

Pia Eloranta ja Rauna Lehto

Ulosteen kalprotektiinin menetelmävalidointi Evolis Twin Plus System -laitteella RIDASCREEN® Calprotectin -testiä käyttäen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikka

Opinnäytetyö

26.10.2012

Tekijät	Pia Eloranta ja Rauna Lehto
Otsikko	Ulosteen kalprotektiinin menetelmävalidointi Evolis Twin Plus System -laitteella RIDASCREEN® Calprotectin -testiä käyttäen
Sivumäärä Aika	34 sivua + 4 liitettä 26.10.2012
Tutkinto	Bioanalyttikko AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Terttu-Liisa Lindell Sairaalamikrobiologi Päivi Kankkunen Bioanalyttikko Heli Nieminen
<p>Suolistoalueen inflammatoriset tulehdukset ovat yleisiä väestössämme. Tulehduksellisia suolistosairauksia ovat haavainen paksusuolitulehdus ja Crohnin tauti. Näiden tautien oireet ovat hyvin samanlaisia, joten niiden tarkka diagnosointi on haastavaa ja vaatii usein invasiivisia toimenpiteitä, kuten mahasuolikanavan ja paksusuolen tähytyksiä sekä koepalojen ottoa. Tutkimukset ovat osoittaneet, että suolistoalueella elimistön puolustussolujen eli valkosolujen erittämä kalprotektiini proteiinin pitoisuus korreloi hyvin suoliston tulehdustiloihin. Tästä johtuen ulosteen kalprotektiinipitoisuuden laboratoriomääritystä voidaan käyttää terveydenhuollossa sekä diagnostiikkaan että hoitovasteen arviointiin. Ulosteen kalprotektiini määritetään entsyymi-immunologisella menetelmällä.</p> <p>Opinnäytetyömme tarkoituksena oli validoida ulosteen kalprotektiinin määrittäminen (F –Calpro 4803) VITA Terveyspalvelut OY VITA Laboratorion käyttöön RIDASCREEN® Calprotectin -testillä Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitetta hyödyntäen.</p> <p>Toteutimme menetelmävalidoinnin, jonka referenssiarvoina käytimme LADR GmbH-Labor Dr Kramer & Kollagen samalla menetelmällä jo tutkittuja näytteitä (n=67). Näiden lisäksi tutkimuksissa oli mukana ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä. Tutkimme työssämme menetelmän oikeellisuutta, uusittavuutta, lineaarisuutta sekä esikäsittelyn vaikutusta tuloksiin.</p> <p>Tämän validoinnin tulokset osoittavat, että kalprotektiinin mittausarvot poikkeavat referenssiarvoistaan, joten nämä määrittäytulokset eivät ole riittävät vaan vaativat edelleen jatkotutkimuksia. Tutkituista parametreista sarjojen sisäinen ja välinen toistettavuus, sekä lineaarisuus täyttää vaaditut ominaisuudet, mutta esikäsittelyvaiheen virhemahdollisuuksien minimointiin tulisi tämän tutkimuksen perusteella kiinnittää erityistä huomiota.</p>	
Avainsanat	validointi, ulosteen kalprotektiini, ELISA-menetelmä, RIDASCREEN® Calprotectin, Evolis Twin Plus System

Authors	Pia Eloranta and Rauna Lehto
Title	Faecal Calprotectin Assay Validation with Evolis Twin Plus System Equipment Using RIDASCREEN® Calprotectin Test
Number of Pages	34 pages + 4 appendices
Date	25 October 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory science
Specialisation option	Biomedical Laboratory science
Instructors	Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer Päivi Kankkunen, Microbiologist Heli Nieminen, Biomedical Laboratory scientist
<p>Inflammatory bowel area infections are common in Finland. Inflammatory bowel diseases are ulcerative colitis and Crohn's disease. Symptoms of these diseases are very similar and the specificity of the diagnosis is challenging and it often requires invasive examination, such as gastrointestinal and colonic endoscopies and biopsy sampling. Previous studies have shown that in the intestinal tract of the body's defence cells, white blood cells' secreting the protein called calprotectin and its concentration correlates well with intestinal inflammatory conditions. As a result, faecal calprotectin concentration assay may be used for diagnostic and for the assessment of treatment response. Faecal calprotectin is defined by using the enzyme immunoassay method.</p> <p>The purpose of our study was to validate faecal calprotectin (F –Calpro 4803) for VITA Health Services VITA Laboratory with RIDASCREEN® Calprotectin test using Bio-Rad Evolis Twin Plus System equipment.</p> <p>We carried out the reference method for validation, where we used as reference values from the same method already investigated samples (n = 67) by LADR GmbH-Labor Dr Kramer & Kollagen. In addition, we used the external quality control samples. We studied the correctness, reproducibility, linearity and pre-treatment effect on the results of the method.</p> <p>Here we show that the calprotectin results got from the validation analysis differ from the values of the reference laboratory indicating that these results were not adequate and further studies are needed. Of the studied parameters, the reproducibility and the linearity met the required values. However, more attention should be paid to minimizing the errors caused by pre-treatment phase.</p>	
Keywords	Validate, faecal calprotectin, enzyme immunoassay, RIDASCREEN® Calprotectin, Evolis Twin Plus System

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Ulosteen kalprotektiini	2
2.1	Tulehdukselliset suolistosairaudet	3
2.1.1	Crohnin tauti	4
2.1.2	Haavainen paksusuolitulehdus	4
3	Ulosteen kalprotektiinimääritys RIDASCREEN® Calprotectin -testillä	5
3.1	Bio-Rad Evolis Twin Plus System -laite	6
3.2	Preanalytiikka	6
3.3	Analytiikka	7
3.4	Postanalytiikka	10
4	Validointi	11
4.1	Laadunvarmistus	11
4.2	Toistettavuus ja uusittavuus	13
5	Tutkimusasetelma	14
5.1	Aikaisemmat tutkimukset	15
5.2	Työtä ohjaavat kysymykset	16
6	Työn toteutus	17
6.1	Näytemateriaali	17
6.2	Menetelmävalidoinnin suoritus	18
7	Tulokset	21
7.1	Uusittavuus	21
7.2	Sarjan sisäinen variaatio	22
7.3	Testin lineaarisuus	23
7.4	Sarjojen välinen toistettavuus	25
7.5	Esikäsittelyn vaikutus	26
7.6	Ulkoinen laaduntarkkailu	27
7.7	Korrelaatio	28
8	Tulosten luotettavuuden arviointi	30

9	Pohdinta	31
	Lähteet	33
	Liitteet	
	Liite 1. Validointisuunnitelma	
	Liite 2. Standardikuvaajan arvot	
	Liite 3. Validoinnin tulokset	
	Liite 4. Evolis Twin Plus System -tulosraportit	

1 Johdanto

Tulehdukselliset suolistosairaudet eli Crohnin tauti ja haavainen paksusuolitulehdus eli haavainen koliitti ovat yleisiä väestössämme. Näihin sairauksiin sairastuu Suomessa useita henkilöitä joka vuosi ja suolistosairauksien esiintyvyys on jatkuvasti kasvussa. Chronin tautia ja haavaista koliittia todetaan yleisimmin nuorilla aikuisilla, mutta niitä voi esiintyä kaiken ikäisillä. Oireet eri suolistosairauksissa ovat hyvin samanlaisia, joten sairauksien tarkka diagnosointi on haastavaa. Tutkimukset ovat osoittaneet, että valkosolujen erittämä kalprotektiini suolistoalueella korreloi hyvin näihin sairauksiin ja kalprotektiini voidaan määrittää suoraan ulosteesta entsyymi-immunologisella laboratoriomäärityksellä. Näin ollen kalprotektiinin laboratoriomääritys voi vähentää usein vaadittavia invasiivisia tutkimuksia, kuten gastro- ja kolonoskopioita.

Opinnäytetyömme tarkoituksena on validoida ulosteen kalprotektiinin määrittäminen (F – Calpro 4803) VITA Terveyspalvelut OY VITA Laboratorion käyttöön Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitetta hyödyntäen. Laite nopeuttaa määrittäminen tekemistä ja vähentää menetelmän vaatimaa käsityötä. Näin ollen diagnostisten näytteiden tulokset ovat nopeammin saatavilla.

Määrittäminen on tähän saakka tehty VITA Laboratorion yhteistyö laboratoriossa LADR GmbH-Labor Dr Kramer & Kollagen:lla Saksassa. Näytemäärien lisääntymisen vuoksi se tehdään jatkossa VITA Laboratoriossa itse.

Opinnäytetyömme koostuu validointiprosessista alkaen näytteen käsittelystä loppuen tulosten raportointiin. Validointiprosessiin kuuluu suunniteltu mittausten sarja joiden tuloksia verrataan keskenään sekä referenssimenetelmän tuloksiin. Näytemateriaalina meillä on VITA Laboratorion valmiiksi keräämiä ulostenäytteitä, mitkä ovat aiemmin määritetty referenssilaboratoriossa Kramerilla. Tuloksia käsittelemme tilastollisin menetelmin ja arvioimme tulosten luotettavuutta laatuvaatimusten mukaisesti. Opinnäytetyömme antaa myös arvokasta tietoa VITA Laboratoriolle laitteen käytettävyydestä, mikä edesauttaa määrittäminen käyttöönottoa.

2 Ulosteen kalprotektiini

Ulosteen kalprotektiinipitoisuuden laboratoriomäärittäystä käytetään tulehduksellisten suolistosairauksien diagnostiikassa, aktiivisuuden arvioinnissa, hoidon seurannassa, sekä pahenemisvaiheen ennustamisessa. Kalprotektiini on herkkä tulehduksen osoittaja ja koko ruoansulatuskanavan alueella, mutta se ei ole tarkka tietyille suolistosairauksille. (Sipponen - Kolho 2011:2632.) Kalprotektiinin mittaaminen kroonisissa tulehduksellisissa suolistosairauksissa auttaa sairauden arvioinnissa, sekä säästää potilasta elimistön sisään tunkeutuvilta tutkimuksilta ja toimenpiteiltä, kuten kolonoskopialta (vanRheenen – Van de Vijver – Fidler 2010:1). Ulostenäyte on helppo ottaa ja säilyvyytensä vuoksi se on hyvä näytemateriaali kyseiseen laboratoriomäärittelyyn (Sipponen - Kolho 2011:2631).

Elimistön immuunipuolustuksessa on osallisena useita eri solutyyppejä, joista leukosyytit eli valkosolut ovat tärkeimpiä. Valkosoluja ovat mm. neutrofiiliset valkosolut, monosyytit ja makrofagit. Kalprotektiini on erityisesti neutrofiilisista granulosyyteistä, mutta myös monosyyteistä vapautuva proteiini, joka sitoo kalsiumia ja sinkkiä ja sen on osoitettu korreloivan mm. suolistoalueen tulehduksiin. (Sipponen - Kolho 2011:2631.) Kalsiumiin sitoutumiskykynsä vuoksi se pysyy ulosteessa tasaisena eikä hajoa lämmön ja entsyymien proteiineja hajottavasta vaikutuksesta (Røseth 2003: 607 - 608).

60 % neutrofiilien sytoplasman proteiineista on kalprotektiinia, joka vapautuu neutrofiiliaktivaation myötä, jolloin se on mitattavissa plasmasta, nievelnesteestä, syljestä, selkäydinnesteestä, virtsasta ja ulosteesta. Kalprotektiinin biologisia tehtäviä ei täysin tunneta, mutta sillä on monia immunoregulatorisia tehtäviä ja sitä kutsutaan mm. antimikrobiseksi proteiiniksi. (Sipponen - Kolho 2011.) Oletetaan, että se suojaa soluja leukosyyttien ja bakteerien proteiineja hajottavalta vaikutukselta (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:2). Ulosteeassa kalprotektiinin määrä on noin kuusinkertainen verrattuna plasman kalprotektiinipitoisuuteen. Tästä syystä se on parhaiten mitattavissa juuri ulosteesta. (Sipponen - Kolho 2011:2631.)

2.1 Tulehdukselliset suolistosairaudet

Tulehduksellisia suolistosairauksia ovat haavainen paksusuolitulehdus ja Crohnin tauti. Näiden tautien syntyperää ei tarkkaan tiedetä ja on arveltu, että aiheuttajia voisi olla useampiakin. (Niemelä – Järvinen – Aitola 2007:466.) Keskeisimpiä tekijöitä tautien synnylle on kuitenkin suoliston limakalvon immunologisen sietokyvyn muutos, jonka katsotaan olevan osittain geneettistä (Färkkilä 2006:69). Kaikille taudeille on tavanomaista vaihteleva taudinkuva eri ihmisillä. Syitä on tutkittu geneettisten tekijöiden lisäksi mm. ympäristötekijöistä, psykologisista tekijöistä, infektioista sekä immunitetin säätelystä, mutta mitään erityistä syytä ei ole löydetty. (Niemelä ym. 2007:467.)

Tutkimusten mukaan ympäristötekijöistä tupakan, tulehduskipulääkkeiden tai ehkäisytablettien käyttö nostaa riskiä sairastua tulehdukselliseen suolistosairauteen, kun taas umpilisäkkeen poisto vähentää sitä. Psykososiaalisilla tekijöillä ei näyttäisi olevan osuutta taudin syntyyn, mutta immunologisilla ja geneettisillä tekijöillä on selvä yhteys. Tulehduksellisiin suolistosairauksiin sairastuneilla suolen limakalvojen immunologisissa reaktioissa on todettu poikkeavuuksia. On mahdollista, että puutteellinen tulehduksen vaimentuminen johtaisi krooniseen tulehdukseen. Erityisesti tulehdusreaktion säätelyn T-auttaja-1-solujen sytokiinit eli solujen välisen viestinnän välittäjäaineet ovat keskeisiä Crohnin taudin synnyssä ja T-auttaja – 2-solun sytokiinit haavaisen paksusuolitulehduksen synnyssä. (Niemelä ym. 2007: 467 - 468.)

Suomessa Crohnin tautiin sairastuu vuosittain 400 henkilöä. Kaikista tautia sairastavista noin 70 %:lla on taudissaan aktiivisia vaiheita ja vaiheita, jolloin tauti on vähemmän aktiivinen. (Tarnanen – Jussila – Vuorio 2011). Haavainen paksusuolen tulehdus alkaa usein 20–35-vuotiaana ja sitä sairastaa Suomessa noin 5 henkilöä tuhannesta (Mustajoki 2012). Luku on yksi maailman korkeimpia ja sairautta esiintyy erityisesti nuorilla miehillä (Suolistosairaudet yleistyvät 2010). Tuore Kela-aineisto osoittaa, että vaikka tulehdukselliset suolistosairaudet eivät ole yleisiä, näiden sairauksien määrät ovat lisääntyneet Suomessa 2000-luvulla noin 6 % joka vuosi (Suolistosairaudet yleistyvät 2010).

Tarkastelemme tässä työssä Crohnin taudin ja haavaisen paksusuolitulehduksen taudinkuvaa, sillä ulosteen kalprotektiinin määrittäminen on tärkeä tutkimusjuuri näiden kahden sairauden sekä diagnostiikassa että hoitovasteen seurannassa.

2.1.1 Crohnin tauti

Crohnin tauti on sekä ohut- että paksusuoleessa esiintyvä tulehdussairaus, jonka taudinkuvaan kuuluvat koliikkimainen vatsakipu, ripuli, laihtuminen sekä kuumeilu, johon liittyy myös C-reaktiivisen proteiiniarvon nousua. Kuten muissa tulehduksellisissa sairauksissa, myös tässä taudille on ominaista moninainen esiintyminen sisältäen selkeitä oireiden lievenemisvaiheita sekä pahenemisvaiheita. Crohnin taudille on tyypillistä suolen sisäpinnan aftamuutokset sekä eri tason ulseraatiot eli haavaumat, jotka voidaan todeta tähystyksen yhteydessä. Crohnin tauti muistuttaakin näin kovin haavaista paksusuolitulehdusta, josta enemmän luvussa 2.1.2 Haavainen paksusuolitulehdus, mutta eroaa siitä granuloomien suhteen, joita esiintyy noin puolella kirurgisista näytteistä. (Niemelä ym. 2007:471) Sen lisäksi näiden kahden taudin esiintymisalueet ovat erilaiset. Crohnin taudissa tulehdus voi olla missä tahansa ruoansulatuskanavan alueella, kun taas haavainen paksusuolitulehdus paikallistuu paksu- ja peräsuoleen (Björknäs 2012.)

Crohnin taudin diagnostiikan perusteena käytetään kliinistä kuvaa, tähystyksen tuloksia (erityisesti ileokolonoskopia, jossa tutkitaan peräsuolen ja koolonin lisäksi myös sykkyräsuolen terminaalinen osa), kuvantamistutkimusten tuloksia (magneettikuvaus tai tietokonetomografia) sekä histologiaa (kolonoskopian yhteydessä otettavat biopsianäytteet). (Käypähoito 2011.) Parantavaa hoitoa ei Crohnin tautiin ole, mutta sairauden aiheuttamia oireita ja komplikaatioita voidaan vähentää lääkehoidolla. Lääkehoitona käytetään 5-aminosalisylihappovalmisteita, mutta osa niistä on heikkotehoisia ja tehokkaallakin lääkehoidolla voi olla haittavaikutuksia. (Käypähoito 2011) Kirurgiasta ei Crohnin taudin hoidossa ole apua (Niemelä ym. 2007:472).

2.1.2 Haavainen paksusuolitulehdus

Haavainen koliitti, colitis ulcerosa eli haavainen paksusuolitulehdus on paksusuolen alueella esiintyvä suolisairaus, joka voidaan jakaa oireiden ja löydösten mukaan kolmeen vaikeusasteeseen: lievään, keskivaikeaan ja vaikeaan koliittiin. (Niemelä ym. 2007:483). Haavaisen koliitin tyypillisiä oireita ovat pitkäaikainen verinen ja limainen ripuli. Myös krampinomaiset vatsakivut ovat mahdollisia. Tauti on saattanut vaivata potilasta jo pitkään ja taudinkulku on usein vaihtelevaa sisältäen sekä oireiden pahenemis- että lievenemisvaiheita. (Mustajoki 2012.) Diagnostiikassa käytetään perä- ja sigmasuolen tähystystä, jonka yhteydessä otetaan koepalat. Mikäli halutaan tutkia taudin laajuutta tai erottaa haavainen koliitti muista koliiteista, voidaan tehdä kolonoskopia

(Niemelä ym. 2007:484.) Verikokeiden avulla saadaan selville tulehdusreaktion voimakkuus ja muita mahdollisia sairauden aiheuttamia yleisoireita (Mustajoki 2012). Koska suolimutoksiin ei pystytä vaikuttamaan omahoidolla, esimerkiksi ruokavaliolla, haa­vaisen koliitin hoitoina käytetään lääkehoitoa oraalisesti (sulfasalatsiini, mesalatsiini, oksalatsiini) tai vaihtoehtoisesti kortisonilääkkeitä sisältäviä peräruiskeita tai -puikkoja. Mikäli lääkehoito ei tehoa, on sairasta suolta mahdollista poistaa kirurgisesti. (Mustajoki 2012.)

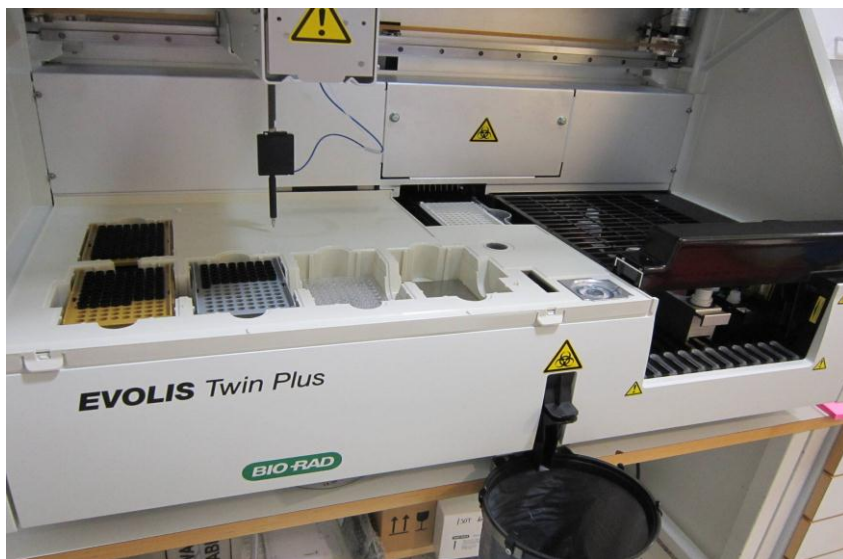
3 Ulosteen kalprotektiinimääritys RIDASCREEN® Calprotectin -testillä

Opinnäytetyömme tavoitteena on validoida ulosteen kalprotektiinimääritys Vita Labora­torion käyttöön RIDASCREEN® Calprotectin -testillä. Määritys tehdään käyttäen Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitetta. Ulosteen kalprotektiinipitoisuus määritetään entsyymi-immunologisella menetelmällä eli ELISA -menetelmällä (Jahnsen–Røseth–Aadland 2008:743). ELISA -menetelmässä antigeenin tai vasta-aineen osoittamiseen käytetään hyväksi entsyymeillä leimattuja komponentteja mitkä katalysoivat substraatin reaktiotuotteeksi, jolloin pitoisuus on mitattavissa (Halonen 2004: 94). Immunokemialli­set määritykset sopivat herkkyytensä vuoksi mittaamaan pitoisuuksia, jotka ovat pieniä. Määritysmenetelmä perustuu enimmäkseen joko kilpailevaan sitoutumiseen tai kaksoisvasta-ainetekniikkaan. Menetelmällä voidaan mitata joko antigeenin tai vasta-aineen pitoisuutta. (Halonen 2004: 90.)

Käyttämämme testi perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan (RIDASCREEN® Calpro­tectin 2011:3). Menetelmässä kiinteään faasiin kiinnitetyn vasta-aineen avulla voidaan osoittaa siihen sitoutuneen antigeenin pitoisuus. Kuoppalevyn pohja on päällystetty vasta-aineella, josta sitoutumattomat antigeenit pestään pois. Näytteen antigeenit si­toutuvat spesifisti, jonka jälkeen lisätään entsyymillä leimattu vasta-aine. Ylimääräinen sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja lisätään entsyymiin sitoutuva substraatti, mikä saa aikaan reaktiotuotteen ja on näin ollen suoraan verrannollinen aineen pitoisuuteen jolloin tulos on mitattavissa fotometrisesti. (Halonen 2004: 94).

3.1 Bio-Rad Evolis Twin Plus System -laite

Käytimme RIDASCREEN® Calprotectin-testin validointityössä Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitetta. Kuviossa 1 näkyy, laitteessa on pipetti, näytteiden ja reagenssien syöttöpaikka, näytteiden laimennosasema, inkubaattori, kuoppalevyjen pipetointiasema, kärkienvaihtopiste, paikat pesupuskurille sekä absorbanssin lukija. (Bio-Rad System overview 2008: 9.) Laite vähentää menetelmän vaatimaa käsin tehtävää pipetointia, mikä nopeuttaa analyysin valmistumista ja vapauttaa laboratoriohenkilökunnan resursseja.



Kuvio 1. Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laite

3.2 Preanalytiikka

Preanalytiikka lähtee hoitavan henkilökunnan tutkimuksen valinnasta ja pyynnöstä. Näytteenotto ja näytteen kuljetus ja oikein säilytys ovat kriittisimpiä vaiheita, analyysituloksen onnistumiselle. (Laitinen 2004: 32). Preanalytiikkaan liittyvien virhemahdollisuuksien minimointi on erittäin tärkeää, sillä jopa 46 - 68 % analyysien virheistä tapahtuu juuri tässä vaiheessa (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 8). Preanalyttisten tekijöiden laiminlyöminen voi aiheuttaa väärän diagnoosin ja hoidon saannin pitkittymisen aiheuttaen näin ollen myös ylimääräisiä kustannuksia (Laitinen 2004: 32).

Ulosteen kalprotektinimääritystä varten suositellaan näytteenottoa aamun ensimmäisestä ulosteesta. Näyte voi olla kuitenkin otettu milloin vain eikä ulosteen koostumuksella ole merkittävää vaikutusta tulokseen. (Sipponen - Kolho 2011:2631-2.) Näytteeksi kelpaa 1 - 5 grammaa ulostetta hyvin suljetussa, tyhjässä ja puhtaassa ulostenäytepurkissa (Laboratoriokäsikirja 2011). Reagenssipakkauksessa ohjeistetaan viilentämään näyte 2 - 8 C°:seen, mikäli se ei ole perillä vuorokauden kuluessa. Jos määritystä ei tehdä kolmen päivän kuluessa, tulee näyte pakastaa vähintään -20 C°:een. Pakastaminen saattaa aiheuttaa neutrofiilien hajoamista, mikä aiheuttaa kalprotektiinin vapautumista soluista aiheuttaen korkeampia tuloksia pakastetuissa näytteissä kuin tuoreissa näytteissä. Tästä syystä näytteitä ei suositella pakastettavan useampaan kertaan. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:6.)

3.3 Analytiikka

Käyttämämme RIDASCREEN® Calprotectin -reagenssipakkaus sisältää tarvittavat reagenssit ulosteen kalprotektiinipitoisuuden määrittämiseen ELISA -menetelmällä. Reagenssipakkausta säilytetään 2 – 8 C°:ssa ja sen tulee antaa lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen määritystä (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:4). Pakkauksen pesu- sekä näytelaimennusekstraktiliuokset tulee valmistaa ennen käyttöä. Pesupuskurikonsentraatti laimennetaan 1:10 ja näytelaimennosekstrakti laimennetaan 1:3 tislattua vettä. Pesupuskuri säilyy neljä viikkoa laimentamisesta ja näytelaimennusekstraktia voi käyttää kuusi kuukautta valmistuksesta. Käytön jälkeen liuoksia tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:6.)

Reagenssipakkaus sisältää näytekuoppia 96: lle näytteelle. Näytekuoppien tulee antaa lämmitä foliopakkauksensa sisällä huoneenlämpöön ennen käyttöä. Näytekuoppien pohjaan on kiinnitetty hiiressä tuotettuja ihmisen kalprotektiinille spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita. Pakkauksen sisältämät kalibraattori, korkea ja matala positiivinen kontrolli, näytelaimennospuskuri, konjugaatti, substraatti ja entsyymaattisen reaktion pysäyttävä stop-reagenssi ovat valmiita käytettäväksi. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:6.) Valmistajan antamia turvallisuusohjeita tulee noudattaa. Ulostennäytteitä ja näytteiden kanssa tekemisissä olleita tarvikkeita käsitellessä tulee huomioida mahdollinen infektiovaara. Reagenssit sisältävät haitallisia aineita, joten iho- ja limakalvokontaktia tulee välttää. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:5.)

Oikein säilytetty ulostenäyte tulee esikäsitellä huolellisesti ennen kuin kalprotektiinia pystytään määrittämään. Näytteen oikea esikäsitely on tärkeää tulosten luotettavuuden kannalta. Tuoreesta tai sulatetusta ulostenäytteestä punnitaan mahdollisuuksien mukaan tasan 100 mg merkittyy näyteputkeen. Putkeen pipetoidaan 5 ml näytelaimennosekstraktia. Vaihtoehtoisesti voidaan punnita ulostetta 80 – 130 mg suhteuttamalla se ekstraktin määrään (1:50). Esimerkiksi kun näytettä on punnittu 80 mg, lisätään näytelaimennosekstraktia 4 ml. Jos taas punnittu määrä on 130 mg, lisätään ekstraktia 6,5 ml. Mikäli uloste on nestemäistä, pipetoidaan 100 µl ulostetta tasan 5 millilitraan ekstraktia. Näyte vortexoidaan hyvin, jotta uloste homogenisoituu ekstraktiin kuten kuviossa 2. Tämän jälkeen näytteen annetaan seistä viisi minuuttia ja vortexoidaan uudelleen. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:7.)

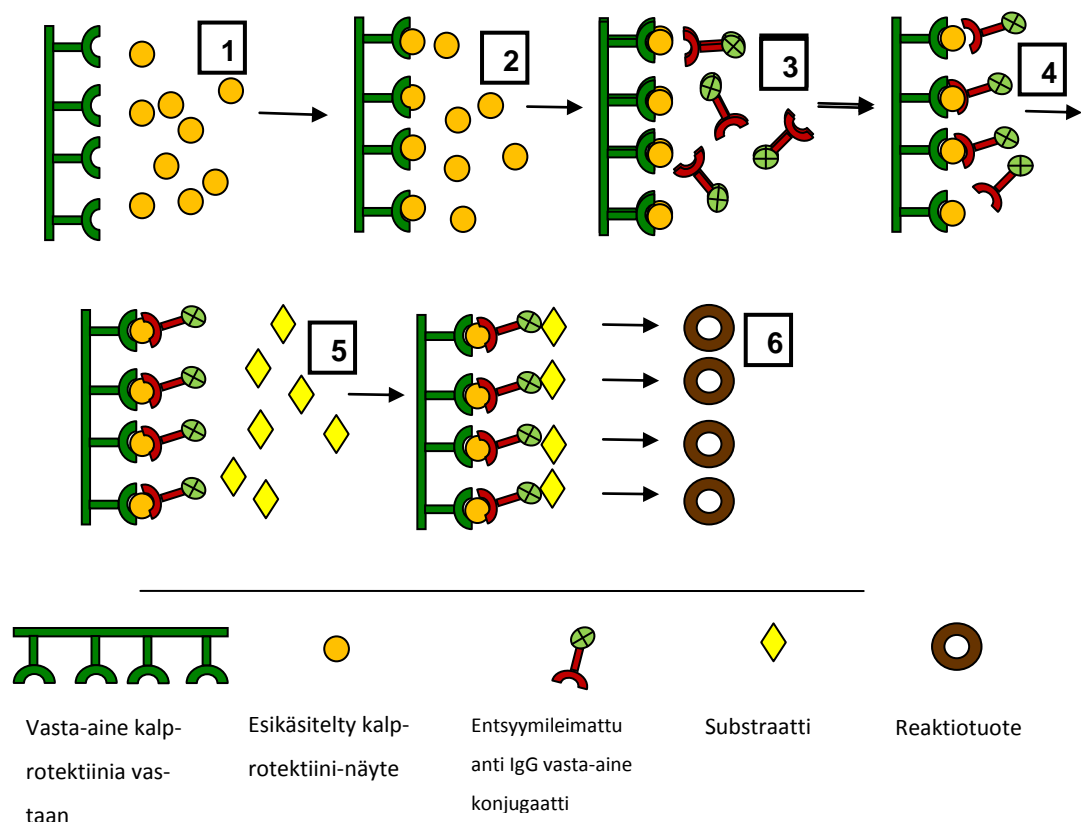


Kuvio 2. Ulosteen kalprotektiininäytteen homogenisointi

Huolellisesti homogenisoitua näytettä sentrifugoidaan >3000g 10 minuuttia, jotta ulosteen suuret partikkelit erottuvat jolloin jäljelle jää supernatantti. Supernatantissa ei saa olla irrallisia partikkeleita, jotta laitteen pipetti ja pesuneulat eivät tukkeudu (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:8). Tämän jälkeen näyte on valmis määrittäväksi käyttämälläme Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitteella. Näytteiden esikäsitely vie aikaa noin tunnin.

Kalprotektiinimäärityksen ohjelma on etukäteen ohjelmoitu Evolis -laitteelle. Laitteeseen syötetään valmiit reagenssit ja näytteet, minkä jälkeen laite suorittaa määrityksen. Laite pipetoi esikäsitellyn näytteen supernatantista 20 µl:aa 980 µl:aan näytelaimennospuskuria laimennuslevylle (1:50). Laimennettua näytettä, kalibraattoria, laimennospuskuria negatiivisena kontrollina, korkeaa positiivista kontrollia sekä matalaa positiivista kontrollia pipetoidaan 100 µl:a reaktionäytekuoppiin. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:8.) Laitteeseen on ohjelmoitu oikeat paikat näytteille, kalibraattorille ja kontrolleille.

Evolis -laite inkuboi näytteitä tunnin ajan inkubointiyksikössään 20 - 25 C°:ssa. Näytteet reagoivat kuoppalevyn pohjaan kiinnitettyjen ihmisen kalprotektiinille spesifien monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa (Kuvio 3 tapahtuma 1), jonka jälkeen laite pesee ylimääräiset sitoutumattomat partikkelit pois huolellisesti (Kuvio 3 tapahtuma 2). Tämän jälkeen kuoppiin lisätään toista vasta-ainetta eli konjugaattia 100 µl:a, joka on tässä testissä piparjuuriperoksidaasi -entsyymillä leimattu (Kuvio 3 tapahtuma 3). Konjugaa-tin annetaan reagoida kiinteään faasiin kiinnitettyihin vasta-aineisiin kiinnittyneiden kalprotektiini proteiinien kanssa tunnin ajan, jonka jälkeen sitoutumattomat partikkelit pestään jälleen huolellisesti pois (Kuvio 3 tapahtuma 4). Pesujen jälkeen näytekuppiin laite pipetoi 100 µl:a substraattiliuosta, joka reagoi sitoutuneiden entsyymillä leimattujen vasta-aineiden kanssa valolta suojattuna 15 minuuttia (Kuvio 3 tapahtuma 5). Viimeisenä näytekuppiin lisätään 50 µl:a reaktion pysäyttävää stop-liuosta. Tämän jälkeen reaktiotuote on valmis (Kuvio 3 tapahtuma 6) ja laite mittaa absorbanssin fotometrisesti aallonpituudella 450 nm, jonka referenssiaallonpituutena ≥ 620 nm. (RIDASC-REEN® Calprotectin 2011:9.)



Kuvio 3. Elisa menetelmän periaate kaaviokuvana (Mukaiillen Halonen 2003:95.)

3.4 Postanalytiikka

Ulosteen normaalin kalprotektiinipitoisuuden viiterajaksi on asetettu 100 µg/g. Alle vuoden ikäisillä lapsilla ja vanhuksilla viite-arvot voivat olla korkeammat. Kalprotektiinipitoisuus voi kasvaa mm. divertikuliitissa, suolistokanavan syövän, paksusuolen polyyp-pien vuoksi, aktiivisessa haavaisen paksusuolen tulehduksessa ja Crohnin taudissa. (Laboratoriokäsikirja 2011.) Reagenssipakkauksen mukaan raja-arvo on 50 µg/g, mutta paikoissa, joissa tutkimusta käytetään etenkin tulehduksellisten suolistosairauksien erotusdiagnoosissa ja hoidon vasteen seurannassa, on raja-arvoksi vakiintunut 100 µg/g. (Sipponen - Kolho 2011:2632). Tulokset jotka asettuvat välille 100 - 200 µg/g tulee arvioida potilaan kliiniseen tilaan suhteuttaen (Laboratoriokäsikirja 2011). Mikäli halutaan tietää näytteen tarkka kalprotektiinipitoisuus silloin kun näytteen tulos ylittää 600 µg/g, tulee se edelleen laimentaa näytelaimentimeen, sillä standardikuvaaja lähtee laskemaan tämän pitoisuuden jälkeen ja voi aiheuttaa vääriä tuloksia. (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:11.) Käytännössä kvantitatiivinen tulos annetaan 2500 µg/g saakka.

Menetelmässä laadunvarmistus tulee huomioida joka kerta kun määrittäminen tehdään. Evolis -laite laskee näytteen sisältämän kalprotektiini proteiinin määrän kalibraattorin arvon ja laitteeseen syötettyjen reagenssivalmistajan antamien neljän parametrin perusteella (4-parameter-logistic-log-model). Neljän parametrin arvot löytyvät liitteestä 2. Tulosten laskeminen vaatii reagenssipakkauksen teknisiä tietoja, joiden mukaan kalprotektiinille muodostuu standardikuvaaja, mikä näkyy kuviossa 2. Liitteestä 2 löytyvät standardikuvaajan tarkat arvot. Määrittäminen voidaan pitää luotettavana mikäli kalibraattori, negatiivinen kontrolli ja positiiviset kontrollit täyttävät pakkauskohtaiset tavoitearvot (RIDASCREEN® Calprotectin 2011:10).



Kuvio 4. Kalprotektiinin standardikuvaaja

4 Validointi

Validointi käsitteenä on tutkintaan ja objektiiviseen todisteaineistoon perustuva varmistuminen siitä, että tiettyä käyttöä koskevat erityisvaatimukset toteutuvat. Validointiprosessilla osoitetaan analyysimenetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Menetelmävalidoinnilla tarkoitetaan suunniteltujen mittausten sarjaa, joiden avulla osoitetaan analyysimenetelmän tuottavan oikeita tuloksia. Validointi tehdään mm. otettaessa käyttöön uutta menetelmää tai analysaattoria, testattaessa menetelmässä käytettäviä materiaaleja, verrattaessa uutta menetelmää vanhaan tai referenssimenetelmään sekä reagenssien vaihtuessa. (Ehder 2005:25.)

4.1 Laadunvarmistus

Validointiin kuuluu määrittämisen sekä soveltuvuuden että suorituskyvyn arviointi tiettyyn käyttötarkoitukseen. Validiteetti eli pätevyys kertoo miten hyvin käytetty tutkimusmenetelmä vastaa juuri sen tutkittavan ilmiön ominaisuuden määrittämisessä mitä on tarkoituskin mitata. (Ehder 2005:25.)

Tässä dokumentissa validoinnilla tarkoitetaan tarkkaan suunniteltua, hyvien kliinisten laboratoriotyöskentelyarvojen mukaisesti toteutettua kvantitatiivista tutkimustyötä, jonka

perusteella voidaan arvioida tuloksia, laskea tilastolliset laskut sekä suorittaa johtopäätökset. Validointityön perusteella voidaan näin päätellä voidaanko tutkimus jo toteutetun validointityön pohjalta käyttöön vai tuleeko validointityötä vielä jatkaa ja tehdä työnsuoritukseen kohdistuvia kehitystoimenpiteitä halutun tuloksen saavuttamiseksi.

Mittausmenetelmän suorituskyvystä kertovat parametrit ovat mm. selektiivisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamisraja, määrittäysraja, poikkeama, saanto, toimintavarmuus, tarkkuus, toistettavuus sekä uusittavuus. (Ehder 2005:25.) Herkkyys ilmoittaa analysaattorin mittaaman arvon muutoksen suhteessa näytteen pitoisuuden muutokseen (Jaarinen – Niiranen 2005: 13).

Selektiivisyydellä voidaan osoittaa miten hyvin menetelmä pystyy määrittämään juuri analysoitavan aineen ilman, että muut näytteessä olevat komponentit sitä häiritsevät. Menetelmä on sitä spesifisempi mitä selektiivisempi se on analysoitavalle aineelle. Lineaarisuus kertoo menetelmän kyvystä antaa hyväksyttävä tulos mittausalueella.

Mittausalue on numeerinen arvojoukko, jolla menetelmän tuloksia voidaan pitää hyväksytyinä. Näillä arvoilla tuloksen ja näytteen pitoisuudella on lineaarinen korrelaatio.

Toteamisraja on luotettavasti todettavissa oleva analyysin määrittäyspitoisuus, joka kuitenkin eroaa selkeästi nollanäytteen arvosta. Määrittäysraja todetaan varmennettua vertailumateriaalia käyttäen. Tavallisesti se on kalibroitikäyrän alhaisin piste, kun nollanäyte jätetään pois. (Ehder 2005:27-28.)

Poikkeama eli analysaattorin systemaattinen virhe on hyvä tunnistaa, jotta mm. mittausepävarmuus voidaan määrittää. Poikkeaman syynä voi olla esim. virheellinen tulostenluku tai epäkuntoinen laite. Yleensä poikkeama ilmoitetaan prosentteina oikeasta tuloksesta. $B (\%) = x - T/T \times 100$, jossa B on kokonaispoikkeamaprosentti, T = teoreettinen arvo ja x on useampien mittaustuloksien keskiarvo. (Ehder 2005:30.)

Saannolla tarkoitetaan analyysimenetelmän tehoa havaita tarkasteltavan analyysin kokonaismäärä. Kun analyysitulokset ilmoitetaan, on saantoprosentti syytä ottaa huomioon silloin kun tehdään päätöksiä jonkun validiteetista analyysituloksen perusteella. Saanto ilmoitetaan useimmiten prosenttina tunnetun lisäyksen laskennallisesta arvosta:

$$R = \left[\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right] \times 100$$

Saanto (%)

C1 = useampien tunnetuilla lisäyksillä tehtyjen mittausten keskiarvo

C2 = mittaustulos näytteestä ilman tunnettua lisäystä

C3 = tunnetun lisäyksen laskennallinen arvo

Toimintavarmuus mittaa analyysimenetelmän toimivuutta ulkopuolisten aiheuttamista poikkeavuuksista riippumatta esim. eri laboratorioiden erilaiset menettelytavat. Häiriökestävyyttä eli toimintavarmuutta voidaan testata asettamalla analyysi alttiiksi erilaisille todellisissa tilanteissa esiintyville muutoksille ja tarkkailla niiden vaikutuksia tuloksiin. (Ehder 2005:33.)

Työssämme asetamme tarkastelun kohteeksi esikäsittelyssä tapahtuvien muutosten vaikutusta analyysituloksiin sekä tarkastelemme sitä kliinisen merkityksen näkökulmasta. Jotta voidaan olla varmoja siitä, että laitteen antamat tulokset ovat oikeita, on tarkasteltava analyysin aikana tapahtuvia sekä satunnaisia että systemaattisia virheitä. Näin voidaan määrittää mittauksen kokonaisvirhe ja tuloksen tarkkuus. (Jaarinen – Niiranen 2005:13.)

Oikeellisuus voidaan määrittää vertaamalla saatuja analyysituloksia tunnetusta vertailumateriaalista saatuihin referenssiarvoihin. Referenssiarvot voidaan määrittää joko samalla tai eri menetelmällä, mutta niiden oikeellisuus tulisi olla jäljiteltävissä ja arvojen olisi hyvä olla mahdollisimman lähellä tutkittavan näytteen todellista arvoa. Oikeellisuutta voidaan todentaa muun muassa ulkoisen laaduntarkkailun avulla. (Ehder 2005:35.)

Tässä validointityössä vertailumateriaalina on käytetty referenssilaboratorion samoista näytteistä suorittamia analyysituloksia. Oikeellisuuden määrittämisen työvaiheet referenssiarvoja käyttäen ovat: tutkittavan aineen useat analyysit esimerkiksi kuudesta kymmeneen kappaletta, kunkin rinnakkaisnäytteen konsentraation määrittäminen, pitoisuuksien keskiarvon, keskihajonnan ja vaihtelukertoimen laskeminen sekä lopuksi konsentraatioiden oikeellisuuden laskeminen, joka saadaan laskemalla keskimääräinen konsentraatio prosentuaalisesti esittäen. (Ehder 2005:35.)

4.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuudella voidaan osoittaa analyysin täsmällisyyttä silloin kun määrittäykset tehdään lyhyen ajan sisällä samanlaisissa mittausolosuhteissa. Mittausolosuhteilla tarkoitetaan analyysiin vaikuttavia samoja tekijöitä kuten laitteita, reagensseja sekä lämpötilaa. Toistettavuus voidaan osoittaa riittävän monien rinnakkaismäärittysten avulla. (Ehder 2005:37.)

Toistettavuus r , voidaan ilmaista lausekkeella:

$$r = 2\sqrt{2}S_w$$

Missä S_w on laboratorion sisäinen keskihajonta (Jaarinen -- Niiranen 2005:13)

Uusittavuus kertoo menetelmän kyvystä säilyttää tarkkuutensa silloin, kun mittaus suoritetaan samasta näytteestä samalla menetelmällä eri laboratorioissa eri laitteita käyttäen (Ehder Tapio 2005:37).

Uusittavuus R, voidaan ilmaista lausekkeella:

$$R = 2\sqrt{2}S_b$$

Missä S_b on laboratorioiden välinen keskihajonta (Jaarinen – Niiranen 2005:13)

5 Tutkimusasetelma

Opinnäytetyömme tavoitteena on validoida ulosteen kalprotektiinimääritys VITA Laboratorion käyttöön. Validointi koostuu validointiprosessista, millä pyrimme osoittamaan, että RIDASCREEN® Calprotectin -testi soveltuu määrityksen tekoon käyttäen Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitetta. Suoritamme menetelmävalidoinnin, mikä käsittää etukäteen suunniteltujen mittausten sarjan. Mittauksilla pyrimme osoittamaan määrityksen antavan oikeita tuloksia. Tuloksia vertaamme referenssilaboratorion tuloksiin sekä keskenään.

Menetelmävalidoinnissa määritämme testin lineaarisuuden, sarjojen sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden sekä näytemateriaalin vaatiman esikäsittelyn vaikutusta tuloksiin. Lisäinformaatiota tulosten oikeellisuudesta antaa ulkoisten laaduntarkkailutosten vertaaminen saamiimme tuloksiin.

5.1 Aikaisemmat tutkimukset

Tutkimuksia kalprotektiinin merkityksestä suolistoalueen tulehdistilojen osoittamiseksi on julkaistu useita. Kalprotektiinia on alkuun nimitetty mm. L1-proteiiniksi ja S100A8/S100A9-proteiiniksi. Fagerhol kumppaneineen on julkaissut tutkimuksen jo vuonna 1980, missä todetaan, että valkosoluista vapautuvan L1-proteiinin normaali taso plasmassa on n. 300 ng/ml. Eri pahanlaatuisia sairauksia potevilla taso on korkeampi. (Fagerhol – Dale – Terje 1980: 393-398).

Ensimmäisen ELISA menetelmällä kalprotektiinipitoisuuden määrittämiseen ulosteesta on kehittänyt Røseth kumppaneineen vuonna 1992. Tämän jälkeen markkinoille on tullut kaupallisia kehittyneempiä ja herkempiä testejä, mihin tarvitaan pienempi määrä näyttemateriaalia. Tämän määrittämisen on todettu korreloivan hyvin kalprotektiinipitoisuuden verrattuna 111-Indiumilla leimattujen ulosteen granulosityttien kolmen päivän poistumaan elimistöstä ($r = 0.87$). (Konikoff-Denson 2006:525.)

Monet tutkijat ovat tutkineet uuden ja vanhan ELISA-menetelmän sisäistä ja välistä variaatiota ja ovat havainneet niiden olevan hyväksyttävissä rajoissa. Sisäinen variaatio on ollut <5 % ja menetelmien välinen variaatio 10 - 40 %. Tutkimus on osoittanut, että kyseinen määrittäminen soveltuisi parhaiten hoidon seurantaan kun saadaan tietoa suoliston tervehtymisestä kalprotektiinipitoisuuden laskiessa. (Konikoff-Denson 2006:525.)

van Rheenen kumppaneineen on tehnyt meta-analyysin tutkimuksista, missä ulosteen kalprotektiinipitoisuuksia on verrattu endoskopia- ja histologisiin koepaloihin. Tarkoituksena on ollut selvittää, voiko kalprotektiinia pitää luotettavana merkkiaineena tulehduksellisissa suolistosairauksissa, jotta ne joiden kalprotektiinipitoisuus ei ylitä raja-arvoa, ei tarvitsisi läpikäydä vaativia ja kalliita invasiivisia toimenpiteitä. Luotettaviksi tutkimuksiksi on hyväksytty ne tutkimukset, missä tutkivalla lääkärillä ei ole ollut etukäteen tietoa potilaan kalprotektiinipitoisuudesta, eikä kalprotektiinia määrittävillä ole ollut tietoa endoskopia- ja histologisten tutkimusten tuloksista. Tutkimuksista kuudessa vertailtiin aikuisten tuloksia ($n=670$) ja seitsemässä lasten ja teini-ikäisten tuloksia ($n=371$). Mitattaessa kalprotektiinipitoisuutta aikuisilta, vähentäisi se tarvittavia endoskopiaa 67 %. Kuudella prosentilla kalprotektiinipitoisuus antoi väärän negatiivisen tuloksen, joten näiden hoito olisi viivästynyt ilman endoskopiaa. Lapsilla se taas vähentäisi 35 % invasiivisia toimenpiteitä ja kahdeksalla prosentilla kalprotektiinipitoisuus

antoi väärän negatiivisen tuloksen. Johtopäätöksenä oli, että määrittäminen olisi hyvä vähentämään kalliita tutkimuksia, mutta parempi arvioimaan aikuisten suolistosairauksia kuin lasten. (vanRheenen – Van de Vijver – Fidler 2010:1.)

A. G. Røseth on kommentoinut artikkelissaan Costan ja kumpaneidensa tutkimusta siitä onko ulosteen kalprotektiinipitoisuuden määrittäminen ELISA-menetelmällä hyvä erottamaan orgaaninen ja toiminnallinen suolistohäiriö, eli tulehduksellinen suolistosairaus ja ärtynneen suolen oireyhtymä. Røseth toteaa, että Costa kumppaneineen on päässyt samaan lopputulemaan kuin hän omissa tutkimuksissaan. Tutkittaessa kalprotektiinipitoisuutta ja suoliston tilaa endoskooppisesti, on havaittu kalprotektiinin olleen normaalilla tasolla silloin kun suoliston tähtystyksessäkin on havaittu terve limakalvo. Näin ollen F –Calpron ollessa alle raja-arvon, ei invasiivista tutkimusta tarvitsisi tehdä. (Røseth 2003: 607 - 608.)

Uuden herkemmän menetelmän tultua markkinoille on F –Calpron -pitoisuuden yksiköksi vakiintunut $\mu\text{g/g}$ aiemman mg/l sijaan. Aiemman testin tulokset voidaan muuttaa nykyiseen yksikköön kertomalla tulos viidellä. Yleisesti normaaliksi kalprotektiinipitoisuuden raja-arvoksi on asetettu $50 \mu\text{g/g}$. Jotkut tutkijat kuitenkin ovat arvioineet, että etenkin niiden potilaiden, joilla tiedetään olevan tulehduksellinen suolistosairaus, on raja-arvoksi vakiintunut $100 -150 \mu\text{g/g}$, riippuen kuitenkin käytettävästä testistä. (Gisbert –McNicholl 2009:60-61)

5.2 Työtä ohjaavat kysymykset

Pyrimme saamaan työmme tuloksena parametreja, jotka antaisivat mahdollisuuden todeta RIDASCREEN® Calprotectin-testin oikeellisuuden Bio-Rad Evolis Twin Plus System laitetta käyttäen F -Calpro määrittäystä suoritettaessa. Jotta haluttu lopputulos saavutettaisiin, laadimme neljä työprosessia ohjaavaa tutkimuskysymystä:

1. Miten VITA Laboratorion tulokset vastaavat referenssilaboratorion tuloksia?
2. Millainen on sarjan sisäinen variaatio, lineaarisuus sekä sarjojen välinen toistettavuus?
3. Millainen vaikutus esikäsitteilyllä on tuloksiin?
4. Miten VITA Laboratorion F -Calpro määrittäksen tulokset asettuvat ulkoisen laaduntarkkailun keskiarvoihin?

6 Työn toteutus

Tutkimuksemme lähtökohtana olivat työelämän tarpeet. Tutkimuskohteenamme oli käytäntö, jonka käyttöönotto vaati suunnitelmallisen tutkimuksen. Toimeksiantajamme VITA Laboratorio oli laatinut validointisuunnitelman, mihin työmme toteutus perustui. Validointisuunnitelma löytyy liitteestä 1. Varsinainen tutkimusosiomme toteutus tapahtui keväällä 7. -11.5.2012. Toteutuksen yhteydessä työmme ohjaajat sairaalamikrobiologi Päivi Kankkunen ja bioanalytikko Heli Nieminen perehdyttivät meitä Evolis -laitteen käyttöön ja kalprotektiinin määritysmenetelmään.

Ennen opinnäytetyömme toteutusosiota toimeksiantajamme oli ohjelmoinut ulosteen kalprotektiinimäärityksen ohjelman Bio-Radin Evolis Twin Plus System -laitteelle. Samoin he olivat määrittäneet etukäteen esitutkimuksena 67:sta näytteestä ensimmäiset 12 kalprotektiininäytettä, varmistaakseen, että laite toimii odotetulla tavalla ja antaa referenssituloksia vastaavia tuloksia. Näiden määritysten perusteella validointi pystyttiin aloittamaan.

6.1 Näyttemateriaali

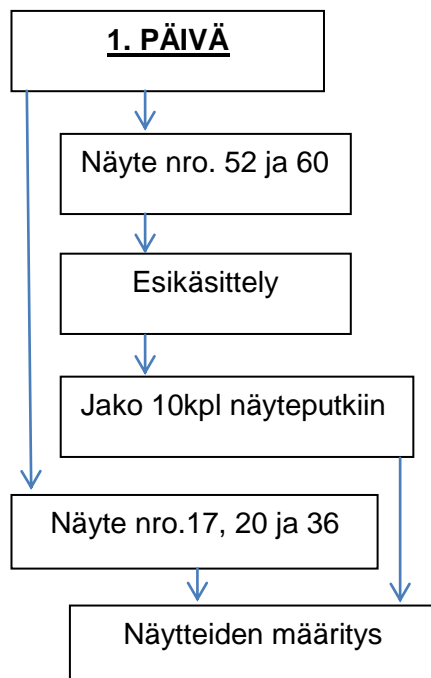
Tutkimusmateriaalinamme olivat valikoidut aikuisväestön potilasnäytteet, jotka olivat kalprotektiinipitoisuuden suhteen eritasoisia. Tutkimukssamme oli näin edustettuna mahdollisimman laajasti mittausalueelle osuvia tuloksia. Toimeksiantajamme oli siirrotanut referenssilaboratorioon lähetettävistä potilasnäytteistä osan eppendorf – putkiin menetelmävalidointia varten. Saimme suullisen luvan VITA Laboratoriolta niiden käyttämiseen. Näytteet olivat noin kolme kuukautta vanhoja potilasnäytteitä, joita oli säilytetty pakastettuna. Osa näytteistä oli kuukauden tuoreempia. Näytteet olivat valmiiksi numeroituja, eikä potilastietoja ollut missään vaiheessa näkyvissämme. Sulatimme jokaisen näytteen reagenssipakkauksen ohjeen mukaisesti hitaasti huoneenlämpöiseksi ennen niiden analysointia.

Analysoimme opinnäytetyössämme 67 eri ulosteen kalprotektiininäytettä, jotka olivat analysoitu jo aiemmin referenssilaboratoriossa. Referenssitulokset olivat määritetty käyttäen saman valmistajan reagenssipakkausta, mutta niiden määrittämiseen oli käytetty DSX® Four-Plate Automated ELISA Processing System -laitetta mikä on vastaava kuin tässä työssä käytetty, mutta eri valmistajan laite. Referenssitulokset olivat käytettävissämme validointia varten.

6.2 Menetelmävalidoinnin suoritus

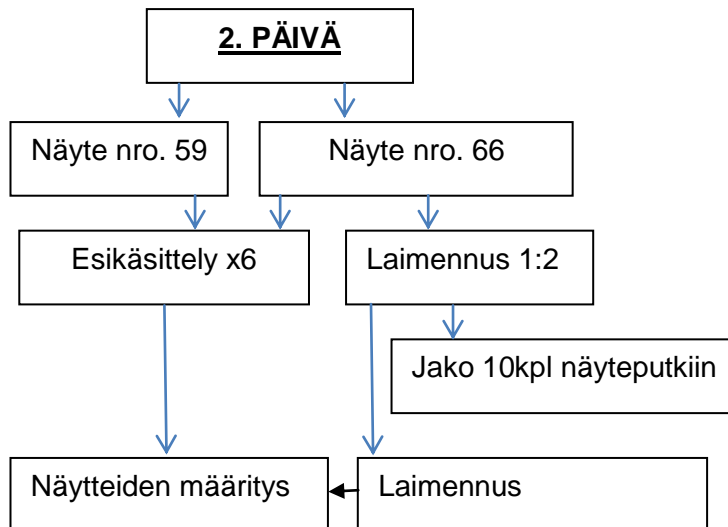
Alkuun suunnittelimme toteutusaikataulun toimeksiantajamme kanssa sekä perehdyimme menetelmään ja Evolis -laitteeseen käytännössä. Validointisuunnitelman perusteella lähdimme toteuttamaan varsinaista menetelmävalidointia.

Ensimmäisenä tutkimuksen toteutuspäivänä tarkastelimme sarjan sisäistä toistettavuutta kahdella eritasoisella näytteellä. Teimme toistettavuustestin näytteille numero 52 ja 60. Esikäsittelimme näytteet samalla tavalla ja jaoimme näytteiden supernatantit kymmeneen eri näyteputkeen. Näyte 52 oli matala positiivinen, jonka referenssilaboratorion tulos oli 109 µg/g ja näytteen 60 tulos korkea positiivinen 631 µg/g. Lisäksi määritimme samassa ajossa kolme eritasoista näytettä (numerot 17, 20 ja 36) verrataksemme niitä referenssituloksiin, jotta saisimme lisäinformaatiota ensimmäisen määrittämisen tulosten oikeellisuudesta ja tietoa laitteen toimintakyvystä, kyetäksemme jatkamaan validointiprosessia. Näytteen 17 referenssitulos oli 352 µg/g, näytteen 20 tulos 109 µg/g ja näytteen 36 tulos 633 µg/g. Näytteistä numero 66 ja 36 ei saatu tuloksia, sillä niiden absorbanssi ylitti laitteen mittauskyvyn, joten jouduimme uusimaan toisella näytteellä sarjan sisäisen toistettavuustestin, jotta riittävä informaatio saavutettaisiin.



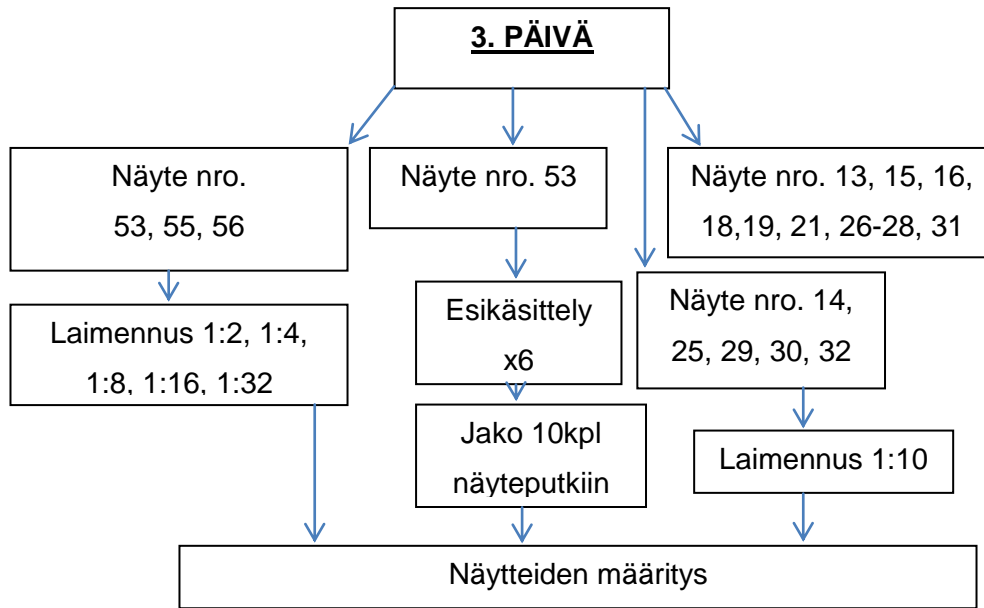
Kuvio 5. Ensimmäisen tutkimustoteutuspäivän näytteiden kulku

Toisena tutkimuksen toteutuspäivänä tarkastelimme esikäsitellyn vaikutusta. Suoritimme kuusi esikäsitelyä kahdelle eritasoiselle näytteelle (näyttenumerot: 59 ja 66). Näytteen 59 referenssitulos oli 42 µg/g ja 66 referenssitulos 705 µg/g. Ensin laimensimme näytteen numero 66 näytelaimennosekstraktiin 1:2 ja teimme tästä kymmenen toiston sarjan kuten ensimmäisenä päivänä näytteille numero 52 ja 60. Tämän jälkeen laimensimme supernatantit 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16 näytelaimennosekstraktiin näyttenumeron 66 aiemman laitteen mittauskyvyn ylityksen vuoksi.



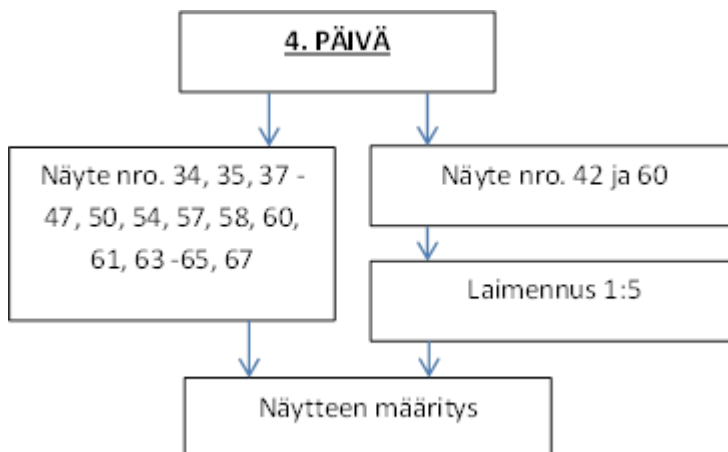
Kuvio 6. Toisen tutkimustoteutuspäivän näytteiden kulku

Kolmantena tutkimuksen toteutuspäivänä tarkastelimme menetelmän lineaarisuutta. Laimensimme esikäsitellyt näytteet numerot 53, 55 ja 56 näytteidenlaimennosekstraktiin laimennussuhtein 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 sekä 1:32. Näytteen numero 53 referenssiarvo oli 98 µg/g, näytteen 55 arvo oli 527 µg/g ja näytteen 56 arvo oli 249 µg/g. Tällä asettelulla pyrimme tarkastelemaan määrittämyksen luotettavuutta mittausalueella. Lisäksi jatkoimme sisäistä toistettavuustutkimusta toistamalla määrittämyksen näytteelle numero 53 kymmenen kertaa. Esikäsitelytutkimusta jatkoimme esikäsittelemällä näytteen numero 53 kuuteen kertaan. Tutkiaksemme uusittavuutta suoritimme näytteiden 13 -16, 18, 19, 21, 25- 32 kalprotektiiniarvomäärittämykset, joista numeroiden 14, 25, 29, 30, 32 supernatantit laimennettiin 1:10 näytteidenlaimennosekstraktiin, jotta laite kykeinsi mitaamaan niiden absorbanssin. Tätä tutkimusosiota varten sovimme toimeksiantajamme kanssa poikkeuksellisesti ulosteen määrän alarajaksi 50mg, vaikka reagenssipakkauksen ohje on 80-130mg, sillä joissakin tutkimusta varten kerätyissä näytteissä oli liian vähäinen ulostemäärä.



Kuvio 7. Kolmannen tutkimustoteutuspäivän näytteiden kulku

Viimeisenä tutkimuksen toteutuspäivänä suoritimme näytteille 34, 35, 37 -47, 50, 54, 57, 58, 60, 61, 63 -65, 67 joista numeroiden 42 ja 60 supernatantit 1:5 laimennettuna näytteidenlaimennosekstraktiin. Vertailemalla näiden tuloksia referenssiarvoihin, saimme tietoa menetelmän uusittavuudesta. Referenssiarvot löytyvät liitteestä 2. Saimme määritettäväksemme myös ulkoiset laaduntarkkailunäytteet, mitkä antoivat lisäinformaatiota määrittämisen luotettavuudesta.



Kuvio 8. Neljännen tutkimustoteutuspäivän näytteiden kulku

7 Tulokset

Tuloksia tarkastelimme kvantitatiivisin tutkimusmenetelmin. Tässä tutkimusmallissa mittauksia tehtiin useita ja jotta tuloksia voidaan pitää luotettavina ja korreloivan mahdollisimman paikkansapitävästi perusjoukon tilaa, edellyttää se riittävää havaintojen määrää. Määrällisen tutkimuksen perustana on positivismi, jolla pyritään absoluuttiseen ja objektiiviseen totuuteen (Kananen 2008: 64).

Koska työmme täyttää kvantitatiivisen tutkimusmenetelmän kriteerit, käsitelimme tuloksia siihen tarkoitettuja tunnuslukuja käyttäen. Tunnuslukuja ovat keskilukuihin ja hajontalukuihin jakautuvat määreet, jotka ilmaisevat jakauman keskikohtaa ja hajontaa. Keskilukuina käytimme aritmeettista keskiarvoa, mediaania ja moodia, joiden avulla voimme ilmaista keskikohdan sekä kuvata muuttujan keskimääräisen arvon. Hajontalukuina käytimme vaihteluväliä, keskihajontaa ja variaatiokerrointa. Hajontalukujen avulla kuvaamme tulosten asettumista keskikohdan ympärille ja voimme määrittää poikkeavuuden jakauman keskiluvusta. (Tilastokeskus.) Näiden lisäksi tutkimme VITA Laboratorion ja referenssilaboratorion tulosten riippuvuutta.

7.1 Uusittavuus

Toteutetuista mittauksista (n= 67) jäi tulokset saamatta yhdeksästä näytteestä ja onnistuneita oli 58 kappaletta, joten kokonaisuonnistumisprosentti oli 87 % (Liite 1). Syitä tulosten puuttumiselle olivat mm. tulosten mittausalueen ylitykset sekä laitteesta johtuvat pipetointivirheet. Epäonnistuneet uusittavuusmittaukset jätettiin aikataulullisista syistä toistamatta, sillä validoinnin kokonaistilanteen kannalta onnistuneita havaintoja oli riittävästi.

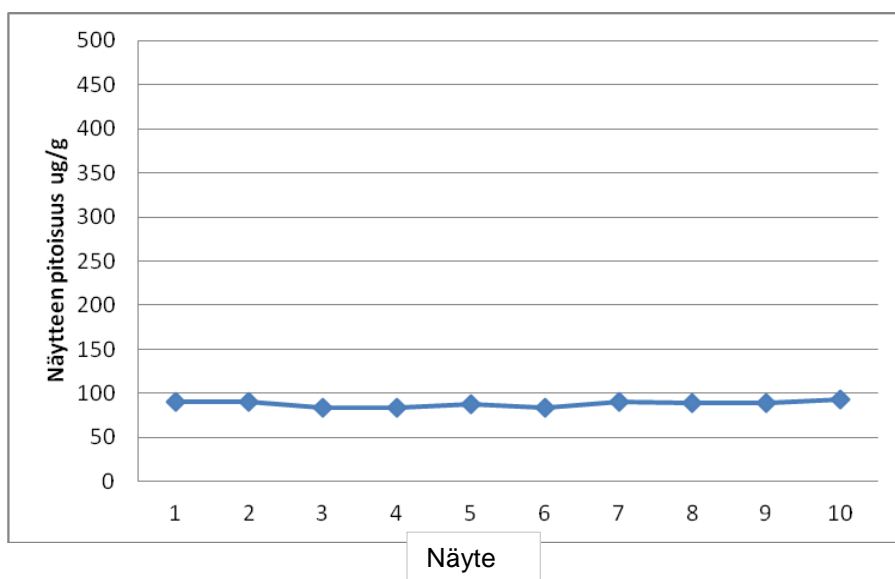
Tulosten perusteella VITA Laboratoriossa mitatut arvot olivat 72 % näytteistä (n= 42), 19 % pienempiä (n= 11) ja 9 % (n= 5) saman suuruisia kuin referenssiarvot, joka osoittaa, että tutkimuskohteemme VITA Laboratorion määrittämisen tulokset ovat suurimmaksi osaksi suurempia kuin vertailussa käytetyn referenssilaboratorion tulokset, mikä selittyy osittain näytteiden säilytyksellä pakastettuina, sillä tutkimusten mukaan pakastettuina säilytettyjen näytteiden kalprotektiinipitoisuudet voivat olla mitattaessa korkeampia (RIDASCREEN® Calprotectin 2011).

Tutkituista näytteistä (n=67) viidessä tapauksessa VITA Laboratorion tulos antoi positiivisen arvon eli tulos ylitti diagnostisen pitoisuuden 100 µg/g, kun sama näyte oli referenssilaboratorion tulosten perusteella sen alle, eli diagnostisesti negatiivinen. Vain yhdessä tapauksessa tilanne oli päinvastainen, jolloin referenssilaboratorion mukaan näyte oli positiivinen ja VITA Laboratorion mukaan negatiivinen.

Kaikkien VITA Laboratorion ja referenssilaboratorion näytteiden mitattujen tulosten erotusten keskiarvo on 200 µg/g, mediaani 45, moodi: 0, vaihteluväli 0 - 1730 µg/g, keskihajonta 347 µg/g ja variaatiokerroin 174. Näiden tulosten perusteella voimme todeta, että vertailun keski- ja hajontaluvut ovat korkeita, joten tämän johdosta toteamme, että kyseisen määrityksen validointiin tarvitaan jatkotutkimuksia, jotta tulokset olisivat jatkossa luotettavia.

7.2 Sarjan sisäinen variaatio

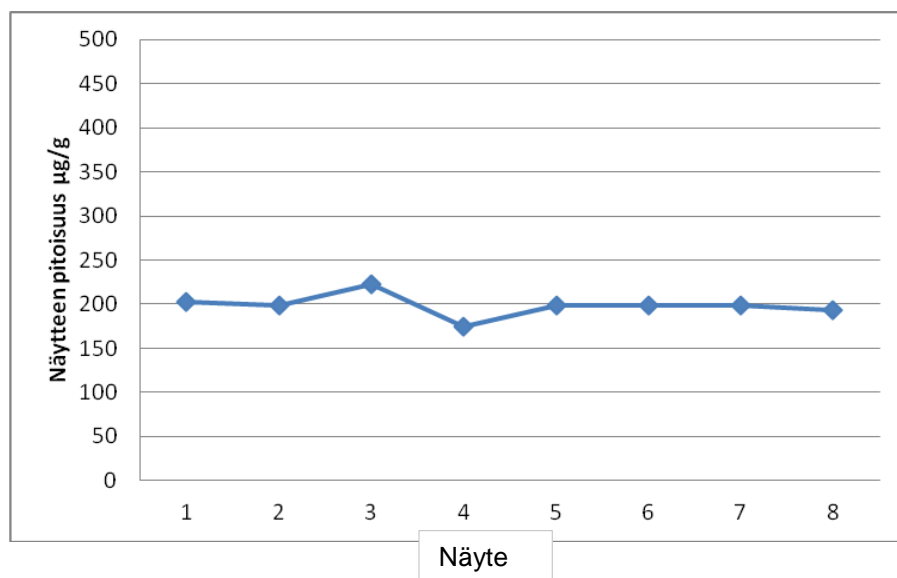
Tämän tutkimusosion tarkoituksena oli selvittää testisarjan sisäinen toistettavuus, jota varten meille oli valittu kaksi eri odotusarvoista näytettä, joiden esikäsittelyt eivät poikenneet toisistaan. Jaoin molemmat näytteet kymmeneen eri näyteputkeen (Kuvio 9 ja 10 sekä liite 3).



Kuvio 9. Ensimmäinen testisarjan sisäinen toistettavuustesti kymmenellä näyteputkella (n=10)

Saamiemme tulosten perusteella voimme todeta, että validointityö täyttää toistettavuudeltaan vaaditut ominaisuudet ensimmäisen testisarjan osalta, jossa keskiarvo 88 µg/g, vaihteluväli oli 84 µg/g - 93 µg/g, keskihajonta 3 µg/g ja variaatiokerroin 3. Tässä sa-

man näytteen toistetut määrittystulokset eivät poikenneet toisistaan suuresti minkä lisäksi niiden diagnostiset arvot antoivat saman tuloksen.

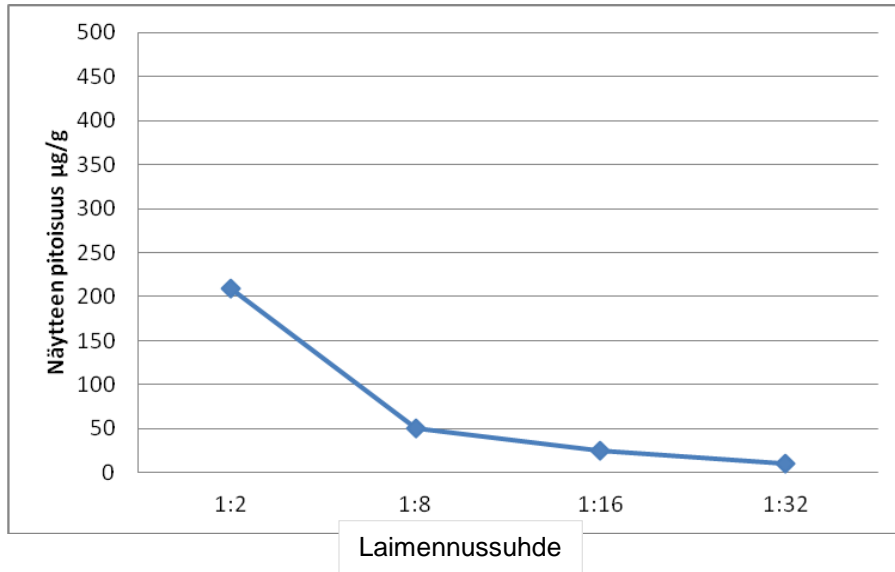


Kuvio 10. Toinen testisarjan sisäinen toistettavuustesti kymmenellä näyteputkella, joista tulokset kahdeksasta (n=8)

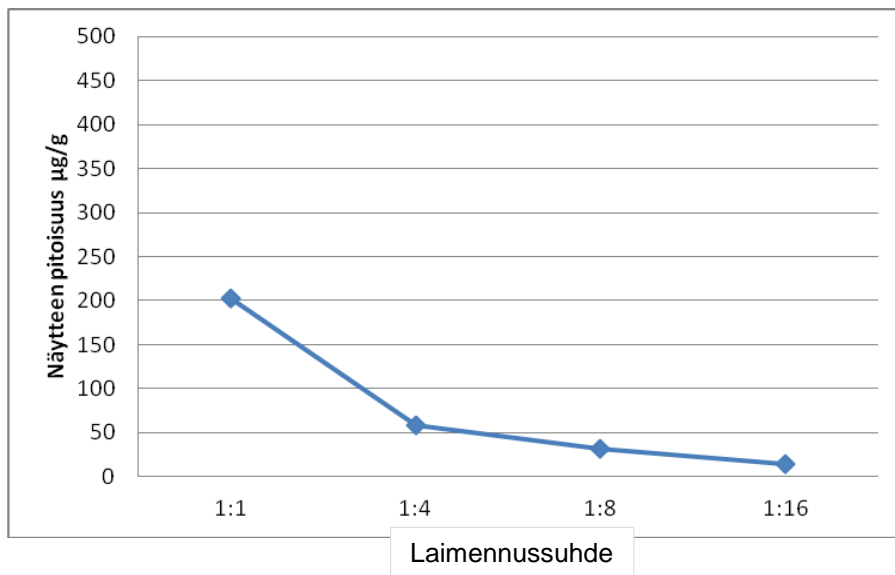
Toisesta toistettavuuden mittaussarjasta saimme tulokset vain kahdeksasta, sillä näistä näytteistä kaksi oli sakkaisia, joten kone ei niitä pystynyt pipetoimaan. Tämän testisarjan vaihteluväli oli 175 µg/g - 223 µg/g, keskiarvo 196 µg/g, keskihajonta 12 µg/g ja variaatiokerroin 6. Näiden lukujen perusteella voimme todeta, ettei tulos täytä toistettavuuden osalta vaadittuja ominaisuuksia vaan jatkotestejä validoinnin suhteen olisi edelleen hyvä suorittaa.

7.3 Testin lineaarisuus

Tässä tutkimusosiossa tarkastelimme määrittelyn lineaarisuutta. Teimme kolmesta näytteestä laimennussarjat. Laimensimme kaikki kolme näytettä viiteen eri väkevyyteen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 sekä 1:32. Ensimmäisestä ja toisesta näytteestä saimme tulokset neljästä mittauksesta (kuvio 11 ja 12 sekä liite 3), joista ensimmäisen tulos jäi saamatta, koska 1:1 näyte ylitti mittausrajan ja toisesta tulos jäi saamatta pipetointivirheen vuoksi. Kolmannesta näytteestä saimme vain kolme määrittysarvoa, koska siitä sarjasta jäi kaksi arvoa pois näytteen ulosteperäisten partikkeleiden vuoksi, jolloin laite ei voinut pipetoida nestettä, vaan sakka tukki pipetinkärjen, jolloin Evolis -laitteen ohjelma ohitti kyseisen näytteen.



Kuvio 11. Linearisuustestin ensimmäinen laimennossarja

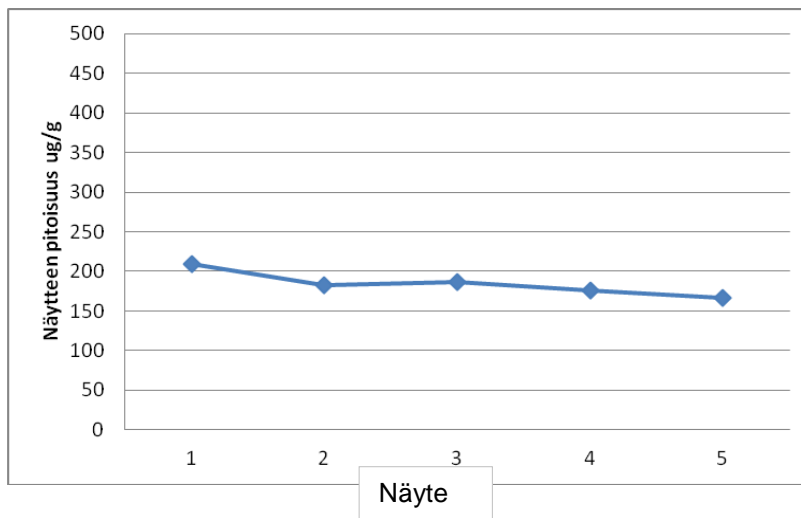


Kuvio 12. Linearisuustestin toinen laimennossarja

Näiden tulosten tarkoituksena on antaa numeraalista informaatiota toimeksiantajalle lineaarisen mittausalueen määrittämistä varten. Laimennusten osalta arvot noudattavat laimennussuhteiden pitoisuuksia ja tulokset ovat luotettavia, joten saatujen arvojen puitteissa ne ovat päteviä käyttötarkoitukseensa.

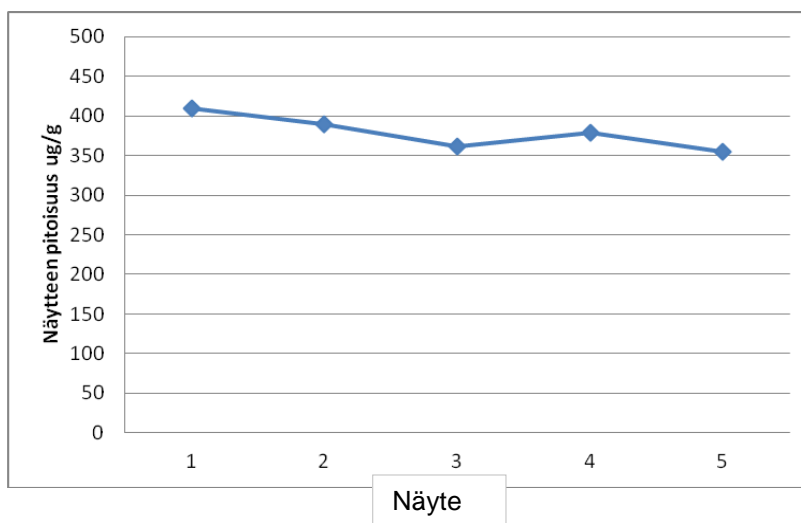
7.4 Sarjojen välinen toistettavuus

Sarjojen välistä toistettavuutta tarkastelimme kontrollinäytteiden avulla (Kuvio 13 ja 14 sekä liite 3). Tutkimuksessamme oli mukana kymmenen kontrollinäytettä, jotka koostuivat viidestä matalan positiivisen pitoisuudesta sekä viidestä korkean positiivisen pitoisuudesta.



Kuvio 13. Sarjojen välisen toistettavuuden testi, matala positiivinen

Matalan positiivisen kontrollinäytteen tulosten vaihteluväli on 43 $\mu\text{g/g}$, keskiarvo on 184 $\mu\text{g/g}$, keskihajonta 14 $\mu\text{g/g}$ ja variaatiokerroin 8. Korkean positiivisen kontrollinäytteen tulosten vaihteluväli on 355 $\mu\text{g/g}$ - 409 $\mu\text{g/g}$, keskiarvo 379 $\mu\text{g/g}$, keskihajonta 19 $\mu\text{g/g}$ ja variaatiokerroin 5.

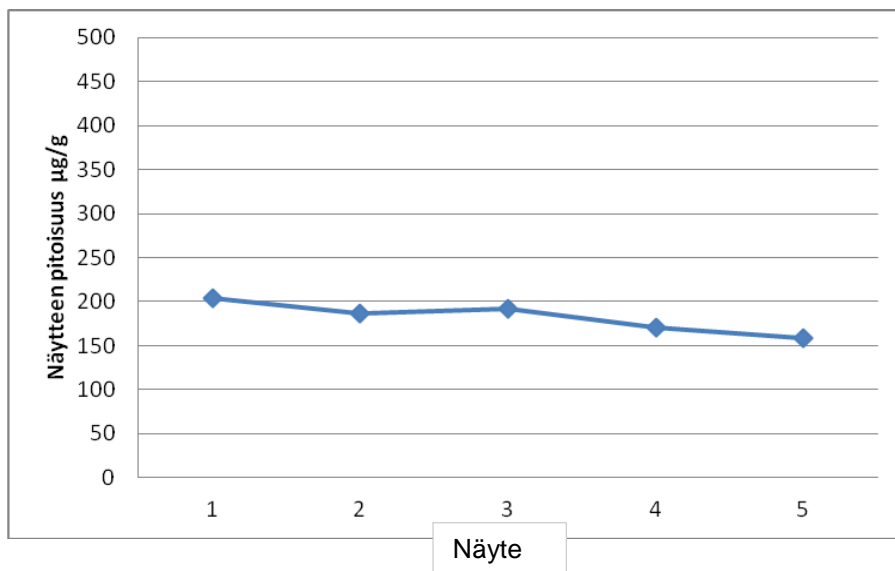


Kuvio 14. Sarjojen välisen toistettavuuden testi, korkea positiivinen

Tulosten perusteella mittausten välisiä eroja on jonkin verran, sillä mitattujen pitoisuuksien vaihteluväli oli suurimmillaan 54 µg/g, joten kehottaisimme tämänkin tutkimusosuuden perusteella jatkamaan validointityötä lisämittauksin.

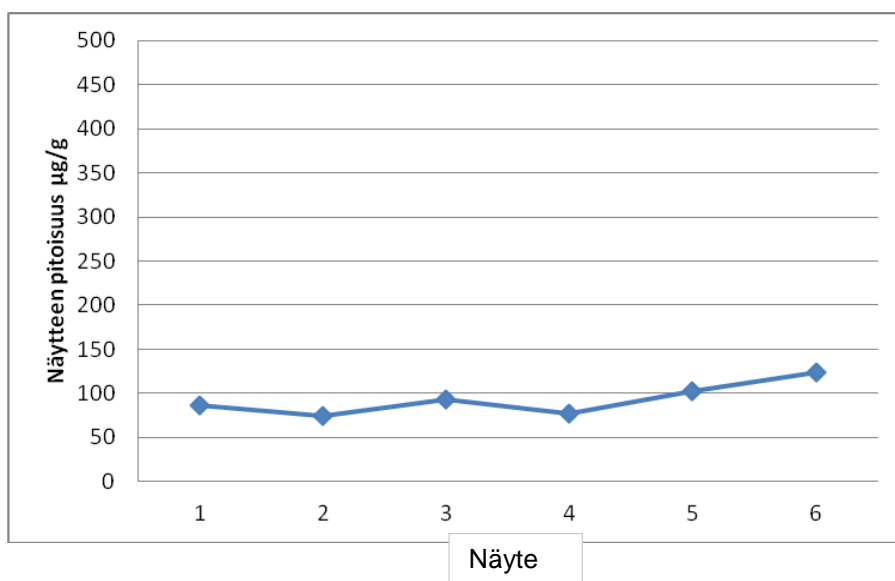
7.5 Esikäsittelyn vaikutus

Koska kalprotektiinimäärityksen esikäsittely tehdään käsityönä punnitsemalla uloste vaa'alla, tulee jokaiseen näytteeseen työntekijästä riippuva virhemahdollisuus. Tutkimme käsityönä tehdyn esikäsittelyn mahdollista vaikutusta tuloksiin. Tähän tutkimukseen meille oli valittu kaksi eri pitoisuustason näytettä, joista molemmista valmistimme kuusi eri näytettä, joista jokainen esikäsiteltiin erillisenä näytteenä ja analysoitiin (Kuviot 15 ja 16 sekä liite 3).



Kuvio 15. Ensimmäinen esikäsittelyn vaikutustutkimus viidestä käsittelystä

Ensimmäisen sarjan viimeisestä näytteestä ei tullut tulosta näytteen sakkaisuuden vuoksi, joten tarkastelemme tuloksia viiden arvon avulla. Mitattujen arvojen vaihteluväli oli 158 µg/g - 204 µg/g, keskiarvo 204 µg/g, keskihajonta 16 µg/g ja variaatiokerroin 8.



Kuvio 16. Toinen esikäsitteilyn vaikutustutkimus kuudesta käsitteystä

Toisen esikäsitteilyserjan mitattujen arvojen, vaihteluväli oli 74 µg/g - 124 µg/g, keskiarvo 93 µg/g, keskihajonta 17 µg/g ja variaatiokerroin 18. Tulosten perusteella näyttäisi siltä, että esikäsitteilyllä voisi olla vaikutusta tulokseen, sillä vaihteluvälit ovat niin korkeat, mutta koska työmme muissakin osioissa on havaittavissa korkeita hajontalukuja, tähdentäisimme edelleen jatkotutkimusten merkitystä kalprotektiinimäärityksen osalta.

7.6 Ulkoinen laaduntarkkailu

Ulkoisille laaduntarkkailukierroksille eli vertailumittauksiin voi laboratorio osallistua osoittaakseen ja varmentaakseen mittaustulostensa oikeellisuuden. Vertailumittausten käytön tavoitteina ovat mm. laadun parantaminen sekä laboratorioiden tulostasojen yhdenmukaisuuden ylläpito. Sen tulokset antavat tietoa sekä laboratorioiden välisistä menetelmien tarkkuudesta että hajonnasta. (Loikkanen 2009:125) Käytimme työssämme ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä varmistaaksemme validoinnin oikeellisuuden, sillä niiden avulla voidaan tarkastella sekä käytössä olevan menetelmän käyttökelpoisuutta että näytteen käsitteilyn tasoa valtakunnallisella mittakaavalla (Muttonen 2000:25).

Ulkoisten vertailumittausten näytteet ovat tutkimuksen kohteena olevan tekijän suhteen mahdollisimman samankaltainen kuin oikea potilasnäyte, mutta lähinnä säilyvyyden vuoksi ne ovat usein laboratoriossa ennen analyysiä regeneroitavia kylmäkuivattuja näytteitä eikä näin ollen täysin vastaa oikeaa näytettä (Nissinen 2000:24).

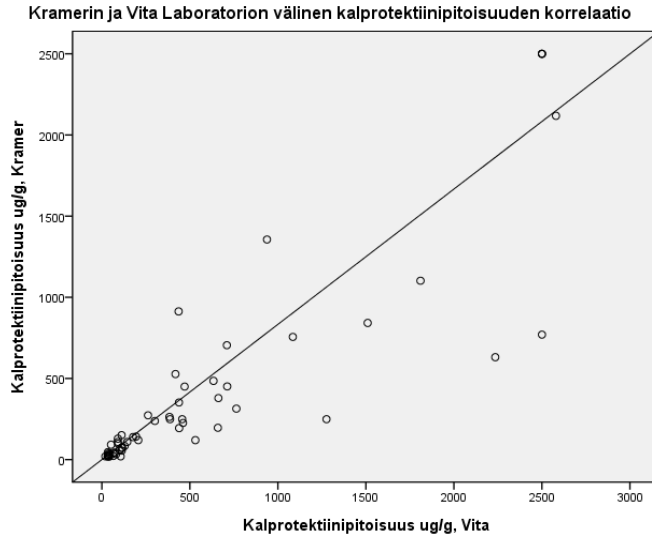
Käytimme Suomen ulkopuolelta saatuja ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä. Materiaaleiksi annetut näytteet olivat kaksi nestemäistä ja kaksi kiinteää näytettä, jotka olivat käytettävissä sellaisinaan, kuten potilailta kerätyt tuorenäytteet olisivat olleet. Saamamme tulokset asettuivat vertailussa hieman korkeammalle tasolle kuin muiden laboratorioiden, joka noudatti samaa linjaa kuin muista tutkimusosioista saadut tulokset.

7.7 Korrelaatio

Validointityömme tulosten tarkastelussa käytimme apuna myös tilastomenetelmän testejä. Tulosten riippuvuutta tarkastelimme regressioanalyysin avulla, jossa pyritään selvittämään kahden muuttujan välistä riippuvuuden muotoa. Tämä tapahtuu etsimällä hajontakuviolle matemaattisesti mahdollisimman parhaiten kuvaavaa suoraa. Suoran oikeellisuuden hyvyyttä määrittävät suoran pienet jäännösarvot. (Kananen 2008:65.)

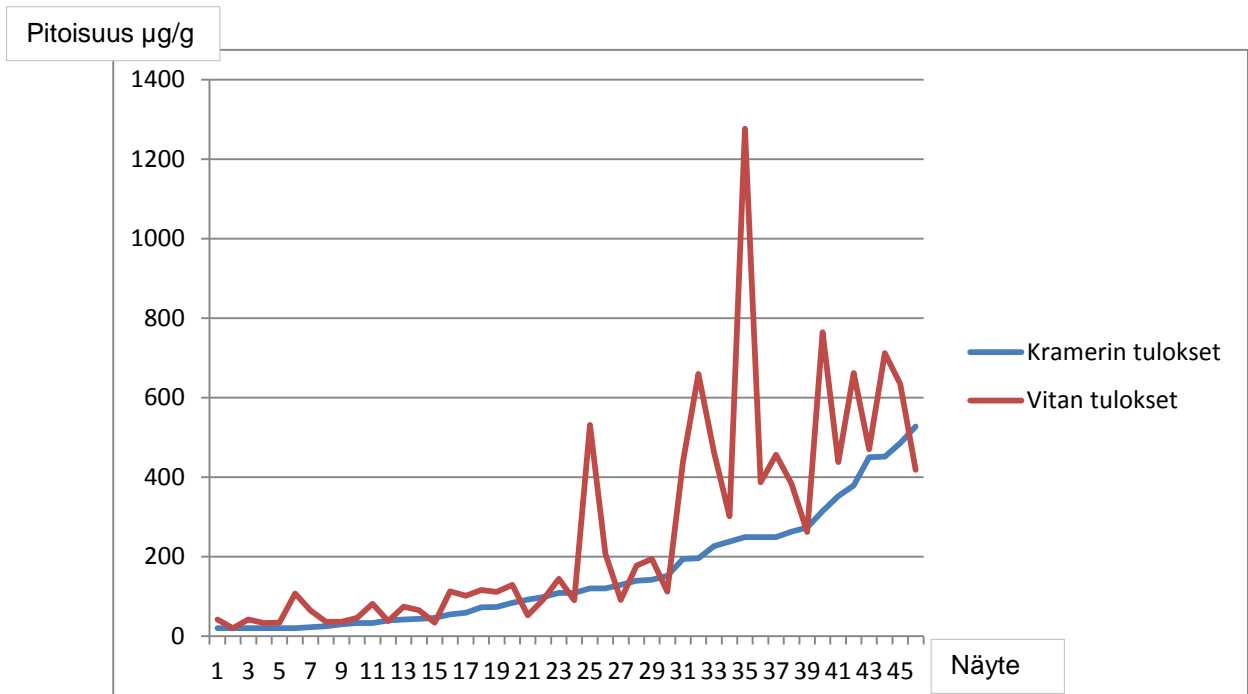
Regressiosuoran yleinen muoto on: $Y = a + bX$, jossa Y on riippuva muuttuja ja X riippumaton muuttuja. Regressiokerroin b on suoran kulmakerroin ja ilmaisee miten Y :n suhde X :ään muuttaa suoran muotoa. Se, miten hyvä regressiosuora on, voidaan tarkastella r^2 -arvon avulla. Tämä arvo kertoo prosentuaalisen määrän havaintoarvoja, joiden kautta suora kulkee. Tässä työssä tulosten regressiosuoran r^2 -arvo on 0,76, joka tarkoittaa, että regressiosuora pystyy selittämään 76% jäännösarvoista, jolloin suoran selityskyky on hyvä. (Kananen 2008:65.)

Kuvion avulla on havainnollistettu VITA Laboratorion ja referenssilaboratorion keskinäisten tulosten erotusten riippuvuutta. Kun näitä tuloksia tarkastellaan, on otettava huomioon VITA Laboratorion mittausraja, joka on 14,4 - 600 $\mu\text{g/g}$, jonka johdosta sen ylittävät tulokset eivät ole tarkkuudeltaan laimentamattomana päteviä. Tämä aiheuttaa isoa hajontaa, joka on todettavissa myös kuviosta. Riippuvuustarkastelun perusteella voimme siis huomata, että hajonta on sitä suurempaa mitä suuremmasta näytteen kalprotektiinipitoisuudesta on kyse eikä VITA Laboratorion ja referenssilaboratorion tuloksilla ole vahvaa riippuvuutta silloin kun tarkastelemme annettuja lukuja kokonaisuudessa vaan hajonta on melko suurta. Mikäli tarkastelemme vain alle 600 $\mu\text{g/g}$ tuloksia, riippuvuus on vahvempi (Kuvio 17).



Kuvio 17. VITA Laboratorion tulokset referenssitulosten suhteen hajontakuviota ja regressiosuoran avulla esitettynä.

Alla olevasta kuviosta 18 voidaan nähdä tulosten keskinäinen poikkeavuus, kun Kramerin tulokset ovat järjestetty pienimmästä suurimpaan. Asetimme tässä tarkemman tarkastelun kohteeksi näytteet, joiden pitoisuus oli enintään 600 $\mu\text{g/g}$, joka on VITA Laboratorion hyväksytty mittausraja laimentamattomalle näytteelle.



Kuvio 18. VITA Laboratorion ja Kramerin tulosten vertailu tilanteessa, jossa referenssilaboratorion tulokset on asetettu suuruusjärjestykseen.

8 Tulosten luotettavuuden arviointi

Kaikissa laboratoriotutkimusten vaiheissa esiintyy virhemahdollisuuksia, jotka tulee huomioida tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Tarkastelemme työmme virhelähteitä enimmäkseen analyttisten vaiheiden osalta, sillä emme juuri voineet vaikuttaa preanalyttisiin tekijöihin. Postanalytiikan osalta keskitymme validointityön laboratoriomääritystulosten luotettavuuden arviointiin.

Jotta laboratoriotulos olisi luotettava, on varmistettava että näyte täyttää annetut laatuvaatimukset. Tutkimuksemme kannalta mahdolliset preanalyttiset virhelähteet liittyvät näytteen oikeaan säilytykseen ja käsittelyyn. Tutkittavat näytteet olivat etukäteen osaaavan laboratoriohenkilökunnan keräämiä potilasnäytteitä ja näytteitä oli säilytetty alle –20 °C:ssa mikä saattoi kuitenkin vaikuttaa tuloksiin nostavasti. Analytiikkavaiheen virhelähteitä ovat näytteen esikäsittelyssä tapahtuvat virheet, reagenssien säilytys- ja laaturvirheet sekä Evolis -laitteen toimintaan liittyvät ongelmat. Tutkimuksessamme tuloksiin vaikuttavia virheitä olivat näytteiden riittävyys, näytteiden ulosteperäisistä partikkeleista johtuvat pipetointiongelmat ja näytteiden suurista kalprotektiinipitoisuuksista johtuvat Evolis -laitteen fotometrisen mittauskäytön ylitykset.

Evolis –laitteella toteutettuja, tutkimuksemme määritystulosten luotettavuutta, voimme arvioida kontrollitulosten avulla. RIDASCREEN® Calprotectin (2011) -reagenssipakkausohjeen mukaan matalan positiivisen kontrollin tarkka tavoitearvo on $156 \mu\text{g/g} \pm 3 \text{ sd}$ eli tuloksen tulee olla välillä 94 - 218 $\mu\text{g/g}$. Työssämme matalan positiivisen kontrollin keskiarvo oli 184 $\mu\text{g/g}$, joka asettuu täysin annettuihin tavoitearvoihin. Korkean positiivisen kontrollin tarkka tavoitearvo on $381 \mu\text{g/g} \pm 3 \text{ sd}$ eli tuloksen tulee olla välillä 229 - 533 $\mu\text{g/g}$. Työssämme korkean positiivisen kontrollin keskiarvo oli 379 $\mu\text{g/g}$, joka myös asettuu täysin annettuihin tavoitearvoihin. Tämän lisäksi negatiivisena kontrollina toimivan näytelaimentimen absorbanssiarvon tulee olla $< 0,05$, joka toteutui työssämme jokaisessa määrityksessä. Näin ollen kontrollien osalta työssä saamamme tulokset ovat luotettavia.

Kalibraattorin absorbanssin tarkka tavoitearvo on käyttämässämme pakkauksessa 1,549, mutta arvo saa vaihdella 0,838 - 1,954 välillä (RIDASCREEN® Calprotectin 2011). Tulostemme mukaan kalibraattorin absorbanssiarvo on ollut yhdellä määritys-

kerralla annettujen tavoitearvojen sisällä ja muissa määrityksissä kalibraattorin absorptiosuarvo ylittyi enintään 0,174. Koska kalibraattorin arvo vaikuttaa neljän parametrin perusteella laskettuun standardikuvaajaan, vaikuttaa se myös suoritettujen kalprotektiinimääritysten tuloksiin. Tämä kertoo, että määrityksissä on taso-ongelma. Käytännössä kalibraattoriarvon ylittyessä klinisiä näytteitä analysoidessa, tulisi määrittäminen hylättyä kokonaan. Kalibraattoriarvojen ylitysten vuoksi on validointityötä tullut jatkaa.

Koska standardikuvaaja lähtee laskuun 600 µg/g jälkeen, tämän ylittäneet tulokset olisi tullut jatkolaimentaa, jotta tulokset olisivat olleet luotettavia. Toteutusaiakataulumme oli kuitenkin rajallinen ja näytteitä niukasti, joten laimentaminen ei ollut mahdollista.

Reagensseja oli säilytetty jääkaappilämpötilassa ja huomioimme niiden viimeiset käyttöpäivämäärät. Annoimme reagenssien lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen niiden käyttöä. Valmistimme tarvittavat liuokset ja merkitsimme niihin viimeisen käyttöpäivämäärän reagenssipakkausohjeen mukaisesti.

9 Pohdinta

Opinnäytetyötä valitessamme halusimme aiheen, jonka toteutus vastaisi mahdollisimman paljon tulevassa työssämme tarvittavaa tietotaitoa. Uusien menetelmien ja analysointimenetelmien validointi kuuluu isona osana bioanalytiikan työhön, joten tämän vuoksi koimme tämän aiheen mielenkiintoiseksi ja hyödyttävän myös työelämää. VITA Laboratorio ei ollut meille aiemmin paikkana tuttu, mutta opiskelijana sinne oli helppo sopeutua työmme ohjaajan, asiantuntijan ja koko työyhteisön lämpimän vastaanoton vuoksi.

Opinnäytetyöprosessi on syventänyt osaamistamme erityisesti laadunhallinnan osalla. Olemme päässeet pohtimaan laatuasioita monesta eri näkökulmasta, kuten esimerkiksi, missä vaiheessa voimme varmasti olla varmoja tulosten oikeellisuudesta ja milloin laatuvaatimukset ovat varmasti täyttyneet riittävällä tavalla. Myös eri laatukäsitteet ovat avautuneet aivan uudella tavalla. Ammatillisen kehittymisemme kannalta opinnäytetyöprosessi on ollut monipuolista. Koska toteutimme työmme parityönä ja työmme oli työelämälähtöinen, olemme oppineet laboratoriotyöskentelyn ohessa myös viestintä- ja yhteistyötaitoja. Tämä erityisesti silloin, kun tiivis yhteistyö toimeksiantajamme kanssa keskeytyi kesän ajaksi, sillä työn toteutusvaihe ajoittui keväälle ja tulosten käsittely sekä raportointi syksyille. Tulosten käsittely on osoittautunut erittäin haasteelliseksi opinnäytetyöprosessissamme. Aikaisempi perehtyneisyys tulosten käsitte-

lyyn kvantitatiivisin tutkimusmenetelmin on ollut suppeaa, mutta se on kehittynyt huomattavasti tänä aikana. Tätä osa-aluetta tulemme kuitenkin jatkossakin kehittämään, jotta voimme hyödyntää täysipainotteisesti osaamistamme työelämässä.

Aiheen saatuaamme, jäsentelimme aihetta hankkimalla tietoa eri tietolähteistä minkä pohjalta laadimme varsinaisen työsuunnitelman työmme toteutuksen tueksi. Saimme myös paljon taustamateriaalia toimeksiantajaltamme. Varsinaisen validointisuunnitelman laati määrittämisestä vastaava asiantuntija sairaalamikrobiologi Päivi Kankkunen. Ennen validointia varmistettu automaatin toimivuus ja soveltuvuus käyttötarkoitukseensa oli myös tehty toimeksiantajamme puolelta esitutkimuksen muodossa. Tutkimusvaiheen suoritus sujui aikataulullisesti suunnitelman mukaisesti, vaikka alkuun pidimme uhkana lyhyessä ajassa suoritettuja mittauksia. Mikäli aikaa olisi ollut, olisimme mahdollisesti uusineet niitä mittauksia, mistä emme saaneet tuloksia. Saimme kuitenkin mittauksistamme riittävän määrän havaintoja työmme laajuuteen suhteutettuna.

Uusittavuuden osalta VITA Laboratorion määrittämis tulokset olivat suurimmaksi osaksi suurempia kuin vertailussa käytetyn referenssilaboratorion tulokset. Hajontaa tuloksissa esiintyi myös sekä sarjojen sisäisessä että välisessä toistettavuudessa. Nämä selittyvät osittain näytteiden säilytyksestä pakastettuina ja kalibraattoriarvon ylityksillä sekä riittämättömillä pesuvaiheilla. Esikäsittelyä tutkivassa osiossa ilmenneet tulokset saattoivat johtua esikäsittelyn vaikutuksesta, joten tämä työ antoi hyvää pohjamateriaalia jatkotutkimusten suunnitteluun. Ulkoisessa laaduntarkkailuvertailussa saamamme tulokset asettuivat hieman korkeammalle tasolle kuin muiden laboratorioden, mutta noudattivat samaa linjaa kuin muista validointitutkimusosioista saadut tulokset.

Opinnäytetyömme tulosten perusteella validointityötä on jatkettu VITA Laboratorion toimesta. Laitteen huoltotoimenpiteisiin on kiinnitetty enemmän huomiota. Evolis Twin Plus System -laitteen pesuohjelmia on tehostettu, esimerkiksi pesuohjelman käytössä olevien kärkien huuhteluja on lisätty, koska erityisesti pesuvaiheet ovat ELISA – menetelmässä kriittisiä. Näiden myötä sarjojen välinen toistettavuus on parantunut ja menetelmä on VITA Laboratorion käytössä.

Menetelmävalidointityömme oli ajankohtainen, sillä suolistosairauksien määrät ovat Suomessa lisääntyneet ja kalprotektiinimääritys on laajalti lääkäreiden käytössä. Tutkimukset osoittavat, että F -Calpro on erittäin käyttökelpoinen orgaanisten ja toiminnallisten suolistosairauksien erotusdiagnoosissa.

Lähteet

Bio-Rad System overview 2008. Bio-Rad Evolis Twin Plus System -laitteen käyttäjän opas. 9.

Björknäs Hans. Colitis Ulcerosa – kuvakavalkaadi. Verkkodokumentti. < <http://www.gastrolab.net/yauc1f.htm>> Päivitetty 1.9.2012. Luettu 28.9.2012.

Ehder, Tapio (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. Verkkodokumentti. < http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf > J6/2005. 25-37. Luettu 28.9.2012.

Fagerhol – Dale – Terje 1980. Release and Quantitation of a Leucocyte Derived Protein (L1). Scandinavian Journal of Haematology. 24.5. 393-398.

Färkkilä Martti 2006. Tulehdukselliset suolistosairaudet aikuisilla. HYKS sisätaudit, gastroenterologian klinikka. Moodi 1/2006. 69.

Gisbert, J. P. – McNicholl, A. G. 2009. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. Digestive and Liver Disease 41. 60 - 61

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

IBD Ry 2007. Kroonisia suolistotulehduksia todetaan jo viisi joka päivä. Lehdistöiedote 10.10.2007. Verkkodokumentti. <<http://www.crohnjacolitis.fi/cms/fileadmin/pdf/LEH-DISTOETIEDOTESyys07.pdf>> Luettu 28.9.2012.

Jaarinen Soili — Niiranen Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Edita prima OY. 13

Jahnsen, Jørgen – Røseth, Arne G. – Aadland, Erling 2008. Measurement of calprotectin in faeces. Translation of review article published in The Journal of the Norwegian Medical Association. 128. 743-5.

Kananen Jorma 2008. Kvantti Kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. s. 64-65.

Karjaluoto Heikki 2007. SPSS opas markkinatutkijoille . Verkkodokumentti. <<https://www.jyu.fi/jsbe/tutkimus/julkaisut/workingpaper/wp344> >. Luettu 29.9.2012.

Konikoff, Michael R. – Denson, Lee A. 2006. Role of Fecal Calprotectin as a Biomarker of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis 12 (6).524-534.

Käypähoito 2011. Crohnin tauti. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Gastroenterologiyhdistys ry:n ja Crohn ja Colitis ry:n asettama työryhmä. Verkkodokumentti. < <http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi50029.pdf>> Päivitetty 2.5.2011.

Laboratoriokäsikirja 2011. Kalprotektiini ulosteesta. VITA Laboratorio.

Laitinen, Matti 2004. Analytiikan ja vierianalytiikan virhelähteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo. WSOY. 32-34.

Loikkanen, Minna 2009. Ulkoisten laadunarviointikierrosten käyttö ja valinta. Labquality Group. Moodi 2/2009. 125

Mustajoki Pertti 2012. Haavainen paksusuolentulehdus. Lääkärikirja Duodecim 19.3.2012. Verkkodokumentti < http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00088>. Luettu 19.10.2012.

Muttonen Laura 2000. Miten hyödynnän ulkoisen laadunarviointikierroksen tuloksia. Keuruun-Multialan th.ky. laboratorio. Moodi 1/2010. 25.

Niemelä, Seppo, Järvinen, Heikki J., Aitola, Petri 2007. Gastroenterologia ja hepatologia. Teoksessa Höckerstedt, Krister – Färkkilä, Martti – Kivilaakso, Eero – Pikkarainen, Pekka (toim.) Duodecim. 466-501.

Nissinen, Antti 2000. Mitä laaduntarkkailutulokset kertovat. Keski-Suomen keskussairaala. Moodi 1/2000. 24.

RIDASCREEN® Calprotectin. Art. Nr.:G09036.R-Biopharm AG.8.8.2011. Reagenssipakkausohje.

Røseth, A. G. 2003. Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders. Digestive and Liver Disease 35. 607 - 608.

Sipponen, Taina -- Kolho, Kaija-Leena 2011. Ulosteen kalprotektiinipitoisuus tulehduksellisissa suolistosairauksissa. Duodecim 127: 2631-7.

Suolistosairaudet yleistyvät. Akuutti. Verkkodokumentti. < http://ohjelmat.yle.fi/akuutti/arkisto/suolistosairaudet_yleistyvat>. Luettu 19.10.2012.

Tarnanen, Kirsi -- Jussila, Airi -- Vuorio Alpo. Crohnin tauti. 2.5.2011. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00101>. Luettu 24.10.2012.

Tilastokeskus. Verkkodokumentti. <<http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/01/04/index.html>>. Luettu 28.9.2012.

Tuokko, Seija - Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoon varten. Helsinki:Tammi.

vanRheenen,Patrick F – Van de Vijver, Els – Fidler, Vaclav 2010. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. BMJ 341 (3369). 1-11.

VITA Laboratorio
26.4.2012
Päivi Kankkunen

Validointisuunnitelma: F-Calpro

VALIDOINTISUUNNITELMA:
Ulosteen kalprotektiinin osoitus, F -Calpro
Menetelmävalidointi RIDASCREEN[®] Calprotectin

Lähtötilanne

Kalprotektiini kuuluu ryhmään S100-proteiinit, jonka muodostaa n. 20 kalsiumia sitovaa proteiinia. Nimi tulee siitä, että nämä proteiinit liukenevat 100 % kyllästettyyn ammoniumsulfaattiin. S100A8, S100A9 ja S100A12 (kalgranuliini A, B ja C) liittyvät immuunijärjestelmään aktivaatioon. Kalprotektiini on S100A8:n ja S100A9:n kompleksi, joka sitoo kalsiumia ja jolla on antimikrobinen teho. Kalprotektiini esiintyy pääasiassa neutrofiileissä granulocyteissa ja monocyteissa. Kalprotektiinia vapautuu aktiivisesti limakalvoissa ja passiivisesti hajoavista valkosoluista. Tutkimus suoritetaan tällä hetkellä Kramerilla samaa testiä käyttämällä.

Tavoite

Tämän validoinnin tavoitteena on validoida ulosteen kalprotektiinin määräitys R-Biopharm Ridascreen Calprotectin testiä (Art. nr. G09036) käyttämällä VITA Laboratorion käyttöön. Analyyttorina käytetään Bio-Radin EVOLIS Twin Plus laitetta.

Validonnissa toteutettavat vaiheet

Ennen tutkimuksen validointia Kalprotektiini testiohjelma kirjataan EVOLIS -laitteelle ja toteutetaan laitteen yleistestaus. Käyttäjille annetaan laitteen käyttökoulutus.

1. F-Calpro testin menetelmävalidointi:
 - a. Sarjojen välinen toistettavuus (Kramer - VITA)
 - i. Potilasnäytteet n. 50 kpl
 - b. Sarjan sisäinen variaatio
 - i. 3 eritasoista näytettä (yksi esikäsittely) analysoituna 10 eri kertaa samalla levyllä.
 - c. Testin lineaarisuus
 - i. 4 eri näytettä laimennetaan esikäsittelyn jälkeen 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10
 - d. Sarjojen välinen toistettavuus
 - i. Vähintään neljä sarjaa, joista tilastollinen analyysi.
 - e. Näyteenkäsittelyn vaikutus lopputulokseen
 - i. 2 eritasoista näytettä käsitellään 6-8 eri kertaan ja analysoidaan omina näytteinään. Tilastollinen analyysi.
 - f. Ulkoinen laaduntarkkausk
2. Tulosten käsittely ja päätelmät
3. Validointiraportti

Validointityö toteutetaan opinnäytetyönä Mertopolian Bioanalyttikko-opiskelijoiden Pia Elorannan ja Rauna Lehdon toimesta.

26.4.2012
Päivi Kankkunen

Standardikuvaajan arvot

Kalprotektiinipitoisuus µg/g	Absorbanssi (450nm; ref. 620nm)
0	0,008
19,5	0,067
39,1	0,159
78,1	0,371
156,3	0,807
312,5	1,549
625	2,462
1250	3,091

Valmistajan antamat neljä parametriä standardikuvaajaa varten

Calculated values of the 4 -parameter logistic-log-model (4PL)	
A	0,0156
B	1,4090
C	5,9709
D	3,6999

Validoinnin tulokset

Näyttenumero	Kramer tulos mg/kg	VITA tulos mg/kg	Erotus
1	151	112	-39
2	30	36	6
3	129	91	-38
4	2500	2500	0
5	20	42	22
6	59	101	42
7	194	439	245
8	55	113	58
9	770	2500	1730
10	2500	2500	0
11	2500	2500	0
12	1356	938	-418
13	20	20	0
14	913	436	-477
15	20	42	22
17	352	438	86
18	263	384	121
19	196	659	463
20	109	144	35
21	226	461	235
22	314	764	450
23	451	712	261
24	2118	2580	462
25	43	65	22
26	1102	1810	708
27	842	1510	668
28	20	33	13
29	20	34	14
30	25	36	11

Näytenro.	Kramer tulos mg/kg	VITA tulos mg/kg	Erotus
32	20	107	87
33	73	111	38
34	46	34	-12
35	756	1085	329
36	120	531	411
37	450	470	20
38	273	262	-11
39	72	116	44
40	92	52	-40
41	109	90	-19
42	98	92	-6
43	139	177	38
44	527	418	-109
45	249	1276	1027
46	379	662	283
47	142	194	52
48	42	74	32
49	631	2235	1604
50	238	301	63
51	39	38	-1
52	84	129	45
53	120	207	87
54	705	710	5
55	22	64	42
56	33	46	13
57	249	387	138
58	33	81	48
59	249	456	207

Sarjojen sisäinen toistettavuus 1

Näyte	Tulos µg/g
1	90
2	90
3	84
4	84
5	88
6	84
7	90
8	89
9	90
10	93

Sarjojen sisäinen toistettavuus 2

Näyte	Tulos µg/g
1	203
2	199
3	223
4	175
5	198
6	198
7	199
8	193

Sarjojen välisen toistettavuuden testi, matala ja korkea positiivinen

Nro	Matala positiivinen Tulos µg/g	Korkea positiivinen Tulos µg/g
1	209	409
2	183	390
3	187	362
4	176	379
5	166	355

Lineaarisuustestin ensimmäinen laimennossarja

Laimennussuhde	Tulos µg/g
1:2	209
1:8	50
1:16	25
1:32	10

Lineaarisuustestin toinen laimennossarja

Laimennussuhde	Tulos µg/g
1:1	203
1:4	58
1:8	32
1:16	15

Ensimmäinen esikäsitellyn vaikutustutkimus viidestä käsittelystä

Näyte	Tulos µg/g
1	204
2	186
3	192
4	171
5	158

Toinen esikäsitellyn vaikutustutkimus kuudesta käsittelystä

Näyte	Tulos µg/g
1	87
2	74
3	93
4	77
5	102
6	124

Evolis Twin Plus System -tulokset

Printed on Monday, May 07, 2012 2:52:16 PM

V.C. passed

Plate ID: calpro12050701 Time: 2:40:06 PM OVER limit: 3.500
 Operator: admin Date: 5/7/2012 Wavelengths: 450nm/620nm
 Assay: C:\BioRad\2PS\Resources\Apf\Calprotectin_Ridascreen(1).asy (3b25)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.980	9.000	0.506	2.560								
B	2.319	9.000	0.504	0.942								
C	0.006	9.000	0.531	9.000								
D	1.169	9.000	0.502									
E	9.000	9.000	0.546									
F	9.000	9.000	0.537									
G	9.000	0.548	0.543									
H	9.000	0.546	0.571									

MA 7.5

Sarfoin sil vanaahtie

Combined Report

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

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
S1	A1	1.980	0.000	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
60a	E1	9.000	*****	
60b	F1	9.000	*****	
60c	G1	9.000	*****	
60d	H1	9.000	*****	
60e	A2	9.000	*****	
60f	B2	9.000	*****	
60g	C2	9.000	*****	
60h	D2	9.000	*****	
60i	E2	9.000	*****	
60j	F2	9.000	*****	
52a	G2	0.548	90.229	
52b	H2	0.546	89.956	
52c	A3	0.506	84.473	
52d	B3	0.504	84.198	
52e	C3	0.531	87.904	
52f	D3	0.502	83.923	
52g	E3	0.546	89.956	
52h	F3	0.537	88.725	
52i	G3	0.543	89.546	
52j	H3	0.571	93.366	
17	A4	2.560	438.280	
20	B4	0.942	143.766	
36	C4	9.000	*****	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
NC1	C1	0.006	*****	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
PC1	B1	2.319	378.927	
PC2	D1	1.169	175.609	

Plate ID: calpro12050801 Time: 4:00:10 PM OVER limit: 3.500
 Operator: admin Date: 5/8/2012 Wavelengths: 450nm/620nm
 Assay: C:\BioRad\2PS\1Resources\Apf\Calprotectin_Ridascreen(1).asy (3b25)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.063	9.000	9.000	9.000	3.447							
B	2.464	9.000	9.000	9.000								
C	0.009	9.000	9.000	0.549								
D	1.270	9.000	9.000	0.446								
E	9.000	9.000	9.000	0.590								
F	9.000	9.000	3.492	0.470								
G	9.000	9.000	2.774	0.665								
H	9.000	9.000	1.924	0.830								

Handwritten notes:
 TT f-n
 GG 10x toisto
 GG 6x eala
 GG 6x eala
 GG laim sarri

Combined Report

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

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
S1	A1	2.063	0.000	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
1	E1	9.000	*****	
2	F1	9.000	*****	
3	G1	9.000	*****	
4	H1	9.000	*****	
5	A2	9.000	*****	
6	B2	9.000	*****	
7	C2	9.000	*****	
8	D2	9.000	*****	
9	E2	9.000	*****	
10	F2	9.000	*****	
GG 0007534801	G2	9.000	*****	
0007534802	H2	9.000	*****	
0007534803	A3	9.000	*****	
0007534804	B3	9.000	*****	
0007534805	C3	9.000	*****	
0007534806	D3	9.000	*****	
I2	E3	9.000	*****	
I4	F3	3.492	733.273	
I6	G3	2.774	466.483	
I8	H3	1.924	283.461	
av	A4	9.000	*****	
bv	B4	9.000	*****	
GG 0007537205	C4	0.549	87.344	
0007537206	D4	0.446	73.656	
0007537204	E4	0.590	92.720	
0007537203	F4	0.470	76.876	
0007537202	G4	0.665	102.495	
0007537201	H4	0.830	123.924	
x	A5	3.447	710.773	

Handwritten notes:
 1:2
 1:4
 1:8
 1:16

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
NC1	C1	0.009	*****	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
PC1	B1	2.464	389.552	
PC2	D1	1.270	182.810	

Plate ID: calpro12051003 Time: 4:37:33 PM OVER limit: 3.500
 Operator: admin Date: 5/10/2012 Wavelengths: 450nm/620nm
 Assay: C:\BioRad\2PS\Resources\ApfCalprotectin_Ridascreen(1).asy (3b25)

WARNING! Assay was paused for 3'18.
 Removed wells: E4, G4, H4, A5, B5, D5, F5, H5, A6, B6, C6, D6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.818	0.323	0.517	0.167	0.010	0.013	0.018					
B	2.247	1.070	1.176	0.044	0.004	0.007	0.195					
C	0.008	1.215	1.139	0.107	1.869	0.009	2.344					
D	1.283	1.217	1.250	0.245	0.008	0.010	0.081					
E	9.000	1.219	0.916	0.007	1.564	3.129	0.339					
F	1.242	1.184	0.062	1.283	0.011	2.427	1.111					
G	1.219	0.957	0.142	0.008	3.040	2.939						
H	1.362	1.041	0.295	0.002	0.005	2.150						

TO 10.5.
10 koki
6 esik.
+ kaim
+ verkanla

Combined Report

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

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
S1	A1	1.818	0.000	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
551;1	E1	9.000	*****	
10	F1	1.242	202.572	
9	G1	1.219	198.816	
8	H1	1.362	222.628	
7	A2	0.323	62.809	
6	B2	1.070	175.085	
5	C2	1.215	198.166	
4	D2	1.217	198.491	
3	E2	1.219	198.816	
2	F2	1.184	193.152	
f	G2	0.957	157.670	
e	H2	1.041	170.573	
d	A3	0.517	92.285	
c	B3	1.176	191.865*	
b	C3	1.139	185.953*	
53a	D3	1.250	203.884	
331;10	E3	0.916	151.451	
0007535610	F3	0.062	15.136	
0007535609	G3	0.142	32.105	
0007535608	H3	0.295	58.367	
0007535607	A4	0.167	36.741	
0007562806	B4	0.044	10.352	
0007562805	C4	0.107	25.205	
0007562804	D4	0.245	50.229	
0007562803	E4	0.007	*****	
0007562802	F4	1.283	209.334	
0007562801	G4	0.008	*****	
0007535306	H4	0.002	*****	
0007535305	A5	0.010	*****	
0007535304	B5	0.004	*****	
0007535303	C5	1.869	318.954	
0007535302	D5	0.008	*****	
301;10	E5	1.564	258.452	
291;10	F5	0.011	*****	
00039227	G5	3.040	712.083	
00039188	H5	0.005	*****	
00039193	A6	0.013	*****	
251;10	B6	0.007	*****	

*53 10 koki **

6 esik.

53 1:16
1:8
1:4 ** 53 1:1
1:2

53 1:32
1:16
1:8

53 1:32
1:16
1:8

1:4
1:2

28
27
26
25

00038414	C6	0.009	****	24
00038342	D6	0.010	****	23
00038328	E6	3.129	764.354	22
00038235	F6	2.427	461.060	21
00038236	G6	2.939	659.221	19
00038237	H6	2.150	384.123	18
00037867	A7	0.018	****	16
00037933	B7	0.195	41.726	15
141;10	C7	2.344	436.389	14
00037866	D7	0.081	19.619	13
00039194	E7	0.339	65.317	12
321;10	F7	1.111	181.519	12

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
NC1	C1	0.008	****	

Patient ID	Well Location	O.D. Reader value	U/ml Quant. 1 value	Qual. value
PC1	B1	2.247	409.386	
PC2	D1	1.283	209.334	

Plate ID: calpro12051108 Time: 5:50:58 PM OVER limit: 3.500
 Operator: admin Date: 5/11/2012 Wavelengths: 450nm/620nm
 Assay: C:\BioRad\2PS\Resources\Apt\Calprotectin_Ridascreen(1).asy (3b25)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.128	0.727	0.796	0.204	0.052							
B	2.376	0.754	0.302	0.893	0.018							
C	0.006	0.177	1.266	1.486								
D	1.185	1.558	3.447	0.388								
E	0.174	0.006	1.390	0.260								
F	0.176	3.086	2.788	2.529								
G	0.193	2.875	2.090	0.003								
H	3.381	1.850	0.620	0.010								

Combined Report

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

Patient ID	Well Location	Reader value	O.D. Quant. 1 value	U/ml value	Qual. value
S1	A1	2.128		0.000	

Patient ID	Well Location	Reader value	O.D. Quant. 1 value	U/ml value	Qual. value
34#	E1	0.174		33.359	
35#	F1	0.176		33.678	
37	G1	0.193		36.356	
38#	H1	3.381		634.963	
39#	A2	0.727		107.663	
40#	B2	0.754		111.060	
41#	C2	0.177		33.838	
421;5	D2	1.558		217.374	
43	E2	0.006		*****	
44	F2	3.086		531.067	
45#	G2	2.875		470.111	
46	H2	1.850		261.510	
47	A3	0.796		116.345	
50	B3	0.302		52.375	
54	C3	1.266		176.894	
57	D3	3.447		662.119	
58	E3	1.390		193.717	
601;5	F3	2.788		447.450	
61	G3	2.090		301.492	
62	H3	0.620		94.166	
63	A4	0.204		38.057	
64	B4	0.893		128.579	
65	C4	1.486		207.101	
67	D4	0.388		64.140	
eqka	E4	0.260		46.393	
eqkb	F4	2.529		386.801	
eqna	G4	0.003		*****	
eqna1;10	H4	0.010		*****	
eqnb	A5	0.052		10.474	
eqnb1;10	B5	0.018		*****	

2i ole kameran hulos ka

Patient ID	Well Location	Reader value	O.D. Quant. 1 value	U/ml value	Qual. value
NC1	C1	0.006		*****	

Patient ID	Well Location	Reader value	O.D. Quant. 1 value	U/ml value	Qual. value
PC1	B1	2.376		354.935	
PC2	D1	1.185		166.149	