille manuaalisesti. (Instruction Manual 2003: 4–5.)

Jakoyksikössä sijaitsee reagenssi- ja näytelaimentaja. Laimentajat koostuvat ruiskusta ja

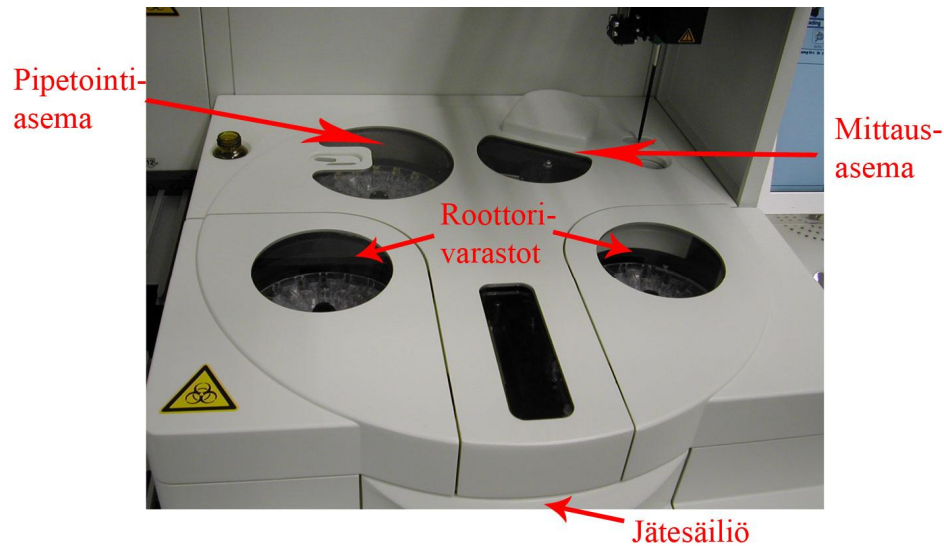
venttiilistä. Ruiskuosa jakaa ja aspiroi näytteen venttiilin kontrolloidessa tapahtumaa. (Instruction Manual 2003: 6.)

BCS:ssä on kaksi siirtävää vartta, joissa on pipetit. Toinen varsi kuljettaa näytettä tai kontrollia putkesta roottoriin, joka sisältää kyvetit. Toinen varsi tuo roottoriin reagenssit. Yhdessä kyvettiroottorissa voi suorittaa 20 määritystä (kuvio 8). (Instruction Manual 2003: 7, 12.)



KUVIO 8. Kyvettiroottori (Heiskanen 2006).

Mittausyksikkö koostuu kyvettiroottorin käsittelijästä, kahdesta roottorivarastosta, pipetointiasemasta, mittausasemasta ja käytettyjen roottorien jätesäiliöstä (kuvio 9). Mittausyksikön lämpötila pysyy koko mittausajan 37 asteessa. Kyvettiroottorin käsittelijä siirtää roottoreita varastosta toiseen ja sieltä tarvittaessa edelleen pipetointiasemaan, mittausasemaan ja lopulta jätesäiliöön. Käsittelijä pystyy myös siirtämään osittain käytetyt roottorit takaisin pipetointiasemaan tai roottorivarastoon uudelleenkäytettäviksi. Roottoreita lisätään manuaalisesti oikeanpuoleiseen roottorivarastoon. Pipetointiasemassa näytteet ja reagenssit pipetoidaan roottorin sisältämiin kyvetteihin, joissa laite inkuboi, sekoittaa tai laimentaa näytteitä tarpeen mukaan. Mittausasemassa roottoria pyöritetään, jolloin reaktion kaikki aineet pääsevät sekoittumaan. Tämän jälkeen tapahtuu mittaus. Jäteastia tyhjennetään, kun laite ilmoittaa sen olevan täynnä. (Instruction Manual 2003: 10–11.)



KUVIO 9. Mittausyksikön osat. (Kyvettiroottorin käsittelijää ei näy kuvassa, sillä se sijaitsee analysaattorin sisällä.) (Heiskanen 2006; mukaillen Instruction Manual 2003: 10.)

Nesteyksikköön kuuluu pumput, kolme laitteen ulkopuolella sijaitsevaa muovikanisteria sekä niihin johtavat letkut. Yksi kanisteri sisältää tislattua vettä, toinen desinfiointiainetta. Kolmas kanisteri on jätekanisteri. Kanistereissa on nestepinnan tasoa mittaava anturi, jonka ansiosta laite ilmoittaa, kun nesteitä pitää lisätä tai jätekanisteri tyhjentää. Venttiili huolehtii nesteiden ottamisesta ja annostelusta jakoyksikön laimentajille. (Instruction Manual 2003: 13.)

5.1.2 Mittausmenetelmä

BCS:n suorittamat mittaukset perustuvat fotometriaan. Valolähteenä on ksenon lamppu, joka vilkkuu lähettäen valoa laajalla aallonpituudella. Sopivaa suodatinta käyttämällä saadaan aikaan haluttu, kapeampi aallonpituus. (Training Manual 4.0: 10.) Haluttua aallonpituutta oleva valo ohjataan kahteen kanavaan: referenssikanavaan ja mittauskanavaan. Referenssikanavaan kulkeva valo ohjautuu suoraan detektorille. Mittauskanavaan kulkeutunut valo kulkee kyvetissä olevan näytteen läpi ja päättyy detektorille. (Training Manual 4.0: 9–10.)

Valonsäteen voimakkuus heikkenee, kun se kulkee näytteen läpi. Heikkeneminen johtuu valon sirottumisesta tai absorboitumisesta näytteeseen. Absorbanssin suuruus määritetään kaksiosaisen mittauksen avulla. Ensimmäinen mittaus on referenssi- ja mittauskanavan pimeämittaus, jolloin lamppu on sammuksissa. Toinen mittaus suoritetaan, kun

lampun kirkkaus on suurimmillaan. Myös kirkasmittaus suoritetaan molempien kanavien osalta. Saaduista tuloksista absorbanssi lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\text{Absorbanssi} = \lg \frac{\text{referenssikanavan kirkas arvo} - \text{referenssikanavan pimeä arvo}}{\text{mittauskanavan kirkas arvo} - \text{mittauskanavan pimeä arvo}}$$

(Training Manual 4.0: 9–10)

Absorbanssia käytetään kvantitatiivisissa mittauksissa, koska sen arvo on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon (Jaarinen – Niiranen 2005: 52). Fotodetektorin avulla kyvetin läpi kulkeneen valonsäteen voimakkuus käännetään sähköiseksi signaaliksi. Sähköisiä signaaleja mitataan koko mittaustapahtuman ajan. Valitun laskentatyypin avulla signaalit saadaan muutettua tuloksiksi. (Training Manual 4.0: 9,11.)

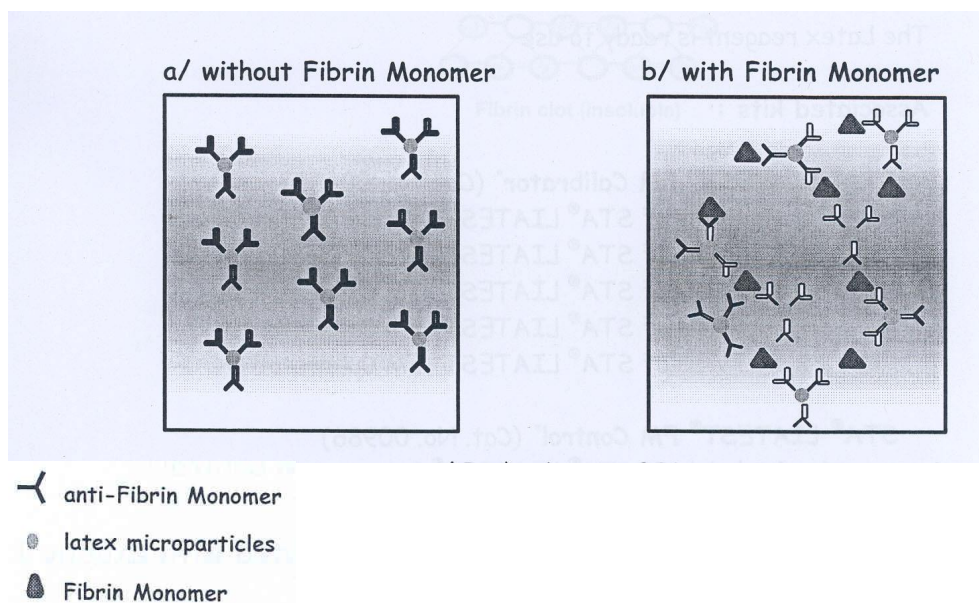
BCS:ssä mittaukset voidaan suorittaa kolmella periaatteella: hyytymisaikaan perustuvalla, kromogeenisellä ja immunokemiallisella menetelmällä. Fibriinimonomeerejä määritettäessä kyseessä on immunokemiallinen menetelmä. Siinä proteiinin konsentraatio määritetään mittaamalla vasta-aine -antigeeni -kompleksin muodostumisnopeutta. (Instruction Manual 2003: 23.)

5.2 STA® - Liatest® FM – immunoturbidometrinen menetelmä

Diagnostica Stagon STA® - Liatest® FM liukoisten fibriinimonomeerikompleksien määrittäminen on immunoturbidometrinen. Menetelmässä liukoisten fibriinimonomeerikompleksien määrä mitataan fotometrillä ja saadaan kvantitatiivinen eli numeerinen tulos. Määrittäminen voidaan suorittaa automatisoidusti. Näytteenä käytetään potilaan plasmaa, joka on otettu 109 mM:n sitraattiputkeen. (Diagnostica Stago 2005b.)

Määrittäminen perustuu mikropartikkelisuspension turbiditeetin eli sameuden muutokseen. Reagenssissa olevat lateksimikropartikkelit on päällystetty fibriinimonomeerille spesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella. (Diagnostica Stago 2005b.) Monet aiemmatkin fibriinimonomeerimääritykset ovat perustuneet monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Vasta-aineet reagoivat fibriinimonomeerimolekyylien pinnan määrättyihin rakenteisiin, joita paljastuu fibrinopeptidien irtoamisen ja polymerisaation aiheuttamien muutosten seurauksena. (Horan – Francis 2001: 658.)

STA® - Liatest® FM immunoturbidometrisessä menetelmässä vasta-aineet on sidottu mikropartikkeleihin kovalenttisilla sidoksilla. Lateksimikropartikkelisuspensio ja testattava näyteplasma sekoitetaan keskenään. Antigeeni-vasta-aine -reaktio johtaa lateksimikropartikkelien ja näyteplasmassa mahdollisesti olevien liukoisten fibriinimonomeerikompleksien agglutinaatioon (kuvio 10). Tämän seurauksena reaktioseoksen sameus lisääntyy. Sameuden lisääntyminen vaikuttaa absorbanssiin, jota mitataan fotometrisesti. Absorbanssin avulla näytteen liukoisten fibriinimonomeerikompleksien pitoisuus saadaan selville. Absorbanssin mittausta tapahtuu 540 nanometrissä. (Diagnostica Stago 2005b.)



KUVIO 10. a) Näytteessä ei ole fibriinimonomeerejä, joten agglutinaatiota ei tapahdu. b) Näytteessä olevat fibriinimonomeerit aiheuttavat mitattavan agglutinaation kiinnittyessään lateksimikropartikkelien pinnalla oleviin fibriinimonomeereille spesifisiin vasta-aineisiin. (Diagnostica Stago 2005a: 6.)

Reagenssi ja puskuri ovat käyttövalmiita liuoksia. Ennen käyttöä niitä tulee seisottaa 15 minuuttia huoneenlämmössä. Molempia sekoitetaan huolellisesti kääntelemällä, varoen ilmakuplien muodostumista. Avatut reagenssit säilyvät kaksi päivää. (Diagnostica Stago 2005b.)

STA® - Liatest® FM kontrollit liuotetaan 1 millilitraan tislattua vettä ja annetaan seistä huoneenlämmössä 30 minuuttia. Ennen käyttöä niitä vielä sekoitetaan hellävaraisesti. Liuotetut kontrollit säilyvät käyttökelpoisina 8 tuntia eivätkä kestä pakastusta. (Diagnostica Stago 2005b.)

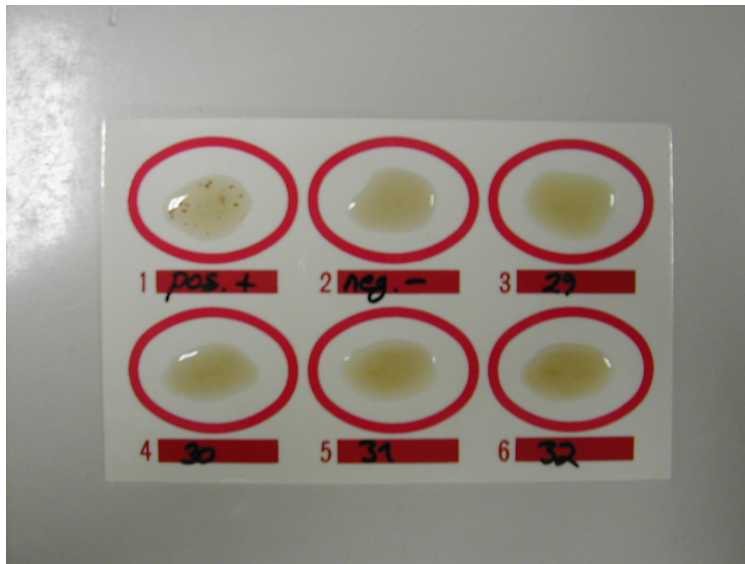
5.3 Vertailumenetelmä – agglutinaatiotesti

Liukoisten fibrinimonomeerikompleksien määrittäminen F.S Test:llä on tällä hetkellä HUSLABin Meilahden sairaalan laboratoriossa käytössä oleva menetelmä. Se perustuu hemagglutinaatioon ja on kvalitatiivinen. Testimateriaalina käytetään potilaan plasmaa, joka on otettu 109 mM:n sitraattiputkeen. (Diagnostica Stago 2003.)

Menetelmässä käytettävä reagenssi sisältää ihmisperäisiä punasoluja, jotka on päällystetty puhdistetuilla fibrinimonomeereillä. Hemagglutinaatio tapahtuu, jos potilaan plasmassa on fibrinimonomeerejä. Ne muodostavat kompleksin punasolureagenssin fibrinimonomeerien kanssa. Kompleksimuodostus johtaa punasolujen agglutinointiin. Tuloksen tulkinta perustuu hemagglutinaation silmämääräiseen arviointiin. Menetelmän mittauskynnys on noin 10 µg/ml, jolloin tämän arvon ylittävät näytteet näkyvät testissä positiivisina. (Diagnostica Stago 2003.)

Reagenssi ja kontrollit ovat kylmäkuivattuja. Positiivinen kontrolli on liukoista fibrinikompleksia sisältävä näyte. Negatiivinen kontrolli on ihmisperäistä normaaliplasmaa, joka ei sisällä fibrinimonomeereja. Reagenssiin, positiiviseen ja negatiiviseen kontrolliin lisätään kuhunkin 0,2 ml tislattua vettä ja annetaan seistä 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Seisotuksen jälkeen pulloja sekoitetaan hellävaraisesti. Liuotettu reagenssi ja kontrollit säilyvät 3 tuntia huoneenlämmössä tai 6 tuntia jääkaapissa. (Diagnostica Stago 2003.)

Määrityksen suoritus on monivaiheinen. Yhden näytteen määrittämiseen tarvitaan kolme lasiputkea: yksi näytteelle ja yksi kummallekin kontrollille. Lasiputkiin pipetoidaan 100 µl testattavaa näytettä tai kontrollia. Sitten lisätään 50 µl hyvin sekoitettua reagenssia kuhunkin lasiputkeen ja inkuboidaan 37 asteessa 10 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen putkien sisältö kaadetaan testikorttiin merkittyihin ympyröihin (kuvio 11). Testikorttia heilutellaan mekaanisessa keinuttajassa 6 minuuttia, jonka jälkeen luetaan tulos: negatiivinen, heikko, keskivahva tai vahva positiivinen. (Saarela 2005.)



KUVIO 11. Testikortti, jonka ympyröihin näytteet on kaadettu (Heiskanen 2006).

6 AIEMMAT TUTKIMUKSET

Immunoturbidometrisestä fibriinimonomeerien määrittämisestä ei ainakaan vielä ole löydettävissä kovinkaan runsaasti tutkimuksia. Seuraavaksi käyn läpi aiheeseen liittyvät tutkimukset, joista toinen esittelee uuden monoklonaalisen vasta-aineen fibriinimonomeerien ja liukoisen fibriinin osoittamiseksi. Toisessa tutkimuksessa immunoturbidometristä fibriinimonomeerien määrittämistä potilasnäytteistä on testattu käytännössä.

6.1. Uusi monoklonaalinen vasta-aine fibriinimonomeerien ja liukoisen fibriinin havaitsemiseksi plasmasta

Ennen tämän japanilaisryhmän tutkimuksia, useat muutkin ryhmät ovat pyrkineet kehittämään spesifisen monoklonaalisen vasta-aineen fibriinimonomeerien tai liukoisen fibriinin määrittämiseksi. Aiemmat tutkimukset ovat tuottaneet joitain määrittämenetelmiä. Osa määrittämenetelmistä on vaatinut esikäsitteilyä tai ne eivät ole olleet spesifejä: menetelmässä on voitu havaita huomattavaa ristireagoitua fibriinin hajoamistuotteiden kanssa. Tästä kertoo esimerkiksi pitoisuuksien korrelaatio D-dimeeripitoisuuksien kanssa. Japanilaisryhmä ilmoittaa kehittäneensä spesifin vasta-aineen, joka reagoi sekä fibriinimonomeerien että liukoisen fibriinin kanssa ilman esikäsitteilyä. (Hamano – Tanaka – Takeda – Umeda – Sakata 2002: 26, 31.)

Japanilaisryhmän kehittämä vasta-aine on F405, joka reagoi desAA-fibriinin kanssa. F405-vasta-aine reagoi fibriinimonomeerien kanssa sekä trombiinin vaikutuksesta pilkkoutuneiden fibriinin kappaleiden X, Y ja E kanssa. Liukoisella fibriinillä ja fibriinin johdannaisilla on rakenteellisesti samanlainen kohta α -ketjussa, joka paljastuu A-fibrinopeptidien irrotessa. Tähän kohtaan F405-vasta-aine pystyy kiinnittymään. Yhteisen sitoutumiskohdan vuoksi F405 näyttää tunnistavan kaikki liukoisen fibriinin muodot. F405-vasta-aine ei reagoi fibrinogeenin eikä sen X, Y, D ja E -johdannaisten kanssa eikä myöskään reagointia D-dimeerin kanssa ole havaittu. (Hamano ym. 2002: 28–31.)

6.2 Tutkimus liukoisten fibriinikompleksien lateksi-immunoturbidometrisestä määrittämisestä

Japanilaisessa tutkimuksessa käytettiin edellä mainittua monoklonaalista F405-vasta-ainetta, joka reagoi spesifisti desAA-fibriinin kanssa. Vasta-aine on sidottu lateksipartikkeleihin. Määrittämis menetelmä perustuu lisääntyneeseen turbiditeettiin, joka aiheutuu reaktiosta vasta-aineen ja näytteessä olevien liukoisten fibriinikompleksien välillä. Määrittäykset suoritettiin täysin automatisoidulla Hitachi 911 analysaattorilla. (Hamano ym. 2005: 183.)

Tulokseksi saatiin, että luotettava mittausalue oli välillä 3–300 $\mu\text{g/ml}$. Menetelmän lineaarisuus, tarkkuus ja herkkyys todettiin hyviksi. Linearisella mittausalueella teoreettiset arvot eivät poikenneet saaduista mittaustuloksista yli viittä prosenttia. Sarjan sisäiset ja sarjojen väliset tarkkuudet osoittivat, että määrittäysten toistuvuus oli hyvä. Sisäisen toistuvuuden CV% oli alle 3% ja sarjan välisen toistuvuuden CV% alle 2%. Menetelmän toteamisrajaksi saatiin $<0,5 \mu\text{g/ml}$. (Hamano ym. 2005:183, 185.)

Ryhmä tutki myös tekijöitä, jotka saattavat häiritä määrittäystä. Kolmella eri pitoisuutta olevalla plasmanäytteellä testattiin mahdollista bilirubiinin, ditaurobilirubiinin, hemoglobiinin, intralipidien, D-dimeerin ja reumafaktorin aiheuttamaa häiriötä määrittämis menetelmässä. Bilirubiini 400 mg/l:aan ja ditaurobilirubiini 440 mg/l:aan asti eivät vaikuttaneet mittaustarkkuuteen. Myöskään hemoglobiini 9,6 g/l:aan, intralipidien nousu kymmeneen prosenttiin sekä D-dimeeri 200 mg/l:aan saakka eivät muuttaneet mittaustarkkuutta. Reumafaktorinkaan kohoaminen jopa 470 000 IU/l:aan ei häirinnyt mittausta. (Hamano ym. 2005: 186.)

Tutkimusryhmä analysoi 304:n terveen, 18–74 -vuotiaan vapaaehtoisen plasmanäytteet ja 160:n DIK-potilaan näytteet. Liukoisten fibriinikompleksien keskimääräiseksi konsentraatioksi saatiin terveillä 1,8 µg/ml. DIK-potilailla keskiarvo oli 48,9 µg/ml. Liukoisten fibriinikompleksien määrä DIK-potilailla oli merkittävästi korkeampi kuin terveillä vapaaehtoisilla. (Hamano ym. 2005: 186.)

Tutkimuksen johtopäätös on, että lateksi-immunoturbidometriaan perustuva määrittymenetelmä suoritettuna Hitachi 911 automaattianalysointilaitteella on sopiva menetelmä liukoisten fibriinikompleksien mittaamiseen. (Hamano ym. 2005: 187)

7 TYÖN TARKOITUS

Työni toimeksiantaja, HUSLABin Meilahden sairaalan laboratorio, on kiinnostunut uudesta kvantitatiivisesta STA® - Liatest® FM fibriinimonomeerimäärityksestä, joka on tullut markkinoille. He haluavat selvittää, olisiko mahdollista korvata nykyinen agglutinaatioon perustuva kvalitatiivinen fibriinimonomeeritestillä tällä uudella menetelmällä. Jos uusi menetelmä osoittautuu sopivaksi, se otettaisiin myös päivystystutkimukseksi.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on testata immunoturbidometrisen STA® - Liatest® FM menetelmän tiettyjä analyttisiä suorituskykyominaisuuksia sekä verrata nykyisen ja uuden menetelmän tuloksia. Tutkimuksessani haen vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Minkälainen on sarjan sisäinen toistuvuus kvantitatiivisella menetelmällä?
- Minkälainen on sarjojen välinen toistuvuus kvantitatiivisella menetelmällä?
- Minkälainen lineaarisuus on kvantitatiivisella menetelmällä?
- Millaisia tuloksia kvantitatiivinen menetelmä antaa agglutinaatiotestiposiitivisille/negatiivisille näytteille? (tasovertailu)
- Millainen vaihteluväli on kvantitatiivisen menetelmän tuloksissa agglutinaationegatiivisilla näytteillä? (tasovertailu)

Työn edetessä tuli aiheelliseksi tutkia menetelmän spesifisyyttä testaamalla fibriinimonomeeritulosten mahdollista korrelaatiota valittuihin muihin hyytymistutki-

mustuloksiin. Niinpä tutkimusongelmiksi päätettiin nostaa vielä seuraavat kysymykset:

- Minkälainen on fibriinimonomeerin ja fibrinogeenin välinen korrelaatio?
- Minkälainen on fibriinimonomeerin ja D-dimeerin välinen korrelaatio?

Menetelmän validointi on kokonaisuudessaan suuri prosessi, eikä koko validointia tässä vaiheessa vielä ole tarpeen suorittaa. Menetelmän soveltuvuutta haluttiin ensin tutkia menetelmän analyttistä suorituskykyä mittaamalla ja jättää muut validointiparametrit huomiotta. Muita validointiparametrejä: laitteen teknistä suorituskykyä ja tietoliikenteen toimivuutta, ei koettu tärkeäksi tarkastella työssäni senkään vuoksi, että BCS-hyytymistutkimusanalysaattori on jo käytössä muiden hyytymistutkimusten määrittämisessä ja tietoliikenne toimii hyvin.

Opinnäytetyössäni menetelmän suorituskyvyn arvioimiseksi haluttiin lähteä liikkeelle samoin kuin hyytymistutkimusten kohdalla on aiemminkin ollut käytäntönä. Opinnäytetyöni kaltaiseen alustavaan tutkimukseen ei ole tarkoitus ottaa mukaan kaikkia analyttisen suorituskyvyn mittareita, vaan uudesta menetelmästä lähdetään kalibroinnin jälkeen tutkimaan toistuvuuksia ja lineaarisuutta. Toistuvuuksien avulla saadaan käsitys siitä, onko uusi menetelmä toimiva ja lineaarisuus kertoo toimiiko menetelmä samalla tehokkuudella koko halutulla mittausalueella (Leinonen 2006). Lisäksi tulee verrata nykyisen ja uuden menetelmän tuloksia, jos määrittämiselle on jo käytössä oleva menetelmä. Tutkimuksen edetessä esiin nousi kysymys tutkimuksen spesifisyydestä eli siitä mittaako menetelmä ainoastaan fibriinimonomeerejä. Spesifisyyttä ajatellen opinnäytetyöhöni haluttiin sisällyttää myös selvitys siitä, korreloiko kvantitatiivisen määrittäminen antama fibriinimonomeeripitoisuus saman näytteen fibrinogeeni- tai D-dimeeripitoisuuksien kanssa.

8 TUTKIMUKSEN SUORITUS

Suoritin opinnäytetyöni kokeellisen osuuden pääosin vuoden 2006 toukokuun ja kesäkuun vaihteessa. Erillistä perehtymistä BCS-analysaattoriin en tarvinnut, sillä se oli minulle tuttu edelliseltä kesältä. Henkilökunta oli kalibroinut uuden menetelmän, joten sen suorittaminen ei sisältynyt opinnäytetyöhöni.

8.1 Tutkimusmateriaali

Tutkimusmateriaaleina käytin kontrolleja ja tuorenäytteitä. Poikkeuksena oli lineaarisuus, johon käytin pakastettuja potilasnäytteitä. Tutkimuksiin valittiin näytteitä, joita tuli hyytymistutkimustyöpisteeseen suppean hyytymistutkimuksen pyynnöllä: P-Hyyttek. Näihin näytteisiin päädyttiin, koska muiden käyttöalueiden ohella sitä käytetään apuna myös DIK:n toteamisessa (HUSLAB 2006). Tämän perusteella oletettiin, että näistä näytteistä saattaa löytyä fibriinimonomeerejä. Osa P-Hyyttek -näytteistä valittiin niiden fibrinogeeni- tai D-dimeeripitoisuuksien mukaan, koska korrelaatioiden selvittämiseksi mukaan haluttiin näytteitä, joissa nämä pitoisuudet vaihtelivat. Varsinaisella fibriinimonomeerien osoitus -pyynnöllä näytteitä tuli tutkimuksen tekoaikana ainostaan yksi. Yhden päivän aikana sain tutkittua noin 6–7 näytettä.

8.2 Sarjan sisäinen toistuvuus

Sarjan sisäistä toistuvuutta haluttiin vertailun vuoksi mitata kahdella menetelmällä. Toisessa käytettiin STA® - Liatest® FM kontrolleja 1 ja 2, sekä HUSLABin omaa hyytymisnormaalitasokontrollia. Kaikki kontrollit analysoitiin 15 kertaa samassa sarjassa. Tällöin analysaattori ohjelmoitiin mittaamaan kukin kontrolleista 15 kertaa peräkkäin. Tuloksista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat sekä variaatiokertoimet prosentteina. CV%:ja verrattiin menetelmävalmistajan ilmoittamiin toistuvuuksiin.

Toisena menetelmänä käytettiin parimenetelmää. Parimenetelmässä analysoitiin 20 eritasoista potilasnäytettä rinnakkaisina. Potilasnäytteinä käytettiin samoja näytteitä, joista tulosten tasovertailu tehtiin. Näytteitä ei tarvinnut analysoida uudelleen, sillä parimenetelmää silmälläpitäen kaikki tasovertailun määritykset oli ohjelmoitu tehtäväksi rinnakkaisina. Näin sain tasovertailun tuloksista poimittua tarvittavat 20, mahdollisimman eritasoista näytettä parimenetelmään. Tuloksista laskettiin sarjan sisäinen keskihajonta ja CV%. Myös parimenetelmästä saatua CV%:a verrattiin menetelmävalmistajan vastaaviin lukuihin.

8.3 Sarjojen välinen toistuvuus

Sarjojen välistä toistuvuutta mitattiin ajamalla kontrolleja kymmenenä päivänä. Kontrolleina käytettiin STA® - Liatest® FM kontrolleja 1 ja 2 sekä HUSLABin hyytymis-

normaalitasokontrollia. Tuloksista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja variaatioker-
toimet prosentteina. Tuloksista laskettuja CV%:ja verrattiin menetelmävalmistajan il-
moittamiin arvoihin.

8.4 Menetelmän lineaarisuus

Lineaarisuutta tutkittiin kahdesta näytteestä. Näytteet olivat pakastettuja potilasnäyttei-
tä. Lineaarisuuden tutkimiseksi suunnittelin laimennossarjan, jonka kemisti hyväksyi.
Laimennoksina käytin seuraavia: 1:1, 0,8:1, 0,6:1, 0,4:1, 0,2:1, 0,1:1. Näytteet laimen-
nettiin hyytymisnormaalitasokontrolliin.

8.5 Tasovertailu

Tasovertailu ei ollut aivan yksinkertaista, sillä varsinaista tasovertailua toisen kvantita-
tiivisen menetelmän kanssa ei voitu tehdä, koska sellaista ei ollut saatavilla. Vertailu
suoritettiin kuitenkin nykyiseen menetelmään. Ongelmana oli, että nykyinen fib-
riinimonomeerien osoitusmenetelmä on kvalitatiivinen ja antaa tulokseksi positiivinen
tai negatiivinen, kun taas uusi menetelmä antaa numeerisen tuloksen. Pohdinnan jälkeen
päädyttiin siihen, että tulosten tasovertailun tarkoituksena on selvittää millaisia tuloksia
kvantitatiivinen menetelmä antaa sekä agglutinaatiotestiposiitiivisille että -negatiivisille
näytteille. Lisäksi haluttiin nähdä, millaisella välillä agglutinaatiotestinegatiivisten näyt-
teiden numeeriset tulokset vaihtelevat.

Tasovertailua varten suoritettiin fibriinimonomeerimääritys molemmilla menetelmillä
40:stä tuorenäytteestä. Päätin tehdä agglutinaatiotestin ensin, koska silloin minulla ei
ollut ennako-odotuksia tuloksesta numeerisen tuloksen pohjalta. Jokaisessa sarjassa
mukana oli positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Ennen immunoturbidometristä määri-
tystä mittasin BCS:llä STA® - Liatest® FM:n kontrollit 1 ja 2 sekä hyytymisnormaali-
tasokontrollin. Hyväksyttävä tulos kontrollilla 1 oli 11–23 µg/ml ja kontrollilla 2 vas-
taavasti 81–121 µg/ml. Hyytymisnormaalitasokontrolli ei sisällä fibriinimonomeerejä,
joten se toimi negatiivisena kontrollina.

8.6 Fibrinimonomeeritulosten korrelaatio fibrinogeeni- ja D-dimeeripitoisuuteen

Fibrinogeeni- ja D-dimeerituloksia minun ei tarvinnut itse määrittää, vaan katsoin ne näytenumeron perusteella Multilab-järjestelmästä ja kirjasin muistiin. Tulokset oli määritetty samasta putkesta, kuin käyttämäni näyte. Korrelaatioita tutkittaessa käytettiin kaikkien 40:n tasovertailussa tutkitun näytteen tuloksia. Fibrinogeeni ja D-dimeeri päätettiin ottaa korrelaatiotestiin sen perusteella, että ne ovat rakenteellisesti lähellä fibrinimonomeerejä. Lisäksi niiden tulokset olivat helposti saatavilla ja niitä molempia käytetään apuna DIK:n osoittamisessa. D-dimeerimääritys on tällä hetkellä ensisijainen tutkimus DIK:n diagnostiikassa. (HUSLAB 2006.)

8.6.1 Fibrinogeeni

Fibrinogeenin rakenne on käsitelty tässä työssä jo aiemmin kappaleessa 3.1, jossa kerrotaan, miten fibrinimonomeerit syntyvät fibrinogeenistä. Fibrinogeeni syntyy maksassa ja on yksi suurimmista plasman proteiineista. Se on akuutin faasin proteiini, jonka vuoksi sen pitoisuus kohoaa tulehduksissa. (Lindsay 2005: 198.) Fibrinogeenin tavallinen pitoisuus on 1,7–4 g/l. Fibrinogeenin lisääntyneen kulutuksen vuoksi sen pitoisuus alenee DIK:ssä. Alentuneet pitoisuudet voivat johtua myös maksan vajaatoiminnasta tai liuotushoidosta. Pitoisuus on alhainen myös perinnöllisessä fibrinogeenin vajauksessa. (HUSLAB 2006.) Fibrinogeenin pitoisuus voi DIK:ssä olla myös normaali tai suurentunut riippuen DIK:n vaiheesta ja siitä onko oireyhtymä akuutti vai krooninen (Rasi 2000: 557).

8.6.2 D-dimeeri

Samanaikaisesti hyytymisen kanssa käynnistyvä fibrinolyysi hajottaa fibriniä plasmiinin avulla. Plasmiini hajottaa myös liukoista fibriniä ja fibrinogeeniä. Fibrinolyysin vaikutuksesta syntyy erilaisia hajoamistuotteita. Yksi fibrinin hajoamistuotteista on D-dimeeri. D-dimeeri koostuu kahden peräkkäisen fibrinimonomeerin D-osista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa kovalenttisin sidoksia. Plasmiini pystyy pilkkomaan vain sidoksia, jotka eivät ole kovalenttisia. (Horan – Francis 2001: 658–660.) D-dimeeripitoisuus on tavallisesti alle 0,5 mg/l. Sen kohoaminen voi johtua DIK:stä, mutta myös monesta muusta syystä kuten laskimotukoksesta, laaja-alaisesta valtimotukoksesta, vaikeasta infektiosta, maligniteetistä, traumasta, leikkauksesta, merkittävästä verenvuodosta, vaikeasta maksan vajaatoiminnasta tai raskaudesta. (HUSLAB 2006.)

8.6.3 Ristireagointi

Kun halutaan mitata tietyn antigeenin pitoisuutta, on toivottavaa, että vasta-aine reagoi ainoastaan mitattavaksi tarkoitettun antigeenin kanssa. Vasta-aine voi kuitenkin reagoida myös sellaisen antigeenin kanssa, jolla on samankaltainen rakenne kuin mitattavalla antigeenillä. Silloin on kyseessä ristireagointi. Mitä suurempi samankaltaisuus on ristireagoivan ja mitattavan antigeenin välillä, sitä voimakkaammin ristireagoiva antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen. Antigeenien samankaltaisuus on yleistä. (Orton 2005: 147.) Diagnostica Stago ilmoittaa, että STA® - Liatest® FM fibriinimonomeerimäärityksessä käytettävä monoklonaalinen vasta-aine on spesifi fibriinimonomeereille (Diagnostica Stago 2005b). Ilmoitetun perusteella vasta-aine ei ristireagoi muiden antigeenien kanssa, vaan mittaa ainoastaan fibriinimonomeerejä.

9 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Tulosten laskennan suoritin pääosin Excelissä. Pearsonin korrelaatiotestaukset suoritin kuitenkin SPSS 14.0 -tilasto-ohjelmalla. Tasovertailun tuloksia ei voinut analysoida millään ohjelmalla, vaan niitä tuli tarkastella sellaisenaan.

9.1 Työssä tarkasteltavat tunnusluvut

Tässä työssä keskiarvolla tarkoitetaan aritmeettista keskiarvoa. Keskiarvo lasketaan summaamalla mittausten tulokset yhteen ja jakamalla saatu arvo mittausten lukumäärällä. Työssäni mittausten lukumäärä jää varsin pieneksi, jolloin ääriarvot voivat vaikuttaa huomattavasti keskiarvoon. (Heikkilä 2004: 83.)

Keskihajonta (SD) on tärkeä hajonnan mitta. Se kuvaa sitä, kuinka hajalleen mittausten arvot ovat sijoittuneet keskiarvon ympärille eli arvojen keskimääräisen poikkeaman keskiarvosta. (Heikkilä 2004: 86.) Mitä suurempi keskihajonta on, sitä enemmän arvot vaihtelevat (Taanila 2004).

Variaatiokerroin kuvaa suhteellista hajontaa ja ilmoitetaan usein prosentteina (CV%). Variaatiokerroimen avulla pystytään vertailemaan eri suuruusluokkaa olevien muuttujien tai eri mittayksikköä olevien muuttujien arvojen hajontaa. (Heikkilä 2004: 87–88.) Variaatiokerroin saadaan jakamalla keskihajonta keskiarvolla (Taanila 2004). Työssäni

prosentteina ilmoitettua variaatiokerrointa käytetään sarjan sisäisen ja sarjojen välisten toistuvuuksien tarkasteluun.

Korrelaatiokerroin (r) on tilastollinen tunnusluku, jolla mitataan muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta. Työssäni käytetään Pearsonin korrelaatiokerrointa, joka mittaa muuttujien välistä lineaarista riippuvuutta. Korrelaatiokerroin on aina välillä -1 ja $+1$. (Holopainen – Pulkkinen 2002: 156.) Työssäni korrelaatiokertoimen avulla tutkitaan fibriinimonomeeri- ja D-dimeerimääritysten sekä fibriinimonomeeri- ja fibrinogeenimääritysten välistä riippuvuutta. Korrelaatioiden tarkasteluun liittyy läheisesti selityssaste (r^2), joka ilmoitetaan prosentteina. Luku kertoo, kuinka suuren osan selittävä muuttuja (x) selittää selitettävän muuttujan (y) vaihtelusta. Selityssaste lasketaan korottamalla korrelaatiokerroin toiseen potenssiin. (Heikkilä 2004: 92.)

9.2 Sarjan sisäinen toistuvuus

Menetelmävalmistajan ilmoittamat sarjan sisäisen toistuvuuden tulokset esitellään taulukossa kaksi. Samasta taulukosta nähdään myös sarjojen välisten toistuvuuksien tulokset. Valmistaja on käyttänyt mittauksissaan kahta eritasoista näytettä.

TAULUKKO 2. Diagnostica Stagon ilmoittamat tulokset sarjan sisäisille ja sarjojen välisille toistuvuuksille (Diagnostica Stago 2005a).

	Intra-Assay Reproducibility		Inter-Assay Reproducibility	
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
n	21	21	10	10
ka ($\mu\text{g/ml}$)	17,3	100,1	18,1	95,7
SD ($\mu\text{g/ml}$)	1,4	3,1	1,6	4,0
CV%	8,0	3,1	8,8	4,2

Sarjan sisäistä toistuvuutta testattiin analysoimalla kahta fibriinimonomeerimäärältään eritasoista kontrollia 15 kertaa peräkkäin. Samoin tehtiin hyytymisnormaalitasokontrollille, joka ei sisällä fibriinimonomeerejä. Sen kaikki tulokset olivat hyvin lähellä nollaa, kuten tuleekin olla. Taulukossa kolme on yhteenveto määritysten keskiarvoista (ka), keskihajonnoista (SD) ja prosentteina ilmoitetuista variaatiokertoimista (CV %).

TAULUKKO 3. Sarjan sisäisen toistuvuuden tulokset.

	Liatest FM kontrolli 1	Liatest FM kontrolli 2
n	15	15
ka ($\mu\text{g/ml}$)	15,35	84,59
SD ($\mu\text{g/ml}$)	0,80	2,90
CV%	5,23	3,43

Sarjan sisäinen toistuvuus on kummallakin tasolla hyvä ja samaa suuruusluokkaa kuin menetelmävalmistaja ilmoittaa. Keskiahjonta on matalamman pitoisuuden kontrollilla (kontrolli 1) 0,8 $\mu\text{g/ml}$ ja variaatiokerroin 5,2 %. Verrattaessa saatua variaatiokerrointa menetelmävalmistajan saamaan variaatiokertoimeen 8,0 % todetaan, että saamani variaatiokerroin on jopa parempi kuin menetelmävalmistajan ilmoittama.

Korkeamman pitoisuuden (kontrolli 2) tulokset vastasivat hyvin toisiaan. Variaatioker-toimeksi saatiin 3,4 %, menetelmävalmistaja vastaavasti 3,1 %. Tuloksista voidaan to-deta, että variaatiokerroin on parempi korkeammalla pitoisuustasolla, kuin matalammal-la. Yksittäisiä suuresti toisista poikkeavia mittaustuloksia ei kummallakaan tasolla ollut, joten ne eivät päässeet vaikuttamaan tuloksiini.

Sarjan sisäistä toistuvuutta mitattiin myös parimenetelmällä (taulukko 4). Näytteiksi valittiin 20 mahdollisimman eritasoista näytettä. Näytteiden pitoisuudet vaihtelivat vä-lillä 0,6–177,4 $\mu\text{g/ml}$, joten väli kattoi koko menetelmävalmistajan ilmoittaman mitta-usalueen 5–150 $\mu\text{g/ml}$. Parimenetelmästä laskettu CV% oli 1,8 %, joka on matalampi kuin menetelmävalmistajan ilmoittama CV% kummallekaan pitoisuudelle: 8,0 % pitoi-suudella 17,3 $\mu\text{g/ml}$ ja 3,1 % pitoisuudella 100,1 $\mu\text{g/ml}$. Sarjan sisäinen toistuvuus on hyvä myös parimenetelmän tulosten perusteella.

TAULUKKO 4. Sarjan sisäinen toistuvuus parimenetelmällä.

n	20
ka	69,58
SD	1,28
CV%	1,80

9.3 Sarjojen välinen toistuvuus

Fibriinimonomeerimäärityksen sarjojen välistä toistuvuutta mitattiin käyttämällä kahta eritasoista fibriinimonomeerikontrollia sekä hyytymisnormaalitasokontrollia. Tulokset on kerätty kymmeneltä päivältä. Hyytymisnormaalitasokontrollin kaikki 10 mittausta antoivat tulokseksi alle 0,0 µg/ml, kuten oli odotettavissa sen toimiessa negatiivisena kontrollina. Fibriinimonomeerejä sisältävien kontrollien tuloksista lasketut keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet on esitetty taulukossa viisi.

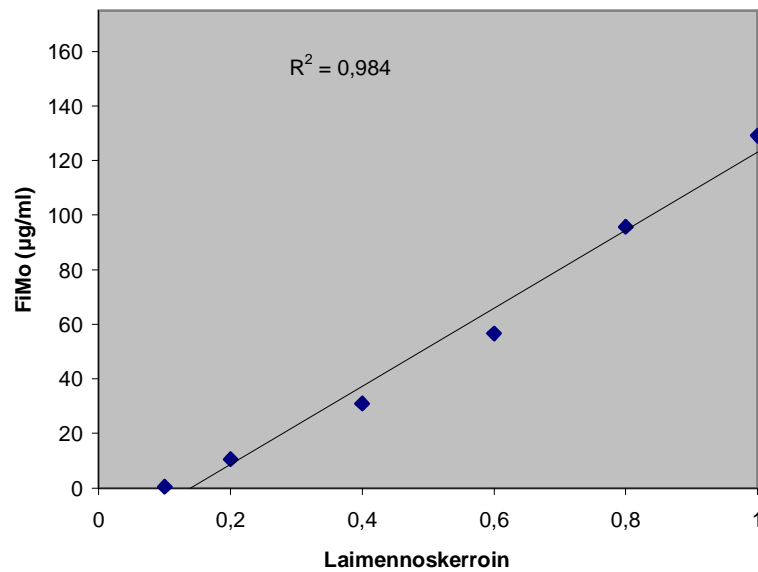
TAULUKKO 5. Sarjojen välinen toistuvuus.

	Liatest FM kontrolli 1	Liatest FM kontrolli 2
n	10	10
ka (µg/ml)	15,65	88,99
SD (µg/ml)	1,39	4,54
CV%	8,88	5,10

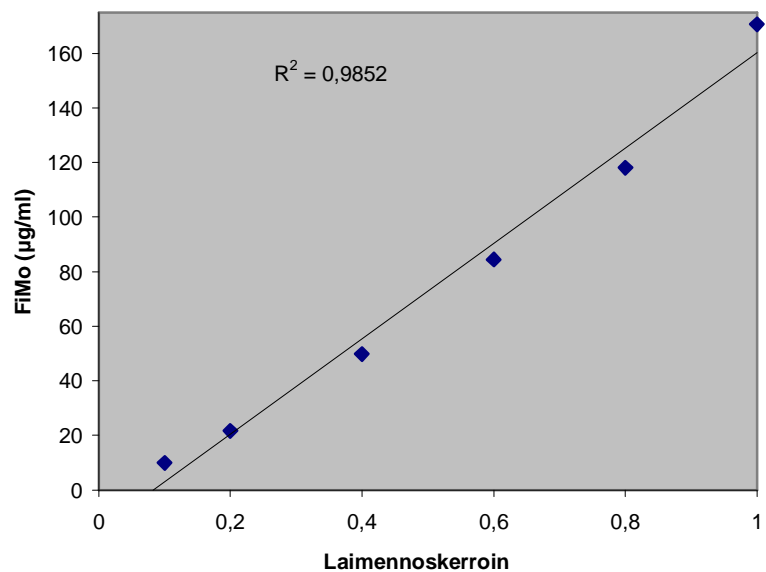
Myös sarjojen välinen toistuvuus osoittautui hyväksi. Kontrollilla 1 keskiarvoksi saatiin 15,7 µg/ml, keskihajonnaksi 1,4 µg/ml ja variaatiokerroimeksi 8,9 %. Kontrollilla 2 keskiarvo oli 89,0 µg/ml, keskihajonta 4,5 µg/ml ja variaatiokerroin 5,1 %. Tuloksia menetelmävalmistajan tuloksiin (taulukko 2) verrattaessa nähdään, että matalamman tason CV% on lähes sama kuin menetelmävalmistajan ilmoittama 8,8 %. Myöskään korkeamman pitoisuuden CV% ei eroa merkittävästi ilmoitetusta 4,2 %:sta. Menetelmävalmistaja on tutkinut sarjojen välistä toistuvuutta yhtä monen määrittäykseen tuloksista kuin tutkimuksessani, joten tulokset ovat hyvin vertailtavissa. Yksittäisiä, toisista suuresti poikkeavia tuloksia ei määrittäyksissä tullut. Sarjojen välinen hajonta on hieman suurempi kuin sarjan sisäinen hajonta.

9.4 Menetelmän lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta arvioitiin tekemällä kahdesta korkean fibriinimonomeeripitoisuuden omaavasta näytteestä laimennossarjat. Laimentaminen suoritettiin käsin pipetoimalla. Kuvioissa 12 ja 13 on esitetty näytteiden regressiosuorat.



KUVIO 12. Menetelmän lineaarisuus näytteestä 1 mitattuna. Näytteen fibrinimonomeeripitoisuus on 129,1 µg/ml.



KUVIO 13. Menetelmän lineaarisuus näytteestä 2 mitattuna. Näytteen fibrinimonomeeripitoisuus on 170,7 µg/ml.

Näytteestä 1 tehdyn laimennossarjan korrelaatiokertoimeksi tuli 0,984. Näyte 2 antoi korrelaatiokertoimeksi lähes saman 0,985. Vaikka korrelaatiokertoimet vaikuttavat suhteellisen hyviltä, menetelmän lineaarisuus ei ole tutkimuksen perusteella optimaalinen, sillä se ei toimi täysin lineaarisesti ilmoitetulla mittausalueella. Mittauksista on laskettu

teoreettiset tavoitearvot kertomalla laimentamattoman näytteen arvo laimennoskertomalla (liite 1). Teoreettiset tulokset poikkeavat huomattavasti mitatuista tuloksista. Mitä vähemmän näytteessä on fibriinimonomeerejä, sitä enemmän tulokset poikkeavat toisistaan. Myös kuvioista 12 ja 13 nähdään, että mittauspisteet eivät ole aivan suoralla linjalta.

9.5 Tasovertailu

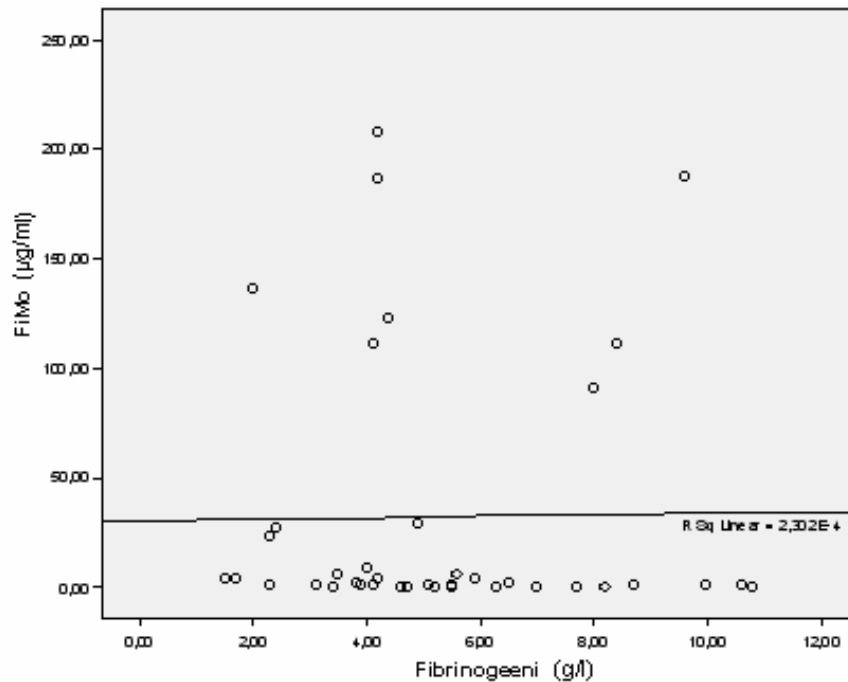
Kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen fibriinimonomeerimäärityksen vertailu ei onnistunut aiotulla tavalla, sillä vertailun suorittamisen aikana ei tullut yhtään kvalitatiivisessa määrityksessä positiivista näytettä. Kaikki 40 näytettä antoivat agglutinaatiotestissä negatiivisen tuloksen. Koska näytteet kuitenkin ovat ainakin osin tulleet analysoitaviksi DIK-epäilyllä, ne analysoitiin myös kvantitatiivisella menetelmällä. Menetelmä antoi agglutinaationegatiivisille näytteille pitoisuuksia väliltä 0,0–207,7 µg/ml. Agglutinaatiotesti ilmoittaa tuloksen positiiviseksi, jos näytteessä oleva fibriinimonomeeripitoisuus on yli 10 µg/ml. 27,5% näytteistä antoi immunoturbidometrisellä menetelmällä tuloksen, joka on yli 10 µg/ml. Tulokset viittaavat siihen, että kvalitatiivisella ja kvantitatiivisella testillä on ainakin osin eri spesifisyys.

Analyyttinen spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä mitata vain tutkittavaa analyyyttiä. Menetelmän katsotaan olevan spesifinen, jos se on täysin selektiivinen tutkittavalle analytyille. Selektiivisyys tarkoittaa menetelmän kykyä määrittää tutkittavaa analytyttiä siten, että muut komponentit eivät häiritse. (Ehder 2005: 27.) Tulosten perusteella voidaan tehdä oletus, että jokin muu komponentti ristireagoi kvantitatiivisessa fibriinimonomeerimäärityksessä, vaikka vasta-aineen sanotaan olevan spesifi fibriinimonomeereille.

9.6 Fibriinimonomeeritulosten korrelaatio fibrinogeeni- ja D-dimeeripitoisuuteen

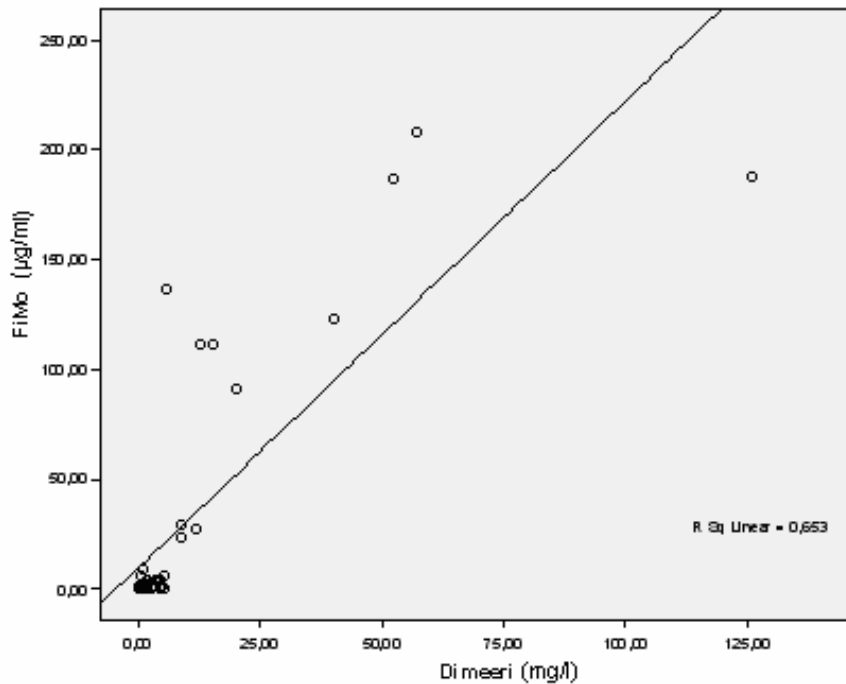
Fibrinogeeni ja D-dimeeri ovat mahdollisia fibriinimonomeerimäärityksessä ristireagoivia komponentteja. Ne ovat rakenteeltaan hyvin lähellä fibriinimonomeeriä, joten on mahdollista, että niillä on samankaltaisia rakenteita, jotka pystyvät tarttumaan fibriinimonomeereille tarkoitettuun vasta-aineeseen.

Korrelaatioiden testaamiseksi verrattiin kvantitatiivisia fibriinimonomeerituloksia samoista näytteistä määritettyihin fibrinogeeni- ja D-dimeerituloksiin. Kuviossa 14 on esitetty fibriinimonomeerin ja fibrinogeenin tulosten korrelaatiotestaus ja kuviossa 15 vastaavasti fibriinimonomeerin ja D-dimeerin välinen testaus. Liitteessä 2 on esitetty korrelaatiotestausten tarkemmat tulokset.



KUVIO 14. Fibriinimonomeeri- ja fibrinogeenitulokset eivät korreloi.

Fibriinimonomeeri- ja fibrinogeenitulosten korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,015, joten muuttujien tulosten välillä ei katsota olevan korrelaatiota. Sama nähdään myös kuviosta 14: näyte, josta saadaan matala fibriinimonomeeritulostus voi antaa joko matalan tai korkean fibrinogeenituloksen tai mitä tahansa siltä väliltä. Sama pätee myös, jos fibriinimonomeeritulostus on korkea.



KUVIO 15. Fibriniinimonomeeri- ja D-dimeeritulosten välillä on nähtävissä korrelaatio. Regressiosuoran yhtälö on $y = 2,12x + 9,92$ ja $r^2 = 65,3 \%$.

Fibriniinimonomeeri- ja D-dimeerituloksia tarkastellessa korrelaatiokertoimeksi saadaan 0,81. Korrelaatiokertoimen ollessa yli 0,8, muuttujien välinen positiivinen korrelaatio on voimakasta. Merkitsevyytasoksi saadaan 0,000, jonka perusteella voidaan todeta muuttujien välisen korrelaation olevan tilastollisesti erittäin merkitsevä. Selitysaste r^2 on 65 %, jolloin fibriniinimonomeeritulosten vaihtelusta 65 % pystytään selittämään D-dimeeritulosten avulla.

Kuviosta 15 nähdään, että matalan fibriniinimonomeerituloksen antava näyte antaa yleensä myös matalahkon D-dimeerituloksen. Fibriniinimonomeeripitoisuuden kasvaessa, myös D-dimeeripitoisuus kohoaa. Tulokset eivät kuitenkaan näytä kohoavan samassa suhteessa.

9.7 Tulosten yhteenveto

Immunoturbidometrisen fibriniinimonomeerimääritysmenetelmän sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus osoittautuivat hyväksi. Tulokset vastasivat menetelmävalmistajan ilmoittamia tuloksia samoille mittauksille. Sarjan sisäisen toistuvuuden variaatiokertoimet prosentteina olivat välillä 1,8–5,2 % ja menetelmävalmistajalla vastaavasti välillä 3,1–8,0 %. Sarjojen välisen toistuvuuden variaatiokertoimet olivat välillä 5,1–8,9 %, kun menetelmävalmistajan ilmoittavat luvut olivat 4,2–8,8 %.

Menetelmän lineaarisuus ei tutkimuksen perusteella ole optimaalinen. Teoreettiset tulokset poikkeavat huomattavasti mitatuista tuloksista. Korrelaatiokertoimet 0,984 ja 0,985 ovat kuitenkin suhteellisen hyvät.

Tasovertailun perusteella voidaan todeta, että agglutinaatiotestillä ja immunoturbidometrisellä mittauksella on ainakin osittain eri spesifisyys. Immunoturbidometrinen menetelmä mittaa todennäköisesti myös jotakin muuta analyyttiä kuin fibriinimonomeeriä. Menetelmä antoi agglutinaatiotestissä negatiivisille näytteille pitoisuuksia väliltä 0,0–207,7 µg/ml. Tutkimuksessa ei saatu selville millaisia tuloksia immunoturbidometrinen menetelmä antaa agglutinaatiopositiivisille näytteille.

Fibriinimonomeeri- ja fibrinogeenitulokset eivät korreloi. Fibriinimonomeeri ja D-dimeeritulosten välillä havaittiin korrelaatio. Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,81 ja merkitsevyytasoksi 0,000. 65 % fibriinimonomeeritulosten vaihtelusta voidaan selittää D-dimeeritulosten avulla.

10 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Mittauksen luotettavuutta arvioidaan validiteetin ja reliabiliteetin avulla. Luotettavuutta alentavat erilaiset virheet, joita voi syntyä tutkimusaineistoa hankittaessa. (Heikkilä 2004: 185.)

Validiteetti eli pätevyys kuvaa, miten hyvin on onnistuttu mittaamaan juuri sitä mitä oli tarkoituskin selvittää (Heikkilä 2004: 29). Tutkimuksessani sain vastaukset esitettyihin tutkimusongelmiin. Ainoaksi epäselvyydeksi jäi millaisia tuloksia kvantitatiivinen menetelmä antaa agglutinaatiopositiivisille näytteille. Tämä johtuu siitä, että tutkimukseni tekoaikana ei tullut yhtään agglutinaatiopositiivista näytettä. Positiivisia näytteitä ei olisi ollut mahdollista kerätä etukäteen, koska kvantitatiivista menetelmää varten näytteet säilyvät vain kuukauden pakastettuna, eikä kuukaudessa välttämättä tule yhtäkään positiivista näytettä.

Validiutta on hankala tarkastella jälkikäteen, joten sen varmistamiseksi tulee tutkimus suunnitella huolella ja tiedonkeruun tulee olla tarkoin harkittua. Työssäni mitattavat

käsitteet ja muuttujat on pyritty määrittelemään tarkasti, mikä myös lisää tutkimuksen validiutta. (Heikkilä 2004: 29.)

Reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoitetaan tulosten tarkkuutta. Tutkimuksesta saatavat tulokset eivät saa olla sattumanvaraisia, vaan luotettavan tutkimuksen tulokset tulee olla toistettavissa samanlaisin tuloksin. (Heikkilä 2004: 30.) Olen pyrkinyt kirjoittamaan tutkimuksen suorituksen niin tarkasti, että tutkimus pitäisi olla toistettavissa. Reliabiliteettia voidaan arvioida mittauksen jälkeen (Heikkilä 2004: 187).

Puutteellinen reliabiliteetti johtuu yleensä satunnaisvirheistä, joita voi sattua tietoja kerättäessä, syötettäessä, käsiteltäessä ja tuloksia tulkittaessa. Tutkimuksen suorittajan tulee olla koko tutkimuksen ajan tarkka ja kriittinen. (Heikkilä 2004: 30, 187.) Eri-tyistä huolellisuutta noudatin, kun kirjasin tuloksia tai syötin niitä tilasto-ohjelmiin sekä etsiessäni näytteiden fibrinogeeni- ja D-dimeerituloksia Multilab-ohjelmasta. Kaikki saamani tulokset olivat koko ajan tallella tulosteina tai kirjoitettuina, jotta niistä pystyi tarkistamaan saatuja tuloksia.

Agglutinaatiotestejä tulkitaan silmämääräisesti. Tällaisten testien tulkinta vaatii kokemusta, joten on mahdollista, että niiden tulokinnassa sattuu erehdys. Erityisesti tutkimukseni alkuvaiheessa varmistin agglutinaatiotestin tulokset myös työpisteen laboratoriohoitajalta, mikä vähensi erehdyksen mahdollisuutta.

Jos tutkimuksen otoskoko on pieni, sitä todennäköisemmin saadaan sattumanvaraisia tuloksia. (Heikkilä 2004: 187). Tulosten luotettavuutta lisää, että sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistuvuuden mittauksissa on käytetty suosituksen mukaisesti kahta eritasois- ta näytettä ja niiden lisäksi vielä hyytymisnormaalitasokontrollia. Sarjan välistä toistuvuutta tutkittaessa HUSLABin toimintakäsikirja (2005: 20) suosittelee mittauksia tehtävän vähintään 20:n työpäivän aikana. Mittausten määrä jäi kymmeneen. Tämä on kuitenkin sama määrä kuin menetelmävalmistajan tutkimuksessa ja saamani tulokset ovat näin ollen vertailtavissa menetelmävalmistajan tuloksiin. Sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistuvuuden tulokset ovat lähellä menetelmävalmistajan tuloksia ja suuria virhelähteitä ei voida osoittaa, joten tuloksia voidaan pitää luotettavina. Tasovertailussa oli ajan ja reagenssien määrän vuoksi mahdollista tutkia 40 näytettä. Suurempi määrä olisi lisännyt luotettavuutta, mutta olennainen tuli tuloksista hyvin ilmi tälläkin määrällä.

Lineaarisuutta määritettäessä tein laimennokset käsin pipetoimalla. Tästä on voinut aiheutua epätarkkuuksia. Tosin lineaarisuusmittauksia tehtiin useampaan kertaan hyvin samankaltaisin tuloksin, joten lineaarisuudesta saatuja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Lisäksi tulos varmistettiin antamalla yhdellä kerralla kokeneemman laboratoriohoitajan suorittaa pipetointi.

Korrelaatioiden selvittämiseksi käyttämäni fibrinogeeni- ja D-dimeeritulokset olivat kokeneiden laboratoriohoitajien rutiinityöskentelyssä saamia, joten niiden voidaan katsoa olevan luotettavia. Omalla toiminnallani olen vaikuttanut korrelaatiotulosten luotettavuuteen siirtämällä tulokset laskentaohjelmaan noudattamalla tietoisesti erityistä huolellisuutta.

Tutkimuksen luotettavuutta lisää, että BCS-analysaattorin käyttö oli minulle ennestään tuttua. Osasin seurata, että laite toimi moitteettomasti. Lisäksi suoritin kaikki kvantitatiiviset mittaukset samalla BCS:llä. Kaikki mittaukset tuli suoritettua samalla tavalla, koska työskentelin yksin. Myös kontrollien käyttö lisää luotettavuutta. Kvalitatiivisessa menetelmässä käytössä oli positiivinen ja negatiivinen kontrolli, kvantitatiivisessa kaksi eritasoista positiivista kontrollia ja negatiivinen hyytymisnormaalitasokontrolli. Jokaisen sarjan alussa kontrollien tuli olla tavoitealueella ennen tutkimusnäytteiden analysointia.

11 POHDINTA

Työni tarkoituksena oli testata Diagnostica Stagon uuden STA® - Liatest® FM immunoturbidometrisen fibriinimonomeerikompleksien määritysmenetelmän analyttisiä suorituskykyominaisuuksia. Tätä päädyttiin tutkimaan sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistuvuuksien sekä lineaarisuuden avulla, jotka kuvaavat hyvin menetelmän suorituskykyä. Myös uuden menetelmän ja käytössä olevan agglutinaatiotestin tuloksia haluttiin tarkastella suhteessa toisiinsa. Menetelmän spesifisyyttä päädyttiin arvioimaan tutkimalla korreloiko fibriinimonomerimäärityksen tulokset samasta näytteestä mitattujen fibrinogeeni- tai D-dimeeritulosten kanssa.

Menetelmän spesifisyyden arviointi tuli ajankohtaiseksi työn edetessä, kun tasoverailun tulokset eivät eri menetelmillä analysoituna vastanneet toisiaan ja antoivat näin aiheutta spesifisyyden epäilyyn.

Saamieni tulosten perusteella voidaan todeta, että immunoturbidometrinen fibriinimonomeerien määrittäminen toimii toistettavasti BCS-analysointilaitteella. Sarjan sisäiset ja sarjojen väliset toistuvuudet ovat samaa luokkaa, kuin menetelmävalmistaja lupaa. Menetelmän lineaarisuus ei kuitenkaan ole optimaalinen, sillä tulosten perusteella mitattu tulos poikkeaa teoreettisesta tuloksesta sitä enemmän mitä vähemmän näytteessä on fibriinimonomeerejä. Tämä voi olla ongelma, jos menetelmä haluttaisiin tulevaisuudessa ottaa käyttöön ja halutaan saada tarkkoja kvantitatiivisia tuloksia koko mittausalueella.

Tutkimuksellani ei saatu selville millaisia tuloksia kvantitatiivinen menetelmä antaa agglutinaatiopositiivisille näytteille, koska tällaisia näytteitä ei tutkimuksen aikana tullut. Agglutinaationegatiivisten tulosten vaihteluväli oli 0,0–207,7 µg/ml. Tästä päätellen menetelmillä on ainakin osittain eri spesifisyys ja immunoturbidometrinen menetelmä saattaa mitata jotain muutakin analyyyttiä kuin fibriinimonomeerejä.

Tuloksia tarkastellessa esiin nousi mahdollisuus, että D-dimeeri saattaa ristireagoida kvantitatiivisessa fibriinimonomeerimäärittämismenetelmässä eli menetelmä voi mitata osittain D-dimeeriä, eikä spesifisesti fibriinimonomeeriä. Tällöin myös negatiiviset agglutinaatiotestitulokset selittyisivät: kaikki näytteet todella olivat negatiivisia fibriinimonomeerikompleksien suhteen. Ristireagoitua puoltaisi se, että tutkimuksessani fibriinimonomeeri- ja D-dimeeritulosten välillä havaittiin voimakas korrelaatio. Tämäkään ei tosin ole aivan yksiselitteistä, sillä kaikkien näytteiden osalta fibriinimonomeeri – D-dimeeri -yhteys ei ollut vahva. Korrelaatio saattaa johtua myös muista tekijöistä kuin mahdollisesta ristireagoinnista. Fibriinimonomeeri- ja fibrinogeenitulosten välillä ei havaittu korrelaatiota eli fibrinogeeni ei todennäköisesti ristireagoi testissä.

Löydettävissä oli yksi vastaava tutkimus, jossa immunoturbidometristä fibriinimonomeerimäärittämismenetelmää on testattu. Kyseessä on Hamanon ja hänen ryhmänsä tutkimus (2005: 183–188), jota olen käsitellyt tarkemmin kappaleessa 6.2. Myös tässä tutkimuksessa sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus osoittautuivat hyviksi. Sisäisen toistuvuuden CV% oli <3,0% ja sarjojen välisen toistuvuuden <2,0%. Toistuvuudet ovat parempia kuin menetelmävalmistajan ilmoittamat ja tutkimuksessani saamat CV%:t. Tutkimus tukee tekemääni johtopäätöstä, että menetelmä on toistettava.

Lineaarisuuden osalta tutkimus poikkeaa merkittävästi omista tuloksistani. Mittausalueella 3–300 µg/ml menetelmä oli lineaarinen eivätkä teoreettiset arvot poikenneet yli viittä prosenttia mitatuista tuloksista. Tutkimuksessani teoreettiset arvot poikkesivat mitatuista arvoista huomattavasti. Pienin poikkeama oli 7,3% ja suurin jopa 96,1%. Hamano ja hänen ryhmänsä (2005: 183–188) testasivat muiden analyttien aiheuttamaa häiriötä käytettyyn mittausmenetelmään. Tulosten perusteella D-dimeeripitoisuus aina 200 mg/l:aan asti ei vaikuta fibriinimonomeerituloksiin. Omien tulosteni perusteella sitä vastoin heräsi epäily, että D-dimeeripitoisuus saattaa vaikuttaa menetelmällä saataviin fibriinimonomeerituloksiin.

Työn tuloksia tarkastellessa eniten pohdittavaa synnyttivät nykyisen agglutinaatiotestin ja uuden immunoturbidometrisen menetelmän tasovertailun tulokset. Ihan varmasti ei voida sulkea pois mahdollisuutta, että näytteet seisoivat liian pitkään ennen agglutinaatiotestiä. Menetelmävalmistaja suosittaa tutkimaan näytteen kahdessa tunnissa näytteenotosta. Tämän vuoksi positiiviset reaktiot ovat voineet heiketä näkymättömiin. Tämän järjestäminen olisi hankaloittanut tutkimusjärjestelyjä oleellisesti, sillä tutkimuksissani käytettyjen suppea hyytymistutkimus -näytteiden omiin tutkimuksiin voi mahdollisten laimennusten ja näytteiden määrän vuoksi kulua aikaa kauemmin kuin kaksi tuntia. Niihin kuluva näytemäärä ei ole mahdollista tietää etukäteen, joten näytteistä ei olisi ennen analysointia voinut ottaa osaa minun käyttööni. Lisäksi kaikki nämä näytteet eivät edes ehdi kahdessa tunnissa perille hyytymistutkimustyöpisteeseen.

Näytteille ilmoitetuissa säilyvyyksissä on selkeä ristiriita. Kvantitatiivista testiä käytettäessä plasman on ilmoitettu säilyvän sentrifugoinnin jälkeen kahdeksan tuntia analyytikelpoisena, kun taas kvalitatiivisessa ainoastaan kaksi tuntia. Molemmat testit ovat kuitenkin saman valmistajan saman analyytin mittaamiseen tarkoitettuja, joten suuret erot säilyvyysajoissa ihmetyttävät. Tulevaisuudessa voitaisi selvittää tarkemmin näytteen säilyvyyttä.

Viitteitä siitä, voidaanko kvalitatiivisia agglutinaationegatiivisia tuloksia pitää luotettavina ei saada myöskään näytteiden fibrinogeenipitoisuuksista. Fibrinogeenin pitoisuus kun voi DIK:ssä olla alentunut, normaali tai suuri riippuen DIK:n vaiheesta ja siitä, onko oireyhtymä akuutti vai krooninen.

On kiinnostavaa jäädä odottamaan artikkeleita tutkijaryhmien tutkimustuloksista koskien kyseistä menetelmää. Aikanaan toiset tutkimukset tulevat toivottavasti valottamaan myös epävarmoiksi jääneitä ristireagoitituloksia. Saamieni tulosten perusteella menetelmää ei voida ottaa käyttöön, vaan myös menetelmän käyttöönotto edellyttäisi lisätutkimustuloksia immunoturbidometrisestä menetelmästä.

Fibriinimonomeereistä ollaan kiinnostuneita erityisesti, koska sen mahdollinen diagnostinen käyttöalue olisi DIK:n toteaminen jo varhaisvaiheessa. Diagnostica Stagon esitteen (2005a: 8) mukaan liukoisten fibriinimonomeerikompleksien määrittäminen on mahdollista käyttää apuna myös muissa tilanteissa, kuten leikkausten jälkeen syntyvien verisuonitukosten aikaisessa diagnosoinnissa ja menetelmää kuvataan lupaavaksi akuuttien sydäninfarktitapausten seurannassa.

Molempiin menetelmiin tutustuneena on helppo ymmärtää, miksi uudesta menetelmästä ollaan Meilahden sairaalan laboratoriossa kiinnostuneita. BCS-analysaattorilla suoritettava immunoturbidometrinen fibriinimonomeerien määrittäminen on helppo ja nopea. Reagenssit ovat valmiita, joten niiden valmistamiseen ei kulu aikaa, eikä liukenemista tarvitse odotella. Huomasin tosin, että lateksipartikkeleita sisältävän reagenssin sekoittamisessa saa olla äärimmäisen huolellinen, sillä partikkelit jäävät helposti pullon pohjalle. Vaikutuksen näki heti siinä, että kontrollien tulokset eivät osuneet tavoitearvoihin. Lisäksi automatisoidulla menetelmällä tulosten luotettavuus lisääntyisi, kun tuloksia ei tulkittaisi silmämääräisesti.

Kyseisestä aiheesta on ollut opettavaista tehdä opinnäytetyötä. Se auttoi minua hahmottamaan paljon selkeämmin koulun teoriaopinnoista varsinkin epäselväksi jäänyttä validointiprosessia, vaikka suoritinkin validoinnista vain osan. Tärkeintä mitä työstäni opin on se, että tutkimuksista ei aina saada odotettuja tuloksia, mutta yllättävätkin tulokset voivat silti olla luotettavia. Minulle selvisi myös, että markkinoilla olevat menetelmät eivät aina ole sellaisenaan käytettävissä, vaan niistäkin saattaa paljastua epäkohtia. Lisäksi menetelmävalmistajan tutkimuksiin käyttämä otoskoko ei välttämättä ole kovin suuri. Yllätyin, että otoskoko oli samaa luokkaa omassa ja menetelmävalmistajan tutkimuksessa.

LÄHTEET

- Diagnostica Stago 2003: Detection of soluble fibrin monomer complexes by the hemagglutination technique. Reagenssipakkauksen ohje.
- Diagnostica Stago 2005a: Immuno-turbidometric assay of soluble fibrin monomer complexes. Esite.
- Diagnostica Stago 2005b: Immuno-turbidometric assay of soluble fibrin monomer complexes. Reagenssipakkauksen ohje.
- Ehder, Tapio (toim.) 2005: Kemia metrologian opas. Helsinki: Mittatekniikan keskus.
- Furie, Bruce – Furie, Barbara C. 2005: Molecular basis of blood coagulation. Teoksesssa Hoffman, Ronald – Benz, Edward J. – Sanford, Shattil J. – Furie, Bruce – Cohen, Harvey J. – Silberstein, Leslie E. – McGlave, Philip (toim.): Hematology: Basic principles and practice. 4. painos. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 1931–1953.
- Hamano, Akiei – Tanaka, Seiji – Tekeda, Yukiko – Umeda, Mamoru – Sakta Yoichi 2002: A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin monomer for the detection of soluble fibrin in plasma. *Clinica Chimica Acta* 318. 25–32.
- Hamano, Akiei – Umeda, Mamoru – Ueno, Yukiko – Tanaka, Seiji – Mimuro, Jun – Sakata, Yoichi 2005: Latex immunoturbidometric assay for soluble fibrin complex. *Clinical Chemistry* 51 (1). 183–188.
- Heikkilä, Tarja 2004: Tilastollinen tutkimus. 5. painos. Helsinki: Edita.
- Heiskanen, Riia 2006. Valokuvat.
- Hoffbrand, A.V. – Pettit, J.E – Moss, P.A.H. 2001: Essential haematology. 4. painos. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2002: Tilastolliset menetelmät. 1.–8. painos. Espoo: WSOY.
- Horan, John T. – Francis, Charles W. 2001: Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27 (6). 657–666.
- HUSLAB 2006. Tutkimusohjekirja. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja>>. Luettu 1.6.2006.
- Instruction Manual 2.2.1. 2003. Kappale 8 Description. BCS Ohjekirja. Marburg: Dade Behring.

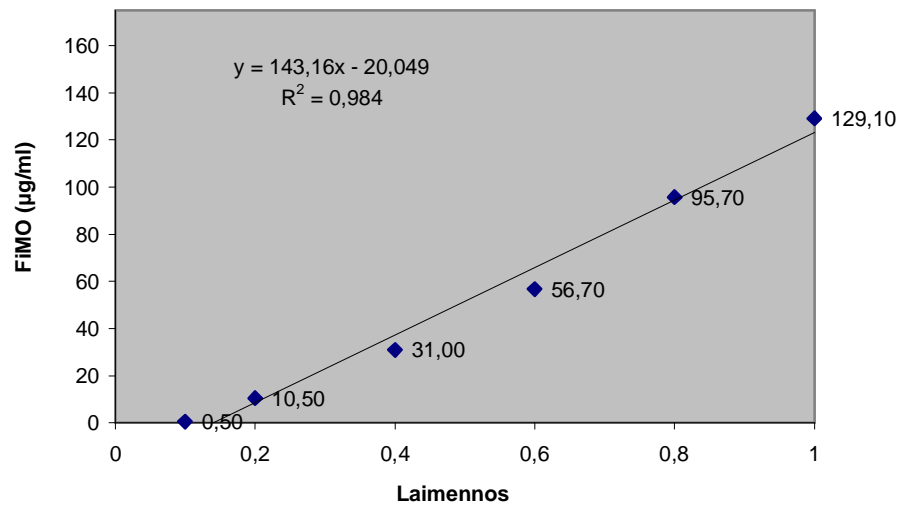
- Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005: Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita.
- Kolde, Hans-Jürgen 2004: Haemostasis. 2. painos. Basel: Pentapharm Ltd.
- Koski, Tomi – Vilpo, Juhani 2005: Veren hyytyminen ja verenvuototaipumus. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.): Ilmari Palvan Veritaudit. 2. painos. Helsinki: Medivil. 158–170.
- Lassila, Riitta 2000: Veren hyytyminen ja fibrinolyysi. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Krusius, Tom (toim.): Veritaudit. 2. painos. Helsinki: Duodecim. 450–460.
- Lehtonen, Pekka O. – Sihvonen, Marja-Liisa 2004: Laboratorion alan analyttinen kemia. Helsinki: Opetushallitus.
- Leinonen, Jari 2006. Kemisti. HUSLAB. Helsinki. Suullinen tiedonanto 3.8.
- Liebman, Howard A. – Weitz, Ilene C. 2005: Disseminated intravascular coagulation. Teoksessa Hoffman, Ronald – Benz, Edward J. – Sanford, Shattil J. – Furie, Bruce – Cohen, Harvey J. – Silberstein, Leslie E. – McGlave, Philip (toim.): Hematology: Basic principles and practice. 4. painos. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2169–2182.
- Lindsay, Barbara J. 2005: Amino acids and proteins. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry: principles, procedures, correlations. 5. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 179–218.
- Mahlamäki, Eija K. 2004: Hemostaasi. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 310–321.
- Orton, Susan 2005: Immunoassays and nucleic acid probe techniques. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry principles, procedures, correlations. 5. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 145–167.
- Rasi, Vesa 2000: Disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Krusius, Tom (toim.): Veritaudit. 2. painos. Helsinki: Duodecim. 553–560.
- Saarela, Ellen 2005: P-FiMo-O, plasman fibrinimonomeerien kvalitatiivinen osoitus. Työohje. HUSLAB.
- Taanila, Aki 2004: Kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät. Oppimateriaali. Verkkodokumentti. Päivitetty 26.5.2005. <<http://www.edu.fi/oppimateriaalit/tilasto2.html>> Luettu 8.8.2006.
- Tirri, Rauno – Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter 2001: Biologian sanakirja. Helsinki: Otava.

Toimintakäsikirja 2005: Osa D, Toiminnalliset prosessit. Versio 3.0. HUSLAB.

Training Manual 4.0. Kappale 2 Description of the hardware. BCS Koulutuskäsikirja.
Dade Behring.

Lineaarisuuden tarkistaminen (näyte 1)

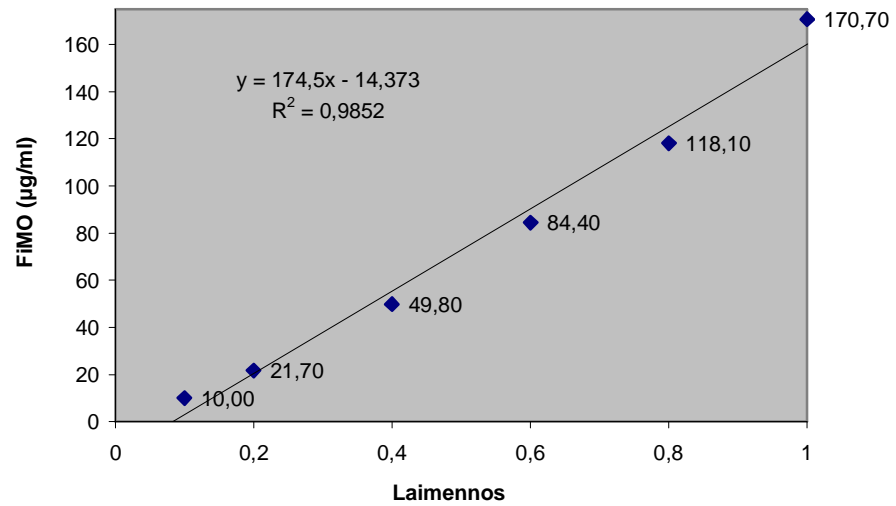
Laite: BCS 4
Määrittäjä: Riia Heiskanen
Suorittaja: Riia Heiskanen



	<i>Laimennos</i>	<i>Tulos</i>	<i>Teor. tulos</i>	<i>Ero-%</i>
Putki 1	1	129,10		
Putki 2	0,8	95,70	103,28	-7,3
Putki 3	0,6	56,70	77,46	-26,8
Putki 4	0,4	31,00	51,64	-40,0
Putki 5	0,2	10,50	25,82	-59,3
Putki 6	0,1	0,50	12,91	-96,1

Lineaarisuuden tarkistaminen (näyte 2)

Laite: BCS 4
Määrittäjä: Riia Heiskanen
Suorittaja: Riia Heiskanen

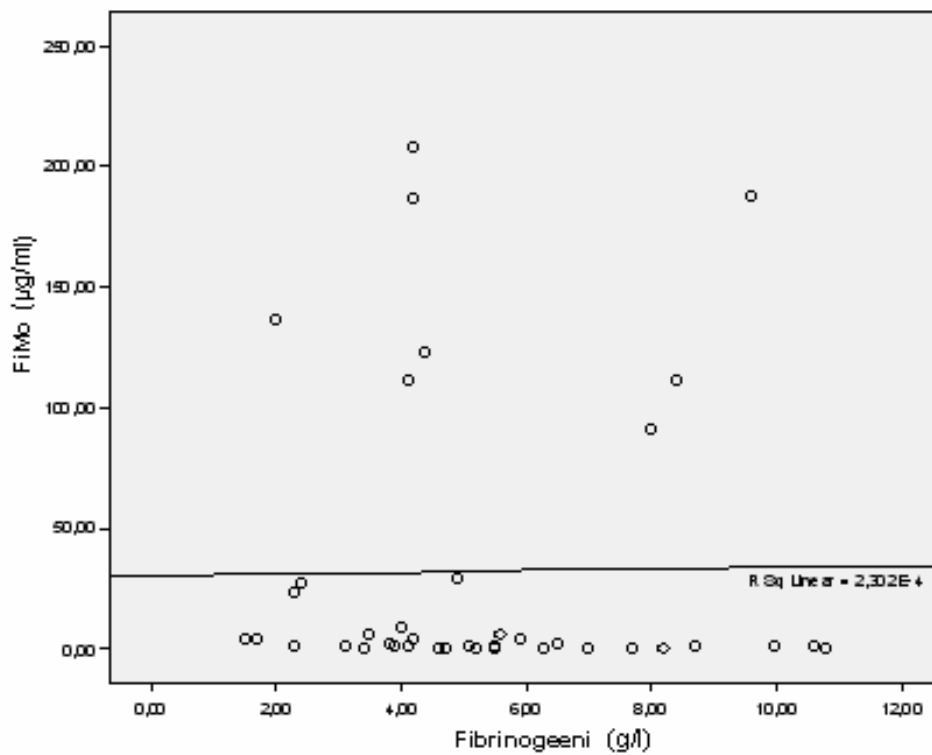


	<i>Laimennos</i>	<i>Tulos</i>	<i>Teor. tulos</i>	<i>Ero-%</i>
Putki 1	1	170,70		
Putki 2	0,8	118,10	136,56	-13,5
Putki 3	0,6	84,40	102,42	-17,6
Putki 4	0,4	49,80	68,28	-27,1
Putki 5	0,2	21,70	34,14	-36,4
Putki 6	0,1	10,00	17,07	-41,4

Korrelaation testaus: Fibrinimonomeeri ja fibrinogeeni

Correlations

		FiMo	Fibrinogeeni
FiMo	Pearson Correlation	1	,015
	Sig. (2-tailed)		,926
	N	40	40
Fibrinogeeni	Pearson Correlation	,015	1
	Sig. (2-tailed)	,926	
	N	40	40

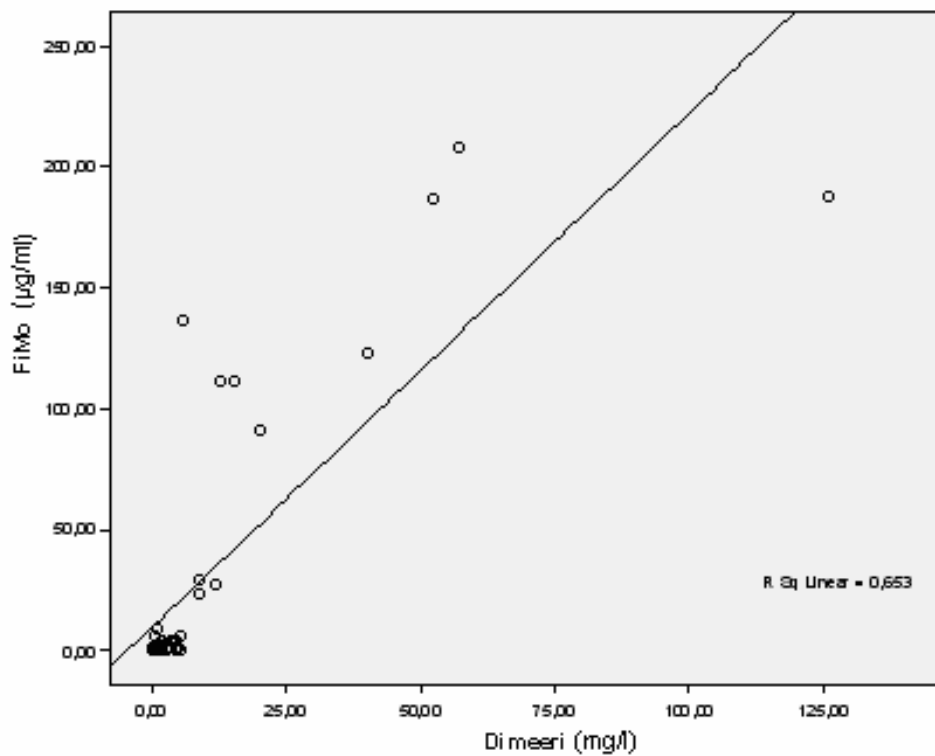


Korrelaation testaus: Fibrinimonomeeri ja D-dimeeri

Correlations

		FiMo	Dimeeri
FiMo	Pearson Correlation	1	,808(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	40	40
Dimeeri	Pearson Correlation	,808(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	40	40

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,808(a)	,653	,644	35,85740

a Predictors: (Constant), Dimeeri

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	9,919	6,254		1,586	,121
	Dimeeri	2,124	,251	,808	8,460	,000

a Dependent Variable: FiMo

Suoran yhtälö $y=kx + a$

$$y= 2,12x + 9,92$$