

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutus
2021

Johannes Rantanen

XPRT BCR-ABL ULTRA (CE- IVD) -MENETELMÄN VALIDOINTI

Johannes Rantanen

XPert BCR-ABL ULTRA (CE-IVD) -MENETELMÄN VALIDOINTI

Tämä opinnäytetyö on tehty yhteistyössä Turun yliopistollisen keskussairaalan (Tyksin) genomiikan osaston kanssa ja sen tavoitteena on auttaa osastoa siirtymään kroonisen myelooiden leukemian jäännöstautianalytiikassa käytettävästä LDT TaqMan-PCR-tekniikkaa hyödyntävästä menetelmästä uuteen Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmään. Uusi Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmä lyhentää tulosten vastaamisaikaa muutamaan päivään, kun taas vanhalla menetelmällä se saattoi kestää viikon. Tässä opinnäytetyössä raportoidaan Cepheidin Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmällä ajetut laitevalmistajan MMQCI-validointinäytteistä saadut tulokset.

Krooninen myeloinen leukemia (KML) on kantasolujen syöpäsairaus, valkosolujen määrä verenkuvassa nousee ja verisolut eivät kypsy kunnolla. Tämä johtuu kromosomien 9 ja 22 translokaation seurauksena syntyneestä BCR-ABL fuusio geenistä, joka aiheuttaa verisolujen ja niiden esiasteiden tyrosiinikinaasiaktiivisuuden kohoamisen. Vuodessa KML:ään sairastuu n. 50 ihmistä ja diagnoosin jälkeen he aloittavat tyrosiinikinaasin estolääkityksen, jonka jälkeen hoitovastetta seurataan. Jäännöstautianalytiikkaa seurataan siihen suunnitelluilla menetelmillä ensin 3kk ja sitten 6kk välein. Tavoitteena oli siirtyä vanhasta LDT TaqMan-PCR-menetelmästä uuteen Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmään.

Laitevalmistajalta saadut MMQCI-validointinäytteet ajettiin, tulokset tilastoitiin ja niistä laskettiin tilastollisin menetelmin keskiarvo, suhteellinen virhe, systemaattinen virhe, kertaluokkaero, keskihajonta, variaatiokerroin ja mittausepävarmuus. Saatuja arvoja verrattiin laitevalmistajalta saatuihin arvoihin, joiden perusteella voidaan todeta MMQCI-näytteillä tehdyn validoinnin hyväksyminen.

Tyksin genomiikan osasto siirtyi uuteen Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmään heinäkuussa 2020.

ASIASANAT:

KML, Krooninen myeloinen leukemia, BCR-ABL, Xpert BCR-ABL Ultra

Johannes Rantanen

XPert BCR-ABL ULTRA (CE-IVD)-METHOD VALIDATION

This thesis has been made in by co-operation with the Turku University Hospital (Tyks) genomic department and the target was to help the department to switch the old LDT TaqMan-PCR -method into a new Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -method which is used to monitor the BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia patients. The new Xpert BCR-ABL ultra (CE-IVD) -method shortens the diagnostic respond time from one or two weeks to only a few days. This thesis reports the results of manufacturers MMQCI-validation samples which are run with the Cepheid Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -method.

Chronic myeloid leukemia is a cancer of stem cells which increases the leukocyte volume in blood count and the blood cells do not mature properly. This is a result from translocation of chromosomes 9 and 22: this translocation creates the BCR-ABL fusion gene, which causes the increased tyrosine kinase activation in the blood cells and their precursors. Approximately 50 people are diagnosed with CML in a year. After having got the diagnosis, they start a tyrosine kinase inhibitor medication, and their residual disease is monitored. Monitoring the residual disease is made with appropriate methods and its frequency is at first 3 months and then 6 months. The target of the study was to switch from the old LDT TaqMan-PCR -method to the new Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -method.

The MMQCI-validation samples from the manufacturer were run with the new method, statistics were made from the results and mean, systematic error, relative error, order of magnitude difference, standard deviation, coefficient of variation and uncertainty were calculated with statistic methods. The results were compared to manufacturer's reference values and based on these values the conclusion was that the validation with manufacturer's MMQCI-validation samples was verified.

Tyks genomic department accepted and switched to the new Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -method in July of 2020.

KEYWORDS:

CML, Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL, Xpert BCR-ABI Ultra

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 KESKEISET KÄSITTEET	9
2.1 Krooninen myeloinen leukemia ja taudin diagnosointi	9
2.2 BCR-ABL jäännöstautianalytiikka ja hoidon seuranta	11
2.3 Kroonisen myelooisen leukemian hoito	11
2.4 In vitro-diagnostiikka (IVD)	12
2.5 Aikaisemmat tutkimukset	13
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	16
4 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	17
4.1 Opinnäytetyön toteutus	17
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	19
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	20
5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	22
5.1 Tulokset	22
5.2 Täsmävyys	26
5.3 Toistettavuus	26
5.4 Mittausepävarmuus	27
5.5 Menetelmät	28
6 POHDINTA	30
LÄHTEET	32

KUVAT

Kuva 1. Laitevalmistajalta saatujen MMQCI-validointinäytteiden tulokset ja tarvittavat laskut. Mittausepävarmuus 36%.	24
Kuva 2. Lineaarinen regressiokuvaaja odotettu vs. havaittu BCR-ABL 0,0032 - 10%.	25
Kuva 3. Eri paneelista olevien MMQCI-validointinäytteiden 1%, 0,1% ja 0% tulokset kolmen eri pipetoijan ajamana. Mittausepävarmuus 17%.	25
Kuva 4. Lineaarinen regressiokuvaaja odotettu vs. havaittu BCR-ABL 0%, 0,1% ja 1%.	26
Kuva 5. Mittausepävarmuuden laskeminen. (Tykslab Laatukäsikirja. 2020)	27

1 JOHDANTO

Krooninen myeloinen leukemia (KML) on luuytimessä muodostuvien kantasolujen syöpäsairaus, joka vaikuttaa verisolujen tuotantoon. Kromosomien 9 ja 22 välisen translokaation seurauksena syntyy niin sanottu Philadelphia-kromosomi (Ph-kromosomi) ja BCR-ABL -fuusiogeeni, joka aiheuttaa pysyvän ABL tyrosiinikinaasiaktiivisuuden kohoamisen, joka johtaa veren valkosolujen määrän nousuun. (Salonen, 2019; Cumbo ym. 2019.) Hoitamattomana KML potilaille kehittyy blastikriisi, joka on akuuttia leukemiaa muistuttava tila. Useimmat potilaat, jotka ovat saaneet taudin alkuvaiheessa hoitoa, saavuttavat pitkän remissiovaiheen. (Hasserjian, 2012, 3.)

Hoitona KML:ään on tyrosiinikinaasiestäjä Imatinibi, joka on täsmälääke ja sillä on hyvä hoitovaste (Ross & Hughes 2004, 12-19). Ensimmäisenpolven tyrosiinikinaasin estäjä Imatinib tuli markkinoille vuonna 1998, joka oli merkittävä askel KML:n hoidossa. Tämän lääkkeen ansiosta potilaat voivat elää tavallista elämää, ilman että KML vaikuttaa elinikään. (Koskenvesa ym. 2017, 14-15.)

Lääkityksen aloittamisen jälkeen veriarvoja seurataan verikokein 1-2 viikon välein puoli vuotta ja kuuden hoitokuukauden jälkeen kerran kuukaudessa. Kolmen ensimmäisen hoitokuukauden aikana soluarvot saattavat laskea, mutta palautuvat luuydintuotannon normalisoituessa 3-4 kuukauden jälkeen. Veressä olevien valkosolujen määrä normalisoituu yleensä 3-4 viikon kuluttua hoidon aloittamisesta. Kun arvot ovat vakiintuneet, seuranta tehdään kolmen kuukauden välein. (Koskenvesa ym. 2017, 19-20.)

Diagnoosin ja hoidon aloittamisen jälkeen hoitovasteen seuranta tapahtuu määrittämällä BCR-ABL-fuusiogeenin lähetti-RNA:n määrä veressä RT-qPCR-tekniikalla (Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction). Tämä menetelmä on luotettava ja herkkä taudin seurannassa. Hoitovastetta seurataan verestä tehtävällä PCR:llä ensin kolmen kuukauden välein, kun vaste on tavoitearvoissa, seuranta tehdään kuuden kuukauden välein. Fuusiogeenin tuottaman RNA:n määrää vertaillaan veressä normaalisti esiintyvän geenin eli kontrolligeenin tuottaman RNA:n määrään. (Ruutu ym. 2007, 325-326.)

Tämä on kvantitatiivinen toiminnallinen opinnäytetyö solu- ja molekyylibiologiaan liittyen. Tämän opinnäytetyön aihe on Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -menetelmän validointi MMQCI-validointinäytteillä Tyksin (Turun yliopistollinen keskussairaala) genomiikan vastuualueelle. Menetelmää käytetään KML:n jäännöstautianalytiikassa. Tämän opinnäytetyön tarkoitus on ajaa laitevalmistajan toimittamat MMQCI-validointinäytteet Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -kitillä ja saada validointi onnistuneesti läpi. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on auttaa Tyksin genomiikan vastuualueetta siirtymään vanhasta, paljon manuaalista työtä vaativasta TaqMan-PCR-tekniikkaa hyödyntävästä LDT (Laboratory Developed Test, suom. Laboratoriossa kehitetty testi) menetelmästä uuteen, tehokkaampaan Gene Xpert-laitteella tehtävään Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) -menetelmään. Siirtyminen vanhasta menetelmästä uuteen nopeutuu näytteiden läpimenoaika laboratoriossa. Uusi menetelmä vapauttaa henkilöstöä muihin tehtäviin, koska laitteisto tekee lyhyen esivalmistelun jälkeen eristys-, synteesi- ja PCR-vaiheet automaattisesti. Hoitovastetta seurataan verestä tehtävällä PCR:llä kolmesta kuuteen kuukautta kuukauden välein vasteesta riippuen (Koskenvesa ym. 2017, 19). Potilasnäytteitä tulee laboratorioon analysoitavaksi viikoittain ja vanhalla menetelmällä näytteiden läpimenoaika on suhteellisen hidas.

2 KESKEISET KÄSITTEET

2.1 Krooninen myeloinen leukemia ja taudin diagnosointi

Krooninen myeloinen leukemia (KML) on luuytimessä muodostuvien kantasolujen syöpäsairaus, joka vaikuttaa verisolujen tuotantoon. Tauti etenee hitaasti ja ilmenee neutrofiilien lisääntymisenä verenkuvassa. KML:ään sairastuu vuosittain noin 50 ihmistä, taudin puhkeamisen syytä ei tunnetta tarkasti. Taudin kehityksen vaiheet tunnetaan kuitenkin erittäin hyvin. (Salonen, 2019.)

Kromosomien 9 ja 22 välillä kaksi geeniä yhdistyvät väärin, jolloin syntyy niin kutsuttu philadelphia-kromosomi ja BCR-ABL1 fuusiogeeni. Kromosomissa 9 sijaitseva ABL1-geeni ja kromosomissa 22 sijaitseva BCR-geeni muodostavat BCR-ABL1 –fuusiogeenin. (Salonen, 2019; Cumbo ym. 2019). Tämä fuusiogeeni aiheuttaa tyrosiinikinaasiaktiivisuuden kohoamisen, joka johtaa veren valkosolujen määrän nousuun (Cortes ym 2005, 1306; Cumbo ym. 2019). Todetussa leukosytoosissa neutrofiilien määrä kohoaa ja havaitaan myös vasemmalle siirtymä granulopoeesissa eli verisolut eivät kypsy normaalisti (Koskenvesa 2019).

Suurin osa potilaista ovat oireettomia ja heillä KML todetaan peruslaboratoriotestien yhteydessä (Salonen, 2019). Kromosomitutkimuksella voidaan todeta Ph-kromosomi luuydin- tai verinäytteestä ja PCR:llä samoista näytetyypeistä voidaan etsiä BCR-ABL1 fuusiogeeniä diagnoosivaiheessa. Myös hoidon seurannassa käytetään PCR-menetelmää, jolla tutkitaan BCR-ABL1 fuusiogeenin määrää veressä lääkkeen aloittamisen jälkeen. (Ruutu ym 2007, 326.) Hoitamattomana KML potilaille kehittyy blastikriisi, joka on akuuttia leukemiaa muistuttava tila. Useimmat potilaat, jotka ovat saaneet taudin alkuvaiheessa hoitoa, saavuttavat pitkän remissiovaiheen. (Hasserjian, 2012, 3.)

Yhtenä hoitoina KML:ään on tyrosiinikinaasin estäjä imatinibi, joka on täsmälääke ja sillä on hyvä hoitovaste (Ross & Hughes 2004, 12-19).

Diagnoosi voidaan tehdä osoittamalla Ph-kromosomi G-raita tai FISH-menetelmillä sekä käyttämällä molekyylibiologista menetelmää eli PCR:ää. Veren tai luuytimen soluista tehtävä G-raitatutkimus osoittaa Ph-kromosomin yleisimmän translokaation t(9;22)(q34;q11), joka on noin 90%:lla tai vaihtoehtoisen translokaation, joka on noin

10%:lla potilaista. Jos Ph-kromosomia ei saada näkyviin G-raitatutkimuksella, BCR-ABL-fuusiogeeni voidaan osoittaa PCR-tekniikalla mahdollisimman laajaa alukevalikoimaa käyttäen. Joissain tapauksissa translokaatiossa voi olla jokin kolmas kromosomi mukana, mutta BCR-ABL-fuusiogeeni voidaan silti osoittaa normaalisti. Taudin alkuvaiheilla noin 15%:lle potilaista syntyy submikroskooppinen häviämä kromosomissa 9, joka lisää alttiutta taudin transformaation. (Ruutu ym. 2007, 325-326.)

Verenkuvassa oireinen tauti ilmenee valkosolujen määrän nousulla eli valkosoluja on veressä $100-500 \times 10^9/l$. Lievä anemia havaitaan, kun määrä ylittää $150 \times 10^9/l$. Punasolut ovat normokromisia, normosyyttisiä ja niiden elinikä on lyhentynyt. Valkosolut ovat enimmäkseen neutrofilejä, kypsiä tai lähes kypsiä ja liuska- tai sauvatumaisia. Osa valkosoluista on epäkypsiä ja näin ollen verestä voidaan havaita blasteja, promyelosyyttejä, myelosyyttejä ja metamyelosyyttejä. Noin kolmasosalla potilaista todetaan myös trombosytoosi. (Ruutu ym. 2007, 326.)

Luuydinnäytteessä nähdään myelooisia soluja ja rasvan osuus on vähentynyt sekä fibroosia eli sidekudoksen lisääntymistä on havaittavissa osalla potilaista. Suhde myelooisten ja erytrooisten solujen välillä on 25:1, kun normaalisti se on 2-5:1. Taudin edetessä blastien määrä luuytimessä nousee 5%:sta jopa 20%:iin, jolloin puhutaan blastikriisistä. (Ruutu ym. 2007, 326.)

Kontrolligeeneinä voidaan käyttää *GUSB* tai *ABL1*. Tulos esitetään prosenttilukuna, logaritmisena vähenemänä ja MR (Molecular Response) -luokkana. Laboratoriokohtaisten korjauskertoimien avulla tuloksia voidaan vertailla eri laboratorioden välillä. Laboratoriokohtainen korjauskerroin mahdollistaa vertailun kansainvälisellä IS-asteikolla (International Scale). Tulosta voidaan vertailla myös lähtötasoon, jolloin käytetään logaritmiasteikkoa ja MR-luokkia. Kolmen hoitokuukauden jälkeen tavoitetulos on <10 prosenttia, kuuden kuukauden jälkeen hoitotavoite on MR2(<1,0%) ja 12 kuukauden jälkeen tavoitellaan MR3(<0,1%). MR-luokkia tulisi käyttää kuvaamaan hoidon toimivuutta ja sairaudessa tapahtuvia muutoksia. MR3-tason saavuttaneilla ja siinä pysyneillä potilailla on hyvin pieni riski sairauden etenemiselle. (Koskenvesa ym. 2017, 19-20.)

2.2 BCR-ABL jäännöstautianalytiikka ja hoidon seuranta

Hoidon seuranta perustuu verinäytteestä tehtävään RT-qPCR:ään, jonka tuloksena saadaan BCR-ABL1-fuusiotranskriptin määrä elimistössä. Reverse transcriptase quantitative PCR:illä määritetään BCR-ABL1 mRNA:n määrä, joka suhteutetaan käytettävään vertailugeenin (GUSB tai ABL1) mRNA:han. Kuten edellä kuvattu, tämä tulos esitetään IS-asteikolla (Cross ym. 2015). Hoitovastetta seurataan ensin kolmen kuukauden välein, josta siirrytään kuuden kuukauden seurantaan. MR-asteikkoa käytetään hoidon tavoitteiden seurantaan, kolmen kuukauden kuluttua hoidosta tavoitteena on saavuttaa taso MR1 (<10%), 6 kuukauden jälkeen MR2 (1.0%) ja 12 kuukauden tavoite on MR3 (0.1%). MR-asteikko on seuraavanlainen: MR1 (10%), MR2 (1.0%), MR3 (0.1%) =MMR (major molecular response), MR4 (0.01%), MR4.5 (0.0032%) ja MR5 (0.001%). TKI-hoidon tavoite on, että potilas saavuttaa MR3 tason. 2-3 vuoden hoitajakson jälkeen sairauden uusiutumisen riski pienenee merkittävästi niillä potilailla, jotka saavuttava ja säilyttävät MR3 tason. (Koskenvesa ym. 2017, 19-21.)

Tyksin genomiikan vastuualueella on käytössä laboratoriossa kehitetty TaqMan-PCR-tekniikka, josta he siirtyvät uuteen kaupalliseen Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmään. Uusi menetelmä perustuu RT-qPCR-tekniikkaan, joka on sama kuin vanhassa menetelmässä, ja lisäksi ns. nested-PCR-tekniikkaan. Uusi menetelmä on automatisoitu ja reaaliaikainen. Näytteeksi käy EDTA-veri, josta valmistetaan lyaatti ennen kasettiin pipetoimista, automaatio vähentää työntekijän työmäärää sekä lyhentää analyysin kestoa ja tulos saadaan nopeammin 2,5 tunnissa. Jokainen kasetti sisältää World Health Organisaation hyväksymät standardit. Uusi menetelmä näyttää tuloksen IS-asteikolla sekä MR-luokituksen ja menetelmällä päästään 0.0030IS/4.52MR herkkyteen. (Cepheid 2019, 19-26.)

2.3 Kroonisen myelooisen leukemian hoito

KML:ää on tutkittu viimeisten vuosikymmenien aikana paljon ja tieto taudin vaiheista on johtanut tehokkaiden lääkkeiden kehittämiseen (Ruutu ym. 2007, 328). Tutkimuskäyttöön vuonna 1999 tullut tyrosiinikinaasestäjä (TKE) Imatinibi vakiintui nopeasti osaksi normaalia hoitoa, koska se antoi hyviä tuloksia hoitovasteesta. Tämä

päivittäin otettava lääke muutti taudin ennustetta ja mahdollisti potilaille melko normaalin elämän. Lääkettä alettiin käyttämään laajemmin KML potilaiden hoitoon Suomessa vuonna 2001. Lääke estää KML potilailla BCR-ABL-fuusiogeenin tuottamaa tyrosiinikinaasiproteiinia toimimasta, joka normalisoi solujen jakautumisen ja elinkaaren. (Koskenvesa ym. 2017, 14-15.)

Toisen sukupolven tyrosiinikinaasin estäjiä ovat bosutinibi, dasatinibi ja nilotinib. Dasatinibi ja nilotinibi ovat olleet Suomen markkinoilla vuodesta 2006-2007 ja bosutinibi tuli vasta vuonna 2013. Kaikilla kolmella lääkkeellä on tehty lääketutkimuksia, potilaita on seurattu yli kymmenen vuoden ajan. Lääkkeet ovat osoittautuneet erittäin hyvin toimiviksi ja siedetyiksi. (Koskenvesa ym. 2017, 14-15.)

Lääkityksen aloittamisen jälkeen veriarvoja seurataan verikokein 1-2 viikon välein puoli vuotta ja kuuden hoitokuukauden jälkeen kerran kuukaudessa. Kolmen ensimmäisen hoitokuukauden aikana soluarvot saattavat laskea, mutta palautuvat luuydintuotannon normalisoituessa 3-4 kuukauden jälkeen. Veressä olevien valkosolujen määrä normalisoituu yleensä 3-4 viikon kuluttua hoidon aloittamisesta. Kun arvot ovat vakiintuneet, seuranta tehdään kolmen kuukauden välein. (Koskenvesa ym. 2017, 19-20.)

2.4 In vitro-diagnostiikka (IVD)

In vitro-diagnostiikka termiä käytettäessä tarkoitetaan potilaasta tai terveestä ihmisestä otetun näytteen diagnostista tutkimista. Käytännössä tämä tarkoittaa laboratorioon tulevia näytteitä ja niiden tutkimiseen käytettyjä laitteita ja menetelmiä. Euroopan parlamentti ja neuvosto ovat tehneet direktiivin in vitro-diagnostiikassa käytetyistä laitteista. Tämä direktiivi koskee laitteiden valmistajia ja pitää sisällään säädöksiä koskien suunnittelua, valmistusta ja markkinoille saattamista. Nämä kansalliset säädökset ovat tulleet voimaan 1.6.2000, täydentäen aikaisempia yhteisiä lääkinnällisten laitteiden säädöksiä. (Himberg 2004, 2-19.)

Vuonna 2017 toukokuussa tehtiin uusi IVD-asetus, joka täydentää aikaisempaa direktiiviä. Uudella asetuksella on viiden vuoden siirtymäjakso, mikä loppuu toukokuussa 2022. Uuden asetuksen on määrä lisätä Euroopan komission ja viranomaisten tekemää valvontaa, selvittää laitteiden riskiluokitusta sekä selvittää valmistajien ja muiden

taloudellisten toimijoiden vastuuta. IVD-asetuksessa on tarkennettu, että IVD-määritelmä pitää sisällään myös testit, joita käytetään tauti- ja sairausalttiuden selvittämiseen eli diagnostiikan ja lääkehoidon ohjelmistot sekä laitteet. Uuden asetuksen myötä valmistajien vastuu lisääntyy, ja velvollisuuteen kuuluu säännöllinen suorituskyvyn testaus sekä niiden julkaisu. (Euroopan komissio 2018.)

2.5 Aikaisemmat tutkimukset

Seuraava osio käsittelee aikaisempia tutkimuksia, jotka liittyvät Kroonisen myeloisen leukemian hoitoon ja jäännöstautianalytiikassa käytettävään laitteistoon. Ensimmäiset kaksi tutkimusta käsittelevät aikaisemmassa kappaleessa mainitun Imatinibin toimivuutta lääkkeenä ja viimeinen käsittelee jäännöstautianalytiikassa käytettävän Xpert BCR-ABL laitteen luotettavuutta.

Björkholm (2011) teki Ruotsissa tutkimuksen, jossa hän vertaili KML-potilaiden eloonjäämistä vuosien 1973-2008 välillä. Kroonisen myeloisen leukemian hoito muuttui radikaalisti Ruotsissa 2001 marraskuussa, kun ensimmäinen tyrosiinikinaasijäläkke tuli markkinoille (Imatinib mesylat). Tutkimuksessa oli viisi ryhmää, joista jokainen ryhmä piti sisällään viiden vuoden aikavälin, ja havainnointiyksikkönä olivat potilaat ovat saaneet diagnoosin tämän aikavälin sisällä. Aineisto oli otettu Ruotsin syöpärekisteristä ja kaikista vuosina 1973-2008 diagnoosin saaneista potilaista oli arvioitu eloonjääminen. Kokonaisotanta on $n=3173$, joista miehiä on 1796 ja naisia 1377, heidän keski-ikänsä on 62-vuotta. Tulokset olivat vuosina 1973-1979 0.21 (95% CI, 0.17:stä 0.24:ään), vuosina 1980-1986 0.23 (95% CI, 0.20:stä 0.27:ään), vuosina 1987-1993 0,37 (95% CI, 0.33:sta 0.41:een), vuosina 1994-2000 0.54 (95% CI, 0.50:stä 0.58:aan) ja vuosina 2001-2008 0.80 (95%CI, 0.75:stä 0.83:een). Yhteenveto kertoo, että tulokset parantuivat jokaisessa vertailuryhmässä, mutta myös ikä oli merkittävä tekijä eloonjäämisessä. Suurin muutos tuloksissa esiintyi kuitenkin vuosina 2001-2008 potilailla, jotka olivat 79-vuotiaita tai sitä nuorempia. Johtopäätöksenä oli, että Imatinib mesylat käytön lisääntyminen vuodesta 2001 on vaikuttanut merkittävästi potilaiden selviytymiseen taudista.

Hochaus ym. (2018) tutki pitkäkestoisen Imatinib-hoidon vaikutuksia kroonisessa myeloisessa leukemiassa. Tässä tutkimuksessa oli otettu satunnainen otanta potilaita, joilla oli juuri diagnosoitu kroonisessa vaiheessa oleva KML. Tutkimus selvitti pitkäkestoisen Imatinib-hoidon vaikutuksia KML-potilaisiin. Potilaita kirjattiin 16:sta eri maasta ja 177:stä eri keskukselta. Potilaiden ikäjakauma oli 18:sta 70:een vuoteen ja

kokonaisotanta oli n=1106. Kokonaisotanta jaettiin kahteen yhtäsuureen ryhmään, joka piti sisällään 553 potilasta. Toisen ryhmän hoito oli Imatinib ja toisen Interferon alfa cytarabin, ryhmien sisällä olevien havaintoyksiköiden selviytymistä vertailtiin. Kummankin ryhmän havaintoyksiköille oli sallittu liikkuvuus ryhmien välillä, jos lääke ei antanut hematologista vastetta 6 kuukauden sisällä, sopimattomia sivuvaikutuksia ilmeni tai potilaalla oli haluttomuutta jatkaa lääkitystä. Seitsemän vuoden jälkeen kokeilua laajennettiin koskemaan ainoastaan Imatinib-ryhmää. Jokaista havaintoyksikköä seurattiin keskimäärin 10,9 vuotta. Tuloksia tarkasteltaessa Interferon alfa plus cytarabine-ryhmästä 65,6% oli siirtynyt Imatinib-ryhmään ja heidän hoitonsa kesti keskimäärin 0,8 vuotta. Analyysi keskittyi siten tarkastelemaan vain Imatinib-ryhmään satunnaisesti valittuja havaintoyksiköitä. 48,3% Imatinib-ryhmän satunnaisesti valikoiduista havaintoyksiköistä suoritti tutkimushoidon Imatinibillä, 82,8% heistä saavutti sytogeneettisen vasteen. Vakavat sivuvaikutukset Imatinib-ryhmässä olivat harvinaisia ja ilmenivät ensimmäisen hoitovuoden sisällä. Yhteenvetona todettiin, että melkein 11 vuoden seurantajakson aikana Imatinib säilytti tehokkuutensa ja pitkäaikainen ylläpito ei aiheuttanut kumulatiivista tai myöhäistoksista vaikutusta (Hochhaus ym. 2018, 1-8).

Dufresne ym. (2007) tekemä tutkimus arvioi Xpert BCR-ABL menetelmän kykyä havaita BCR-ABL fuusiogeeni KML-potilailla. Analyysin herkkyyttä testattiin valmistamalla standardikäyrä, joka tehtiin laimentamalla CML solulinjaa normaalina kontrollina olleeseen kokovereen. Standardikäyrän arvojoukko oli 0,001%:sta 0,1%:iin K-562 soluja, jokainen laimennos ajettiin neljä kertaa. Analyysin stabiliteettia testattiin ajamalla jaettu standardiliuos heti, 24 tunnin kuluttua säilytys 4C° ja 96 tunnin kuluttua säilytys 4C°. Standardikäyrän arvojoukko oli 10 K-562-solua 200uL:ssa aina 10000:een K-562-soluun 200uL:ssa. Jokainen standardiliuos ajettiin kaksi kertaa. Aineistona käytettiin 14 hoidossa olevan KML-potilaan kokoveri- ja/tai luuydinnäytettä sekä 11 potilasta, joilla oli KML:ään viittaavia oireita. Näytteet pitivät sisällään myös 10 normaalia kontrollia. Näytteet, standardit ja kontrollit lyysattiin sekä pipetoitiin kasettiin laitevalmistajan ohjeistamalla tavalla ennen ajoa. Herkkyystestauksen standardikäyrän kaikkiin tuloksiin saatiin regressiokerroin $r^2=0,98$ ja variaatiokerroimen prosentti oli korkeimmassa kohtaa käyrää 24% ja matalassa kohtaa käyrää se oli 15%. Stabiliteettia testatessa havaittiin, että merkittävää eroa ei ollut ajettaessa liuos heti tai 24 tunnin kuluttua. 96 tunnin säilytyksen jälkeen käyrän lineaarisuus heikkeni. 14 Imatinib hoidossa olleesta potilaasta 11:sta havaittiin positiivinen tulos Xpert BCR-ABL Monitor assay:ta käytettäessä. Arvojoukko otannan sisällä oli 0,00050%:sta 44%:iin. Potilas, jolla oli alhaisin BCR-ABL%, sai negatiivisen tuloksen 2 kertaa analyysin kertoessa matalasta pitoisuudesta

lähellä alarajaa. Yhdentoista potilaan joukosta, joilla oli KML:ään viittaavia oireita vain yksi sai positiivisen tuloksen. Kymmenen normaalia kontrollia osoittautui negatiivisiksi. Yhteenvetona Xpert BCR-ABL Monitor assay on luotettava menetelmä havaita BCR-ABL fuusiogeeni KML-potilailla.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmän validointi Tyksin genomiikan vastuualueelle. Menetelmää käytetään kroonisen myeloisen leukemian jäännöstauditutkimuksessa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on auttaa korvaamaan Tyksin genomiikan vastuualueella tällä hetkellä käytössä oleva kvantitatiivinen TaqMan-PCR-tekniikka uudella Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) menetelmällä. Uuden menetelmän käyttöönotto mahdollistaa nopeamman tulosten valmistumisen, pienentää kontaminaation riskiä ja vapauttaa työntekijän muihin tehtäviin, laitteiston tehdessä analyysiprosessin. Laitteisto ja menetelmä vastaavat uuden IVD-asetuksen mukaisia säädöksiä.

4 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tämän opinnäytetyön käytännön toteutus suoritettiin Tyksin genomiikan ja mikrobiologian laboratorioissa. Verifioinnissa käytettävät kontrollit tulivat laitevalmistajalta ja lisäksi kollegani ajoivat potilasnäytteitä uudella ja vanhalla menetelmällä rinnakkain. Tämä tutkimus käsittelee valmistajan kontroleilla tehtävää validointia ja sen tuloksia. Aineistona oli kolme laitevalmistajan kontrollipaneelia, yksi paneeli sisältää kaksi kertaa 0%, 0,0032%, 0,01%, 0,1%, 1% ja 10% kontrollit eli yhteensä 12 kappaletta yhdessä kontrollipaneelissa. Verifioinnissa tehtyyn tarkkuus, spesifisyys, lineaarisuus ja täsmällisyys tutkimukseen tarvittiin kolme sarjaa valmistajan kontroleja (Xpert BCR-ABL IS Panel C130), jotka pitävät sisällään viisi positiivista ja yhden negatiivisen kontrollin. Lisäksi tarvitaan myös kolme valmistajan kittiä (Xpert BCR-ABL Ultra kits). (Bates ym.) Verifiointiin käytetyt valmistajan kitit ja kontrollit hankki Genomiikan osasto keväällä 2020. Kittien ja kontrollien hankkimisesta aiheutui kustannuksia toimeksiantajalle. Verifiointi kesti noin kahdeksan työpäivää, kun ajettiin kolme näytettä päivässä. Kahtena päivänä vaihdoimme pipetoijaa ja ajoimme paneeleista 2 ja 3 kontrollinäytteet 0%, 0,1% ja 1%. Kontrollinäytteet analysoitiin keväällä 2020 Xpert BCR-ABL Ultra-menetelmällä, jonka jälkeen tuloksia vertailtiin laitevalmistajalta saatuihin odotusarvoihin.

Tämä opinnäytetyö on osa bioanalytikkokoulutuksessa käynnissä olevaa Turku CRC:n tutkimuslupahanketta (T12/022/19). Tavoitteena on vastata työelämän tarpeisiin ja muutoksiin sekä yhdistää työelämä oppimisympäristöön.

4.2 Toteutuksen eri vaiheet

Verifioinnissa tehtävään tarkkuus, spesifisyys, lineaarisuus ja täsmällisyys tutkimukseen tarvittiin kolme valmistajan kittiä (Xpert BCR-ABL Ultra kits) ja kolme valmistajan kontrollisettiä (MMQCI controls: Xpert BCR-ABL IS Panel C130) (Bates ym), jotka pitivät sisällään viisi positiivista ja yhden negatiivisen kontrollin. Verifiointi kestää noin kahdeksan työpäivää, kun ajetaan kolme näytettä päivässä. (Bates ym.)

Valmistajan kontrollien lisäksi osasto ajoi potilasnäytteitä uudella sekä vanhalla menetelmällä rinnakkain. Potilasnäytteiksi valittiin mukaan eri jäännöstautitasoilla olevia näytteitä.

Yksi kontrollisetti pitää sisällään:

- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 0%IS
- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 0,0032%IS
- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 0,01%IS
- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 0,1%IS
- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 1%IS
- 2 x 4.5ml of Xpert BCR-ABL 10%IS

Kitin mukana tulevat reagenssit:

- Proteinase K (PK) 10 x 130ul/pullo
- Lysis Reagent (LY) (Guanidinium Chloride) 10 x 5.3ml/pullo
- Wash Reagent 10 x 2.9ml/ampulli

Kitin mukana tuleva kasetti sisältää:

- Bead 1, 2, 3 ja 4 (kylmäkuivatut) 1kpl/kasetti
- Rinse Reagent 2.0ml/kasetti
- Elution Reagent 2.5ml/kasetti

Kitit ja kontrollit pitävät sisällään tarvittavat kasetit. Lisäksi validoinnin suorittamiseen tarvitaan pipettejä, pipetin kärkiä, absoluuttista etanolia, vorteksi ja mikrosentrifuugi, jotka ovat käytettävissä Tyksin genomiikan laboratoriossa. (Bates ym.)

Verifioinnin työvaiheet:

Tärkeää: Kasetti poistetaan pakkauksesta ennen kuin näyte valmistetaan. Analyysi aloitetaan 60 minuutin kuluessa siitä, kun näyte ja pesureagenssin on lisätty kasettiin. (Bates ym.)

Näytteen valmistaminen:

Kontrolli ja reagenssit tulee olla huoneenlämpöisiä (18-25 astetta). Proteinaasi K (PK) mikrosentrifugoidaan. Kontrollipaneelin komponentit sekoitetaan juuri ennen käyttöä kääntelemällä 5-10 kertaa ja vorteksoidaan 10-15 sekuntia keskinopeudella. 4ml paneelin komponenttia lisätään 50ml falcon-putkeen, jossa 100ul Proteinase K:ta. Vaihe on sama kuin verinäytteellä tehdessä. Näytettä sekoitetaan vorteksissa maksiminopeudella 3 sekuntia ja inkuboidaan huoneenlämmössä 1 minuutti. Näytteeseen lisätään 2,5ml Lysis Reagenssia (LY) ja vorteksoidaan 10 sekuntia maksiminopeudella. Näytettä inkuboidaan 5 minuuttia huoneenlämmössä ja vorteksoidaan maksiminopeudella 10 sekuntia ja jälleen inkuboidaan 5 minuuttia huoneenlämmössä. Näyte sekoitetaan naputtelemalla putken pohjaa 10 kertaa ja 1ml valmista lyaattia uuteen 50ml falcon-putkeen. Tähän lisätään 1.5ml Lysis Reagenssia. Näytettä vorteksoidaan maksimikierroksilla 10 sekuntia ja inkuboidaan 10 minuuttia huoneenlämmössä. Samaan putkeen lisätään 2ml abs. etanolia. Näytettä sekoitetaan vorteksissa maksimikierroksilla 10 sekuntia ja siirretään sivuun odottamaan. Jäljellä oleva PK ja LY voidaan hävittää. (Bates ym.)

Kasetin valmistaminen:

Kasetti poistetaan pakkauksesta ja tarkistetaan, että kasetti on käyttökelpoinen. Jos kasetti on vaurioitunut, sitä ei voi käyttää. Kasetin kansi avataan ja puristetaan Washing Reagent ampullista kasetissa sille tarkoitettuun kammioon. Valmisteltu näyte pipetoidaan kokonaan kasetin näytekammioon. Kansi suljetaan hyvin. (Bates ym.)

Seuraavaksi valmistellaan laite ja edetään laitteen ohjelman antamien ohjeiden mukaan. Luetaan viivakoodi kasetin kyljestä ja syötetään tarvittavat tiedot koneelle. Koneesta avautuu vapaana oleva paikka, johon kasetti asetellaan ja käynnistetään ajo. (Bates ym.)

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa eli määrällisessä tutkimuksessa tietoja tarkastellaan numeerisesti. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tarkastellaan kysymyksiä, kuinka moni, kuinka paljon ja kuinka usein. Numeeriset arvot ryhmitellään ja esitetään tulokset sanallisesti kuvaillen sekä katsotaan yhtäläisyyksiä ja eroavaisuuksia. (Vilka 2007, 13-24)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa määritetään ensin tutkimusongelma eli tutkitaan aihealuetta, rajataan se, asetetaan tavoitteita ja hankitaan taustatietoa. Aikaisempiin tutkimuksiin ja kirjallisuuteen perehtymisen jälkeen mietitään mahdollisia hypoteeseja sekä aloitetaan tutkimussuunnitelman laatiminen. Suunnitelmaan tulee täsmentää tavoitteita, valita menetelmä, budjetoida ja aikatauluttaa tutkimus, päättää tapa hankkia tietoa, määrittää perusjoukko sekä otanta ja valita aineiston käsittelytapa. Suunnitelman jälkeen tehdään tiedon keräämiseen suunnitellut työkalut esim. lomakkeet. Tietojen keräämisen jälkeen, ne käsitellään ja analysoidaan. Tulokset raportoidaan ja tehdään johtopäätökset, jonka jälkeen mietitään, miten tulokset voidaan hyödyntää. (Heikkilä 2014.)

Tarkastelemalla laitteen sekä menetelmän tarkkuutta, toistettavuutta ja lineaarisuutta, saadaan kuva laitteen ja menetelmän luotettavuudesta (Vilka 2007, 19-24). Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan menetelmän verifiointissa saatuja tuloksia ja vertaillaan niitä laitevalmistajan antamiin viitearvoihin.

Tästä kvantitatiivisesta tutkimuksesta laadittiin ensin suunnitelma, jossa tarkasteltiin aikaisempia tutkimuksia ja kirjallisuutta aiheeseen liittyen. Suunnitelmassa esitettiin tutkimusongelma, tavoitteet, teoriaa aiheeseen liittyen, tutkimusmenetelmän valinta ja aineiston keruun suunnittelu. Tässä tapauksessa havaintoyksiköitä olivat Cepheidin Xpert BCR-ABL Ultra-menetelmällä mitatut tulokset laitevalmistajalta saaduista MMQCI-validointinäytteistä. Saadut havaintoyksiköt tilastoitiin ja laskettiin tilastollisin menetelmin keskiarvo, suhteellinen virhe, systemaattinen virhe, kertaluokkaero, keskihajonta, variaatiokerroin ja mittausepävarmuus. Vertaamalla tuloksia ja tilastollisesti laskettuja arvoja laitevalmistajalta saatuihin arvoihin, voidaan todeta menetelmä luotettavaksi.

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Etiikka filosofian osa-alueena tutkii käsityksiä siitä, mikä on oikein tai väärin, hyvää tai paha sekä moraalisia kysymyksiä. Tutkimuksessa se tarkoittaa hyviä toimintatapoja, joita jokainen tutkija tulee pyrkiä noudattamaan, jotta tutkimuksista saadut tulokset ovat luotettavia ja tutkimukseen osallistuneita ihmisiä on kohdeltu hyvin. Tutkimukseen osallistuvien oikeuksia tulee kunnioittaa, ottaa huomioon yksityisyys, itsemääräämisoikeus ja ihmisarvo. Haittojen, riskien ja vahinkojen aiheuttamista tulee välttää tutkimuksessa mukana oleville tahoille. Vaikka tutkija ei olisi samaa mieltä tutkittavien kanssa, nämä näkemyserot eivät saa vaikuttaa väärin tavalla.

tutkimustuloksiin. Tutkijan asema tai tulokset eivät myöskään saa hankaloittaa muiden ihmisten elämää ja erityisesti eettiset kysymykset nousevat pintaan, kun tutkitaan vähemmistöjä, alakulttuureita tai muuten hankalassa tilanteessa olevia ryhmiä. Tutkija on myös vastuussa tekemästään tieteestä, eikä näin ollen saa haitata tieteen edistymistä esimerkiksi toimimalla epäeettisesti, jolloin aihealueen tai kohderyhmän tutkiminen hankaloituu. Tutkimusta tehdessä on hyvä pohtia miten tutkimus hyödyttää ja ketä. (Vuori 2020.) Hyvä tutkimusetiikka pitää sisällään tutkimussuunnitelman. Kaikki aineisto ja lähteet esitellään avoimesti. Tutkimus tehdään ja raportoidaan huolellisesti, jotta tulokset ovat mahdollisimman luotettavia. (TENK 2013, 6.)

Tässä opinnäytetyössä ei käsitellä potilasaineistoa. Verifiointi tehdään laitevalmistajan kontrolleilla ja saatuja tuloksia vertaillaan laitevalmistajan antamiin viitearvoihin. Kaikki menetelmän verifiointista saadut tulokset julkaistaan tässä opinnäytetyön raportissa. Tässä opinnäytetyössä noudatetaan hyvää tutkimusetiikkaa.

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

5.1 Tulokset

Validoinnilla tarkoitetaan varmentamista, että menetelmä on vaatimuksia vastaava ja käyttötarkoitukseen sopiva. Validoinnista saaduilla tuloksilla selvitetään menetelmän ja laitteen luotettavuutta sekä laillisuutta käyttötarkoitukseen. Menetelmän ja laitteiden tulee vastata sille asetettuja säädöksiä ja lakeja ennen käyttöönottoa, jotka voidaan varmentaa validoinnilla. (Hägg 2016, 7.)

Verifiointi on validointia suppeampi ja tällä voidaan osoittaa, että mittaustulokset vastaavat määritettyjä vaatimuksia. Kun uusi menetelmä on käytössä muualla ja se on validoitu valmistajan toimesta diagnostiikkaan, voidaan verifiointi tehdä, kun uusi menetelmä otetaan käyttöön. (Hägg 2016, 7-8; Labquality 2020.)

Kaikki toukokuussa ajettut MMQCI-validointinäytteet menivät hyväksytysti läpi ja verifiointi eteni seuraavaan vaiheeseen. Heinäkuussa 2020 Xpert BCR-ABL Ultra-menetelmä otettiin käyttöön Tyksin genomiikan osastolla. Tässä raportissa kuvailtu validoinnin käytännöntoteutus sujui ongelmitta, iso kiitos siitä sairaalageneetikko Mirikka Montoselle sekä genomiikan osaston ylilääkäri Veli Kairistolle, jotka organisoivat ja aikatauluttivat käytännöntoteutuksen.

(Kuva 1 ja 3) Verifiointissa ajettiin kolmen kontrollipaneelin näytteet ja tulokset tilastoitiin Exceliin. Tuloksista laskettiin ensin jokaisen kontrollinäytteen kolmen eri paneelin odotetun ja havaittujen tuloksien keskiarvo. Nummenmaa ym. (2014, 74-75.) kertoo ”Kaikki havaintoarvot siis lasketaan yksinkertaisesti yhteen ja saatu summa jaetaan havaintojen lukumäärällä.” Havaitusta keskiarvosta vähennettiin laitevalmistajan odotettu tulos, josta saadaan systemaattinen virhe. Mittaustulokset saattavat olla lähellä toisiaan, mutta kaukana odotetusta tuloksesta, jos virhe on systemaattinen (TIM Jyväskylän Yliopisto 2020). Suhteellinen virheprosentti saadaan jakamalla systemaattinen virhe odotetulla tuloksella. Eloranta (2018, 8/9) kuvaa ”Mittauksen suhteellinen virhe kuvaa mittaustuloksen tarkkuutta suhteessa mittausvirheeseen.” Kertaluokka ero saadaan jakamalla havaittu keskiarvo odotetulla tuloksella. Tieteen

termipankki selventää ”Kertaluokka on matemaattinen merkintätapa, joka kuvaa kuinka funktiota rajoitetaan, kun funktion argumentit kasvavat loputtomasti tai lähestyvät tiettyä lukua.” Excel-taulukko on syötetty jokaiselle kontrollinäytteelle laitevalmistajan ilmoittama hyväksytyn kertaluokkaeron raja-arvo. Keskihajonta kuvaa kuinka paljon mitatut tulokset poikkeavat keskiarvosta eli lasketaan havainnon erotus keskiarvosta ja otetaan niiden keskiarvo (Nummenmaa ym. 2014). Variaatiokerroin saadaan jakamalla keskihajonta havaitulla keskiarvolla. Nummenmaa ym. 2014 selventää ”Variaatiokertoimella ei siis ole varsinaista mittayksikköä, vaan se ilmoittaa, kuinka monen keskiarvon päässä muuttujan arvot keskimäärin ovat keskiarvosta.” Lisäksi ajettiin vielä kolmesta eri paneelista näytteet 0%, 0,1% ja 1% kolmen eri pipetoijan toimesta ja näistä tuloksista laskettiin arvot samoin tilastollisin menetelmin kuin yllä on esitetty.

Lineaarinen regressiokuvaaja esittää kahden muuttujan välistä yhteyttä. Kuvaajan regressiosuora näyttää kuinka voimakas yhteys muuttujilla on ja onko yhteys positiivinen vai negatiivinen. Alaspäin laskeva suora kertoo muuttujien negatiivisen yhteyden ja ylöspäin nouseva suora taas positiivisen yhteyden. Suorien positiivinen tai negatiivinen yhteys kuvataan myös suorien kulmakertoimella eli regressiokertoimella, jos kerroin on negatiivinen, suora laskee ja positiivisella kertoimella suora on nouseva. (KvantiMOTV 2008.)

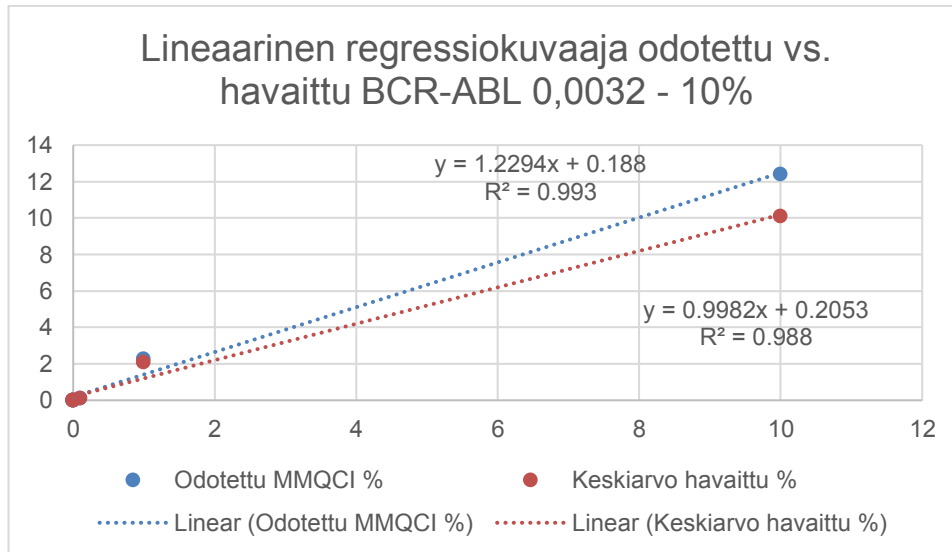
(Kuva 2) Kuvassa on esitetty lineaarinen regressiokuvaaja BCR-ABL 0,0032-10% näytteistä, mistä voidaan havaita muuttujien positiivinen korrelaatio ja regressiokerroin on 0,988.

(Kuva 4) Kuvassa on esitetty lineaarinen regressiokuvaaja BCR-ABL 0%, 0,1% ja 1% näytteistä kolmen eri pipetoijan ajamana. Voidaan havaita muuttujien positiivinen korrelaatio ja regressiokerroin on 0,9981

Tuloksista tehtyjen laskujen ja kuvaajien avulla voidaan tehdä johtopäätös, että verifiointi laitevalmistajan MMQCI-validointinäytteillä meni hyväksytysti läpi ja menetelmä siirtyi potilasnäytteillä tehtävään verifiointiin.

BCR-ABL %	10	1	0,1	0,01	0,003	0
Odotettu MMQCI %	12,4	2,3	0,1	0,02	0,005	0
Paneeli 1 (%)	12,6	2,1	0,1	0,01	0,003	0
Paneeli 2 (%)	9,5	1,8	0,1	0,02	0,004	0
Paneeli 3 (%)	8,2	2,4	0,2	0,02	0,008	0
Keskiarvo havaittu %	10,1	2,1	0,1	0,02	0,005	0
Systemaattinen virhe	-2,3	-0,2	0	0	0	
Suhteellinen						
virheprosentti (sv)	-19 %	-7 %	0	0	0	
Kertaluokkaero (ke)	0,8	0,9	1,1	1,1	0,9	
Hyväksytty (ke)	≤ 2	≤ 2	≤ 2,2	≤ 2,25	≤ 3	
Keskihajonta %	1,84	0,25	0,03	0,01	0,002	
Variaatiokerroin (cv)	18 %	12 %	25 %	36 %	46 %	
Hyväksytty cv	50 %	50 %	50 %	50 %	100 %	

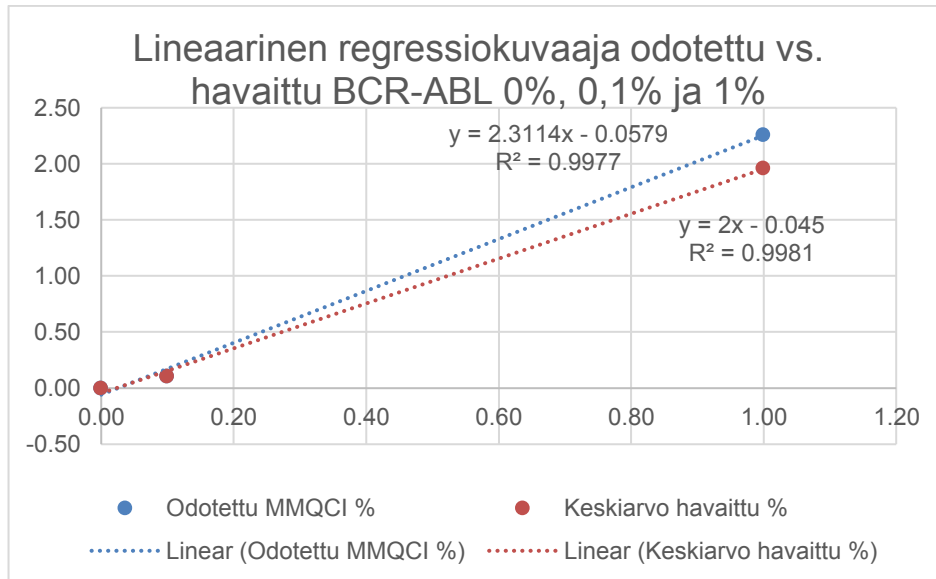
Kuva 1. Laitevalmistajalta saatujen MMQCI-validointinäytteiden tulokset ja tarvittavat laskut. Mittausepävarmuus 36%.



Kuva 2. Lineaarinen regressiokuvaaja odotettu vs. havaittu BCR-ABL 0,0032 - 10%.

BCR-ABL %	1	0,1	0
Odotettu MMQCI %	2,260	0,109	0
Pipetoija 1 (ka)	2,080	0,125	0
Pipetoija 2	2,060	0,097	0
Pipetoija 3	1,7	0,1	0
Keskiarvo havaittu %	1,96	0,105	0
Systemaattinen virhe	-0,30	-0,004	
Suhteellinen virheprosentti (sv)	-13 %	-4 %	
Kertaluokkaero (ke)	0,9	1,0	
Hyväksytyt (ke)	≤2,5	≤2,2	
Keskihajonta %	0,2	0,01	
Variaatiokerroin (cv)	8 %	14 %	
Hyväksytyt cv	50 %	50 %	

Kuva 3. Eri paneelista olevien MMQCI-validointinäytteiden 1%, 0,1% ja 0% tulokset kolmen eri pipetoijan ajamana. Mittausepävarmuus 17%.



Kuva 4. Lineaarinen regressiokuvaaja odotettu vs. havaittu BCR-ABL 0%, 0,1% ja 1%.

5.2 Täsmävyys

Täsmävyydellä mitataan menetelmän kykyä mitata samaa tai samankaltaista näytettä tietyissä olosuhteissa toistuvasti mahdollisimman tarkasti (Hägg 2016, 32.) Toistettavuutta mitattiin ajamalla laitevalmistajalta saatuja tietyn pitoisuuden omaavia kontrollinäytteitä kolme sarjaa.

5.3 Toistettavuus

Toistettavuudella halutaan mitata menetelmän kykyä analysoida pitoisuudeltaan tunnettujen näytteiden tulosten yhtäpitävyys mahdollisimman tarkasti monta kertaa samoissa olosuhteissa (Hägg 2016, 31.) Menetelmän toistettavuutta mitattiin ajamalla uudestaan kontrollipaneeli 2. ja 3. näytteet 1%, 0,1% ja 0%, mutta kahden eri pipetoijan toimesta.

5.4 Mittausepävarmuus

Laskemalla mitatuista suureista mittausepävarmuus, voidaan tarkastella mittauksen luotettavuutta. Sisäiset ja ulkopuoliset tekijät vaikuttavat aina mitattuihin tuloksiin, joten mittausepävarmuus tulee laskea aina mitatuista suureista. Mittausepävarmuus kuvaa mitattujen suureiden vaihtelua. (Finas 2016.; Hiltunen ym. 2011, 35.)

Ohjeet mittausepävarmuuden laskemiseen
 Jokaisella yksittäisellä mittaustuloksella on virheensä, jolla se eroaa mittaustuloksen todellisesta arvosta.

Mittausepävarmuuden osatekijät voidaan jakaa systemaattisiin ja satunnaisiin tekijöihin:

- Systemaattinen virhe (bias) voi johtua mm. käytössä olevasta menetelmästä, kalibroinnista, annostelun paikkansapitävyydestä, olosuhteiden kuten lämpötilan poikkeamisesta, sensorin ikääntymisestä
- Satunnaispävarmuutta aiheuttavat mm. reagenssit, eri henkilöiden työtavat, näytteen esikäsittely ja säilytys, näytematriisi, eri laitteet ja menetelmät

Mittausepävarmuuden arviointi perustuu menetelmän suorituskyvystä saatuun tietoon. Se lasketaan seuraavasti:

$$U = [\sqrt{CV(sis)^2 + CV(väl)^2 + CV(syst)^2}] \times 2$$

U = kokonaismittausepävarmuus (ilmoitetaan prosentteina esim. U = ±10 %)
 Tykslabin tavoite mittausepävarmuudelle (=suorituskykyvaatimus), kirjataan sulkuihin lasketun U-arvon viereen (esim. Tykslabin tavoite suorituskyvylle ±15 %)

CV(sis) = menetelmän sarjan sisäinen variaatiokerroin (%)
 CV(väl) = menetelmän sarjojen välinen variaatiokerroin (%)
 CV(syst) = systemaattisen virheen tuottama epävarmuus (%)

Kerroin 2 Käytettäessä kerrointa 2 on analysoitavan aineen pitoisuus epävarmuusrajojen sisällä noin 95 %:n todennäköisyydellä.

Kuva 5. Mittausepävarmuuden laskeminen. (Tykslab Laatukäsikirja. 2020)

Ensin tarvitaan systemaattisen virheen tuottama epävarmuusprosentti, joka on suhteellinen virheprosentti. (Kuva 1.) Suhteellisten virheprosenttien keskiarvo kerrotaan kahdella, jolloin tulokseksi saadaan 0,0027. Sarjojen välinen variaatiokerroin saadaan jakamalla keskihajonnan keskiarvo havaittujen keskiarvojen keskiarvolla, josta saadaan tulokseksi 0,17, joka kerrotaan kahdella ja siitä saadaan tulokseksi 0,0294. KvantiMOTV 2008 selventää variaatiokerrointa seuraavasti ”Variaatiokerroin on hajontaluku, joka suhteuttaa keskihajonnan aineiston keskiarvoon”. Suhteellisen virheprosentin keskiarvoon lisätään sarjojen välinen variaatiokerroin, jolloin summaksi saadaan 0,0321. Tästä tuloksesta otetaan neliöjuuri, joka kerrotaan kahdella ja tulokseksi saadaan 0,36. Näin ollen kaikkien kolmen paneelin MMQCI-validointinäytteiden mittausten mittausepävarmuus on +36%. (Tykslab Laatukäsikirja 2020.)

MMQCI-validointinäytteillä tehtävän toisen osan ajojen mittausepävarmuus laskettiin tuloksista seuraavasti. (Kuva 3.) Ensin tarvitaan systemaattisen virheen tuottama epävarmuusprosentti, joka on suhteellinen virheprosentti. Suhteellisten virheprosenttien keskiarvo kerrotaan kahdella, jolloin tulokseksi saadaan 0,0072. Sarjojen välinen variaatiokerroin saadaan jakamalla keskihajonnan keskiarvo havaittujen keskiarvojen keskiarvolla, josta saadaan tulokseksi 0,085, joka kerrotaan kahdella ja siitä saadaan tulokseksi 0,0072. Suhteellisen virheprosentin keskiarvoon lisätään sarjojen välinen variaatiokerroin, jolloin summaksi saadaan 0,0144. Tästä tuloksesta otetaan neliöjuuri, joka kerrotaan kahdella ja tulokseksi saadaan 0,17. Näin ollen MMQCI-validointinäytteiden toisen osan mittausten mittausepävarmuus on +17%. (Tykslab Laatukäsikirja 2020.)

5.5 Menetelmät

PCR:llä (Polymerase chain reaction) voidaan monistaa DNA:ta ja tiettyä geenialuetta liittämällä siihen haluttuja alukkeita. PCR:n rajoituksena on, että tutkittava alue ei ole kovin laaja, eli sillä voidaan monistaa pieniä mutaatioita ja rakennemuutoksia. Reaktiot tapahtuvat PCR-laitteessa, johon laitetaan koeputki, jossa on näyte ja halutut alukkeet. Ensin kaksijuosteinen DNA lämmitetään 95 C° eli denaturoidaan, jolloin juosteet irtoavat toisistaan. Denaturoinnin jälkeen lämpötilaa lasketaan n. 50-60 C°:een, jolloin mukana olevat alukkeet kiinnittyvät yksijuosteisen DNA:n tutkittavaan alueeseen. Kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan 72C°:een, jolloin DNA-Polymeraasi alkaa kopioimaan juostetta. Tämä sykli toistetaan useita kertoja ja lopputuloksena saadaan yli miljoonakertainen määrä DNA:ta. Käänteiskopioijaentsyymien avulla voidaan RNA:sta tehdä cDNA:ta, joka taas voidaan monistaa PCR-menetelmällä. Tätä kutsutaan RT-PCR:ksi. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016.)

PCR:n tulos saadaan, kun näyte pipetoidaan agarosigeelille, ajetaan ja luetaan siitä, kun taas RT-PCR:ää voidaan seurata reaaliaikaisesti fluoresenssimolekyylin avulla monitorista jokaisen syklin välissä. Fluoresenssimolekyylillä voi sitoutua DNA:han tai olla sitoutuneena alukkeisiin ja koettiin, jolloin se voidaan havaita, kun DNA:n pitoisuus nousee. RT-PCR voi olla kvalitatiivista, jolloin merkkiaine joko löytyy syklin jälkeen tai sitten ei. RT-qPCR:ssä eli kvantitatiivisessä PCR:ssä taas voidaan laskea jokaisen syklin jälkeen kopioiden määrä, niihin sitoutuneiden fluoresenssimolekyylin avulla. (Bio-Rad Laboratories 2006.)

Nested PCR on muunnelma PCR:stä, joka pitää sisällään kaksi joukkoa alukkeita kahteen onnistuneeseen PCR aioon eli PCR ajetaan kaksi kertaa peräkkäin. Nested PCR on yksi herkimmistä PCR menetelmistä ja on siksi erittäin herkkä kontaminaatioille. (Deepachandi 2019.)

Xpert BCR-ABL ultra -menetelmä käyttää nested RT-qPCR:ää, joka tapahtuu tutkimuskasetin sisällä. Kasetin sisällä tapahtuu RNA:n eristys, reverse transcription eli cDNA valmistus ja nested qPCR. (Cepheid 2021).

6 POHDINTA

Tämä opinnäytetyö sai alkunsa syksyllä 2019; aihe tuli Tyksin genomiikan vastualuejohtaja, osastonylilääkäriin Veli Kairistolta. Aiheeksi valikoitui kroonisen myeloisen leukemian jäännöstautianalytiikassa käytettävän Xpert BCR-ABL Ultra CE-IVD-menetelmän validointi. Aihe oli ajankohtainen, tärkeä ja se vastasi suoraan työelämän tarpeisiin. BCR-ABL jäännöstautianalytiikkaa tehdään genomiikan osastolla viikoittain ja tämän uuden menetelmän käyttöönotto lyhentää vastausaikaa huomattavasti.

Suunnitelman teko piti sisällään käsitteisiin perehtymistä, koska aikaisempaa kokemusta BCR-ABL fuusiogeenin jäännöstautianalytiikasta sekä validoinnista ei tekijällä ollut. Tiedonhaku ja suunnitelman tekeminen vei paljon aikaa, ja suunnitelma valmistui keväällä 2020. Opinnäytetyösuunnitelman tekeminen opetti paljon tilastollisista menetelmistä sekä tiedon etsimisestä ja seulomisesta. Artikkeleiden lukeminen oli mielenkiintoista, aihe opetti paljon uutta tietoa verisyöivistä, genetiikasta ja menetelmistä, joita käytetään verisairauksien diagnostiikkaan. Xpertin BCR-ABL Ultra CE-IVD-menetelmä on uusi ja haastavaa oli löytää tuoreita lähteitä suunnitelmaan ja raporttiin. Mittausepävarmuuden selittäminen osoittautui vaikeaksi ja siihen liittyvät viitteet oli myös haastava löytää, koska jokainen artikkeli kertoi hieman eri kaavan laskea. Opinnäytetyön käytännön toteutus alkoi genomiikan osastolla toukokuussa 2020, ja se valmistui toukokuun 2020 aikana. Käytännön toteutuksessa ei ilmennyt haasteita, kaikki sujui erittäin hyvin. Kiitos siitä sairaalageneetikko Mirikka Montoselle, joka suunnitteli verifiointin ja toteutuksen aikataulun sekä auttoi tilastollisten menetelmien kanssa. Tulokset olivat hyviä laitevalmistajan validointinäytteistä sekä rinnakkain ajetuista potilasnäytteistä ja uusi menetelmä otettiin käyttöön Tyksin genomiikan osastolla heinäkuussa 2020.

Syksyllä 2020 sopimuspaperit allekirjoitettiin ja raportin kirjoittaminen alkoi. Suunnitelman ja raportin kirjoittaminen oli hieman raskasta, koska samaan aikaan oli muita opintoja ja töitä. Opinnäytetyön tekeminen oli prosessina erittäin mielenkiintoinen ja opetti paljon tutkimuksen tekemisestä prosessin aikana luetuista artikkeleista sekä oppimateriaaleista. Tutkimuksissa käytettäviin menetelmiin sekä tilastollisiin menetelmiin

tutustuminen oli mielenkiintoista ja hyödyllistä, ajatellen mahdollisia tulevia opintoja ja ammatin vaatimaa perehtymistä uusiin tutkimusartikkeleihin. Opinnäytetyö vastasi suoraan työelämän tarpeisiin ja oli näin ollen mielekäs sekä hyödyllinen. Opinnäytetyön tekeminen oli ammatillisesti kasvattavaa ja syventävää, josta on varmasti hyötyä tulevaisuudessa bioanalytikkona toimiessa.

LÄHTEET

Bates, M.; Day, G.-J.; Weidler, J. ja Simon, I. Xpert BCR-ABL Ultra (CE-IVD) Test Verification Guide. Cepheid.

Bio-Rad Laboratories. 2006. Real-Time PCR. Applications guide. Viitattu 28.4.2021 http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf

Björkholm, M.; Ohm, L.; Eloranta, S.; Derolf, Å.; Hultcrantz, M.; Sjöberg, J.; Andersson, T.; Höglund, M.; Richter, J.; Landgren, O.; Kristinsson, S.Y. ja Dickman, P.W. 2011. Success Story of Targeted Therapy Chronic Myeloid Leukemia: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973-2008. Journal of Clinical Oncology. Vol 29. No 18. 2514-2520. Viitattu 2.5.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3138632/pdf/zlj2514.pdf>

Cepheid 2021. Xpert BCR-ABL Ultra Product information. Viitattu 30.4.2021 <https://www.cepheid.com/en/tests/Oncology-Genetics/Xpert-BCR-ABL-Ultra>

Cepheid. 2019. Xpert BCR-ABL Ultra. Delivering confidence with fast and accurate Chronic Myeloid Leukemia molecular monitoring results. 19-26.

Cortes, J.E.; Talpaz, M.; O'Brien, S.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; Ferrajoli, A.; Verstovsek, S.; Rios, M.B.; Shan, J. & Kantarjian, H.M. 2005. Staging of Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib era - An evaluation of the World Health Organization Proposal. American Cancer Society 2/2006. 1306. Viitattu 7.3.2020. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cncr.21756>

Cross, NCP.; White, HE.; Colomer, D.; Ehrencrona, H.; Foroni, L.; Gottardi, E.; Lange, T.; Lion, T.; Machova Polakova, K.; Dulucq, S.; Martinelli, G.; Opplinger Leibundgut, E.; Pallisgaard, N.; Barbany, G.; Sacha, T.; Talmaci, R.; Izzo, B.; Saglio, G.; Pane, F.; Müller, MC. & Hochhaus, A. 2015. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. Vol. 29, 999-1003.

Cumbo, C.; Anelli, L.; Specchia, G. & Albano, F. 2019. Monitoring of Minimal Residual Disease (MDR) in Chronic Myeloid Leukemia: Recent Advances. Cancer Management and Research. Dove Press journal.

Deepachandi, B.; Weerasinghe, S.; Soysa, P.; Karunaweera, N. & Siriwardana, Y. 2019. A highly sensitive modified nested PCR to enhance case detection in leishmaniasis. BMC Infectious Diseases. Viitattu 28.4.2021 <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4180-3>

Dufresne, S.D.; Belloni, D.R.; Levy, N.B. ja Tsongalis, G.J. 2007. Quantitative Assessment of the BCR-ABL Transcript Using the Cepheid Xpert BCR-ABL Monitor Assay. Arch Pathol Lab Med- Vol 131 June 2007. 947-950. Viitattu 3.5.2020 <https://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/1543-2165%282007%29131%5B947%3AQAOBTB%5D2.0.CO%3B2>

Eloranta, K. 2018. Mittaamisen perusteita. Jyväskylän Lyseon lukio. Viitattu 26.12.2020. <https://peda.net/jao/lyseo/opiskelu2/ojkuo/yjl/fysiikka/ffl/fy-1-9-elok2/2sjm/2majsv/2mp:file/download/b24188df595cab8fe10b0a2e58fde9b9471e541c/2-MittaaminenO20181204.pdf>

Euroopan komissio. 2018. Tiedote in-vitro -diagnoosiikkaan tarkoitettujen lääkinnällisten laitteiden valmistajille. Euroopan unioni.

Finas. 2016. Mittausepävarmuus. Viitattu 20.12.2020. <https://www.finas.fi/akkreditointi/jaljitettavyys/Sivut/Mittausepavarmuus.aspx>

- Hasserjian, R.P. 2012. Chronic Myelogenous Leukemia. Current Cancer Therapy Reviews. Volume 8. 2012, 3. Viitattu 26.2.2020 <http://www.eurekaselect.com/76665/article>
- Heikkilä, T. 2014. Kvantitatiivinen tutkimus. Tilastollinen tutkimus. Edita Publishing Oy, Helsinki. Viitattu 14.2.2021. <http://www.tilastollinentutkimus.fi/1.TUTKIMUSTUKI/KvantitatiivinenTutkimus.pdf>
- Hiltunen, E.; Linko, L.; Hemminki, S.; Hägg, M.; Järvenpää, E.; Saarinen, P.; Simonen, S. ja Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. MIKES. Viitattu 20.12.2020 <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>
- Hochhaus, A.; Larson, R.A.; Guilhot, F.; Radich, J.P.; Branford, S.; Hughes, T.P.; Baccarani, M.; Deininger, M.W.; Cervantes, F.; Fujihara, S.; Ortmann, C-E.; Mensesen, H.D.; Kantarjian, H.; O'Brien, S.G.; Druker, B.J ja IRIS tutkijat. 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2017 March 09, 1-8. Viitattu 2.5.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5901965/pdf/nihms947077.pdf>
- Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016. Geenitestauksen menetelmiä. Kromosomi- ja geenimuutosten laboriodiagnostiikka. Duodecim. Viitattu 26.10.2020 https://www.oppiportti.fi/op/lfg00905/do?p_haku=pcr - q=pcr
- Himberg, J-J. 2004. Kliinisten laboriomittausten jäljitettävyyden ja IVD-direktiivi. 2-19. Viitattu 26.2.2020 <http://kemiaanseurat.fi/finntesting/wp-content/uploads/2014/03/Kliinisten-laboriomittausten-jäljitettävyyden-ja-IVD-direktiivi.pdf>
- Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelu opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Viitattu 13.10.2020. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>
- Jyväskylän yliopisto. TIM. 2020. Mittaaminen. Viitattu 26.12.2020. <https://tim.jyu.fi/view/tau/toisen-asteen-materiaalit/fysiikka/fy1-1/mittausvirheet>
- Koskenvesa, P. 2019. KML Diagnoosi. Suomen hematologiyhdistys. Viitattu 1.3.2020 <https://www.hematology.fi/fi/hoito-ohjeet/veritaudit/kml/diagnoosi>
- Koskenvesa, P.; Mustijoki, S. & Rosenberg, L. 2017. KML-potilaan opas. Suomen syöpäpotilaat ry. 14-20. Viitattu 11.4.2020 <https://docplayer.fi/64561944-Kml-potilaan-opas-krooninen-myeloinen-leukemia-ja-sen-hoito.html>
- KvantiMOTV. 2008. Hajontaluvut. Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto. Menetelmäopetuksen tietovaranto. Viitattu 26.1.2021 <https://www.fsd.tuni.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html - variaatiokerroin>
- KvantiMOTV. 2008. Regressioanalyysi. Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto. Menetelmäopetuksen tietovaranto. Viitattu 6.1.2021. <https://www.fsd.tuni.fi/menetelmaopetus/regressio/analyysi.html>
- Labquality 2020. Validointi ja verifiointi. Viitattu 20.12.2020 https://www.labquality.fi/vieritestisuositus/luotettava_vieritesti/validointi_verifiointi/
- Nummenmaa, L.; Holopainen, M. ja Pulkkinen, P. 2014. Tilastollisten menetelmien perusteet. Sanoma Pro. 74-75.
- Ross, D.M. & Hughes, T.P. 2004. Cancer treatment with kinase inhibitor: what have we learnt from imatinib?. British Journal of Cancer. (2004). 90. 11-19. Viitattu 26.2.2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395307/pdf/90-6601507a.pdf>
- Ruutu, T.; Rajamäki, A.; Lassila, R. & Porkka, K. 2007. Krooninen myeloinen leukemia. Veritaudit. Duodecim. 325-328.

Salonen, J. 2019. KML eli krooninen myeloinen leukemia. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 10.02.2020. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00822

TENK 2013. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. 6. Helsinki: Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Viitattu 26.2.2020. https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

Tieteen Termipankki. 2016. Viitattu 27.12.2020. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Tietojenkäsittelytiede:kertaluokka>

Tykslab Laatukäsikirja. 2020. Mittausepävarmuus.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 13-24. Viitattu 1.3.2020. <http://hanna.vilka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>

Vuori, J. 2021. Tutkimusetiikka ihmistieteissä. Tietoarkisto. Viitattu 14.2.2021. <https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvali/tutkimusetiikka/tutkimusetiikka-ihmistieteissa/>

