

Tiia Huhtakangas & Emilia Järvinen

FGF23 PROTEIININ TUTKIMUSTULOSTEN LUOTETTAVUUDEN JA PROSESSIN LAADUNARVIOINTI

FGF23 PROTEIININ TUTKIMUSTULOSTEN LUOTETTAVUUDEN JA PROSESSIN LAADUNARVIOINTI

Tiia Huhtakangas & Emilia Järvinen
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Tiia Huhtakangas & Emilia Järvinen

Opinnäytetyön nimi: FGF23 proteiinin tutkimustulosten luotettavuuden ja prosessin laadunarviointi

Työn ohjaajat: Henna Ek, Mika Paldanius & Jani Salmivaara

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Kevät 2016

Sivumäärä: 39 + 4

Opinnäytetyön tarkoituksena oli havainnoida laatua ja toistettavuutta mitattaessa FGF23 proteiinia manuaalisella ELISA -menetelmällä. Tutkimusprojektissa mitattiin osana kansainvälistä tutkimusta 2049 potilasnäytettä viidenkymmenenviiden ELISA -kitin avulla. Osallistuimme kittien tekoon tekemällä yhteensä 10 kittiä eli analysoida yhteensä 380 näytettä. Saimme aiheen ValiRx Finland Oy:ltä (ValiFinn), joka on Oulussa toimiva bioteknologia-alan yritys.

Laadunhallinta on tärkeässä roolissa kaikissa tutkimuksissa. Projektissa havainnoimme mittausprosessin ja -tulosten laatua sekä toistettavuutta. Opinnäytetyössä perehdyimme siihen, kuinka varmistetaan näytteiden käsittelyn ja mittausolosuhteiden yhteneväisyys sekä tulosten tarkkuus, kun käsiteltiin ja mitattiin suuria näytemääriä eri päivinä ja eri henkilöiden toimesta. Tavoitteena oli havainnoida tekijöiden toimintatapoja, mittaustulosten vertailukelpoisuutta sekä toistettavuutta ja laboratoriossessien laadunhallintaa.

Tietoperustassa käsitelimme tutkimusprojektissa laadunvarmistukseen ja laadunarviointiin käytettäviä menetelmiä. Menetelmien avulla arvioimme tutkimusprosessin ja mittaustulosten laatua. Prosessin laadunarviointi perustui havainnointiin, työntekijöiden lausuntoihin ja pitämäämme tutkimuspäiväkirjaan. Tulosten vertailukelpoisuutta arvioitiin rinnakkaisnäytteiden, standardien ja kontrollien avulla.

Arvioinnin ja vertailun perusteella tuloksia voitiin pitää luotettavina. Havaitimme, että eri päivinä ja eri henkilöiden tekeminä mittaustulosten välillä ei ollut merkittäviä eroja. Kontrollien ja standardien tuloksissa ei ollut suuria eroja ja niiden arvot pysyivät tavoiterajoissa. Rinnakkaisnäytteiden väliset erot tarkastettiin, koska liian suuria eroja tuloksissa ei voitu pitää luotettavina. Mittauksissa onnistuttiin sekä tulosten toistettavuudessa että työtapojen erojen minimoimisessa. Tulosten tarkastelun ja havainnoinnin perusteella työprojektissa onnistuttiin pääosin vakioimaan työvaiheet niin, että eri henkilöt suorittivat työt samalla tavalla, samoissa olosuhteissa ja samoilla menetelmillä, vaikka joidakin yksittäisiä näytteitä jouduttiin uusimaan korkeiden rinnakkaisnäytteiden välisten erojen takia.

Asiasanat: ELISA, laadunarviointi, toistettavuus, tutkimusprojekti, vertailukelpoisuus

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology

Authors: Tiia Huhtakangas & Emilia Järvinen

Title of thesis: Quality Evaluation of the Process and Reliability of Study Results of Protein FGF23

Supervisors: Henna Ek, Mika Paldanius & Jani Salmivaara

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2016 Number of pages: 39 + 4

The purpose of the thesis was to observe the quality and reproducibility when measuring the protein FGF23 with a manual ELISA method. This project was part of an international research, where 2049 clinical specimens were measured with 55 ELISA kits. We participated by doing 10 ELISA kits which was 380 specimens. The subject was given by ValiRx Finland Oy (ValiFinn).

Quality control plays crucial role in all important research projects. In this project we observed the quality and reproducibility of the research project and the results. We got acquainted, how to ensure the comparability of handling and measuring specimens and how to ensure the accuracy of results when big amounts of samples were measured by different researcher in several days. We aimed to observe the differences in the working methods as well as comparability and reproducibility of the test results.

In the content of the thesis we dealt with methods of the quality evaluation and quality control which we used in this research to create conclusions. The quality evaluation of the working methods were based on observation, researcher's statements and research diary. Comparability of the test results were evaluated by comparing the results of duplicate samples, standards and controls.

Based on the evaluation and comparison the test results were reliable. In addition, we noticed that there were no significant differences between the test results made by different researcher in different days. There were no major divergences in the controls or standards and they were within the desired values. Duplicate results were also checked. If there were high disparities in same duplicates, the results were not reliable. In conclusion, the measurements were successful considering the reproducibility of the results and validation of the working methods. On the other hand, few individual needed remeasurement, but those samples were minimal part of the total amount.

Keywords: ELISA, evaluation of quality, reproducibility, research project, comparability

SISÄLLYS

JOHDANTO	6
1 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT	7
1.1 Tarkoitus ja tavoitteet	7
1.2 Projektioorganisaatio	8
2 FGF23 PROTEIINI	10
3 PROJEKTIN MENETELMÄT	11
3.1 Spektrofotometri	11
3.2 Työprosessin havainnointi	11
3.3 ELISA	12
4 LAADUNVARMISTUS KLIINISESSÄ TUTKIMUSPROJEKTISSA	14
4.1 Pipettien kalibrointi ja tarkistus	15
4.2 Standardit ja kalibrointi	16
4.3 Kontrollit	16
4.4 Tarkkuus ja oikeellisuus	17
4.5 Vertailukelpoisuus ja toistettavuus	17
5 FGF23 PROTEIINIMÄÄRITYKSEN TYÖVAIHEET	18
5.1 Alkuvalmistelut	19
5.2 Työvaiheet	19
5.3 Mittaus ja tulosten arkistointi	23
5.4 Työskentelyssä laatuun ja toistettavuuteen vaikuttavat tekijät	24
5.5 Jätteiden käsittely	25
6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	26
7 POHDINTA	34
LÄHTEET	37
LIITTEET	40

JOHDANTO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli havainnoida laatua ja toistettavuutta mitattaessa FGF23 proteiinia ELISA -menetelmällä. Saimme aiheen ValiRx Finland Oy:ltä (ValiFinn), joka on Oulussa toimiva bioteknologia-alan yritys. ValiFinn tekee pääasiassa tutkimus- ja kehitystyötä sekä biomarkerimitauksia. Kansainvälinen tutkimusorganisaatio tilasi FGF23 proteiinin mittaukset ValiFinn:ltä projektiinsa. Määritykset tehtiin manuaalisella ELISA -kitillä 2049 potilasnäytteestä. Osallistuimme tutkimukseen ja havainnoimme tutkimusprosessin laatua. Prosessin laadunarviointi perustui osallistuvaan havainnointiin, työntekijöiden lausuntoihin ja pitämäämme tutkimuspäiväkirjaan. Tulosten vertailukelpoisuutta arvioitiin rinnakkaisnäytteiden, standardien ja kontrollien avulla.

Näytteiden käsittelyn, mittausolosuhteiden sekä tulosten tarkkuuden arviointi on tärkeää isoja näyttemääriä käsiteltäessä, kun samaa tutkimusta tehdään manuaalisesti usean henkilön toimesta, eri päivinä ja pitkällä aikavälillä. Tavoitteena oli havainnoida tekijöiden toimintatapoja, mittaustulosten vertailukelpoisuutta ja laboratorioprosessien laadunhallintaa.

FGF23 on fibroblastikasvutekijä, jota erittyy pääasiassa osteosyyteistä eli kypsistä luusoluista. FGF23 on äskettäin löydetty terveyttä indikoiva tekijä ja sillä on suuri merkitys kalsiumin ja fosforin aineenvaihdunnassa. Useiden tutkimusten mukaan kohonneet FGF23 arvot ovat yhdistetty moniin perinnöllisiin luutauteihin ja komplikaatioihin kroonisessa munuaistaudissa sekä sydän- ja verisuonitaudeissa. (Dittmer & Hardcastle 2015, 770.)

ELISA on entsyymi-immunomääritys, jota käytetään paljon erilaisissa tutkimuksissa kliinisessä kemiassa immunologisten aineiden määrittämisessä. ELISA -menetelmiä on erilaisia, mutta mittaustulosten analysointiin käyttämämme menetelmä on kaksoisvasta-ainetekniikka (sandwich). ELISA -menetelmällä voidaan havaita vasta-aine tai antigeeni riippuen käytetystä menetelmästä. Vastaaineet kiinnittyvät proteiinin antigeeniin ja reaktio voidaan havainnoida esimerkiksi värinmuutoksen avulla. (Halonen 2004a, 94.) Värinmuutos mitataan spektrofotometrillä, jolla voidaan mitata absorboitunutta (imeytyynyttä) tai transmittoitunutta (läpäistynyttä) valoa. Valo mitataan tietyllä aallonpituudella eli absorbanssilla. Aallonpituus valitaan näytteen värin perusteella eli sen mukaan, mitä väriä näyte absorboi. Näytteestä absorboituva valo on suoraan verrannollinen tutkittavan yhdisteen pitoisuuteen. (Halonen 2004b, 66.)

1 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT

Teimme opinnäytetyön ValiRx Finland Oy:lle (ValiFinn). ValiFinn on monikansallinen bioteknologia-alan yritys, joka toimii Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa. ValiFinn tekee pääasiassa tutkimus- ja kehitystyötä muun muassa syöpämarkkereiden parissa sekä biomarkerimittauksia. ValiRx Finland Oy:n omistaa Lontoossa toimiva syöpälääkekehitykseen erikoistunut lääkekehitysyritys Valirx Plc. (ValiFinn 2016, viitattu 24.3.2016.)

Kansainvälisessä projektissa analysoitiin FGF23 proteiinin C-terminaalista osaa ELISA -menetelmällä. Laadunhallinta on tärkeää isoissa kansainvälisissä tutkimuksissa. Projektissa havainnoimme mittausprosessin ja -tulosten laatua sekä toistettavuutta. Tutkimusprojektissa mitattiin 2049 potilasnäytettä viidenkymmenenviiden ELISA -kitin avulla, joista teimme 380 näytettä (10 kit-tiä).

1.1 Tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyön tarkoituksena oli havainnoida laatua ja toistettavuutta mitattaessa FGF23 C-terminaalista proteiinia manuaalisella ELISA -menetelmällä. Opinnäytetyössä perehdyimme siihen, kuinka varmistetaan näytteiden käsittelyn ja mittausolosuhteiden toistettavuus sekä tulosten tarkkuus isoja näytemääriä käsiteltäessä. Tutkimusnäytteitä tekivät useat eri henkilöt eri päivinä. Laaduntarkkailu on erityisen tärkeää tutkimusprojekteissa, joissa tehdään manuaalista näytteiden analysointia, koska manuaalisesti suoritettavissa määrittelyissä virheiden mahdollisuus on suurempi kuin automaateilla tehdyissä. Laatuun vaikuttavien tekijöiden arviointia ja työmme tuloksia voidaan soveltaa myös muihin tutkimuslaboratorioihin, joissa tehdään ELISA -määrittelyjä. Tavoitteena oli mittaustulosten luotettavuuden ja laadun varmistaminen koko analysointiprosessissa. Seuraavien kysymysten avulla pyrittiin vastaamaan tavoitteisiin.

- Miten varmistetaan näytteenkäsittelyn ja mittaustulosten yhteneväisyys ja tulosten tarkkuus, kun käsitellään ja mitataan suuria näytemääriä eri päivinä eri henkilöiden toimesta?
- Millä perusteilla tuloksia voidaan pitää luotettavina?

- Ovatko tulokset luotettavia?

Prosessin aikana havainnoimme työskentelytapoja sekä arvioimme saatujen tulosten luotettavuutta. Käytimme tutkimusprojektissa laadunvarmistuksen ja -arviointiin käytettyjä menetelmiä, joiden avulla arvioimme tutkimusprosessin ja mittaustulosten laatua. Keskityimme laadunhallinnassa analyysivaiheeseen, koska käytimme jo valmiiksi kerättyä seerumiainestoa. Meillä ei siis ollut tutkimuksessa mahdollisuutta analysoida preanalyttisen vaiheen onnistumista. Vahvasti hemolytyttistä ja lipeemisistä näytteistä tehtiin merkinnät näyte- ja tuloslistoihin.

Opinnäytetyömme on ajankohtainen, koska tutkimustulosten luotettavuus ja mittaustulosten toistettavuus ovat niin tutkimustyön kuin kliinisenkin työn perusta. Lisäksi opinnäytetyön tekeminen oli monipuolista, sillä se sisälsi käytännön laboratoriotyöskentelyä, työskentelyn ja tulosten arviointia sekä tiedonhakuja isossa kansainvälisessä tutkimusprojektissa. Työn monipuolisuuden kautta saimme mahdollisuuden soveltaa ja vahvistaa ongelmanratkaisu- sekä laboratoriotyöskentelytaitojamme. Työ oli myös ammattitaitoa kehittävä, sillä projektin aikana ammatillinen osaamisemme ja tietopohjamme aiheesta laajenivat merkittävästi.

1.2 Projektorganisaatio

Opinnäytetyön tilaaja oli ValiRx Finland Oy (ValiFinn). Opinnäytetyön ohjaajina ja asiantuntijoina toimivat ValiFinn:n laboratoriojohtaja, biokemisti Jani Salmivaara, sekä vastaava bioanalyttikko Henna Ek. Lisäksi ohjaajana oli Oulun ammattikorkeakoulussa yliopettajana toimiva Mika Paldanius. Opinnäytetyön projektipäälliköt olivat Tiia Huhtakangas ja Emilia Järvinen. Maiju Arhipoff ja Essi Harju olivat työn opponentteja, jotka arvioivat opinnäytetyömme. Kuviossa 1 on esitelty projektorganisaatio.



KUVIO 1. Projektioorganisaatio

2 FGF23 PROTEIINI

FGF23 eli fibroblastikasvutekijä 23 (fibroblast growth factor) koostuu 251 aminohaposta. FGF23 proteiini aktivoituu valkuaisaineiden arginiinin ja seriinin pilkkoutuessa. Kun proteiini pilkkoutuu, muodostuvat sen C- ja N-terminaaliset osat. Tutkimuksessa mitattiin FGF23 proteiinin aktiivista C-terminaalista osaa. FGF23 proteiinia erittyy pääasiassa osteosyyteistä eli kypsistä luusoluista. (Fukumoto 2008, 338.) Mediaaniarvo (n=35) veren seerumipitoisuudelle näennäisesti terveillä henkilöillä on 0,8 pmol/l (Biomedica Immunoassays 2016, viitattu 24.3.2016). Huslabin tutkimusohjekirjassa viitearvoväli FGF23 proteiinille plasmasta on 26–110 kRU/l (Huslab 2016, viitattu 20.3.2016).

FGF23 on hormonin kaltainen tekijä ja se on merkittävä fosfaatin ja D-vitamiinin aineenvaihdunnan säätelijä, sillä se kontrolloi niiden tasapainon säätelyä elimistössä. Kohonneet arvot viittaavat usein hypofosfatemiaan tai krooniseen munuaissairauteen, esimerkiksi munuaisten vajaatoiminnassa FGF23 arvo voi olla kohonnut. Munuaisissa FGF23 aiheuttaa virtsaan fosfaatin eritystä. (Deger, Deric, Erten, Onec, Pasaoglu, Pasaoglu & Reis 2012, viitattu 9.5.2016.) Kohonnut FGF23 arvo aiheuttaa hypofosfateemiaa, sillä se lisää fosfaatin eritystä virtsaan vähentämällä sen takaisinottoa primaarivirtsasta. FGF23 myös vähentää fosfaatin imeytymistä suolistosta hidastamalla 25(OH)-D-vitamiinin hydroksylaatiota munuaisissa ja siten alentaa aktiivisen 1,25-dihydroksivitamiini D:n (1,25(OH)2D) synteesiä ja fosfaatin imeytymistä suolistosta elimistöön. (Huslab 2016, viitattu 20.3.2016.)

Indikaatiot FGF23 arvon mittaamiseen ovat fosfaattitasapainon häiriötilojen muutokset sekä luuston sairauksien selvittely. Sen avulla voidaan myös selvittää hypofosfatemian syytä. Hypofosfateemia voi liittyä erilaisiin sairauksiin, kuten esimerkiksi perinnölliseen hypofosfateemiseen riisitautiin, autosomaaliseen dominanttiin hypofosfateemiaan, autosomaaliseen resessiiviseen hypofosfateemiaan sekä onkogeneeseen hypofosfateemiseen osteomalasiaan eli tuumoriosteomalasiaan. (Huslab 2016, viitattu 20.3.2016.) FGF23 säätelee myös muun muassa veren kalsiumpitoisuutta (Koski 2013, viitattu 20.3.2016).

FGF23 on vastikään löydetty hormoni, jolla on suuri merkitys kalsiumin ja fosforin aineenvaihdunnassa. Useiden tutkimusten mukaan FGF23 on yhdistetty useisiin perinnöllisiin luutauteihin ja komplikaatioihin kroonisessa munuaistaudissa sekä sydän- ja verisuonitaudeissa. (Dittmer & Hardcastle 2015, 770.)

3 PROJEKTIN MENETELMÄT

ELISA -menetelmää käyttäen saimme selville näytteistä seerumin FGF23 proteiinin pitoisuuden. Kuoppalevyille pipetoidut näytteet analysoitiin spektrofotometriä käyttäen, joka mittasi levyltä värinmuutosta. Värinmuutos oli suoraan verrannollinen proteiinin pitoisuuteen näytteissä.

Toisenlaisena menetelmänä käytimme havainnointia, jonka avulla pystyimme pohtimaan saatuja tuloksia ja arvioimaan prosessin luotettavuutta ja laatua. Teimme prosessin aikana muistiinpanoja ja haastatteluja, joita käytimme hyväksi laadunarvioinnissa. Lisäksi pidimme päiväkirjaa tapahtuneista virheistä ja muutoksista prosessin aikana. Havainnoimme myös toistemme tekemää työtä. Haastatteluja teimme prosessin aikana aina, kun havaitsimme asioita, joihin halusimme tarkennuksia. Haastattelu havainnoinnin yhteydessä oli joustavaa molemmille osapuolille, eikä siihen tarvinnut varata erillistä aikaa.

3.1 Spektrofotometri

Fotometria on menetelmä, jota voidaan käyttää näytteiden analysoimiseen esimerkiksi kuoppalevyiltä. Fotometrian avulla mitataan valon aiheuttamaa säteilyenergiaa vakioituissa olosuhteissa. Erilaiset fotometrit voivat mitata säteilevän, läpäisevän, imeytyvän, siroutuvan, fluoresoituvan tai heijastuvan valon määrää. Spektrofotometrillä voidaan mitata absorboitunutta (imeytynyttä) tai transmittoitunutta (läpäistynyttä) valoa. Valo mitataan tietyllä aallonpituudella eli absorbanssilla. Jos näytteestä halutaan mitata keltaiselta näyttävän yhdisteen pitoisuutta, täytyy se mitata aallonpituudella 435–500, sillä näyte absorboi sinistä valoa. Eli näytteestä absorboituva sininen valo on suoraan verrannollinen yhdisteen värireaktioon. (Halonen 2004b, 66.)

3.2 Työprosessin havainnointi

Haastattelu on joustava tiedonkeruumenetelmä, koska se antaa mahdollisuuden suoraan ja kielelliseen vuorovaikutukseen haastateltavan kanssa. Haastattelulla on mahdollisuus syventää omaa tietoa aiheesta sekä pyytää selvennystä ja perusteluita saatavista vastauksista. Lisäksi haastateltavia on mahdollista tavoittaa myöhemminkin tutkimuksen edetessä. Haastattelu tiedonkeruumenetelmänä pitää sisällään myös huonoja puolia. Haastattelu sekä sen huolellinen suunnittelu ja

toteuttaminen voivat olla monimutkaisia ja aikaa vieviä. Lisäksi haastattelun luotettavuuden arvioinnissa täytyy olla kriittinen, sillä haastateltava voi antaa sosiaalisesti suotavia vastauksia oman taustansa perusteella. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 199—202.)

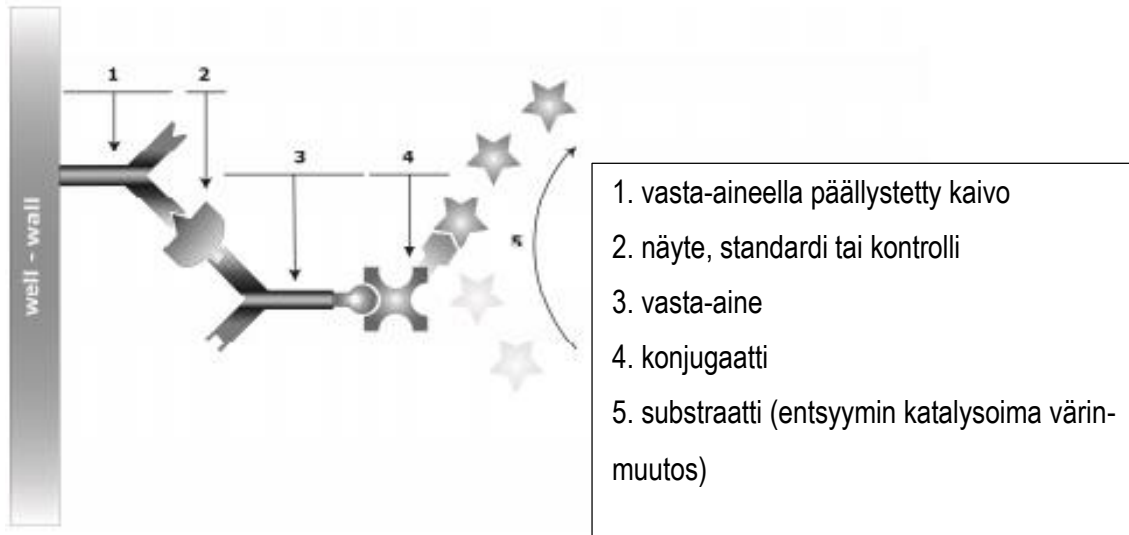
Päiväkirjan pitäminen tutkimusprosessin aikana antaa mahdollisuuden kirjata ylös erilaisia tapahtumia prosessin kulusta, omista kokemuksista ja opituista asioista. Päiväkirjaa voi ajatella kyselylomakkeena, jota täytetään avointa vastaustapaa käyttäen ja jonka valmistelussa täytyy olla huolellinen. Kun päiväkirjan täyttäjiä on useita, on yhteistyö tärkeää, jotta tekstien analysointi olisi helpompaa. (Hirsjärvi ym. 2007, 214—215.)

Havainnointi kertoo, mitä todella tapahtuu ja sen avulla on mahdollisuus selvittää, toimivatko ihmiset kuten he sanovat toimivansa. Havainnoinnilla saadaan välitöntä tietoa yksilöiden käyttäytymisestä ja päästään mukaan tapahtumien luonnollisiin ympäristöihin. Toisaalta havainnointimenetelmä saattaa häiritä seurattavan tilanteen kulkua ja jopa muuttaa sitä. Hyvin suunniteltu havainnointi voi myös viedä paljon aikaa. Havainnointikeinoja on useita. Tärkeimmät ovat systemaattinen havainnointi ja osallistuva havainnointi. Systemaattinen havainnointi on jäsenneiltyä ja useimmiten se tehdään rajatuissa tiloissa, esimerkiksi laboratorioissa. Siinä havainnoija on ulkopuolinen seuraaja. Osallistuvassa havainnoinnissa havainnoija osallistuu toimintaan tutkittavien ehdoilla joko osittain tai täydellisesti. Tilanteita ei ole juurikaan suunniteltu etukäteen, vaan ne muotoutuvat vapaasti. (Hirsjärvi ym. 2007, 207—211.)

3.3 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on entsyymi-immunomääritys, jota käytetään erilaisissa immunokemiallisissa tutkimuksissa. ELISA -menetelmällä voidaan tutkia proteiinien ja muiden molekyylien pitoisuuksia todella spesifisesti. Menetelmiä on erilaisia, mutta työssä käyttämämme menetelmä perustui kaksoisvasta-ainetekniikkaan (sandwich). Käyttämässämme menetelmässä kuoppalevyn pohjaan on kiinnitetty yksi reaktioon osallistuvista komponenteista, joka on vasta-aine. Analysoitava näyte eli antigeeni pipetoidaan kiinnitetyn aineen päälle kuoppalevylle ja antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen. Seuraavassa vaiheessa kuoppalevy pestään, jolloin sitoutumaton materiaali poistuu. Sitten lisätään entsyymileimattu vasta-aine, joka saa aikaan kaksoisvasta-ainekompleksin. Tämän jälkeen lisätään konjugaatti. Toisen pesun jälkeen lisätään substraatti. Aiemmin lisätty entsyymi katalysoi substraatin reaktiotuotteeksi, joka mitataan. Siitä syntyvä värinmuutos on suoraan verrannollinen mitattavaan yhdisteeseen. Värinmuutos kuvastaa

siis reaktiotuotteen määrää, joka voidaan mitata spektrofotometrillä. (Halonen 2004a, 94.) Kuviossa 2 havainnollistetaan tutkimuksessa käytetty ELISA sandwich eli sandwich enzyme immunoassay -menetelmä.



KUVIO 2. ELISA sandwich –menetelmä (Biomedica Immunoassays 2016, viitattu 24.3.2016)

4 LAADUNVARMISTUS KLIINISESSÄ TUTKIMUSPROJEKTISSA

Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriotyössä on tärkeää, sillä tulokset ovat usein tärkeä osa ihmisen terveydentilan arviointia. Tutkimusprojektin laadunhallinta koostuu monista eri tekijöistä. Kokonaisvaltaisessa laadussa tulisi huomioida asiakasnäkökulman lisäksi tutkimusprosessin preanalyttiset, analyttiset ja postanalyttiset vaiheet. Keskitymme kuitenkin kliinisessä tutkimustyössä käytettyihin yleisiin laadunvarmistustoimenpiteisiin, jotka tapahtuvat laboratoriossa ja koskevat näytteiden analysointia.

Tutkimusprojekti eroaa tavallisesta rutiinomaisesta laboratoriotyöstä. Projektilla eli hankkeella on selkeä ja realistinen tavoite, johon sillä pyritään ja se on kertaluontoinen. Projektin toteuttamisesta vastaa yleensä jokin ryhmä tai organisaatio. Projektin aihe tai tarve voi tulla ulkopuoliselta tekijältä, joka tilaa hankkeen. Projektilla voi olla tarkkaan suunniteltu aikataulu ja sillä on yleensä selkeä aloitus ja lopetus. Projektin aikana ryhmän kesken on hyvä sopia vastuun jakamisesta, tehtävistä ja säännöistä, jotta tavoitteissa on mahdollista pysyä. (Peda.net 2013, viitattu 28.3.2016.)

Laadun parantamiseen käytetään apuna erilaisia standardeja. Esimerkiksi ISO 9000:2015 laatustandardin mukaan laadulla tarkoitetaan tuotteen tai palvelun kaikkia ominaisuuksia, joilla tuote tai palvelu täyttää sille annetut vaatimukset. Lisäksi standardissa tarkennetaan, että tuotteiden ja palveluiden laatu määräytyy niiden ominaisuuksien tai tekijöiden perusteella, jotka tyydyttävät asiakkaiden ja muiden sidosryhmien tarpeet sekä odotukset. Laatua voidaan siis arvioida sen mukaan, miten tuotteen tai palvelun tilaaja kokee tarpeensa ja odotustensa täytyvän, minkälaisen hyödyn ja arvon asiakas saa palvelusta tai tuotteesta sekä kuinka tarkoituksenmukainen ja toimiva tuote tai palvelu on. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry 2016, viitattu 21.3.2016.)

Laatua voidaan hallita eri osa-alueiden avulla, joita ovat laadun suunnittelu, laadunvarmistus ja -ohjaus sekä laadun parantaminen. Suunnittelun avulla asetetaan laatutavoitteet: laadunvarmistuksella synnytetään luottamus tavoitteiden täytymisestä, laadunohjauksella varmistetaan laatutavoitteiden täytyminen ja laadun parantamisella pyritään parantamaan kykyä täyttää laatuvaatimukset, esimerkiksi tehostamaan toimintaa. (Suomen Standardisoimisliitto SFS ry 2016, viitattu 21.3.2016.)

Tavallisin mittari kliinisen laboratoriotyön laadulle on tutkimustyössä saatujen tulosten oikeellisuus ja luotettavuus. Tulosten laatuun vaikuttavat muun muassa työntekijöiden ammattitaito, tehokas

viestintä, laboratoriotilojen ja laitteiden toimivuus, työprosessien järkevä suunnittelu sekä virheiden havainnointi ja korjaaminen. (Sinervo 2011, viitattu 21.3.2016.) Menetelmien tulee siis olla muun muassa validoituja, mikä tarkoittaa sitä, että saatavien tulosten mittausalueen ja tarkkuuden tulee olla käyttötarkoitukseen nähden asianmukaisia (SFS –EN ISO/ IEC 17025 2000, 37). Laadunvarmistukseen kliinisessä tutkimustyössä yleisesti käytettyjä menetelmiä ovatkin muun muassa pipettien kalibrointi ja tarkistus, mittausten toimintavarmuuden testaaminen sekä tulosten vertailukelpoisuuden ja toistettavuuden arviointi.

4.1 Pipettien kalibrointi ja tarkistus

Pipettien kalibrointi tarkoittaa pipetoidun määrän ja pipettiin valitun tilavuuden erojen määrittämistä. Kalibroinnilla varmistetaan pipetoitavan tilavuuden tarkkuus. Sääto tarkoittaa pipetin tarkkuuden säätämistä niin, että pipetoitu määrä vastaa asetusarvoa. Pipeteille on usein valmistajan määrittämät rajat siitä, kuinka paljon suurin sallittu virhe voi pipetoidussa tilavuudessa olla verrattuna pipetin asetusarvoon. Kalibroinnissa voidaan tosin käyttää myös laboratorion itse määrittämiä rajoja tai standardeihin perustuvia hyväksyttäviä rajoja. Kalibroitaessa pipetti yleensä testataan sen pienimmällä ja suurimmalla tilavuudella. (Thermo Scientific 2015, viitattu 26.3.2016.) Pipetin kalibrointi, tarkistus ja säätö tulisi aina suorittaa vedottomassa tilassa, jonka lämpötila on 20–25 astetta. Lisäksi kalibroinnissa käytetään tislattua vettä, jonka pitää olla huoneen lämpötilassa, kuten myös itse pipetti, pipetin kärjet ja punnitusastia. Käytettävän analyysiväian tulee olla riittävän tarkka. (Biohit Oyj 2016, 11.)

Ennen kalibrointia asetetaan pipettiin haluttu kalibrointitilavuus ja huuhdellaan pipetin kärkikartioon kiinnitetty kertakäyttöinen kärki viisi kertaa tislattulla vedellä. Tämän jälkeen vettä pipetoidaan esitaarattuun astiaan ja kirjataan tulos ylös. Jokaisella kalibroittavalla tilavuudella pipetoiminen toistetaan vähintään viisi kertaa. Lopuksi lasketaan kalibrointitilavuuden pipetointitulosten keskiarvo ja muutetaan se tilavuudeksi jakamalla keskiarvo tislattun veden tiheydellä, joka esimerkiksi kahdenkymmenen asteen lämpötilassa on 0,998203 mg/ μ l. (Biohit Oyj 2016, 12–13.)

Kalibrointituloksia verrataan tilavuuden sallittuihin arvoihin. Jos kalibrointimittausten tulokset eivät ole sallittujen tilavuusrajojen sisällä, tulee laskea mittaustulosten tarkkuus ja toistettavuus sekä tarvittaessa tehdä pipetin kalibrointisäätö. Säädön jälkeen säädetty tilavuus kalibroidaan uudestaan. (Biohit Oyj 2016, 12.)

Pipetit voidaan myös tarkistaa ennen työskentelyä työskentelyssä tarvittavilla tilavuuksilla. Tarkistus suoritetaan kuten kalibrointi, mutta kalibrointitilavuuksina käytetään vain työssä tarvittavia tilavuuksia. Tarkistamalla tilavuudet voidaan varmistua siitä, että pipetoitava tilavuus vastaa työssä tarvittavaa tilavuutta.

4.2 Standardit ja kalibrointi

Standardilla eli mittanormaalilla tarkoitetaan pitoisuudeltaan tarkasti tunnettua liuosta. Standardeja käytetään useimmiten diagnostiikkalaitteiden tai -menetelmien kalibrointiin tai muodostamaan diagnostiikassa mittaussuureen arvoja vertailukäyttöön. Kalibrointi tarkoittaa toimia, joilla spesifisissä olosuhteissa saadaan diagnostiikkalaitteiden tai -menetelmien osoittamien arvojen ja mittasuureen vastaavien arvojen välinen yhteys. Useimmiten pitoisuuksiltaan eri väkevyisillä standardeilla tehdään laimennossarja, jonka jokaisen näytteen konsentraatio on tarkasti tunnettu. Laimennossarjan avulla määritetään mittaussignaalin tason ja analyytin pitoisuuden välinen yhteys, joka muodostaa mittauslaitteelle tai -menetelmälle kalibrointikäyrän. Standardiliuosten pitoisuudet ja mitatut tulokset vaikuttavat siis näytteen analyysituloksiin. Tämän takia standardiliuosten kontaminaatiota on vältettävä ja standardien liuottamiseen on käytettävä tarkasti suodatettua ja puhdistettua vettä, joka ei sisällä vesijohtoveden epäpuhtauksia. (Jaarinen & Niiranen 2008, 18, 20, 24.)

4.3 Kontrollit

Kontrollien avulla tehdään laboratoriossa sisäistä laadunvalvontaa. Kontrollipakkaus on tarkoitettu käytettäväksi testikontrollina varmistamaan se, että näytteen mittaus- ja tunnistusjärjestelmät toimivat oikein. Kontrollien avulla mittausmenetelmien tarkkuus ja toistettavuus varmistetaan. (Salmivaara, haastattelu 9.5.2016.)

Kontrollinäyte analysoidaan samalla tavalla kuin potilasnäytteet. Jos kontrollinäytteen mittaustulos vastaa tunnettua pitoisuutta tai tavoitearvoa, mittausmenetelmää voidaan pitää toimivana ja luotettavana. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25.) Usein diagnostiikkalaitteille ja -menetelmille käytetään juuri niille suunniteltuja kaupallisia kontrollivalmisteita, jotka tulevat yleensä reagenssipakkauksen mukana. Valmistajat määrittelevät kontrolleille tavoitearvot, joihin kontrollien mitatut pitoisuudet pitäisivät osua. Kontrolleja onkin yleensä eri tasoja, kuten esimerkiksi matalilla ja korkeilla pitoisuuksilla, jotka mittaavat diagnostiikkalaitteiden tai -menetelmien toimivuutta mittausalueen ylä- ja alarajoilla. Kaupallisten kontrollien lisäksi laboratorio voi käyttää kontrolleina esimerkiksi potilasnäytteitä tai

itse valmistamiaan sisäisiä kontrolleja, joiden pitoisuuden ovat vastaavasti mitattu ja ne ovat tiedossa. (Salmivaara, haastattelu 9.5.2016.)

Kaupallisesti on saatavilla myös ulkoisia kontrolleja, jotka taas ovat diagnostiikkalaitteista tai -menetelmistä täysin riippumattomia laadunvalvontatuotteita. Ulkoiset kontrollit eivät ole kitin tai laitevalmistajan suunnittelemaa ja sen kitille tai laitteelle optimoituja kontrolleja. (Labquality Oy 2016, viitattu 23.3.2016.)

4.4 Tarkkuus ja oikeellisuus

Menetelmän tarkkuudella havainnoidaan mitatun tuloksen ja oikean arvon osuvuutta. Kun tunnetaan mitattavan analyysin oikea pitoisuus, saadaan selville mittaustuloksen tarkkuus prosentuaalisena arvona tai poikkeamana vertailuarvosta. Tarkkuuden määrittämisessä arvioidaan menetelmän systemaattisia ja satunnaisia virheitä, kun taas menetelmän oikeellisuus sisältää vain systemaattiset virheet. Oikeellisuudella tarkoitetaan useista mittauksista saatujen tulosten keskiarvon vastaavuutta tosiarvon, referenssiarvon tai sovitun arvon kanssa. Oikeellisuus ilmoitetaan usein poikkeamana eli systemaattisena virheenä, joka siis on mittaustulosten ja tosiarvon välinen ero. (Ehder 2005, 35—36.)

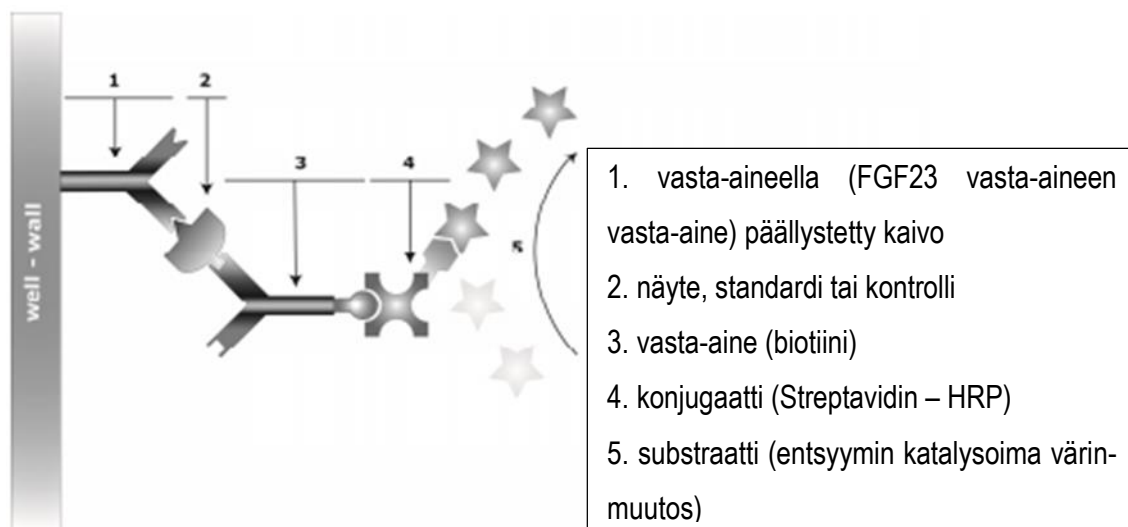
4.5 Vertailukelpoisuus ja toistettavuus

Vertailukelpoisuutta ja toistettavuutta käytetään yhtenä tekijänä tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Toistettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten täsmällisyyttä, joka saavutetaan toistettavissa olosuhteissa eli samalla menetelmällä, samasta materiaalista, saman analysoijan toimesta ja samassa laboratorioissa tehtynä lyhyellä aikavälillä. Toistettavuuden selvittämiseksi voidaan mitata näytteistä rinnakkaismääryksiä. (Ehder 2005, 36—37.) Rinnakkaismääryksissä jokainen yksittäinen määrittäminen toistetaan samalla menetelmällä ja suoritustavalla, jolloin samasta näytteestä saadaan kaksi eri tulosta, joita voidaan verrata keskenään (Eurachem-Suomen laadunvarmistusalan työryhmä 1997, 26).

Toistotarkkuus tarkoittaa toisistaan riippumattomien tunnetuissa olosuhteissa saatujen tulosten keskinäistä vastaavuutta, jota voidaan arvioida tekemällä useista eri näytteistä rinnakkaismääryksiä useana päivänä. Toistotarkkuus ilmoitetaan usein suhteellisenä hajontana. (Ehder 2005, 35.)

5 FGF23 PROTEIINIMÄÄRITYKSEN TYÖVAIHEET

Tutkimuksen tekemiseen käytimme Biomedican kaupallista kittiä, joka perustui ELISA sandwich -menetelmään. Kitti oli tarkoitettu määrittämään FGF23 C-terminaalisen proteiinin määrää ihmisen seerumi- tai plasmanäytteistä. Kuoppalevyn kaivot olivat päällystetty FGF23 vasta-aineen vasta-aineella, joihin lisättiin standardit, kontrollit ja potilasnäytteet sekä havaittava vasta-aine (biotini). Mitattavissa analyyteissä mahdollisesti oleva C-terminaalinen FGF23 sitoutui kaivon pohjalla olevan vasta-aineen kanssa, jolloin ne muodostivat kerrosrakennelman havaittavan vasta-aineen kanssa. Pesuissa sitoutumaton materiaali poistui. Lisättävän konjugaatin Streptavidin sitoutui vasta-aineen biotiiniin ja HRP reagoi substraatin kanssa. Pesun jälkeen substraatti pipetoitiin kaivoihin. Entsyymi katalysoi substraatin värinmuutoksen, ja värin intensiteetti oli suoraan verrannollinen FGF23 proteiinin määrään. Kuviossa 3 Biomedica kitin periaate.



KUVIO 3. Biomedica kitin periaate (Biomedica Immunoassays 2016, viitattu 24.3.2016)

Kitin mukana tuli kaikki tarvittavat reagenssit ja kontrollit sekä kuoppalevy. Pitoisuuksiltaan erilaisia standardeja oli seitsemän ja kontrolleja oli kahta erilaista: A ja B. Lisäksi käytimme tekemissämme kiteissä ylimääräistä laboratorion potilasnäytteistä aiemmin valmistamaa puuli S01 kontrollia, joka oli pakastettu valmiiksi pienempiin käyttöeriin. Sen tarkoituksena oli saada lisää vertailupohjaa laadun ja toistettavuuden arviointiin. Tutkimuksessa käytetyt potilasnäytteet olivat seerumia.

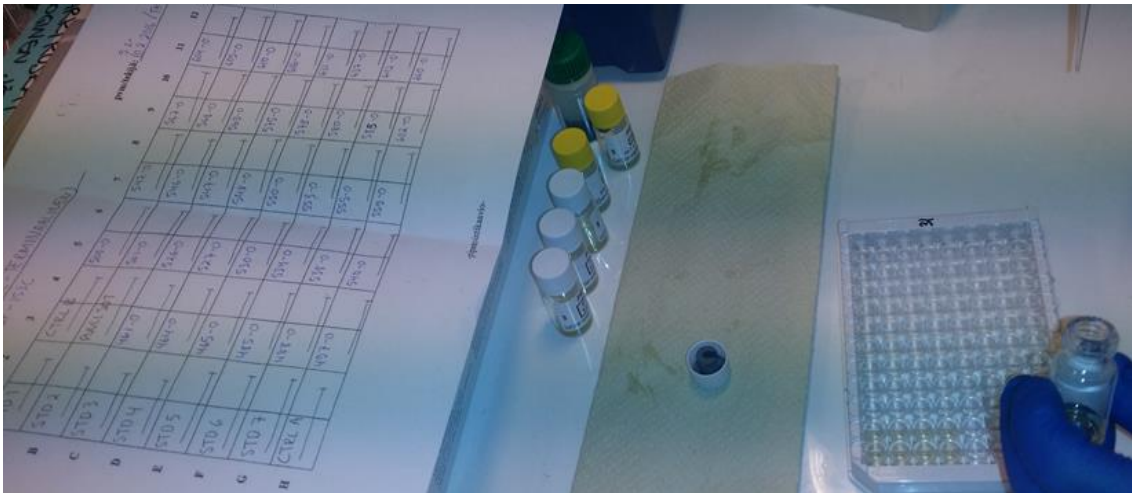
5.1 Alkuvalmistelut

Ennen tutkimuksen aloittamista otimme sulamaan pakastetut seeruminäytteet. Teimme analysoitavista näytteistä pipetointikaavion (liite 1) helpottamaan työn kulkua ja varmistamaan, että näytteet pysyivät oikeassa järjestyksessä ja että mittaustulokset vastasivat oikeita näytteitä. Lisäksi varmistimme, että käyttämämme kitit olivat samaa eränumeroa myös aikaisemmin käytettyjen kittien kanssa. Tarvikkeista tarkistimme myös eräpäivät ja käyttökelpoisuuden.

Liuotimme kitin mukana tulleet kontrollit ja standardit tislattuun veteen ja annoimme liueta huoneenlämmössä 15 minuuttia. Liuotuksen ajankohta täytyi ottaa huomioon, sillä kontrollit ja standardit olivat käyttökelpoisia vain neljä tuntia huoneenlämmössä veden lisäämisestä. Teimme myös pesupuskurin laimentamalla kitin mukana tullut puskuri tislatulla vedellä. Ennen tutkimuksen aloittamista tarkistimme käyttämämme pipetit punnitsemalla tarvittavat tilavuudet. Kaikki reagenssit ja näytteet tuli olla huoneenlämpöisiä ennen tutkimuksen aloittamista.

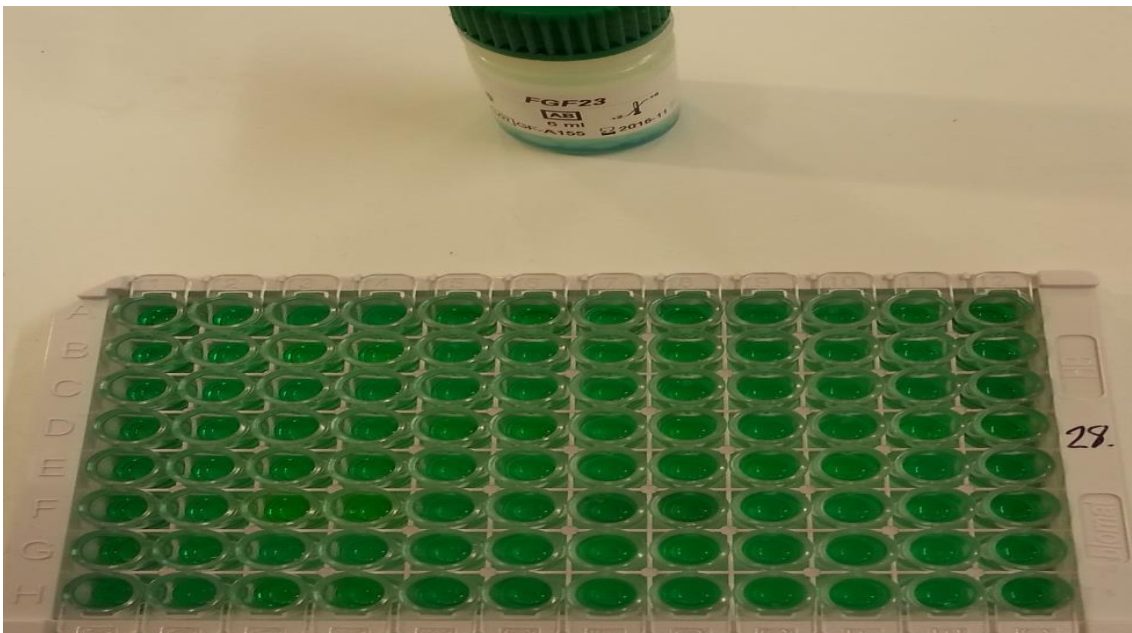
5.2 Työvaiheet

Aloitimme työskentelyn, kun näytteet olivat pipetointikaavion mukaisessa järjestyksessä sekä reagenssit ja tarvikkeet valmiina. Kuoppalevy oli tärkeää ottaa ulos suojafoliosta varovasti koskemalla vain reunoihin kontaminaation ja jälkien välttämiseksi. Levyt numeroitiin pipetointikaavioiden mukaan. Kuoppalevylle pipetoiminen aloitettiin standardeista, joilla tehtiin laimennossarja pipetoimalla standardit laimeammasta väkevämpään. Kuvassa 1 näkyy pipetointikaavio sekä standardien pipetointi kuoppalevylle. Seuraavaksi pipetoitiin kontrollit A, B ja puuli S01 sekä potilasnäytteet. Standardeja, kontrolleja ja potilasnäytteitä pipetoitiin 50 µl rinnakkaisnäytteinä. Ne sekoitettiin lyhyellä vorteksoimisella ennen pipetointia.



KUVA 1. Standardien pipetointi kuoppalevyllle

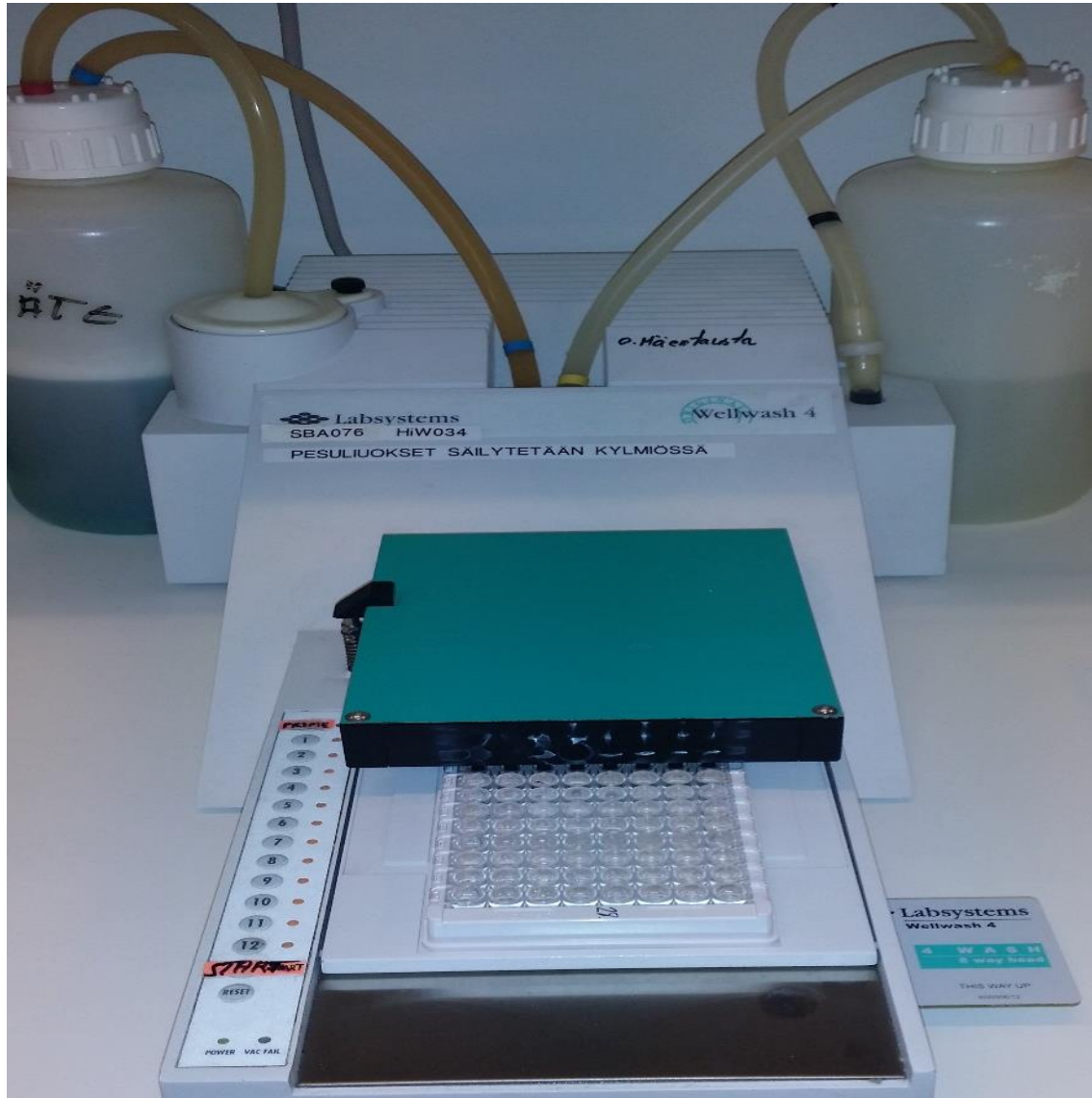
Yhteen 96-kuoppalevyyn mahtui yhteensä 38 eri potilasnäytettä. Jokaiseen kuoppaan lisättiin 50 µl vasta-ainetta. Kuvassa 2 vasta-aine on lisätty levyllle. Liuksen vihreä väri helpotti pipetointia. Kuoppalevyä sekoitettiin varovasti, jotta aineet sekoittuivat. Levy peitettiin tiukasti kitin mukana tulleella suojakalvolla, joka esti liuosten haihtumista kaivoista. Kuoppalevyjä inkuboitiin 20-24 tuntia huoneenlämmössä 18-24 asteessa.



KUVA 2. 96-kuoppalevy vasta-aineen lisäyksen jälkeen

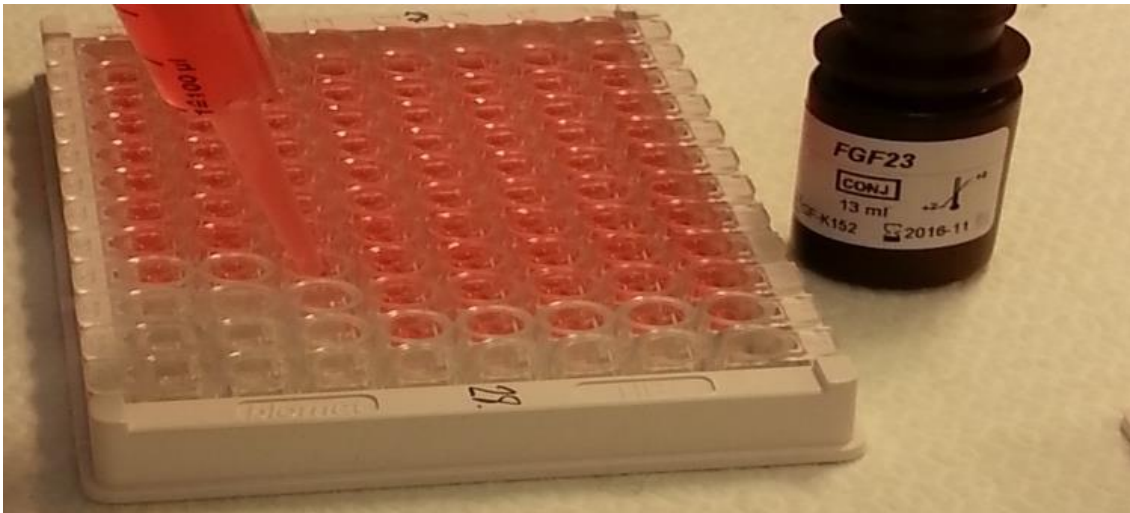
Vuorokauden inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin viisi kertaa 300 µl:lla laimennetulla pesupuskurilla. Pesut suoritettiin automaattisella Labsystems:n Wellwash 4 pesulaitteella, joka pipetoi kuoppiin tarvittavan määrän puskuria sekä poisti puskurin imulla. Kuvassa 3 on käyttämämme pesulaite.

Oikean puoleisesta säiliöstä laite otti pesupuskurin ja vasemman puoleiseen säiliöön kulkeutui jäte. Pesujen jälkeen ylimääräinen puskuri poistettiin taputtamalla kuoppalevyä voimakkaasti paperia vasten, kunnes kaikki puskuri saatiin poistettua kuopista.



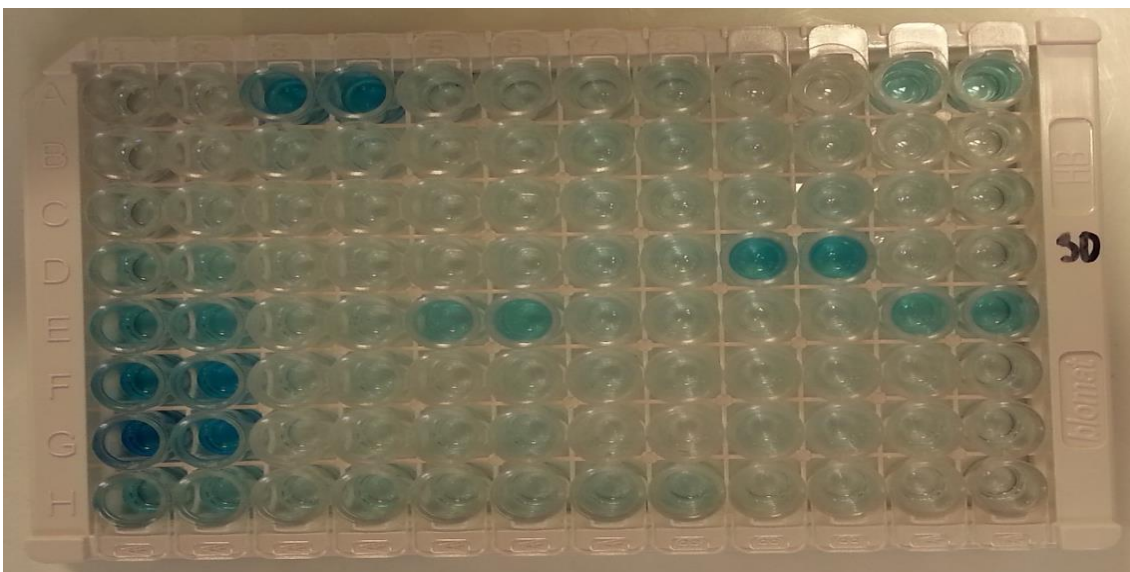
KUVA 3. Automaattinen pesulaite

Kuoppiin lisättiin 100 μ l konjugaattia, jonka jälkeen levy peitettiin tiukasti uudella suojakalvolla ja laitettiin pimeään inkuboitumaan huoneenlämpöön tunniksi. Kuvassa 4 punaisen väristä konjugaatti-liuosta pipetoidaan kaivoihin. Inkuboinnin jälkeen kuoppien pesu toistettiin.



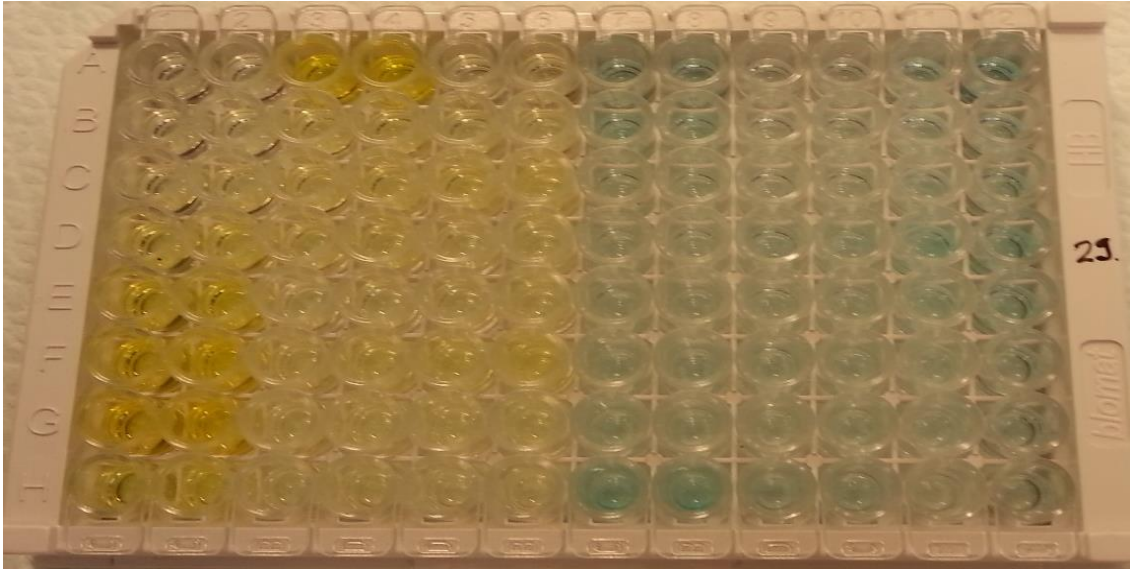
KUVA 4. Konjugaatin pipetointi

Seuraavaksi lisättiin 100 μ l substraattia, jonka jälkeen levyä inkuboitiin pimeässä ja huoneenlämmössä puoli tuntia. Kuvassa 5 näkyy entsyymien aiheuttama värinmuutos substraatin lisäämisen jälkeen. Kuopista A1-G2 huomaa selkeästi standardien laimennossarjan laimeammasta väkevämpään. Mitä tummemmaksi väri muuttui, sitä suurempi oli näytteen konsentraatio.



KUVA 5. Substraatti lisätty kuoppalevyille

Lopuksi kuoppiin lisättiin väritöntä stop -liuosta 50 μ l ja levyä sekoitettiin kevyesti reaktion pysäyttämiseksi. Kuvassa 6 näkyy, kuinka stop -liuoksen lisäämisen jälkeen väri muuttui keltaiseksi.



KUVA 6. Stop -liuos lisätty levyn vasemmalle puolelle

5.3 Mittaus ja tulosten arkistointi

Levyt mitattiin välittömästi reaktion pysäyttämisen jälkeen spektrofotometrillä aallonpituudella 450. Mittaukset tehtiin kuvassa 7 olevalla Victor X4 PerkinElmer -spektrofotometrillä ja tulokset analysoitiin WorkOut 2.5 PerkinElmer-ohjelmalla. Ohjelma on suunnittelu- ja suoritusohjema kuoppalevynlukijalaitteille. Tuloksista tarkastettiin standardikuvaaja ja standardien pitoisuudet. Lisäksi verrattiin kontrollien A ja B tuloksia valmistajan viitearvoihin. Jos standardien ja kontrollien mitatut pitoisuudet vastasivat niille määriteltyjä pitoisuuksia, tarkistettiin potilasnäytteiden konsentraatiot. Jos potilasnäytteen konsentraatio oli pitoisuudeltaan suurempi kuin vahvin standardi, tuli potilasnäyte laimentaa kitin ohjeen mukaan ja analysoida uudestaan. Potilasnäytteistä tarkistettiin myös rinnakkaisnäytteiden väliset erot eli laitteen valmiiksi laskema coefficient of variation eli CV prosentti. Suurista eroista ilmoitettiin biokemistille mahdollisia jatkotoimenpiteitä varten. Mittaustulokset arkistoitettiin paperisessa muodossa sekä tallennettiin sähköisesti muistitikulle. Lisäksi tuloksista tehtiin yhteenvetolista, joka lähetettiin tilaajalle.



KUVA 7. Victor X4 PerkinElmer –spektrofotometri

5.4 Työskentelyssä laatuun ja toistettavuuteen vaikuttavat tekijät

Tutkimusprojektissa oli tärkeää, että kaikki kitit olivat samaa eränumeroa, sillä samalla eränumerolla tehtyjen tuotteiden voitiin olettaa olevan identtisiä muun muassa laadultaan, ainesosiltaan ja pitoisuuksiltaan. Näin varmistuttiin, ettei tuloksiin tullut eroja eränumeron vaihtumisesta johtuvista mahdollisista reagenssien pitoisuuseroista. Työskentelyssä pyrittiin tekemään työvaiheet vakioidusti aina samalla tavalla. Etenkin oleellisesti tuloksiin vaikuttavat virheet tuli tiedostaa niiden välttämiseksi.

Kontrollien ja standardien korokit oli tärkeää pitää järjestyksessä, sillä liuosten pitoisuudet olivat erilaisia. Liuotusjärjestys oli laimeammasta väkevämpään, jotta estettiin laimean liuoksen kontaminaatio väkevästä liuksesta. Pipetoitaessa seerumia oli muistettava, että pipetin kärjen pintaan kärjen ulkopuolelle voi tarttua nestetippa näytettä, joka oli pyyhittävä pois näyteastian reunaan ennen pipetoimista. Näytetilavuuden tuli antaa nousta pipetin kärkeen rauhassa seerumin viskositeetin vuoksi. Pipetin kärki piti myös tarkistaa ilmakuplista, jotta näytetilavuudet pysyisivät vakioituina. Kaikki pipetointi tehtiin suoralla pipetointimenetelmällä. Pipetit säilytettiin pystyasennossa, jotta ehkäistiin mahdollisesti pipettiin jääneen nesteen pääseminen pipetin kärkikartioon. Näytteiden lyhyt sulatusaika ja kylmät näytteet sekä vähäinen sekoittaminen saattoivat sakkauttaa näytteitä, millä mahdollisesti oli vaikutusta näytteiden pitoisuuksiin. Reagenssit piti sekoittaa varovaisesti tasalaa-tuisiksi liuoksiksi välttämällä kuitenkin vaahtoutumista. Liiallinen vaahtoutuminen vähensi pipetointitilavuutta. Myös reagenssien käyttökelpoisuus oli varmistettava. Esimerkiksi substraatti oli väritöntä liuosta, joten värireaktiot pullossa viittasivat kontaminaatioon ja käyttökelvottomuuteen.

Pipetointitekniikan lisäksi pipetointijärjestyksellä oli merkitystä tulosten laatuun. Rinnakkaisnäytteet pipetoitiin järjestyksessä pipetointikaavion mukaan. Kaivoihin pipetoitiin reagenssit samassa järjestyksessä kuin näytteet, jotta kaikki näytteet saivat ajallisesti samanlaisen käsittelyn. Tämä piti huomioida myös useampia levyjä yhtä aikaa tehtäessä, joten uusi työvaihe aloitettiin aina ensimmäisestä levystä.

Pesuvaiheiden jälkeen levyt taputeltiin kuivaksi, jolla varmistettiin, ettei pesupuskuria jäänyt kaivoihin. Mahdolliset puskurijäämät saattoivat laimentaa liuoksia ja siten vaikuttaa tuloksiin. Kuoppalevyyn sai koskea vain reunoilta, sillä jäljet pohjassa saattoivat haitata spektrofotometrillä mittausta. Reagenssi- ja näytepisarat levyn reunoilla tai kuoppien välissä olisivat voineet myös vääristää mittaustuloksia. Roskat tai pölyt myös spektrofotometrin levynlukijassa saattoivat haitata mittausta. Tämän vuoksi aina tarkistimme silmämääräisesti, että levynlukija oli puhdas.

5.5 Jätteiden käsittely

Kaikki biologista materiaalia sisältävä jäte, kuten potilasnäytteiden jäämiä sisältävät pipetin kärjet, piti hävittää biologiseen jätteeseen. Käytetyt standardit ja kontrollit hävitettiin riskijäteastiaan, sillä vaikka ne ovat valmistajan puolesta testattu negatiivisiksi tarttuvien tautien osalta, ohjeessa neuvottiin käsittelemään niitä tartuntavaarallisina. Muut reagenssit hävitettiin normaalin jätteen mukana. Potilasnäytteet pakastettiin uudelleen mahdollista uusintamittausta varten. Kaivojen pesuissa syntynyt jäte hävitettiin kaatoaltaaseen.

6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulosten vertailukelpoisuutta arvioitiin rinnakkaisnäytteiden, standardien ja kontrollien avulla. Kontrollit, standardit ja näytteet mitattiin rinnakkaisina. Spektrofotometri laski rinnakkaisnäytteiden mitattujen absorbanssien erot, jotka ilmoitettiin CV prosentteina. CV prosentti tarkoitti rinnakkaisten tulosten vaihtelukerrointa eli kuinka paljon rinnakkaisnäytteiden tulokset erosivat toisistaan prosentteina. Valmistajan ohjeen mukaan CV prosenttiarvon suositus oli alle kymmenen. Biokemisti arvioi kuitenkin järkeväksi uusintarajaksi CV prosentin 25, sillä uusittavia näytteitä olisi ollut liikaa, eivätkä tilatut kitit olisivat riittäneet. Liitteessä 2 on esimerkkitulokset levyiltä 31.

Ensin tuloksista tarkistettiin, että kontrollit olivat hyväksyttävissä rajoissa. Sallittu arvo kontrollissa A oli $3,8 \pm 1,1$ pmol/l ja kontrollissa B $10,7 \pm 3,2$ pmol/l. Kontrolleissa tunnetuilla arvoilla oli sallittu vaihteluväli, jonka sisällä tulokset olivat hyväksyttäviä. Puuli S01 kontrolli oli sekoitus seerumia, joka oli jaettu pieniin käyttöeriin. Laskimme tuloksista keskiarvon puulille, jonka arvo oli 0,8 pmol/l.

Vertailimme kymmentä levyä, joka on noin viidesosa kaikista tehdyistä levyistä. Taulukkoon 1 on kirjattu kontrollien tulokset tekemistämme kymmenestä kitistä. Levyt olivat siis kahden eri ihmisen tekemiä eri päivinä. Taulukossa samoina päivinä samaan aikaan tehdyt levyt ovat korostettu samoilla väreillä. Levyt 7, 26, 27, 28 ja 29 teki sama henkilö sekä levyt 8, 24, 25, 30 ja 31 teki toinen henkilö.

TAULUKKO 1. Kontrollien tulokset

Levynumero ja tekijä	Kontrolli A, pmol/l (3,8 +/- 1,1 pmol/l)	Kontrolli B, pmol/l (10,7 +/- 3,2 pmol/l)	Puuli S01 kontrolli, pmol/l (KA 0,8 pmol/l)
7, tekijä 1	2,8	10,9	0,8
8, tekijä 2	3,0	10,4	0,8
24, tekijä 2	2,9	11,5	0,7
25, tekijä 2	3,1	11,1	0,7
26, tekijä 1	2,9	11,0	0,8
27, tekijä 1	3,2	11,3	0,9
28, tekijä 1	3,1	11,0	1,0
29, tekijä 1	3,1	9,9	0,8
30, tekijä 2	3,1	11,0	0,9
31, tekijä 2	3,1	10,6	0,8

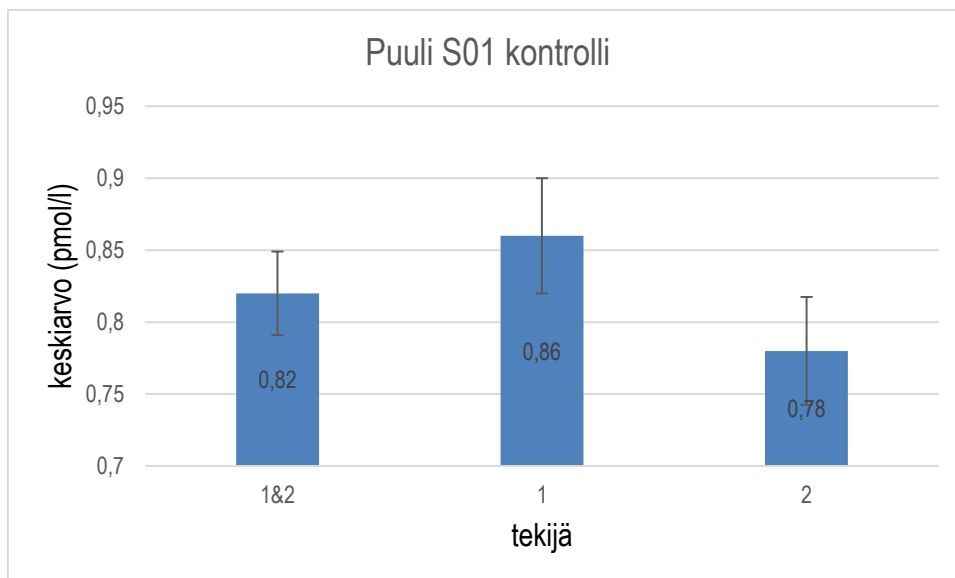
Taulukosta 1 huomataan, että tulosten vaihteluväli oli pysynyt pienenä kaikissa kontrolleissa eli tulokset eivät olleet vaihdelleet ääripäästä toiseen. Kontrollin A tulosten keskiarvo oli 3,0 pmol/l ja kontrollin B 10,9 pmol/l. Puuli S01 kontrollin vaihteluväli keskiarvosta oli +/- 0,2 pmol/l, joten erot eivät olleet suuria tulosten välillä. Tuloksia voitiin pitää luotettavina ja mittauksia onnistuneina, sillä kontrollit olivat sallituissa rajoissa. Tulokset eivät eronneet toisistaan merkittävästi, joten myös toistettavuutta voitiin pitää hyvänä.

Laadunarvioinnissa ja tulosten vertailussa voidaan käyttää tuloksista laskettua keskiarvoa, standardideviaatiota ja standardivirhettä. Standardivirhe on keskiarvon standardipoikkeama eli keskiarvon virhe. Virhe lasketaan jakamalla standardideviaatio näytemäärän neliöjuurella. Standardivirhe kuvaa todennäköistä väliä, mille tulokset sijoittuvat. Standardideviaatio tarkoittaa keskihajontaa. Sillä mitataan saatujen tulosten vaihtelun määrää. Mitä matalampi deviaatioarvo on, sitä lähempänä keskiarvoa saadut tulokset ovat. Korkea deviaatioarvo viittaa tulosten korkeampaan vaihteluväliin. (NC State University 2004, viitattu 18.4.2016.) Arvojen perusteella voidaan helposti vertailla tulosten keskiarvoja, heittoja ja yhteneväisyyttä. Teimme kontrolleista keskiarvojen, standardideviaatioiden ja standardivirheiden perusteella taulukot 2, 3 ja 4 vertailun helpottamiseksi. Taulukoista on helppoa katsoa kontrollien toistettavuuden onnistuminen. Vertikaaliarvot vasemmalla vaihtelevat eri taulukoissa ja arvojen väli on pieni, mikä pitää huomioida tarkastelussa. Tämä näkyy

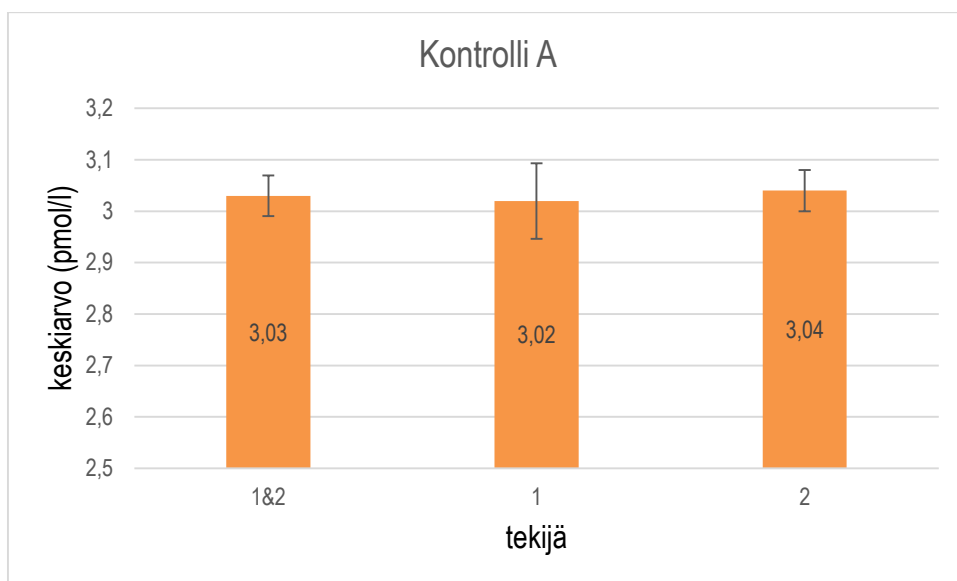
siinä, että palkkien väliset erot näyttävät suurilta, vaikka todellisuudessa arvojen väliset erot ovat pieniä, kun huomioidaan vertikaaliarvot.

Taulukoissa 2, 3 ja 4 värilliset palkit kuvastavat keskiarvoja, joiden sisässä on arvo myös numeerisesti. Mustat horisontaaliset viivat eli virhepylväät keskiarvopylväiden keskellä ovat muodostettu standardivirhe -arvoa käyttäen. Ensimmäiset palkit 1&2 kuvastavat tekemiemme kymmenen kitin kontrollien keskiarvoja. Näiden kymmenen kitin tekoon osallistui kaksi henkilöä, joista molemmat teki viisi kittiä. Palkit 1 ja 2 kuvastavat näitä eri henkilöiden tekemiä kittejä ja ne kuvastavat, miten keskiarvot vaihtelivat eri henkilöiden tekeminä.

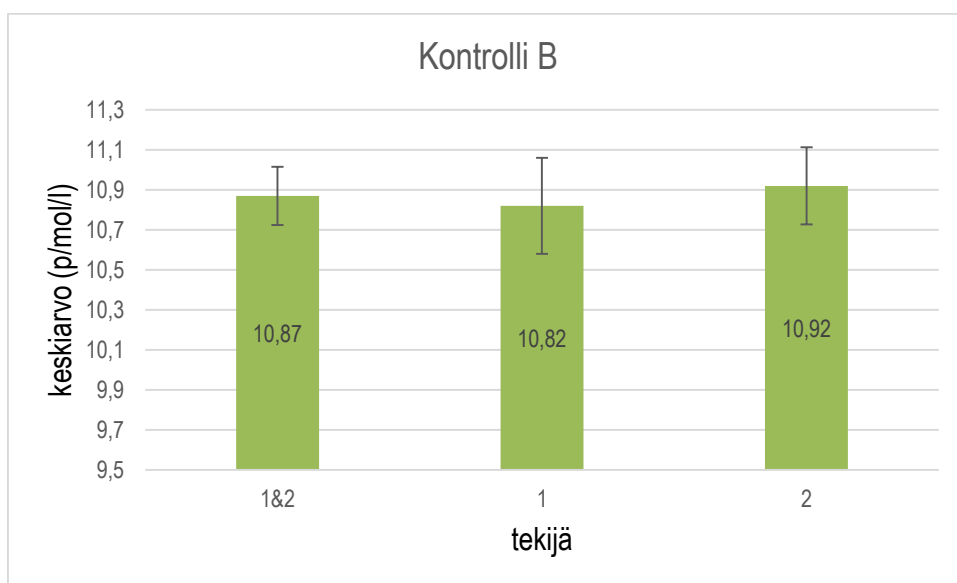
TAULUKKO 2. Puuli S01 kontrollin keskiarvot ja virhepylväät



TAULUKKO 3. Kontrolli A:n keskiarvot ja virhepylväät



TAULUKKO 4. Kontrolli B:n keskiarvot ja virhepylväät



Taulukoista näkee, ettei keskiarvon vaihteluväli ole ollut suuri. Jokaisessa palkissa on myös virhepylväs, joka kuvastaa standardivirhe -arvoa. Standardivirhe -arvo kuvastaa sitä väliä, mille mittaustulokset todennäköisesti sijoittuvat. Standardivirheen nolla-arvo on keskiarvo ja se vaihtelee todellisten mittaustulosten mukaan keskiarvon molemmin puolin. Esimerkiksi taulukossa 4 palkissa 1&2 standardivirhe -arvo on 0,15 eli mittaustulosten todennäköiset arvot ovat keskiarvosta vaihteluvälillä +/- 0,15. Yleensä mitä suurempi arvo on kyseessä, sitä suurempi on virhe eli standardivirhe -arvo. Kontrolli B:n keskiarvot ovat yli kymmenen eli selvästi suurempia kuin kontrolli A:ssa ja puoli

S01 kontrollissa, joten myös standardivirhe -arvot ovat suurempia. Esimerkiksi kontrolli B:n kaikkien kymmenen kitin standardivirhe -arvo palkissa 1&2 on 0,15, kun taas puoli S01 kontrollissa se on 0,03 ja kontrollissa A 0,04.

Kaikista mittaustuloksista tarkistettiin standardien arvot. Standardien tuli vastata kitin valmistajan määrittämiä pitoisuuksia. Taulukossa 5 on käytettyjen standardien laimennossarjan tunnetut pitoisuudet. Olosuhteet ja mittauslaitteet vaihtelevat eri laboratorioissa, joten pienet vaihtelut standardien arvoissa olivat sallittuja. Standardien laimennossarjan tulokset muodostivat parametrikäyrän, jonka laite piirsi automaattisesti absorbanssin ja konsentraation suhteesta (liite 3). Standardeista tarkistettiin tulosten lisäksi, että standardikäyrän muoto vastasi valittua parametria. Laitte vertasi näytteiden absorbanssia standardikuvaajaan ja laski sen avulla mittaustulokset näytteille. Tämän takia standardien mittaustulosten onnistuminen vaikutti suoraan näytteiden mittaustulosten laatuun.

TAULUKKO 5. Standardien tunnetut pitoisuudet

Standardi	1	2	3	4	5	6	7
Konsentraatio (pmol/l)	0	0,2	0,6	1,8	5	10	20

Toisaalta yhden standardin epäonnistunut mittaustulos ei haitannut, jos yhdenkään näytteen pitoisuus ei vastannut epäonnistuneen standardin arvoa. Esimerkiksi, jos standardi 1 mittaustulos erosi merkittävästi sille määritetystä arvosta, sillä ei ollut merkitystä, jos yhdenkään mitattavan näytteen pitoisuus ei ollut niin matala kuin ensimmäisen standardin. Jos standardin mittaustulos epäonnistui, voitiin tarkastella myös CV prosenttia. Mikäli standardin CV prosentti oli suuri, eikä standardin pitoisuus ollut riittävän lähellä tunnettua tavoitearvoa, oli toinen rinnakkaisnäyte mahdollisesti epäonnistunut. Tällöin voitiin toisen rinnakkaisnäytteen absorbanssitulos poistaa, jotta standardin mittaustulos saatiin lähemmäksi oikeaa arvoa. Taulukossa 6 esitellään tekemiemme levyjen standardien konsentraatiot ja CV prosentti -arvot. Taulukossa on ylärivillä tekemiemme levyjen numerot ja allekkain standardien mittaustulokset ja CV prosentit. STD tarkoittaa standardia. Taulukossa ilman tulosta olevat arvot olivat mittaamattoman pieniä.

TAULUKKO 6. Tekemiemme levyjen standardien konsentraatiot ja CV% -arvot

Levynumero		7	8	24	25	26	27	28	29	30	31
STD1	conc. (pmol/l)	0,0	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-
	CV%	10	2	26	5	15	1	3	2	8	-
STD2	conc. (pmol/l)	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
	CV%	1	17	6	0	15	1	3	7	7	1
STD3	conc. (pmol/l)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
	CV%	6	8	3	0	14	1	17	5	2	5
STD4	conc. (pmol/l)	1,8	1,8	1,8	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8
	CV%	6	11	1	1	2	4	12	0	4	5
STD5	conc. (pmol/l)	4,9	4,9	5,0	4,8	4,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,9
	CV%	1	10	4	4	7	7	2	0	5	3
STD6	conc. (pmol/l)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	CV%	8	6	0	1	5	0	1	0	5	1
STD7	conc. (pmol/l)	20	20	20	20	20	20	20	20	23	20
	CV%	1	2	1	1	3	2	1	1	20	0

Taulukosta 6 näkee, että arvot olivat hyväksyttävissä rajoissa. Yhtä näytettä lukuun ottamatta vaihteluväli tavoitearvosta oli vain +/- 0,2 pmol/l:ssa. Levyn 30 standardi 7 konsentraatio oli hieman korkea, mutta biokemistin mukaan se oli silti hyväksyttävissä rajoissa. Saman standardin CV prosentti oli myös korkea, joten absorbanssiltaan korkeamman rinnakkaisnäytteen olisi voinut poistaa,

mutta se olisi ollut tarpeetonta, sillä yksikään näyte levyllä 30 ei ollut yhtä väkevä kuin standardi 7. Osassa standardinäytteistä CV prosentit olivat myös korkeahkoja, kuten levyllä 24 standardi 1, mutta niillä ei ollut merkitystä, sillä konsentraatiot olivat kuitenkin lähellä tavoitearvoja. Levyllä 31 standardi 1:n toisen rinnakkaisnäytteen absorbanssi oli liian korkea, joten se poistettiin, koska se olisi nostanut standardi 1:n konsentraatiota liikaa. Tämän vuoksi CV prosentti puuttuu kyseiseltä standardilta taulukosta, sillä toisen rinnakkaisnäytteen absorbanssia ei ollut.

Tuloksista tarkastelimme standardien ja kontrollien lisäksi potilasnäytteiden CV prosentteja. Teke-
mistämme 380 näytteestä noin kahdessakymmenessä rinnakkaisnäytteessä, eli viidessä prosen-
tissa, oli CV prosentti yli 20. Korkeiden CV prosenttien määrissä ei ollut huomattavia eroja eri teki-
jöiden valmistamissa näytteissä. Toisella kerralla tehdyissä näytteissä korkeiden CV prosenttien
määrä oli suurempi kuin muilla kerroilla. Tämän arvioitiin johtuvan siitä, ettei näytteitä oltu sulatettu
ja annettu temperoitua huoneenlämpöön huolellisesti. Myös projektin muun henkilökunnan teke-
missä näytteissä korkeiden CV prosenttien arvioitiin johtuvan huolimattomasta sulatuksesta tai se-
koituksesta ennen pipetointia. Näytteet, joiden CV prosentti oli yli 25, uusittiin. Uusinta-analyyseissä
näytteet sulatettiin ja sekoitettiin kunnolla, jolloin CV prosentit pienenevät huomattavasti.

Projektin alussa automaattinen pesulaite ei toiminut täysin normaalisti, sillä se annosteli kaivoihin
pesupuskuria vain puolet siitä määrästä, mitä olisi pitänyt. Liian vähäisellä pesupuskurin käytöllä
olisi saattanut olla vaikutusta siihen, että näytteiden ylimääräiset komponentit eivät huuhtoutuneet
kunnolla. Ylimääräiset komponentit haittaavat näytteiden mittausta ja saattavat antaa vääriä tulok-
sia. Levyjen 1-8 pesut suoritettiin väärällä pesupuskuritulavuudella. Lopulta automaattipesuri hajosi
kokonaan ja osa levyistä pestiin manuaalisesti pipetoimalla. Pesurin korjaamisen jälkeen loput levyt
pestiin automaattipesurilla.

Halusimme varmistua, vaikuttiko pesurin annostelevä väärä tilavuus näytteiden tuloksiin vertaa-
malla levyjen 1-8 tuloksia loppupään levyjen 28-35 tuloksiin. Vertasimme levyistä kontrollien tulok-
sia sekä näytteiden CV prosentteja. Tarkastelimme, oliko alkupään levyjen näytteissä enemmän
suuria CV prosentti eroja kuin loppupään levyjen näytteissä. Levyjen 1-8 kontrollit olivat sallituissa
rajoissa. Kontrolli A:n tulokset vaihtelivat välillä 2,7-3,2 pmol/l. Kontrolli B:n tulokset olivat välillä
9,1-12,1 pmol/l. Lisäksi näytteitä, joiden CV prosentti ylitti kaksikymmentä, oli 20. Levyissä 28-35
kontrolli A:n tulokset olivat 3,1-3,2 pmol/l sekä kontrolli B:n 9,9-12,4 pmol/l. Kahdenkymmenen ylit-

täviä CV prosentteja oli 23 kappaletta. Tulokset eivät poikenneet toisistaan merkittävästi, eikä kontrollien tulosten vaihteluvälikään ollut suuri. Tämän perusteella automaattipesurin väärällä annostelulla ei ollut merkitystä tuloksiin.

Edellisten analyysien pohjalta tulosten toistettavuus ja laatu olivat riittävää. Standardien ja kontrollien tuloksissa ei ollut merkittäviä poikkeamia. Kontrollinäytteiden tulokset pysyivät tavoitearvoissa sekä ylimääräisenä kontrollina käyttämämme puuli S01 kontrollin vaihteluväli oli todella pieni. Lisäksi standardien arvot olivat hyvin lähellä valmistajan määrittämiä arvoja.

Suuria CV prosentteja eli eroja rinnakkaisnäytteiden välillä oli jonkin verran. Kitin työohjeen mukaan alle kymmenen prosentin CV arvot olivat hyviä, mutta projektissa uusittiin vain näytteet, joiden CV prosentti oli yli 25. Tarkastelimme analysoimiamme 380 näytettä, joista 5 % ylitti CV prosentin 20. Lisäksi vertailimme neljän eri tekijän alku- ja loppupään levyjen arvoja, joita oli tehty myös eri päivinä. Levyissä oli tulokset yhteensä 618 näytteestä, joissa 7 % näytteistä ylitti CV prosentin 20. Prosentuaalisesti suurien CV arvojen määrä oli kuitenkin melko pieni.

7 POHDINTA

Tekemämme kymmenen kittiä onnistuivat hyvin vertailemienne tulosten perusteella. Tekemistämme 380 näytteestä seitsemässä oli CV prosentti yli 25, joten ne jouduttiin uusimaan. Todennäköisesti korkeat CV prosentti -arvot johtuivat näytteiden vähäisestä sulatuksesta tai sekoituksesta, jolloin näytteet saattoivat sakkautua ja pitoisuudet muuttua. Tulosten tarkastelun ja osallistuvan havainnoinnin perusteella työprojektissa onnistuttiin muilta osin vakioimaan työvaiheet niin, että eri henkilöt suorittivat työt samalla tavalla, samoissa olosuhteissa ja samoilla menetelmillä. Ainoastaan alussa automaattisen pesulaitteen viallisuus aiheutti variaatiota työvaiheissa, jolloin pesuvaiheessa pesupuskurin tilavuudet olivat puolet siitä, mitä työohjeen mukaan olisi pitänyt olla. Pesulaitteen rikkoutumisen jälkeen pesut suoritettiin ohjeen mukaisilla tilavuuksilla ensin manuaalisesti pipetoinnalla ja automaatin korjauksen jälkeen automaattisella pesulaitteella. Tuloksia tarkastellessa kuitenkin huomattiin, että pesulaitteen väärällä pesupuskurin annostelulla ei ollut vaikutusta tuloksiin.

Opinnäytetyössä pyrimme saamaan vastaukset seuraaviin kysymyksiin: Miten varmistetaan näytteenkäsittelyn ja mittaustulosten yhteneväisyys ja tulosten tarkkuus, kun käsitellään ja mitataan suuria näytemääriä eri päivinä eri henkilöiden toimesta? Millä perusteilla tuloksia voidaan pitää luotettavina? Ovatko tulokset luotettavia?

Mittaustulosten tarkkuuden ja toistettavuuden varmistamiseen käytettiin laadunvarmistuksen menetelmiä, kuten standardeja, kontroleja sekä rinnakkaisnäytteiden vertailua. Projektin aikana pyrittiin käyttämään samoja työskentelytapoja. Havainnoimme mahdollisia virheitä tutkimuksen aikana, joilla olisi voinut olla vaikutusta mittaustuloksiin. Virheet tiedostamalla niitä pystyttiin myös välttämään projektissa. Osallistuva havainnointi analysointimenetelmänä oli joustavaa, sillä suoritimme havainnointia projektin teon yhteydessä. Menetelmänä havainnointi sopi työvaiheiden arviointiin.

Tulosten luotettavuutta arvioitiin standardien, kontrollien ja rinnakkaisnäytteiden avulla. Standardeista ja kontroleista varmistimme, että ne vastasivat kitin valmistajan määrittämiä tavoitearvoja. Kontrollien avulla vertailimme eri henkilöiden eri päivinä tehtyjä mittaustuloksia. Rinnakkaisnäytteiden CV prosenttien avulla arvioimme mittausten onnistumista. Tuloksia ei voitu pitää luotettavina, jos rinnakkaisnäytteissä oli korkeita CV prosentteja. Näytteet, joiden CV prosentti oli yli 25, uusittiin.

Arvioinnin ja vertailun perusteella tuloksia voitiin pitää luotettavina. Lisäksi havaitsimme, että eri päivinä ja eri henkilöiden tekemien mittaustulosten välillä ei ollut merkittäviä eroja. Kontrollien tuloksissa ei ollut suuria eroja. Mittauksissa oli siis onnistuttu toistettavuudessa ja työtapojen erojen minimoimisessa. Toisaalta rinnakkaisnäytteitä, joiden CV prosentti oli yli 20, oli jonkun verran ja osa näytteistä jouduttiin uusimaan. Laadunarviointituloksemme pohjautuivat luotettavalla menetelmällä mitattuihin numeerisiin arvoihin, joten johtopäätöksemme laadusta perustuivat todellisiin lukuihin ja näin niitä voidaan pitää luotettavina.

Opinnäytetyömme oli ajankohtainen, sillä luotettavuuden sekä mittaustulosten toistettavuuden arviointi on aina tärkeä aihe tutkimustyössä ja kliinisessä laboratoriotyössä. Lisäksi työ oli monipuolinen, sillä se sisälsi itsenäistä projektiluontoista laboratoriotyöskentelyä sekä työskentelyn ja tulosten arviointia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tulosten ja analysointiprosessin luotettavuuden sekä laadun varmistaminen. Tavoitteena oli perehtyä siihen, kuinka varmistetaan näytteiden käsittelyn ja mittausolosuhteiden yhteneväisyys sekä tulosten tarkkuus isoja näytemääriä käsiteltäessä. Lisäksi tutkimusta ja mittauksia tekivät useat eri henkilöt eri päivinä, joten arvioimme myös, kuinka nämä vaikuttivat mittaustuloksiin. Havainnoimme laatua ja toistettavuutta projektin edetessä sekä tulosten analysointivaiheessa. Tuloksia tarkastelimme toistettavuuden ja tarkkuuden näkökulmasta. Näytteiden analysointimenetelminä olivat manuaalinen ELISA -menetelmä sekä spektrofotometria. Laadunarviointimenetelmänä käytimme osallistuvaa havainnointia.

Opinnäytetyön tilaaja oli ValiFinn, josta saimme valmiiksi rajatun aiheen. Työn edetessä otimme huomioon tilaajan erityistoiveet opinnäytetyöstä, sekä olimme jatkuvasti yhteydessä tilaajaan. Tilaaaja myös hoiti työstä aiheutuneet kustannukset, kuten kitit ja muut tarvikkeet, joten kustannusylitykset eivät vaikuttaneet opinnäytetyöhömmme. Lisäksi saimme aina tarvittaessa ohjausta, mikä auttoi meitä muun muassa pysymään aikataulussa.

ELISA -menetelmää olimme käyttäneet aikaisemminkin ja periaate oli meille tuttu. Opinnäytetyön myötä perehdyimme aiheeseen syvemmin. Sen sijaan FGF23 proteiinista ja laadunarvioinnin periaatteista meillä ei ollut aikaisempaa tietämystä. Nykyään erityisesti laaduntarkkailuun on laboratoriotyössä kiinnitetty paljon huomiota ja se on tärkeä osa laboratoriotyötä. Tämän vuoksi opinnäytetyömme aihe oli tärkeä ja kehityimme työtä tehdessä juuri laadunarvioinnissa. Opimme, miten laadunarvioinnin periaatteita voidaan soveltaa ja millä perusteilla tulosten luotettavuutta arvioidaan kliinisessä laboratoriotyössä.

Itsenäisessä käytännön laboratoriotyöskentelyssä vaadittavat taidot kehittyivät ja varmuus oman työn tekemiseen kasvoi, sillä työ sisälsi paljon huolellista työskentelyä vaativia työvaiheita ja pienten tilavuuksien pipetointia. Työ kehitti myös itsenäisiä ongelmanratkaisutaitoja sekä kykyä suunnitella ja aikatauluttaa töitä järkevästi. Onnistuimme suunnittelemaan työt niin, että pysyimme aikataulussa. Lisäksi kittejä tehdessä suunnittelu oli erityisen tärkeää, sillä työvaiheet olivat ajallisesti rajoitettuja, joten muun muassa esivalmistelut piti suunnitella tarkasti.

Kokonaisuudessaan työ oli kiinnostava ja kehittävä, koska projektin edetessä ammatillinen osaamisemme ja tietopohjamme aiheeseen kasvoi. Työssämme varmistimme isoon kansainväliseen tutkimukseen vaikuttavien tulosten luotettavuuden. Työ oli siis tärkeä osa isoa kokonaisuutta. Vaikka laadunarviointi keskittyi vain yhteen projektiin ja analysointimenetelmään, voidaan laadunarviointiperiaatteita soveltaa myöhemmin myös muissa kliinisissä laboratoriotöissä.

LÄHTEET

Biohit Oyj 2016. Biohit Proline pipettien huolto-ohje. Helsinki.

Biomedica Immunoassays 2016. FGF23 (C-terminal). Instruction for use. Viitattu 24.3.2016, http://www.bmgrp.com/fileadmin/user_upload_immunoassays/downloads/IFU/BI-20702_FGF23_ELISA_IFU.pdf.

Deger, S. M., Deric, U. B., Erten, Y., Onec, K., Pasaoglu, H., Pasaoglu, O. T. & Reis, K. A. 2012. The effects of iron on FGF23-mediated Ca-P metabolism in CKD patients. Viitattu 9.5.2016, https://www.researchgate.net/publication/233770027_The_effects_of_iron_on_FGF23-mediated_Ca-P_metabolism_in_CKD_patients.

Dittmer, K. & Hardcastle, K. 2015. Fibroblast Growth Factor 23; A New Dimension to Diseases of Calcium-Phosphorus Metabolism. *Veterinary Pathology* 52 (5), 770–784. Viitattu 20.3.2016, <http://vet.sagepub.com/content/52/5/770.full.pdf+html>.

Ehder, T. 2005. Kemia metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta. Helsinki, Mikes. Viitattu 23.3.2016, http://www.metrologia.fi/mikes/Julkaisut/2005/j6_05_b5_nettiin.pdf.

Eurachem-Suomen laadunvarmistussanastotyöryhmä 1997. Analyttisen ja kliinisen kemian laadunvarmistussanasto. Helsinki: Eurachem-Suomi.

Fukumoto, S. 2008. Physiological Regulation and Disorders of Phosphate Metabolism; Pivotal Role of Fibroblast Growth Factor 23. *Inter Med* 47, 337–343. Viitattu 9.5.2016, https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/47/5/47_5_337/_pdf.

Halonen, T. 2004a. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 90–100.

Halonen, T. 2004b. Fotometriset menetelmät. Teoksessa I. Penttilä (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 66–76.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Huslab 2016. Fibroblastikasvutekijä-23, plasmasta. Viitattu 20.3.2016, http://huslab.fi/cgi-bin/ohje-kirja/tt_show.exe?assay=9468&terms=fgf.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.

Koski A-M. 2013. Hypokalsemia, hypoparatyreoosi ja D-vitamiinin puute. Terveysportti. Viitattu 20.3.2016, http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00579&p_haku=fgf23.

Labquality Oy 2016. Kontrollit, vakiot ja referenssimateriaalit. Viitattu 23.3.2016, <http://www.iqas.fi/kontrollit-vakiot-ja-referenssim/>.

NC State University 2004. Graphing Resources. Viitattu 18.4.2016, <https://www.ncsu.edu/labwrite/res/gt/gt-stat-home.html>.

Peda.net 2013. Mikä on projekti? Viitattu 28.3.2016, <http://www.peda.net/veraja/jko/opintokokonaisuudet/pr/luokka/projekti>.

Salmivaara, J. 2016. Laboratoriojohtaja, biokemisti, ValiFinn. Haastattelu 9.5.2016.

Sinervo, T. 2011. Miten varmistaa laboratoriotoininnan hyvä laatu nyt ja tulevaisuudessa. FINAS -akkreditointipalvelu. Viitattu 21.3.2016, http://www.labquality.fi/@Bin/2306799/Tuija+Sinervo_Jatkuva+para.

Suomen Standardoimisliitto SFS ry 2000. SFS –EN ISO/ IEC 17025. Testaus ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset. Helsinki.

Suomen Standardisoimisliitto SFS ry 2016. Johdanto laadunhallinnan ISO 9000 –standardeihin. Viitattu 21.3.2016, http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:hGrY7OIRW6QJ:www.sfsedu.fi/files/126/ISO_9000_kalvosarja_oppilaitoksille_2016.ppt+&cd=3&hl=fi&ct=clnk&gl=fi.

Thermo Scientific 2015. Good Laboratory Pipetting Guide. Viitattu 26.3.2016, <http://www.pipettecalibration.net/pipette-calibration-files/guide-to-pipetting-2.pdf>.

ValiFinn 2016. Tietoa yrityksestä. Viitattu 24.3.2016, <http://valifinn.com/etusivu/>.

LIITTEET

Liite 1. Pipetointikaaviopohja

Liite 2. Esimerkkitulokset levytä 31

Liite 3. Standardikuvaaja

pvm/tekijä: _____

Testin nimi: F&F-23 (C-TERMINAALINEN)

LOT: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1		CTRL B									
B	STD 2		PULLI 501									
C	STD 3											
D	STD 4											
E	STD 5											
F	STD 6											
G	STD 7											
H	CTRL A											

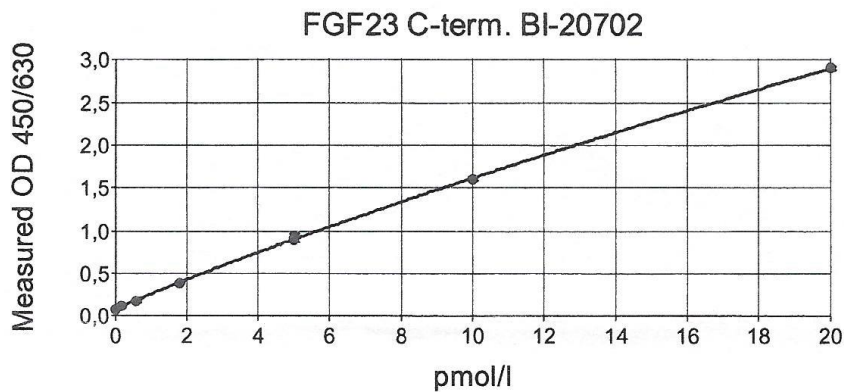
-pipetointikaavio-

Group	Wells	Absorbance @ 450 (0.1s)	Concs.	Dilutions	%CV	Dilution
Standard1	A2	0,0823628	-	-	-	-
Standard2	B1, B2	0.116703, 0.115018	0,166836	0,166836	1,03	-
Standard3	C1, C2	0.198233, 0.213295	0,654157	0,654157	5,18	-
Standard4	D1, D2	0.438924, 0.468008	1,83637	1,83637	4,54	-
Standard5	E1, E2	1.06001, 1.1	4,91221	4,91221	2,62	-
Standard6	F1, F2	1.90917, 1.89479	10,0876	10,0876	0,53	-
Standard7	G1, G2	2.85514, 2.85311	19,9589	19,9589	0,05	-
Control1	H1, H2	0.733279, 0.696765	3,07216	3,07216	3,61	-
Control2	A3, A4	1.93054, 2.00993	10,6182	10,6182	2,85	-
Control3	B3, B4	0.215442, 0.248585	0,784619	0,784619	10,1	-
10461-0	C3, C4	0.258074, 0.234568	0,85514	0,85514	6,75	1
10464-0	D3, D4	0.294752, 0.315423	1,13853	1,13853	4,79	1
10465-0	E3, E4	0.23971, 0.245782	0,83783	0,83783	1,77	1
10485-0	F3, F4	0.117768, 0.107967	0,147618	0,147618	6,14	1
10488-0	G3, G4	0.189398, 0.229637	0,672249	0,672249	13,58	1
10497-0	H3, H4	0.14773, 0.152617	0,364266	0,364266	2,3	1
10500-0	A5, A6	0.14491, 0.144247	0,333549	0,333549	0,32	1
10501-0	B5, B6	0.220403, 0.25207	0,805483	0,805483	9,48	1
10526-0	C5, C6	0.150858, 0.195361	0,484822	0,484822	18,18	1
10527-0	D5, D6	0.101385, 0.130433	0,162724	0,162724	17,72	1
10530-0	E5, E6	0.106446, 0.156671	0,253065	0,253065	27	1
10534-0	F5, F6	0.140301, 0.174185	0,401084	0,401084	15,24	1
10538-0	G5, G6	0.141359, 0.190725	0,446802	0,446802	21,02	1
10540-0	H5, H6	0.129785, 0.123718	0,232165	0,232165	3,38	1
10542-0	A7, A8	0.159613, 0.152105	0,395083	0,395083	3,41	1
10546-0	B7, B8	0.154742, 0.151137	0,379342	0,379342	1,67	1
10547-0	C7, C8	0.151624, 0.187329	0,466371	0,466371	14,9	1
10548-0	D7, D8	0.112787, 0.100572	0,106789	0,106789	8,1	1
10550-0	E7, E8	0.268907, 0.237397	0,888337	0,888337	8,8	1
10553-0	F7, F8	0.154008, 0.140416	0,347771	0,347771	6,53	1
10555-0	G7, G8	0.221866, 0.190376	0,655502	0,655502	10,8	1
10559-0	H7, H8	0.175647, 0.1789	0,508521	0,508521	1,3	1
10567-0	A9, A10	0.16472, 0.155314	0,41739	0,41739	4,16	1
10568-0	B9, B10	0.40135, 0.378335	1,53863	1,53863	4,17	1
10569-0	C9, C10	0.231131, 0.225918	0,767844	0,767844	1,61	1
10575-0	D9, D10	0.18977, 0.181512	0,551792	0,551792	3,15	1
10578-0	E9, E10	0.138438, 0.142985	0,312005	0,312005	2,28	1
10580-0	F9, F10	0.137127, 0.131106	0,274736	0,274736	3,17	1
10585-0	G9, G10	0.213272, 0.208397	0,679768	0,679768	1,63	1
10602-0	H9, H10	0.203485, 0.179871	0,582414	0,582414	8,71	1
10604-0	A11, A12	0.202942, 0.214045	0,667957	0,667957	3,77	1
10609-0	B11, B12	0.184387, 0.193128	0,567806	0,567806	3,27	1
10610-0	C11, C12	0.132789, 0.138528	0,283514	0,283514	2,99	1
10616	D11, D12	0.330149, 0.308709	1,20674	1,20674	4,75	1
10631	E11, E12	0.180905, 0.184896	0,5377	0,5377	1,54	1
10637	F11, F12	0.270213, 0.259872	0,946356	0,946356	2,76	1
10642	G11, G12	0.211935, 0.197519	0,648939	0,648939	4,98	1
10660	H11, H12	0.143561, 0.143999	0,329128	0,329128	0,22	1

Quality Control Protocol FGF23 (C-terminal) multi-matrix ELISA

Kit Lot GF-153C Abl./Exp. 2016-11

Control A: 3.8 pmol/l (3.8 +/- 1.1 pmol/l)
Control B: 10.7 pmol/l (10.7 +/- 3.2 pmol/l)



4 Parameter	A	B	C	D	R2
$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$	0.0749	0.932	245	32.1	0.9999

Std	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	conc. [pmol/l]
1	0.079	0.079	0.079	0%	0
2	0.128	0.118	0.123	6%	0.2
3	0.191	0.168	0.180	9%	0.6
4	0.349	0.396	0.395	0%	1.8
5	0.958	0.880	0.919	6%	5
6	1.626	1.596	1.611	1%	10
7	2.889	2.914	2.902	1%	20

For Production: *Pell...*

For quality assurance: *[Signature]*

December 21, 2015