

Olga Elkina ja Elena Hyrri

Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen
lipokaliinin määrittäminen virtsasta
Abbott ARCHITECT -
ja Hitachi/Roche Modular -laitteilla.

Menetelmien vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

14.11.2013

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Olga Elkina, Elena Hyrri Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin määrittäminen virtsasta Abbott ARCHITECT - ja Hitachi/Roche Modular -laitteilla. Menetelmien vertailu. 41 sivua + 6 liitettä 14.11.2013
Tutkinto	Bioanalyttikko AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Irma Niittymäki, Metropolia Ammattikorkeakoulu Kemisti Aija Helin, HUSLAB
<p>Neutrofiilien gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini eli NGAL on yksi uusista spesifeistä merkkiaineista. Äkillisissä munuaisvaurioissa NGAL:n pitoisuus nousee sekä virtsassa että plasmassa jo kahden tunnin kuluessa. Sen määrittäminen on erittäin tärkeää sydänkirurgiassa, tehohoidossa tai varjoainetutkimuksen jälkeen.</p> <p>Vuodesta 2009 U-NGAL:n määrittäminen on käytössä Suomessa HUSLABin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa Abbott ARCHITECT i2000 SR -analysaattorilla, immunokemiluminometrisella menetelmällä. Vuonna 2013 NGAL:n tutkimukset on tarkoitus siirtää Meilahden sairaalan laboratorioon, koska munuais- ja elinsiirtopotilaiden hoito on keskitetty HYKS:n Kolmiosairaalaan.</p> <p>Tämä opinnäytetyö kuuluu HUSLABin Meilahden laboratorion NGAL:n tutkimuksiin ja on suoritettu henkilökunnan ohjauksessa. Tehtävämme oli selvittää, miten kahden eri mallia olevan laitteen ja eri menetelmän U-NGAL:n tulostasot vastaavat toisiaan.</p> <p>U-NGAL:n pitoisuudet kerätyistä ja pakastetuista potilasnäytteistä (n=59) oli mitattu rinnakkaisina Meilahden sairaalan laboratorion Hitachi/Roche Modular -laitteella immunoturbidimetristä menetelmää hyödyntäen. Lisäksi tutkimuksessa oli käytetty NGAL:n matala- ja korkeatasokontrollien ja poolinäytteen tietoja noin neljän kuukauden ajalta. Saaduista NGAL:n tuloksista tarkasteltiin sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistettavuutta. Mittausalueen lineaarisuus analysoitiin laimentamalla korkeapitoista potilasnäytettä. Hitachi/Roche Modular -analysaattorin NGAL:n tuloksia verrattiin aiemman Abbott ARCHITECT -laitteen tulostasoon. Virtsan NGAL:n tulokset käsiteltiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelman ja SPSS/PASW -ohjelmiston avulla. Niistä oli laskettu keskiarvot, keskihajonnat, variaatioprosentit, kontrollien bias -arvot ja korrelaatiokerroimet. Lisäksi saadut tulokset esitettiin graafisesti.</p> <p>Modularin immunoturbidometrisen menetelmän validoinnissa havaittiin, että NGAL:n sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus olivat HUSLABissa hyväksyttävissä rajoissa. Saaduissa Abbott ARCHITECT - ja Hitachi/Roche Modular -analysaattoreilla virtsan NGAL:n tuloksissa ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Validoinnissa menetelmä on lineaarinen laitevalmistajan ilmoittamalla kalibrointialueella ja sen voi hyväksyä käyttöön.</p>	
Avainsanat	NGAL virtsasta, Abbott ARCHITECT, Modular, lipokalin-2.

Authors Title Number of Pages Date	Olga Elkina, Elena Hyrri The determination of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with Abbott ARCHITECT and Hitachi/Roche Modular: a comparison of the diagnostic devices. 41 pages + 6 appendices 14 November 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Senior Lecturer Irma Niittymäki, Metropolia University of Applied Sciences Chemist Aija Helin, HUSLAB
<p>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is one of the new biomarkers of acute kidney injury. In acute renal failure, the NGAL concentration of urine and plasma increases within two hours. Hence its determination is of great importance to cardiac surgery, intensive care or contrast medium examination.</p> <p>Urinary NGAL determination was practiced only at the HUSLAB Surgical Hospital Laboratory, Finland. It was determined 2009-2013 by the Abbott ARCHITECT i2000 SR -analyzer with the chemiluminescent immunoassay method. In 2013, the NGAL researches in Finland were relocated to the Helsinki University Central Hospital Laboratory equipped with the Hitachi/Roche Modular -device based on the immunoturbidimetric method.</p> <p>Our study was part of the NGAL tests carried out at the HUSLAB Meilahti Hospital laboratory. Our objective was to evaluate samples on the Hitachi/Roche Modular -device and compare the results with the old method.</p> <p>The urine NGAL samples of our study were collected, processed in the HUSLAB Surgical Hospital Laboratory, and finally frozen for future use. The urine samples (n = 59) were measured twice on the Hitachi/Roche Modular -device. In addition we used NGAL low- and high-level controls and the pool tests information over a four-month period. The NGAL patient and control sample results were used to determine the within-run and between-runs repeatability. The range measurement linearity was analyzed by diluting high-containing patient samples. The NGAL results of the Hitachi/Roche Modular -device were compared with the previous Abbott ARCHITECT for the level of results. The urine NGAL results were analyzed with the Microsoft Excel program, and the SPSS/PASW software. Among others we calculated averages, standard deviations, percentages of variation, bias values of controls and correlation coefficients. In addition, the results were presented graphically in our study report.</p> <p>The Modular immunoturbidimetric method validation has not revealed any significant variation within the series and between the series. Our comparison has shown, that results provided by Abbott ARCHITECT method and that of obtained on Hitachi/Roche Modular -device are not significantly different from each other. The validation method is linear with the manufacturer's the declared range of the level and instructions, and thus may be acceptable for practice.</p>	
Keywords	NGAL urine, Abbott ARCHITECT, Modular, lipocalin-2.

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	2
3	Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin laboratoriodiagnostiikka	2
3.1	FINNAKI – tutkimus Suomessa.	4
3.2	Neutrofiilien gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini	5
3.3	Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin määrittäminen laboratoriodiagnostiikassa	6
4	Laatu kliinisessä laboratoriossa ja menetelmien vertailu	10
5	Analysaattorit ja määrittämenetelmät	12
5.1	Abbott ARCHITECT	13
5.2	Hitachi/Roche Modular	15
6	Työn suorittaminen	16
6.1	Näytteet	16
6.2	Työryhmä, ohjaus ja tiedonhakujen kuvaus	17
6.3	Menetelmän vakiointi ja kontrollit	17
7	Tulokset	20
7.1	Tilastolliset käsitteet	20
7.2	Tulosten käsittely	22
7.3	Sarjan sisäinen toistuvuus	22
7.4	Sarjojen välinen toistuvuus	24
7.5	Lineaarisuus	26
7.6	Menetelmien yhtenevyyden vertailu	28
7.7	Tilastolliset testaukset	32
8	Luotettavuuden arviointi	34
9	Pohdinta	36
	Lähteet	38
	Liitteet	1-6

1 Johdanto

Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliini (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) eli NGAL on yksi uusista munuaistubulusvaurion merkkiaineista ja ollut jo vuodesta 2009 kliinisessä käytössä HUSLABin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa (HUSLAB 2009. Tutkimustiedote. U-NGAL). Tällä hetkillä P-NGAL:n ja U-NGAL:n määrittymenetelmät ovat olleet rutiinikäytössä HYKS:ssä (HUSLAB 2013. Tutkimusohjekirja).

NGAL:n määrittäminen virtsasta on käytössä Suomessa HUSLABin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa Abbott ARCHITECT i2000SR -analysointilaitteella, joka perustuu immunokemiluminometriaan. Plasman NGAL tutkitaan Meilahden laboratoriossa kaupallisella Triage-vieritestilaitteilla, jonka menetelmä perustuu immunofluorisenssiin.

NGAL-proteiini on herkkä ja spesifinen merkkiaine, jonka pitoisuus veressä ja virtsassa on osoitettu suurenevan munuaisvaurion synnyttyä (Haapio – Lassus 2010: 2586). NGAL määritetään potilailta esimerkiksi erotusdiagnostisena tutkimuksena, potentiaalisesti munuaistoksisen lääkityksen aloituksessa ja varhaisen akuutin munuaisvaurion huomauttamiseksi (Haapio 2012).

Helsingin sairaalahoitopiirissä on tapahtunut muutoksia. Munuais- ja elinsiirtopotilaat on keskitetty HYKSin Kolmiosairaalaan. NGAL-pitoisuus on varhainen ja nopea merkkiaine ja sen mittauksen on oltava lähempänä hoitopaikkoja varhaisen diagnosoinnin ja hoidon mahdollistamiseksi.

Meilahden sairaalan laboratorion tutkimusvalikoima laajentuu U-NGAL -määrittämisellä Hitachi/Roche Modular -laitetta käyttäen. Ennen uuden määrittämismenetelmän käyttöönottoa halutaan testata määrittämismenetelmän luotettavuus vertaamalla Meilahden sairaalan laboratoriossa saatuja tuloksia Kirurgisen sairaalan laboratoriossa oleviin U-NGAL -tuloksiin. Tässä opinnäytetyössä suoritamme NGAL-tulostasovertilu kahden laitteen välillä.

2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Työmme tarkoituksena on selvittää: miten kahta eri menetelmää käytävillä laitteilla virtsan NGAL:n tulostasot vastaavat toisiaan ja tehtävänä on testata NGAL-proteiinien pitoisuuksia potilaiden virtsasta Meilahden sairaalan laboratorion Hitachi/Roche Modular -laitteella immunoturbidimetrisellä menetelmällä.

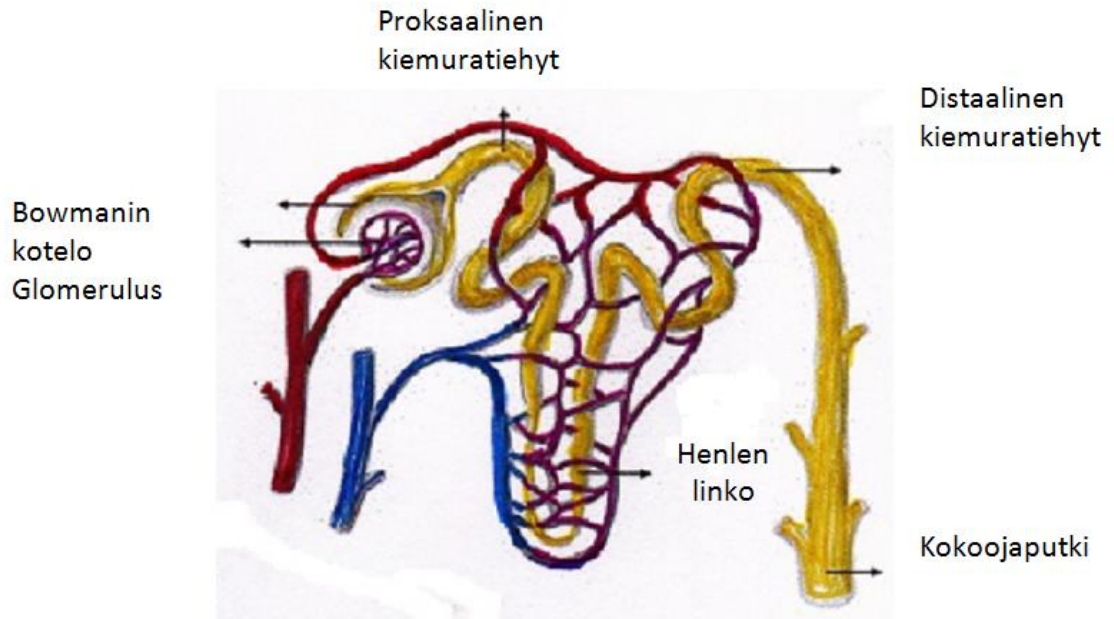
Tavoitteena on:

1. verrata Hitachi/Roche Modularilla saatuja tuloksia Kirurgisen sairaalan laboratorion U-NGAL:n tuloksiin. Siellä on käytössä Abbott ARCHITECT i2000SR -analysointilaitteisto, kemiluminesenssimikropartikkeli-immunomääritys, CMIA (HUS-LAB, Tutkimustiedote 2009)
2. tutkia sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistuvuutta sekä lineaarisuutta
3. testaustulosten perusteella arvioida määritysten yhtenevyyttä.

3 Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin laboratoriodiagnostiikka

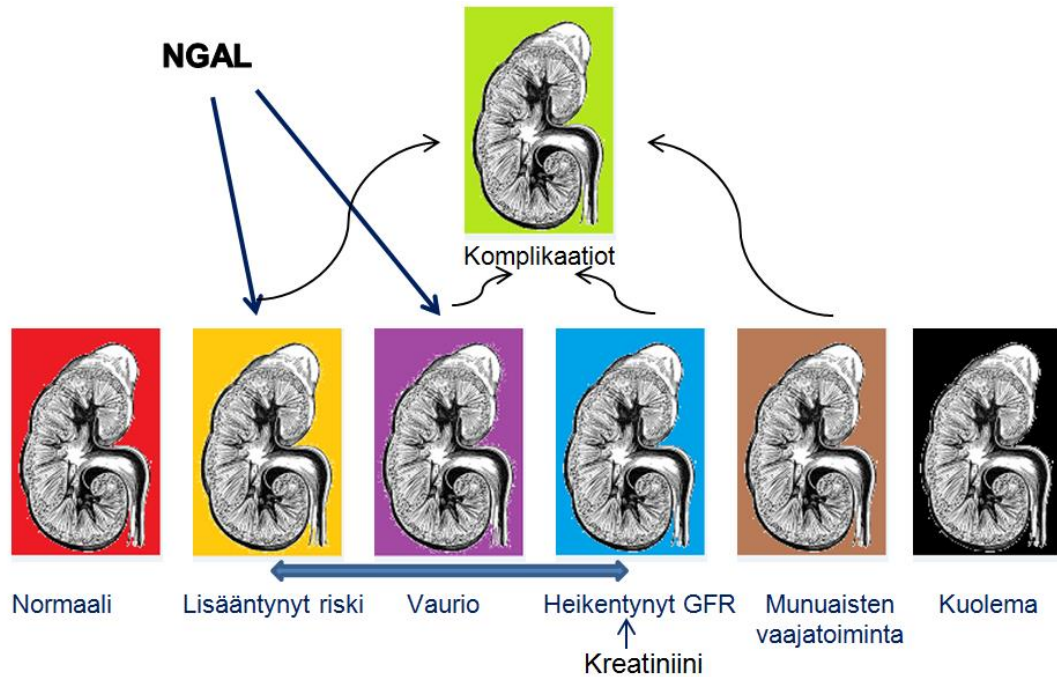
Väestön ikääntyminen, aikuistyyppin diabeteksen ja valtimonkovettumistaudin lisääntyminen sekä kasvava määrä varjoainetutkimuksia on aiheuttanut munuaisten akuutin vajaatoiminnan tilastojen kasvua. Se on lisännyt myös kuolleisuutta. Parannuksia saatiin ottamalla käyttöön termi akuutti munuaisvaurio (AKI) ja luokittelemalla sen vaikeusasteen mukaan. (Haapio – Lassus 2010: 2581.)

Munuaisnefronin rakenteen perustella (ks. kuvio 1) glomeruluksen verenkierto tapahtuu tuojasuonta pitkin ja lähtee pientä valtimoa viejäsuaonta pitkin, joka muuttuu hiusuoneksi ja ympäröi munuaistubulusta (Vierimaa – Laurila 2010: 170).



Kuvio 1. Nefronin rakenne (Vierimaa 2010 mukaan).

Yhtenäisiä kriteerejä AKI:n diagnosoinnissa on glomerulusfiltraation heikentyminen ja sen seurauksena kreatiniinipitoisuuden kasvu ja / tai virtsamäärän vähentyminen. Munuaisvaurion varhaisessa diagnosoinnissa voisi auttaa munuaisten tubulusvaurion selvittäminen, koska se tapahtuu aiemmin kun glomerulusfiltraation heikentyminen. Sen takia uusia, herkempiä ja spesifimpiä merkkiaineita tutkitaan ja otetaan kliiniseen käyttöön. NGAL on yksi tubulusvaurion merkkiaineista, jota käytetään kliinisesti. Tarkoituksena on huomata vauriota mahdollisimman aikaisin, jotta se ei ehdi vaurioitumaan toiminnallisia funktioita eli heikentää glomerulusfiltraatiota (GFR). Tutkimustyöt tällä alueella ovat aktiivisesti menossa. Uusia merkkiaineita verrataan kreatiniiniin, ottamalla huomioon sen puutteet AKI:n merkkiaineena (kuvio 2). Varhainen AKI:n diagnosointi antaa mahdollisuuden pysäyttää tai jopa parantaa vaurioita, sellaisia kuten hemodynaamiikka, nestetasapainon optimoiminen ja nefrotoksisten lääkkeiden välttäminen. (Haapio – Lassus 2010: 2582.)



Kuvio 2. Virtsan NGAL (Abbottin mukaan).

NGAL:n kannattaa määrittää riskipotilaille, diabeetikoille ja kroonisen munuaisten vajaatoiminta potilaille sekä sydänleikkauksen ja varjoainetutkimusten jälkeen. Lähitulevaisuudessa odotetaan erilaisten testimenetelmien lisääntyvän. Se antaa diagnosoinnille lisää apua ja parempaa hoitoa potilaille. (Haapio – Lassus 2010: 2583.)

3.1 FINNAKI – tutkimus Suomessa.

Kansanvälisten lääkäreiden ja asiantuntijayhteisö on asentanut AKI:n epidemiologiselle tutkimukselle yhden keskeisen tavoitteen: parantaa taudin ennustetta. Syyskuussa vuonna 2012 Suomessa on aloitettu FINNAKI-tutkimus, jonka tehtävänä on selvittää taudin esiintyvyyttä ja hoitoa Suomessa. Aikaisemmin AKI:n diagnostiikassa oli käytetty kreatiniinin pitoisuutta plasmassa. Mutta merkkiaineena se on huono ja vaihtelee sukupuolen, rodun, iän ja lihasmassan mukaan. Kreatiniinin pitoisuus kasvaa vasta 24–48 tunnin kuluttua munuaisvauriosta. Sen avulla ei pystytä erottamaan kuivumista munuaisvaurioista. AKI:n riskitekijöitä, jotka on tunnettu, ovat verenpainetauti, diabetes, munuaisten krooninen vajaatoiminta ja maksasairaus. Akuutissa tilanteessa AKI:n riski huomattavasti suurenee. Se tapahtuu seuraavissa tilanteissa kuten sepsiksissä, hypotensiassa, infektiossa, kirurgisissa toimenpiteissä ja suonensisäisten varjoaineiden käytön jälkeen. Munuaispotilaan hoidossa on tärkeää myös ehkäistä niiden lääkkeiden käyttöä, jotka voivat aiheuttaa munuaisvauriota. On huomattu, että tehohoidossa tär-

kein riskintekijä on sepsis. Sen osuus on melkein 50 % AKI:ssa. FINNAKI-tutkimuksessa selvitetään:

- esiintyvyys Suomessa keinomunuaishoitoa vaativa AKI:a
- eriateisen AKI:n esiintyvyyttä
- kehittyvää AKI:a tehohoitopotilailla sekä sepsiksen, hemodynaamisen tilan ja nestehoidon osuutta
- munuaisvaurion uusien merkkiaineiden käyttöä ja niiden ennustuskykyä
- AKI:n patofysiologisia mekanismeja ja tutkitaan geeniperimän vaikutusta potilaiden joukoissa
- potilaiden viiden vuoden ajan munuaiskorvaus hoidon tarvetta, heidän elämänlaatua sekä seurataan eloonjäämistä
- AKI:n varhaista tunnistamista ja hoidon kehitystä.
(Kaukonen – Korhonen – Haapio – Haapio 2012: 121.)

3.2 Neutrofiilien gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini

Neutrofiilien gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini on tunnettu samalla lailla kuten human neutrophil lipocalin (HNL), lipokaliini-2, siderokaliini, onkogeeni-proteiini 24p33 ja hiiren uterokaliini (Goetz ym. 2002: 1033). NGAL kuuluu suureen lipokaliinien perheeseen. Lipokaliineilla on tertiäärirakenne, jossa keskellä on hydrofobinen ydin. Niiden päätehtävä elimistössä kuljettaa pieniä lipofiilisiä molekyylejä. (Pervaiz – Brew 1987: 209, 212; Kjeldsen – Bainton – Sengelov – Borregaard 1994: 799.) Lipokaliiniproteiinit koostuvat kahdeksasta β -säikeistä, jotka muodostavat β -tynnyriä. Se sulkee sisäänsä verhiössä, sitoo ja kuljettaa pienipainoisia molekyylejä. (Mori ym. 2005: 610; Flower – North – Sansom 2000:10.) Lipokaliinit ovat pieniä erittyviä proteiineja, jotka kykenevät sitomaan hydrofobisia molekyylejä, erityisesti sideroforit. Sideroforit (kr. sideros — rauta ja phoros — kantaa) ovat pienimolekyyli-painoisia aineita, jotka sitovat tehokkaasti rautaa muodostaen rautakelaattia. NGAL:n bakteriostaattinen teho johtuu siitä, että se pystyy sitomaan siderofori-raudan. (Goetz ym. 2002: 1036; Neilands 1995: 26723.) On todettu, että raudan kuljetus on olennaisen tärkeää solujen kasvua ja kehitystä varten. Rauta on tarpeellinen munuaisten suojaamisessa. (Himmelfarb 2007: 379.)

Ihmisen NGAL on pieni 25 kDa proteiinimolekyyli, jonka primaarinen polypeptidiketju koostuu 178 proteiinien jäämistä. Sen 25 kDa-proteiini oli eristetty monomeeri- ja dimeerimuodoissa humaanin neutrofiilien supernatantista. (Kjeldsen – Johnsen – Sengelov – Borregaard 1993: 10425; Kjeldsen ym. 2000: 272.) NGAL syntesoidaan granulocyte kypsymisen yhteydessä luuytimessä ja kuljetetaan plasmaan aktivoineista neutrofiileista (McPherson – Pincus 2011: 179). Tarkemmat tutkimukset ovat osoitta-

neet, että NGAL:n pieniä määriä syntesoituu myös elimien epiteelisolukoissa (aivot, keuhkot, suolisto ja munuaiset), solujen stressitilanteissa kuten tulehdus, iskemia. Immuunijärjestelmän solut, hepatosyytit ja adiposyytit sekä munuaisten tubulussolut ovat sellaisia NGAL:n aktiivisia tuottajia. NGAL:n fysiologiset tehtävät liittyvät nefronien rakentamiseen, raudan aineenvaihduntaan ja bakteriinfektioiden torjumiseen. (Schmidt-Ott ym. 2007: 409–410; Haapio – Lassus 2010: 2585.) Terveillä ihmisillä sitä ei löydy, mutta akuutissa munuaisvauriossa NGAL:n pituisuudet lisääntyvät hyvin nopeasti sekä virtsassa että veressä, jopa satakertaisesti. NGAL on spesifinen merkkiaine munuaisten tubulusvaurioille. (Haapio – Lassus 2010: 2585.)

NGAL on yksi varhaisimmista ja aktiivisesti muodostavista proteiineista munuaisten iskeemian jälkeen. Tutkimuksissa päästään selville munuaisten geeneistä, jotka aktivoituvat heti munuaistiehyiden solujen vauriossa. NGAL- proteiinia ilmestyy virtsaan jopa pienissä munuaisvaurioissa ja sitä on helppo havaita. (Mishra ym. 2003: 2534.)

3.3 Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin määrittäminen laboratoriodiagnostiikassa

NGAL:a määritetään potilailta varhaisen akuutin munuaisvaurion diagnostiikassa, erotusdiagnostisena nefrologiatutkimuksena sekä terapeuttisiin tarkoituksiin sydänleikkauksen jälkeen, non-invasiivisessa seurannassa munuaisten transplantaation jälkeen ja potentiaalisesti munuaistoksisen lääkityksen aloituksessa. NGAL:n avulla voidaan ennustaa kliinisiä tuloksia: munuaissiirto, viivästynyt siirännäisen toiminta ja kuolleisuus. (Haapio 2012.)

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että potilailla akuutissa munuaisvauriossa NGAL-proteiini esiintyy seerumissa 24–48 h ennen kuin havaitaan kreatiniinin nousua (Cullen – Murray – Fitzgibbon 2012: 190; Mishra ym 2005: 1233). Nykyään tiedetään, että pasman kreatiniinipitoisuus on huono merkki akuuttista munuaisten vauriosta, mutta sitä on hyvä käyttää luovuttajan munuaisten laatutestissä, jolla voidaan osoittaa sen kelpoisuus (Hollmen ym. 2011:5).

Oli huomattu, että NGAL laajensi luovuttajan statuksen kriteereitä. Luovuttajan seerumin ja virtsan arvotasojen välillä suoritettiin analyysit, mitkä todistivat, että U-NGAL:n tason seuranta antoi lisää informaatiota ja mahdollisuuden selvittää potentiaalisen siir-

toelimen sopivuus. Samaa lisäinformaatiota ei saatu S-NGAL:n tasojen seurannalla. (Hollmen ym. 2011: 95, (2)).

NGAL:n tasot ovat diagnostisia ja ennustavia akuutti munuaisten vajaatoiminnassa. NGAL:n erittyminen virtsaan tapahtuu vain silloin, kun se liittyy vaurioon proksimaalissa munuaistiehyissä, mikä estää NGAL:n takaisin imeytymistä ja / tai lisää NGAL synteesin munuaisissa. Virtsan NGAL:n määrittämistä voidaan käyttää biomerkkiaineena vastasyntyneillä ilman sitä, että otetaan verinäyte. Suurin raja NGAL virtsassa lapsille on 100–135 ng / ml. Vastasyntyneillä kriittisissä tiloissa voidaan suositella käytettävän NGAL:n määrittämistä virtsasta kun halutaan diagnosoida ja ennustaa akuuttia munuaisvauriota. (Safina – Daminova 2012: 44.)

NGAL:n tason tarkkailua käytetään aikaisen munuaisvaurioiden indikaattorina sydänkirurgiassa. Kirjallisuudessa on kuvattu tutkimus, johon osallistui 71 lasta sydämen kirurgisten korjausten jälkeen. Seerumi- ja virtsanäytteitä oli analysoitu western blot ja ELISA -menetelmiä käyttäen. Oli osoitettu, että NGAL:n pitoisuus virtsassa ja seerumissa kaksi tuntia leikkauksen jälkeen, sydän-keuhko-konetta apuna käyttäen, voidaan pitää varhaisena ja riippumattomana indikaattorina munuaisten kudosisvaurioissa. Testillä oli 100 %:n herkkyys ja 98 %:n spesifisyys akuutin munuaisvaurion kehittämisen ennustettaessa. (Mishra ym. 2005: 1231.)

Munuaissiirrossa NGAL:n pitoisuuden perusteella voidaan ennustaa munuaissiirteiden toimintaa ja eloonjäämisen todennäköisyyttä siirron jälkeen. NGAL:n tason lisääntyminen ensimmäisenä päivänä on potilaan viivästyneen siirrännäisen toiminnan merkki. Luovuttajan korkeat virtsan NGAL arvot osoittavat munuaisvaurion spesifisemmin kuin seerumin NGAL arvot, jotka voivat olla peräisin muista elimistä, kuten keuhkoista, luuytimestä tai maha-suolakanavasta. U-NGAL voisi olla parempi ja konkreettisempi AKI markkerina kuin S-NGAL. (Hollmen ym. 2011: 6, (1).)

Kliinisesti NGAL:a määritetään sekä plasma- (seerumi), että virtsanäytteistä. Tutkimuksesta tuli ilmi, että eri mittausmenetelmillä suoritettujen mittauksien U-NGAL ja S-NGAL eivät ole suoraan vertailukelpoisia. (Hollmen ym. 2011: 6, (1).)

Seeruminäytteet ovat helposti saatavilla ja seerumin biomarkkerit ovat vakaampia, mutta seerumin biomarkkerit voivat heijastaa vain systeemisen sairauden prosessia eikä tietyn elimen reaktiota (McPherson – Pincus 2011: 179).

Vuonna 2009 Kirurgisen sairaalan laboratoriossa tehtiin alustava validointi U-NGAL -määrityksestä elinsiirtopotilaiden tutkimusnäytteistä Abbott ARCHITECT -laitteen immunokemiluminometrisella menetelmällä. Nämä näytteet oli aikaisemmin tutkittu Suomen Punaisen Ristin laboratoriossa tutkimuskäyttöön tarkoitetulla Elisa-menetelmällä. Tutkimusnäytteet oli säilytetty $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa Kirurgisen sairaalan laboratoriossa. Niistä valittiin 21 eritasoista näytettä ja ne ajettiin parinäytteinä. Laskettu Abbott ARCHITECT -laitteen sarjan sisäinen toistuvuus oli 6,9 %. Validoinnin ja valmistajan sarjojen väliset prosentit (CV alle 6 %) olivat yhtenevät. Kolmesta eritasoista tutkimusnäytteestä oli mitattu lineaarinen alue, joka oli 1500 ng/ml. Lineaarisuusyhtälö ja korrelaatiokerroin ($r=1$) olivat hyvät ja osoittivat menetelmän olevan lineaarinen koko mittausalueella. Myös näytemateriaalista ($n=686$) oli valittu 13 näytettä ja ne tutkittiin ARCHITECT-menetelmällä ja verrattiin tuloksia ELISA-menetelmään. Tasovertailussa menetelmien väliset korrelaatiot ($r=0,76$ ja Spearman $r=0,93$) eivät olleet hyviä. Oli huomiotu, että validoinnissa näytteet olivat pari kolme vuotta vanhoja ja niiden sulatuskerroista ei ollut tietoa. Yllämainituista näytteistä oli valittu 20 eritasoista näytettä pilottitutkimuksiin Abbott ARCHITECT -analyysaattorilla. Validoinnissa saadut tulokset oli hyväksytty ja U-NGAL-menetelmä Abbott ARCHITECT -laitteella oli otettu käyttötarkoitukseen (laite kuviossa 3). (HUSLAB 2010. Validointiraportti U-NGAL, Abbott ARCHITECT i2000SR.)



Kuvio 3. Abbott ARCHITECT i2000SR -analyysaattori.

Vastaavassa tutkimuksessa oli tehty NGAL-määritystä Becman Coulter AU-laitteella immunoturbidimetrisellä menetelmällä. Analyttinen arviointi osoittaa, että NGAL-testissä oli useita teknisiä ja analyttisiä etuja, kuten ei manuaalista esikäsittelyä, vähäinen

määrä näytettä (3µl), nopea laimennosaika (10 min) ja optimaalinen lineaarisuus. Vertailussa Abbott ARCHITECT -laitteen NGAL:n mittauksiin virtsasta saatiin tuloksena korrelaatiokerroin $r=0,925$. (Lippi – Aloe – Storelli – Cervellini – Trenti 2012: 1581.)

Huhtikuussa vuonna 2012 Meilahden sairaalan automaatiolaboratoriossa oli suoritettu Hitachi/Roche Modular cU -laitteen menetelmävalidointi plasmanäytteille. Sen tarkoituksena oli uuden menetelmän testaus mahdollista myöhempää käyttöönottoa varten. Menetelmä oli ohjelmoitu Modular cU -analysaattorin vapaalle kanavalle ja testaamalla etsittiin mahdollisimman optimaaliset reaktio-olosuhteet. Tulostason vertailu oli tehty 31 potilasnäytteellä Triage P-NGAL-tuloksiin. Validoinnissa oli testattu menetelmän toistettavuus, tulostason vertailtavuus rutiinikäytössä olevan menetelmän kanssa sekä menetelmän lineaarisuus laimennussarjalla. Triage-vieritestianalysaattorin mittaamat tulokset, jotka olivat pienemmät kuin 60 µg/l, antoivat näyttöön vastauksen < 60. Uudella menetelmällä pystyy mittaamaan pitoisuudet, jotka ovat noin 10 µg/l, joten se on herkempi ja kätevämpi. Menetelmän validointitulokset olivat hyvät ja sillä on todettu, että NGAL:n analysointi plasmasta on mahdollista. (HUSLAB 2012.)

On ajankohtaista suorittaa validointitutkimuksena ARCHITECT - ja Modular -laitteiden vertailua NGAL:n virtsanäytteistä. Osallistuimme opinnäytetyöllämme uuteen tutkimukseen. Tulevaisuudessa NGAL virtsassa ja plasmassa on suunniteltu analysoimaan Modular -analysaattorilla samalla immunoturbidometrisellä menetelmällä (kuviossa 4). Tämä laite oli jo aikaisemminkin automaatiolaboratoriossa käytössä ja nykyisen tutkimustyön tarkoituksena on laitteen mahdollisuuksien ja analyysivalikoiman laajentaminen.



Kuvio 4. Hitachi/Roche Modular cU -analysaattori.

4 Laatu kliinisessä laboratoriossa ja menetelmien vertailu

Laadunvarmistus kuuluu keskeisimpänä tavoitteena hyvään kliiniseen laboratoriokäytäntöön. Analyyttisen laadunvarmistuksen tärkeimmät alueet ovat sisäinen laadunohjaus ja ulkoinen laadunarviointi. Laboratorion sisäisen ohjauksen tavoitteena on potilastulosten oikeellisuuden varmentaminen ja niiden hyväksyminen hoidon käyttöön. (Linko 2004: 60.)

Sisäinen laadunohjaus tapahtuu laboratoriossa jatkuvasti suorittamalla toimenpiteitä, jotka varmistavat tutkimustulosten luotettavuutta (Linko 2004: 60).

Ulkoisella laadunarvioinnilla tarkoitetaan laboratorion ulkopuoliselta, riippumattomalta taholta hankittava testien analyttisen laadun arviointia sekä vertailua määrävälein muihin laboratorioihin tulosten totuudellisuuden osoittamiseksi. Ennen laboratoriotutkimusten määritysmenetelmän käyttöönottoa sille asetetaan analyttiset laatutavoitteet, jotta tarkoitusmukainen taso saavutetaan. Validointi ja sisäinen laadunohjaus tukee käytännössä tätä asiaa. (Linko 2004: 60–62.)

Sisäisen laadunohjauksen menettelytapoihin kuuluvat **kontrollit**, niiden hyväksymis- ja hylkäämisrajat. Päivittäiskontrolleilla seurataan analyysimenetelmän jatkuvaa suorituskykyä. Niiden avulla havaitaan menetelmän toistuvuudessa ja tulostasossa mahdollisesti sattuvat muutokset. Hyvä kontrollinäyte on tarkoitukseensa soveltuva, stabiili ja ominaisuuksiltaan mahdollisimman lähellä potilasnäytteitä. Käyttöönottoon valittavien kontrollien tasot ja määrä riippuu määritysmenetelmän käyttötarkoituksesta. Se määräytyy tutkimuksen pitoisuusalueesta, viitevälistä ja menetelmälle sovitetuista kontrolliarvon välistä. (Linko 2004: 60–61.) Kontrollin virherajat pohjautuvat analyysin mittausarjojen sisäisen ja sarjojen välisen kokonaishajontaan. Sääntöjen mukaan kontrollinäytteelle on asetettu $\bar{x} \pm 2s$ rajoja, jossa \bar{x} on laboratorion tulosten keskiarvo ja s on laskettu keskihajonta. (Sorto – Törmä – Kaihola 1996: 12–13.)

Validoinnilla tarkoitetaan testausta, jolla todetaan, että testi toimii aiottua tarkoitusta varten riittävän luotettavasti (Termien määritelmät 2009: 319). Laboratorion pätevyyden toteamiselle on yhtenä edellytyksenä, että laboratorio on arvioinut pätevyysalueeseen kuuluvien menetelmien mittausepävarmuuden (Sorto ym. 1996: 3).

Menetelmä- ja laitevertailu kuuluu validointiprosessiin. Validointi on tarpeen esimerkiksi uuden ja standardimenetelmän välisessä vertailussa tai kahden eri mittausmenetelmän tulosten samanmukaisuuden tutkinnassa. (Ehder 2005: 26.)

Uusien menetelmien ja laitteiden käyttöönottoa varten validointi toteutetaan riittävässä laajuudessa. Sen avulla pystytään varmistumaan tulosten toistettavuudesta ja virheettömyydestä. Yleispätevää määritelmää validoinnin laajuudesta ei ole ja se riippuu uuden menetelmän/laitteen käyttötarkoituksesta, asetetuista laatutavoitteesta, henkilökunnan resursseista ja myös kustannusten rajoitteesta. (Liimatainen 2010: 57; Ehder 2005: 26.) Käsitteellisesti laitekoestusta ja menetelmien validointia ei aina eroteta toisiinsa (Linko 1999: 24). Tässä opinnäytetyössä olemme suorittaneet laitekoestusta eli suppeaa menetelmävalidointia. Sen yhteydessä tutkittiin seuraavat validoinnin osa-alueet: toistettavuus, lineaarisuus, mitta-alue, tarkkuus ja osittain jäljitettävyyys.

Mittaustuloksen toistuvuus on saman mitattavan suureen peräkkäisten mittaustulosten totuudellisuus, kun mittaukset suoritetaan identtisessä olosuhteissa (Ehder 2005: 37). Mittaustuloksen toistuvuus tarkoittaa samalla tavalla ja samoissa olosuhteissa suoritettujen peräkkäisten mittaustulosten samankaltaisuus. **Sarjan sisäinen toistuvuus** edustaa samasta näytteestä, samalla menetelmällä ja saman henkilön lyhyellä aikavälillä toistaminen testitulosten keskinäinen yhtäpitävyys. Toistettavuutta voidaan testata myös mittaamalla näytteitä rinnakkaisina. (Termien määritelmät 2009: 319.) FINAS S/33 -suosituksen mukaan toistokokeiden määrän pitää olla $n \geq 20$. **Sarjan välistä toistuvuutta** tutkitaan samasta näytteestä sekä samalla testillä, eri henkilöiden ja pitkällä aikavälillä saatujen tulosten yhteneväisyyttä (Termien määritelmät 2009: 319). Luotettava variaatiokertoimen arvo saadaan, jos toistotestien lukumäärä $n > 20$ on suoritettu vähintään kolmen kuukauden aikana (Siloaho ym. 1997: 198).

Mitta-alueella tarkoitetaan mittaussuureen arvojen joukkoa, jolla mitta-analysointivirheen pitäisi olla tarkennetuissa rajoissa. Kliinisessä kemiassa menetelmän mitta-alue merkitsee tavallisesti lineaarista mitta-alueetta, laimennusrajaa tai analyttistä toiminta-alueetta. (Ehder 2005: 28; Jaarinen – Niiranen 2005: 13.)

Lineaarisuus on analyysimenetelmän kyky antaa tiedossa olevalla alueella hyväksyttävä lineaarista korrelaatiota tulosten ja tutkittavien näytteiden konsentraation välillä.

Samalla voidaan määritellä analyysimenetelmän luotettavaa mittausaluetta, jolla saavutetaan hyväksyttävä tarkkuutta ja täsmällisyyttä. (Ehder 2005: 28.)

Tulosten **tarkkuutta** tarkoittaa mittaustuloksen ja tosiarvon yhteensopivuus ja menetelmävalidoinnissa määritetään laskemalla systemaattisia ja satunnaisia virheitä. **Jäljittävyy**s määritellään silloin, kuin on yhteys tiedotettuihin referenssimateriaaleihin ja kansainvälisiin mittanormeihin. Hyvä tutkittava vertailumateriaali kuuluisi olla mahdollisimman lähellä matriisipohjaista vertailumateriaalia. Käytännössä menetelmän oikeellisuus arvioidaan vertaamalla saatuja mittausarvoja toisen tunnetun menetelmän referenssiarvoon. (Ehder 2005:8, 35.)

5 Analysaattorit ja määrittämenetelmät

Työ suoritetaan Meilahden sairaalan laboratorion Hitachi/Roche Modular cU -laitteella, immunoturbidimetristä menetelmää käyttäen, jossa NGAL määritetään immunopresipitaation perustella. Saatuja tuloksia verrataan Kirurginen sairaalan laboratorion U-NGAL:n tuloksiin. Siellä on käytössä Abbott ARCHITECT i2000SR -laite, immunokemiluminometrinen määrittämenetelmä, CMIA.

Sairaalan päivystyksessä arvioidaan hoidon tarpeita. Heikossa tilassa oleva potilasta on diagnosoitava ajankohtaisesti ja luotettavasti. Henkilöstön koulutus ja perehdytys on suunniteltava niin, että se tukee ensihoidon kiireellisyyden arviointia. (Malmström 2012: 703.) Meilahden sairaalan päivystyksessä vitaaliparametrien lisäksi tarvittaessa on mahdollisuus käyttää munuaisten toiminnan pikadiagnostiikassa Triage-vieritestistä veren NGAL mittaamiseksi.

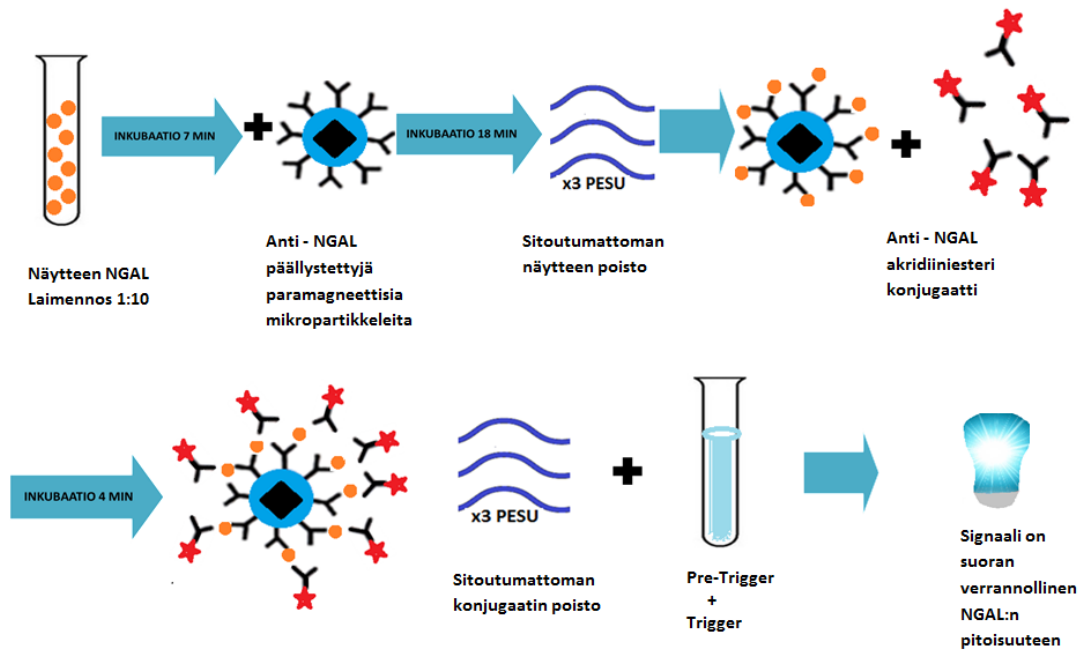
Triage-immunofluoresenssi-menetelmä perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan. Meilahden sairaalassa käytetään plasmanäytettä, joka annostellaan Triage-NGAL® -testikasetin näytekaivoon. Näytteissä olevat analyytit-antigeenit reagoivat reagenssien ja fluoresoivan vasta-ainekonjugaatin kanssa reaktiokammiossa. Inkubaatiovaiheen jälkeen seos kulkee testipaneelilla detektiosektoriin, missä sitoutuvat kompleksit huuhtoutuvat jätekammioon. Analysoitavaksi jäävät vapaita leimattuja konjugaatteja, jotka pysyvät kiinnittymään detektioalueessa. Triage MeterPro mittaa fluoresenssin, jonka arvo on kääntäen verrannollinen NGAL-pitoisuudelle. (HUSLAB 2011. Työohje.)

Meidän opinnäytetyössämme virtsan NGAL:n määrittämisessä käytämme HUSLABin kliinisen biokemian laboratorioiden Hitachi Roche Modular cU - ja Abbott ARCHITECT i2000SR -laitteita.

5.1 Abbott ARCHITECT

Abbott ARCHITECT i2000SR -laitteen käyttämä keimilumesenssimenetelmä kuuluu luminometrian määrittämiin. Luminesenssi tarkoittaa säteilyenergian vapautumista, kun molekyyli­rakenteessa oleva elektroni palaa korkeammalta energiatilalta matalammalle. Siitä miten elektroni on saatettu korkeammalle energiatilalle, luminesenssi voidaan jaotella fluoresenssiksi tai fosforesenssiksi ja kemiluminisenssiksi. Kemiluminisenssissa (bioluminesenssissa) molekyylin virittyminen aikaansaadaan kemiallisen reaktion avulla. (Äkerman – Jokela 2010: 57.) Kemiluminesenssi-immunomääritys – menetelmässä viritysentergia aiheutetaan hapetus-pelkistysreaktiolla, jossa käytetään merkkiaineena kemiluminisoivia orgaanisia molekyyli­jeja. Yksi tunnetuista merkkiaineista on akrediniumesteri, joka on konjugoitu proteiinimolekyyliin. Alkalisissa olosuhteissa akrediniumesterit hapettuvat vetyperoksidin läsnäollessa muodostaen suurenergisiä välituotteita. Hapettumalla virittynyt yhdiste emittoi valoa palatessaan perusenergiatilaan­sa. Valon voimakkuus mitataan valomonistinputkella. (Halonen 2004: 76, 98.)

Abbott ARCHITECT -laitteen NGAL:n CMIA-määritys on heterogeeninen kaksivaiheinen sandwich-menetelmä (kuvio 5). Siinä sidottu ja vapaa vasta-ainefraktio on erotettava toisistaan ennen mittausta pesemällä, mikä on helposti järjestettävissä automaattisesti. (Savolainen – Parviainen 2010: 65.)



Kuvio 5. Abbott ARCHITECT virtsan NGAL menetelmä (Abbottin mukaan).

Ensimmäisessä vaiheessa näytteen mahdollisesti sisältämät NGAL:n analyytiantigeenit tarttuvat anti-NGAL päällystettyihin paramagneettisiin mikropartikkeleihin tuottaen immunokompleksin. Inkubaation ja pesun jälkeen reaktioseokseen lisätään anti-NGAL-akridiniinimerkityn konjugaatin. Toisessa reaktiovaiheessa muodostuu konjugaattiin sitoutunut NGAL:n kaksoisvasta-aineimmunokompleksi. Pesun jälkeen näytteseokseen lisätään vetyperoksidia (H_2O_2) ja natriumhydroksidia (NaOH) sisältämiä Pre-Trigger ja Trigger-reagenssia. Natriumhydroksidin avulla säädetään reaktion pH. Akridiniesteri reagoi vetyperoksidin kanssa alkalisissa olosuhteissa muodostaen tuotetta, joka hajoaa lähettäen valokvanttia. Saatu kemiluminisenssireaktio mitataan suhteellisina valoyksiköinä RLU (Relative Light Unit) aallonpituudella 430 nm. Valon signaali on suoraan verrannollinen näytteen NGAL-konsentraatioon (Hebbar 2009: 53; Halonen 2004: 98). Abbottin NGAL:n määrittämisessä on käytössä 3 taso-kontrolleja H(high), M(medium) ja L(low) (Abbott ARCHITECT i System 2009: 1) (kuvio 6).



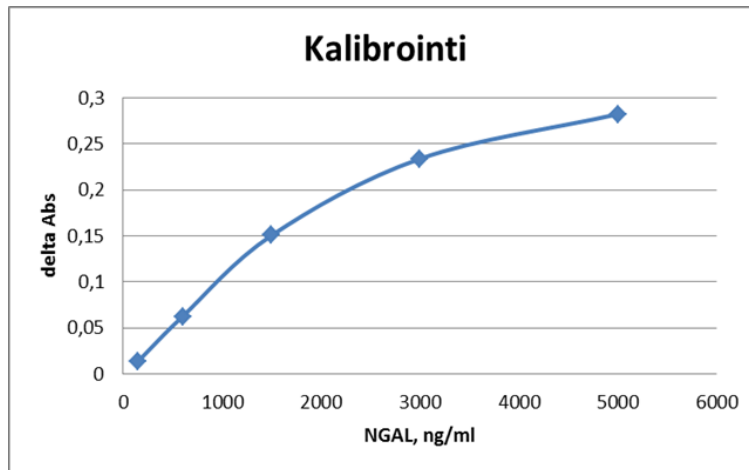
Kuvio 6. Abbott ARCHITECT reagenssit ja kontrollit.

5.2 Hitachi/Roche Modular

Turbidometriset immunnokemialliset menetelmät yhdistyvät sekä immunologinen reaktio että turbidometria ja niitä käytetään erityisesti seerumin ja virtsan spesifisten proteiinien pitoisuuksien mittaauksessa. Turbidometria kuuluu spektrofotometriin määrittämiseen. Sen avulla mitataan siroamisesta, heijastumisesta tai absorptiosta aiheutuvaa läpäisseen valon intensiivisyyden vähenemistä. Immunoturbidometrialla mitataan liukenemattomien partikkelien pitoisuutta suspensioissa. Turbidometriset immunnokemialliset menetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen liukenemattoman immunokompleksin muodostumiseen eli agglutinaatioon. Turbidometrisissä määrittämissä lisätään vesiliukoisten lineaaristen polymeerin saostumisnopeutta lisäämiseksi. Läpäisevän valon voimakkuus riippuu yhdisteen pitoisuudesta ja partikkelin koosta ja se on verrannollinen muodostuneiden kompleksien määrään. (Halonen 2004: 71–72, 99.)

Immunoturbidometrista menetelmää hyödyntäen voidaan fotometrisesti mitata virtsan NGAL:n pitoisuus. BioPorto testi on tarkoitettu NGAL:n kvantitatiiviseksi määrittämiseksi ihmisen virtsasta ja plasmasta. Näyte sekoitetaan reaktion puskurin kanssa ja lyhyen inkuboinnin jälkeen reaktio käynnistyy lisäämällä suspensiota (polystyreenimikropartikkeleita, jotka päällystetty hiiren monoklonalisia NGAL vasta-aineita). Näytteessä oleva NGAL aggregoituu immunopartikkelien kanssa. Läpäisevän valon voimakkuus riippuu NGAL:n pitoisuudesta ja partikkelikoosta. Aggregaation voimakkuus määritetään läpäisevän valon eli absorbanssin avulla. Sen muutos mitataan pääaallonpituuden 570 nm ja sivuaallonpituuden 800 nm absorbanssin erotuksena. NGAL:n pitoisuus näytteestä määritetään arvon interpoloimalla standardikalibrointikäyrästä. (BioPorto Diagnostics 2012.)

Valmistajan ilmoittama mittausalue on 25 ng/ml – 5000 ng/ml (ks. kuvio 7). Menetelmä on lineaarinen samalla alueella. Modular -laitteen NGAL:n määrittämisessä käytetään taso-kontrolleja H (High) ja L (Low). (BioPorto Diagnostics 2012.)



Kuvio 7. NGAL:n mittausalue (BioPorto Diagnostics 2011)

Immunologiset menetelmät ovat herkäät ja tarvitsevat omaa preanalyttistä laadun valvontaa. Siihen kuluvat sopivat laboratoriotilat, reagenssien ja menetelmien optimointi, menetelmän ohjeiden noudattaminen ja valvonta sekä henkilökunnan analyysivalmiudet. (Weber 2000:181.)

6 Työn suorittaminen

6.1 Näytteet

Virtsanäytteiden säilyminen ennen kvantitatiivisia kemiallisia tutkimuksia tapahtuu perinteisillä vakiotavoilla. Ne ovat koottu Euroopan suositusten mukaan ja ensisijaisesti ne ovat oikea säilytysaineen ja lämpötilan valinta (Kouri 2003: 5). U-NGAL tutkimusta varten näyte on otettava lisääaineettomaan putkeen, joka säilytetään 24 tuntia huoneenlämpötilassa, kolme vuorokautta jääkaapissa ja jatkossa kuusi kuukautta pakastettuna -70 C:ssa. (HUSLAB 2013. Tutkimusohjekirja).

Näytteinä käytämme potilaiden virtsanäytteitä, jotka on säilytetty pakastuneina -70 °C Meilahden sairaalan laboratoriossa. Abbott ARCHITECT -laitteen valmistajan mukaan virtsanäytteet ovat käyttökelpoisia, jos ne säilytetty -70 °C lämpötilassa enintään puoli vuotta. Käytämme 59 näytteitä, jotta saamme vaihtelua U-NGAL arvoihin. Päätämme tehdä rinnakkaisten tulosten toistettavuuden analyysin.

Ohjeiden mukaan virtsanäytteet, jotka ovat lisäaineettomissa putkissa, on sentrifugoitava 1000 rpm 10 minuutin ajan. Aikaisemmissa tutkimuksissa, jonka suoritti Hollmen (ym. 2011:3 (1)) työryhmä Kirurgisessa sairaalassa elinsiirto-osastolla, käytetyt näytteet oli tuoreena heti sentrifugoitu 2500 rpm +4 °C: n lämpötilassa 10 minuuttia ja sen jälkeen seerumin ja virtsan sakan yläpuolinen osaa oli jaettu putkeihin ja jäädytetty - 70 °C. Näyteastian oli käytetty lisäaineettomia putkia.

6.2 Työryhmä, ohjaus ja tiedonhakujen kuvaus

SB11K7 ryhmän opiskelijat Elena Hyrri ja Olga Elkina ovat työryhmän jäsenet, jotka osallistuvat Meilahden sairaalan laboratorion NGAL -projektiin. Tutkimusprojektin omistajana on Meilahden sairaalan laboratorio. Työ suoritetaan HUSLABin kemistin Aija Helinin ohjauksen mukaan. Opettaja Irma Niittymäki ohjaa kirjallista työtämme Metropolian puolesta. Työmme aikataulu ja SWOT -analyysi ovat esitetty liitteessä 1.

Kirjaston tietokannon kautta etsimme tietoja ja aineistoa meidän oppinäytetyöaiheen kuvailevien hakusanojen avulla. Etsimme lähteet sosiaali- ja terveysalan tietokannoista: PubMed ja Medic. Haussamme käytimme seuraavia hakusanoja: NGAL, urine, Abbott ARCHITECT, Modular, lipokalin-2. Suurin osa tavoitetuista lähteistä oli englanninkielisiä. Löysimme myös suomenkielisen tutkimuskatsastuksen, joka oli tehty viime aikoina. Jotkut tutkimukset olivat venäjänkielisiä ja ne ovat haettu tietokannoista eLibrary.ru hakusanoilla: ngal, липокалин 2, кардиохирургия, острое повреждение почек и диагностика. Huomasimme, että NGAL kiinnostaa koko maailmaa ja tutkimusten geografia on laaja.

6.3 Menetelmän vakiointi ja kontrollit

Modular–menetelmän virtsan NGAL parametrit on esitetty taulukossa 1.

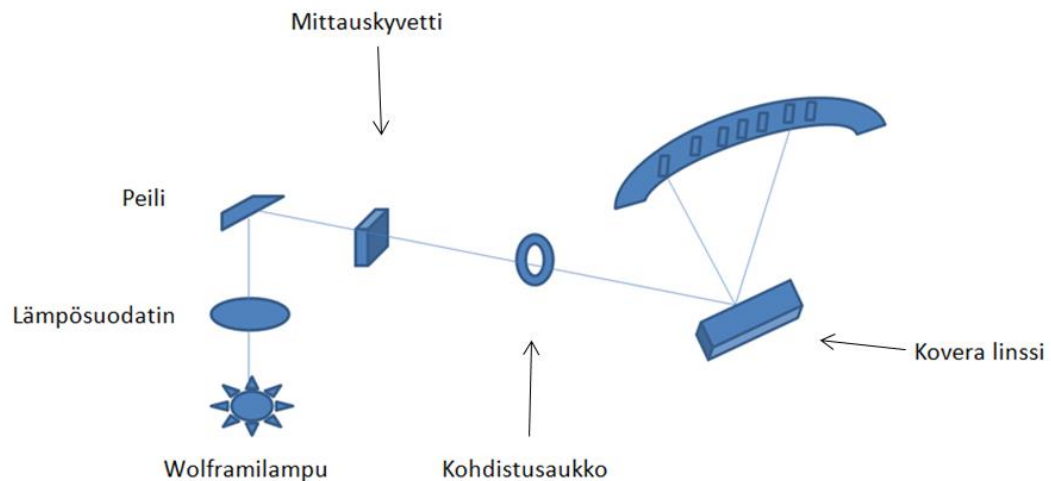
Taulukko 1. Hitachi/Roche Modular -laitteen parametrit.

Näytteen tilavuus	6 µl
Reagenssin R1 (puskurin) tilavuus	150 µl
Reagenssin R2 (vasta-aineen) tilavuus	50 µl
Aallonpituudet	800/570 nm
Kalibroinnin menetelmä	SPLINE
Yksikkö	µl/l
Vakioinnin yläraja	1500 µl/l
Kalibraattorit	150, 600, 1500 µl/l
Kontrollit	Low (202ng/ml), High (499 ng/ml)

Käytimme BioPorto reagensseja ja kontroleja. Käytetyt reagenssit: puskuriliuos R1, joka sisältää muriiniproteiineja sekä immunnopartikkelisuspensio R2, joka sisältää polystyreeni partikkeleita, päällystettyinä hiiren monoklonalisilla NGAL – vasta-aineilla. Avaamattomat reagenssit säilyivät 11.2013 asti, 2 – 8 °C lämpötilassa. Avatut reagenssit säilytys lyhennee 4 viikoksi.

NGAL:n pitoisuuksien mittauksessa hyödynnetään bikromaattinen mittausmenetelmä. NGAL:n määrittäminen potilaan näytteistä Modular -laitteilla tapahtuu kahden aallon pituudella: 570 nm pääaallon- ja 800 nm sivuaallonpituudella. Laitteen sivu eli tausta-aallonpituuden mittaus poistaa häiritsevien aineiden virheitä. Voidaan todeta, että hemolyysi, lipeemisyys ja ikteerisyys eivät vaikuta tulokseen.

Modularin fotometrin mittausyksikkö on kaavamaisesti esitetty kuviossa 8. Kovera linssi jakaa näytteen läpi tuleva valosignaali aallonpituudeltaan.



Kuva 8. Roche Modular fotometri. (Hitachi/Roche Modularin mukaan).

Modular -laite suorittaa kaksi mittausta 10 minuutin välin eli saamme kaksi absorbanssimittaus tulospistettä. Ensin laite sekoittaa 6 μl näytettä ja 150 μl puskuria (R1) ja 5 minuuttin 37 °C inkuboinin jälkeen toteuttaa absorbanssimittausta 570 nm aallonpituudella. Reagenssin R2 lisäyksen ja 10 minuutin inkuboinnin jälkeen laite suorittaa absorbanssimittausta 800 nm aallonpituudella. Näiden arvojen erotustulos on suoraan verrannollinen näytteen NGAL pitoisuuteen. Näytteen raakatulos ilmoitetaan absorbanssi-yksikössä (Abs), joka muutetaan vakiokuvaajan avulla konsentraatio-yksikköön eli $\mu\text{g/l}$. Virtsan NGAL menetelmä oli ohjelmoitu avoimille kanavalle ja reagenssipulloille kiinnitetty avoimen kanavan viivakoodit. Ulkokehälle sijoitetaan reagenssi R1, sisäkehälle R2. Seuraavaksi oli suoritettu menetelmän vakiointi 6 – pistekalibroinnilla. Käytimme 0,9 % NaCl:a nollaliuoksena. Kalibraattoripakkaus sisältää 5 vakiota: 150 $\mu\text{g/l}$, 600 $\mu\text{g/l}$, 1500 $\mu\text{g/l}$, 2500 $\mu\text{g/l}$, 5000 $\mu\text{g/l}$ (ks. kuvio 9).



Kuvio 9. BioPorto:n kontrollit ja vakiot.

Meidän suorituksessa käytimme 3 vakiota: 150 µg/l, 600 µg/l, 1500 µg/l, niistä laite automaattisesti valmistaa lisäpitoisuudet vakiokuvaajan eripisteitä varten. Tuloksena olivat seuraavat vakiokuvaajan pisteet: 0, 100, 300, 600, 1000, 1500. Vakioinnin tulokset onnistuivat ilman hälytyksiä. Käytetyn menetelmän mittausalue oli 0 – 1500 µg/l. Jos tulos oli korkeampi, kun 1500, laite suoritti automaattisesti uutta määritystä laimentamalla näytteen 1:10. Meillä oli kuusi näytettä, joiden NGAL:n pitoisuus oli yli 1500 µg/l. NGAL:n menetelmän toimivuutta tarkistimme kontrollien Low (taso 202 µg/l) ja High (taso 499 µg/l) avulla. Seuraavaksi syötimme 59 virtsanäytettä laiteeseen analysoitavaksi, jotka ajoimme rinnakkaisina. ARCHITECT:n NGAL:n tulokset ja Modularilla mitatut NGAL:n rinnakkaiset arvot ovat liitteessä 2. Analysoitujen näytteiden määrä oli 59 kpl. ja niistä 7 näytteettä, joiden arvot olivat alle 10 µg/l, oli poistettu tilastanalyysistä.

7 Tulokset

7.1 Tilastolliset käsitteet

Tässä luvussa määritellään keskimmäiset tilastolliset termit, jotka käytetään laboratorion sisäisessä laadunohjauksessa.

Normaalijakauma (Gaussin jakauma). Tulosjoukon kasvaessa tarpeeksi isoksi, voidaan kyseinen pistejoukko interpoloida Gaussin käyrällä. Se on yleisin kaikista todennäköisyysjakaumista, ja käytännössä mittausten havaintovirheet ovat jakautuneet suurin piirtein normaalisti. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 144.) Tulosten jakauma kuvataan keskiarvon ja keskihajonnan avulla (Sorto – Törmä – Kaihola 1996: 6-7).

Keskiarvo lasketaan jakamalla tulosten summa niiden lukumäärällä:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Keskihajonta kuvaa tulosten jakaumista keskiarvon ympärille ja antaa tiedon tulosten jakauman leveydestä. Keskihajonta ja sen kerrannaiset käytetään yleensä kontrollinäytteen virherajoina. (Sorto ym. 1996: 7.) Keskihajonta rinnakkaismäärittämisistä lasketaan Dahlbergin kaavalla (Siloaho ym. 1997: 202):

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$$

S_0 – keskihajonta

$(x_{i1} - x_{i2})$ – rinnakkaismäärittelyksen erotus

n – näytteiden parien lukumäärä

Variaatiokerroin on tilastollinen hajontaluku, joka saadaan kun keskihajonta suhteutetaan keskiarvoon. Se ilmoitetaan usein prosentteina (Heikkilä 2008: 88):

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} * 100\%$$

S – keskihajonta

\bar{x} - sarjan rinnakkaisnäytteiden keskiarvo

Variaatiokerroin on hyödyllinen tilastovertailuissa, esimerkiksi, se mahdollistaa kahden eri tasojen jakauman hajontojen keskinäisen vertailun (Sorto ym. 1996:7).

Poikkeama (bias) on mittauslaitteen ilmaisema systemaattinen virhe. Laitteen poikkeama voi johtua väärästä kalibroinnista, systemaattisesta mittauslaitteen väärästä lukemisesta tai laitteen rajoittuneesta havaitsemistehosta. Mittalaitteen kalibrointi on hyvä keino systemaattisten virheiden tunnistamiseksi. Poikkeama (bias) määritetään kuten mitattavan suureen oletetun mittaustuloksen ja tosiarvon tai sovitun arvon välinen ero (Ender 2005: 30–31):

$$bias = \frac{|C_n - C_0|}{C_0} * 100\%$$

Korrelaatio on riippuvuussuhde kahden muuttujan välillä ja sen voimakkuus ilmaistaan korrelaatiokertoimen avulla. Tavallisesti käytetyin mitta on Pearsonin korrelaatiokerroin, joka on kahden muuttujan välinen riippuvuus (Heikkilä 2008: 90):

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{S_{xy}}{S_x S_y},$$

jossa (x_i, y_i) ovat jakauman muodostavia lukupareja,

S_x ja S_y ovat muuttujien keskihajonnat.

Pearsonin korrelaatiokerroin on parametrien lineaarisen riippuvuuden mitta muuttujien x ja y välillä. Suurten x ja y yhteisjakauman pitäisi olla likimäärin normaalin. (Sarna 2007: 57–58.) Korrelaatiokerroin on kahden muuttujan välisen yhteyden voimakkuuden

ja suunnan mitta, joiden arvot ovat rajojen -1 ja +1 välillä. Muuttujien välillä on voimakas positiivinen korrelaatio kun kerroin on lähellä arvoa +1, jos se on lähellä -1, silloin on voimakas negatiivinen korrelaatio. (Heikkilä 2008: 91.)

Tutkimuksen tilastolliset hypoteesit kuuluvat selittäviin tutkimuksiin (Heikkilä 2004: 190). Ne tehdään, kun todennäköisyysjakauman parametreja koskevia oletuksia tai väitteitä testataan tilastollisesti. Testausasetelman kiinnittämiseksi on tehtävä seuraavat oletukset: nollahypoteesi (H_0) tarkoittaa testattavaa oletusta ja vaihtoehtoinen hypoteesi (H_1) on oletus, joka on voimassa, jos nollahypoteesi hylätään. (Mellin 2006: 131.) Testin **p-arvo** tarkoittaa pienin merkitsevyytaso, jolla nollahypoteesi (H_0) saadaan hylätä (Mellin 2006: 137). Tilastollinen hypoteesi kutsutaan parametriseksi hypoteesiksi, jos sen avulla tutkitaan satunnaismuuttujan parametrien arvoja. Ei-parametrinen hypoteesi koskee normaalijakauman muotoa ja silloin tarkastetaan onko muuttujia jakautunut normaalisti (Heikkilä 2008: 193).

7.2 Tulosten käsittely

Hitachi/Roche Modular -laitteen U-NGAL:n tuloksia verrattiin Abbott ARCHITECT -analysaattorin tuloksiin. Ne käsiteltiin SPSS/PASW – ohjelmaa käyttäen. Hitachi/Roche Modular -laitteelle laskettiin sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistuvuutta sekä keskihajonnan ja variaatioprosentin arvot rinnakkaisista näytteistä. Molempien laitteiden tulokset laitettiin regressiosuoralle ja sen perustella laskettiin korrelaatiokerroin.

7.3 Sarjan sisäinen toistuvuus

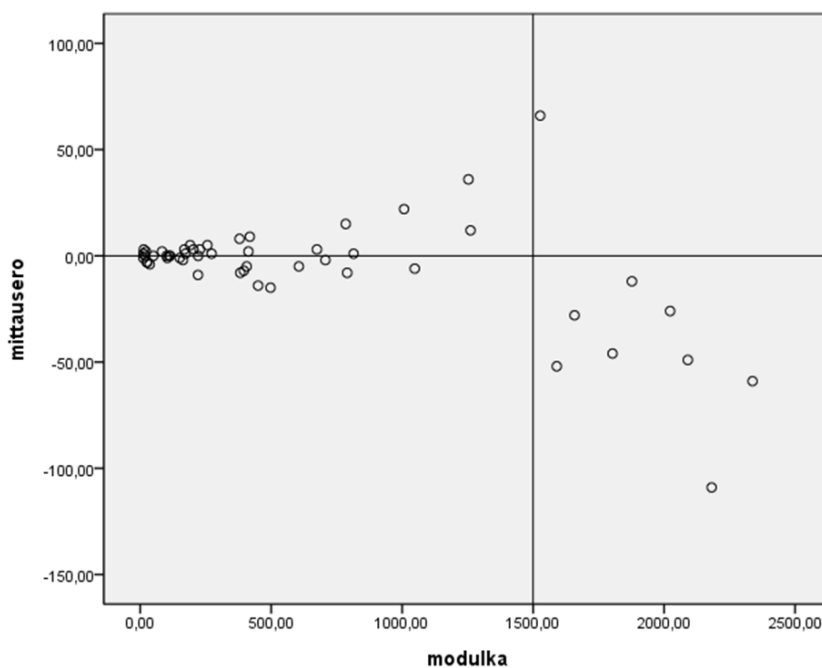
Sarjan sisäisen toistuvuutta tutkittiin laskemalla keskiarvo ja variaatiokerroin CV % rinnakkaisista Modular NGAL:n mittaustuloksista Dahlbergin kaavaa käyttäen. Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Modularin NGAL-tuloksista laskettu keskiarvo, keskihajonta, ja variaatioprosentti

parametri	arvo
ka(mittaukset)	622,10
sd	17,47
CV%	2,81 %

ARCHITECT - ja Modular -laitteiden mittaustulosten minimi-, maksimi- ja keskiarot ovat liitteessä 2 (2).

Kuviossa 10 y-akselille laitettiin rinnakkaisten Modularin mittausten erotukset ja x-akselille niiden keskiarvot. Tästä kuvioista nähdään tulosten olevan hyvin lähellä toisiinsa NGAL:n mittausalueella (0-1500 µg/l). Pienet poikkeamat ovat 1500–2500 µg/l arvojen alueella, jossa laite laimentaa näytteitä automaattisesti.



Kuvio 10. Modular -analysointilaitteen rinnakkaisten tulosten poikkeavuus verrattuna Architectin keskiarvoihin.

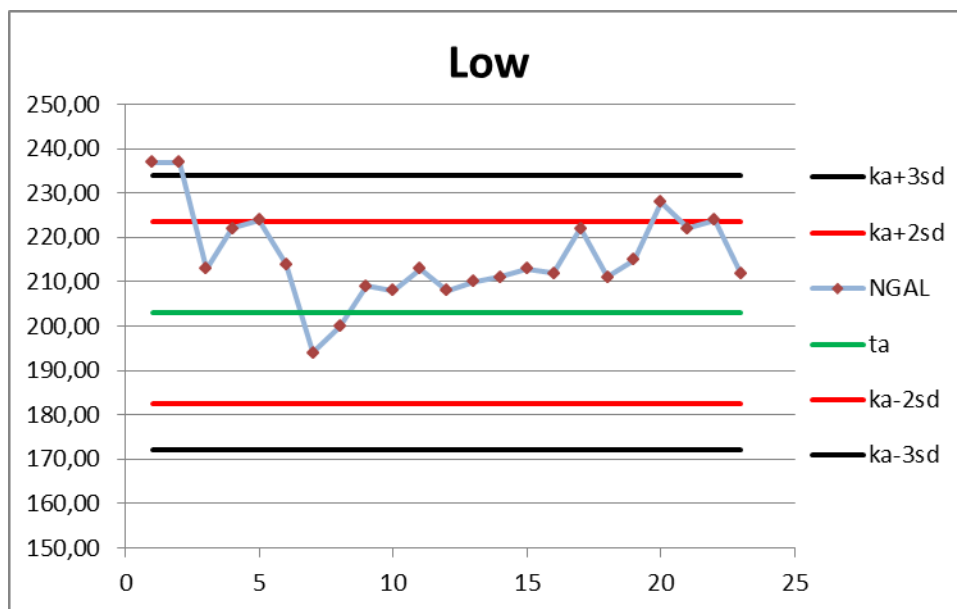
7.4 Sarjojen välinen toistuvuus

Modularin tasokontrolleja NGAL-Low, NGAL-High ja poolinäyte (Niisku) ajettiin neljän kuukauden aikana. Yhteenveto tuloksista on liitteessä 3. Matalan ja korkean tulostason kontrollien ja potilaan näytteen NGAL:n tuloksista oli laskettu keskiarvot, keskihajonnat, variaatioprosentit, luottamusvälin ala- ja ylärajat ja kontrollien bias-arvot. Ne ovat taulukossa 3.

Taulukko 3. NGAL:n kontrollinäytteiden ja potilaan näytteen tuloksista lasketut tilastoarvot.

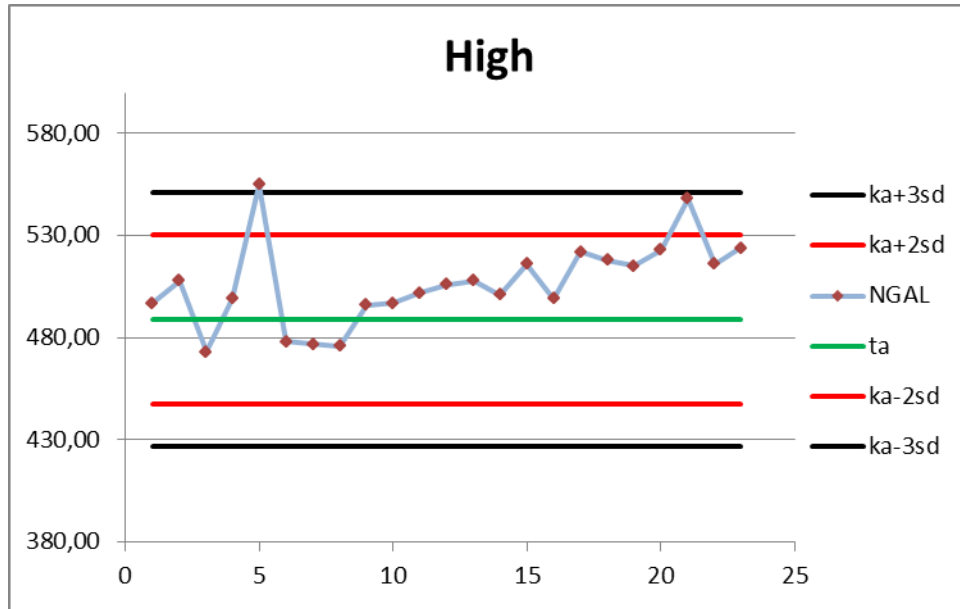
	Low	High	Pooli
\bar{x}	215,61	506,70	115,78
sd	10,28	20,75	6,91
CV%	4,77 %	4,10 %	6 %
tavoitearvo	203	489	
bias	6,2 %	3,6 %	

Matalatason kontrollin bias- (6,2 %) ja poolinäytteen CV % - arvoissa (6 %) ilmeni jonkin verran poikkeavuutta (ks. kuva 11). Meidän arvoihin verrattuna HUSLABin kontrollien poikkeamaluviut ovat lähes samoja ($CV\%_{Low}= 4,55\%$, $CV\%_{High}=5,07\%$) (HUSLAB 2013).

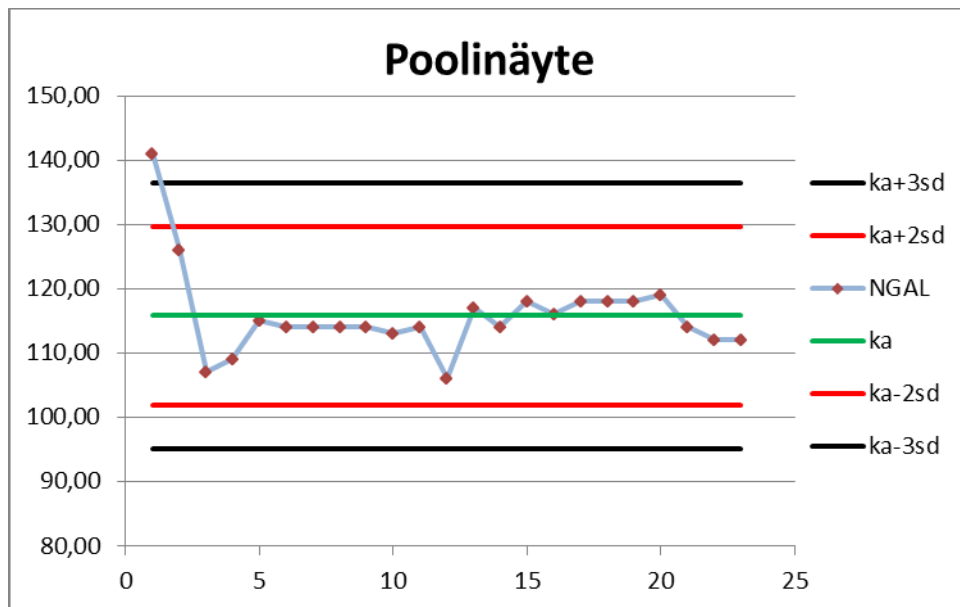


Kuvio 11. Matalan NGAL:n taso kontrollin tulosten vaihtelu eri mittauskerroilla.

Kontrollinäytteitä oli analysoitu useita kertoja, saimme tulokseksi sarjat mittaustuloksia. Ilmenevät erot johtuvat tyypillisestä satunnaisvirheestä. Suurin osa sarjojen välisen kontrolliarvoista noudattaa kontrollisääntöä ja sijaitsee $\pm 2sd$ rajalla. Kuvioissa 11–13 suosittu analysiraja $ka \pm 2sd$ on merkitty punaisella.



Kuvio 12. Korkean NGAL:n taso kontrollin tulosten vaihtelu eri mittauskerroilla.



Kuvio 13. Potilasnäytteen tulosten vaihtelu eri mittauskerroilla.

7.5 Lineaarisuus

Lineaarisuutta tutkittiin potilasnäytteestä, jonka NGAL:n pitoisuus oli $C=2367 \mu\text{g/l}$. Näyte oli laimennettu käsin pipetoimalla 0,9 % NaCl:lla seuraavissa suhteissa: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Meidän tutkimuksessa menetelmä oli vakioitu 0-1500 $\mu\text{g/l}$ näytteiden pitoisuuden rajoissa. Ne näytteet, jotka ovat NGAL- pitoisuudeltaan korkeampi, kun 1500 $\mu\text{g/l}$, Modular -laite laimentaa automaattisesti. Tulokset, jotka ylittivät NGAL:n mittausalueen ja olivat poikkeavia, hylättiin. Otimme vain luotettavat arvot, joita laite ei ollut laimentanut kahteen kertaan. Jälkikäteen huomasimme, että olisimme voineet saada enemmän pisteitä, mikäli olisimme valinneet näytteen pitoisuuden alle 1500 $\mu\text{g/l}$.

Yhteenveto lineaarisuuden tutkinnasta taulukossa 4, mihin laitettiin laimennuskertoimet, analysaattorin antamat rinnakkaiset U-NGAL mittaustulokset ja niiden keskiarvot sekä teoreettiset arvot. Mittaustulosten keskiarvot kerrottiin laimennuskertoimellaan ja sen jälkeen saaduista tulosten joukosta laskettiin keskiarvo, keskihajonta, variaatiokerroin ja myös bias (ks.taulukko 5).

Taulukko 4. Korkeapitoisen näytteen NGAL:n lineaarisuuden tutkimus

Näytteen numero	Laimennussuhde	Laimennuskoroin	Rinnakkaiset tulokset U-NGAL, $\mu\text{g/l}$		U-NGAL keskiarvo	U-NGAL laskennalliset arvot $\mu\text{g/l}$	U-NGAL kerrotut arvot $\mu\text{g/l}$
			1	2			
1	0		2	0		0	
2	0,1	10	213	210	212	237	2120
3	0,2	5	436	436	436	473	2180
4	0,3	3,333	640	643	642	710	2140
5	0,4	2,5	862	888	865	947	2162
6	0,5	2	1071	1092	1082	1184	2164
7	0,6	1,667	1271	1265	1268	1420	2113
8	0,7	1,428	1537	1542	1540	1657	2199

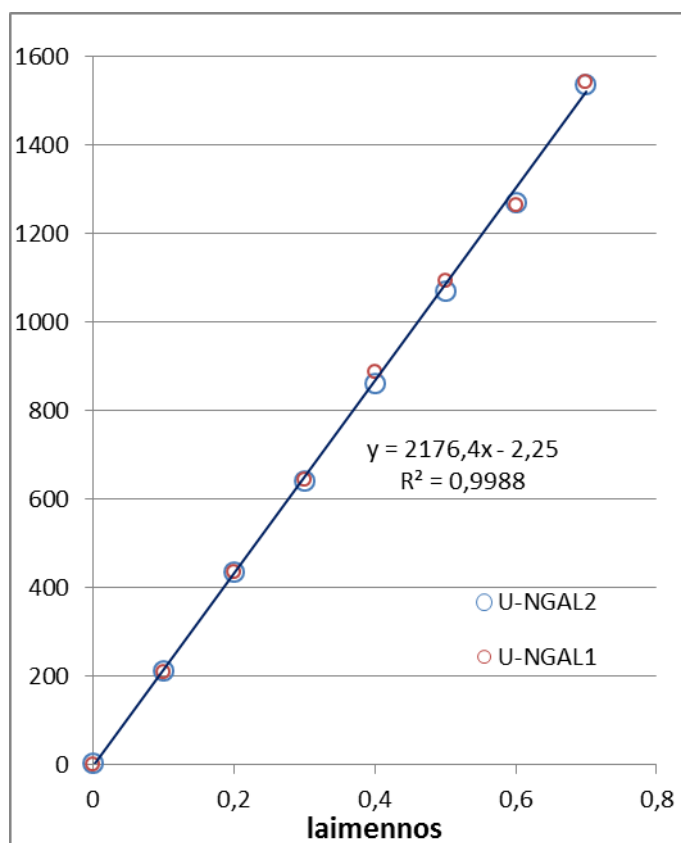
Kaikki rinnakkaiset mittaukset olivat tosi lähellä toisiaan. Siihen viittaa matala variaatiokertoimen arvo, $CV=1,34 \%$. Laskettu poikkeama oli arvoltaan korkea, $\text{bias}=9 \%$ (ks.taulukko 5). Systemaattinen virhe johtuu siitä, että valitsemamme potilasnäytteen

NGAL:n konsentraatio oli vakiointialueen ulkopuolella ja laite laimensi sen automaattisesti.

Taulukko 5. Potilaan NGAL näytteen lasketut tilastoluvut.

Parametri	Luku
ka	2154 µg/l
sd	29,03
CV	1,34 %
bias	9,00 %

Kuviossa 14 esitettiin kahdeksanpisteen lineaarisuuskuvaajan yhtälön ja korrelaatiokerroimen arvon.

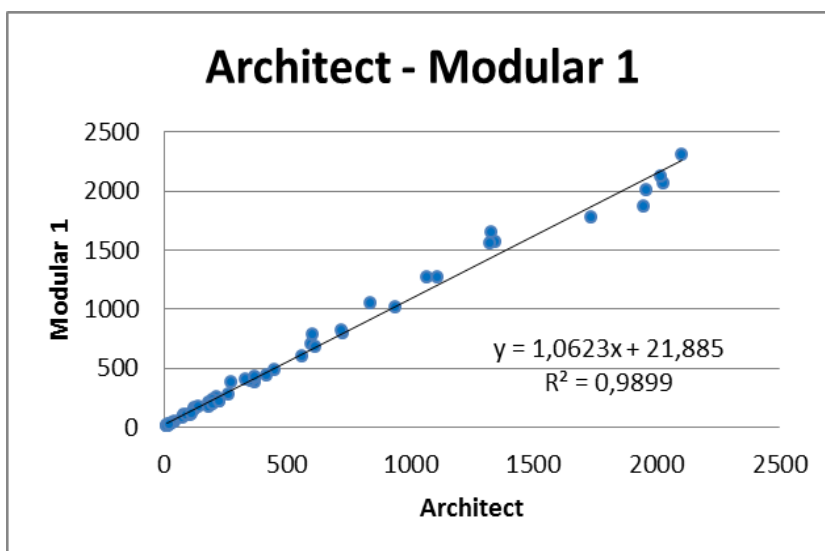


Kuvio 14. Lineaarisuusalue.

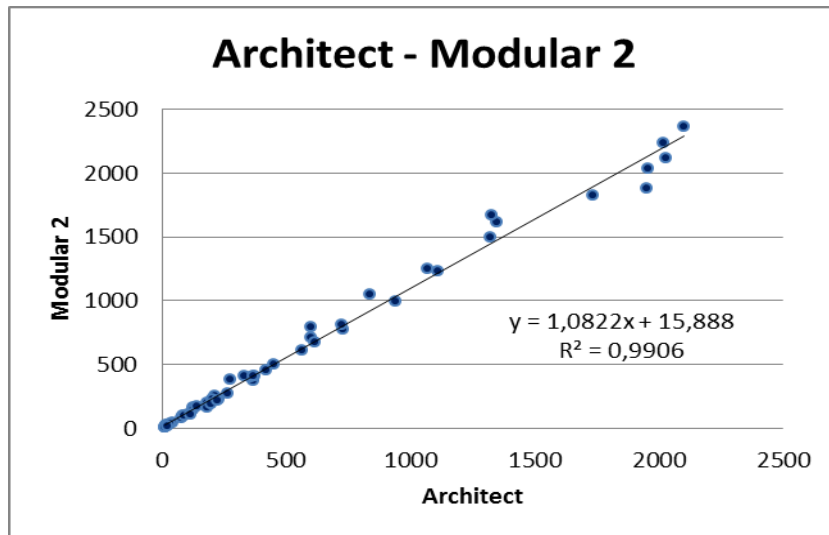
Tuloksena saimme hyvän lineaarisuussuoran, joiden regressiosuoran yhtälö on $y=2176,4x-2,25$ ($R^2=0,9988$). Meidän tulosten perustella voidaan sanoa, että validoitava menetelmä on lineaarinen laboratorion käytetyllä kalibrointialueella.

7.6 Menetelmien yhtenevyyden vertailu

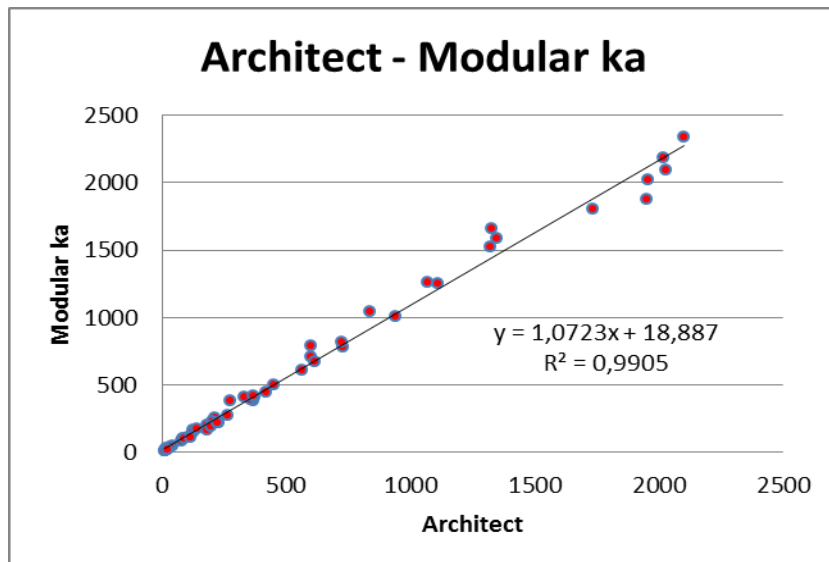
Rinnakkaiset näytteet (n=59) ajettiin Modular -analysointilaitteella ja tuloksia verrattiin HUSLABin Kirurgisessa sairaalassa samoista näytteistä Abbott ARCHITECTin CMIA –menetelmällä tehtyihin tuloksiin. Tulokset on esitetty graafisesti kuvioissa 15–17. NGAL:n tulostason vertailussa x-akselille laitettiin Abbott ARCHITECT (vertailu menetelmä) U-NGAL:n arvot ja y-akselille Modular (validoitava menetelmä) U-NGAL:n keskiarvot.



Kuvio 15. ARCHITECT ja Modular 1 virtsan NGAL:n tulosten vertailu.



Kuvio 16. ARCHITECT ja Modular 2 virtsan NGAL:n tulosten vertailu.



Kuvio 17. ARCHITECT ja Modular keskiarvot virtsan NGAL:n tulosten vertailu.

NGAL:n tulostason vertailussa saatiin regressiosuoran yhtälö: $y=1,0723x+18,887$. Tästä yhtälöstä näkyy, että regressiosuora leikkaa "y" akselia pisteessä 18,887. T-testin mukaan sen vakion arvo tilastollisesti ei ole merkitsevää ja sitä ei oteta huomioon. Regressioyhtälö voidaan kuvitella yhtälöllä: $y=1,027x$, jossa "y" on Modularin arvot ja "x" on ARCHITECTin arvot. Mittaukset ovat samansuuntaisia, riippuvaisia ja hyvin ennustettavia (liite 4).

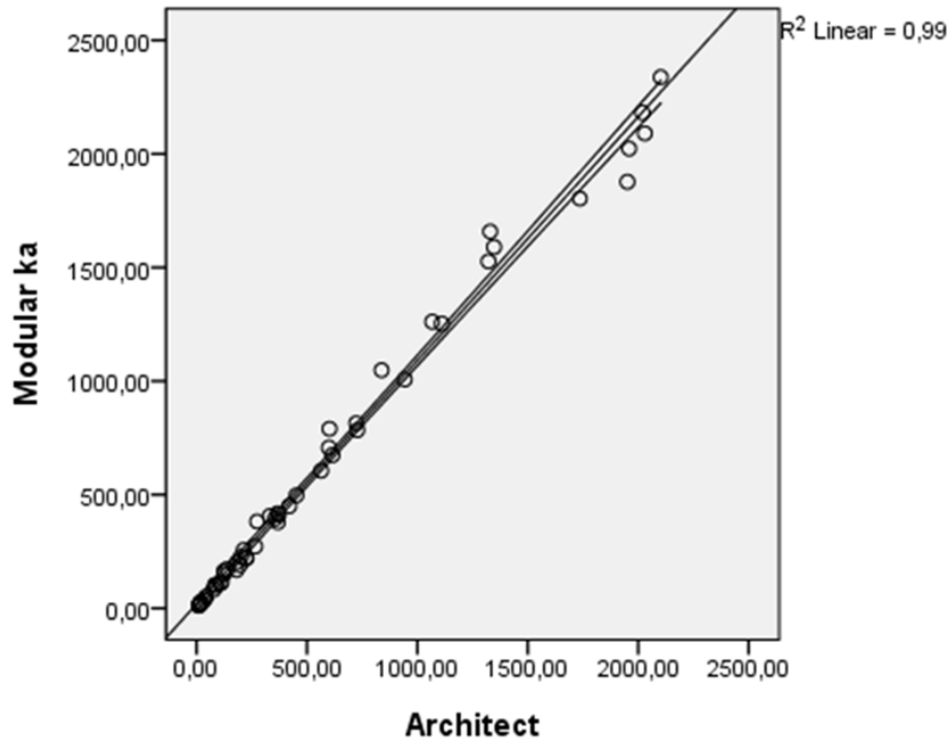
Kuvaajat ovat samannäköiset ja R^2 -arvot ovat lähellä ykköstä. Kahden muuttujan välistä riippuvuutta ja voimakkuutta voidaan arvioida korrelaatiokertoimien avulla. Tavallisin käytetty kerroin on Pearsonin korrelaatiokerroin eli R_p ks. taulukko 6.

Taulukko 6. Korrelaatiot.

	yhtälö	Pearson korrelaatio		Spearman korrelaatio
		R^2	R_p	R_s
ARCHITECT - Modular1	$y = 1.0623x + 21,885$	0,9899	0,995	0,997
ARCHITECT - Modular2	$y = 1,0822x + 15,888$	0,9906	0,995	0,997
ARCHITECT - Modular ka	$y = 1,0723x + 18,887$	0,9905	0,995	0,996

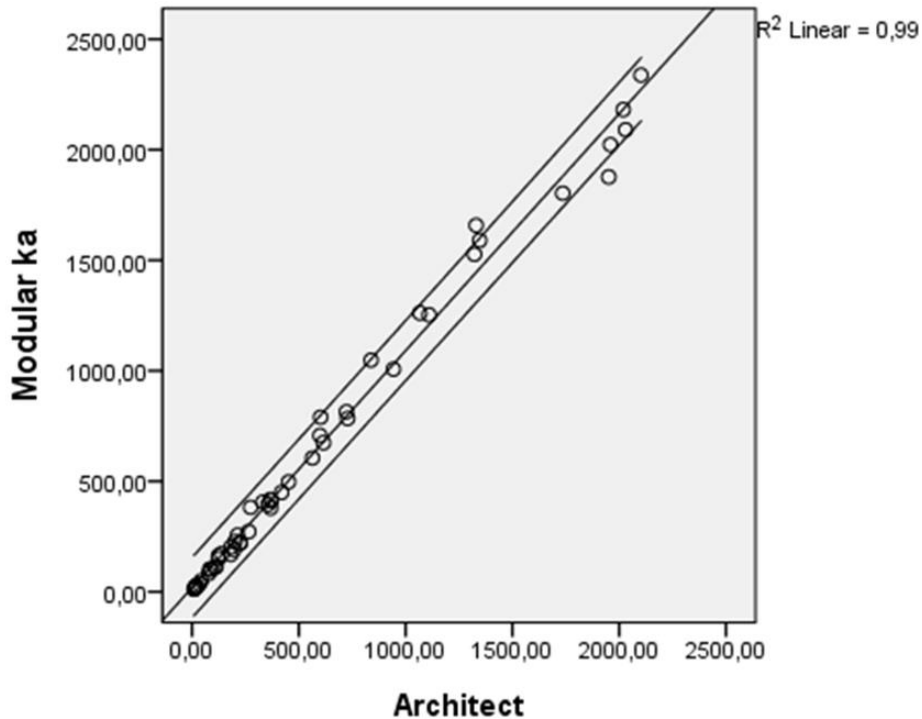
Saimme voimakasta positiivista korrelaatiota tutkimalla tilastollista yhteyttä kahden numeerisen tilastollisen muuttujan välillä korrelaatiokertoimen avulla. Täydellistä yhteyttä ilmaisevat ykkösen suuruiset korrelaatiot. Jos korrelaatiokertoimen arvo on yli 0,8, yhteys tulkitaan voimakkaaksi. Saadut korrelaatiokertoimet ovat yli 0,8 ja jopa lähellä ykköstä. Pearson korrelaatiot, jotka mittaavat kahden muuttujan välinen lineaarisen yhteyden voimakkuutta, ja Spearman korrelaatiot molemmat ovat myös lähellä ykköstä. Meillä on normaalisti jakautuneita muuttujia.

Luottamustaso kertoo meille millä todennäköisyydellä tutkimusjoukon arvot ovat tietyllä luottamusvälillä. Luottamusväli on tiedossa oleva vaihteluväli. Luottamusväli esimerkiksi 95 % kertoo meille, millä todennäköisyydellä perusjoukon lasketut keskiarvot sijaitsevat sen välillä. Seuraavat kuvaajat heijastavat regressiosuoran luottamustaso eli Confidence Interval. (kuvio 18) ja Prediction interval eli ennusteväli (kuvio 19). Luottamustaso merkitsee valittua todennäköisyyttä ja ilmaisee prosentiksi miten luottamusväli peittää Pearsonin korrelaatiokertoimen oikean arvon (Mellin 2006: 256). Ennustevälin avulla arvioidaan lasketun ennusteen luotettavuutta.



Kuvio 18. Lineaarinen regressioanalyysi Abbott ARCHITECT (vertailumenetelmä) vs Modular ka (Modular keskiarvo). 95 % Confidence Interval.

Kuviossa 19 ennustevälin alarajat ja ylärajat ympäröivät regressiosuoraa muodostaen ennustevyöhykkeen (Prediction band). Regressioanalyysissä ennusteväli lasketaan satunnaismuuttujalle ja luottamusväli laaditaan parametreille. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 290). Meidän kuvioissa suora sijaitsee todennäköisyydellä 95 % luottamustasolla ja 95 % ennustevyöhykkeessä.



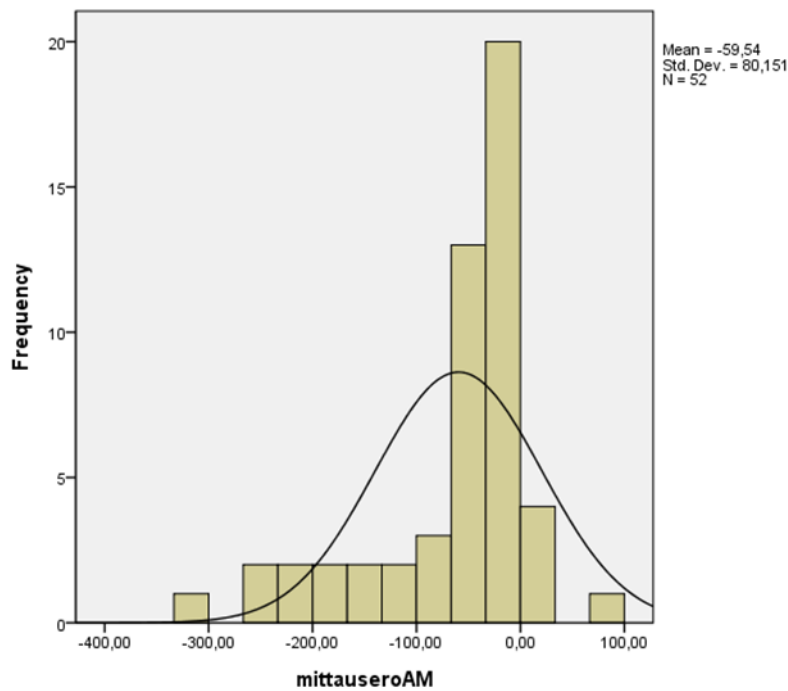
Kuvio 19. Lineaarinen regressioanalyysi Abbott ARCHITECT (vertailumenetelmä) vs Modular ka (Modular keskiarvo). 95 % Prediction interval.

7.7 Tilastolliset testaukset

Työssämme olimme suorittaneet hypoteesitestaukset johtopäätösten tekemisessä. Testauksessa lähetettiin liikkeelle nollahypoteesin H_0 eli luonnollisen otaksuman ja vastahypoteesin H_1 asetelmasta. Testin p-arvon avulla pääteltiin, oliko perusolettamus voimassa vai pitikö se hylätä ja kuinka suurella todennäköisyydellä.

Perusjoukon normaalisuutta saa tarkastella, jos piirtää histogrammin ja vertaa sitä Gaussin käyrään. SPSS tilasto-ohjelma sisältää Kolmagorov-Smirnov -testin, joka auttaa tutkimaan tulosten normaalijakaumaoletusta. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 205.)

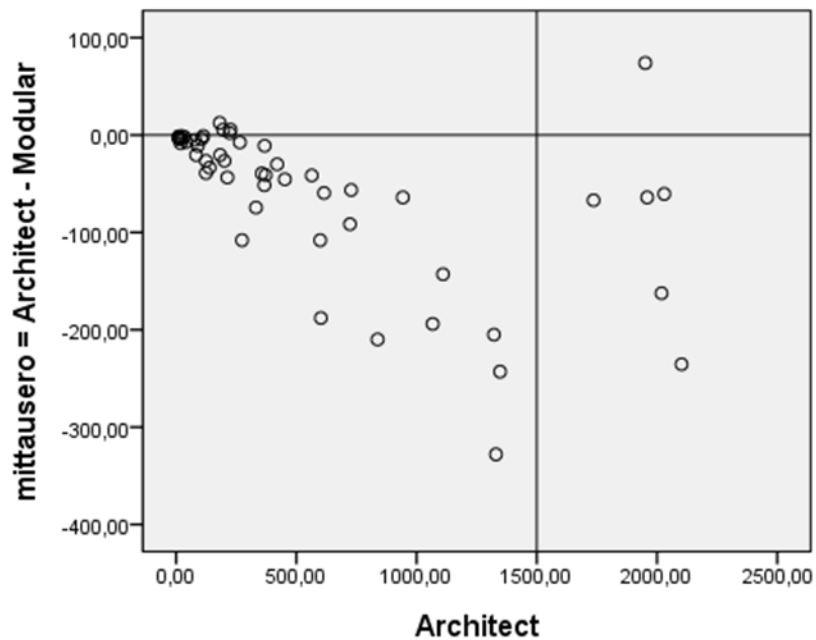
Tulosten mittauseroa käsiteltyssä laitamme hypoteesit: H_0 – tulokset ovat normaalijakautuneita ja vastahypoteesi H_1 – tulokset eivät ole normaalijakautuneita. Tilastollisen Kolmagorov-Smirnov -testin perustella ARCHITECTin p-arvo on 0,016 Modularin keskiarvon p-arvo on 0,016; kyseiset p-arvot ovat $< 0,05$ (ks. liite 5). NGAL:n tuloksien mittauseroilla (ARCHITECT – Modular) ei ole normaalijakauma. Kuvasta 20 havaitaan, että muuttujien frekvenssijakauma on vino vasemmalle.



Kuvio 20. Tulosten mittauseron (ARCHITECT – Modular) jakauma.

T-testejä saa käyttää myös vinoille erotuksien jakaumille, jos aineiston lukumäärä $n > 40$ (Mellin 2006). Meidän tehtävässä analysoidun tulosmäärä on $n = 52$ ja sen perusteella t-testin saa hyödyntää jopa epäsymmetriselle jakaumalle.

Frekvenssijakaumakuvan avulla saa todeta, että Modularin NGAL-arvot ovat korkeampia kuin ARCHITECT -arvot. Kahden laitteen tulosten välisiä eroja on kuvattu graafisesti kuviossa 21.



Kuvio 21. Modular -analysointilaitteen tulosten poikkeavuus verrattuna Abbott ARCHITECT -analysointilaitteeseen.

Kuviosta 21 myös nähdään, että kaikki Modularin NGAL:n tulokset ovat hieman korkeampia ARCHITECTin arvojen verrattuna.

T-testillä tutkittiin, eroavatko saadut Modularin tulosten keskiarvot ARCHITECTin tuloksista (liite 6). Hypoteesille asetettiin kysymys: Poikkeavatko kahden laitteen mittaukset tilastollisesti merkitsevästi toisistaan:

H_0 : mittaukset eivät poikkea

H_1 : mittaukset poikkeavat

Asiaan kuuluu todennäköisyys p , joka tiedottaa miten suuren riskin voi ottaa, jos nollahypoteesi hylätään. Riskitaso oli $p=0,000$ ($p<0,05$). Tämä tarkoittaa, että nollahypoteesi on voimassa ja laitteiden mittaustulokset eivät poikkea eli yhtenevät toisiaan.

8 Luotettavuuden arviointi

Analyysimenetelmien standardisaatio ja automatisaatio laboratoriossa lisäävät merkittävästi mittaustulosten luotettavuutta. Laatuun vaikuttavat myös näytteenotto ja tulosten oikea-aikaisuus. Oikea näytteenottoaika auttaa selvittämään näytteen kiireellisyyttä. Potilan näytteen tunnistusmerkinnasta on merkitystä. (Laila 2000:179).

Työssämme käsitellyt potilasvirtsanäytteet olivat säilytetty työhöjden mukaan. Menetelmävalidointi oli suoritettu laboratoriossa laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti. Käytetyt reagenssit ja kontrollit olivat tuoreina ja käyttämättöminä. Laitetyöskentelyssä saimme apua laboratorion kemistiltä. Yhdessä laskimme teoreettinen reagenssien ja kontrollien tarvetta, kun meillä oli käytössä kaksi valmistajapakkausta, jotta ne riittäisivät meidän tutkimusta varten. Lineaarisuutta varten oli huolehdittava, että näytteen määrä oli riittävä laimennusta varten. Samalla yritimme säästää reagensseja ja kontroleja, jotka ovat kalliita. Pipetointi suoritettiin tarkan esilaskennan mukaisesti ja asiaan kuuluvasti.

Meidän oppinäytetyössämme olimme ottaneet huomioon myös eettiset kysymykset. Ne oli käsitelty ja ratkaisu oli tehty tutkimusprosessin suunnittelu- ja esivalmisteluvaiheissa. Tutkimusta varten oli käytetty Kirurgisen sairaalan potilasnäytteitä, jotka olivat säilytetty pakastettuna ja alkuperäisellä tunnistustarralla merkattuna. Oli päätetty, että me haluamme saada tulokset rinnakkaisina ryhminä. Sitä varten oli tulostettu omat tarrat ”OTTO”- ja ”MAIJA”-ryhmille, jotka oli numeroitu 1-59 (ks. kuva 22.) Alkuperäiset tarrat oli siirretty erilliselle lomakkeelle, joka jäi laboratorion käyttöön ja antaa mahdollisuuden seurata näytteitä. Uusilla tarroilla oli merkitty näytekupit, jotka oli analysoitu Modular -laiteilla. Saimme erilleen ”OTTO”- ja ”MAIJA”-testeille numerokohtaiset tulokset työjonotulostettuna. Nämä tulokset olivat lähtökohtana meidän jatkoanalyysissa. Näin potilassuoja toteutui meidän työssämme.

U-NGAL-näytteiden tulostasovertilu (Metropolia)

Vertailuputken näytetunniste	Tulos (Abbot)	TESTI,OTTO	TESTI,MAIJA
		 <p>M... KIR Näyte 1 MEILLAB TESTI,OTTO U-NGAL 030413 AAMU</p>	 <p>M... KIR Näyte 1 MEILLAB TESTI,MAIJA U-NGAL 030413 AAMU</p>
		 <p>M... KIR Näyte 2 MEILLAB TESTI,OTTO U-NGAL 030413 AAMU</p>	 <p>M... KIR Näyte 2 MEILLAB TESTI,MAIJA U-NGAL 030413 AAMU</p>
		 <p>M... KIR Näyte 3 MEILLAB TESTI,OTTO U-NGAL 030413 AAMU</p>	 <p>M... KIR Näyte 3 MEILLAB TESTI,MAIJA U-NGAL 030413 AAMU</p>

Kuva 22. Tulostetut tulosvertailutaulukko.

Hitachi/Roche Modular -laitteen kalibrointi suoritettiin kolmen vakion avulla. Niiden lisäksi laite automaattisesti rajaa menetelmän mittausaluetta valmistamalla lisäpitoisuudet, jotka muodostuvat vakiokuvaajalle lisää pisteitä. Kalibrointikuvaaja oli lineaarinen analyysille määrätyllä mittausalueella.

Uusi menetelmä on luotettava, koska sillä saadaan samanlaisia kontrollituloksia käyttäjästä riippumatta. Validoitava menetelmä on lineaarinen laitevalmistajan ilmoittamalla mittausalueella. T-testin suorituksella oli todettu, että molempien menetelmien tulokset olivat yhtenevät. Se viittaa myös siihen, että validoitava menetelmä toimii hyvin ja sen voi ottaa rutiinikäyttöön laboratoriossa.

9 Pohdinta

Työn tuloksista raportointi tutkimusluvan myöntäjälle on eettinen velvoite. Tutkimustulosten raportointi on suoritettu avoimesti, rehellisesti, tarkasti, totuudenmukaisesti ja HUSin salassapito- ja käyttäjäsitoumusta noudattamalla. Alussa olimme tutustuneet aiheeseen, joka oli todella kiinnostava ja hyödyllistä yhteiskunnalle. Tutkittujen lähteiden mukaan uuden merkkiaineen, Neutrofiilien gelatinaasiin assosioituneen lipokaliinin käyttö laboriodiagnostiikassa munuaispotilaan hoidossa on hyödyllistä ja merkittävää. Asianmukaisella diagnostiikalla sekä ajankohtaisella hoidolla kasvavat mahdollisuudet eloonjäämisestä.

Saimme mahdollisuuden tutustua laiteisiin Abbott ARCHITECT i2000 SR Kirurgisen sairaalan laboratoriossa ja Hitachi/Roche Modular cU Meilahden sairaalan laboratoriossa, jossa P-NGAL- ja U-NGAL-näytteet analysoidaan. Tutustuimme laiteiden käyttöön ja menetelmien periaatteisiin. Opimme käytännössä näytteiden käsittelyä ja Modular -laitteen kalibrointia. Olemme kiitollisia Meilahden automaatiolaboratorion kemistille Helin Aijalle, joka esitteli automaatiolaboratorion sekä auttoi työn suunnitteluvaiheessa ja loistavasti ohjasi työn suoritusprosessia.

NGAL:n määrittäminen kuuluu uusiin diagnostisiin tutkimuksiin ja sille ei ole ollut vielä Suomessa hyväksyttyä referenssiä eikä ulkoista laadunarviointia. Uskomme, että Modularin vertailu tietyn menetelmän NGAL:n CMIA Abbott ARCHITECT suhteen, joka oli käytössä Suomessa vajaa neljä vuotta, on iso askel vertailuaineiston laajentamiseen ja

menetelmän akkreditointiin. Meidän työemme tuloksien perusteella voidaan ehdottaa laboratoriokäytännössä laajentamaan Hitachi/Roche Modular cU -laitteelle vakionkuivan 2500 µg/l asti. Silloin laitteelle ei tarvitse laimentaa näytteitä, joilla on korkea NGAL:n pitoisuus. Seurauksena on korkeampi analyysitulosten tarkkuus. Voidaan päätellä, että meidän tilastoilla on täydellinen yhteys ja menetelmät ovat yhtenevät.

Helmikuussa saimme opinnäytetyön aiheen, joka tuntui mielenkiintoiselta. Muun opiskelun ohella tutustuimme lähdemateriaaleihin ja teoriaan kahden kuukauden aikana. Näytteiden käsittely ja mittaukset laboratoriossa suoritimme parissa päivässä huhtikuussa. Sen jälkeen ryhdyimme tilastollisen tutkimuksen tekemiseen, joka koostui teoriasta ja laskuista. Samalla jatkoimme kirjallisen osuuden luomista. Tuntui joskus, ettei aika riittäisi. Kesällä työharjoittelun ohella suunnittelimme työemme kehittymistä, mutta se oli haasteellista, kun työharjoittelukin vaati paljon voimaa ja oppimiskykyä. Meidän lopputyöemme toivot ja suuret päätökset jäivät syksylle. Lokakuussa julkistimme opinnäytetyöemme Meilahden automaatiolaboratoriossa. Opinnäytetyön parissa saimme tutkimuksellista kokemusta, joka kehitti meitä myös ammatillisesti.

Lähteet

Abbott ARCHITECT i System 2009: Urine NGAL Calibrators. Reagenssipakkauksen ohje.

BioPorto Diagnostics 2012. The NGAL TEST™. Reagenssipakkauksen ohje.

Cullen, M. Rachel – Murray, Patrick – Fitzgibbon, Maria C 2012. Establishment of a reference interval for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Annals of Clinical Biochemistry* 2. 190–193.

Ehder, Tapio (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. MIKES – Mittatekniikan keskus.. Julkaisu J6/2005. Helsinki.

Flower, Darren – North, Anthony – Sansom, Clare. 2000. The lipocalin family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482. 9–24.

Goetz, David – Holmes, Margaret – Borregard, Niels – Bluhm, Martin – Raymond, Kenneth – Strong, Roland 2002: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell* (10). 1033–1043.

Haapio, Mikko – Lassus, Johan 2010. Akuutin munuaisvaurion uudet merkkiaineet. Katsaus. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 126. 2581–9. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo99196.pdf>>. Luettu 24.2.2012.

Haapio, Mikko 2012. Akuutin munuaisvaurion uudet merkkiaineet. SKKY ja Sairaala-kemistit ry 16.11.2012. Verkkodokumentti. <http://www.skky.fi/pdf/MHaapio_AKIn%20uudet%20merkkiaineet._SKKY%20Sairaala-kemistit%20012.pdf>. Luettu 09.02.2013.

Halonen, Toivo 2004. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.). *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY. 74–76.

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

Hebbar, Sudarshan 2009. Virtsan NGAL. Uusi biomarkkeri akuutin munuaisvaurion diagnostiikkaan. Abbott.

Heikkilä, Tarja.2008. Tilastollinen tutkimus. 7.painos. Helsinki. Edita.

Himmelfarb, Jonathan 2007. Iron regulation. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2. 379–381.

Hollmen, Maria – Kyllönen, Lauri – Inkinen, Kaija – Lalla, Martti – Merenmies Jussu – Salmela, Kaija 2011. Deceased donor neutrophil gelatinase-associated lipocalin and delayed graft function after kidney transplantation: a prospective study. *Critical Care*. 15(3).(1-10). (1).

Hollmen, Maria – Kyllönen, Lauri – Inkinen, Kaija – Lalla, Martti – Salmela, Kaija. 2011. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker of graft recovery after kidney transplantation. *Kidney International*. 79: 89–98. (2).

Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka. 2008. Tilastolliset menetelmät. 5.–6. painos. Helsinki: WSOY.

HUSLAB 2009. Tutkimustiedote. U-NGAL, Verkkodokumentti.

<http://huslab.fi/ohjekirjan_liitteet/tutkimustiedotteet/tutkimustiedotteet_2009/2009_65_usi_tutkimus_virtsan_lipokaliini_neutrofiilin_gelatinaasiin_assosioitunut_lipokaliini_6132_u_ngal.pdf>. Luettu 10.2.2013.

HUSLAB 2010. Validointiraportti U-NGAL, Abbott ARCHITECT i2000SR -analysointilaitteella. 16.6.2010 Kliininen kemian ja hematologia. Kirurginen sairaalan laboratorio. Luettu 20.03.2013.

HUSLAB 2011. Työohje 22.6.2011. P-NGAL, Triage-vieritestit. Kliininen kemian ja hematologia. Meilahden sairaalan laboratorio. Luettu 20.03.2013.

HUSLAB 2012. Validointiraportti NGAL, Modular cU. 23.4.2012 Kliininen kemian ja hematologia. Meilahden sairaalan laboratorio. Luettu 20.03.2013.

HUSLAB 2013. NGAL kontrollien tulostasot tiedot. Raportti. Kliinisen kemian ja hematologian vastuualue. Luettu 24.10.2013.

HUSLAB 2013. Tutkimusohjekirja. U-NGAL. Päivitetty 19.8.2013/AH. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=6132&terms=u-ngal>. Luettu 30.8.2013.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita.

Kaukonen, Maija – Korhonen, Anna-Maija – Haapio, Mikko 2012. Akuutti munuaisvaurio. Duodecim 128: 121–123. Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo10043.pdf>>. Luettu 23.2.2013.

Kjeldsen, Lars – Bainton, DorothyF – Sengelov, Henrik – Borregaard, Niels 1994. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. Blood 83. 799–807.

Kjeldsen, Lars – Cowland, Jack B – Borregaard, Niels 2000. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. Biochimica et Biophysica Acta 1482 (2000). 272–283.

Kjeldsen, Lars – Johnsen AndersH – Sengelov, Henrik – Borregaard, Niels 1993. Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. Journal of Biological Chemistry 268 (14.).10425–10432.

Kouri, Timo 2003. Virtsanäytteiden säilyvyys. Moodi 1. 5.

Lailla, Martti 2000. Erite- ja muiden erikoisnäytteiden preanalyttiset ongelmat. Moodi 6. 179.

Liimatainen, Oili 2010. Laboratorioprosessin laatu; mistä elementeistä laatu koostuu. Moodi 1. 57–58.

Linko, Solveig 1999. Menetelmävalidointi. Moodi 1. 24.

Linko, Solveig 2004. Kontrollien merkityksestä käytännön laboratoriotyössä. Moodi 2. 60–63.

Lippi, Giuseppe – Aloe, Rosalia – Storelli, Antonietta – Cervellini, Gianfranco – Trenti, Tommaso 2012. Evaluation of NGALTest, a fully-automated neutrophil gelatinase-

associated lipocalin (NGAL) immunoassay on Beckman Coulter AU 5822. Clin Chem Lab Med 50 (9). 1581–84.

Malmström, Raija 2012. Suomen Lääkäri lehti 9/2012 v sk 67. Päivystyspotilaiden kii-reellisyysluokittelut Suomessa erilaiset kuin Ruotsissa. <http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/2012/nosto9_2.pdf>. Luettu 11.3.2013.

McPherson, Richard A. – Pincus, Mathew R. 2011. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22. painos. Philadelphia. SaundersElsevier.

Mellin, Ilkka 2006. Tilastolliset menetelmät: tilastolliset testit. TKK. Verkkodokumentti. <<http://math.aalto.fi/opetus/sovtoda/oppikirja/Testit.pdf>>. Luettu 26.05.2013.

Mishra, Jaya – Dent, Cathedrine – Tarabishi, Ridwan – Mitsnefes, Mark M – Ma, Qing – Kelly, Caitlin – Ruff, Stacey M – Zahedi, Kamyar – Shao, Mingyan – Bean, Judy – Mori, Kiyoshi – Barash, Jonathan, Devarajan Prasad 2005. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. Lancet 365. 1231–1238.

Mishra, Jaya – Ma, Qing – Prada, Anne – Mitsnefes, Mark – Zahedi, Kamyar – Yang, Jun – Barasch, Jonathan – Devarajan, Prasad 2003. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. J Am Soc Nephrol. 4. 2534–2543.

Mori, Kiyoshi – Lee, Thomas – Rapoport, Dana – Drexler, Ian R. – Foster, Kirk – Yang Jun – Schmidt-Ott, Kai M. ym .2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. The Journal of Clinical Investigation. 115(3.). 610–621.

Neilands, John B. 1995: Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. The Journal of Biological Chemistry 270(45.). 26723–26726.

Pervaiz, Syed – Brew, Keith 1987: Homology and structure –function correlations between alfa 1-glukoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. FASEB Journal 1. 209–214.

Safina, Asiya – Daminova, Maria 2012. Diagnostinen tarkoitus NGAL:n määrittäminen virtsassa vastasyntyneillä kriittisissä oloissa. Lastentaudit 6. 41–45.

Сафина, Асия – Даминова, Мария 2012. Диагностическое значение определения уровня липокалина-2, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой, в моче у новорожденных в критических состояниях. Педиатрия 6. 41–45.

Sarna, Seppo. 2007. Biostatistiikkaa lyhyesti. Verkkodokumentti. <<http://www.kttl.helsinki.fi/sarna/Biostatistiikkaa%20lyhyesti.pdf>> Luettu 16.10.2013.

Savolainen, Kari – Parviainen, Markku 2010. Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.). Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 65–66.

Schmidt-Ott, Kai M. – Mori, Kiyoshi – Yi Li, Jau – Kalandadze, Avtandil – Cohen, David J. – Devarajan, Prasad – Barasch, Jonathan 2007. Dual action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. Journal of American Society of Nephrology 18. 407–413.

Siloaho, Maritta – Elg, Peter – Leppänen, Esa – Loikkanen, Minna – Puukka, Raija – Ruopuro, Marja-Leena – Saarmala, Hannu 1997: Ohjeita mittaasepävarmuuden arvioimiseksi ja laskemiseksi kliinisen kemian laboratorioissa. Moodi 4. 196–203.

Sorto, Aira – Törmä, Ari – Kaihola, Hanna-Leena 1996. Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriossa. Sisäisen laadunohjauksen periaatteet. Moodi 5. 3–23.

Termien määritelmät 2009. Vieritestaus terveydenhuollossa. Labqualityn asiantuntijasuositus. Moodi 6. 318–320.

Vierimaa, Heidi – Laurila, Mirja 2010. Keho. Anatomia ja fysiologia. 1. painos. Helsinki. WSOYpro Oy.

Weber, Teddy 2000. Immunokemiallisen analytiikan preanalyttiset ongelmat. Moodi 6. 181.

Äkerman, Kari – Jokela, Hannu 2010. Fotometria. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.). Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandi-daattikustannus Oy. 54–58.

AIKATAULU

Työ suoritetaan aikataulun mukaisesti

Opinnäytetyön aikataulu

Opinnäytetyön vaiheet	Ajankohta
Aihe	5.2.2013
Opinnäytetyön aiheen jäsentely	21.2.2013
Lähdemateriaaliin tutustuminen	helmi-maaliskuu 2013
Työn suunnittelu	helmi-maaliskuu 2013
Määrittysten suoritus	3 ja 4 huhtikuu 2013
Raportin kirjoittaminen	huhti-lokakuu 2013
Opinnäytetyön tulosten hyödyntäminen ja kypsäysnäyte	marraskuu 2013

SWOT-analyysi

Vahvuudet	Heikkoudet
Aikaisemmat teoriaperustaidot Aikaisemmin laboratorioalan koulutus Korkea motivaatio oppia uutta ja kehittää itsensä	Kirjallisuus on pääosin englannin kielellä Ei ole kokemusta Modular -laitteen työkentelystä
Mahdollisuudet	Uhat
Osallistuminen uusiin merkkiaineen tutkimuksiin Kehittämään ammatilliset tiedot ja taidot	Ajan puute suunnitelmavaiheessa Elämän mahdolliset muutokset (esim. sairaudet)

ARCHITECT VIRTSAN NGAL TULOKSET JA MODULARIN SARJAN SISÄISEN TOISTETTAVUUDEN TULOKSET (Modular 1, Modular 2) sekä niiden keskiarvo (Mod ka).

	ARCHITECT	Modular1	Modular2	Mod ka
1	43	50	50	50
2	1347	1564	1616	1590
3	20	23	26	24,5
4	728	792	777	784,5
5	599	706	708	707
6	368	383	375	379
7	452	490	505	497,5
8	564	603	608	605,5
9	226	216	225	220,5
10	265	273	272	272,5
11	943	1018	996	1007
12	183	205	202	203,5
13	1110	1271	1235	1253
14	615	676	673	674,5
15	1951	1871	1883	1877
16	1959	2010	2036	2023
17	1067	1267	1255	1261
18	2030	2066	2115	2090,5
19	1322	1560	1494	1527
20	106	110	110	110
21	356	392	399	395,5
22	19	26	29	27,5
23	420	443	457	450
24	213	259	254	256,5
25	274	378	386	382
26	181	170	167	168,5
27	83	103	104	103,5
28	201	229	226	227,5
29	2102	2308	2367	2337,5
30	124	162	164	163
31	78	84	82	83
32	838	1045	1051	1048
33	196	193	188	190,5
34	223	221	221	221
35	332	404	409	406,5
36	124	150	151	150,5
37	1330	1644	1672	1658
38	90	101	101	101
39	2019	2127	2236	2181,5
40	723	815	814	814,5
41	372	414	412	413
42	139	173	172	172,5
43	10	11	12	11,5
44	15	19	19	19

45	10	13	12	12,5
46	10	15	12	13,5
47	113	114	114	114
48	367	423	414	418,5
49	1736	1780	1826	1803
50	602	786	794	790
51	34	34	38	36
52	21	23	21	22

Hylätyt NGAL:n tulokset (C<10µg/l)

Poistetut näytteet ARCHITECT	Modular1	Modular2	Mod ka	näyte- numero	
53	10	8	2	5	27
54	10	10	9	9,5	28
55	10	10	8	9	34
56	10	8	6	7	40
57	10	6	4	5	48
58	10	7	14	10,5	56
59	10	12	8	10	59

ARCHITECT - ja Modular -laitteiden mittaustulosten minimi-, maksimi- ja keskiarvot sekä poikkeama-arvot

Descriptive Statistics					
	N	Mini- mum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ARCHITECT	52	10	2102,00	562,5577	628,45660
Modular1	52	11,00	2308,00	619,4808	670,99170
Modular2	52	12,00	2367,00	624,7115	683,36949
modulka	52	11,50	2337,50	622,0962	677,09907
Valid N (listwise)	52				

SARJOJEN VÄLINEN TOISTUVUUS.

Modularin tasokontrolleja NGAL-Low, NGAL-High ja poolinäyte (Niisku) ajettiin 4 kk aikana.

Low ja High NGAL-kontrollien ja poolinäytteen NGAL:n arvot.

N	Low	High	Pooli, µg/l
1	237	497	141
2	237	508	126
3	213	473	107
4	222	499	109
5	224	555	115
6	214	478	114
7	194	477	114
8	200	476	114
9	209	496	114
10	208	497	113
11	213	502	114
12	208	506	106
13	210	508	117
14	211	501	114
15	213	516	118
16	212	499	116
17	222	522	118
18	211	518	118
19	215	515	118
20	228	523	119
21	222	548	114
22	224	516	112
23	212	524	112

REGRESSION

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	ARCHITECT ^b	.	Enter

- a. Dependent Variable: modulka
 b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,995 ^a	,990	,990	66,70084

- a. Predictors: (Constant), ARCHITECT

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	23159170,910	1	23159170,910	5205,475	,000 ^b
	Residual	222450,109	50	4449,002		
	Total	23381621,019	51			

- a. Dependent Variable: modulka
 b. Predictors: (Constant), ARCHITECT

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	18,887	12,468		1,515	,136
	ARCHITECT	1,072	,015	,995	72,149	,000

- a. Dependent Variable: modulka

KORRELAATIOT

Korrelaation tilastotaulukot.

Correlations

			ARCHITECT	Modular1	Modular2	modulka
Spearman's rho	ARCHITECT	Correlation Coefficient	1,000	,997**	,997**	,996**
		Sig. (2-tailed)	.	,000	,000	,000
		N	52	52	52	52
Modular1	Modular1	Correlation Coefficient	,997**	1,000	1,000**	1,000**
		Sig. (2-tailed)	,000	.	,000	,000
		N	52	52	52	52
Modular2	Modular2	Correlation Coefficient	,997**	1,000**	1,000	1,000**
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	.	,000
		N	52	52	52	52
modulka	modulka	Correlation Coefficient	,996**	1,000**	1,000**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	.
		N	52	52	52	52

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

		ARCHITECT	Modular1	Modular2	modulka
ARCHITECT	Pearson Correlation	1	,995**	,995**	,995**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	52	52	52	52
Modular1	Pearson Correlation	,995**	1	1,000**	1,000**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	52	52	52	52
Modular2	Pearson Correlation	,995**	1,000**	1	1,000**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000
	N	52	52	52	52
modulka	Pearson Correlation	,995**	1,000**	1,000**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	
	N	52	52	52	52

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

KOLMOGOROV-SMIRNOV TESTI.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		mittauseroAM
N		52
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	-59,5385
	Std. Deviation	80,15101
Most Extreme Differences	Absolute	,213
	Positive	,170
	Negative	-,213
Kolmogorov-Smirnov Z		1,535
Asymp. Sig. (2-tailed)		,018

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Normaalijakauma testi

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ARCHITECT	Modular1	Modular2	modulka
N		52	52	52	52
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	562,5577	619,4808	624,7115	622,0962
	Std. Deviation	628,45660	670,99170	683,36949	677,09907
Most Extreme Differences	Absolute	,215	,219	,217	,216
	Positive	,215	,219	,217	,216
	Negative	-,190	-,182	-,185	-,184
Kolmogorov-Smirnov Z		1,552	1,580	1,567	1,555
Asymp. Sig. (2-tailed)		,016	,014	,015	,016

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ARCHITECT p-arvo 0,016, Modularin keskiarvon p-arvo 0,016;

p-arvot ovat < 0,05.

Ei ole normaalijakauma.

T-TESTI

T-testilla oli tutkittu eroavatko NGAL:n tulosryhmien keskiarvot.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	ARCHITECT	562,5577	52	628,45660	87,15125
	modulka	622,0962	52	677,09907	93,89675

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	ARCHITECT & modulka	52	,995	,000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	ARCHITECT - modulka	-59,53846	80,15101	11,11495	-81,85265	-37,22428	-5,357	51	,000

