

Outi Salminen

Indiko-analyssaattorin GGT- ja AST- menetelmien mittausalueiden verifiointi eläinten viitearvoille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

23.10.2017

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Outi Salminen Indiko-analysaattorin GGT- ja AST-menetelmien mittausalueiden verifiointi eläinten viitearvoille 26 sivua + 2 liitettä 23.10.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	lehtori Hannele Pihlaja product manager Ville Vuorinen
<p>Gammaglutamyyli transferaasi (GGT) ja aspartaattiaminotransferaasi (AST) ovat maksan toimintaan liittyviä entsyymejä, joiden aktiivisuutta elimistössä voidaan mitata kineettisillä entsyymiaktiivisuusmittauksilla. GGT:n aktiivisuus lisääntyy tyypillisesti maksasairauksissa, erityisesti intra- ja ekstrahepaattisen sappistaasin, toisinaan myös haimatulehduksen yhteydessä. AST liittyy maksan soluvaurioihin. Sen aktiivisuus kohoaa useimmiten akuutissa maksavauriossa, joka voi olla seurausta esimerkiksi infektiosta, sappitietukoksesta tai myrkyllisistä yhdisteistä. GGT- ja AST-tasot määritetään seerumi- tai plasmanäytteistä.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli testata Thermo Fisher Scientificin kliinisen kemian analyyttorin Indiko GGT- ja AST-menetelmiä, jotka muokattiin eläinnäytteitä käsittelevien laboratorioden tarpeisiin. Menetelmien mittausalueet haluttiin muuttaa vastaamaan eläinten viitearvoja, joka toteutettiin säätämällä näyte-reagenssisuhdetta. Työn päämääränä oli selvittää, säilyykö testattavan menetelmän suorituskyky hyväksyttävällä tasolla myös menetelmään tehtyjen muutosten jälkeen. Määritettävät suorituskykyparametrit olivat lineaarisuus sekä toistettavuus.</p> <p>Hyväksymiskriteereinä variaatiokertoimen tuli olla alle 2,5 % toistettavuusmittauksissa, lineaarisuusmittauksissa ero suoran sovituksessa tuli olla $\pm 10\%$ tai 10 U/l mittausalueella. Nämä hyväksymiskriteerit täyttyivät molempien menetelmien kohdalla. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta sekä GGT- että AST-menetelmän suorituskyvyn säilyneen hyväksyttävällä tasolla menetelmiin tehtyjen muutosten jälkeen.</p>	
Avainsanat	Glutamyyli transferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, verifiointi, kliininen kemia, entsyymaattiset menetelmät

Author(s) Title Number of Pages Date	Outi Salminen Verification of measuring ranges for veterinary reference values of GGT- and AST-applications for the Indiko clinical chemistry analyzer 26 pages + 2 appendices 23 October 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, lecturer Ville Vuorinen, Product Manager
<p>Gammaglutamyltransferase (GGT) and aspartateaminotransferase (AST) are enzymes associated with liver function. The activity of these enzymes can be measured by kinetic enzyme assays. High GGT levels are typically a result of a liver disease, especially intra- and extrahepatic cholestasis, or occasionally pancreatitis. AST is associated with liver cell damage. AST levels are usually elevated in conjunction with acute liver failure, which can be a result of infection, cholestasis or toxic compounds. GGT and AST levels can be measured from plasma and serum.</p> <p>The purpose of the thesis was to test performance of modified GGT and AST applications for Thermo Fisher Scientific's clinical chemistry analyzer, the Indiko. These applications were developed to meet the requirements of veterinary laboratories. The measuring ranges were modified to correspond veterinary reference values by adjusting the sample-reagent ratio. The aim of the study was to find out if the performance of the test was on an acceptable level after the modification. Repeatability and linearity were being measured during the study.</p> <p>The acceptance criteria included a coefficient of variation under 2,5 % for the determination of repeatability and a bias $\pm 10\%$ or 10 U/l within the measuring range for the determination of linearity. Test acceptance criteria was fulfilled during the studies and the test results indicate that both GGT and AST application perform well after modification.</p>	
Keywords	Glutamyltransferase, aspartateaminotransferase, verification, clinical chemistry, enzyme assays

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Mittausmenetelmän luotettavuus	2
2.1	Verifiointi ja validointi	2
2.2	Suorituskykyparametrit	3
2.2.1	Mittausalue	3
2.2.2	Toistettavuus	4
3	Entsymaattiset menetelmät	5
3.1	Entsyymireaktioon vaikuttavat tekijät	7
3.2	Transferaasit	7
3.2.1	GGT ja AST	8
4	Opinnäytetyön tavoite, tarkoitus ja tutkimusongelmat	9
5	Toteutus	10
5.1	Työssä käytetyt menetelmät, laitteet ja reagenssit	11
5.1.1	Indiko	11
5.1.2	AST	12
5.1.3	GGT	13
5.1.4	Käytetyt reagenssit, kalibraattorit ja kontrollit	14
5.2	Työn suoritus	16
6	Tulokset	18
6.1	GGT_lowc tulokset	18
6.2	AST_horse tulokset	22
7	Tulosten yhteenveto ja pohdinta	24
	Lähteet	26
	Liitteet	
	Liite 1. GGT_lowc kalibrointi	
	Liite 2. AST_horse kalibrointi	

1 Johdanto

Maksan toiminnan häiriöiden ja vajaatoiminnan taustalla saattaa olla useita erilaisia syitä, joihin lukeutuvat esimerkiksi eräät hankinnaiset ja perinnölliset sairaudet, geneettiset häiriöt tai vieraiden aineiden joutuminen elimistöön. Maksan toiminta on keskeinen osa elimistön aineenvaihduntaa ja siten sen toiminnan muutokset näkyvät herkästi erilaisissa biokemiallisissa mittauksissa, jossa näytemateriaalina on veri. Gammaglutamyyli transferaasi (GGT) ja aspartaatti aminotransferaasi (AST) ovat maksan toimintaan liittyviä entsyymejä, joilla on tärkeä rooli maksan sairauksien diagnostiikassa. Näiden entsyymien aktiivisuutta elimistössä voidaan mitata kineettisillä entsyymiaktiivisuusmittauksilla. (McCord – Webb 2011; Niemelä – Pulkki 2010.)

GGT- ja AST-aktiivisuudet määritetään seerumi- tai plasmanäytteistä. Veri näytematriisina on ominaisuuksiltaan melko samankaltainen, oli tutkittavana eläin tai ihminen, mutta eläinnäytteisiin liittyy myös tiettyjä ominaispiirteitä. Veren hyytymisprosessit ovat eläimillä usein lyhytkestoisempia kuin ihmisellä, jolloin trombosyyttien kasautuminen ja hyytymien muodostuminen voivat vaikuttaa näytteen analyysikelpoisuuteen etenkin hematologisissa tutkimuksissa. Proteiinien määrät, erityisesti globuliinien pitoisuudet, ovat eläinten seerumi- ja plasmanäytteissä tyypillisesti korkeita. Eläimillä näytemäärät ovat usein myös hyvin pieniä, joka saattaa muodostaa näytteiden analysointiin omat haasteensa. (Klaassen 1999; Burthartsmeier 2007.)

Maksan fysiologia ja entsyymien puoliintumisajat vaihtelevat jossain määrin eläinkohdaisesti, joten laboratoriotuloksia tulkitaan hieman eri tavalla riippuen siitä, mikä eläin on tutkimuksen kohteena. GGT-arvot ovat eläinnäytteissä tyypillisesti 10-70 U/l, AST:n pitoisuudet puolestaan vaihtelevat 200-660 U/l välillä. Tämän työn tavoitteena oli testata Thermo Fisher Scientificin kliinisen kemian Indiko-analysaattorin GGT- ja AST-menetelmiä, jotka muokattiin eläinnäytteitä käsittelevien laboratorioiden tarpeisiin. Menetelmät kehitettiin vastaamaan eläinten viitearvoja edellä mainittujen analyyttien suhteen. Projektin käytännön toteutus ajoittui keväälle 2017, jolloin varsinaiset menetelmien verifointiin liittyvät testaukset suoritettiin: määritettävät suorituskykyparametrit olivat lineaarisuus sekä toistettavuus. Kirjallisen raportin kirjoittamista jatkettiin syksyille 2017. Opinnäytetyö toteutettiin kvantitatiivisena tutkimuksena. (Chapman – Hostutler 2013; Thermo Fisher Scientific 2017.)

2 Mittausmenetelmän luotettavuus

Laadunvarmistuksella pyritään takaamaan, että mittausmenetelmä tuottaa oikeita tuloksia. Tulosten oikeellisuus, eli mittaustulosten keskiarvon ja todellisen arvon välinen yhtäpitävyys, voidaan todentaa osoittamalla mittausjärjestelmän kyky tuottaa oikeita tuloksia kyseiselle näytetyypille ja pitoisuudelle. Mittausjärjestelmään luetaan analyysimenetelmän lisäksi näyte, mittalaite, mittaaja sekä mittausympäristö. Näitä osatekijöitä tulee seurata riittävästi mittauksen laadunvarmistamiseksi. Analyysituloksen tarkkuus ja mittauksen kokonaisvirhe voidaan määrittellä, kun mittauksiin liittyvä systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe ovat tiedossa. Systemaattinen virhe eli poikkeama (engl. *bias*) säilyy mittausta toistettaessa vakiona ja voi aiheutua esimerkiksi olosuhdevirheestä tai virheellisistä kalibrointiliuoksista. Satunnaisvirhe (engl. *random error*) vaihtelee mittausta toistettaessa ennustamattomalla tavalla ja on läsnä kaikissa analyyseissä. Sen vaikutusta voidaan pienentää muun muassa huolellisella työskentelyllä. (Jaari- nen – Niiranen 2005.)

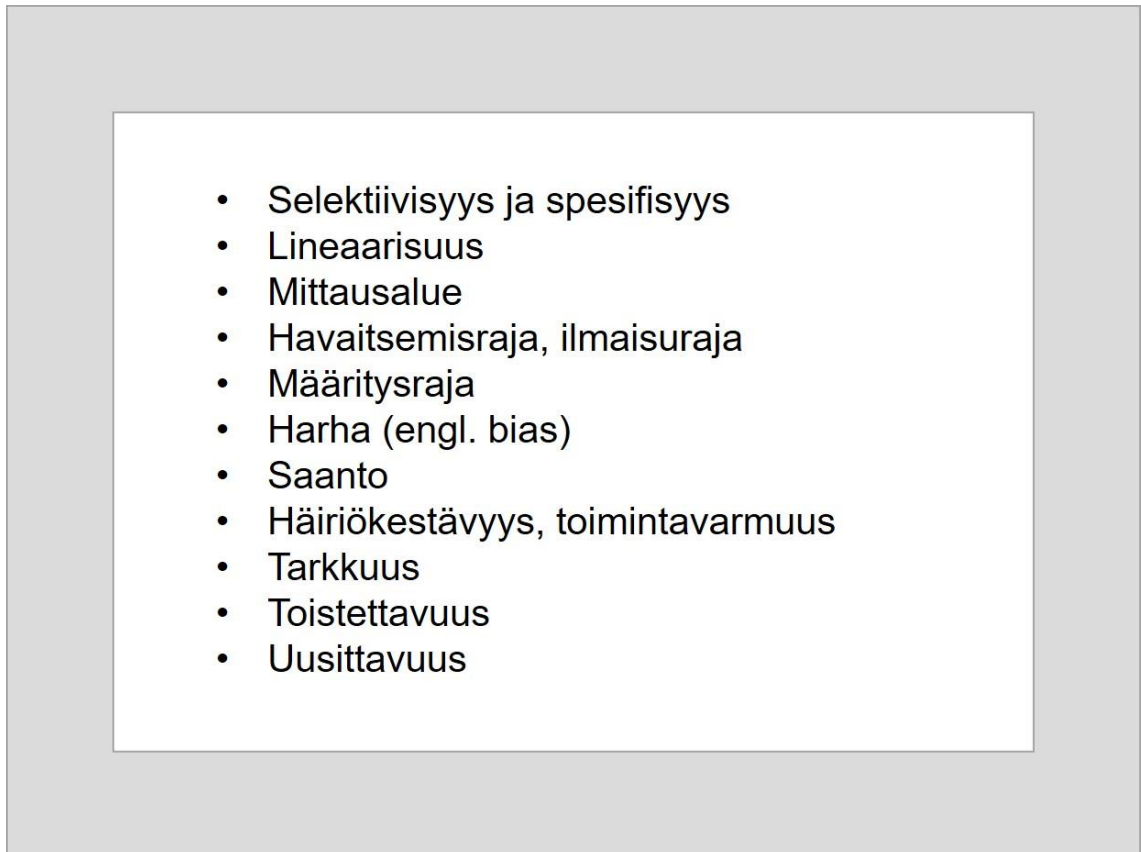
2.1 Verifiointi ja validointi

Verifiointi ja validointi ovat mittausmenetelmän luotettavuuteen liittyviä käsitteitä. Validointi on menettely, jolla varmistetaan että analyttinen menetelmä soveltuu suunniteltuun käyttötarkoitukseen. Validointi suoritetaan esimerkiksi kehitettäessä uutta menetelmää tiettyyn tarkoitukseen tai laajennettaessa menetelmän käyttötarkoitusta jollekin uudelle tutkimusalueelle. Validointiprosessin aikana arvioidaan mittausmenetelmän soveltuvuuden lisäksi menetelmän suorituskykyä tuottamalla vertailuarvoja mittausmenetelmän eri validointiparametreille. (Ehder 2005; Hägg 2016.)

Verifiointi on validointia suppeampi prosessi, jota käytetään esimerkiksi laajennettaessa jo ennestään validoidun menetelmän käyttöä toisenlaiselle näytematriisille. Verifiointi on objektiivisen näytön esittämistä siitä, että tietty kohde täyttää määritellyt vaatimukset. Laite- tai reagenssivalmistajan menetelmien, ohjeista muokattujen menetelmien ja valmiiden reagenssipakkauksien luotettavuuden osoittamiseen verifiointi on yleensä riittävä menettely. Myös kansainväliset ja kansalliset standardimenetelmät verifioidaan. Itse kehitetyille sisäisille menetelmille tulee suorittaa laajempi validointi. (Ehder 2005; Hägg 2016.)

2.2 Suorituskykyparametrit

Validointi ja verifiointi toteutetaan suorittamalla erilaisia mittaussarjoja, joilla selvitetään menetelmän suorituskykyparametrit. Näistä määritetään vähintään mittausalue ja toistettavuus. Mittausten tuloksena syntyvä tieto sekä tausta-aineisto kootaan ja niiden perusteella arvioidaan menetelmän luotettavuus. (Jaarinen – Niiranen 2005.)



Kuvio 1. Suorituskykyparametrit.

2.2.1 Mittausalue

Kliinisessä ja analyttisessä kemiassa mittausalueella tarkoitetaan yleensä menetelmän lineaarista mittausaluetta, laimennusrajaa tai analyttistä toiminta-aluetta. Mittausalue on siten se analyytin pitoisuusalue tai suureen vaihtelualue, jolla menetelmää voidaan käyttää sen käyttötarkoitukseen soveltuvalla tarkkuudella. Lineaarinen alue on menetelmän mittausalue, jolla analyytin vaste käyttäytyy lineaarisesti pitoisuuteen nähden. Useimmiten mittausalueeksi valitaan lineaarinen alue, jolloin pienimpänä pitoisuus-

tena on menetelmän luotettavasti saavutettava määrittäjäraja. Mittauksen lineaarisesta alueesta määritettäessä menetelmän toteutus- tai määrittäjäraja ovat mittausalueen alkupäässä rajoittavia tekijöitä ja loppupäässä mittalaitteen kyky havaita analyysin pitoisuuksien tai suureen muutoksia. (Ehder 2005; Hägg 2016.)

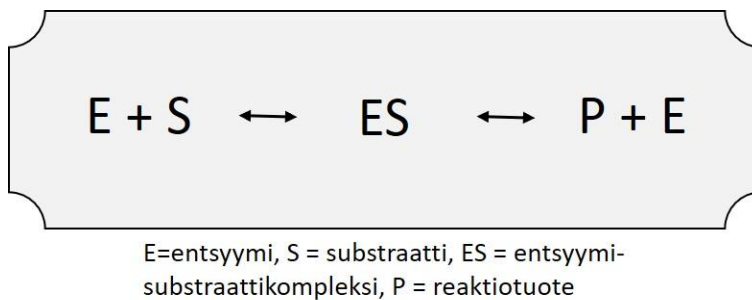
Mittausalueeksi voidaan valita myös suurempi alue kuin mittauksen lineaarinen alue, jos hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys saavutetaan epälineaarisella alueella. Luotettava mittausalue onkin yleensä laajempi kuin lineaarinen alue. Lineaarisuustutkimusten avulla määritetään samalla myös menetelmän luotettava mittausalue. Lineaarisuus määritetään kolmena toistona vähintään viidellä eripitoisella näytteellä, joiden pitoisuus kattaa vaadittavan mittausalueen. Lineaarisuus arvioidaan tulosten perusteella laaditusta regressiosuorasta, eli pienimmän neliösumman menetelmällä. Korrelaatiokerroin r kuvaa mittauspisteiden osumista lineaarisen regression avulla sovitetulle lineaarisuuskuvaajalle. Korrelaatiokerroimen arvo voi vaihdella -1 ja $+1$ välillä; mitä enemmän kerroin poikkeaa arvosta $+1$, sitä enemmän mittaukseen liittyy hajontaa tai epälineaarisuutta. Lineaarisuutta voidaan arvioida korrelaatiokerroimen ja selityskertoimen, eli korrelaatiokerroimen neliön, lisäksi residuaalien avulla. Residuaalit lasketaan mitattujen pisteiden ja pienimmän neliösumman menetelmällä laskettujen lineaarisuuskuvaajan pisteiden erotuksena. (Ehder 2005; Hägg 2016; Jaarinen – Niiranen 2005.)

2.2.2 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa täsmällisyyttä, joka saavutetaan kun määrittäykset tehdään samoissa olosuhteissa lyhyen aikavälin sisällä. Menetelmän toistettavuutta voidaan testata tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä erityyppisistä näytteistä erilaisilla pitoisuuksilla suunnitellun pitoisuusalueen alarajalla, keskivaiheilla sekä ylärajalla. Mittaussarjojen välinen hajonta on aina jossain määrin suurempi kuin mittaussarjojen sisäinen hajonta; mikäli mittaussarjojen välinen hajonta on merkittävästi suurempi kuin sarjojen sisäinen hajonta, syy vaihteluun tulisi selvittää. Toistettavuutta määritettäessä näytteistä lasketaan keskimääräinen pitoisuus, keskihajonta ja variaatiokerroin. Toistettavuuden testaus voidaan toteuttaa joko kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. (Ehder 2005; Hägg 2016; Jaarinen – Niiranen 2005.)

3 Entsymaattiset menetelmät

Entsyymit ovat proteiineja, jotka toimivat biokatalyytteinä kemiallisissa reaktioissa. Entsyymejä esiintyy kaikissa elimistön kudoksissa ja erilaisia entsyymimittauksia voidaan hyödyntää sairauksien diagnostiikassa ja seurannassa. Kliinisessä kemiassa käytetäänkin laajalti entsyymiaktiivisuusmäärittämiä, joille on annettu kansainväliset menetelmäsuositukset. Suositukset perustuvat reaktio-olosuhteiden optimointiin ja määrätyn lämpötilan käyttöön (37 °C), jolloin mittauksille saadaan eri laboratorioiden välisesti vertailukelpoisia tulostasoja. Entsyymiaktiivisuus määritetään reaktiokuvaajasta tietyllä aikavälillä reaktiossa kuluneen substraatin, muodostuneen lopputuotteen tai koentsyymin määrän muutoksen perusteella. Tämä määrä on verrannollinen entsyymin määrään, mikäli reaktiossa on ylimäärin substraattia tai koentsyymiä. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)



Kuvio 2. Entsyymireaktio.

Entsyymimäärittämissä hyödynnetään fotometriä seuraamalla reaktiota mitattavan aineen absorptiomaksimin alueella. Fotometriset mittaukset perustuvat valon läpäisevyyteen (transmittanssiin) tai imeytymiseen (absorptioon) väliaineessa. Fotometri koostuu pääpiirteissään säteilylähteestä, monokromaattorista, näyttilästä sekä valodetektorista. Säteilylähteen avulla mittauskyvetissä olevan näytteen läpi johdetaan valoa, josta monokromaattori erottelee halutun aallonpituuden. Kvantitatiivinen mittaus suoritetaan yleensä määritettävän analyytin absorptiomaksimin aallonpituudella, jolloin mitattavan aineen pitoisuus saadaan selville sen molaarisen absorptiviteetin avulla. Lambert Beerin lain mukaisesti absorboituneen valon määrä tietyllä aallonpituudella on lineaarisesti verrannollinen absorboivan aineen konsentraatioon:

$$A = \varepsilon b c,$$

jossa suure A on absorbanssi ja ε molaarinen absorptiokerroin. Suure b on säteilyn näytteessä kulkema matka ja c konsentraatio. Molaarinen absorptiokerroin on aallonpituuden funktio ja kullekin aineelle ominainen; mittaus suoritetaan yleensä analyytin absorptiomaksimin aallonpituudella, koska tällöin vähäinen epätarkkuus aallonpituudessa ei vaikuta merkittävästi mittaustuloksiin. (Niemelä – Pulkki 2010; Jaarinen – Niiranen 2005.)

Kliinisen kemian analyyseissä näytteestä johtuvat mittausta häiritsevät tekijät, esimerkiksi näytteen sameus tai hemolytyisyys, ovat suhteellisen yleisiä. Analyysiä häiritseviä tekijöitä pyritäänkin eliminoimaan käyttämällä mittauksissa sivuaallonpituuksia, jolloin voidaan vähentää tällä aallonpituudella saatu absorptiolukema absorptiomaksimin lukemasta. Entsyymiaktiivisuusmittausten tulokset ilmoitetaan yleisimmin mittayksikössä U/l. Kansainvälinen entsyymiyksikkö (U) on se entsyymimäärä, joka katalysoi yhden mikromoolin (μmol) substraattia minuutissa. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

Entsyymiaktiivisuusmittaukset voivat olla päätepistemittauksia tai kineettisiä mittauksia. Kineettisissä entsyymimäärityksissä reaktion aikana tehdään useita eri mittauksia tiettyjen aikaintervallien välein (useimmiten 30 tai 60 sekunnin) tai jatkuvana mittauksena. Päätepistemenetelmässä reaktio saatetaan siihen pisteeseen, että substraatti on kokonaan tai lähes kokonaan kulunut loppuun. Päätepistemittaus voidaan jakaa spesifiseen vaiheeseen ja varsinaiseen mittausvaiheeseen eli määrittelyyn kytkettyyn toiseen reaktioon, jota mitataan fotometrisesti ja jonka avulla määrittelyksen kvantitointi suoritetaan. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

Entsyymaattisten määritysten ongelmallisena puolena voidaan pitää sitä, että useimpien jotain tiettyä entsyymiä esiintyy elimistössä useassa eri kudoksessa; siten entsyymin aktiivisuuden tason nousun taustalla saattaa olla vaurio missä tahansa näistä kudoksista. Mittaamalla esimerkiksi kahden eri entsyymin aktiivisuutta voidaan kuitenkin saada tarkempaa tietoa vaurion sijainnista, sillä eri kudokset sisältävät entsyymejä erilaisessa mittasuhteessa. Toisaalta tietyt entsyymit esiintyvät jollekin kudokselle tyypillisenä vain tietyssä muodossa, isoentsyymeinä, jolloin niiden ominaisuudet saattavat erota esimerkiksi herkkyydessä lämpötilalle tai inhibiittoreille. (Bangert – Marshall 2008.)

3.1 Entsyymireaktioon vaikuttavat tekijät

Entsyymireaktioon vaikuttavia tekijöitä ovat entsyymikonsentraation ja lämpötilan lisäksi reaktioliuoksen pH, entsyymireaktioseoksessa läsnä olevat aktivaattorit ja inhibiittorit sekä koentsyymit. Entsyymien konsentraatio vaikuttaa reaktion nopeuteen: mitä enemmän reaktiossa on entsyymiä sitomassa substraattia, sen nopeammin reaktio etenee. Reaktioliuoksen pH on entsyymireaktion kannalta oleellinen tekijä, sillä entsyymit toimivat vain tietyllä pH-alueella. Jokaisella entsyymillä on oma entsyymikohtainen pH-optiminsa, mutta useimmilla entsyymeillä optimaalinen pH-alue sijaitsee kuitenkin välillä 7-8. Lämpötilan nostaminen lisää entsyymiaktiivisuutta noin kaksinkertaiseksi jokaisesta 10 °C:n nostoa kohden, kunnes entsyymi denaturoituu. Optimaalinen lämpötila entsyymien toiminnalle riippuu myös reaktion muista tekijöistä, kuten reaktion kokonaisajasta. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

Koentsyymit ja aktivaattorit voivat olla reaktion kannalta välttämättömiä aineita tai toimia vain reaktiota edistävinä tekijöinä. Koentsyymeihin kuuluvat esimerkiksi NAD ja NADP. Koentsyymit voivat toimia hapettumalla tai pelkistymällä, mutta ne voivat myös liittyä entsyymien inaktiiviseen muotoon, jolloin entsyymi aktivoituu: tämän tyyppistä koentsyymiä kutsutaan prosteettiseksi ryhmäksi. Reaktioliuoksen inhibiittorit ja aktivaattorit vaikuttavat reaktion kulkuun joko kiihdyttämällä tai hidastamalla reaktionopeutta. Mikäli reaktiossa on aktivaattoria ylimäärin, se saattaa alkaa toimia reaktiota inhiboivana tekijänä. Inhibiittorit ja aktivaattorit ovat pienimolekyyllisiä aineita tai ioneja, useimmiten metalleja tai epämetalleja, jotka vaikuttavat entsyymi-substraattikompleksin muodostumiseen sitoutumalla substraattiin tai entsyymiin. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

3.2 Transferaasit

Transferaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat entsyymireaktioissa jonkin kemiallisen ryhmän siirtoa substraatilta toiselle. Sekä GGT että AST lukeutuvat transferaasi-entsyymeihin. Näiden entsyymien aktiivisuuden mittaamista plasma- ja seeruminäytteistä käytetään pääasiassa maksasairauksien diagnostiikassa ja seurannassa. (Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

3.2.1 GGT ja AST

GGT eli gammaglutamyylitransferaasi toimii katalyyttinä glutamyyliryhmän siirrossa aminohapoille. Gammaglutamyylin luovuttaja on yleensä glutationi. GGT:n tarkkaa merkitystä ei tunneta, mutta sen uskotaan osallistuvan peptidien ja proteiinien synteesiin, aminohappojen siirtoon solukalvojen läpi sekä glutationitasojen säätelyyn kudoksissa. GGT on maksan toimintaan liittyvä entsyymi, jonka aktiivisuus lisääntyy maksasairauksissa, erityisesti intra- ja ekstrahepaattisen sappistaasin, toisinaan myös haimatulehduksen yhteydessä. GGT:tä esiintyy useissa kudoksissa, maksan lisäksi muun muassa sappiteiden seinämissä, sydämessä, munuaisissa ja haimassa, mutta seerumi- ja plasmanäytteistä mitattavat entsyymiaktiivisuudet ovat pääasiassa peräisin maksasta. Lihassoluissa GGT:tä ei esiinny. Vähäiset aktiivisuuden tason nousut saattavat liittyä rasvamaksaan tai lääkemyrkytyksiin. (Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001; Thermo Fisher 2016.)

AST eli aspartaattiaminotransferaasi katalysoi aminoryhmän siirtoa aspartaatilta α -ketoglutaraatille, pyridoksaalifosfaatti toimii reaktiossa koentsyyminä. Reaktiossa muodostuu oksaloasetaattia ja glutamaattia. Transaminaatiolla on merkittävä osuus aminohapposynteesissä ja -kataboliassa, joten sillä on tärkeä merkitys solunsisäisen aineenvaihdunnan kannalta. Sitruunahappokierto hapettaa reaktiossa muodostuneet ketohapot, toimien energianlähteenä. Maksasairauksien diagnostiikassa ja seurannassa hyödynnetään kahta aminotransferaaseihin kuuluvaa entsyymiä: aspartaattiaminotransferaasia ja ALT:ia eli alaniiniaminotransferaasia, jota esiintyy pääasiassa maksassa. (Bishop – Fody – Schoeff 2001; Bangert – Marshall 2008.)

AST liittyy maksan soluvaurioihin: sen aktiivisuus kohoaa tyypillisesti akuutissa maksavauriossa, joka voi olla seurausta esimerkiksi infektiosta, sappitietukoksesta tai myrkyllisistä yhdisteistä. AST:tä esiintyy elimistössä maksan lisäksi esimerkiksi sydänlihaskudoksessa ja luurankoliaksissa, mutta myös pienempinä määrinä munuaisissa, haimassa ja punasoluissa. Akuutin maksavaurion yhteydessä maksasolut turpoavat, jolloin osa soluista tuhoutuu ja maksaperäisten entsyymien pitoisuudet kasvavat verenkierrossa. Koska maksasolut sisältävät alaniiniaminotransferaasia enemmän kuin muut elimistön solut, AST/ALT-suhdetta voidaan hyödyntää maksan solujen sairauksien diagnostiikassa. (Bishop – Fody – Schoeff 2001; Niemelä – Pulkki 2010.)

GGT-tasot laskevat hetkellisesti syömisen jälkeen, joten näytteenoton ajoittaminen heti aterian jälkeen voi vaikuttaa vääristävästi tuloksiin. Punasoluissa ei ole GGT-entsyymiä, joten näytteen hemolyytisyys ei vaikuta sen suhteen tuloksiin, mutta on voimakkaasti AST:n määrittystä häiritsevä tekijä sillä se voi antaa virheellisen korkeita tuloksia. Seeruminäytteissä GGT-tasot pysyvät stabiilina viikon ajan 4 °C:ssa, AST-tasot neljän päivän ajan jääkaappilämpötilassa. (Ahmed – Blann 2014; Niemelä – Pulkki 2010; Bishop – Fody – Schoeff 2001.)

4 Opinnäytetyön tavoite, tarkoitus ja tutkimusongelmat

Indikon GGT- ja AST-menetelmien mittausalueet on määritetty vastaamaan Thermo Fisher Scientificin asiakkaiden kliinisiä tarpeita valitsemalla reaktio-olosuhteet siten, että mittauksen lineaarisuus, toistettavuus ja tarkkuus ovat mittausalueella hyväksyttävällä tasolla. Menetelmien mittausalueita haluttiin kuitenkin muokata vastaamaan myös eläinten viitearvoja, jotta ne soveltuisivat paremmin eläinnäytteitä käsittelevien laboratoriodien tarpeisiin. Taulukkoon 1 on merkitty punaisella ne arvot, joiden kohdalla eläinten viitearvot joko ylittävät tai alittavat analyttisen mittausalueen: hevosten viitearvot ylittävät AST-menetelmän analyttisen mittausalueen ylärajan, GGT:n osalta hevosilla, koirilla ja kissoilla viitearvot jäävät nykyisen mittausrajan alapuolelle. (Thermo Fisher Scientific 2017).

Taulukko 1. Menetelmien mittausalueet ja viitearvot.

	AST		GGT		Yksikkö
	Alaraja	Yläraja	Alaraja	Yläraja	
Analyttinen mittausalue	4	350	15	600	U/l
Laajennettu mittausalue	4	2100	15	6000	U/l
Viitearvot, hevonen	200	660	10	70	U/l
Viitearvot, kissa	15	62	-	10	U/l
Viitearvot, koira	10	57	-	11	U/l

Menetelmän mittausaluetta voidaan muuttaa säätämällä testiparametreista näytetilavuutta, jota kasvattamalla mittausalueen alarajaa saadaan alhaisemmaksi. Jos mittausaluetta halutaan muuttaa ylärajan suhteen, näytetilavuutta pienennetään. Menetelmään tehtyjen muutosten jälkeen menetelmän suorituskykyä mitataan testaamalla menetelmän lineaarisuutta, reaktiokinetiikkaa ja toistettavuutta. Opinnäytetyön tavoit-

teena on selvittää, säilyykö testattavien menetelmien suorituskyky hyväksyttävällä tasolla myös menetelmään tehtyjen muutosten jälkeen.

Tutkimuskysymykset ovat seuraavat:

1. Voidaanko nykyisen menetelmän mittausaluetta muuttaa vastaamaan viitearvoja siten, että menetelmän suorituskyky säilyy hyväksyttävällä tasolla?
2. Ovatko menetelmän lineaarisuus ja toistettavuus hyväksyttävissä rajoissa?

5 Toteutus

Testaukset suoritettiin keväällä 2017 maaliskuun aikana Thermo Fisher Scientificin tiloissa Vantaalla. Ensimmäinen projektiin liittyvä tapaaminen oli viikolla 8, jolloin sovittiin muun muassa alustavasti aikatauluista ja muista työn toteutukseen liittyvistä käytännön asioista. Projekti aloitettiin viikolla 10 kahden päivän mittaisella perehdytysjakolla. Perehdytyksen jälkeen aloitettiin varsinaiset testaukset, joiden oli määrä valmistua viimeistään viikolla 13. Mittaukset saatiin tehtyä suunnitellun aikataulun mukaisesti.

Taulukko 2. Projektin aikataulu.

Projektin aikataulu	
14.3.2017	GGT kalibrointi
15.3.2017	GGT laimennussarjojen suunnittelu
16.3.2017	GGT laimennussarjojen suunnittelu ja 100%-liuoksen valmistaminen
17.3.2017	GGT laimennussarjojen valmistaminen ja lineaarisuuden mittaaminen (11 tasoa)
20.3.2017	GGT laimennussarjojen valmistaminen ja lineaarisuuden mittaaminen (5 tasoa), toistettavuuden mittaaminen
22.3.2017	AST kalibrointi
23.3.2017	AST toistettavuuden mittaaminen
24.3.2017	AST laimennussarjojen suunnittelu
27.3.2017	AST laimennussarjojen valmistaminen ja lineaarisuuden mittaaminen

5.1 Työssä käytetyt menetelmät, laitteet ja reagenssit

Kaikki mittaukset suoritettiin Thermo Fisherin tiloissa reagenssituotannon-laboratoriossa Indiko-analyssaattorilla (86310000020), jonka toimintakyky varmistettiin ajamalla kontrolli- ja hajontanäytteet ennen verifiointiin liittyvien testausten aloittamista. Menetelmien testiparametrejä muutettiin näytetilavuuden suhteen. Muokatut menetelmät nimettiin AST_horse ja GGT_lowc.

5.1.1 Indiko

Indiko on klinisen kemian analysaattori, jolla voidaan suorittaa fotometrisiä mittauksia. Analysoitava näytemateriaali voi olla kokoverta, seerumia, plasmaa, virtsaa, sylkeä tai likvoria. Laitteella voidaan lisäksi määrittää elektrolyyttejä ionispesifisten elektrodien yksiköllä (ISE) seerumista tai plasmasta. Yleisimpien klinisen kemian tutkimusten lisäksi laitteella voidaan suorittaa immunokemiallisia- ja lääkeainetutkimuksia. (Thermo Fisher Scientific 2016.)



Kuvio 3. Indiko-analyssaattori. (Thermo Fisher Scientific 2017).

Analysaattori käyttää mittaamenetelmänä turbidometriaa tai kolorimetriaa. Mittaus suoritetaan 37 °C:n lämpötilassa ja laitteella voidaan tehdä sekä kineettisiä- että päätepistemittauksia. Kineettisissä mittauksissa mittaustyyppiä voidaan valita linear tai linear cut, jolloin tulosten laskemisessa huomioidaan vain kuvaajan lineaarinen alue. Analysaattori mittaa näytteestä absorbanssia tai absorbanssin muutosta minuutissa. Mittaus voidaan tehdä yhdellä aallonpituudella tai pääaallonpituuden lisäksi voidaan käyttää sivuaallonpituutta. Injektoitava näytetilavuus on 2-120 µl ja reaktion lopputilavuus 120-300 µl. Analysaattori annostelee näytteen extratilavuudella vettä tai näytettä, jonka tilavuudeksi voidaan asettaa 0-120 µl. Laite annostelee myös reagenssin extratilavuudella. Analysaattorilla voidaan tehdä näytteelle automaattinen esilaimennos ja tarvittaessa laimennusrajan ylittyessä automaattinen laimennos ja uudelleenajo. (Thermo Fisher Scientific 2016.)



Kuvio 4. Näytteiden lataaminen Indikoon. (Thermo Fisher Scientific 2017).

5.1.2 AST

AST-mittaus on kineettinen entsyymiaktiivisuusmääritys. Reaktiossa aspartaattiaminotransferaasi toimii katalyyttinä aminoryhmän siirrossa aspartaatilta ketoglutaaraatille,

jolloin muodostuu glutamaattia ja oksaloasetaattia. Oksaloasetaatti pelkistyy malaatiksi malaattidehydrogenaasi-entsyymien vaikutuksesta. Menetelmässä mitataan koentsyymi NADH:n määrää, joka hapettuu reaktiossa NAD:ksi ja jonka väheneminen on verrannollinen näytteen AST-aktiivisuuteen. Mittaus suoritetaan aallonpituudella 340 nm ja reaktion suunta on laskeva. Tulokset lasketaan teoreettisen faktorin avulla. Menetelmässä voidaan käyttää kalibrointiin myös eCal-kalibraattoria, jolloin saadaan lineaarinen kalibraatiokuvaaja. Mittaus on 9 pisteen mittaus ja mittausaika 240 sekuntia. AST-aktiivisuus voidaan mitata seerumi- tai plasmanäytteistä. AST_horse-menetelmässä näytetilavuutta muutettiin taulukon 3 mukaisesti. (Thermo Fisher Scientific 2014).

Taulukko 3. AST-menetelmän pääparametrit.

	AST (clinical)	AST (vet)
Reagenssitilavuus	125 µl + 20 µl extra	125 µl + 20 µl extra
Ink.	400 s	400 s
Näytetilavuus	15 µl + 15 µl extra	5 µl + 10 µl extra
Ink.	120 s	120 s
Mittautyyppi	Kineettinen, linear cut	Kineettinen, linear cut
Mittausaallonpituus	340 nm	340 nm
Mittausaika	240 s	240 s
Aikaintervallit/kesto	9/27 s	9/27 s
Mittausalue	4-350 U/l	20-1050 U/l
Laimennusraja	350 U/l	1050 U/l
Laajennettu mittausalue	4-2100 U/l	20-6300 U/l

5.1.3 GGT

GGT-mittaus on kineettinen entsyymiaktiivisuusmääritys, jossa reaktion suunta on nouseva. Reaktiossa gammaglutamyylitransferaasi toimii katalyyttinä glutamiinihapon siirrossa glysyyliglysiinille, jolloin vapautuu 5-amino-2-nitrobentsoattia. Menetelmässä mitataan entsyymireaktion lopputuotetta eli 5-amino-2-nitrobentsoattia, jonka määrä on suoraan verrannollinen näytteen GGT-aktiivisuuteen. Mittaus suoritetaan aallonpituudella 405 nm, sivuaallonpituutta ei käytetä. Tulokset lasketaan teoreettisen faktorin avulla tai kalibrointiin käytetään eCal-kalibraattoria. Kalibraatiokuvaaja on lineaarinen. Määritys voidaan tehdä seeruminäytteistä tai hepariiniputken otetuista plasmanäytteistä. Mittaus on 7 pisteen mittaus ja mittausaika 120 sekuntia. Menetelmää muokattiin taulukon 4 mukaisesti säätämällä näytetilavuutta. (Thermo Fisher Scientific 2016.)

Taulukko 4. GGT-menetelmän pääparametrit.

	GGT (clinical)	GGT (vet)
Reagenssitilavuus	120 µl + 20 µl extra	120 µl + 20 µl extra
Ink.	400 s	400 s
Näytetilavuus	12 µl + 10 µl extra	24 µl + 20 µl extra
Ink.	120 s	120 s
Mittaustyyppi	Kineettinen, linear cut	Kineettinen, linear cut
Mittausaallonpituus	405 nm	405 nm
Mittausaika	120 s	120 s
Aikaintervallit/kesto	7/18 s	7/18 s
Mittausalue	15-600 U/l	7-300 U/l
Laimennusraja	600 U/l	300 U/l
Laajennettu mittausalue	15-6000 U/l	7-3000 U/l

5.1.4 Käytetyt reagenssit, kalibraattorit ja kontrollit

AST:n mittauksessa voidaan käyttää 1-reagenssin tai 3-reagenssin menetelmää. Tässä työssä mittaukset tehtiin 1-reagenssin menetelmällä, joka 3-reagenssin menetelmästä poiketen ei sisällä pyridoksaali-5'-fosfaattia. Sekä AST- että GGT-menetelmässä käytettävä reagenssi valmistettiin yhdistämällä kyseisen kitin reagenssipullo B:n sisältö reagenssipulloon A. Reagenssien koostumus on kuvattu taulukoissa 5 ja taulukossa 6.

Taulukko 5. AST-reagenssi A:n ja B:n koostumus.

AST Reagenssi A		AST Reagenssi B	
Tris-puskuri, pH 7.8	110 mmol/l	α-Ketoglutaarihappo	65 mmol/l
L-aspartaatti	325 mmol/l	NADH	1,0 mmol/l
Laktaattidehydrogenaasi	>810 U/l	Natriumatsidi	<0,1 %
Malaattidehydrogenaasi	>810 U/l		
Natriumatsidi	<0,1 %		

Taulukko 6. GGT-reagenssi A:n ja B:n koostumus.

GGT Reagenssi A		GGT Reagenssi B	
Glysyyliglysiini	206 mmol/l	L-γ-glutamyyli-3-karboksyyl-4-nitroaniiliini	33 mmol/l
Natriumatsidi	<0,1 %	Natriumatsidi	<0,1 %
Tris-puskuri, pH 8.3	<5 %		

Kalibrointiin käytettiin eCal-kalibraattoria, joka liuotettiin 3 ml:aan ionivaihdettua vettä. Toistettavuuden määrittämisessä näytteinä käytettiin matalan tason Nortrol- sekä korkean tason Abtrol-kontrollinäytteitä; kontrollit valmistettiin liuottamalla ne 5 ml:aan ionivaihdettua vettä. Ennen lineaarisuusmittauksia sulatettiin laimennussarjojen valmistuksessa käytetyt spike-näytteet (ref. G2751-1kU ja G9270-100UN), jotka oli liuotettu ennen pakastamista 0,9 % NaCl-liuokseen. Reagensseja ja näytteitä säilytettiin mittausajan jääkaapissa 2-8 °C:n lämpötilassa.

Taulukko 7. Testauksissa käytetyt reagenssit, kalibraattorit ja näytteet.

	REF	LOT	Exp.	Valmistaja
AST (reagenssi)	981771	N073	2017-11	Thermo Fisher Scientific
GGT (reagenssi)	981377	N070	2017-12	Thermo Fisher Scientific
eCal	981830	M655F	2018-10	Thermo Fisher Scientific
Abtrol	981044	L260Y	2018-02	Thermo Fisher Scientific
Nortrol	981043	L680V	2018-02	Thermo Fisher Scientific
Glutamic-oxalacetic-transaminase from porcine heart	G2751-1kU	069K003	Ei ilmoitettu, säilytys -70°C	Sigma-Aldrich
GGT type VI	G9270-100UN	064H9504	Ei ilmoitettu, säilytys -70°C	Sigma-Aldrich

5.2 Työn suoritus

Testaukset suoritettiin ensin GGT_lowc-menetelmälle. Kalibrointi suoritettiin eCal-kalibraattorilla ja se toistettiin kolme kertaa (liite 1). Onnistuneen kalibroinnin jälkeen toistettavuus määritettiin Nortrol- ja Abtrol-kontrollinäytteillä, jotka nimettiin samplelow1 ja samplehigh1. Molempien tason kontrolleista tehtiin yhteensä 20 määritystä (n=40). Toistettavuusmittausten tulokset käsiteltiin Excel-ohjelmassa, jossa tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin.

Lineaarisuuden määrittämistä varten valmistettiin taulukon 8 mukaiset laimennussarjat spike-näytteestä. GGT_lowc-menetelmän lineaarisuuden tarkastelua varten valmistettiin sekä 11 tasoa että 5 tasoa sisältäneet laimennussarjat, sillä lineaarisuutta haluttiin tarkastella myös pienemmillä pitoisuuksilla. Laimennussarjojen suunnittelussa korkein taso pyrittiin saamaan 10-20 % yli odotetun laimennusrajan ja matalin taso 20 % halutun mitta-alueen alle. Ennen laimennussarjojen suunnittelua mitattiin spike-näytteen konsentraatio ja tulosten perusteella laskettiin 0%- ja 100%-liuokseen pipetoitava näyteliuoksen tilavuus. 0%- ja 100%-liuosten valmistamisen jälkeen näiden liuosten konsentraatiot vielä mitattiin, jotta voitiin varmistaa niiden olevan halutulla tasolla. Laimennussarjat valmistettiin pipetoimalla liuoksia 1:1 taulukon 8 mukaisesti, kutakin liuosta tarvittava tilavuus on listattu taulukossa 9. Jokaisesta näytteestä ajettiin neljä rinnakkaismääritystä (n=64).

Taulukko 8. GGT_lowc, 11 tason laimennussarja.

Std	%	L	p1	H	p2	c (U/l)
1	0	0	1	0	1	0
2	3,125	0	1	6,25	1	10
3	6,25	0	1	12,5	1	20
4	12,5	0	1	25	1	40
5	25	0	1	50	1	80
6	37,5	25	1	50	1	120
7	50	0	1	100	1	160
8	62,5	50	1	75	1	200
9	75	50	1	100	1	240
10	87,5	75	1	100	1	280
11	100	100	1	100	1	320

Taulukko 9. 11 tason laimennussarja, tarvittavat liuostilavuudet mikrolitroina.

Std	%	A		B	
		l	n	ll	Tot
1	0	500	5	1250	1750
2	3,125	500	0	0	500
3	6,25	500	1	250	750
4	12,5	500	1	250	750
5	25	500	2	500	1000
6	37,5	500	0	0	500
7	50	500	4	1000	1500
8	62,5	500	0	0	500
9	75	500	2	500	1000
10	87,5	500	0	0	500
11	100	500	5	1250	1750

Taulukko 10. GGT_lowc, 5 tason laimennussarja.

Std	%	L	p1	H	p2	c (U/l)
1	0	0	1	0	1	5
2	25	0	1	50	1	8,6
3	50	0	1	100	1	12,5
4	75	50	1	100	1	16,3
5	100	100	1	100	1	20

Taulukko 11. GGT_lowc, 5 tason laimennussarja, tarvittavat liuostilavuudet mikrolitroina.

Std	%	A		B	
		l	n	ll	Tot
1	0	500	4	1000	1500
2	25	500	0	0	500
3	50	500	2	500	1000
4	75	500	0	0	500
5	100	500	4	1000	1500

AST_horse-menetelmän kohdalla kalibrointi (liite 2) ja toistettavuuden mittaaminen suoritettiin vastaavasti kuten GGT_lowc-menetelmän kohdalla. Matalan tason kontrolli nimettiin samplelow01 ja korkean tason kontrolli samplehigh01. AST_horse-menetelmän laimennussarja käsitti 11 eri tasoa (taulukko 12), joista jokaisesta tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä (n=44). Laimennussarjat suunniteltiin samalla periaatteella kuten edellä.

Lineaarisuusmittauksista saadut tulokset taulukoitiin Excelissä ja niistä laadittiin regressiosuora. Tuloksille laskettiin lisäksi keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin.

Taulukko 12. AST_horse laimennussarja.

Std	%	L	p1	H	p2	c (U/l)
1	0	0	1	0	1	20
2	3,125	0	1	6,25	1	57
3	6,25	0	1	12,5	1	94
4	12,5	0	1	25	1	168
5	25	0	1	50	1	315
6	37,5	25	1	50	1	463
7	50	0	1	100	1	610
8	62,5	50	1	75	1	758
9	75	50	1	100	1	905
10	87,5	75	1	100	1	1053
11	100	100	1	100	1	1200

6 Tulokset

Mittausten tulokset taulukoitiin ja käsiteltiin tilastollisin menetelmin Excel-ohjelmassa. Tulosten hyväksymiskriteereinä variaatiokertoimen tuli olla alle 2,5 % toistettavuusmittauksissa, lineaarisuusmittauksissa ero suoran sovituksessa sai olla enintään 10% tai 10 U/l mittausalueella.

6.1 GGT_lowc tulokset

GGT_lowc-menetelmän toistettavuutta testaavan mittaussarjan alemman tason kontrollin (samplelow1) tulosten keskiarvoksi saatiin 48,69 U/l. Kontrollille ilmoitettu pitoisuus oli 48 U/l. Keskihajonta alemman tason kontrollilla oli 0,408 ja variaatiokerroin 0,84%. Ylemmän tason kontrollin (samplehigh1) tulosten keskiarvo oli 145,28 U/l, ilmoitettu pitoisuus 145 U/l. Keskihajonta ylemmän tason kontrollilla oli 0,729 ja variaatiokerroin 0,50 %.

Taulukko 13. GGT_lowc toistettavuus.

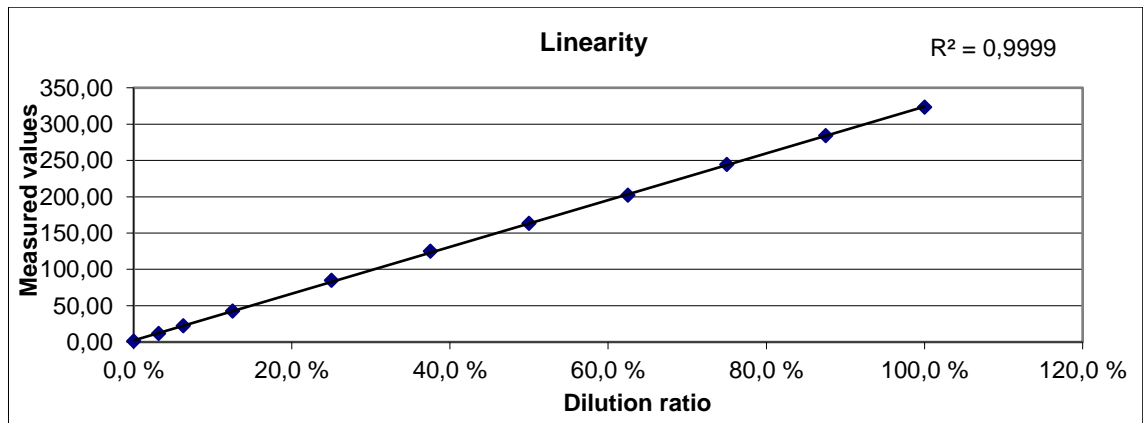
	samplelow1	samplehigh1
	49,24	144,26
	48,87	145,19
	48,69	144,59
	48,66	145,61
	49,69	145,08
	47,84	145,07
	49,26	145,65
	48,66	146,15
	48,78	144,95
	48,72	145,32
	48,54	145,80
	48,51	144,97
	48,16	145,97
	48,46	145,60
	48,79	145,83
	48,60	146,79
	49,00	144,63
	48,52	143,44
	48,39	145,47
	48,32	145,32
n	20	20
ka	48,69	145,28
SD	0,408	0,729
CV%	0,84 %	0,50 %

GGT_lowc-menetelmän lineaarisuuden määrittämistä varten valmistettiin ensin 11 tason laimennussarja mitta-alueella 0-320 U/l. Taulukkoon 14 on koottu mittauksista saadut tulokset. Tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin sekä ennustettu arvo. Lisäksi laskettiin residuaalit ja recovery%, eli mittaustuloksen vastaavuus ennustemalliin.

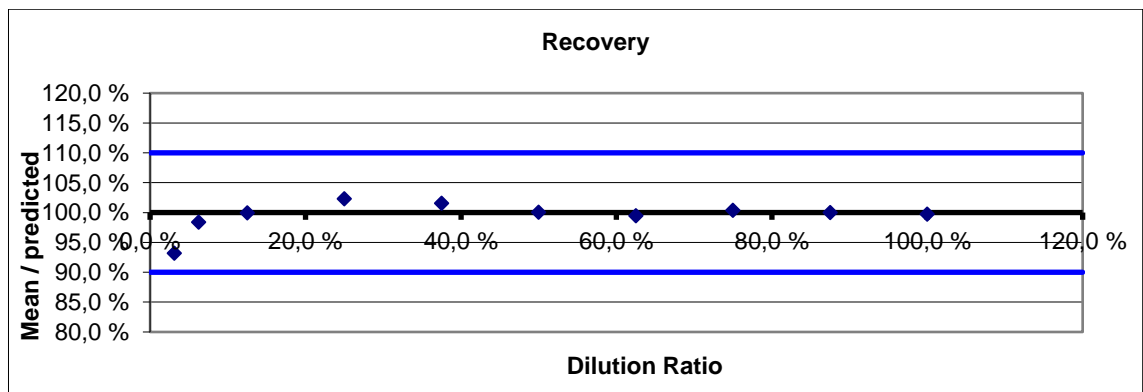
Taulukko 14. GGT_lowc 11 tason laimennussarjan lineaarisuusmittausten tulokset.

Percent Dilution	Dil.ratio	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Mean	SD	CV%	Predicted	Δ Measured Mean - Predicted	Recovery-% (Mean/Predicted)
0,0 %	0,000	0,90	1,23	1,16	0,96	1,06	0,157	14,8 %	2,24	-1,18	47,3 %
3,1 %	0,031	11,55	11,41	11,53	11,39	11,47	0,082	0,7 %	12,32	-0,84	93,2 %
6,3 %	0,063	21,95	21,82	22,01	22,20	21,99	0,158	0,7 %	22,36	-0,36	98,4 %
12,5 %	0,125	42,17	42,28	42,57	42,76	42,45	0,268	0,6 %	42,47	-0,02	99,9 %
25,0 %	0,250	84,38	84,82	84,41	84,74	84,59	0,226	0,3 %	82,70	1,89	102,3 %
37,5 %	0,375	124,59	124,64	125,33	124,60	124,79	0,363	0,3 %	122,92	1,86	101,5 %
50,0 %	0,500	163,74	162,67	163,07	163,21	163,17	0,445	0,3 %	163,15	0,02	100,0 %
62,5 %	0,625	201,90	203,13	201,93	201,84	202,20	0,622	0,3 %	203,38	-1,18	99,4 %
75,0 %	0,750	245,18	245,52	243,89	243,12	244,43	1,118	0,5 %	243,60	0,82	100,3 %
87,5 %	0,875	281,45	284,70	284,51	284,54	283,80	1,569	0,6 %	283,83	-0,03	100,0 %
100,0 %	1,000	324,49	321,36	322,38	324,06	323,07	1,462	0,5 %	324,06	-0,99	99,7 %

Tulosten perusteella laadittiin myös lineaarisuuskuvaaja, jonka korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9999 (kuvio 5).



Kuvio 5. GGT_lowc 11 tason laimennussarjan lineaarisuuskuvaaja.



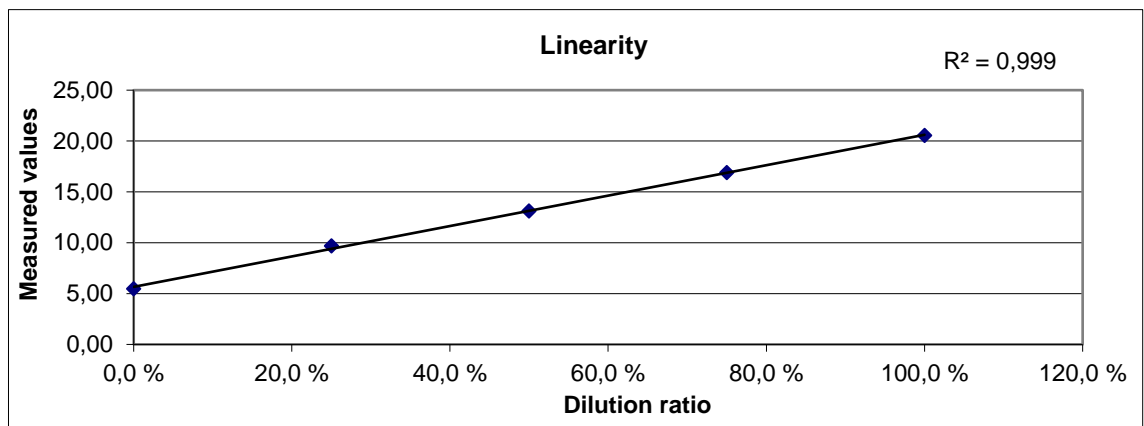
Kuvio 6. GGT_lowc 11 tason laimennussarja, recovery%.

Ero suoran sovituksessa ylitti alimmalla pitoisuudella 10%. Linearisuutta haluttiin tarkastella vielä tarkemmin pienemmillä pitoisuuksilla, joten valmistettiin 5 tasoa sisältänyt laimennussarja (5-20 U/l). Näiden mittausten tulokset taulukoitiin (taulukko 15).

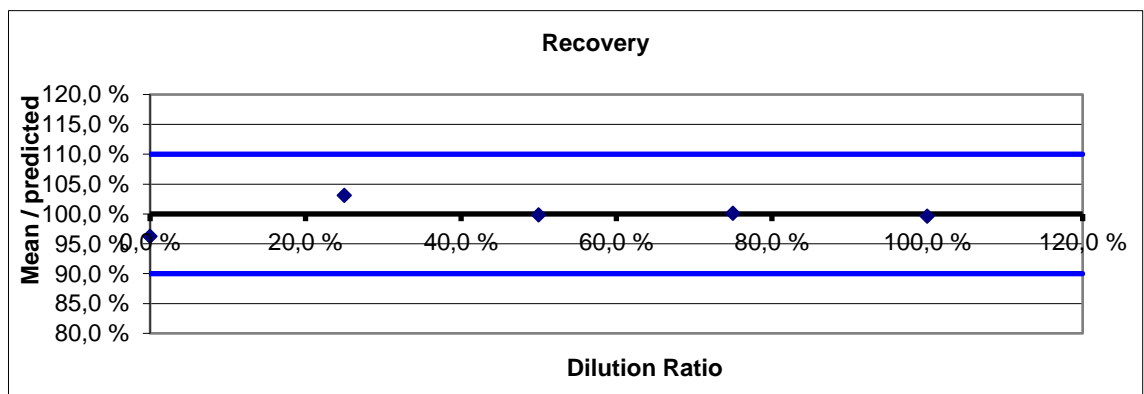
Taulukko 15. GGT_lowc 5 tason laimennussarjan lineaarisuusmittausten tulokset.

Percent Dilution	Dil.ratio	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Mean	SD	CV%	Predicted	Δ Measured Mean - Predicted	Recovery-% (Mean/Predicted)
0,0 %	0,000	5,61	5,39	5,42	5,38	5,45	0,108	2,0 %	5,66	-0,21	96,3 %
25,0 %	0,250	9,48	9,50	9,60	10,18	9,69	0,332	3,4 %	9,40	0,29	103,1 %
50,0 %	0,500	12,83	13,12	13,38	13,12	13,11	0,226	1,7 %	13,14	-0,02	99,8 %
75,0 %	0,750	16,85	16,84	16,83	17,05	16,89	0,107	0,6 %	16,87	0,02	100,1 %
100,0 %	1,000	20,99	20,39	20,52	20,24	20,54	0,325	1,6 %	20,61	-0,07	99,6 %

5 tason laimennussarjasta saatujen tulosten perusteella laadittiin vielä lineaarisuuskuvaaja, jonka korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,999 (kuvio 7).



Kuvio 7. GGT_lowc 5 tason lineaarisuuskuvaaja.



Kuvio 8. GGT_lowc 5 tason laimennussarja, recovery%.

Kuvioon 8 on kuvattu recovery% pienemmillä pitoisuuksilla. Ero suoran sovituksessa on alle 10%.

6.2 AST_horse tulokset

AST_horse-menetelmän toistettavuutta testatessa alemman tason kontrollin (samplelow01) tulosten keskiarvo oli 50,89 U/l, ilmoitettu pitoisuus kontrollille oli 50 U/l. Keskihajonta tälle sarjalle oli 0,950 ja variaatiokerroin 1,87%. Ylemmän tason kontrollille (samplehigh01) keskiarvoksi saatiin 171,50 U/l, keskihajonnaksi 1,310 ja variaatiokerroimeksi 0,76%. Kontrollin ilmoitettu pitoisuus oli 171 U/l.

Taulukko 16. AST_horse toistettavuus.

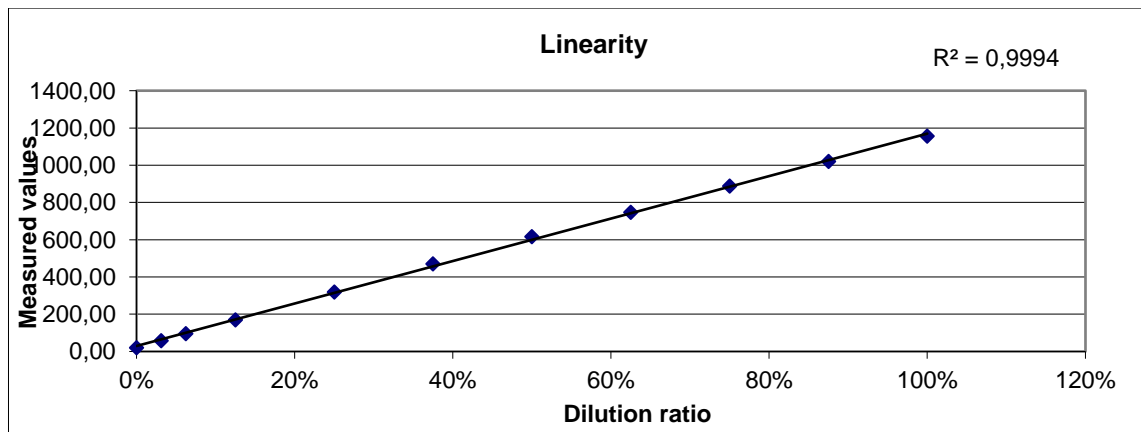
	samplelow01	samplehigh01
	53,22	172,73
	50,65	171,83
	50,82	171,51
	50,47	170,44
	51,09	170,64
	50,75	170,60
	50,26	172,42
	50,26	173,71
	50,71	173,69
	51,62	171,72
	50,34	170,85
	49,99	170,21
	49,03	170,90
	50,50	170,76
	49,83	172,14
	51,04	172,57
	52,18	173,43
	51,83	170,29
	51,12	168,73
	52,15	170,88
n	20	20
ka	50,89	171,50
SD	0,950	1,310
CV%	1,87 %	0,76 %

AST_horse-menetelmän lineaarisuus määritettiin valmistamalla laimennussarja, joka sisälsi 11 tasoa. Laimennussarjan liuosten pitoisuus pyrittiin saamaan alueelle 20-1200 U/l. Mittausten tulokset taulukoitiin (taulukko 17).

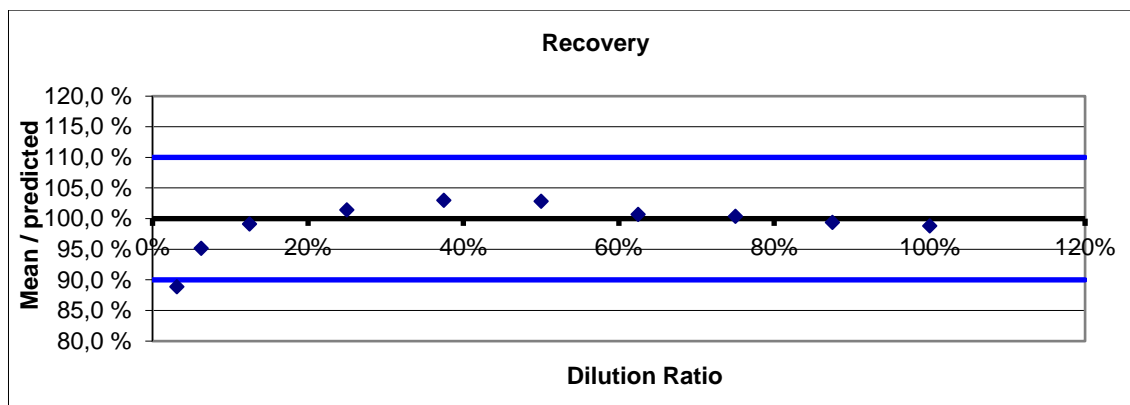
Taulukko 17. AST_horse lineaarisuusmittausten tulokset.

Percent Dilution	Dil.ratio	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Mean	SD	CV%	Predicted	Δ Measured Mean - Predicted	Recovery-% (Mean/Predicted)
0 %	0,000	20,096	19,856	20,126	20,29	20,09	0,180	0,9 %	29,47	-9,37	68,2 %
3,13 %	0,031	56,411	57,878	58,969	58,14	57,85	1,065	1,8 %	65,10	-7,25	88,9 %
6,25 %	0,063	97,054	95,096	95,106	96,01	95,82	0,930	1,0 %	100,73	-4,91	95,1 %
12,5 %	0,125	169,885	170,221	171,404	170,51	170,50	0,651	0,4 %	171,98	-1,48	99,1 %
25 %	0,250	319,084	317,845	317,412	321,23	318,89	1,712	0,5 %	314,50	4,39	101,4 %
37,5 %	0,375	477,723	470,229	468,236	466,52	470,68	4,936	1,0 %	457,02	13,66	103,0 %
50 %	0,500	618,199	620,117	618,667	608,93	616,48	5,097	0,8 %	599,53	16,94	102,8 %
62,5 %	0,625	754,895	747,048	742,977	744,42	747,34	5,313	0,7 %	742,05	5,28	100,7 %
75 %	0,750	884,403	882,526	893,817	890,74	887,87	5,297	0,6 %	884,57	3,30	100,4 %
87,5 %	0,875	1022,254	1013,213	1017,015	1029,64	1020,53	7,116	0,7 %	1027,09	-6,55	99,4 %
100 %	1,000	1159,511	1155,751	1150,689	1156,39	1155,58	3,654	0,3 %	1169,60	-14,02	98,8 %

Lineaarisuuskuvaajan korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9994.



Kuvio 9. AST_horse lineaarisuuskuvaaja.



Kuvio 10. AST_horse recovery%.

Ero suoran sovituksessa ylitti pienemmillä pitoisuuksilla 10% (kuvio 10), mutta oli alle 10 U/l. Tulokset olivat hyväksyttävissä rajoissa.

7 Tulosten yhteenveto ja pohdinta

Toistettavuus oli hyväksyttävissä rajoissa, mikäli variaatiokerroin oli alle 2,5 %. GGT_lowc-menetelmän toistettavuusmittauksissa mittaussarjojen matalan tason kontrollinäytteiden variaatiokerroin oli 0,84 % ja korkean tason kontrollinäytteiden variaatiokerroin 0,50 %. AST_horse-menetelmän kohdalla toistettavuusmittauksissa matalan tason kontrollinäytteiden variaatiokertoimeksi saatiin 1,87 % ja korkean tason kontrollinäytteiden variaatiokerroin oli 0,76 %. Molempien menetelmien osalta toistettavuuden voidaan siis sanoa olleen hyväksyttävissä rajoissa.

Lineaarisuusmittausten tulokset voitiin hyväksyä, mikäli ero suoran sovituksessa oli enintään $\pm 10\%$ tai 10 U/l AST_horse-menetelmän mittausalueella 20-1200 U/l tai GGT_lowc-menetelmän mittausalueella 7-300 U/l. GGT_lowc-menetelmälle tehtiin kaksi mittaussarjaa, 11 tason (0-320 U/l) ja 5 tason (5-20 U/l) laimennussarjat. Tehtyjen mittausten perusteella lineaarisuusmittauksille asetetut kriteerit täyttyivät. AST_horse-menetelmälle tehtiin laimennussarja mittausalueella 20-1200 U/l. Recovery% ylitti pienemmillä pitoisuuksilla 10%:n rajan, mutta oli alle 10 U/l eli hyväksyttävissä rajoissa. Hevosten AST-entsyymien viitearvot ovat 200-660 U/l, eli menetelmä soveltuu AST:n tasojen mittaamiseen tällä alueella.

Mittauksissa käytettävän analysoijan toimintakyky varmistettiin ennen mittaussarjojen suorittamista ja sen toimintakykyä valvottiin päivittäin ajettavilla kontrollinäytteillä,

joiden tulokset olivat tavoitearvojen sisällä. Lineaarisuusmittauksia varten valmistetut laimennussarjat sisälsivät melko paljon pipetointia, joten mahdollinen virhelähde työssä ovat pipetointivirheet laimennussarjojen valmistuksessa. Laimennussarjojen pipetointi vaikutti kuitenkin lineaarisuuskuvaajan perusteella onnistuneen hyvin, sillä mittauspisteiden välillä ei ollut merkittävää hajontaa.

Projekti toteutettiin tiiviillä aikataululla, joka muodosti opinnäytetyön tekemiseen tietyt haasteensa. Testaukset saatiin kuitenkin tehtyä suunnitellun aikataulun puitteissa, eli työ onnistui siltä osin erinomaisesti. Suoritettujen mittausten perusteella voidaan myös todeta, että GGT- ja AST-menetelmän suorituskyky säilyi hyväksyttävällä tasolla niihin tehtyjen muutosten jälkeen. Lineaarisuutta ja toistettavuutta testatessa tulokset olivat hyväksyttävissä rajoissa, joten molempien menetelmien voidaan sanoa toimivan luotettavasti suunnitellulla mittausalueella. Muokattua AST-menetelmää voidaan käyttää mittausalueella 20-6300 U/l, joka kattaa hevosten viitearvot. GGT-menetelmällä voidaan mitata siihen tehtyjen muutosten jälkeen GGT-entsyymin tasoja 7 U/l lähtien, eli menetelmä vastaa myös osaltaan kissojen ja koirien viitearvoja. Menetelmien mittausalueiden muokkauksen eläinten viitearvoja vastaavaksi voidaan siten todeta onnistuneen.

Lähteet

Bangert, Stephen K – Marshall, William J 2008. Clinical Chemistry. 6. painos. Mosby Elsevier.

Blann, Andrew – Nessar, Ahmed 2014. Blood Science: Principles and Pathology. 1. painos. John Wiley & Sons, Ltd.

Bishop, Michael – Fody, Edward – Schoeff, Larry 2001. Clinical chemistry: principles, techniques and correlations. 7. painos. Wolters Kluwer Health.

Burthartsmeier, Gary 2007. Veterinary laboratory testing: a viable alternative? Medical Laboratory Observer 39 (10). 34-35.

Chapman, Seth – Hostutler, Roger 2013. A Laboratory Diagnostic Approach to Hepatobiliary Disease in Small Animals. Vet Clin Small Anim 43. 1209-1225.

Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Saatavilla myös sähköisesti.

<<http://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>>.

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

Ehder, Tapio 2005. Kemian metrologian opas. Helsinki: MIKES. Saatavilla myös sähköisesti. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>>.

Klaassen, James 1999. Matrix Issues Associated With Analysis of Veterinary Specimens. Laboratory Medicine 30 (2). 109-111.

McCord, Kelly – Webb, Graig 2011. Hepatic Dysfunction. Vet Clin Small Anim 41. 745-758.

Niemelä, Onni – Pulkki, Kari 2010. Laboratoriolääketiede: kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: kandidaattikustannus oy.

Thermo Fisher Scientific 2014. AST/GOT (IFCC).

Thermo Fisher Scientific 2016. Gamma-GT (IFCC).

Thermo Fisher Scientific 2016. Indiko Reference Manual.

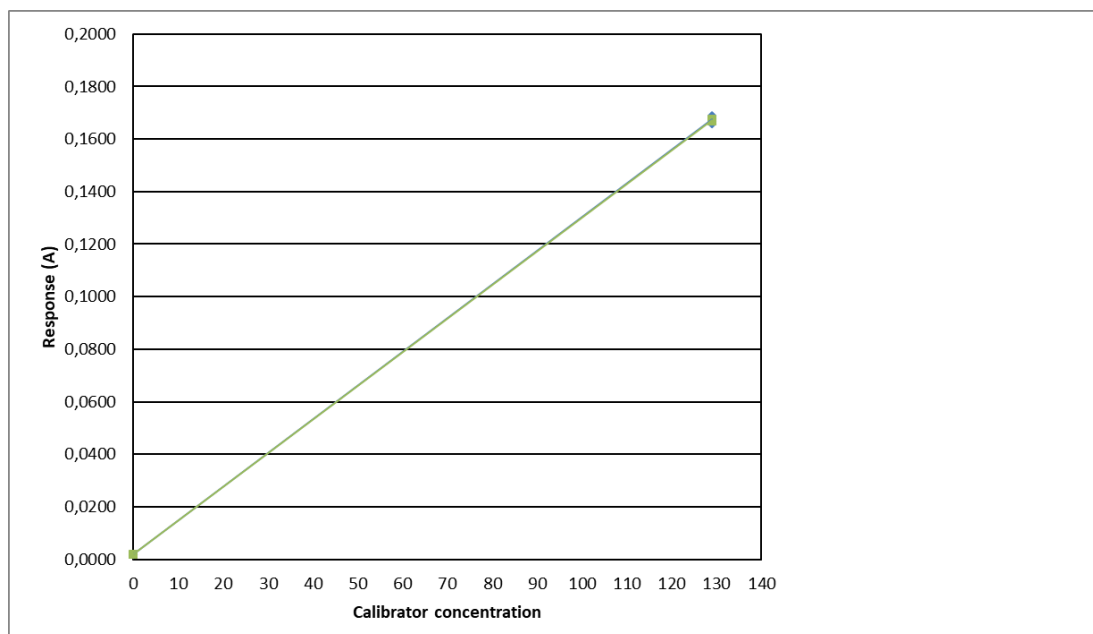
Thermo Fisher Scientific 2017. Veterinary reference ranges and existing analytical measurement ranges.

Thermo Fisher Scientific 2017. Vet_GGT_Plan_Results_Report.

Thermo Fisher Scientific 2017. Vet_AST_Plan_Report_Results.

GGT_lowc kalibrointi

Date	Application	Version	Calibrator	Dilution	Response	Concentration	Factor	Bias
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1660	129,000	781,807	0,002
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1670	129,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1680	129,000	775,221	0,002
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1690	129,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1669	129,000	775,700	0,001
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	eCal	0	0,1676	129,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		
14.3.17	GGT_lowc	1.1.	Water	0	0,0020	0,000		



AST_horse kalibrointi

Date	Application	Version	Calibrator	Dilution	Response	Concentration	Factor	Bias
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0210	113,000	-5024,7800	0,001
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0220	113,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		
				0				
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0210	113,000	-5088,2770	0,0010
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0210	113,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		
				0				
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0210	113,000	-5037,8030	0,0010
22.3.17	AST_horse	1.1.	eCal	0	-0,0210	113,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		
22.3.17	AST_horse	1.1.	Water	0	0,0010	0,000		

