

ULOSTEEN KALPROTEKTIININ SÄILYVYYS- JA HOMOGEENISUUSTUTKIMUS SEKÄ MÄÄRITYSMENETELMÄN INKUBAATIOTUTKIMUS

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
Bioanalyttikko
Opinnäytetyö
27.10.2010

Irene Erling
Laura Hakuli

| | | |
|---|--------------------|-----------------------------|
| Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma | | Suuntautumisvaihtoehto |
| Tekijä/Tekijät Irene Erling ja Laura Hakuli | | |
| Työn nimi Ulosteen kalprotektiinin säilyvyys- ja homogeenisuustutkimus sekä määritysmenetelmän inkubaatiotutkimus | | |
| Työn laji Opinnäytetyö | Aika Syksy 2010 | Sivumäärä 44+10 liitettä |
| TIIVISTELMÄ <p>Ulosteen kalprotektiinimääritystä käytetään tulehduksellista suolistosairautta sairastavilla potilailla yleensä lääkehoidon tehoa arvioitaessa tai taudin diagnoosin tukena. Teimme opinnäytetyönämme tutkimukset ulosteen kalprotektiinin säilyvyydestä näytteessä, analyysin inkubaatioajoista ja ulostenäytteen homogeenisuudesta kalprotektiinin suhteen. Tutkimukset toteutettiin Naistenklinikan laboratorioissa keväällä 2010.</p> <p>Säilyvyystutkimuksiin valitsimme 12 potilasnäytettä, joista jokaista jaettiin lämpötiloihin +20°C, +4°C ja -20°C yhden, kolmen ja seitsemän vuorokauden ajaksi. Säilytysten jälkeen näytteen kalprotektiinipitoisuus mitattiin. Tuloksia vertailtiin toisiinsa ja niiden pohjalta teimme johtopäätöksiä kalprotektiinin säilyvyydestä ulosteessa.</p> <p>Kalprotektiinipitoisuuden mittaamiseen käytetään ELISA-menetelmää, joka sisältää kolme inkubaatiota. Tällä hetkellä käytössä ovat 45 minuutin, 45 minuutin ja 25 minuutin inkubaatiot. Tavoitteenamme oli tutkia, voidaanko analyysiaikaa lyhentää tai menetelmää herkistää tämänhetkisestä muuntelemalla kahden ensimmäisen inkubaation pituutta.</p> <p>Homogeenisuustutkimuksen tarkoituksena oli mitata kalprotektiinipitoisuutta ulosteen eri näytekohdista. Otimme mukaan mahdollisimman heterogeenisiä ulosteita ja valitsimme näytekohtia, jotka sisälsivät epämääräisen näköistä, sulamatonta ulostetta. Tällä hetkellä laboratorion rutiinityöskentelyssä yritetään välttää muita kuin pelkkää sulanutta ulostetta sisältäviä kohtia.</p> <p>Säilyvyystutkimuksiemme perusteella kalprotektiini säilyy ulostenäytteessä parhaiten -20°C:ssa. Lämpötilassa +20°C säilytetyissä ulostenäytteissä kalprotektiinipitoisuuden lasku oli tilastollisesti merkitsevä vertailtaessa ensimmäisen ja seitsemännen säilytysvuorokauden pitoisuuksia. Inkubaatiotutkimuksissa selvisi, että ensimmäistä inkubaatiota voidaan luotettavasti lyhentää tämänhetkisestä. Toista inkubaatiota pidentämällä menetelmää voidaan herkistää. Tekemämme homogeenisuustutkimuksen mukaan nykyinen käytäntö on oikea. Näytteenotto kohta vaikuttaa kalprotektiinipitoisuuteen ja tulevaisuudessa-kin tulisi näytteenottokohdiksi valita ainoastaan sulanutta ulostetta.</p> | | |
| Avainsanat Kalprotektiini, uloste, säilyvyys, inkubaatio, homogeenisuus, ELISA-menetelmä | | |

| | | |
|---|----------------------------|----------------------------------|
| Degree Programme in Biomedical Laboratory Science | | Degree Programme in |
| Author/Authors Irene Erling and Laura Hakuli | | |
| Title Faecal calprotectin preservation and homogeneous studies and method's incubation study | | |
| Type of work Final project | Date Autumn 2010 | Pages 44+10 appendices |
| <p>ABSTRACT</p> <p>Faecal calprotectin is detected in patients having inflammatory bowel disease usually to make the right diagnosis or to evaluate the effect of medical care. We studied the faecal calprotectin preservation in a stool sample, analysis incubation times and how homogeneous a stool sample is regarding calprotectin. The studies were carried out at the laboratory of the HUS women's hospital in spring 2010.</p> <p>We chose 12 patient samples to our preservation studies. Each patient sample were preserved at +20°C, +4°C and -20°C temperature for one, three and seven days. After the storage, the content of calprotectin was measured in the samples. We compared the results with each other and, based on the results, we made conclusions of the preservation of calprotectin in stool samples.</p> <p>The ELISA-method which includes three incubations is used in measuring the content of calprotectin. Nowadays there are 45 minutes, 45 minutes and 25 minutes incubations in use. Our purpose was to study if the time used for analysis could be shortened or if the method could be sensitized by modifying the length of the two first incubations.</p> <p>In our homogeneous study, the aim of the study was to measure the content of calprotectin in different spots of the stool sample. We aimed to find the most possible heterogeneous stool and chose spots that included indefinite unmelted stool. At this point of the laboratory routines, all the other spots including something else but entirely melted stool are avoided.</p> <p>Based on our preservation studies, we found out that the calprotectin of the stool samples stays most stable in -20°C. Our incubation studies showed that the first incubation time may be shortened from the one used at the moment. By lengthening of the second incubation time the method may be sensitized. The results of the homogeneous study showed that the routine used in these days is correct and only melted stool must be chosen to the analysis.</p> | | |
| Avainsanat Calprotectin, stool, faecal calprotectin, preservation, incubation, homogeneous, ELISA-method | | |

SISÄLLYS

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | JOHDANTO | 1 |
| 2 | KALPROTEKTIININ KLIININEN MERKITYS | 2 |
| 2.1 | Tulehdukselliset suolistosairaudet | 2 |
| 2.2 | Kalprotektiini indikaattorina, tähytykset ja syöpäriski | 4 |
| 3 | KALPROTEKTIINIPITOISUUDEN MÄÄRITYS ULOSTEESTA | 5 |
| 3.1 | Preanalytiikka | 5 |
| 3.2 | Analytiikka | 6 |
| 3.2.1 | ELISA -menetelmä | 7 |
| 3.2.2 | Kalprotektiinin määrittäminen manuaalisesti työohjeen mukaan | 9 |
| 3.2.3 | BEP® 2000-laite | 10 |
| 3.3 | Postanalytiikka | 11 |
| 4 | KALPROTEKTIININÄYTTEIDEN SÄILYVYYS, ELISA-MENETELMÄN INKUBOINTIAJAT JA ULOSTEEN HOMOGEENISUUS | 12 |
| 4.1 | Säilyvyys | 12 |
| 4.2 | Inkubointi | 14 |
| 4.3 | Homogeenisuus | 14 |
| 4.4 | Aikaisemmat tutkimukset | 15 |
| 5 | TUTKIMUSONGELMAT JA TAVOITTEET | 17 |
| 5.1 | Näytteen säilyvyyden tutkimusongelmat ja tavoitteet | 17 |
| 5.2 | Inkubaatioaikojen tutkimusongelmat ja tavoitteet | 18 |
| 5.3 | Homogeenisuuteen liittyvät tutkimusongelmat ja tavoitteet | 19 |
| 6 | TYÖN SUORITUS | 19 |
| 6.1 | Säilyvyystutkimuksen suoritus | 20 |
| 6.2 | Inkubaatiotutkimuksen suoritus | 21 |
| 6.3 | Homogeenisuustutkimuksen suoritus | 22 |
| 7 | TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA | 23 |
| 7.1 | Kalprotektiinin säilyvyys | 25 |
| 7.2 | Kalprotektiinin inkuboinnit | 30 |
| 7.3 | Kalprotektiinin homogeenisuus ulostenäytteessä | 32 |
| 7.4 | Tulosten hyödynnettävyys | 34 |
| 8 | TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI | 34 |
| 8.1 | Työprosessin luotettavuus | 35 |
| 8.2 | Tulosten luotettavuus | 37 |

| | | |
|---|---|----|
| 9 | POHDINTA | 38 |
| | LÄHTEET | 42 |
| | LIITTEET | |
| | Liite 1. Säilyvyystutkimus, näytteiden pitoisuudet | |
| | Liite 2. Kalprotektiinipitoisuuden muutokset eri säilyvyysajoilla ja lämpötiloilla näytekohtaisesti | |
| | Liite 3. Säilyvyystutkimus/absorbanssiarvot | |
| | Liite 4. Inkubaatiotutkimus/absorbanssiarvot/nollanäytteet | |
| | Liite 5. Homogeenisuustutkimus/absorbanssiarvot | |
| | Liite 6. Trendiviivat | |
| | Liite 7. Tarkkatesti | |
| | Liite 8. Homogeenisuustutkimuksen näytteiden pitoisuudet pylväsdiagrammeina | |
| | Liite 9. Työvaihekuvat | |
| | Liite 10. Säilyvyys-, inkubaatio- ja homogeenisuustutkimuksen kuoppalevysuunnitelmat | |

1 JOHDANTO

Ulosteen kalprotektiinipitoisuutta mitataan pääsääntöisesti potilailta, joilta tutkitaan tulehduksellisen suolistosairauden (IBD) hoidon tehoa. IBD-potilailla esiintyy korkeita kalprotektiinipitoisuuksia sairauden akuutissa vaiheessa. Kalprotektiini on hajoamista hyvin kestävä proteiini, joka sitoo kalsiumia. Sitä esiintyy neutrofiilien granulosityeissä, sekä jonkin verran monosyyteissä ja aktivoituneissa makrofageissa. Kalprotektiinin pitoisuus ulosteessa heijastaa neutrofiilisten valkosolujen kulkeutumista suolesta tulehduksen limakalvon läpi. (Sipponen 2006: 27.)

Olemme saaneet opinnäytetyömme aiheen HUSLAB:in Naistenklinikan laboratoriosta. Opinnäytetyönämme on tutkia ulosteen kalprotektiinipitoisuuden säilyvyyttä, inkubaatiota, ja homogeenisuutta. Säilyvyystutkimuksen tarkoituksena on saada tietoa kalprotektiinipitoisuuden säilymisestä ulosteessa eri lämpötiloissa ja säilytysajoilla. Inkubaatiotutkimuksen aiheena on tarkastella, voidaanko ulosteen kalprotektiinin analyysiin käytettävää ELISA -menetelmää nopeuttaa tai herkistää kahta ensimmäistä inkubaatioaikaa muuntelemalla. Homogeenisuustutkimuksessa halutaan selvittää, onko näytteenotokohdalla väliä, eli pysyykö kalprotektiinipitoisuus samana erilaisista ulostenäytekohdista mitattuna.

Laboratorio hyötyy opinnäytetyöstämme, jos säilytystutkimustemme avulla voidaan määrittää tarkemmat kuljetus- ja säilytysohjeet. Inkubaatiotutkimusten avulla laboratorio pystyy mahdollisesti lyhentämään analyysiaikaa tai herkistämään menetelmää. Analyysiajan lyhentyminen olisi hyödyllistä, sillä näytemäärät kasvavat. Homogeenisuustutkimuksella saadaan tieto, onko näytekohdalla merkitystä tuloksen kannalta.

Ulosteen kalprotektiinin analysointiin käytettävä menetelmä on entsyymi-immunologinen ELISA-menetelmä. Analyysi voidaan tehdä Siemensin BEP®2000 analyaattorilla, mutta se ei ole käytössä. Tällä hetkellä analysointi tehdään käsin työohjeen mukaan. Työssämme kaikki laboraatiot suoritetaan manuaalisesti pesuria ja multi-scan mittauslaitetta apuna käyttäen.

2 KALPROTEKTIININ KLIININEN MERKITYS

Kalprotektiini on proteiinikompleksi, joka koostuu kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta ja yhdestä kevyetketjusta. Proteiinikompleksi on kalsium- tai sinkkisidonnainen ja kuuluu S-100 proteiineihin. Sitä koodittavat geenit ovat sijoittuneet kromosomiin 1q 21r. Neutrofiilisissä granulocyteissa huomattava osa solujen kokonaisproteiinimäärästä on kalprotektiinia, mutta sitä esiintyy myös monosyyteissä ja aktivoituneissa makrofageissa. Kalprotektiinin pitoisuutta voidaan tutkia ulosteesta, plasmasta ja muista kehon nesteistä. (Sipponen 2009: 33.)

Kalprotektiinin biologista tehtävää ei kokonaisuudessaan tunneta. Se toimii inhibiittorina sinkkiriippuvaisen matriksin metalloproteiinaasissa, jota tarvitaan haavojen parantamisessa, inflammaatiassa, verisuonten muodostamisessa ja kudostuhoissa. Elimistön liian suuri kalprotektiinikonsentraatio aiheuttaa solu- ja kudostuhoa. (Sipponen 2009: 33.) Kalprotektiinin pitoisuus elimistössä nousee, kun ihmisellä on tulehduksellinen (inflammatorinen) suolistosairaus (engl. IBD, inflamammatory bowel disease). IBD on yleisnimitys haavaiselle paksusuolitulehdukselle colitis ulcerosalle (UD), Crohnin taudille (CD) ja mikroskooppiselle koliitille (Sipponen 2006: 27.)

Kalprotektiini heijastaa hyvin Crohnin taudin kliinistä, endoskooppista ja histologista aktiivisuutta (Poullins – Foster – Shetty – Fagerholm - Mendall 2004: 279). Kaikista saatavilla olevista ulosteen merkkiainemittareista kalprotektiini on osoittautunut lupavimmaksi arvioitaessa tulehduksellisten suolistosairauksien kehitystä (Sipponen 2009: 19–26). Paksusuolen syöpää, paksusuolen polyyppeja tai muuta ruuansulatuselimistön syöpää sairastavilla potilailla todetaan myös korkeita kalprotektiiniarvoja. Merkkiaineella ei voida selvittää, onko potilaalle puhjennut syöpä vai onko kyseessä aktiivisessa vaiheessa oleva IBD. (Fagerhol – Dale - Røseth 1995: FIG4, FIG5.)

2.1 Tulehdukselliset suolistosairaudet

Tulehduksellisia suolistosairauksia ovat Crohnin tauti, ulseroiva koliitti sekä niihin usein liittyvä krooninen peräsuolen tulehdus. Tautien esiintyvyys on suurinta Pohjoismaissa, Brittein saarilla ja Pohjois-Amerikassa. Suomessa näiden tautien ilmaantuvuus on 20/100 000 asukasta ja vallitsevuus 300–400/100 000 asukasta. Tulehdukselliset suolistosairaudet ovat yleistyvää ilmiötä. (Niemelä 2007: 467.)

Etiopatogeneettisinä tekijöinä on tutkittu ympäristötekijöitä, kuten hyvää elintasoja, kaupunkiasumista, tulehduskipulääkkeiden ja mikrobilääkkeiden käyttöä, ehkäisytablettien käyttöä sekä tupakointia ja infektioita, esimerkiksi *Mykobacteriumavium ssp. paratuberculosis* –bakteerin osallisuutta Crohnin taudin syntyyn sekä suolen oman bakteeriflooran pahentavia ja toisaalta parantavia vaikutuksia. Immunoregulaatioita pidetään keskeisinä etiopatogeneettisinä tekijöinä, sillä TNF α ja muut sytokiinit ovat keskeisiä taudin synnyssä kuten myös puutteellinen tulehdusreaktion vaimennusmekanismi. Psykososiaalisia tekijöitä on myös tutkittu, sillä kyseessä on osittain psykosomaattinen sairaus taudin kulun ja oireiden osalta. Geneettisesti altistava geeni on löydetty, mutta inflammatoriset suolistosairaudet ovat kuitenkin multifaktoriaalisia tauteja, joissa ulkoiset tekijät ovat laukaisevia. Mekanismi on tuntematon. Oletetaan, että potilaan poikkeavuudet immuunivasteessa yhdessä laukaisevien tekijöiden, kuten infektioiden ja toksiinien kanssa johtavat krooniseen tulehdukseen. Immunologinen toleranssi peräsuolen omaa bakteeriflooraa kohtaan murtuu, jolloin suolen omat bakteerit aiheuttavat tulehduksen. (Niemelä 2007: 467–469.)

Tulehdukselliset suolistosairaudet muistuttavat taudinkuviltaan toisiaan. Selviä merkkejä peräsuolen haavaisesta koliitista ovat ripuli ja verinen tai limainen uloste. Joskus potilas hakeutuu hoitoon, kun vatsakivut ovat jatkuneet viikkoja, kuukausia tai jopa vuosia, kun taas joillain tauti alkaa akuutilla infektiokoliitilla. Lääkehoidolliset tai spontaanit relapsit kuuluvat taudinkuvaan. Taudin vaikeusasteesta riippuen oireita kuvaillaan skaalalla lievä, keskivaikea ja vaikea. (Niemelä 2007:469–470.) Crohnin tauti voi levitä koko ruuansulatuskanavaan. Spesifejä taudin oireita ovat vatsakipu, ripuli, kuume, laihduminen, veriuloste ja anaalialueen vaivat. Oireet ovat saattaneet jatkua kuukausia, joissain tapauksissa jopa vuosia ennen hoitoon hakeutumista. Yleisoireet ovat Crohnin taudissa hallitsevia. Jatkuvaa oireilua esiintyy 1/3:lla potilaista, vähäoireinen tauti on 1/3:lla ja relapsi-aktiivinen vuorotteleva 1/3:lla. Crohnin tauti jaetaan taudinkuvasta riippuen kolmeen alaluokkaan: strikturoivaan, fistuloivaan ja tulehdukselliseen. (Niemelä 2007: 487–490; Färkkilä 2007.) Joskus erotusdiagnostiikka voi olla hankalaa. Ongelmallisissa tilanteissa katsotaan kliinisen kuvan antamaa tietoa, endoskopiaa, radiologiaa ja histologiaa. (Niemelä 2007: 467; Färkkilä 2007).

Tulehduksellisten suolistosairauksien hoidossa on kaikkein tärkeimmässä asemassa lääkehoito. Lääkevalmisteista merkittävimpiä ovat 5-aminosalisyli, eli 5-ASA –valmis-

teet. Niiden käyttö riippuu haavaisen koliitin asteesta ja Crohnin taudin oireista. Jos 5-ASA –valmisteet ovat potilaalle riittämätön hoito, pystytään tauteja helpottamaan kortikosteroideilla. Myös steroideja on mahdollista antaa pistoksina. Potilaan käyttäessä sekä ASA-5 -lääkitystä että kortikosteroideja maksimaalisia määriä ilman, että tauti on saatu kuriin, voidaan mukaan ottaa vielä immunosuppressiiviset lääkkeet. Mikrobilääkkeitä voidaan käyttää, jos potilaan tila sitä vaatii, ei kuitenkaan jatkuvasti. Oireenmukainen hoito, esimerkiksi ripulilääkkeet, on usein tarpeellinen. (Niemelä 2007: 273–293; Färkkilä 2007.) Jos haavainen koliitti tai Crohnin tauti on edennyt syöpäasteelle, on ehdoton toimenpide kirurginen. Myös komplikaatiotilanteissa tai lääkehoidon ollessa tehoton potilaalle suositellaan kirurgista hoitoa. (Niemelä 2007: 468–469.)

2.2 Kalprotektiini indikaattorina, tähystykset ja syöpäriski

Auttaja T 1 ja 2 –solut tuottavat sytokiineja, kuten TNF α :aa, joilla näyttäisi olevan keskeinen asema tulehduksellisten suolistosairauksien synnyssä. Vaikka säätelyjärjestelmää ja sen toimintaa ei tarkkaan tunneta, on TNF α :n vasta-ainetta infliksimabia käytetty Crohnin taudin hoidossa. (Niemelä 2007: 468–469.) Ulosteesta määritettävät kalprotektiinin pitoisuudet näyttävät vastaavan hyvin tuumorinekroositekijäalfan (TNF- α) salpaajalla saavutettua limakalvon parantumista. Ulosteesta mitattavaa kalprotektiinia pidetään lupaavana menetelmänä arvioitaessa tulehduksellisten suolistosairauksien vaikeusastetta. Aikaisemmin on jouduttu turvautumaan ainoastaan epämiellyttävistä ja kalliista tähystyksistä saatuihin kudospalanäytteiden tuloksiin. Kalprotektiinin on todettu vastaavan hyvin sekä tähystyksessä saatuihin tuloksiin että kliinisesti todettuun taudin aktiivisuutteen. Kalprotektiinia voidaan pitää erinomaisena limakalvon parantumisen indikaattorina. Kalprotektiinin määrittäminen vähentää hoitovasteen arvioimiseksi tehtyjen tähystysten tarvetta. (Sipponen 2008: 22.)

Crohnin tautiin ja ulseroivaan koliittiin liittyy molempiin riski sairastua kolorektaalisyöpään. Sappitie- ja haimasyövän riski kasvaa myös näiden tautien myötä. Todennäköisyys sairastua syöpään kasvaa, kun tulehdus on kestänyt yli kahdeksan vuotta ja on levinnyt suureen osaan paksusuolta. Normaaliväestöön verrattuna riski on noin kolminkertainen. Jotta syöpä huomattaisiin ajoissa, tulee potilaan käydä ensimmäisen 8 vuoden jälkeen 1-3 vuoden välein otattamassa endoskopiabiopsiat peräsuolesta mahdollisimman laajalta alueelta. (Niemelä 2007: 498–499.) Ulosteen kalprotektiinipitoisuus nousee peräsuolen tai ruoansulatuselimistön syöpää sairastavilla, mutta ei välttä-

mättä sen enempää kuin taudin aktiivisessa vaiheessa yleensä. Kalprotektiinia ei siis voida käyttää peräsuolen syövän indikaattorina, vaan ainoastaan hoidon tehoa tai taudin vaikeusastetta arvioitaessa tai oikeanlaisia lääkkeitä etsittäessä. (Fagerhol ym. 1995.)

3 KALPROTEKTIINIPITOISUUDEN MÄÄRITYS ULOSTEESTA

Kalprotektiinia voidaan määrittää eri näytemateriaaleista. Ulostenäytteen lisäksi sitä voidaan määrittää plasmasta ja seerumista, virtsasta, syljestä, nivelnesteistä ja selkäydinnesteistä. (Sipponen 2009: 33.) Ulosteen kalprotektiinimääritys on spesifi tulehduksellisten suolistosairauksien ja ruuansulatuselimistön syövän suhteen. Sen pitoisuus ei nouse muiden sairauksien yhteydessä (Fagerhol ym. 1995). Esimerkiksi plasman ja seerumin kalprotektiinipitoisuus nousee myös nivelreuman, maksakirroosin, akuutin hyljintäreaktion, kystisen fibroosin ja monen muun taudin yhteydessä (Sipponen 2009: 33–34).

3.1 Preanalytiikka

Ennen näytteenottoa ei tarvitse noudattaa erityistä ruokavaliota. Ulostenäyte pitää ottaa puhtaaseen kaarimaljaan tai vastaavaan astiaan. Näytettä ei saa ottaa vessanpöntöstä. Näytettä tulee ottaa peukalonpään kokoinen nokare näytepurkkiin. Kalprotektiini on tasaisesti jakautunut ulosteeseen. Kertänäytteen ja ulostekeräyksen luotettavuus on yhtä hyvä. Näytepurkki ja pyyntökortti tulee toimittaa joko samana päivänä tai viimeistään seuraavana arkipäivänä laboratorioon. Näytettä voidaan säilyttää yön yli huoneenlämmössä. (HUSLAB 2010.) Näytteeksi riittää nykyisellä ELISA-menetelmällä 50 mg ulostetta. Näytteen kalprotektiinipitoisuus säilyy stabiilina huoneenlämmössä jopa viikon ajan. (Sipponen 2009: 34.)

Kalprotektiininäyte esikäsitellään homogenisoiden tasalaatuisiksi ja liuosmuotoon. Se tapahtuu punnitsemalla 100 µg ulostenäytettä koeputkeen ja lisäämällä sinne uuttoliuosta 4,9 ml (1:50). Näyteliuos sekoitetaan ensin vortexilla tasaiseksi ja sekoitusta jatketaan sekoittajalla 30 minuuttia. Uutettua näytettä otetaan 1 ml Eppendorff-putkeen ja sentrifugoidaan 10 minuuttia 10 000 rpm huoneenlämmössä. Supernatantti erotellaan putkesta analyysikäyttöön. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

3.2 Analytiikka

Kalprotektiini määritetään ulosteesta ELISA-menetelmällä BEP® 2000 - analysaattorilla tai käsin työhöjään mukaan. Määritysmenetelmässä käytetään valmista CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausta. Reagenssipakkaus sisältää vakio-kuvaajan piirtämiseen tarvittavat standardiliuokset punakorkkisissa pulloissa ja kontrollin vihreäkorkkisessa pullossa käyttövalmiina. Pakkauksessa on myös entsyymillä konjugoitu vasta-aine keltakorkkisessa pullossa, pesuliuos valkokorkkisessa, pNPP - substraattiliuos mustakorkkisessa ja keskeyttävä liuos valkokorkkisessa värittömässä pullossa. Pesulioksen kantaliuos (20xconc.) on laimennettava 1:20 (50 ml/950 ml) puhdistettuun veteen ennen käyttöä. Värittömän liuoksen pH on 8.0 +/- 0.2. Pesuliuosta käytetään pipettien ja näytekuoppien huuhteluun. Uuttoliuos on laimennettava 1:2,5 (90 ml/135 ml) puhdistettuun veteen ennen käyttöä, mistä saadaan 225 ml valmista liuosta. Liuos täytyy sekoittaa hyvin. Laimennettu liuos tulee säilyttää suljetussa pullossa. Jos kiteitä on muodostunut, tulee liuosta lämmittää 37°C:ssa vesihauteessa kunnes kiteet häviävät. Näytteen laimennettu kantaliuos: 10 kertainen konsentraatio on laimennettava 20 ml/180 ml puhdistettuun veteen. Liuos on väriltään keltainen ja korkki sininen. Liuos tulee säilyttää suljetussa pullossa (kuvio 1). (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

Standardien kalprotektiinipitoisuudet ovat A 7,8 µg/l, B 15,6 µg/l, C 31,3 µg/l, D 62,5 µg/l, E 125 µg/l, F 250 µg/l, G 500 µg/l ja H 1000 µg/l. Standardien ja muiden pakkauksessa tulevien reagenssien täytyy lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen käyttöä. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkaus 2009.) Standardien täytyy sijoittua pitoisuuskäyrälle oikein, jotta näytteiden pitoisuudet voidaan määrittää luotettavasti. Korkea vasta-ainesitoutumisvoimakkuus edistää herkkyttä. Herkkyys yhdistyy vinouteen pitoisuusvastekäyrällä. Analyysivirheen mittauksissa herkkyys voidaan myös yhdistää tarkkuuteen, aktiivisuuteen ja leiman havaittavuuteen. (Kaplan – Pesce 1996: 266, 268.)

Kontrollin kalprotektiinipitoisuus on tunnettu arvo. Tavoiterajat ovat 145–245 µg/l ja tavoitearvo 188 µg/l. Kontrollia käytetään jokaisessa kuoppalevyssä rinnakkaismäärityksenä. Kontrolli ja standardit määritetään kuten näytteet. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)



KUVIO 1: Reagenssipakkauksen sisältö. (Hakuli 2010).

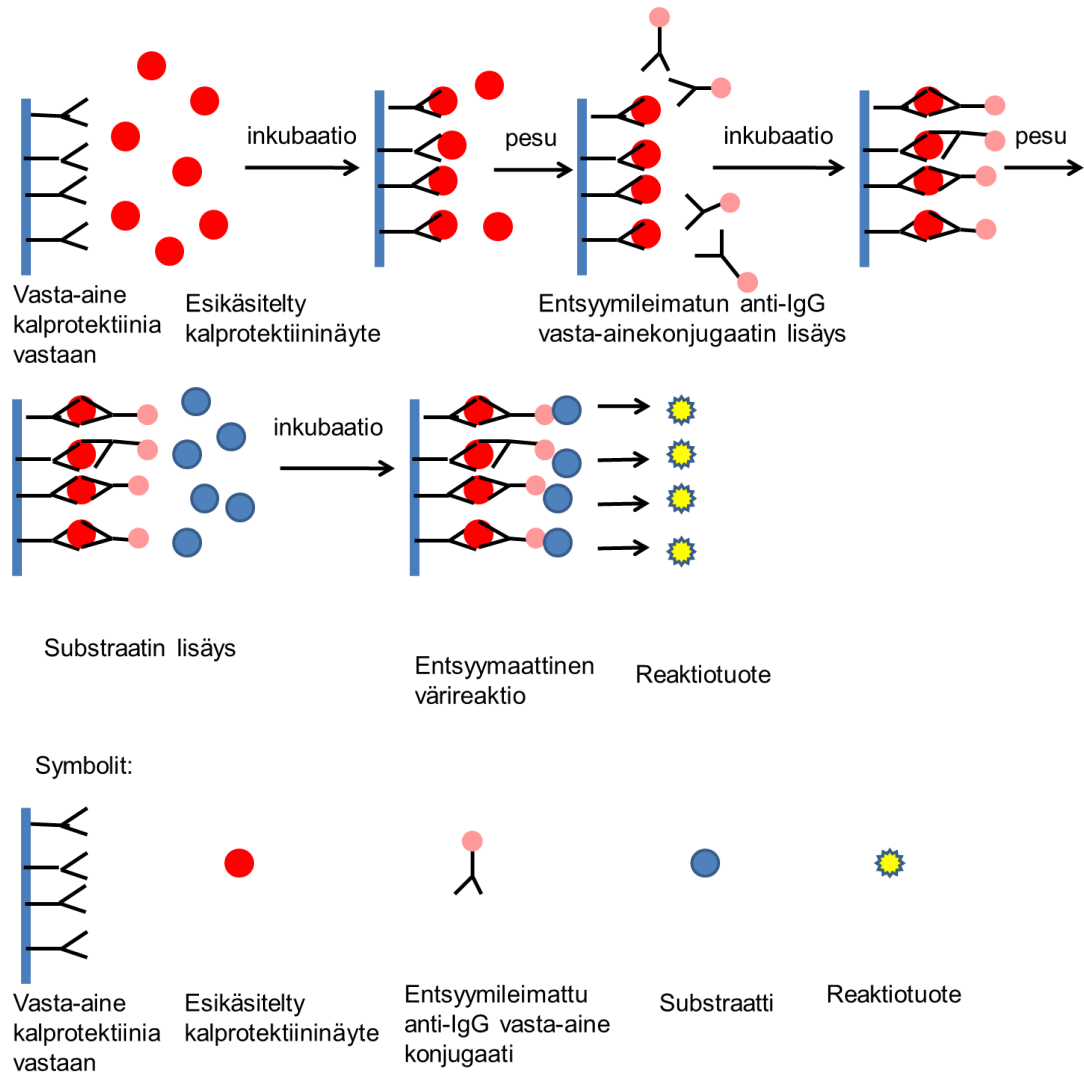
3.2.1 ELISA -menetelmä

Kalprotektiinin pitoisuus määritetään ELISA-menetelmällä. Menetelmässä mikrotittelevyjen näytekuppien pohjaan on kiinnitetty kanissa tuotettua polyklonaalista vastaainetta kalprotektiinia vastaan. Kuoppaan lisätään 50 µl homogenisoitua ja laimennettua ulostenäytettä (näytelaimennos: 1:50, 20 µl näytettä/ 1000 µl laimennosliuosta), standardeja ja kontrolli rinnakkaisina. Tasosekoittimessa huoneenlämmössä tapahtuvan 45 minuutin inkuboinnin aikana kalprotektiini kiinnittyy kiinteän faasin polyklonaaliseen vasta-aineeseen. Ylimääräiset kiinnittymättömät immunokompleksit pestään pois. Kuoppaan lisätään 50 µl konjugaattia, joka sisältää kanissa tuotettuja entsyymileimattuja anti-IgG -vasta-ainemolekyylejä. Nämä entsyymileimatut anti-IgG -vasta-ainemolekyylit tarttuvat näytteeseen 45 minuutin inkuboinnin aikana tasosekoittimessa huoneenlämmössä. Syntyy niin sanottu Sandwich -kompleksi. Ylimääräiset, kiinnittymättömät konjugaatit pestään pois. Entsyymisidosten määrä on suoraan verrannollinen näytteen kalprotektiinipitoisuuteen. Lisätään 100 µl substraattia. Kuoppalevyjä inkuboidaan 25 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna 25 minuutin ajan. Inkubaation aikana entsyymi katalysoi substraatin reaktiotuotteeksi. Lisätään 100 µl 1mol NaOH:a reaktion lopettamiseksi ja mitataan näytteen pitoisuus, kun standardi H (1000 µg/l) on saavuttanut noin 2.0 O.D. -arvon. Reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen näytteen kalprotektiinipitoisuuteen. (Kuvio 2 s. 9). (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009; Kricka 2008: 166–167.)

Vasta-aine reagoi ainakin kuuden eri kalprotektiinin epitoopin kanssa, mikä mahdollistaa hyvän mittausvasteen, vaikka jokin epitooppi olisi vahingoittunut tai peittyisi jonkun

muun kompleksimuodon taakse ulosteessa. Reaktioiden intensiteetti on mitattavissa spektrofotometrillä aallonpituudella 405 nm. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

Määrittämissä käytetään polyklonaalisia, kanissa tuotettuja vasta-aineita juuri kalprotektiinin monen epitoopin vuoksi. Polyklonaaliseen kalprotektiinin vasta-aineeseen kiinnitetään monoklonaalinen leimattu vasta-aine, jonka ansiosta näytteen pitoisuus saadaan mitattua. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.) Polyklonaalisia vasta-aineita tuotetaan yleensä laboratorioita varten eläimellä. Eläin immunisoidaan määritetyllä yhdisteellä, jolloin se alkaa tuottaa useita erilaisia spesifisiä vasta-aineita, joissa antigeenien sitoutumiskohdat eroavat toisistaan. Vasta-aineet eristetään ja puhdistetaan eläimen seerumista. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat yleisiä luonnossa, koska niiden vaihtelu assosioi immunologisen herkkyyden kanssa. Vasta-aineet tehoavat moneen lähes samanlaiseen rakenteeseen. Niillä on kuitenkin alhainen spesifisyys verrattaessa monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Lisäksi on olemassa ristireaktion vaara, koska polyklonaalinen vasta-aine sisältää useita vasta-aineita. (Craft 2000: 133,160.)



KUVIO 2: Ulosteen kalprotektiinipitoisuuden määrittäminen ELISA-menetelmällä. (Mukaiillen Halonen 2003: 95.)

3.2.2 Kalprotektiinin määrittäminen manuaalisesti työhöjeen mukaan

Esivalmistellut ja laimennetut näytteet, käyttövalmiit standardit ja kontrolli pipetoidaan kuoppalevyille rinnakkaisina. Kuoppalevy peitetään mikrofilmillä ja laitetaan tasoravistelijaan inkuboitumaan. Pohjaan koskemista on vältettävä, sillä mittaus tapahtuu pohjan läpi. Inkuboinnin jälkeen suoritetaan kuoppien pesu pesurilla, johon voidaan ohjelmoida oikea ohjelma. Konjugaatti lisätään kuoppiin monikanavapipetillä tai annostelijalla. Kuoppalevyn käsittelyä jatketaan tasoravistelijalla ja pesurilla, minkä jälkeen lisätään substraatti monikanavapipetillä tai annostelijalla. Kuoppalevy peitetään foliolla ja jätetään inkuboitumaan huoneenlämpöön pöydälle. Reaktio lopetetaan NaOH:lla moni-

kanavapipettiä käyttäen, minkä jälkeen kuoppalevy viedään välittömästi mittausanalyysaattoriin. Liitteessä 9 on kuvia eri työvaiheista.

Fotometriset mittaukset noudattelevat Lambert Beerin lakia, jossa liuoksessa olevan yhdisteen pitoisuus on suoraan verrannollinen absorboituneen valon määrään. Määritettävän näytteen tuloksen laskemiseksi tarvitaan määritettävän yhdisteen pitoisuus, vakion pitoisuus, määritettävän yhdisteen absorbanssi ja vakion absorbanssi. Määritettävä konsentraatio = määritettävän yhdisteen absorbanssi/ vakion absorbanssi X vakion pitoisuus. (Halonen 2003a: 66–67.)

Mittaukseen vaikuttavia häiriötekijöitä ovat näytekupppalevyssä oleva naarmu, kupla, pöly, liuoksen pyörre, väärä näytetilavuus tai vaillinainen pesu. (Siemens BEP®2000-ohje, Siemens BEP® III-ohje 2009.)

3.2.3 BEP® 2000-laite

BEP® 2000 on automaattinen mikrokuoppalevyanalyysaattori, joka käyttää ELISA-menetelmää. Analyysaattori koostuu sisäänsyöttövaunusta, kuljetus-, pesu- ja inkubaatioyksiköistä sekä aspiraatio/annosteluyksiköstä. Laitteen sisä- ja ulkopuolelta otetut kuvat ovat kappaleen lopussa (kuvio 3, kuvio 4). Laitteistoon kuuluu myös Windows-pohjainen tietojenkäsittely-ohjelma. Sisäänsyöttövaunussa oleva viivakoodilukija tunnistaa kuoppalevyjen viivakoodit. Viivakoodien mukaan laite osaa suorittaa tarvittavat analyysit ja laskea analyysihin tarvittavat reagenssimäärät. Näytteet siirtyvän ensin inkubaattoriin, jossa ne ovat tarvittavan ajan. Inkubaattoriin mahtuu kerralla kymmenen levyä. Kuljetusyksikkö siirtää levyt määrätyn inkuboinnin jälkeen pesupisteeseen, jossa on kaksirivinen 8-kärkinen pesuharava. Pesuyksikössä näytteet dispensoidaan ja aspiroidaan. Paine tuotetaan suoraan pesupulloon, minkä vaikutuksesta neste siirtyy letkujen kautta kuoppalevyille. Alipaineen avulla pesuneste imetään näytekupista jätessäiliöön. Reagenssiannostelija laimentaa reagenssit ja pipetoi ne kertakäyttöisillä reagenssiruiskuilla mikrokuoppalevyille. Mittausyksikössä mitataan näytekupista niiden pitoisuudet fotometrisesti. Fotometrisenä valonlähteenä on halogeenilamppu, joka emittoi eli lähettää valoa kaikkiin suuntiin spektrinä. Lampun takana oleva heijastin heijastaa väärin heijastuneen valon lampun etupuolelle lisäten samaan suuntaan säteilevän valon intensiteettiä eli voimakkuutta. Valo kohdistetaan filttteriroottorille linssien avulla. Häiriöfilttterin läpi kuljettuaan valo jakautuu yhdeksään samansuuntaiseen valon säteeseen

yhdeksänkärkisen valonohjaajan avulla. Näistä säteistä kahdeksan kulkee omien pienten linssien kautta ja läpäisee pohjan kautta yhden kuoppalevyn kuopan. Fotodiodi mittaa ja määrittää jokaisen yksittäisen valosäteen. Mittauksen ajaksi kuoppalevy viedään fotometrini sisälle, jossa se on valolta suojattuna, ettei ulkopuolinen valo pääse häiritsemään mittausta. (Siemens BEP® 2000 Käyttöohje 2009.)

Mittauksen päätyttyä suoja avautuu ja kuoppalevy siirtyy pesupisteeseen. Ajon päätyttyä nesteet imetään pois tai jätetään kuppiin. (Siemens BEP® 2000 Käyttöohje 2009.) Fotometriassa haluttu aallonpituus valitaan aallonpituuden valitsijalla eli filtterillä. Kyseisen aallonpituuden valo läpäisee näytteen, jossa analysoitava aine on optisesti kirkkaassa liuoksessa. Osa valosta absorboituu näytteeseen. Emittoituvan valon intensiteetti mitataan detektorilla. Detektori muuttaa valon tallennettavaan muotoon elektroniseksi mittaussignaaliksi. Säteilyn absorbanssia mitataan näytteeseen tulevan valon ja näytteen läpäisseen valon intensiteettien avulla. Absorptioarvo lasketaan näiden avulla. (Halonen 2003b: 94.) Siemens BEP®2000-laite suorittaa ennen kuoppalevyllä olevia näytteiden mittausta taustan mittauksen ja mittauksen ilman näytettä. (Siemens BEP® 2000 Käyttöohje 2009.)



KUVIO 3: Siemens-BEP®2000-laite (Hakuli 2010).



KUVIO 4: Siemens BEP®2000-laite sisältä (Hakuli 2010).

3.3 Postanalytiikka

Kalprotektiinin viiteyläraja on 100 µg/g ulostetta (HUSLAB 2010). Normaaleja arvoja ovat kaikki alle 100 µg/g. Viitearvo perustuu tutkimukseen, jossa tutkittiin suolisto-oireista kärsiviä henkilöitä. Ulosteen kalprotektiinipitoisuuden herkkyys ja spesifisyys olivat pitoisuudella 100 µg/g 82 % ja 83 %. Kun raja-arvoksi asetettiin 300 µg/g, oli

herkkyys jo 100 % ja spesifisyys 97 %. Inflammaation aikana kalprotektiinipitoisuus ulosteessa voi nousta jopa kymmeneen tuhansiin µg/g. (Sipponen 2009: 34, 36.)

4 KALPROTEKTIININÄYTTEIDEN SÄILYVYYS, ELISA-MENETELMÄN INKUBOINTIAJAT JA ULOSTEEN HOMOGEENISUUS

Naistenklinikan sairaalaan lähetetään ulosteen kalprotektiininäytteitä eri puolilta Suomea toiminnan yhtenäistymisen ja kustannustehokkuuden vuoksi. Yhtenäiset lähettämistavat vaativat logistiikan tarkkaa miettimistä ja näytteiden säilyvyyden tuntemista, jotta ne ovat saapuessaan laboratorioon määrittyskelpoisia. Tämä pätee etenkin, jos näytettä säilytetään yli vuorokausi ennen analyysin tekoa. (Tanner 2007: 22.)

Kalprotektiininäytteiden säilyvyyttä pakastimessa (-20°C), jääkaapissa (+4°C) ja huoneenlämmössä (+20°C) ei ole aikaisemmin tutkittu Naistenklinikan laboratoriossa. Reagenssipakkauksen valmistajan NovaTec Immundiagnostica GmbH mukaan näytteet säilyvät analyysikelpoisina neljä vuorokautta huoneenlämmössä. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

Ulosteen kalprotektiininäytteiden inkubaatioajat määrittävät pitkälti sen, kuinka paljon aikaa koko analyysiin tekemiseen kuluu. Inkubaatioaikojen tarkoituksena on vahvistaa analyysissä tapahtuvia reaktioita. Reaktio ei tapahdu täydellisenä, jos inkubaatioaika ei ole optimi. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

Naistenklinikan laboratorioon tulevat ulosteen kalprotektiininäytteet ovat näytepurkeissa erilaisina heterogeenisinä massoina. Punnituksessa pyritään ulosteesta erottelemaan mahdollisimman homogeeninen näyteotos.

4.1 Säilyvyys

Biologisissa, ihmisistä otetuissa näytteissä jatkuvat samat kehossa tapahtuvat aineenvaihdon reaktiot myös sen ulkopuolella, ulkopuolella tosin hidastettuina. Tämä tarkoittaa, että näytteen koostumus muuttuu verrattuna näytteenottohetkellä vallinneeseen tilanteeseen, josta on tarkoitus saada käsitys analysoitaessa. Monet analysoitavat yhdisteet ovat herkkiä säilytykselle, koska niiden pitoisuudet muuttuvat ajan kuluessa jatka-

essaan metabolisoitumista. Näyte voi myös kontaminoitua tai siihen saattaa tulla ulkopuolelta lisää aineita, jolloin näytteen koostumus voi muuttua. Oikeanlaisen säilytyksen avulla halutaan näytteessä tapahtuvat reaktiot pysäyttää tai reaktioiden määrä minimoida, sekä säilyttää näyte sellaisena kuin se näytteenottohetkellä on ollut. (Tapola 2003: 29.)

Näytteiden käsittely, lähettäminen ja kuljetus ovat suurimpia virheille alttiita vaiheita. Näytteen nopea kuljetus ja lyhyt säilytys olisivat tulosten luotettavuuden kannalta parhaimmat tavat. Näytteessä olevien komponenttien säilyvyyteen vaikuttavat lämpötila, auringonvalo ja näyteastian materiaali sekä aika ennen näytteen analysointia. Kuljetuksen ja käsittelyn aikana lämpötila tulee pitää mahdollisimman alhaisena, mutta ei sellaisena, että se muuttaa näytettä. Näytettä tulee suojata auringonvalolta. Sopivilla säilöntäaineilla voidaan vähentää virhetekijöiden vaikutuksia. (Tapola 2003: 31.)

Yleensä ulostenäytteitä tulisi säilyttää jääkaappilämpötilassa. Tällä vältetään se, etteivät näytteessä olevat bakteerit käytä tai tuota tutkittavia komponentteja, jotka saattaisivat aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Näytteen kuljetukseen liittyviä ongelmia ovat pitkät kuljetukset, joiden aikana tutkittavan näytteen analysoitavan tekijän säilyvyys vaarantuu. Lämpötilan vaihtelu sekä näytteiden haihtuminen ja vuotaminen synnyttävät analysoitavien osatekijöiden pitoisuuksien muutoksia tai näytteen määrän riittämättömyyttä. Pakastettu näyte ei saisi sulaa lähetyksen aikana. Tavallisen postin mukana lähetettävät näytteet tulee merkitä selvästi, jotta näytteet saapuvat varmasti vastaanottajalle. Viikonloput ovat välillä hankalia näytteiden säilyvyyden takia. (Tapola 2003: 30 - 31.)

Ulosteessa oleva kalprotektiini on vakaa Ca^{+2} läsnäollessa jopa seitsemän vuorokautta huoneenlämmössä. Tämä tekee mahdolliseksi sen, että ulostenäyte voidaan lähettää tavallisen postin mukana analytiikan suorittavaan laboratorioon. (Sipponen 2009: 34.) Ca^{+2} läsnäollessa kalprotektiini on myös vastustuskykyinen proteolyttisille entsyymeille ja kuumennukselle (Røseth – Fagerhol - Aaland - Schjonsby 1992: 793).

4.2 Inkubointi

Entsyymireaktion nopeuteen vaikuttavat optimaalinen ja tarkka pH sekä reaktiolämpötila (Penttilä 2003: 82). Kalprotektiinipitoisuuden määrittämiseen käytettävässä ELISA -menetelmässä on kolme inkubointitapahtumaa. Ensimmäisen inkubaation aikana näytteessä oleva kalprotektiini sitoutuu kanissa tuotettuun polyklonaaliseen vasta-aineeseen. Toisen inkubaation aikana kompleksiin sitoutuu monoklonaalinen vasta-aine, johon on konjugoitu eli sidottu entsyymileima. Syntyy niin sanottu sandwich -kompleksi. Kolmannessa inkubaatioissa lisätty substraatti hajoaa entsyymin vaikutuksesta muodostaen fotometrillä kvantitoitavan yhdisteen. (CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009.)

4.3 Homogeenisuus

Ulostenäyte voi olla tasajakoinen tai sisältää erilaisia ruuan sulamattomia tähteitä. Homogeeninen näyte on laadultaan tasajakoinen, eikä siihen vaikuta, mistä kohtaa tutkittava otos otetaan, koska sen ominaisuudet pysyvät muuttumattomina koko näytteessä. Heterogeenisessä näytteessä tutkittavan ominaisuuden pitoisuus vaihtelee eri kohdissa. Mitä epätasajakoisempi näyte on sitä tarkemmin pitää harkita, mistä kohtaa näytettä otetaan mahdollisimman edustava otos. Myös aineiston koko ja se, paljonko näytteessä on tutkittavaa ainetta, vaikuttavat näytteenottoon. Näytteen biokemiallinen aktiivisuus vaikuttaa näytteenottoon, koska varastoinnin tai käsittelyn aikana tapahtuvat biokemialliset reaktiot aiheuttavat muutoksia näytteen ominaisuuksiin ja koostumukseen. Paljon vettä sisältävät näytteet ovat biokemiallisesti aktiivisempia kuin näytteet, joiden kuiva-ainepitoisuus on suuri. (Mattila - Piironen - Ollilainen 2003: 20–21.)

Laboratorioon tulevan ulostenäytteen määrä voi olla niin suuri, ettei sitä voida kokonaan ottaa analyysiin. Näytteestä tulee tällöin ottaa mahdollisimman pätevä otos, joka edustaisi mahdollisimman hyvin alkuperäistä näytettä. Tähän asiaan vaikuttaa näytemateriaali ja määritettävä aineosa. Monissa tapauksissa näytettä tulee homogenisoida, jotta saataisiin tasalaatuinen näyte. Homogenisointi tulee suorittaa laitteella tai välineillä, jotka eivät saastuta, hukkaa tai muuta näytteistä mitattavien ominaisuuksia. Näytemateriaalista riippuen voidaan käyttää erilaisia menetelmiä ja välineitä, joilla voidaan suorittaa näytteen pienennys. Tapa voi olla esimerkiksi lusikkanäytteenotto, näytteen puolitus

tai jokin muu, jolla mahdollistetaan edustava otos näytteestä. Kohtalaisen homogeenisista näytteistä voidaan ottaa yleensä suoraan näyte sekoituksen jälkeen käyttämällä yllämainittuja tapoja hyödyksi. Heterogeenisten näytteiden pienennyksessä täytyy käyttää enemmän harkintaa kuin homogeenisissa näytteissä. Heterogeeninen näyte tulee pyrkiä homogenisoimaan ennen analyysiä, jotta tarvittava näyteotos olisi tulokseltaan luotettava. (Mattila ym. 2003: 27–28.)

4.4 Aikaisemmat tutkimukset

Røseth ym. (1992) ovat tutkineet ulosteen kalprotektiinin säilyvyyttä. Näytteitä säilytettiin $+4^{\circ}\text{C}$:n ja $+20^{\circ}\text{C}$:n lämpötiloissa 24 tuntia, 48 tuntia ja seitsemän vuorokautta. Kun näytteitä oli säilytetty $+4^{\circ}\text{C}$:ssa 48 h tai $+20^{\circ}\text{C}$:ssa 24 h, muutosta kalprotektiinin pitoisuudessa ei todettu. Pitoisuudessa havaittiin 17,5 % nousu 48 tunnin jälkeen säilytettäessä näytteitä $+20^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Kun näytteitä oli säilytetty seitsemän päivää $+20^{\circ}\text{C}$:ssa, tutkijat totesivat, että kalprotektiinin pitoisuudessa ei muutosta enää ollut havaittavissa. Tutkimuksessa todettiin muutosten olevan pieniä ja ulosteen kalprotektiinin säilyvyyden olevan erinomainen. Tämän tutkimuksen avulla on myös haettu patenttia kalprotektiiniproteiinin määrittämiseksi ELISA-menetelmällä nimellä diagnostinen testi ja reagenssipakkaus ruuansulatuselimistön sairauden tai häiriön toteamiseksi (engl. diagnostic test and kit for disease or disorders in the digestive system). Tätä tutkimusta on käytetty usean muun tutkimuksen pohjana kerrottaessa ulosteen kalprotektiinipitoisuuden stabiilisuudesta.

Silberer ym. (2005; 51: 117–126) tutkivat viittä eri leukosyyttien proteiinipitoisuutta ulosteesta terveitä henkilöitä ja potilailta, joilla oli tulehduksellinen suolistosairaus tai ärsyntyneen suolen syndrooma. Heidän tutkimuksensa mukaan kalprotektiinin supernatantin pitoisuus pysyi huoneenlämmössä stabiilina neljän päivän ajan.

Bunn, Bisset, Main, Golden (2001: 4, 7) ovat tutkineet kalprotektiinia taudin aktiivisuuden mittarina lapsuusiän tulehduksellisessa suolistosairaudessa. He ovat säilyttäneet ulostenäytteistä tehtyjä supernatantteja alle -20°C :ssa. Heidän mukaansa näytteitä pystytään säilyttämään edellä mainitulla tavalla, sillä kalprotektiinin pitoisuus pysyy stabiilina ulosteessa.

Reagenssivalmistaja Bühlmann (2009) mainitsee kalprotektiinireagenssipakkausohjeessaan, että pakastettaessa näytteen kalprotektiinin pitoisuus voi nousta hieman, jos näyte sisältää neutrofiilejä. Pidemmällä säilytysajoilla on kuitenkin suositeltavaa jäädyttää näyte. Näytekupissa ei saa olla kemiallisia tai biologisia säilytysaineita.

Røseth ym. (1992) ovat tutkiessaan ulosteen kalprotektiinin säilyvyyttä huomanneet, että käytettäessä yhden tunnin inkubointiaikaa ilmenee virheellisesti matalia arvoja jos näyte sisältää enemmän kalprotektiinia kuin korkeamman pitoisuuden standardi. Virhetä saadaan kuitenkin korjattua laimentamalla näytettä.

Gaya ym. (2005) olivat tutkiessaan kalprotektiinin mittauksen luotettavuutta aktiivista Crohnin tautia sairastavilla potilailla käyttäneet seuraavia inkubaatioaikoja: ensimmäisessä ja toisessa inkubaatiossa 45 minuuttia ja kolmannessa inkubaatiossa 30 minuuttia. Näillä inkubaatioajoilla tulokset ovat olleet luotettavia.

Tutkittaessa ulosteen kalprotektiinia indikaattorina eri sairauksille, on monissa tutkimuksissa käytetty entsyymi-immunologista menetelmää. Sen on todettu olevan käyttökelpoinen tutkittaessa kalprotektiinipitoisuutta ulosteesta. Tosin inkubaatioajat tutkimuksissa vaihtelevat.

Fagerhol ym. (1995) toteavat menetelmän patenttia varten tehdyssä tutkimuksessaan, että kalprotektiini on jakautunut näytteeseen tasaisesti. He ovat tutkineet samaa ulostenäytettä kolmesta satunnaisesti valitusta kohdasta. Neljäs näyte oli sekoitettu ulostenäyte. Sekoitettun näytteen kalprotektiinipitoisuus oli sama kuin kolmessa satunnaisesti valitusta näytekohdasta mitattu pitoisuus.

Røseth, Schmit ja Fagerhol (1999) ovat käyttäneet tutkimuksessaan ” Ulosteeseen erityyppien indium-111 -päälysteisten granulosityttien ja kalprotektiinin, granulositytin merkkiproteiinin, välinen korrelaatio tulehduksellista suolistosairautta sairastavilla potilailla” mekaanisesti sekoitettua ulostenäytettä. Tutkimuksessa oli saatu luotettavia tuloksia.

5 TUTKIMUSONGELMAT JA TAVOITTEET

Opinnäytetyö tehdään HUSLAB:n Naistenklinikan sairaalan laboratoriossa, jossa tehdään suurin osa ulostenäytteiden kalprotektiinipitoisuusmäärytyksistä. Kuljetuksissa tulee ottaa huomioon näytekuljetusten kesto, lähetysolosuhteet ja näytteiden säilyvyys, jotta näytteet pysyisivät analysointikelpoisina.

Näytteen analysointiin käytetään ELISA-menetelmää. Analyysimenetelmä sisältää kolme eri inkubaatiota. CALPRO reagenssipakkauksen valmistaja NovaTec Immunodiagnostica GmbH antaa omat viitteelliset inkubaatioaikansa. Monissa tutkimuksissa on tutkittu kalprotektiinia indikaattorina, mutta ei varsinaisesti inkubaatioaikojen pituutta. Naistenklinikan sairaalan laboratorioon tulee paljon kalprotektiininäytteitä, ja suurin aika analyysiä tehdessä menee inkubaatioihin. Inkubaatioaikoja haluttaisiin lyhentää, jotta näytemääriä voitaisiin nostaa ja aikaa jäisi muihin tehtäviin.

Ulosteen kalprotektiininäytteen homogeenisuuden merkityksestä ei ole tutkittua tietoa. Kalprotektiinin ainoastaan todetaan olevan tasaisesti jakautuneena ulosteessa. Oletuksena kuitenkin on, että yhden näytteen otoksen tulisi olla mahdollisimman tasalaatuinen.

5.1 Näytteen säilyvyyden tutkimusongelmat ja tavoitteet

Ohjeen mukaan näytteet voidaan lähettää huoneenlämpöisinä. Tarkkaa lähetysaikaa ei ole määritelty, mutta HUSLAB:n ohjekirjassa sanotaan ulosteen kalprotektiinin säilyvän hajoamatta jopa 5-7 vuorokautta. Pitkien kuljetusten ja erilaisten säilytysten takia on tarve tutkia näytteiden säilyvyyttä -20°C :ssa, $+4^{\circ}\text{C}$:ssa ja $+20^{\circ}\text{C}$:ssa kolmena eri ajankohtana.

Säilytyksen tutkimusongelmien perustana on logistiikka. Näytteitä voidaan tällä hetkellä lähettää ja säilyttää huoneenlämpöisinä eli $+20^{\circ}\text{C}$:ssa ja jääkaappilämpötilassa eli $+4^{\circ}\text{C}$:ssa. Niitä säilytetään analyysin jälkeen pakastinlämpötilassa -20°C :ssa.

1. Muuttuuko kalprotektiinin pitoisuus huomattavasti/merkittävästi säilytystavasta riippuen?
2. Millä säilytystavoilla kalprotektiinipitoisuus pysyy stabiilimpana pidemmällä säilytysajoilla?
3. Kuinka kauan näytettä voidaan säilyttää eri lämpötiloissa?

4. Mikä on paras lämpötila kuljettaa ja säilyttää ulosteen kalprotektiininäytteitä?

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia kalprotektiinin säilyvyyttä huoneenlämmössä, jääkaappilämpötilassa ja pakastinlämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan. Tutkimustyö suoritetaan seuraavasti: ensimmäisenä päivänä laboratoriotyöntekijöiden analyysin jälkeen näytteet jaetaan eri säilyvyysluokkiin. Näytteet analysoidaan yhden, kolmen ja seitsemän päivän säilytyksen jälkeen. Tavoitteena on selvittää, kuinka kauan kalprotektiinin pitoisuus säilyy muuttumattomana eri säilytyslämpötiloissa.

Opinnäytetyön tuloksena yritetään saada tietoa näytteiden säilytysajasta ja siihen liittyvistä olosuhteista, joilla voidaan arvioida näytteiden analysointikelpoisuutta. Työn avulla voidaan tarvittaessa tarkentaa näytteiden kuljetus- ja säilyvyysohjeita. Tulosten perusteella voidaan antaa asiakkaille tietoa näytteenkuljetuksesta ja säilytyksestä, joka auttaa asiakasta näytteiden oikeaoppisessa lähettämisessä. Tutkittaessa eri lämpötilojen vaikutusta kalprotektiinipitoisuuteen voidaan arvioida, voidaanko näytteitä pakastaa ennen analysointia ja voidaanko niitä säilyttää analyysin jälkeen pakastimessa niin, ettei kalprotektiinipitoisuus alene tai nouse näytteessä.

5.2 Inkubaatioaikojen tutkimusongelmat ja tavoitteet

CALPRO -reagenssipakkauksen ohjeen mukaan näytteet inkuboidaan analyysin aikana kolme kertaa. Ensimmäinen inkubaatio kestää 45 minuuttia, toinen 45 minuuttia ja kolmas 25 minuuttia. Inkubaatioiden tarkoituksena on vahvistaa reaktioita, jotta mitattava tulos olisi pitoisuudeltaan oikea. Pitkien inkubaatioaikojen takia on tarve tutkia standardien käyttäytymistä lyhyemmillä inkubaatioajoilla analyysiin käytettävän ajan lyhentämiseksi. Lisäksi halutaan tietää, vaatisiko menetelmä todellisuudessa pidemmät inkubaatiot kuin ohjeessa sanotaan.

Tarkoituksenamme on tutkia eri inkubaatioaikojen vaikutusta standardien ja nollanäytteiden absorbansseihin.

1. Minkälainen vaikutus eri inkubaatioajoilla on standardien absorbanssilukemiin?
2. Voidaanko inkubaatioajoja lyhentää tämänhetkisistä ilman että menetelmän herkkyys kärsii?
3. Pystytäänkö inkubaatioajoja pidentämään tämänhetkisistä, jotta menetelmää voitaisiin herkistää?

5.3 Homogeenisuuteen liittyvät tutkimusongelmat ja tavoitteet

Homogeenisuustutkimusten tarkoituksena on arvioida, muuttuuko kalprotektiinipitoisuus eri näytekohdista otettuna. Tähän asti kuituja, siemeniä ja muita ulosteesta erottuvia ruoka-ainejäämiä on vältelty mahdollisuuksien mukaan näytteen esikäsittelyvaiheessa. Haemme vastausta seuraavaan kysymykseen:

1. Pysyykö näytteen kalprotektiinipitoisuus samana näytteenottokohdan ja näytteen koostumuksen muuttuessa?

6 TYÖN SUORITUS

Tutkimukset suoritettiin Naistenklinikan laboratoriossa 21.5.2010 – 1.6.2010. Työn suoritusajataulu on esitetty taulukossa 1. Tarvitsimme laboratoriossa suoritettavaa työtämme varten hyväksytyt tutkimuslupa-anomuksen ja vakiosopimuksen. Aloitimme inkubaatiotutkimuksilla, jotka suoritettiin pelkillä standardeilla. Standardeja on 8 kpl. Säilyvyystutkimuksissa käytössämme oli 12 potilasnäytettä, joita käsitelimme eri tavoin. Potilasnäytteitä ei käsitelty henkilötiedollisina, vaan näytteet numeroitiin juoksevin numeroin, jotta potilaiden tietosuoja ei vaarantuisi. Tulokset kirjattiin ainoastaan numerotunnisteella. Homogeenisuustutkimus suoritettiin seitsemällä eri näytteellä ja yhden näytteen kuudella eri supernatantilla. Inkubaatiotutkimuksiin sisällytettiin myöhemmin tutkimus pelkillä nollanäytteillä eli näytteen uuttoliuksella ja reagensseilla. Nollanäytteen yleisimpänä tarkoituksena on mitata taustaa, mutta me tutkimme niillä eri inkubaatioaikojen vaikutusta absorbansseihin.

TAULUKKO 1: Suoritusaikataulu

| | |
|-----------------------|---|
| Perjantai 21.5.2010 | Standardien inkubaatiotutkimukset |
| Maanantai 24.5.2010 | Säilyvyystutkimus: 1, 3 ja 7 päivien jako tutkimuslämpötiloihin (Pakastin & huoneenlämpö & jääkaappi) |
| Tiistai 25.5.2010 | Säilyvyys 1. päivän analyysi |
| Keskiviikko 26.5.2010 | Homogeenisuustutkimus ja nollanäyteinkubaatiotutkimus |
| Torstai 27.5.2010 | Säilyvyys 3. päivän analyysi |
| Maanantai 1.6.2010 | Säilyvyys 7. päivän analyysi |

6.1 Säilyvyystutkimuksen suoritus

Säilyvyystutkimuksen 12 näytettä kerättiin maanantain 24.5.2010 potilasnäytteistä. Laboratoriohenkilökunta analysoi aloituspäivänä näytteet ensin itse. Omissa näytevalinnoissamme otimme huomioon näytteenottopäivän, näytteiden tuoreuden sekä niiden eritasoiset pitoisuudet. Näytteistä yksitoista oli otettu 20.5.2010 ja yksi 19.5.2010. Pitoisuuksiltaan suurin osa sijoittui alle sataan, eli viitearvoalueelle. Kolmen näytteen pitoisuus oli yli sadan, kuusi oli keskitasoa ja kolmessa oli hyvin alhainen pitoisuus. Jaoinme yhdestä näytteestä ulostetta yhteensä yhdeksään eri putkeen 100 µg, jonka jälkeen putket sijoitettiin -20°C:n, +4°C:n ja +20°C:n lämpötiloihin. Putket numeroitiin seuraavasti: 1-12 pakastin/1. päivä, 3.päivä ja 7.päivä, 1-12 jääkaappi/1. päivä, 3.päivä ja 7.päivä sekä 1-12 huoneenlämpö/1. päivä, 3.päivä ja 7.päivä. Punnitsimme yhteensä 108 kalprotektiininäytettä, joista 36 säilytettiin pakastimessa, 36 jääkaapissa ja 36 huoneenlämmössä. Näytemäärä purkeissa ei ollut kovin suuri, joten jouduimme käyttämään lähes jokaisesta näytteestä kaiken materiaalin. Se saattaa vaikuttaa tuloksiin, sillä uloste ei ollut jokaisessa näytteessä tasalaatuista.

Ensimmäisen päivän näytteitä säilytettiin niiden säilytyslämpötiloissa 16 tuntia, joka vastasi tutkimuksessamme yhtä vuorokautta. Tarkoituksenamme oli säilyttää näytteitä lähes 24 tuntia, mutta valitettavasti maanantain punnitukset kestivät kello 16 saakka ja tiistaina analysointi oli aloitettava jo aamupäivällä. Otimme näytteet lämpiämään säilytyslämpötiloista tiistaina aamulla kello 8. Sulatuksen jälkeen alkoi näytteiden esikäsittely. Putkiin lisättiin 4,9 ml uuttopuskuria. Näytteet sekoitettiin vortexilla ja kiinnitettiin ravistavaan homogenisointilaitteeseen 30 minuutiksi. Homogenisoinnin jälkeen vortexoimme jälleen putket. Sitten pipetoimme näyteliuosta 1ml Eppendorff-putkiin, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 10 000 rpm. Supernatantti eroteltiin uu-

siin Eppendorff-putkiin, joista pipetoitiin koeputkiin 20 µl supernatantia (näytettä) ja 1000 µl näytteen laimenninta (sample diluent). Liitteessä 9 on esitettyinä työvaiheet ja laitteet valokuvoin.

Esikäsittelyn jälkeen näytteet olivat valmiit pipetoitaviksi mikrotiitterilevyn kuoppiin. Standardit ja kontrolli tulevat reagenssipakkauksen mukana käyttövalmiina. Pipe-toimme näytteitä, standardeja ja kontrolleja 50 µl kuoppiin. Sitten sarjaa inkuboitiin 45 minuutin ajan tasoravistelijassa. Inkubaation jälkeen kuopat pestiin pesuliuksella viisi kertaa ja kuoppiin lisättiin konjugaattia 50 µl. Levyä inkuboitiin uudestaan 45 minuuttia tasoravistelijassa. Kuoppalevyt pestiin vielä pesuliuksella viisi kertaa, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 100 µl substraattia ja levyä inkuboitiin tasaisella alustalla folion alla huoneen lämmössä 25 minuutin ajan. Reaktio lopetettiin 100 µl NaOH:lla ja kuopat olivat valmiit mitattaviksi. Säilyvyys-, inkubaatio- ja homogeenisuustutkimusten kuoppalevysuunnitelmat ovat liitteessä 10.

Toinen säilyvyystutkimus suoritettiin kuten ensimmäinenkin. Kolmen vuorokauden säilytys oli käytännössä pituudeltaan 2 vrk ja 16 tuntia maanantain myöhäisen punnituksen vuoksi. Tiistain tuloksista huomasimme, että näytteen numero 2 pitoisuus oli hyvin korkea (absorbanssi ylitti 2,5), joten näytteen pitoisuutta ei voitu laskea ensimmäisenä päivänä. Kolmannen päivän säilyvyystutkimuksissa laimensimme näytteen valmiiksi 1:10, jotta olisimme saaneet kakkosnäytteen tuloksen mukaan tutkimukseen. Laimentamisesta ei ollut lopulta apua, sillä emme pystyneet tekemään pitoisuusvertailua eri päivien välille ensimmäisen päivän tuloksen puuttuessa. Seitsemännen päivän tutkimuksen säilyvyysajaksi tuli kaikkiaan 6 vrk ja 16 tuntia. Viimeisen päivän näytteet, kontrollit ja standardit tehtiin rinnakkaisina, sillä kuoppalevyrivejä jäi sopivasti ylimääräisiä.

6.2 Inkubaatiotutkimuksen suoritus

Inkubaatiotutkimus toteutettiin standardien ja nollanäytteiden avulla. Standardeja on kahdeksan kappaletta, ja jokaiselle niistä on annettu oma kalprotektiinipitoisuus ja tavoitearvo. Standardisuoran tulee antaa hyvä vaste vakiokuvaajalla, jotta sen avulla voitaisiin luotettavasti määrittää näytteiden pitoisuudet.

Standardien inkubaatiomodifikaatiot on esitetty ensimmäisen ja toisen inkubaation suhteen taulukossa 2. Kolmas inkubaatioaika on jokaisessa 25 minuuttia. Työ suoritettiin yhden päivän aikana.

TAULUKKO 2: Eri Inkubaatioajat

| Inkubaatio modifikaatiot | 1. inkubaatio/ minuuttia | 2. inkubaatio/ minuuttia | 3. inkubaatio/ minuuttia |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 15 | 30 | 25 |
| 2 | 15 | 60 | 25 |
| 3 | 15 | 90 | 25 |
| 4 | 30 | 30 | 25 |
| 5 | 30 | 60 | 25 |
| 6 | 30 | 90 | 25 |
| 7 | 60 | 30 | 25 |
| 8 | 60 | 60 | 25 |
| 9 | 60 | 90 | 25 |

Aloitimme suorituksen pipetoimalla 50 µl standardeja mikrotiitterilevyn kuoppiin ja inkuboimalla kuopparivejä tasoravistelijassa. Teimme inkubaatiotutkimukset standardeilla A – H. Etenimme työssämme taulukossa 2 esitettyjen modifikaatioiden mukaan. Jaoin modifikaatiot ryhmiin 1-3, 4-6 ja 7-9, jotka analysoimme peräkkäin työskentelyn helpottamiseksi. Ensimmäisten inkubaatioiden jälkeen suoritimme pesun pesuliuoskella viisi kertaa ja pipetoimme 50 µl konjugaattia kuoppiin. Inkuboimme kuopparivejä tasoravistelijassa. Tämän jälkeen kuopat pestiin vielä kerran ja niihin lisättiin 100 µl substraattia. Kuoppalevyt peitettiin valolta suojaavalla foliolla. Kolmannessa seisotuksessa kuoppia inkuboitin 25 minuuttia tasaisella alustalla huoneenlämmössä. Tämän jälkeen reaktio pysäytettiin 100 µl NaOH:lla ja kuopat olivat valmiit mitattaviksi.

Suoritimme myös nollanäytteiden mittaukset pelkällä näytteen laimentimella. Käytimme samoja aikoja ja menetelmää kuin standardien inkubaatiotutkimuksessa. Tutkimuksella haluttiin saada selville, mikä tulostaso on reagensseilla.

6.3 Homogeenisuustutkimuksen suoritus

Homogeenisuustutkimukseen olimme valinneet seitsemän mahdollisimman heterogeenistä näytettä. Näytteissä oli maissia, kuituja, verta, tomaatinkuoria sekä muuta sulamatonta ravintoa. Olomuodoltaan näytteet olivat kiinteitä tai löysiä. (Taulukko 3.) Tutkimus suoritettiin samalla lailla kuin säilyvyystutkimus, mutta vain kerran. Seitse-

mästä näytteestä jaettiin ulostetta seitsemään eri putkeen. Yhdestä näytteestä otettiin vain yhden kerran näytettä ja sen supernatantista otettiin kuusi näyteliuosta kuoppalevyille. Tekninen suoritus tapahtui kuten säilyvyystutkimuksessa.

TAULUKKO 3: Homogeenisuustutkimuksessa käytettyjen ulostenäytteiden koostumukset.

| | |
|---------|--|
| Näyte 1 | Maissia, muita epämääräisiä möykkyjä |
| Näyte 2 | Kuituja, punaista väriä, verta? |
| Näyte 3 | Paljon kuituja |
| Näyte 4 | Tomaatin kuoria, paprikan kuoria, muuten homogeeninen |
| Näyte 5 | Kiinteä, hyvin kuituinen |
| Näyte 6 | Löysä, vähemmän kuituja ja artefaktia kuin muissa näytteissä |
| Näyte 7 | Kiinteä, homogeeninen |

7 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Käsittelimme säilyvyystutkimustuloksia Excel-ohjelmalla. Vertasimme -20°C :ssa, $+4^{\circ}\text{C}$:ssa ja $+20^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjen näytteiden pitoisuuksia yhden, kolmen ja seitsemän vuorokauden säilytyksillä. (Liite 1). Näytteiden vertailu tapahtui viivakaavioon piirrettyjen kuvioiden avulla. Kaavioissa esitetään sekä yksittäisten näytteiden että kaikkien näytteiden vuorokausivaihtelut. (Liite 2). Näytteiden kalprotektiinipitoisuudet laskettiin määrittäen ensin standardien absorbanssiarvoilla standardisuora sekä trendiviiva. Trendiviivan kaava on $y=ax+b$. Sen mukaan laskettiin näytteiden pitoisuudet: Pitoisuus = (absorbanssi – vakioeroin)/kulmakerroin. (Hautejärvi – Ottelin – Wallin-Jaakkola 2003: 59.) Liitteessä 6 on esitetty säilyvyystutkimuksen trendiviivat. Mukana olivat kaikki muut näytteet paitsi 2. ja 7. näyte, joilla oli korkeimmat pitoisuudet. Olimme unohtaneet laimentaa ne ensimmäisenä päivänä ennen mittausta. Kaikille näytteille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin (CV %) (liite 1). Teimme tuloksin helpottamiseksi tuloksille SPSS-ohjelmalla Wilcoxonin merkkitestin sekä varmistukseksi tarkkatestin (liite 7) ja Friedmanin testin.

Keskiarvot on laskettu summaamalla tulokset ja jakamalla saatu summa tulosten lukumäärällä. Keskiarvoon vaikuttavat muista arvoista huomattavasti poikkeavat arvot. Arvojen lukumäärän ollessa pieni voivat yksittäiset arvot vaikuttaa paljon saatuun keskiar-

voon. Työssämme käytimme leikattua keskiarvoa, jossa tietty määrä poikkeavista havainnoista poistetaan. Tätä menetelmää voidaan käyttää, kun huomattavan suuri tai pieni havainto korottaa tai laskee keskiarvoa huomattavan paljon. Poistimme kahden näytteen pitoisuudet, jotka olivat huomattavasti korkeammat kuin muiden näytteiden, sillä näiden näytteiden pitoisuudet olisivat vääristäneet keskiarvoja. (Nummenmaa 2004: 57 – 59.)

Keskihajonta ilmoittaa havaintojen keskimääräisen etäisyyden jakauman keskiarvoista. Keskihajonnan ollessa suuri mitattavat arvot vaihtelevat paljon toisiinsa nähden. (Nummenmaa 2004: 59 – 63.)

Variaatiokertoimen avulla saadaan jakauman suhteellinen hajonta. Se lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon osamääränä ja ilmoitetaan prosentteina, CV %. Variaatiokerrointa käytetään, kun halutaan vertailla kahden eri muuttujan jakauman hajontojen suuruutta. (Nummenmaa 2004: 63 – 64.)

Wilcoxonin merkkitesti on parittaisen t-testin parametriton vastine. Sitä käytetään vertailtaessa mittauspareja ennen - jälkeen -tilanteessa, kun pystytään tunnistamaan toinen arvoltaan pienemmäksi ja toinen suuremmaksi ja havaintojen väliset erot voidaan laittaa suuruusjärjestykseen. Wilcoxonin testi antaa vastaukseksi tiedon positiivisesta (jälkimmäinen mittaus on suurempi kuin ensimmäinen) tai negatiivisesta (jälkimmäinen mittaus on pienempi kuin ensimmäinen) erosta parien välillä ja tilastollisen merkitsevyyden sig-luvulla. (Metsämuuronen 2004: 100–103.)

Friedmanin testi kuvaa järjestysasteikollisia, toisistaan riippuvia muuttujan arvoja ennen – jälkeen -tilanteessa. Sitä voidaan käyttää, kun havaintokertoja on useita, enemmän kuin kaksi. (Metsämuuronen 2004: 112–113.)

Inkubaatiotutkimuksessa taulukoimme standardien absorbanssiarvot. Vertailimme keskimmäisten standardien absorbanssitulosten eroja toisiinsa. Nollanäytteiden absorbanssiarvojen avulla laskettiin inkubaatioaikojen laskennallinen herkkyys.

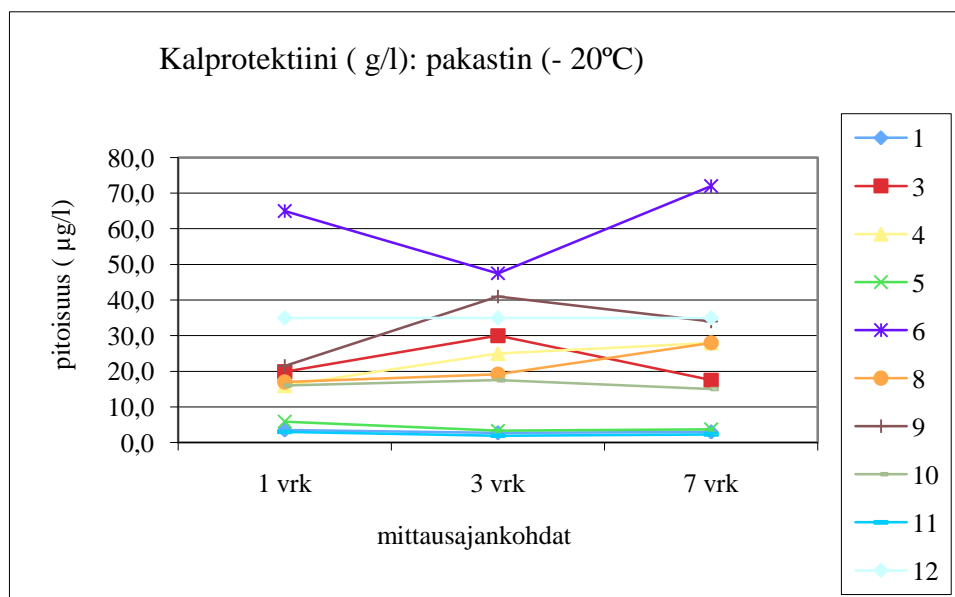
Laskennallinen herkkyys lasketaan millimetripaperille piirretyltä vakiokuvaajalta. Vakiokuvaajalta katsotaan nollanäytteiden pitoisuus (7 kpl) ja lasketaan niiden keskiarvo ja keskihajonta (SD). Laskemalla keskiarvo + 2SD:tä, saadaan piste, jossa laskennalli-

nen herkkyys leikkaa y-akselin. Siitä piirretty suora kuvaajalle ja kuvaajan leikkauskohdasta x-akselille on laskennallisen herkkyyden pitoisuus. Laskennallinen herkkyys on synonyymi sanalle ”detection limit”, joka tarkoittaa pienintä konsentraatiota, joka voidaan mitata tietyllä menetelmällä. (Payling 2000; Alfthan 2010.)

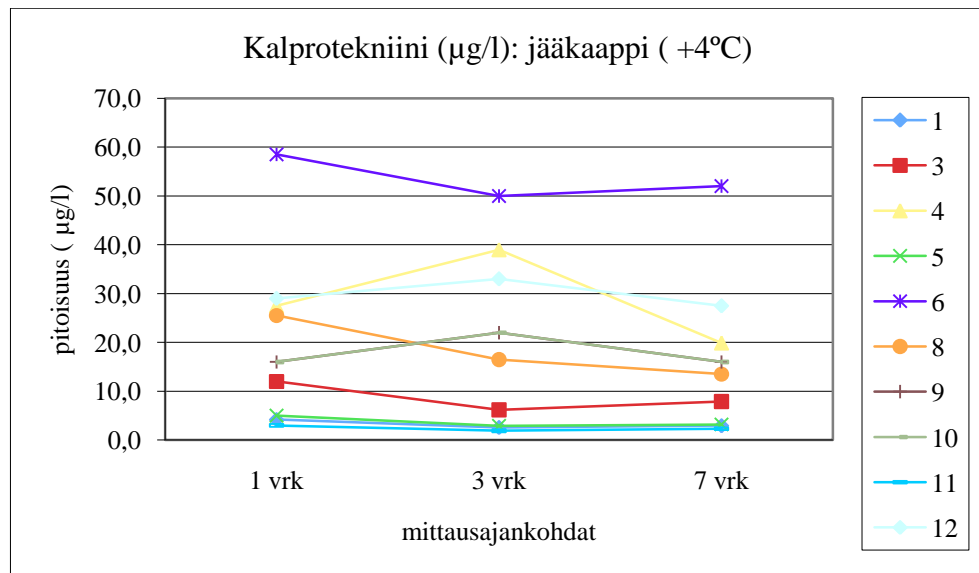
Homogeenisuustutkimuksessa laskimme kaikille tuloksille keskiarvon, keskihajonnan ja CV %:n. Teimme Excel-taulukon avulla viivakuvaajan ja pylväsdiagrammin näytteiden pitoisuuseroista näytteenottokohdasta riippuen. Homogeenisuustutkimuksen absorbanssiarvot ovat liitteessä 5 ja kuvaajan trendiviiva liitteessä 6.

7.1 Kalprotektiinin säilyvyys

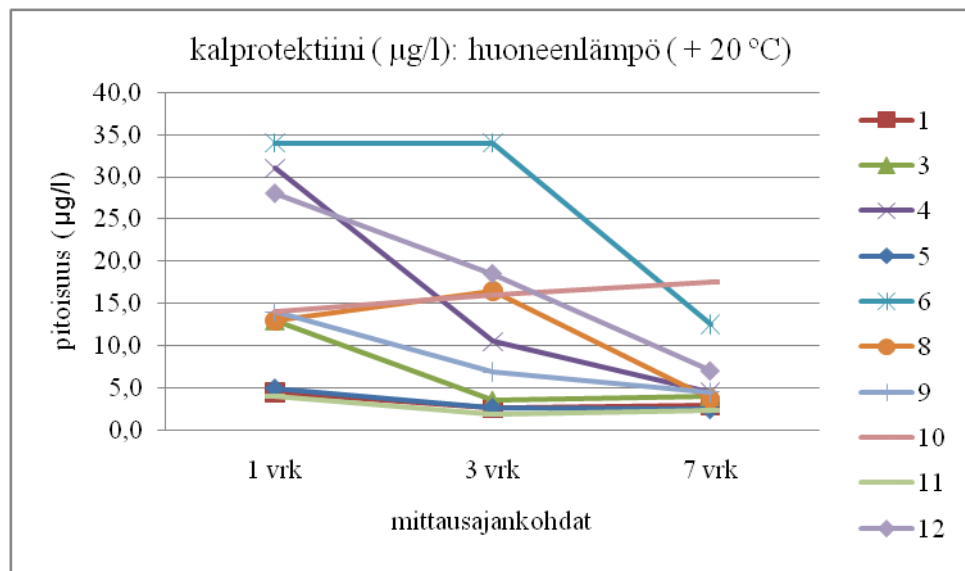
Kalprotektiinin säilyvyyttä tutkittiin mittaamalla näytteet ensimmäisen, kolmannen, ja seitsemännen vuorokauden säilytyksen jälkeen säilytyslämpötilojen ollessa -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ ja $+20^{\circ}\text{C}$. Kalprotektiinin pitoisuudet eri lämpötiloissa ja säilytysajoilla sekä keskihajonta, keskiarvo ja CV % on kuvattu liitteessä 1. Teimme tuloksista viivakaaviot mitattujen absorbanssien ja trendiviivojen perusteella (liite 3, liite 6). Viivakaavioissa on esitettyinä näytteiden kalprotektiinipitoisuuksien muutokset eri mittausajankohtina kaikissa eri säilytyslämpötiloissa. (Kuvio 5, kuvio 6, kuvio 7.) Liitteessä 2 on kuvattuna tarkemmin jokaisen yksittäisen näytteen muutos säilytyslämpötilasta ja -ajasta riippuen.



KUVIO 5: Kalprotektiininäytteiden säilyvyys -20°C eri mittausajankohtilla. Jokainen näyte on kuvattu erivärisellä viivalla, $n=10$.



KUVIO 6: Kalprotektiininäytteiden säilyvyys +4°C eri mittausajankohdilla. Jokainen näyte on kuvattu erivärisellä viivalla, n=10.



KUVIO 7: Kalprotektiininäytteiden säilyvyys +20°C eri mittausajankohdilla. Jokainen näyte on kuvattu erivärisellä viivalla, n=10.

Säilyvyystutkimusten tuloksia arvioitaessa päädyimme käyttämään Wilcoxonin merkkitestää. Vertailemme kalprotektiinin aikaisemmin tunnettua pitoisuutta uuteen muuttuneeseen pitoisuuteen tietyn säilytysajan ja säilytyslämpötilan jälkeen. Tässä opinnäytetyössä on Wilcoxonin testin käyttö järkevää, sillä käyttämämme aineisto on kymmenellä tutkittavalla näytteellä liian suppea T-testiin, eivätkä parittaiset erotukset ole normaalisti jakautuneita. Sig-luku eli merkitsevyytaso (significance) kertoo, kuinka suuri riski on, että tutkimuksessa saadut erot ja riippuvuudet ovat sattumanvaraisia (Heikkilä 1999: 194). Taulukossa 4 on esiteltyä sig-luvulla testatun eron tai riippuvuuden merkitsevyytasot. Olemme sig-luvulla laskeneet vallitsevan tilanteen todennäköisyyden, jos

näytteitä olisi 1000 kappaletta kaavalla: $1 - \text{sig-luku} \times 1000$. Esimerkiksi -20°C :ssa säilytettyjen näytteiden yhden ja kolmen vuorokauden välinen vaihtelu syntyy Wilcoxonin testin mukaan 559 tapauksessa tuhannesta. Sig-luvun ja tilanne-esimerkin avulla voidaan olettaa, että tilanne on täysin sattumanvarainen, eikä pitoisuus näissä olosuhteissa todennäköisesti muutu suuremmaksi tai pienemmäksi vaan pysyy kutakuinkin samana.

TAULUKKO 4 : Sig-luvun (p) tilastollinen merkitsevyys (Heikkilä 1999: 195).

| | |
|--|-----------------------|
| Tilastollisesti erittäin merkitsevä | $p \leq 0,001$ |
| Tilastollisesti merkitsevä | $0,001 < p \leq 0,01$ |
| Tilastollisesti melkein merkitsevä | $0,01 < p \leq 0,05$ |
| Tilastollisesti suuntaa antava (oireellinen) | $0,05 < p \leq 0,1$ |

Ohessa on esitetty Wilcoxonin testin tulokset (taulukko 5). Pakastimessa -20°C :ssa säilytettyjen näytteiden sig-luvut ovat yhden ja kolmen säilytysvuorokauden välillä 0,441, yhden ja seitsemännen välillä 0,374 ja kolmannen ja seitsemännen vuorokauden välillä 0,594. Tutkimuksemme mukaan näytteiden kalprotektiinipitoisuus ei pakastimessa säilytettyinä muutu tilastollisesti merkitsevästi, vaan pitoisuuden nousut ja laskut ovat täysin sattumanvaraisia.

Sen sijaan $+4^{\circ}\text{C}$:ssa ja $+20^{\circ}\text{C}$:ssa säilytetyt näytteet eivät pitäneet niin hyvin pitoisuuttaan. Molemmissa lämpötiloissa pitoisuudet vaikuttaisivat laskevan etenkin vertailtaessa ensimmäisen ja seitsemännen vuorokauden pitoisuuksia. Huoneenlämmössä $+20^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjen näytteiden kalprotektiinipitoisuuden lasku on jo tilastollisesti merkitsevää. Täytyy kuitenkin muistaa, että aineistomme on vain 10 näytettä. Aineiston pitäisi olla huomattavasti suurempi, jotta johtopäätökset voitaisiin tehdä luotettavasti.

TAULUKKO 5: Wilcoxonin testin tulokset. Säilytyslämpötilan pysyessä samana vertaillaan pitoisuuksien nousua ja laskua yhden, kolmen ja seitsemän vuorokauden välillä. Tuloksen merkitsevyys on ilmoitettu sig – luvulla.

| SÄILYVYYSTUTKIMUS -20°C n=10 | 1vrk ja 3vrk | 1vrk ja 7vrk | 3vrk ja 7vrk |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 5 | 4 | 6 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 1 | 1 | 1 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 4 | 5 | 3 |
| Sig –luku | 0,441 | 0,374 | 0,594 |
| Tilanteen todennäköisyys 1000 mittausta kohden | 559 | 626 | 406 |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS +4°C n=10 | 1vrk ja 3vrk | 1vrk ja 7vrk | 3vrk ja 7vrk |
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 4 | 0 | 5 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 0 | 1 | 0 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 6 | 9 | 5 |
| Sig -luku | 0,878 | 0,008 | 0,203 |
| Tilanteen todennäköisyys 1000 mittausta kohden | 122 | 992 | 797 |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS +20°C n=10 | 1vrk ja 3vrk | 1vrk ja 7vrk | 3vrk ja 7vrk |
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 2 | 1 | 6 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 1 | 0 | 0 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 7 | 9 | 4 |
| Sig -luku | 0,066 | 0,017 | 0,169 |
| Tilanteen todennäköisyys 1000 mittausta kohden | 934 | 983 | 831 |

Varmistimme Wilcoxonin testin tulokset vielä tarkalla testillä, joka on tarkoitettu hyvin pienten aineistojen analyysiin. Tulokset ovat yhteneväiset Wilcoxonin testissä saatujen tulosten kanssa (liite 7). (Mellin 2004).

Halusimme vertailla myös -20°C:ssa, +4°C:ssa ja +20°C:ssa säilytettyjä näytteitä keskenään yhden, kolmen ja seitsemän vuorokauden säilytysajoilla. Tahdoimme tietää, ovatko tulokset yhtäpitäviä eri lämpötiloissa säilytettynä. Käytimme Friedmanin testiä, sillä Wilcoxonin merkkitesti on tarkoitettu vain muuttujaparille ja meillä muuttujia on kolme.

Friedmanin testissä tutkitaan ”mean rank” – arvoa, eli järjestyslukujen keskiarvoja. Tulokset on taulukoitu alempana (taulukko 6). Muuttujien arvojen ollessa samoja tai lähellä toisiaan voidaan päätellä, ettei olosuhteilla, eli säilytyslämpötiloilla, ole ollut vaikutusta kalprotektiinipitoisuuksiin. Esimerkiksi yhden vuorokauden jälkeen tutkituissa

näytteissä ei säilytyslämpötilalla ole ollut suurta merkitystä, vaan tulokset ovat olleet arvoiltaan lähes samoja. Sig-luvun perusteella pienet nousut ja laskut pitoisuuksissa ovat olleet sattumanvaraisia.

Säilyvyystutkimuksen kolmannen vuorokauden tuloksissa on jo merkittävää eroa -20°C :ssa, $+4^{\circ}\text{C}$:ssa ja $+20^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjen näytteiden kalprotektiinipitoisuuksien välillä. Sig-luvun mukaan pitoisuuksien nousut ja laskut eivät ole sattumanvaraisia, vaan tilanne toistuu 99,8 % kaikista tapauksista. Kolmannen vuorokauden kohdalla $+20^{\circ}\text{C}$ säilytettyjen näytteiden pitoisuustasot ovat laskeneet kylmemmässä säilytettyihin näytteisiin nähden. Seitsemännen vuorokauden kohdalla sekä $+20^{\circ}\text{C}$:ssa että $+4^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjen näytteiden pitoisuudet ovat laskeneet verrattuna -20°C :ssa säilytettyihin näytteisiin. Sig – luku on 0,005, eli tilanne ei ole sattumanvarainen.

TAULUKKO 6: Friedmanin testin tulokset. Samassa ajassa tapahtuneet pitoisuusmuutokset eri lämpötiloissa järjestysluvun keskiarvolla ilmaistuna. Testin luotettavuus on esitetty sig –luvulla.

| SÄILYVYYSTUTKIMUS 1vrk | järjestysluvun keskiarvo |
|------------------------|--------------------------|
| -20°C | 2,2 |
| +4°C | 2,05 |
| +20°C | 1,75 |
| Sig -luku | 0,567 |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS 3vrk | järjestysluvun keskiarvo |
| -20°C | 2,55 |
| +4°C | 2,25 |
| +20°C | 1,2 |
| Sig -luku | 0,002 |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS 7vrk | järjestysluvun keskiarvo |
| -20°C | 2,65 |
| +4°C | 2,05 |
| +20°C | 1,3 |
| Sig -luku | 0,005 |

Tutkimuskysymyksenämme oli, miten kalprotektiinin pitoisuus muuttuu säilytystavasta riippuen. Yhden vuorokauden säilytyksissä lämpötilalla ei ollut merkitystä, vaan tulokset pysyivät melko samoina. Kolmen vuorokauden säilytyksissä eroja oli havaittavissa: $+20^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjen näytteiden pitoisuus oli laskenut verrattuna kylmemmässä säilytettyihin näytteisiin. Seitsemän vuorokauden jälkeen -20°C :ssa säilytetyt näytteet olivat

pitoisuuksiltaan kaikkein eniten lähtötilanteen kaltaisia, kun taas +4°C:ssa ja +20°C:ssa säilytettyjen näytteiden kalprotektiinipitoisuus oli laskenut.

Tutkimuskysymyksiämme oli, kuinka kauan näytettä voidaan säilyttää eri lämpötiloissa ja millä säilytysmenetelmillä kalprotektiinipitoisuus pysyy stabiilimpana pidemmällä säilytysajoilla. Lisäksi pohdimme kysymystä, muuttuuko kalprotektiinipitoisuus pidemmällä (7vrk) säilytysajalla eri lämpötilojen välillä. Saimme kaikkiin kolmeen kysymykseen karkean vastauksen. Ulsteen kalprotektiininäytteet voidaan säilyttää 1-3 vuorokautta +20°C:ssa, +4°C:ssa tai -20°C:ssa ilman, että pitoisuus laskee tai nousee merkittävästi. Näytteitä voidaan säilyttää +4°C:ssa ja -20°C:ssa vielä tämänkin jälkeen, mutta yli seitsemän päivän säilytyksessä on tutkimuksen mukaan paras säilytyslämpötila -20°C, jotta näytteen kalprotektiinipitoisuus pysyisi mahdollisimman samana kuin lähtötilanteessa.

Viimeisenä säilytykseen liittyvänä tutkimuskysymyksenä pohdimme, mikä on paras lämpötila kuljettaa ja säilyttää ulsteen kalprotektiininäytteitä. Tulosten perusteella paras kuljetus- ja säilytystapa olisi -20 °C. Näytteet olisi hyvä analysoida mahdollisimman pian näytteenotosta, sillä pitoisuudet laskevat jonkin verran päivä päivältä. Kuitenkin säilytysaikaa voidaan pidentää, sillä selvästi pitoisuudeltaan korkeat näytteet pysyvät korkeina ja matalat alle 100 µg/l pysyvät alhaisina. Ongelman tuottavat pitoisuudeltaan juuri yli 100 µg/l menevät näytteet, sillä ne saattavat laskea esimerkiksi seitsemässä säilytyspäivässä viitearvoalueelle, jos näytettä on säilytetty huoneenlämmössä. Perusteltua olisi toimittaa ulostenäyte laboratorioon mahdollisimman pian.

7.2 Kalprotektiinin inkuboinnit

Tutkimme kalprotektiinin inkubaatioaikoja standardeilla ja nollanäytteillä, eli pelkillä reagenssiliuoksilla ja näytteen puskuriliuoksella. Eri inkubaatioaikoja vertailtiin keskenään taulukoimalla standardien absorbanssitulokset (taulukko 7). Nollanäytetutkimuksia vertailimme laskennallisen herkkyuden avulla (taulukko 8 s.31). Kolmea viimeistä standardia F, G ja H ei otettu mukaan taulukoihin, sillä ne vinouttaisivat suoraa. Muut standardit A-E ovat mukana tutkimuksessamme. Liitteessä 4 on esitettyä myös nollakokeiden näytteillä tehdyn inkubaatiotutkimuksen absorbanssiarvot.

Ensimmäisenä tutkimuskysymyksenä oli, minkälainen vaikutus eri inkubaatioajoilla on standardien absorbanssiarvoihin. Inkubaatioiden tarkoituksena on vahvistaa ja herkistää reaktiota. Jos inkubaatioajat eivät ole optimeja, ei reaktio tapahdu täydellisenä. Standardien absorbanssiarvoista voidaan päätellä, että ensimmäisen inkubaation, jolloin polyklonaalinen vasta-aine kiinnittyy kalprotektiiniin, ei tarvitse olla kovin pitkä. 15 minuuttia olisi riittävä, sillä absorbanssiarvo ei muutu oleellisesti pidemmällä inkubaatioajalla. Käytännössä kuitenkin jo koko levyn pipetointiin menee lähes 15 minuuttia, joten inkubaation on oltava hieman pidempi, jotta kuopat olisivat tasavertaisia. Toisen inkubaation aikana, jolloin monoklonaalinen leimattu vasta-aine tarttuu polyklonaaliseen vasta-aineeseen, absorbanssiarvo näyttäisi lisääntyvän sitä mukaa, mitä pidempi inkubaatio on. 90 minuutin inkubaatiolla saadaan parhaat tulokset sillä 90 minuutin aikana suurempi osa vasta-aineista on päässyt kiinnittymään kuin esimerkiksi 30 minuutin inkubaation aikana. Pelkillä nollanäytteillä suoritettut mittaukset antoivat samanlaisia tuloksia. 90 minuutin inkubaatiot antoivat parhaan laskennallisen herkkyyden ensimmäisen inkubaation ajasta riippumatta.

TAULUKKO 7: Standardien absorbanssiarvot eri inkubaatioajoilla. (Ensimmäinen + toinen inkubaatio minuutteina).

| Std. | 15+30 min. | 15+60 | 15+90 | 30+30 | 30+60 | 30+90 | 60+30 | 60+60 | 60+90 |
|------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0,145 | 0,204 | 0,253 | 0,158 | 0,196 | 0,251 | 0,157 | 0,221 | 0,270 |
| B | 0,221 | 0,336 | 0,418 | 0,235 | 0,335 | 0,405 | 0,249 | 0,359 | 0,455 |
| C | 0,383 | 0,568 | 0,699 | 0,392 | 0,545 | 0,668 | 0,395 | 0,601 | 0,735 |
| D | 0,647 | 0,989 | 1,137 | 0,66 | 0,885 | 1,13 | 0,647 | 0,977 | 1,140 |
| E | 1,119 | 1,641 | 1,782 | 1,170 | 1,410 | 1,765 | 1,115 | 1,588 | 1,685 |

Toisena tutkimuskysymyksenämme oli, voidaanko menetelmän inkubaatioaikoja lyhentää tämänhetkisistä ilman, että menetelmän herkkyys kärsii. Ensimmäistä inkubaatiota voidaan todennäköisesti lyhentää luotettavasti tämänhetkisestä, mutta vain vähän, koska pipetointi vie oman aikansa. Toisen inkubaation aikaa ei voida lyhentää ilman, että luotettavuus kärsisi.

Viimeisenä tutkimuskysymyksenämme oli, pystytäänkö analyysin inkubaatioaikoja pidentämään tämänhetkisistä, jotta menetelmää voitaisiin herkistää. Toista inkubaatiota voidaan pidentää, jos tahdotaan herkkyyden parantuvan. Standardi- ja nollanäytetutkimusten antamissa tuloksissa kaikkein herkimmillään menetelmä oli toisen inkubaation

ollessa 90 minuuttia. Toisen inkubaation ollessa 60 minuuttia menetelmä oli herkempi verrattuna 30 minuuttiin. Ensimmäisen inkubaation pidennetyillä ajoilla ei ollut samantyyppistä vaikutusta menetelmän herkkyyteen kuin toisella inkubaatiolla. Nollakokeiden absorptioiden tulokset ovat alla olevassa taulukossa 8.

TAULUKKO 8: Nollakokeet ja niiden keskiarvot (Ka), keskihajonnat (SD) ja laskennalliset herkkyydet (Ka+2SD).

| Ensimmäinen+ toinen inkubaatio (minuuttia) | 15+30 | 15+60 | 15+90 | 30+30 | 30+60 | 30+90 | 60+30 | 60+60 | 60+90 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ka (abs.450) | 0,070 | 0,071 | 0,077 | 0,072 | 0,075 | 0,075 | 0,073 | 0,077 | 0,080 |
| SD | 0,002 | 0,002 | 0,009 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,003 |
| Ka+2*SD | 0,075 | 0,075 | 0,094 | 0,077 | 0,079 | 0,078 | 0,079 | 0,085 | 0,087 |
| HERKKYYS µg/l | 2,8 | 1,6 | 0,26 | 0,8 | 0,3 | 0,25 | 0,65 | 0,33 | 0,29 |

7.3 Kalprotektiinin homogeenisuus ulostenäytteessä

Valitsimme tarkoituksellisesti mahdollisimman heterogeenisiä näytteitä ja näytekohtia. Otimme punnitsemisvaiheessa näytteeseen mukaan sulamatonta ruokaa, siemeniä, kuituja, verta ja muita epämääräisiä kohtia. Oletettiin, että näytteen kalprotektiinipitoisuus on pienempi, jos osan näytteen massasta vie muu kuin sulanut uloste.

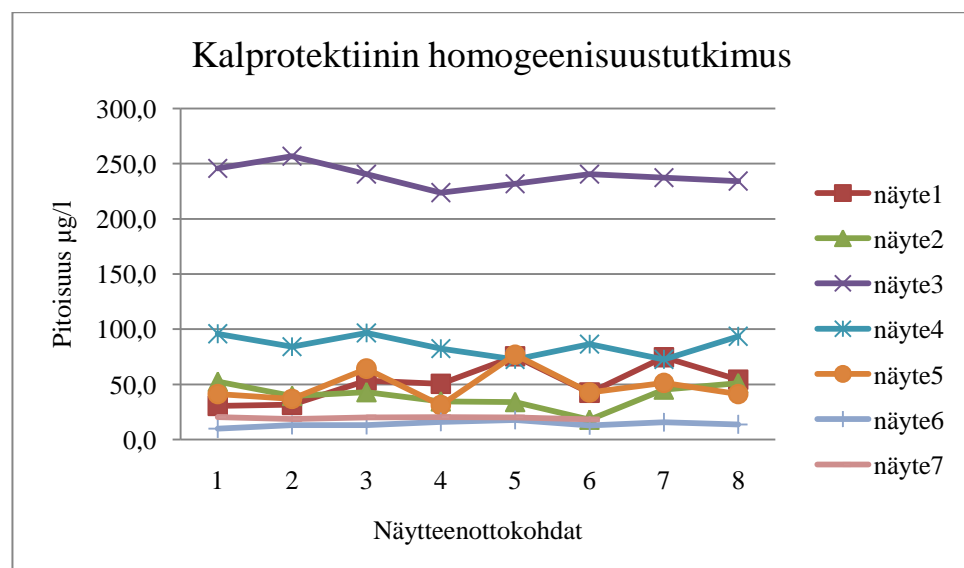
Tulostemme perusteella näytteen heterogeenisuus vaikuttaa kalprotektiinipitoisuuteen alentavasti. Näytteen tulisi olla mahdollisimman homogeeninen, eikä epämääräisiä kohtia tule ottaa punnitusvaiheessa mukaan käsiteltävään näytteeseen. Homogeenisuustutkimukseen kuului myös uuttoliuostesti, jossa seitsemännen näytteen supernatanttia pipetoitiin kuusi kertaa rinnakkain. Seitsemännen näytteen CV % oli 4,4 ja sen keskihajonta oli vain 0,9. Seitsemänneistä näytteistä tutkittiin muuttuuko pitoisuus enää sen jälkeen, kun näytteen supernatantti on eroteltu. Tulokseksi saatiin, ettei pitoisuus enää muutu tämän jälkeen. (Taulukko 9). Viivakaaviossa on kuvattu kalprotektiinin pitoisuus eri näytteillä ja koostumuksilla (kuvio 8 s.33). Pitoisuseroja on kuvattu liitteessä 8 vielä tarkemmin pylväsdiagrammien avulla. Niissä kuvataan kaikkien eri näytteiden kalprotektiinipitoisuuksien muutokset näytteenottokohdasta riippuen.

Tutkimuskysymyksenämme oli, pysyykö näytteen kalprotektiinipitoisuus samana, vaikka näytteenottoa tai näytteen koostumus muuttuu. Kalprotektiinipitoisuus ei pysy-

nyt samana eri näytteenottokohdista otettuna. Pitoisuus pysyy riittävän tasaisena, jos näyte on sulanutta ulostetta eikä sisällä artefaktaa, kuten marjankuoria tai kuituja. Voimme päätellä tämän vertaamalla taulukkoa 3 sivulla 22 ja taulukkoa 9 toisiinsa. Näytteet numero 6 ja numero 7 ovat olleet tasalaatuisimpia muihin nähden ja näytteiden eri kohtien keskihajonnat ovat pienet. Tarkempaa näytekohtaista kuvausta kuin taulukossa 3 emme voineet tehdä, sillä emme varmuudella tiedä mitä potilas on syönyt, eikä sulanutta tai edes puoliksi sulanutta ulostetta voi arvioida tarkalleen sisällöllisesti ilman tarkempaa tutkimusta. Pääasiassa valitsimme epämääräisen näköistä ja heterogeenistä ulostetta ja karkeasti päätelimme, että uloste sisältää ainakin taulukossa 3 esitettyjä koostumuksia.

TAULUKKO 9. Kalprotektiinin homogeenisuustutkimuksen eri näytekohdista analysoidujen otosten pitoisuudet, keskimääräiset (Ka) pitoisuudet, keskihajonta (SD) ja variaatiokerroin (CV %) keskiarvoon nähden. (n=7).

| Näytekohdat | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte7 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 30,4 | 52,4 | 245,8 | 95,9 | 41,2 | 9,8 | 20,4 |
| 2 | 31,5 | 39,5 | 256,7 | 84,0 | 36,9 | 13,2 | 18,7 |
| 3 | 53,4 | 42,9 | 240,4 | 96,6 | 64,2 | 13,1 | 20,1 |
| 4 | 50,6 | 34,6 | 223,8 | 82,5 | 31,2 | 15,9 | 20,2 |
| 5 | 75,3 | 34,0 | 231,9 | 72,5 | 76,8 | 17,7 | 20,1 |
| 6 | 42,5 | 18,0 | 240,5 | 86,5 | 42,7 | 12,8 | 18,2 |
| 7 | 74,5 | 45,3 | 237,3 | 72,7 | 51,3 | 15,6 | |
| 8 | 54,3 | 51,1 | 234,2 | 93,5 | 41,2 | 13,8 | |
| Keskiarvo | 51,6 | 39,7 | 238,8 | 85,5 | 48,2 | 14,0 | 19,6 |
| Keskihajonta | 16,0 | 10,4 | 9,1 | 9,0 | 14,3 | 2,2 | 0,9 |
| CV % | 30,9 | 26,2 | 3,8 | 10,5 | 29,7 | 16,1 | 4,4 |



KUVIO 8: Kalprotektiinin pitoisuus eri näytteillä ja koostumuksilla. Näytteenottokohdasta riippuvan pitoisuuden vaihtelut.

7.4 Tulosten hyödynnettävyys

Kalprotektiininäytteiden lähetysohjeiden mukaan näytteet voidaan lähettää huoneenlämpöisinä. Tutkimuksissa on todettu kalprotektiinin säilyvän ulosteessa hajoamatta jopa 5-7 vuorokautta. Tekemämme tutkimuksen perusteella näyttää siltä, että kalprotektiininäytteet olisi hyvä lähettää kylmälähetyksenä +4°C:ssa, jos näytteen lähetyks tai analysointi kestää pidempään kuin 3 päivää. Jos lähetykseen tai analysointiin kuluu yli 7 päivää, tulisi näyte lähettää pakastettuna -20°C:ssa. Näitä saatuja tuloksia voidaan hyödyntää esimerkiksi laboratorion ulkopuolelta tuleviin kysymyksiin näytteiden säilytyksestä tai kuljetuksesta. Laboratoriossa näytteet on tutkimuksemme perusteella hyvä säilyttää aina kylmässä, mieluiten -20°C:ssa.

Analyysia voidaan lyhentää ensimmäisen inkubaation aikaa lyhentämällä. Tutkimuksemme mukaan 15 minuutin inkubaatio on riittävä, mutta käytännössä jo kuoppalevyille pipetointi vie lähes 15 minuuttia. Ensimmäisen inkubaation on oltava pidempi, jotta kuopat olisivat tasavertaisia. Nykyisestä 45 minuutista voitaisiin ensimmäisen inkubaation aikaa lyhentää esimerkiksi 30 minuuttiin ilman, että menetelmän herkkyys tutkimuksemme perusteelle kärsisi. Menetelmää voidaan sitä vastoin herkistää toista inkubaatioaikaa pidentämällä. Toisen inkubaatioajan ollessa 90 minuuttia menetelmä oli tutkimuksemme mukaan herkimmillään.

Homogeenisuustutkimuksemme perusteella näytekohta tulee valita huolella. Punnitusvaiheessa mukaan tulee ottaa ainoastaan sulanutta homogeenista ulostetta, jotta tutkimuksen tulos olisi luotettava. Myös ulostenäytteen verisiä kohtia tulee välttää.

8 TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Tutkimuksen tulee mitata sitä, mitä oli pyrkimyksenä selventää. Validiteetin käsittely kuuluu tärkeänä osana hyvään tutkielmaan. Luotettavuutta mitataan yleensä kahdella käsitteellä: reliabiliteetilla ja validiteetilla. Reliabiliteetilla tarkoitetaan tulosten tarkkuutta eli tutkimuksen toistettavuutta. Sisäinen reliabiliteetti tarkoittaa, että mitattaessa samaa asiaa monta kertaa saadaan samanlaisia tuloksia. Ulkoinen reliabiliteetti tarkoittaa, että mittaukset ovat toistettavissa myös muissa tutkimuksissa ja tilanteissa. (Heikki-

lä 1999: 30, 187; Metsämuuronen 2000: 11.) Validiteetin luotettavuudella tarkastellaan, mitataanko juuri sitä, mitä on tarkoitus mitata (Heikkilä 1999: 186; Metsämuuronen 2000: 11). Sisäisellä validiteetilla mitataan, vastaavatko mittaukset tutkimuksen teorioasassa esitettyjä käsitteitä. Ulkoisessa validiteetissa tarkastellaan, pystyvätkö myös muut tutkijat tulkitsemaan kyseiset tutkimustulokset samalla tavoin. (Heikkilä 1999: 186.)

8.1 Työprosessin luotettavuus

Työprosessin luotettavuus pyrittiin takaamaan hyvällä suunnittelulla ja toimimalla kaikissa vaiheissa työohjeiden mukaan. Olimme etukäteen määrittäneet tutkimuskysymykset ja tavoitteet, joilla varmistettiin, että mittaukset vastaavat sitä, mitä on tarkoitus tutkia. Kävimme ennen työskentelyn aloittamista ohjauksissa sekä tutustumassa määritysmenetelmään ja työskentelytapoihin. Suunnittelimme valmiiksi näytteiden numeroinnin säilyvyys- ja homogeenisuustutkimukseen ja varasimme säilytystilat näytteille. Teimme omat värikoodatut tarrat jokaiselle näytteelle helpottaaksemme niiden käsittelyä. Olimme tehneet myös päiväsuunnitelmat. Inkubaatiotutkimuksiin teimme kuoppalevy-suunnitelmat etukäteen ennen työskentelyn aloittamista. Hyvällä valmistelulla työskentely oli helppo suorittaa aikataulussa suunnitelman mukaisesti. Kaikki määritykset tehtiin samoilla ohjeilla ja laitteilla kun rutiinimääritykset. Tällä varmistettiin tulosten vertailukelpoisuus laboratorion omiin tuloksiin nähden.

Reagenssien, jääkaappi- ja pakastinnäytteiden annettiin tasaantua huoneenlämmössä ainakin puolen tunnin ajan ennen analysointia. Näytteet sekoitettiin aina huolellisesti ennen niiden pipetointia kuoppalevyille. Työprosessit olimme suunnitelleet siten, että toinen parista esikäsittelee näytteet toinen analysoi ne. Näin vältimme henkilöstä tai työskentelytavasta johtuvaa sattumanvaraisuutta. Näytteiden käsin tehtävässä esikäsitteilyssä on inhimillisen virheen mahdollisuus. Kävimme harjoittelemassa pipetointia ja monikanavaisen pipetin käyttöä Naistenklinikan laboratoriossa ennen työn aloitusta. Hyvällä pipetointitekniikalla ja huolellisuudella jokaisessa työvaiheessa voidaan minimoida virheiden ilmaantuminen.

Näytteiden säilytysolosuhteet pidettiin mahdollisimman stabiileina koko työprosessin ajan. Jääkaappi- ja pakastinnäytteet oli jaettu eriin päivittäisiä analyysejä varten. Siten vältettiin koko näyte-erän siirtely -20°C :n, $+4^{\circ}\text{C}$:n ja $+20^{\circ}\text{C}$:n välillä. Analysoinnit py-

rittiin tekemään mahdollisemman samanaikaisesti joka päivä. Ensimmäisen päivän analyysi aloitettiin jo 16 tunnin säilytyksen jälkeen, koska edellisenä päivänä punnitukset lopetettiin myöhässä. Siksi myös kolmannen päivän analyysi aloitettiin 2 vuorokauden ja 16 tunnin jälkeen punnituksesta ja seitsemännen päivän 6 vuorokauden ja 16 tunnin jälkeen punnituksesta. Punnitukset myöhästivät, koska työskentelyssämme tuli ottaa huomioon potilasnäytteiden ensisijaisuus.

Työmme validiteetti kuvaa, missä määrin on onnistuttu mittaamaan juuri sitä mitä piti-kin mitata. Säilyvyystutkimuksessamme halusimme tietää missä lämpötilassa ja kuinka kauan kalprotektiini säilyy parhaiten. Inkubaatiotutkimuksessa pyrimme selvittämään, mitkä inkubaatioajat olisivat optimaalisimmat ulosteen kalprotektiininäytteille. Homogeenisuustutkimuksesta saimme tiedon, vaikuttaako näytteenotto kohta ulostenäytteen kalprotektiinipitoisuuteen.

Sisäisellä validiteetilla tarkoitamme sitä, vastaavatko tehdyt mittaukset teoriaosuudessa esitettyjä käsitteitä. Meidän tapauksessamme pohdimme, olivatko tutkimuskysymykset onnistuneita. Saamamme tulokset vastaavat tutkimuskysymyksiimme. Teoriaosamme tukee sisäistä validiteettia.

Ulkoinen validiteetti toteutuu myös. Työ on toistettavissa, ja tuloksista on mahdollista saada samankaltaisia. Teoriaosassa olemme jo kertoneet samanlaisista tuloksista, kuin mitä me olemme tutkimuksessamme saaneet.

Tulokset ovat objektiivisia eli puolueettomia, sillä eri menetelmiä ja tuloksia käsiteltiin työntekijöiden mielipiteistä riippumatta ja ilman ennako-odotuksia. Myös tehtävän suoritusmenetelmä, kysymysten muotoilu ja tulosten raportointi on valittu puolueettomasti ja tuloksista on pyritty laskemaan useita eri tekijöitä luotettavuuden maksimoimiseksi.

Tässä raportissa on pyritty kertomaan tutkimuksen kulku niin tarkasti, että se olisi mahdollista toistaa luetun perusteella. Jotta prosessin seuranta olisi johdonmukaista, on tehty valinnat ja päätökset pyritty perustelemaan raportissa.

8.2 Tulosten luotettavuus

Valitsemamme otoskoko oli pieni. Saamamme tutkimustulokset ovat jokaisen tutkimuksen osalta suuntaa antavia ja ollakseen luotettavia tarvitaan lisätutkimusta laajemmilla resursseilla. Tiedonkeruu tapahtui tulostamalla analysaattorin antamat tulokset paperille ja analysoimalla tiedot Microsoft Office Excel-ohjelmalla. Tarkistimme syötetyt tulokset useaan otteeseen mahdollisten näppäilyvirheiden välttämiseksi. Tuloksia tulkittiin laskemalla millimetripaperille laskennallinen herkkyys kemisti Henrik Alfthanilta saatujen ohjeiden mukaan. Saimme huomattavasti tarkemmat tulokset käyttämällä millimetripaperia tietokoneohjelmien asemesta säilyvyys- ja inkubaatiotutkimuksissa. Tulosten luotettavuutta tarkasteltiin erilaisilla testeillä, joita suoritimme SPSS-ohjelmalla. Testit pyrittiin valitsemaan siten, että ne soveltuisivat mahdollisimman hyvin pienten otosten testaamiseen. Saimme apua oikeiden testien valitsemiseen koulumme ATK-opettajilta Sami Grönbergiltä ja Päivi Leskiseltä. Leskinen myös vahvisti tulosten tulkinnat oikeiksi. Tulosten tulkinnan ja sitä kautta luotettavuuden arvioinnin helpottamiseksi teimme erilaisia kuvaajia ja taulukoita, joista tulosten hahmottaminen ja virheiden havaitseminen helpottuu.

9 POHDINTA

Saimme työmme aiheen Naistenklinikan laboratorion kemistiltä Henrik Alfthanilta tammikuussa 2010. Alun perin tarkoituksena oli tutkia ainoastaan ulosteen kalprotektiinin säilyvyyttä yhden, kolmen ja seitsemän päivän ajan eri lämpötiloissa. Seuraavana mukaan tuli inkubaatiotutkimus pelkillä standardeilla. Homogeenisuustutkimus tuli mukaan vasta siinä vaiheessa, kun pohdimme säilyvyystutkimukseen käytettäviä näytteitä ja sitä, miten valitsemme näytteenottokohdan. Vasta viimeisenä, jo tehdessämme laboraatioita, otimme inkubaatiotutkimukseen mukaan nollakokeet, eli ainoastaan reagenssi-liuksilla tehtävän inkubaatiotutkimuksen. Olimme saaneet Naistenklinikan laboratorion ylilääkäri Esa Hämäläiseltä luvan käyttää kolme reagenssipakkausta tutkimustemme tekoon. Resurssit olivat rajalliset, sillä reagenssipakkaukset maksavat yli 600 euroa kappaleelta. Määrä muuttui kokeitten edetessä ja tutkimuksen laajentuessa kemistin ohjauksessa. Käytimme lopulta kuusi reagenssipakkausta tutkimuksiemme tekoon. Pienemmällä reagenssipakkausmäärällä ei kaikkia tutkimuksia olisi voitu suorittaa edes näin pienillä otoksilla. Olemme tyytyväisiä tutkimuksemme laboraatioiden laajuuteen, ja mielestämme ne ovat riittävät kahden hengen opinnäytetyöksi.

Ennen laboraatioita teimme koko teoriaosuuden opinnäytetyöhömmme. Aloitimme prosessin tammikuussa kalenteriin merkitsemällä opinnäytetyön kirjoittamiselle varatut päivämäärät. Teoriaosuuden kirjoittaminen kesti ilman viikkoa pidempää taukoa tammikuusta kesäkuun alkuun saakka. Olimme varanneet kirjoitustyölle tarpeeksi aikaa, jotta pystyimme muokkaamaan tekstin mieleisemmeksemme ja etsimään hyviä ja tarpeellisia lähteitä. Erityisen hankalaa oli tiedonhakuprosessin alkuvaiheessa. Vaikeuksia tuotti tutkimusten ja hyvien lähteiden etsiminen inkubaatioajoista ja ulosteen kalprotektiini-näytteen homogeenisuudesta. Säilyvyydestä tietoa löytyi hieman paremmin, mutta ei helposti. Olemme sitä mieltä, että tämä vaihe prosessista olisi ollut molemmille erityisen hankala suorittaa yksin. Parin tuki ja kannustus auttoivat yli vaikean työvaiheen. Pitkä teoriaosuuden työstäminen mahdollisti lähteiden tilaamisen koulun kirjaston kautta, tiedonhaun Biomedicum kirjastossa sekä kirjalainat kemistiltä. Meille oli tärkeää, että teoriaosuus olisi mahdollisimman viimeistelty ennen laboraatioiden aloittamista. Kirjoittaminen auttoi ymmärtämään, mitä teimme omassa tutkimuksessamme ja miksi. Ilman valmista teoriaosuutta emme olisi osanneet myöskään asettaa itsellemme tavoitteita tai tutkimusongelmia työllemme.

Laboratoriotyöskentelyn aloitimme toukokuussa 2010 tutustumalla käsin tehtävään määritysmenetelmään etukäteen. Vasta tässä vaiheessa meille selvisi, että joudumme työskentelemään ilman BEP® 2000 -analysointia. Jätimme analysointin kuvauksen lyhenneltynä esittelyä teoriaosuuteen, sillä sen käyttöönottoa suunnitellaan laboratoriossa edelleen. Teimme säilyvyystutkimusten mukaan työsuunnitelmat kahdeksi viikoksi etukäteen. Ne päivät, jolloin emme tehneet säilyvyystutkimuksia, teimme homogeenisuus- ja inkubaatiotutkimuksia. Aikaa oli säästetty myös yllätyksille, eli ylimääräiselle työlle, jos suunnitelmamme ei toimisi. Ylimääräisen ajan käytimme nollanäytetutkimukseen ja työn suorituksen kirjoittamiseen. Muistimme paremmin ja todenmukaisemmin työn suorituksen, kun saimme sen heti kirjoitettua. Vuoropäivinä toinen esikäsitteli näytteet ja kirjoitti suoritusta, kun toinen analysoi ja suoritti laboratoriotyön. Molemmat pääsivät sisäistämään laboratorioanalyysin ja saivat vaihtelua työpäiviin. Naistenklinikan laboratoriossa analysoidaan potilaiden ulosteen kalprotektiininäytteitä päivittäin, joten teimme laboraatioita omissa oloissamme käytävällä vaihtelevissa työolosuhteissa. Meille oli alkujaan suunniteltu oma työpiste, mutta sitä ei tilanpuutteen vuoksi ollut mahdollista järjestää. Laboraatioiden käytännön osuudessa ja työtapojen valinnoissa meitä auttoivat Iina Ververs ja Anne Blomberg, joista Blomberg toimi myös työpaikkaohjaajanamme.

Tulosten tulkinnan aloitimme kesäkuun alussa 2010. Jo laboraatioiden aikana käsitelimme tuloksia Excel-ohjelmalla, sillä emme saaneet tuloksista valmista liuskaa, jossa absorbanssit olisivat olleet muutettuina pitoisuuksiksi. Teimme siis kovan työn syöttäessämme ja laskeessamme absorbansseja pitoisuuksiksi. Teimme erilaisia taulukoita ja viivakaavioita tuloksista. Laskimme myös millimetripaperilla pitoisuuksia ja herkkyyskäyriä, mikä oli erittäin aikaa vievää ja haastavaa. Lisäksi kirjoitimme tulkinnat suurimasta osasta tutkimuksiamme. Kesäkuun jälkeen pidimme tauon kirjoitusprosessissa ja palasimme työntekoon elokuun puolella välissä. Jatkoimme tulosten tulkintaa tekemällä säilyvyystutkimuksille SPSS-testejä. Tämän jälkeen kirjoitimme loput tulosten tulkintatietoon ja rupesimme pohtimaan luotettavuutta. Viimeistelyn aloitimme syyskuun alussa 2010.

Olemme oppineet paljon opinnäytetyöprosessin aikana. Teoriatiedon linkittyminen käytännön työskentelyyn tuli selvästi esiin työssämme. Opimme hakemaan tietoa ja lähteitä entistä paremmin ja punnitsemaan tutkimusten luotettavuutta. Aikataulusta kiinnipitäminen ja tarkkojen työsuunnitelmien tekeminen olivat ehdottomasti hyvä asia prosessin

aikana. Olimme suunnitelleet aikataulun riittävän väljäksi ja ehdimme hyvin saattamaan työmme loppuun ja viimeistelemään sen ennen palautuspäivämäärää. Mielestämme olemme suoriutuneet opinnäytetyön teoria-, tutkimuksellisesta ja tulkinnallisesta osasta kiitettävästi, mutta olisimme toivoneet enemmän ulkopuolista palautetta sisällön suhteen prosessin aikana.

Saimme mielestämme hyviä ja luotettavia tuloksia monelta eri kannalta arvioituina. Otokokomme oli kaikin puolin pieni jokaisessa tutkimuksessa, mutta tuloksiamme voidaan pitää suuntaa antavina. Ainakin kahdessa aikaisemmassa tutkimuksessa mainitaan kalprotektiinipitoisuuden pysyvän ulosteessa stabiilimpana pakastelämpötilassa pitkillä säilytysajoilla. Myös meidän säilyvyystutkimuksemme tulokset viittaavat siihen, ettei ulosteen kalprotektiinipitoisuus pysy samana, vaan laskee muissa säilytyslämpötiloissa kuin -20°C :ssa. Yhden tutkimuksen mukaan kalprotektiinipitoisuus säilyisi ulosteessa seitsemän päivää myös huoneenlämmössä. Tutkimuksemme mukaan kalprotektiinipitoisuus laskee $+20^{\circ}\text{C}$:ssa jo kolmannen säilytyspäivän jälkeen. Yhdessä tutkimuksessa on pienellä otoksella ($n=4$) todettu, että kalprotektiini jakautuu ulostenäytteeseen tasaisesti. Emme tiedä millaisia kohtia tutkijat ovat valinneet, mutta meidän tulostemme ja otoksemme ($n=6$) perusteella näytteenottokohdalla on merkitystä tulosten luotettavuuden kannalta. Olimme valinneet tarkoituksella hyvin erilaisia kohtia. Yleinen käsitys kuitenkin on, että epämääräisiä kohtia vältetään ottamasta mukaan analyysiin. Inkubaatioista emme ole löytäneet aikoja vertailevaa tutkimustietoa. Monessa tutkimuksessa todetaan, että tällä ELISA -menetelmällä on käytetty tiettyjä inkubaatioaikoja ja että tutkimus on luotettava. Tutkimuksessamme saimme selville, että ensimmäistä inkubaatiota pystyttäisiin ajallisesti lyhentämään, mutta toista inkubaatiota ei. Sen sijaan toista inkubaatiota pidentämällä menetelmää pystyttäisiin herkistämään. Tutkimustietoa tarvittaisiin kuitenkin lisää jokaiseen osa-alueeseen, jotta tuloksista voitaisiin vetää vahvoja johtopäätöksiä.

Ammatillisesti olemme kehittyneet prosessin aikana. Jo kehittämistehtävä valmisti meitä opinnäytetyöhön. Osasimme käyttää ammatillista, usein englanninkielistä lähdemateriaalia ja poimia olennaisimmat kohdat tekstistä paremmin ja paremmin prosessin edetessä. Suunnitelmallisuus kannatti ja opimme arvioimaan ajankäyttöä työskentelyssämme. Työskentelyn aikana huomasimme myös ammatillisen kehityksemme opiskelujen aloituksesta tähän päivään saakka. Esimerkiksi menetelmien hallinta, laboratoriossa työskenteleminen, muiden kanssa kommunikointi ammattikielellä ja oman työskentelyn

luotettavuuden arviointi ovat parantuneet paitsi opinnäytetyön tekemisen myötä, myös koko opiskelun ajan. Opinnäytetyö on ollut meille kokoava kokemus opintojen ajalta.

LÄHTEET

- Alfthan, Henrik 2010. Kemisti. Naistenklinikan laboratorio, HUSLAB, Helsinki. Suullinen tiedonanto.
- Bunn S.K. - Bisset W. M. - Main M.J.C - Golden B.E. 2001: Fecal Calprotectin as a Measure of disease Activity in Childhood Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 32 (2) 171-177.
- CALPRO Calprotectin ELISA Test (ALP) reagenssipakkausohje 2009
- Calprotectin ELISA. Bühlmann Laboratories AG. 13.7.2009.
- Craft, David W. 2000: Emergent Technologies. Textbook of Diagnostic Microbiology. W.B. Saunders Company. USA, Philadelphia Pennsylvania. Toinen painos.
- Fagerhol, Magne - Dale, Inge - Røseth, Arne 1995: Diagnostic test and kit for disease or disorders in the digestive system. Patentti. United States Patent.
- Färkkilä Martti: Tulehdukselliset suolistosairaudet. Mikko Mäyränpää (toim.); Terapia Fennica. Kandidaattikustannus OY. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.9.2007. <http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Tulehdukselliset_suolistosairaudet>. Luettu 22.2.2010
- Gaya D.R. - Lyon T.D.B. - Duncan A. - Neilly J.B. - Han S. - Howell J. - Liddell C. - Stanley A.J, Morris A.J. - Mackenzie J.F. 2005: Faecal calprotectin in the assessment of Crohn`s disease activity. Oxford University Press.
- Hakuli, Laura 2010: Valokuvat ulosteen kalprotektiinin analysoinnin työvaiheista Naistenklinikan laboratoriossa. 5/2010.
- Halonen, Toivo 2003a: Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WSOY. 66-69.
- Halonen, Toivo 2003b: Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WSOY. 90-100.
- Hautejärvi, Tarmo – Ottelin, Jukka – Wallin-Jaakkolla, Leena 2003: Variaabeli kertauskirja. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Otava.
- Heikkilä, Tarja 2002: Tilastollinen tutkimus. 4.painos. Helsinki: Oy Edita Ab.
- HUSLAB 2010: Tutkimusohjekirja. Potilasohjeet. Kalprotektiini ulosteesta F-Calpro. HUSLAB ohjekirja. Verkkodokumentti. Päivitetty 19.1.2010. http://huslab.fi/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4871&terms=f-cal. Luettu 20.2.2010.
- Kaplan Lawrence A. – Pesce Amadeo J. 1996: Principles for competitive-binding assays. Clinical Chemistry. Thompson Stephan A. St. Louis, Missouri. Mosby-Year Book. Kolmas painos.

- Karjalainen, Leila 2000: Tilastomatematiikka 7. painos Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Kricka, Larry J. 2008: Principles of immunochemical techniques. Burtis Carl A. - Ashwood Edward R. – Bruns David E. (toim.): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry 6. painos. W.B. Saunder Company. USA. 155- 170.
- Mattila, Pirjo – Piironen, Vieno - Ollilainen, Velimatti 2003: Näytteenotto. Elintarvikemedia ja –analytiikka. Yliopistopaino. Helsinki.
- Mellin, Ilkka 2004: Testit järjestysasteikollisille muuttujille. Johdatus tilastotieteeseen. Verkkodokumentti. Päivitetty 10.2.2006.
<http://www.sal.tkk.fi/vanhat_sivut/Opinnot/Ma-2.104/luennot2006/Luento3a.pdf> Luettu 3.9.2010.
- Metsämuuronen, Jari 2000: Tilastollisten kuvauksen perusteet. Metodologian-sarja 2. Jaabes OÜ. Viro.
- Niemelä, Seppo 2007: Tulehdukselliset suolistosairaudet. Duodecim. 1. painos. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.
- Nummenmaa, Lauri 2004: Käyttätymistieteiden tilastolliset menetelmät. Tammi Oy. Vammalan Kirjapaino Oy. Vammala.
- Payling, Richard 2000: Gladnet. Verkkodokumentti. Päivitetty 29.4.2008.
<http://www.thespectroscopy.net/Index.html?/Detection_Limits_3.html>. Luettu 26.2.2010.
- Penttilä, Ilkka 2003: Entsyymianalyysien periaatteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo WSOY. 1. 82-89.
- Poullis, A. - Foster R. - Shetty A. - Fagerholm M.K. - Mendall M.A. 2004: Bowels inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. Cancer Epidemiology Preview 13 (2). 279.
- Røseth - Schmit - Fagerhol 1999: Correlation between Faecal Excretion of Indium - 111- Labelled Granulocytes and Calprotectin, a Granulocyte Marker Protein in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology 34. 50-54.
- Røseth, A. - Fagerhol, M. - Aaland, E. - Schjonsby, H. 1992: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. The Scandinavian journal of Gastroenterology 27 (9) 793-798.
- Siemens BEP® 2000 analysaattorin käyttöohje 2009.
- Siemens BEP® III analysaattorin käyttöohje 2009.
- Silberer, Hannah – Küppers, Bruno – Mickisch, Oliver – Baniewicz, Wojtek – Drescher, Maren – Draber, Lydia – Kempf, Alexander - Schmidt-Gayk, Heinrich 2005: Fecal Leukocyte Proteins in Inflammatory Bowel Disease and Irritable Bowel Syndrome. Clin.Lab. 2005; 51:117–126.

Sipponen, Taina – Savilahti, Erkki – Kärkkäinen, Päivi - Kolho, Kaija-Leena - Nuutinen, Hannu - Turunen, Ulla – Färkkilä, Martti 2008: Ulosteen kalprotektiini ja laktoferrini lupaavia merkkiaineita biologisen hoidon vasteen arvioinnissa Crohnin tautia sairastavilla. Duodecim 12/2008.

Sipponen, Taina 2006: Ulosteen merkkiaineiden käyttö inflammatorisissa suolisairauksissa. Moodi 30 (1). 27–29.

Sipponen, Taina 2009: Noninvasive Monitoring Of Activity In Crohn's Disease. Väitöskirja. University of Helsinki, Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Helsinki University Central Hospital.

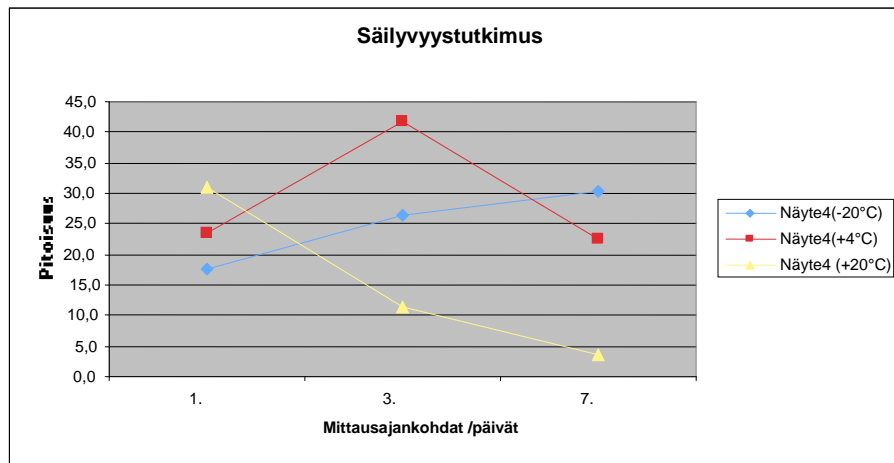
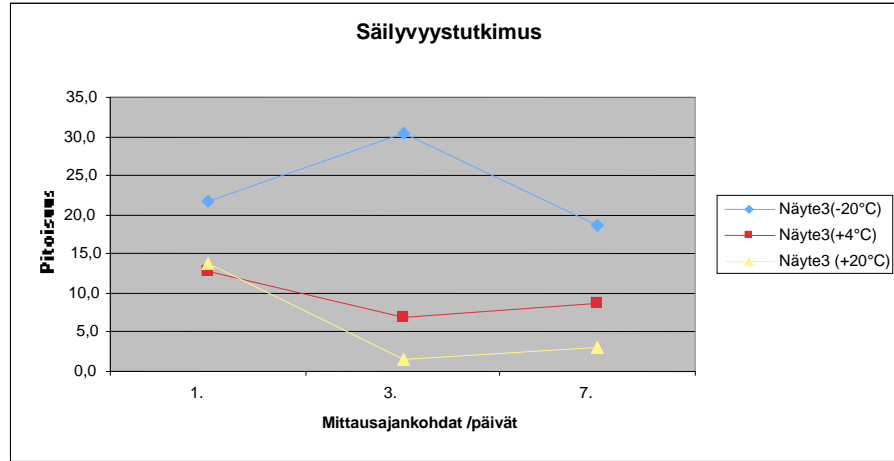
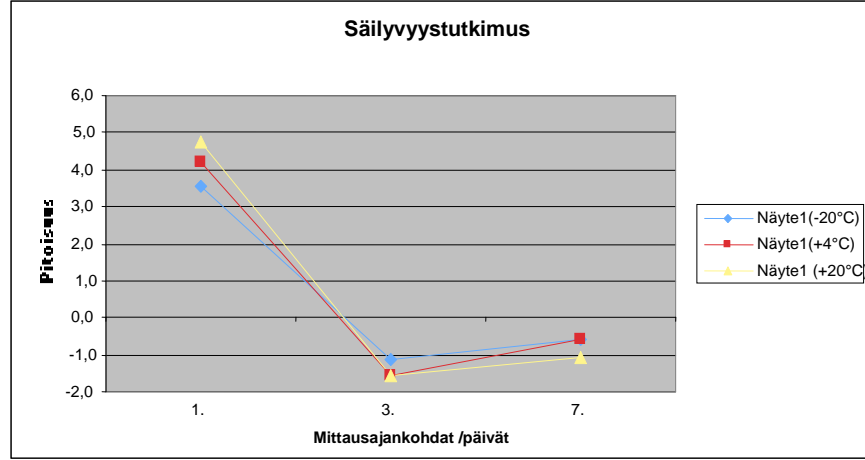
Tanner, Pirjo 2007: Näytteiden lähettäminen. Moodi 31 (1). 22.

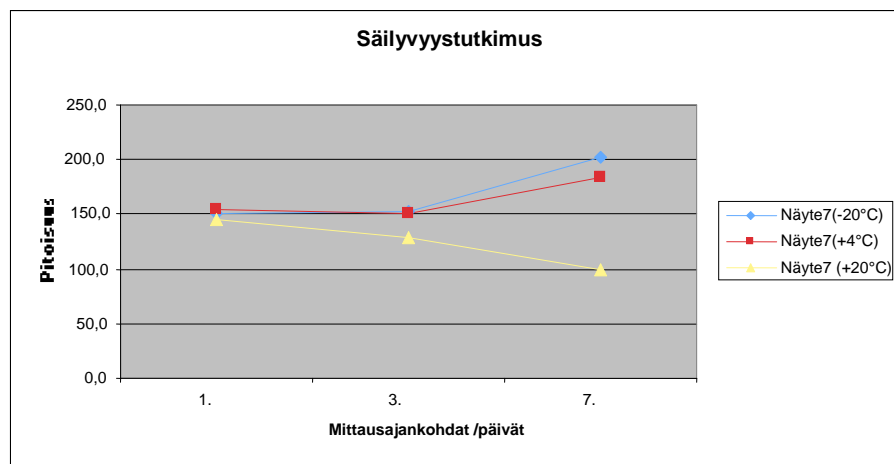
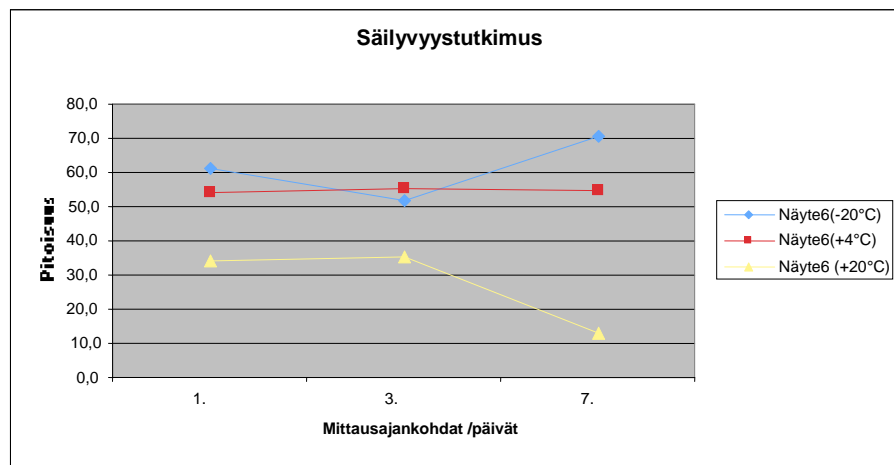
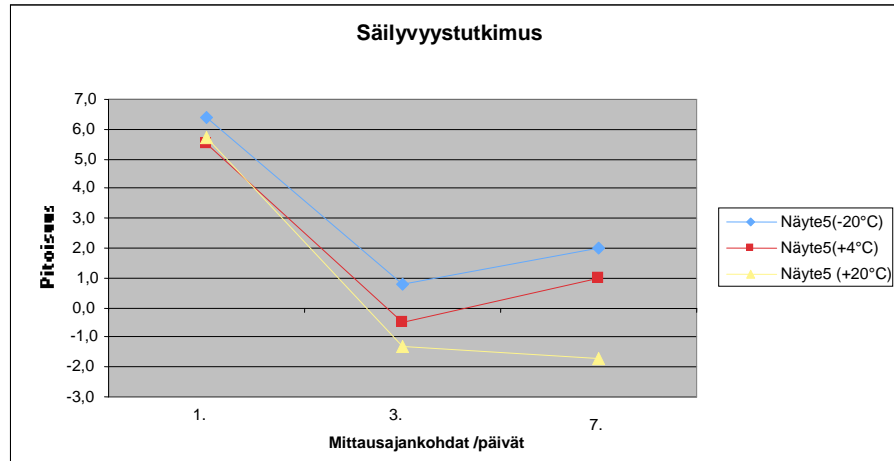
Tapola, Hilikka 2003: Näytteiden käsittely ja lähettäminen sekä kuljetus. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo WSOY. 29-31.

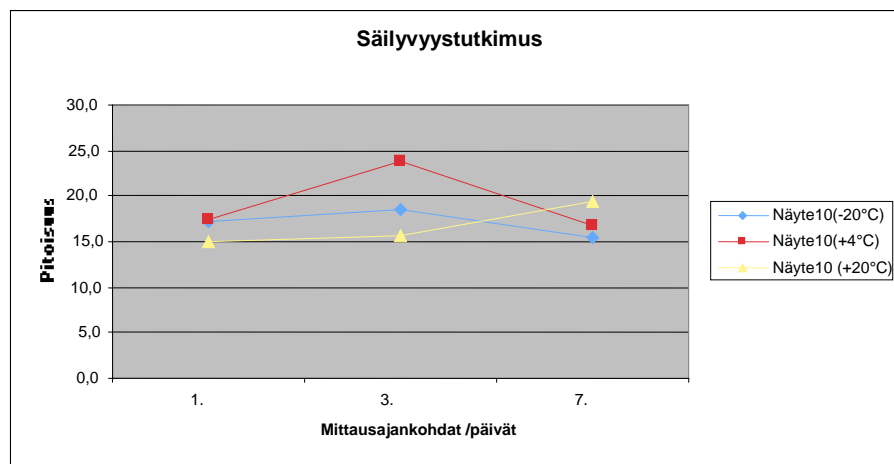
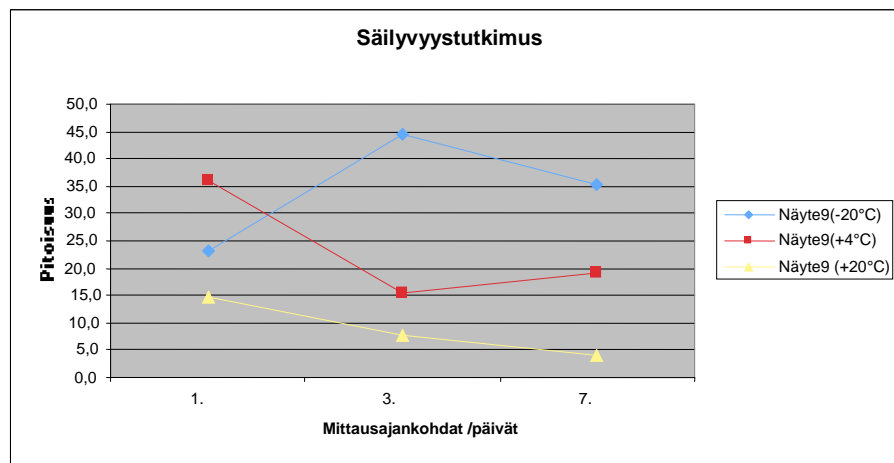
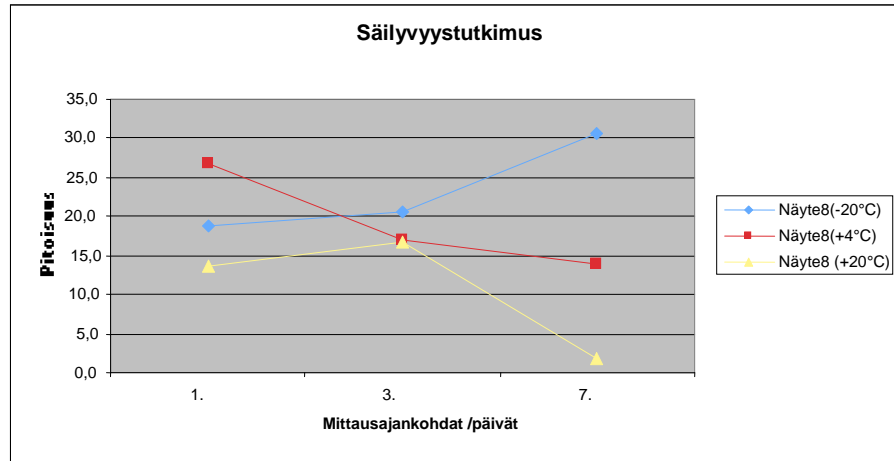
SÄILYVYYSTUTKIMUS, NÄYTTEIDEN PITOISUUDET

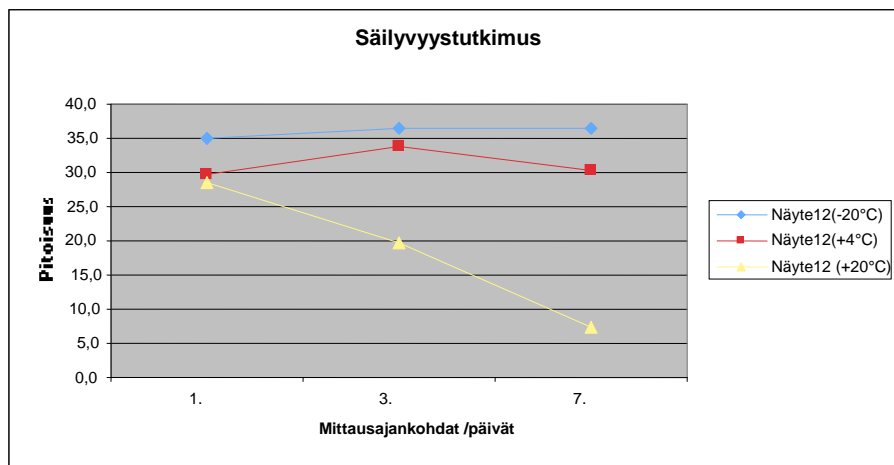
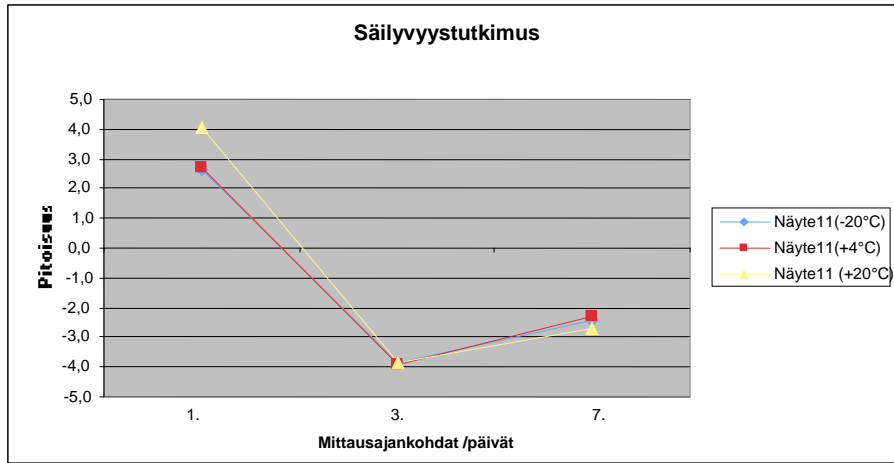
| Kalprotektiini (µg/l): pakastin (-20°C) | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|------------------|---------------------|------------|
| Näyte | 1 vrk | 3 vrk | 7 vrk | Keskiarvo | keskihajonta | CV% |
| 1 | 3,5 | 2,7 | 2,9 | 3,1 | 0,4 | 13,4 |
| 3 | 19,9 | 30,0 | 17,5 | 22,5 | 6,6 | 29,5 |
| 4 | 16,0 | 25,0 | 28,0 | 23,0 | 6,2 | 27,2 |
| 5 | 5,9 | 3,3 | 3,7 | 4,3 | 1,4 | 32,6 |
| 6 | 65,0 | 47,5 | 72,0 | 61,5 | 12,6 | 20,5 |
| 8 | 17,0 | 19,2 | 28,0 | 21,4 | 5,8 | 27,2 |
| 9 | 21,5 | 41,0 | 34,0 | 32,2 | 9,9 | 30,7 |
| 10 | 16,0 | 17,5 | 15,0 | 16,2 | 1,3 | 7,8 |
| 11 | 3,0 | 1,9 | 2,3 | 2,4 | 0,6 | 23,2 |
| 12 | 35,0 | 35,0 | 35,0 | 35,0 | 0,0 | 0,0 |
| Kalprotektiini (µg/l): jääkaappi (+ 4°C) | | | | | | |
| Näyte | 1 vrk | 3 vrk | 7 vrk | Keskiarvo | keskihajonta | CV% |
| 1 | 4,2 | 2,6 | 2,9 | 3,3 | 0,8 | 25,9 |
| 3 | 12,0 | 6,2 | 7,9 | 8,7 | 3,0 | 34,3 |
| 4 | 27,5 | 39,0 | 19,9 | 28,8 | 9,6 | 33,4 |
| 5 | 5,0 | 2,9 | 3,2 | 3,7 | 1,1 | 30,7 |
| 6 | 58,5 | 50,0 | 52,0 | 53,5 | 4,4 | 8,3 |
| 8 | 25,5 | 16,5 | 13,5 | 18,5 | 6,2 | 33,8 |
| 9 | 36,5 | 41,0 | 17,5 | 31,7 | 12,5 | 39,4 |
| 10 | 16,0 | 22,0 | 16,0 | 18,0 | 3,5 | 19,2 |
| 11 | 3,0 | 1,9 | 2,3 | 2,4 | 0,6 | 23,2 |
| 12 | 29,0 | 33,0 | 27,5 | 29,8 | 2,8 | 9,5 |
| Kalprotektiini (µg/l): huoneenlämpö(+20°C) | | | | | | |
| Näyte | 1 vrk | 3 vrk | 7 vrk | Keskiarvo | keskihajonta | CV% |
| 1 | 4,5 | 2,6 | 2,9 | 3,3 | 1,0 | 30,6 |
| 3 | 13,0 | 3,5 | 4,0 | 6,8 | 5,3 | 78,2 |
| 4 | 31,0 | 10,5 | 4,5 | 15,3 | 13,9 | 90,6 |
| 5 | 5,0 | 2,7 | 2,5 | 3,4 | 1,4 | 40,9 |
| 6 | 34,0 | 34,0 | 12,5 | 26,8 | 12,4 | 46,3 |
| 8 | 13,0 | 16,5 | 3,7 | 11,1 | 6,6 | 59,8 |
| 9 | 14,0 | 6,9 | 4,5 | 8,5 | 4,9 | 58,3 |
| 10 | 14,0 | 16,0 | 17,5 | 15,8 | 1,8 | 11,1 |
| 11 | 4,0 | 1,9 | 2,3 | 2,7 | 1,1 | 40,8 |
| 12 | 28,0 | 18,5 | 7,0 | 17,8 | 10,5 | 59,0 |

KALPROTEKTIINIPITOISUUDEN MUUTOKSET ERI SÄILYVYYSAJOILLA JA LÄMPÖTILOILLA NÄYTEKOHTAISESTI









SÄILYVYYSTUTKIMUKSEN ABSORBANSSIARVOT

| | STD | NÄYTENUMERO | 1. PÄIVÄ -20°C | 1. PÄIVÄ+4°C | 1.PÄIVÄ+20°C |
|----------|------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| A | 0,166 | 1 | 0,103 | 0,113 | 0,121 |
| B | 0,276 | 3 | 0,379 | 0,244 | 0,260 |
| C | 0,532 | 4 | 0,318 | 0,408 | 0,521 |
| D | 1,006 | 5 | 0,146 | 0,133 | 0,136 |
| E | 1,942 | 6 | 0,975 | 0,876 | 0,565 |
| F | 2,587 | 8 | 0,336 | 0,457 | 0,258 |
| G | 2,745 | 9 | 0,402 | 0,595 | 0,275 |
| H | 2,791 | 10 | 0,312 | 0,315 | 0,276 |
| | | 11 | 0,089 | 0,090 | 0,111 |
| | | 12 | 0,580 | 0,499 | 0,484 |
| | STD | NÄYTENUMERO | 3. PÄIVÄ -20°C | 3. PÄIVÄ+4°C | 3.PÄIVÄ+20°C |
| A | 0,236 | 1 | 0,140 | 0,133 | 0,133 |
| B | 0,382 | 3 | 0,630 | 0,263 | 0,179 |
| C | 0,666 | 4 | 0,565 | 0,803 | 0,336 |
| D | 1,201 | 5 | 0,169 | 0,149 | 0,137 |
| E | 2,058 | 6 | 0,960 | 1,013 | 0,704 |
| F | 2,813 | 8 | 0,478 | 0,420 | 0,415 |
| G | 3,664 | 9 | 0,848 | 0,394 | 0,276 |
| H | 3,066 | 10 | 0,444 | 0,527 | 0,400 |
| | | 11 | 0,098 | 0,096 | 0,097 |
| | | 12 | 0,722 | 0,682 | 0,462 |
| | STD | NÄYTENUMERO | 7. PÄIVÄ -20°C | 7. PÄIVÄ+4°C | 7.PÄIVÄ +20°C |
| A | 0,154 | 1 | 0,100 | 0,100 | 0,095 |
| B | 0,248 | 3 | 0,291 | 0,192 | 0,136 |
| C | 0,456 | 4 | 0,407 | 0,327 | 0,141 |
| D | 0,153 | 5 | 0,126 | 0,115 | 0,089 |
| E | 1,333 | 6 | 0,802 | 0,649 | 0,234 |
| F | 2,232 | 8 | 0,408 | 0,244 | 0,125 |
| G | 2,575 | 9 | 0,456 | 0,294 | 0,147 |
| H | 2,670 | 10 | 0,259 | 0,271 | 0,298 |
| | | 11 | 0,081 | 0,083 | 0,079 |
| | | 12 | 0,468 | 0,404 | 0,178 |

INKUBAATIOTUTKIMUS/ABSORBANSIARVOT

Nollanäytteet

| | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| 15+30 min. | 15+60 min. | 15+90 min. |
| 0,145 | 0,204 | 0,253 |
| 0,221 | 0,336 | 0,418 |
| 0,383 | 0,568 | 0,699 |
| 0,647 | 0,989 | 1,137 |
| 1,119 | 1,641 | 1,782 |
| 30+30 min. | 30+60 min. | 30+90 min. |
| 0,158 | 0,196 | 0,251 |
| 0,235 | 0,335 | 0,405 |
| 0,392 | 0,545 | 0,668 |
| 0,660 | 0,885 | 1,130 |
| 1,170 | 1,410 | 1,765 |
| 60+30 min. | 60+60 min. | 60+90 min. |
| 0,157 | 0,221 | 0,270 |
| 0,249 | 0,359 | 0,455 |
| 0,395 | 0,601 | 0,735 |
| 0,647 | 0,977 | 1,140 |
| 1,115 | 1,588 | 1,685 |

HOMOGEENISUUSTUTKIMUS/ABSORBANSSIARVOT

| | | | | | |
|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| 1.1 näyte | 0,363 | 2.1 näyte | 0,616 | 3.1 näyte | 2,840 |
| 1.2 näyte | 0,376 | 2.2 näyte | 0,468 | 3.2 näyte | 2,965 |
| 1.3 näyte | 0,628 | 2.3 näyte | 0,507 | 3.3 näyte | 2,778 |
| 1.4 näyte | 0,595 | 2.4 näyte | 0,411 | 3.4 näyte | 2,587 |
| 1.5 näyte | 0,880 | 2.5 näyte | 0,404 | 3.5 näyte | 2,680 |
| 1.6 näyte | 0,502 | 2.6 näyte | 0,220 | 3.6 näyte | 2,779 |
| 1.7 näyte | 0,870 | 2.7 näyte | 0,534 | 3.7 näyte | 2,743 |
| 1.8 näyte | 0,638 | 2.8 näyte | 0,601 | 3.8 näyte | 2,707 |

| | | | | | |
|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| 4.1 näyte | 1,116 | 5.1 näyte | 0,487 | 6.1 näyte | 0,126 |
| 4.2 näyte | 0,980 | 5.2 näyte | 0,438 | 6.2 näyte | 0,165 |
| 4.3 näyte | 1,124 | 5.3 näyte | 0,752 | 6.3 näyte | 0,164 |
| 4.4 näyte | 0,962 | 5.4 näyte | 0,372 | 6.4 näyte | 0,196 |
| 4.5 näyte | 0,847 | 5.5 näyte | 0,897 | 6.5 näyte | 0,217 |
| 4.6 näyte | 1,008 | 5.6 näyte | 0,504 | 6.6 näyte | 0,161 |
| 4.7 näyte | 0,849 | 5.7 näyte | 0,603 | 6.7 näyte | 0,193 |
| 4.8 näyte | 1,089 | 5.8 näyte | 0,487 | 6.8 näyte | 0,172 |

| | | | | |
|--------------------------|-------|--------------|------------------|--------------------|
| 7.1 supernatantti | 0,248 | | PITOISUUS | ABSORBANSSI |
| 7.2 supernatantti | 0,228 | std 1 | 7,8 | 0,168 |
| 7.3 supernatantti | 0,245 | std 2 | 15,6 | 0,273 |
| 7.4 supernatantti | 0,246 | std 3 | 31,3 | 0,422 |
| 7.5 supernatantti | 0,245 | std 4 | 62,5 | 0,821 |
| 7.6 supernatantti | 0,223 | | 125 | 1,510 |

TRENDIVIIVAT

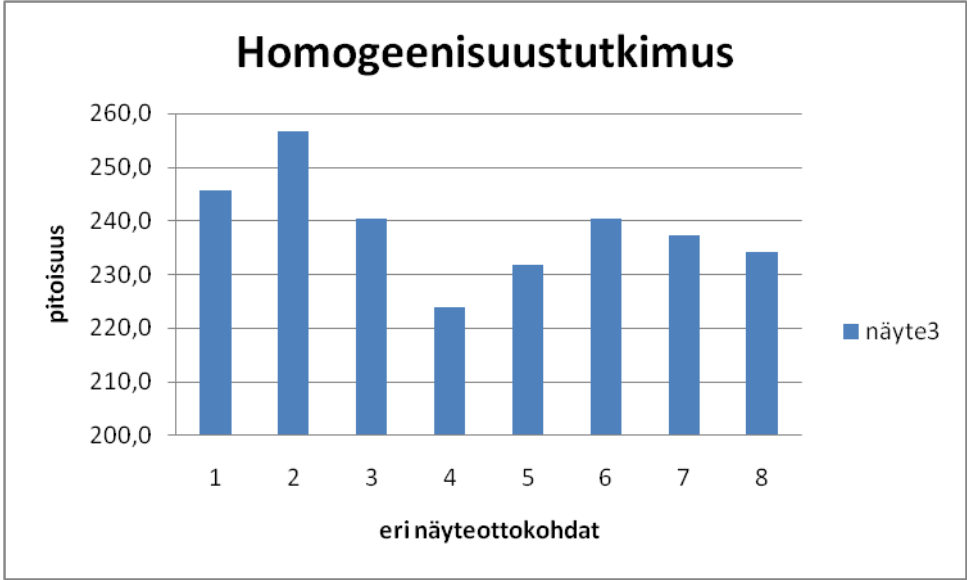
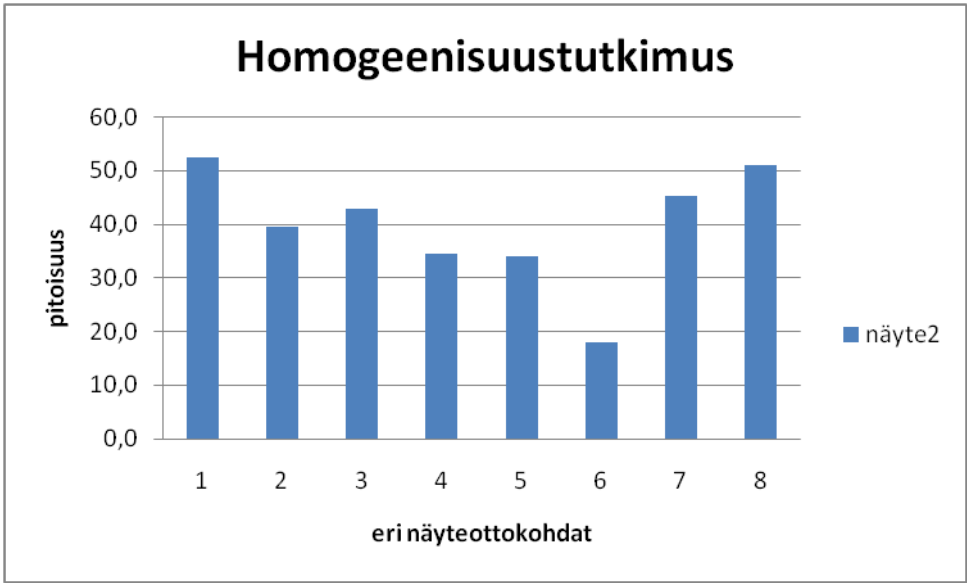
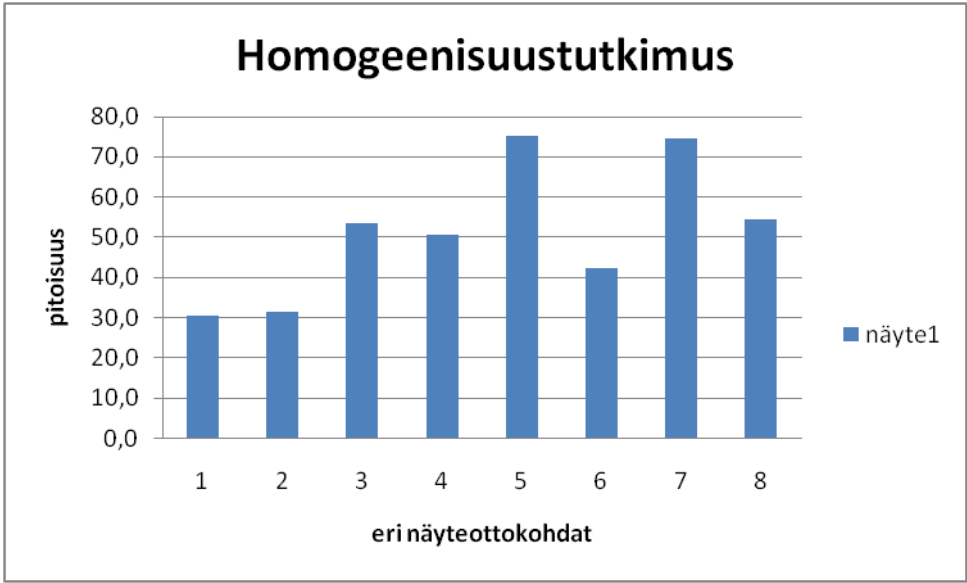
| |
|---|
| Homogeenisuustutkimuksen trendiviiva |
| $y=0,0115x+0,0135$ |

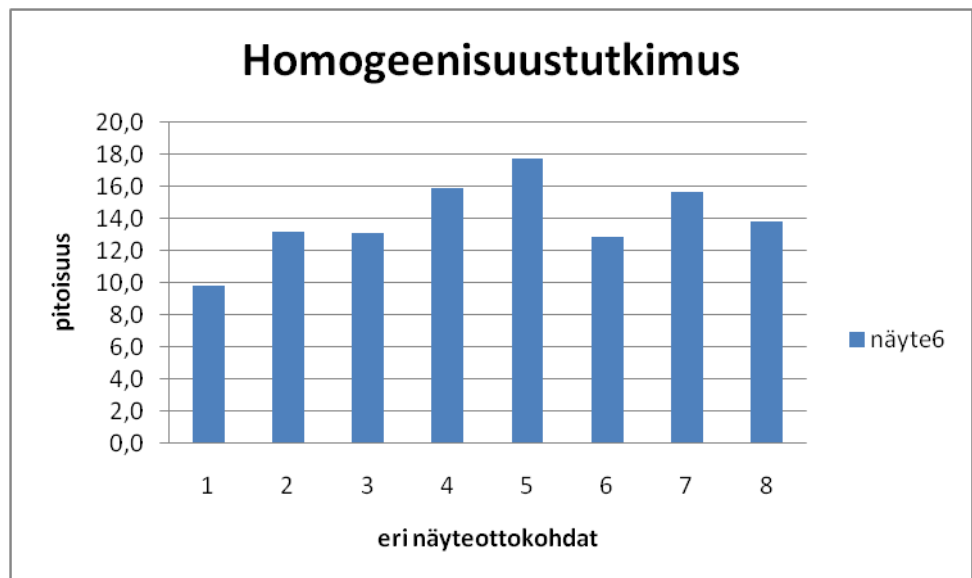
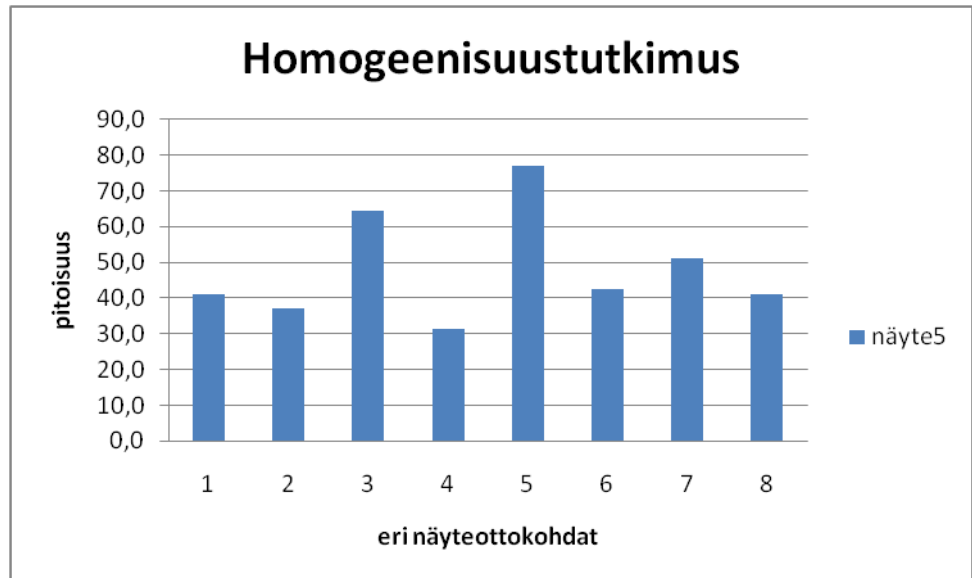
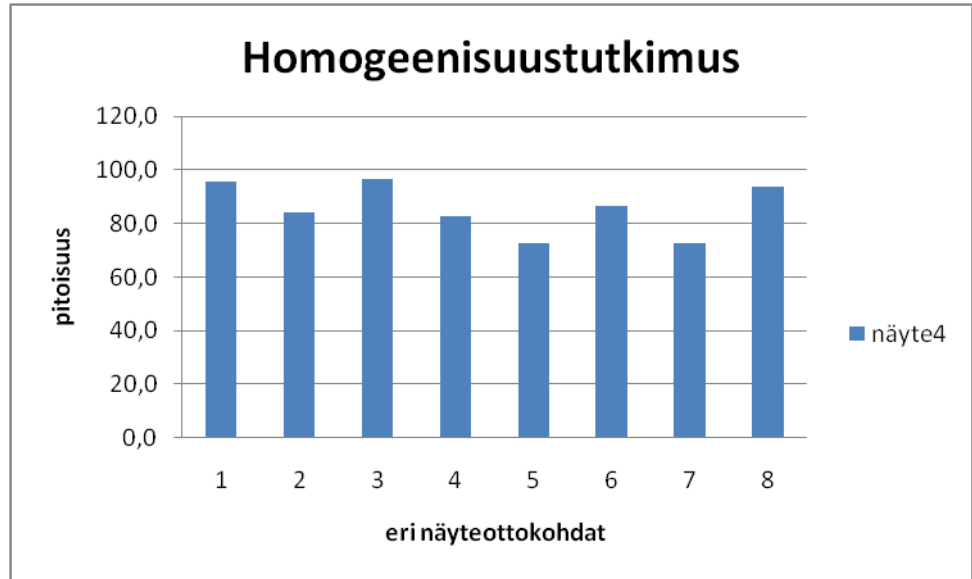
| | |
|--|--------------------|
| Säilyvyystutkimuksen trendiviivat | |
| 1. päivä | $y=0,0152x+0,049$ |
| 3. päivä | $y=0,0155x+0,1572$ |
| 7. päivä | $y=0,0099x+0,1059$ |

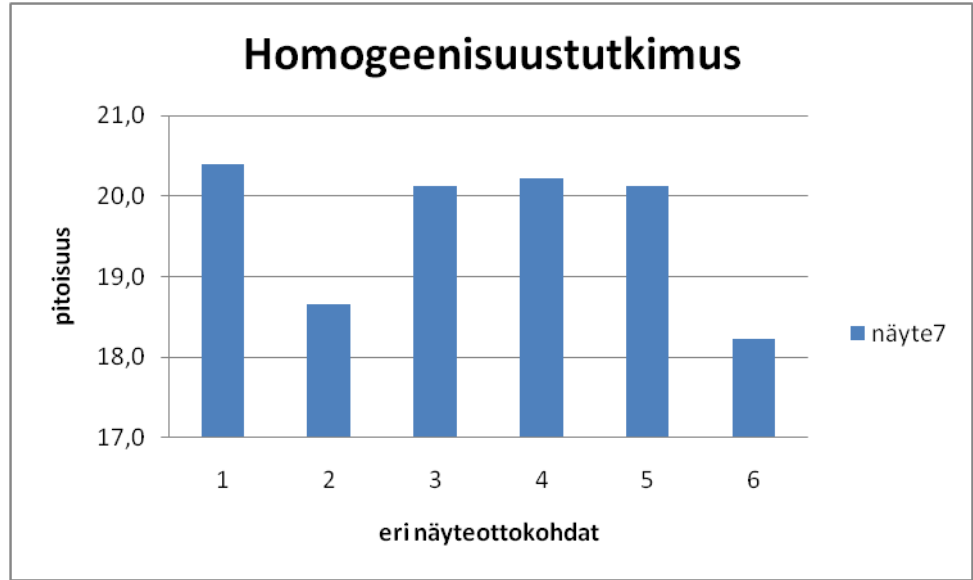
TARKKATESTI

| SÄILYVYYSTUTKIMUS -20 °C | 1vrk-3vrk | 1vrk-7vrk | 3vrk-7vrk |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 5 | 4 | 6 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 1 | 1 | 1 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 4 | 5 | 3 |
| Sig -luku | 0,496 | 0,426 | 0,633 |
| | | | |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS +4 °C | 1vrk-3vrk | 1vrk-7vrk | 3vrk-7vrk |
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 4 | 0 | 5 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 0 | 1 | 0 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 6 | 9 | 5 |
| Sig -luku | 0,922 | 0,004 | 0,232 |
| | | | |
| SÄILYVYYSTUTKIMUS +20 °C | 1vrk-3vrk | 1vrk-7vrk | 3vrk-7vrk |
| Kalprotektiinin pitoisuus kasvaa | 2 | 1 | 4 |
| Kalprotektiinin pitoisuus pysyy samana | 1 | 0 | 0 |
| Kalprotektiinin pitoisuus laskee | 7 | 9 | 6 |
| Sig -luku | 0,07 | 0,014 | 0,193 |

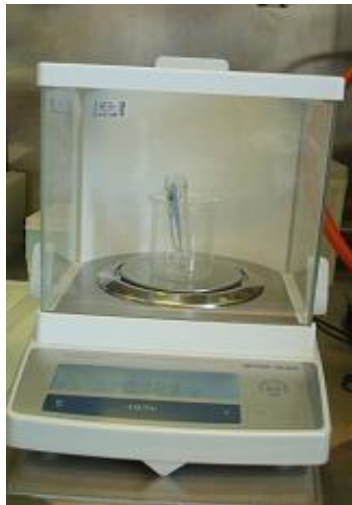
HOMOGEENISUUSTUTKIMUKSEN NÄYTTEIDEN PITOISUDET PYLVÄSDIAGRAMMEINA







TYÖVAIHEKUVAT



KUVIO 1: Näytevaaka ja näytteen punnitus, Mettler Toledo PB503-s/FACT ClassicPlus (Hakuli 2010).



KUVIO 2: Uuttoliuoksen lisäys näyteputkeen (Hakuli 2010).



KUVIO 3: Punnittu uloste ja uuttoliuos menossa homogenisoitaviksi (Hakuli 2010).



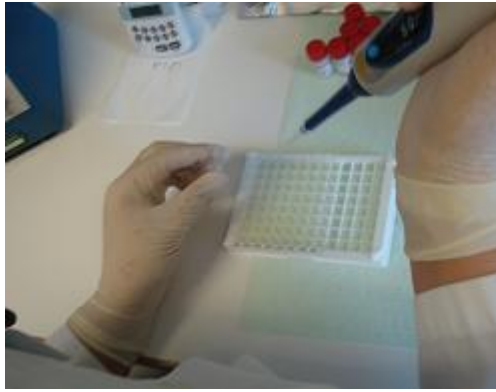
KUVIO 4: Homogenisointilaite Norlab STUART SCIENTIFIC, orbital shakerso1 (Hakuli 2010).



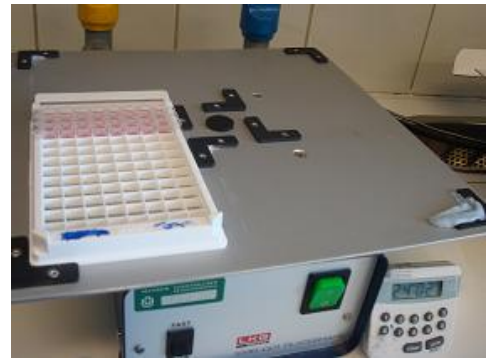
KUVIO 5 Homogenisoidut ulostenäytteet Eppendorff-putkissa menossa sentrifuugiin (Hakuli 2010).



KUVIO 6: Laimennosliuoksen lisäys annostelijapipetillä (Hakuli 2010).



KUVIO 7: Reagenssin pipetointi kuoppalevyllä (Hakuli 2010).



KUVIO 8: Kuoppalevy tasoravistelijassa inkuboitumassa. LKB WALLAC 1296-001 PLATE SHAKE (Hakuli 2010).



KUVIO 9: Kuoppalevypesuri toiminnassa. MultiWash III, TRICONTINENT (Hakuli 2010).



KUVIO 10: Viimeinen inkubaatio foliossa valolta suojattuna (Hakuli 2010).



KUVIO 11: Mittauslaite. Labsystems Multiskan® BICHROMATIC, ohjelma Multicalc (Hakuli 2010).

SÄILYVYYS-, INKUBAATIO- JA HOMOGEENISUUSTUTKIMUSTEN KUOPPALEVYSUUNNITELMAT

Inkubaatiotutkimus

Standardit ja nollanäytteet

| | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| A15+30 | A15+60 | A15+90 | A30+30 | A30+60 | A30+90 | A60+30 | A60+60 | A60+90 | kontrolli |
| B15 | B15 | B15 | B30 | B30 | B30 | B60 | B60 | B60 | |
| C15 | C15 | C15 | C30 | C30 | C30 | C60 | C60 | C60 | |
| D15 | D15 | D15 | D30 | D30 | D30 | D60 | D60 | D60 | |
| E15 | E15 | E15 | E30 | E30 | E30 | E60 | E60 | E60 | |
| F15 | F15 | F15 | F30 | F30 | F30 | F60 | F60 | F60 | |
| G15 | G15 | G15 | G30 | G30 | G30 | G60 | G60 | G60 | |
| H15+30 | H15+60 | H15+90 | H30+30 | H30+60 | H30+90 | H60+30 | H60+60 | H60+90 | |

Säilyvyystutkimus

Ensimmäinen vuorokusi

| | | | | | |
|--------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| stand1 | näyte1-20 | näyte9-20 | näyte5+4 | näyte1+20 | näyte9+20 |
| stand2 | näyte2-20 | näyte10-20 | näyte6+4 | näyte2+20 | näyte10+20 |
| stand3 | näyte3-20 | näyte11-20 | näyte7+4 | näyte3+20 | näyte11+20 |
| stand4 | näyte4-20 | näyte12-20 | näyte8+4 | näyte4+20 | näyte12+20 |
| stand5 | näyte5-20 | näyte1+4 | näyte9+4 | näyte5+20 | kontrolli |
| stand6 | näyte6-20 | näyte2+4 | näyte10+4 | näyte6+20 | |
| stand7 | näyte7-20 | näyte3+4 | näyte11+4 | näyte7+20 | |
| stand8 | näyte8-20 | näyte4+4 | näyte12+4 | näyte8+20 | |

Kolmas vuorokausi

| | | | | | |
|--------|-----------|------------|-----------|-----------|----------------------------|
| stand1 | näyte1-20 | näyte9-20 | näyte5+4 | näyte1+20 | näyte9+20 |
| stand2 | näyte2-20 | näyte10-20 | näyte6+4 | näyte2+20 | näyte10+20 |
| stand3 | näyte3-20 | näyte11-20 | näyte7+4 | näyte3+20 | näyte11+20 |
| stand4 | näyte4-20 | näyte12-20 | näyte8+4 | näyte4+20 | näyte12+20 |
| stand5 | näyte5-20 | näyte1+4 | näyte9+4 | näyte5+20 | nollakoe |
| stand6 | näyte6-20 | näyte2+4 | näyte10+4 | näyte6+20 | kontrolli |
| stand7 | näyte7-20 | näyte3+4 | näyte11+4 | näyte7+20 | näyte 2. -20 laim. 1:10 |
| stand8 | näyte8-20 | näyte4+4 | näyte12+4 | näyte8+20 | näyte 2. + 4 laim. 1:10 |

Seitsemäs vuorokausi

| | | | | | |
|--------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| stand1 | näyte1-20 | näyte9-20 | näyte5+4 | näyte1+20 | näyte9+20 |
| stand2 | näyte2-20 | näyte10-20 | näyte6+4 | näyte2+20 | näyte10+20 |
| stand3 | näyte3-20 | näyte11-20 | näyte7+4 | näyte3+20 | näyte11+20 |
| stand4 | näyte4-20 | näyte12-20 | näyte8+4 | näyte4+20 | näyte12+20 |
| stand5 | näyte5-20 | näyte1+4 | näyte9+4 | näyte5+20 | kontrolli |
| stand6 | näyte6-20 | näyte2+4 | näyte10+4 | näyte6+20 | |
| stand7 | näyte7-20 | näyte3+4 | näyte11+4 | näyte7+20 | |
| stand8 | näyte8-20 | näyte4+4 | näyte12+4 | näyte8+20 | |

Homogeenisuustutkimus

| | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
| stand1 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand2 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand3 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand4 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand5 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand6 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | näyte1supernatantti |
| stand7 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | kontrolli |
| stand8 | näyte1 | näyte2 | näyte3 | näyte4 | näyte5 | näyte6 | |