

Paula Väyrynen

## Jäännösvalkosolujen määrittäminen virtaussytometrisesti veri- ja soluvalmisteista

LeukoSure™-menetelmän validointi Navios™-  
virtaussytometreille – SPR Veripalvelu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

25.10.2012

Tekijä(t) Otsikko	Paula Väyrynen Jäännösvalkosolujen määrittäminen virtausytometrisesti veri- ja soluvalmisteista – LeukoSure™-menetelmän validointi Navios™-virtausytometreille – SPR Veripalvelu
Sivumäärä Aika	47 sivua + 7 liitettä 25.10.2012
Tutkinto	Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Opettaja Irma Niittymäki Asiantuntija Anne Valkeajärvi
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun laadunvalvontalaboratorioon vaihtoehtoinen jäännösvalkosolujen kvantitoimiseen tarkoitettu tutkimusmenetelmä Beckman-Coulter LeukoSure™ Beckman-Coulter Navios™-virtausytometreille. Veripalvelutoiminnan laatuvaatimusten mukaisesti veri- ja soluvalmisteiden tulee olla valkosoluttomia, sillä valmisteisiin jääneet valkosolut voivat aiheuttaa potilaalle verensiirron haittavaikutuksen, joka voi ilmetä esimerkiksi lievänä kuumereaktiona tai henkeä uhkaavana käänteishyljintäreaktiona (TA-GVHD eli Transfusion Associated Graft-Versus-Host Disease).</p> <p>Validoinnin tutkimusaineistoa olivat valkosoluttomat punasoluvalmisteet (PSVS; n=20), valkosoluttomat trombosyyttivalmisteet (TRVS4; n=20) sekä valkosoluttomat hemaferesillä kerätyt trombosyyttivalmisteet (TRFVS4; n=3). Lisäksi validoinnissa käytettiin menetelmävalmistajan kontrolleja punasolu- ja trombosyyttimatriiseissa ja menetelmä osallistui ulkoiselle laadunvalvontakierrokselle (UK NEQAS matalan tason valkosolut). Vertailumenetelmänä käytettiin Becton-Dickinson Leucocount™ -menetelmää.</p> <p>LeukoSure™-menetelmän validoinnin tulokset täyttivät validointisuunnitelmassa asetetut hyväksymiskriteerit. Menetelmän lineaarisuus (<math>R^2</math>) oli <math>\geq 0,991</math>, mittausalue oli <math>0,4\text{--}42 \times 10^6</math> valkosolua/l, menetelmävertailun tasoero oli <math>-37\text{--}20</math> %, mittausepävarmuus tasolla <math>2\text{--}3 \times 10^6</math> valkosolua/l oli 87 % ja oikeellisuus (z-score) oli <math>\leq 2</math>.</p> <p>Validoinnin perusteella LeukoSure™-menetelmä soveltuu jäännösvalkosolujen kvantitatiiviseen laskentaan veri- ja soluvalmisteista. LeukoSure™ voidaan ottaa SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa Leucocount™-menetelmän varamenetelmäksi, mutta sen käyttöönotto vaatii lisävalidointeja, joissa tarkennetaan mittausepävarmuutta. Validoinnin aikana toisen rinnakkaisen Navios™-virtausytometrin asetuksia täytyi muuttaa, joten kyseisen analysaattorin tulostason oikeellisuus tulisi osoittaa lisävalidointien avulla.</p>	
Avainsanat	jäännösvalkosolut, validointi, verensiirron haittavaikutukset, veri- ja soluvalmisteet, veriturvatoiminta, virtausytometria

Author(s) Title	Paula Väyrynen The Enumeration of Residual Leucocytes in Blood and Platelet Products by Flow Cytometry – The Validation of LeukoSure™ Method to Navios™ Flow Cytometers – Finnish Red Cross Blood Service
Number of Pages Date	47 pages + 7 appendices 25 October 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Irma Niittymäki, Senior Lecturer Anne Valkeajärvi, M. Sc. Biochemist
<p>The purpose of this study was to test if Beckman-Coulter LeukoSure™ method may be reliably used to enumerate the residual leucocytes in leucoreduced red blood cell and platelet products with Beckman-Coulter Navios™ flow cytometer in the Finnish Red Cross Blood Service quality control laboratory. According to the quality principles of blood service operations, all red blood cell and platelet products must be leucoreduced to prevent deleterious post-transfusion events that may cause light fever or even life threatening transfusion associated graft-versus-host disease to the patient.</p> <p>The specimen of the validation were leucoreduced red blood cell products (n=20), leucoreduced platelet products (n=20) and leucoreduced platelet products that were collected by automated apheresis (n=3). In addition, a number of control samples and three external quality control samples (UK NEQAS Low Level Leucocyte) were analyzed. Becton-Dickinson Leucocount™ was used as a reference method.</p> <p>The results of the validation of the LeukoSure™ method fulfilled the criteria that were set beforehand: the linearity (<math>R^2</math>) was <math>\geq 0,991</math>, the measuring range was <math>0,4\text{--}42 \times 10^6</math> leucocyte /l, the bias in the method comparison was <math>-37\text{--}20\%</math>, the measurement uncertainty was 87% at the level <math>2\text{--}3 \times 10^6</math> leucocyte/l and the accuracy (z-score) was <math>\leq 2</math>.</p> <p>Based on the results of the validation, LeukoSure™ method can be used to enumerate the residual leucocytes in leucoreduced red blood cell and platelet products. The method may be used as a backup method in the Finnish Red Cross Blood Service quality control laboratory. However, additional validations must be performed before the LeukoSure™ method can be considered as reliable as the laboratory's current enumeration method Leucocount™.</p>	
Keywords	deleterious post-transfusion events, flow cytometry, heamovigilance, leucoreduced red blood cell and platelet products, residual leucocytes, validation

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tarkoitus ja tavoitteet	2
3	Opinnäytetyön tietoperusta	4
3.1	Jäännösvalkosolut ja verensiirtojen haittavaikutukset	4
3.2	Virtaussytometria jäännösvalkosolujen määrittämisessä	7
3.3	Validointi	9
3.4	Opinnäytetyössä määritettävät parametrit	10
3.5	Muuta taustatietoa	13
4	Jäännösvalkosolujen määritysmenetelmät	14
4.1	LeukoSure™-menetelmä	14
4.2	Leucocount™-menetelmä	16
4.3	Menetelmien eroja ja yhteneväisyyksiä	18
4.4	Navios™-virtaussytometri	19
5	LeukoSure™-menetelmän validoinnin suoritus	20
5.1	Näyteaineisto	20
5.1.1	PSVS-, TRVS- ja TRFVS-valmisteet	21
5.1.2	Kontrollit	22
5.1.3	Ulkoiset laaduntarkkailunäytteet	23
5.2	Validointisarjat	23
5.3	Analysointi Navios™-virtaussytometreilla	24
5.4	Tulosten käsittely	26
6	Tulokset	26
6.1	Lineaarisuus ja mittausalue	26
6.2	Sarjan sisäinen toistettavuus	28
6.3	Sarjojen välinen toistettavuus	29
6.4	Mittausepävarmuus	30
6.5	Siirtymävirhe	31
6.6	Oikeellisuus	32
6.7	Menetelmien vertailu	33
6.8	Yhteenvedo tärkeimmistä tuloksista ja johtopäätökset	35

7	Tulosten luotettavuus	36
8	Pohdinta	39
8.1	Tutkimuksen eettisyys	39
8.2	LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset	41
8.3	Opinnäytetyön ja sen tulosten hyödynnettävyys	43
8.4	Jatkotutkimuskohteita	43
8.5	Oma oppiminen	44
	Lähteet	45

#### Liitteet

Liite 1. Näytteiden esikäsittely LeukoSure™-menetelmällä

Liite 2. Näytteiden esikäsittely Leucocount™-menetelmällä

Liite 3. LeukoSure™-menetelmän asetukset Navios™-virtaussytometreilla

Liite 4. LeukoSure™-menetelmän lineaarisuus ja mittausalue

Liite 5. Sarjojen sisäinen toistettavuus LeukoSure™-menetelmässä

Liite 6. Sarjojen välinen toistettavuus LeukoSure™-menetelmässä

Liite 7. LeukoSure™-menetelmän siirtymävirhe

## 1 Johdanto

”Veriturvatoiminnalla tarkoitetaan koko verensiirtoketjun - alkaen verenluovuttajasta aina potilaan jälkiseurantaan - turvallisen toiminnan seuraamista ja varmistamista” (SPR Veripalvelu 2012c).

Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu auttaa vuosittain yli 50 000 veri- ja soluvalmisteita tarvitsevaa potilasta. Veri- ja soluvalmisteiden tarpeen kattamiseksi Suomessa tehdään vuosittain noin 270 000 verenluovutusta. SPR Veripalvelu vastaa keskitetysti koko Suomen veripalvelutoiminnasta, joka käsittää muun muassa verenluovutusten järjestämisen, valmisteiden turvallisuuden ja laadun tutkimisen, valmisteiden tuotannon ja jakelun sairaaloihin sekä ympärivuorokautiset lääketieteelliset asiantuntijapalvelut. (Punainen Risti Veripalvelu 2010: 2, 14.) Veripalvelutoimintaan liittyy kiinteänä osana veriturvatoiminta, jonka tarkoituksena on kerätä tietoa verensiirtojen haittavaikutuksista ja pyrkiä estämään niitä (Koski 2010: 300). Potilasturvallisuuden toteutuminen vaatii veripalvelutoiminnan tarkkaa säätelyä.

Verensiirron käyttämistä hoitokeinona harkitaan aina potilaskohtaisesti, eikä tarpeettomia verensiirtoja tulisi tehdä (Koski 2010: 294). Veri- ja soluvalmisteet ovat biologista materiaalia, joten jokainen potilas reagoi verensiirtoon omalla tavallaan (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 64). Veri- ja soluvalmisteiden tuotantoprosessiin kuuluu valkosolujen poistaminen, sillä valmisteeseen jääneet valkosolut voivat aiheuttaa potilaalle verensiirron haittavaikutuksen, joka voi ilmetä lievemässä tapauksessa kuumereaktion ja pahimmassa tapauksessa hengenvaarallisenä käänteisshyljintäreaktiona. Valkosolujen poistamiseen kokoverivalmisteesta tarvitaan monta eri vaihetta. (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 23, 32, 64, 68.) Opinnäytetyön tarkoituksena ja tavoitteena oli turvata ja tehostaa juuri tämän veri- ja soluvalmisteiden tuotantoon liittyvän prosessin, eli valmisteiden valkosoluttomuuden, toimintavarmuutta.

Opinnäytetyö toteutettiin SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriolle. Laadunvalvontalaboratoriossa varmistetaan, että veri- ja soluvalmisteet täyttävät niille asetetut laatuvaatimukset. Laatuvaatimusten mukaiset valmisteet ovat tärkeä osa veriturvatoimintaa. (Yleisohje TLA-YO-001 2011.) Tietystä prosenttiosuudesta vuosittain tuotetuista veri- ja soluvalmisteista määritetään jäännösvalkosolut käyttäen kaupallista reagenssipakkausta ja virtausytometrillä analyysimenetelmää. Jäännösvalkosolututkimukseen valittavat

näytteet otetaan valkosoluttomista punasoluvalmisteista (PSVS), valkosoluttomista trombosyyttivalmisteista (TRVS4), hemafereesilla kerätyistä valkosoluttomista trombosyyttivalmisteista (TRFVS4) sekä valkosoluttomista erikoisvalmisteista. Lisäksi menetelmällä tehdään materiaalien (valmiste- tai näytteenottopussi) käyttöönottotarkistuksia sekä laitekontroleja (trombafereesilaitteet). Opinnäytetyön aiheena oli validoida laadunvalvontalaboratorion Navios™-virtaussytometreille vaihtoehtoinen jäännösvalkosolujen määrittäminen menetelmä LeukoSure™, joka voisi validoinnin tuloksista riippuen korvata käytössä olevan tutkimusmenetelmän tai toimia jäännösvalkosolututkimusten varamenetelmänä.

Opinnäytetyön ohjaajina toimivat Metropolia Ammattikorkeakoulun lehtori Irma Niittymäki ja SPR Veripalvelun asiantuntija Anne Valkeajärvi. SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion henkilökunta suoritti vertailumenetelmän (Leucocount™) analyysit osana päivittäisiä työtehtäviään, opastivat analysointilaitteiden käytössä ja ohjeistivat laadunvalvontalaboratorion käytännön asioissa.

## 2 Tarkoitus ja tavoitteet

Veri- ja soluvalmisteiden jäännösvalkosolujen analysoimiseksi ovat tutkittavat näytteet esikäsiteltävä tarkoitukseen sopivalla menetelmällä. Menetelmällä tarkoitetaan tässä tapauksessa reagenssipakkausta, jota käytetään näytteiden esikäsitelyssä, jotta näytteistä pystytään luotettavasti tunnistamaan ja mittaamaan jäännösvalkosolut. Markkinoilla on tarjolla monien eri valmistajien menetelmiä, joista laboratorion tulee valita käyttöönsä sopivin. Esikäsitelyn jälkeen näytteet analysoidaan virtaussytometrillä. Virtaussytometrissä tulee olla valittuna menetelmän analysoinnissa käytettävä ajopohja, joka sisältää käytettävälle menetelmälle sopivat mittauskanavien ja muiden asetusten säädöt. Ajopohjan voi muodostaa joko käyttäjä itse tai menetelmän valmistaja. Sopivan ajopohjan avulla käyttäjä pystyy tulkitsemaan näytteistä saatavan primaaridatan oikealla tavalla. Näytteiden esikäsitelyllä tarkoitukseen sopivalla menetelmällä ja esikäsitelyjen näytteiden virtaussytometrisellä analysoinnilla saadaan numeerinen vastaus kysymykseen: paljonko tutkittavassa näytteessä on jäljellä valkosoluja tuotantoprosessien, eli valkosolujen poiston, jälkeen?

SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa käytössä olevat Becton-Dickinson FACS Calibur™ -virtaussytometrit korvataan kahdella Beckman-Coulter Na-

vios™-virtaussytometrilla. FACS Calibureilla™ käytössä oleva jäännösvalkosolujen tutkimusmenetelmä Becton-Dickinsonin Leucocount™ pyritään siirtämään näille uusille Navios™-virtaussytometreille vuoden 2012 aikana. Beckman-Coulterilla on kuitenkin tarjota jäännösvalkosolujen analyysiin oma tutkimusmenetelmänsä LeukoSure™. Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida LeukoSure™-menetelmä Navios™-virtaussytometreille. Vertailumenetelmänä käytettiin Leucocount™-menetelmää ja Navios™-virtaussymetreja.

Validointi suunniteltiin yhdessä työelämän asiantuntijaohjaajan kanssa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa validointi käytännössä, eli suorittaa tarvittava määrä analysointisarjoja LeukoSure™-menetelmällä. Validoinnin tarkoituksena oli tutkia, voidaanko LeukoSure™-menetelmällä määrittää jäännösvalkosolut luotettavasti ja kvantitatiivisesti laadunvalvontalaboratoriossa tutkittavista veri- ja soluvalmisteista. Tarkasteltavat tutkimuskysymykset olivat:

1. Millainen on LeukoSure™-menetelmän lineaarisuus?
2. Mikä on LeukoSure™-menetelmän mittausalue?
3. Millainen on sarjan sisäinen toistettavuus käytettäessä LeukoSure™-menetelmää?
4. Millainen on sarjojen välinen toistettavuus käytettäessä LeukoSure™-menetelmää?
5. Mikä on LeukoSure™-menetelmän mittausepävarmuus?
6. Millainen on LeukoSure™-menetelmän siirtymävirhe?
7. Mikä on LeukoSure™-menetelmän oikeellisuus (ulkoisen laadunarviointi)?
8. Saadaanko LeukoSure™- ja Leucocount™-menetelmillä samanlaiset tulostasot näytteistä (menetelmien vertailu)?
9. Mitkä ovat LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset verrattuna Leucocount™-menetelmään?

Opinnäytetyön tavoitteena oli jäännösvalkosolujen analysoinnin toimintavarmuuden lisääminen odottamattomien tapahtumien varalta. Varamenetelmän olemassaolo on perusteltua koko veripalvelutoiminnan toimintavarmuuden kannalta, sillä jokainen veri ja soluvalmisteisiin liittyvä prosessi on tärkeä turvallisten verensiirtojen takaamiseksi.



### 3 Opinnäytetyön tietoperusta

Jäännösvalkosolut ja verensiirtojen haittavaikutukset ovat keskeisiä tekijöitä perusteltaessa opinnäytetyön merkitystä, sillä opinnäytetyön perimmäisenä tavoitteena oli laadunvalvontalaboratorion toiminnan varmistaminen veriturvatoiminnan eli potilasturvallisuuden näkökulmasta. Virtausytometrian keskeiset periaatteet jäännösvalkosolujen määrittämisessä ja validoinnin merkitys luotettavien laboratoriotulosten saamiseksi kertovat puolestaan opinnäytetyön analyysien taustoista ja merkityksestä.

#### 3.1 Jäännösvalkosolut ja verensiirtojen haittavaikutukset

Veri- ja soluvalmisteille on sairaanhoidossa monia käyttöindikaatioita: punasoluja käytetään akuutin vuodon hoidossa, trombosyyttejä annetaan vaikeaa trombosytopeniaa sairastaville potilaille ja plasmavalmisteita käytetään, kun potilaalle korvataan puuttuvia veren hyytymistekijöitä (Koski 2010: 295). Veri- ja soluvalmisteista tulee muistaa, että ne ovat biologista materiaalia, joten jokaisen potilaan reaktio verensiirtoihin on yksilöllinen ja täten jokaiseen verensiirtoon liittyy haittavaikutusreaktion riski. Biologisista ominaisuuksista johtuen veri- ja soluvalmisteet eivät ole lääkevalmisteiden kaltaisesti standardoituja. Tyypillisimpiä verensiirron haittavaikutuksia ovat lievä kuume ja allergiatyyppiset reaktiot. Harvinaisempia, mutta vakavampia haittavaikutuksia, ovat muun muassa hemolyysi, bakteeri- ja virusinfektiot sekä voimakkaat allergiset reaktiot. Verensiirron haittavaikutus voi olla pahimmassa tapauksessa potilaan henkeä uhkaava ja sen taustalla voi olla monia erilaisia tekijöitä, joista jäännösvalkosolut ovat vain yksi. (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 64–69.) Verensiirron käyttämisestä hoitokeinona harkitaan aina potilaskohtaisesti, eikä tarpeettomia verensiirtoja tulisi tehdä mahdollisten haittavaikutusten ehkäisemiseksi (Koski 2010: 294).

Veripalvelulain mukaisesti sairaalat ja muut hoitavat yksiköt ovat veloitettuja ilmoittamaan verensiirtoihin liittyvät haittavaikutukset, vaaratilanteet ja väärät verensiirrot Veriturvatoimistoon (Veripalvelulaki 197/2005 § 10). Vuonna 2010 Suomen sairaaloista ja muista hoitoyksiköistä raportoitiin Veriturvatoimistoon yhteensä 248 verensiirtoihin liittyvää haittavaikutusreaktiota, joista 27 oli vakavia. Vakavien haittavaikutusten todennäköisyys on kuitenkin hyvin pieni suhteutettuna toteutettujen verensiirtojen määrään, kuten useimmissa muissakin Euroopan maissa. (Veriturvaraportti 2010: 1–2, 6.)

Veri- ja soluvalmisteista tulee poistaa valkosolut, sillä valmisteeseen jääneet valkosolut voivat aiheuttaa potilaalle verensiirron haittavaikutuksen. Haitallisten reaktioiden todennäköisyyttä on saatu vähennettyä suodattamalla kaikki veri- ja soluvalmisteet. Suodattamisesta huolimatta valmisteisiin jää hieman valkosoluja, jotka voivat aiheuttaa potilaalle alloimmunisaatiota ja immunosuppressiota, mutta vain pienellä todennäköisyydellä. (Matinlauri 2004: 867, 869.) Yleisin verensiirron haittavaikutus jäännösvalkosoluista johtuen on lievä kuumereaktio (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 64). Veri- tai soluvalmistetta saaneen potilaan elimistö pystyy normaalisti tuhoamaan valmisteessä olevat jäännösvalkosolut, jolloin veri- tai soluvalmisteen jäännösvalkosoluista ei aiheudu potilaalle verensiirron haittavaikutusta. Lisäksi veri- ja soluvalmisteiden jäännösvalkosolumäärät ovat tuotantoprosessien jälkeen niin vähäiset, että verensiirron haittavaikutuksen riski valkosoluista johtuen on lähes olematon. (Juvonen – Koistinen 2007: 685–686.)

Valkosolut poistetaan kokoverivalmisteesta ensiksi sentrifugoimalla yhdeltä luovuttajalta saatu valmistepussi, jonka jälkeen siitä poistetaan niin kutsuttu buffy coat -kerros. Buffy coat on sentrifugoinnissa plasmakerroksen ja punasolukerroksen väliin jäävä valkosolut sisältävä kerros (SPR Veripalvelu 2012b). Valkosolujen poistoa valmisteesta tehostetaan lisäksi valmisteen suodattamisella. Valkosolusuodatus ei ole kuitenkaan täysin varma menetelmä kaikkien valkosolujen poistamiseksi, sillä pienet lymfosyytit voivat läpäistä suodattimen. Erikoistilanteissa potilas voi tarvita täysin valkosoluttoman veri- tai soluvalmisteen, jolloin valmisteen turvallisuus varmistetaan sädetyksen avulla. Sädettäminen estää valkosolujen normaalin toiminnan niin, että solut eivät kykene enää aktivoitumiseen ja jakautumiseen. Sädetys on kuitenkin turvallinen tumattomille punasoluille ja trombosyyteille, joten vaikutus näiden solujen elinkykyyn ja toimintaan ei ole merkittävää. (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 23, 32, 64, 68.) Ilman veri- ja soluvalmisteiden sädetystä voivat valmisteeseen jääneet pienet lymfosyytit aktivoitua uudelleen valmistetta saaneessa potilaassa. Indikaatioita sädetettyjen veri- ja soluvalmisteiden käyttämiselle hoitokeinona ovat immuunipuutteinen potilas, kantasolusiirtohoito, kohdunsisäinen verensiirto, pieni tai hyvin ennenaikainen keskonen sekä potilas, jolla on hematologinen sairaus. (Auvinen 2009.)

Alloimmunisaatio tarkoittaa, että potilaan elimistö tuottaa vasta-aineita, jotka kohdistuvat vieraita antigenejä kohtaan (Juvonen, Savolainen 2007: 202). Näitä vieraita antigenejä voivat olla tumallisten valkosolujen, kuten monosyyttien, B-lymfosyyttien ja varsinkin aktivoituneiden T-lymfosyyttien, pinnoilla sijaitsevat HLA-antigeenit (Human

Leucocyte Antigen). HLA-immunisaatiosta on haittaa erityisesti trombosyyttisiirroissa, sillä se voi johtaa siirrettyjen trombosyyttien tuhoutumiseen potilaan elimistön tuottamista HLA-vasta-aineista johtuen. Tällöin trombosyyttien siirrosta ei ole potilaalle toivottua hoitovastetta. Potilaalle voidaan kuitenkin saada hoitovaste käyttämällä HLA-tyypitettyjä trombosyyttejä, jolloin HLA-vasta-aineita ei synny. (Juvonen – Koistinen 2007: 685–686). HLA-tyypitettyjä trombosyyttejä tulee käyttää myös elinsiirteitä saavilla potilailla, sillä HLA-vasta-aineet voivat tuhota siirrettyä kudosta (Zimring 2009: 216).

Immunosuppressiolla tarkoitetaan potilaan oman puolustuskyvyn heikkenemistä siirretystä veri- tai soluvalmisteesta johtuen (Matinlauri 2004: 867, 869). Immuunipuutteisten potilaiden elimistön puolustusmekanismit ovat häiriintyneet. Tällöin jo hyvin pieni määrä veri- tai soluvalmisteessa olevia jäännösvalkosoluja voi lisääntyä merkittävästi, kun kyseiset solut aktivoituvat potilaan elimistössä. Tästä voi seurata käänteishyljintäreaktio, josta käytetään myös nimitystä TA-GVHD eli Transfusion Associated Graft-Versus-Host Disease. (Juvonen – Koistinen 2007: 685–686.) Verensiirtoon liittyvä käänteishyljintäreaktio on erittäin vakava ja lähes aina kuolemaan johtava komplikaatio. Hoidosta riippumaton kuolemariski on Lillevingin ja Kristensenin vuonna 1992 julkaiseman tutkimuksen mukaan yli 90 %, mutta Veripalvelun vuonna 2009 julkaiseman Verivalmisteiden käytön oppaan mukaan riski on noin 80 %. Riskin pieneneminen johtuu mahdollisesti edistymisestä komplikaation ehkäisemisessä sekä sen hoitamisessa. Käänteishyljintäreaktion äkilliset oireet ilmaantuvat noin 3–30 vuorokauden kuluttua verensiirrosta. Kliiniseen oireistoon kuuluvat muun muassa korkea kuume, punoittava ihottuma ja mahdolliset vastaoireet. Lillevingin ja Kristensenin tutkimuksen mukaan käänteishyljintäreaktio johtuu siirretyn veri- tai soluvalmisteen aktivoituneista T-lymfosyyteistä, jotka reagoivat potilaan MHC-antigeeneja (Major Histocompatibility Complex) vastaan. Komplikaation voimakkuus on verrannollinen veri- tai soluvalmisteen valkosolupitoisuuteen ja muita vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa siirretyn veri- tai soluvalmisteen tyyppi ja sen säilytysikä ennen siirtoa potilaaseen. (Koskimies 1995: 180; Lillevang – Kristensen 1992: 2964; Verivalmisteiden käytön opas 2009: 68.)

Veri- tai soluvalmisteen jäännösvalkosolut voivat toimia myös sytomegaloviruksen (CMV) välittäjänä. Lisäksi on epäilty, että jäännösvalkosolut voisivat välittää muitakin herpesviruksia sekä prionitauteja, kuten varianttia Creutzfeldt-Jakobin tautia. (Zimring 2009: 216.)

Jäännösvalkosolut voivat olla erään hypoteesin mukaan osatekijänä verensiirrosta aiheutuneessa akuutissa keuhkovauriossa (TRALI eli Transfusion Associated Acute Lung Injury), joka on vakava, mutta harvoin ilmenevä verensiirron haittavaikutus. Sairausten syntymekanismi on kuitenkin vielä tutkijoillekin epäselvä ja edellä mainittu teoria on vain yksi monista. (Auvinen 2009; Stubbs 2011: 66.)

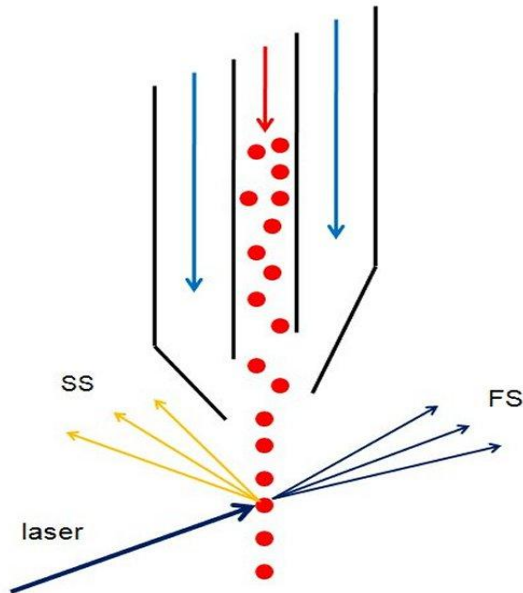
Jos veri- ja soluvalmisteet eivät täytä niille asetettuja laatukriteereitä jäännösvalkosolujen määrän suhteen, on tilannetta tällöin arvioitava yleisen veritilanteen ja mahdollisen potilaan kannalta. Valmisteen jäännösvalkosoluja tutkittaessa valmiste on voitu jo jakaa sairaalaan, mutta tällöinkin valmiste voidaan vielä vetää takaisin. Jäännösvalkosolututkimus ei ole valmisteiden jakelun vapautuskriteeri, kuten esimerkiksi jokaisesta luovutuksesta tehtävät virustutkimukset ovat. Toimenpiteiden arvioinnissa huomioidaan laadunvalvontarajan ylityksen suuruus sekä valmisteen hoitoarvon ja mahdollisen valkosolujen tuottaman kuumereaktion riski. (Valkeajärvi 2012b.)

### 3.2 Virtaussytometria jäännösvalkosolujen määrittämisessä

Virtaussytometria on erityisesti hematologiassa käytettävä mittausmenetelmä, jota käytetään verisolujen erotteluun ja laskentaan kokoverestä. Virtaussytometri soveltuu kuitenkin muidenkin solususpensioiden analysointiin, joten tutkittava näyttemateriaali voi olla kokoveren lisäksi esimerkiksi luuytimen aspiraationäyte tai imusolmukkeesta tehty solususpensio. Virtaussytometrillä saadaan määritettyä näytteestä yhdellä analysointikerralla monia eri suureita, jotka kertovat solun koosta, sisärakenteesta (muun muassa granulaisuus ja tuman monimuotoisuus) sekä fluoresenssileimojen avulla spesifisemmin solutyypistä. Menetelmä perustuu virtaussytometrin kykyyn havaita solusta aiheutuva sironna, kun siihen kohdistetaan valonsäde. Valon sironna johtuu sekä solun ominaisuuksista, mutta myös solun leimaamiseen käytetystä fluoresoivasta aineesta. Fluoresoiva yhdiste on kiinnitetty vasta-aineisiin, jotka tunnistavat tiettyjen solujen anti-geeneja (pinta- tai sisärakenteita) ja kiinnittyvät niihin. (Savolainen – Pelliniemi – Koski 2010: 86–92.) SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa virtaussytometriä käytetään muun muassa jäännösvalkosolujen määrittämiseksi veri- ja soluvalmisteista.

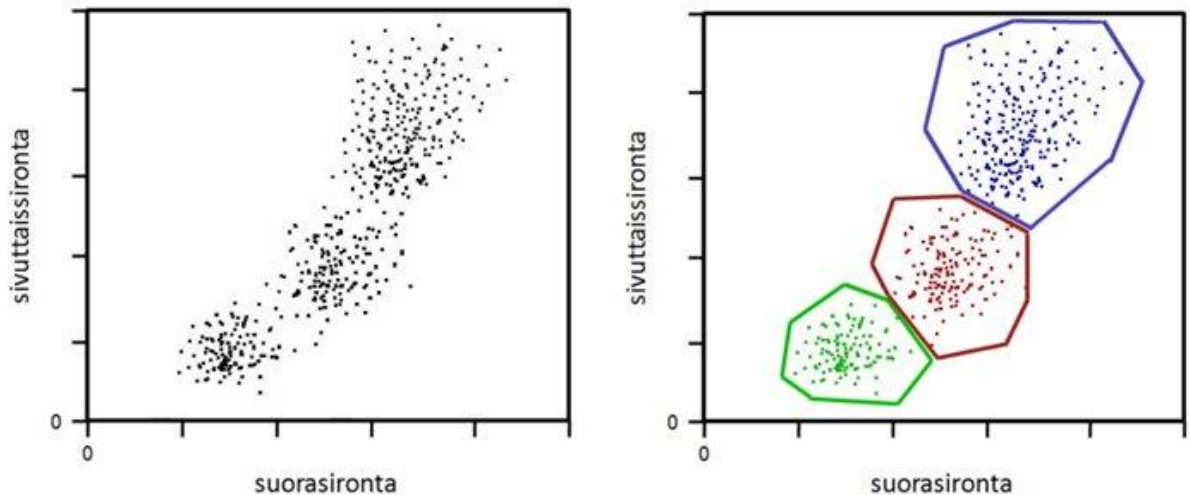
Virtaussytometrian peruseräiteeseen kuuluu, että näytteessä olevat mitattavat solut erotellaan kulkemaan yksittäin mittauskanavan läpi. Solujen erottuminen saadaan aikaiseksi näytevirran ympärillä nopeammin kulkevan vaipanesteen avulla. Vaipaneste

on paineistettu kulkemaan nopeammin kuin näytevirta, jolloin näytteessä olevat solut kulkevat pakotetusti yksittäin mittauskanavan läpi. Tapahtumasta käytetään nimitystä hydrodynaaminen fokuointi, joka on esitetty yksinkertaistettuna kaaviokuvana kuviossa 1. (Savolainen – Pelliniemi – Koski 2010: 87.)



Kuvio 1. Yksinkertaistettu kuvio hydrodynaamisesta fokuoinnista. Punaisella esitetyn näytevirran ympärillä kulkee kovemmalla nopeudella vaaleansinisellä esitetty vaipaneste, joka pakottaa näytteessä olevat solut asettumaan yksittäin mittauskanavaan. Näytevirtaan kohdistetun laserin avulla saadaan aikaiseksi suorasironta (FS) ja sivuttaissironta (SS). Kuvio on mukailtu lähteestä Impola 2012.

Virtausytometri muuttaa soluista saamansa informaation suorasironnasta, sivuttaissironnasta ja mahdollisesta fluoresenssista erilaisiksi havainnollistaviksi kaavioiksi kuten histogrammeiksi tai sirontakuvioiksi (Savolainen – Pelliniemi – Koski 2010: 90). Kuviossa 2. on esitettyä perinteinen suorasironnasta ja sivuttaissironnasta muodostettu kuvitteellinen sirontakaavio. Eri solupopulaatiot erottuvat toisistaan kokonsa ja monimuotoisuutensa perusteella. Lisäksi eri solupopulaatiot voidaan rajata manuaalisesti, jolloin solupopulaatioiden sisältämät solut voidaan myös laskea visuaalisen erottelun lisäksi.



Kuvio 2. Perinteinen sirontakaavio, jossa on yhdistettynä suorasisironta (solun koko) ja sivuttaisironta (solun monimuotoisuus). Vasen kuvio on ennen eri solupopulaatioiden rajaamista toisistaan. Oikea kuvio kuvastaa eri solupopulaatioille manuaalisesti tehtyjä rajauksia, jolloin solupopulaatiot saadaan visuaalisesti ja laskennallisesti eroteltua toisistaan.

### 3.3 Validointi

Validointi on suunnitelmallinen prosessi, jossa varmistetaan menetelmän eli mittarin sopivuus sen käyttötarkoitukseen. Toisin sanoen validoinnilla tutkitaan saadaanko menetelmällä luotettavia tuloksia juuri mitattavasta analyytistä siinä ympäristössä, missä menetelmää tultaisiin mahdollisesti käyttämään. Validointi tulee suunnitella huolellisesti ennen sen aloittamista ja suunnittelussa tulee ottaa huomioon viranomaismääräykset sekä laboratorion omat laatutavoitteet ja toimintatavat. (Saari 2010.) Veripalvelulaissa on määrätty muun muassa laatujärjestelmästä, dokumentaatiosta sekä laatu- ja turvallisuusvaatimuksista, joita myös tässä opinnäytetyönä toteutettavassa validoinnissa noudatettiin (Veripalvelulaki 197/2005 § 7, § 8, § 17). Veripalvelutoimintaa sääteleviä lakeja ja asetuksia käsitellään tarkemmin kappaleessa *8.1 Tutkimuksen eettisyys*.

Validoinnissa määritetään monia eri matemaattisia parametreja, joiden avulla pystytään arvioimaan validoitavaa menetelmää kokonaisuutena. Validoinneissa määritettävät parametrit valitaan tapauskohtaisesti. Tässä validoinnissa määritettävät parametrit olivat lineaarisuus, mittausalue, sarjan sisäinen toistettavuus, sarjojen välinen toistettavuus, mittausepävarmuus, siirtymävirhe, oikeellisuus sekä menetelmien vertailu, joita käsitellään tarkemmin kappaleissa *3.4 Opinnäytetyössä määritettävät parametrit ja 6*

*Tulokset.* Joidenkin parametrien osalta, kuten spesifisyys ja selektiivisyys, työssä luotettiin valmistajan kehitystyössään määrittelemiін arvoihin. SPR Veripalvelun asiantuntija laati opinnäytetyötä varten validointisuunnitelman, jossa määritettiin validoinnin tarkoitus, aikataulu, tutkittavat näytteet, määritettävät parametrit, tulosten käsittely, dokumentointi ja validoinnin hyväksymiskriteerit (Validointisuunnitelma STR-90-5815-4S 2012). Asiantuntija kokosi validoinnin tulokset SPR Veripalvelun omaan validointiraporttiin (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012).

Parametrit ja niiden yleisesti asetetut määritelmät helpottavat tulosten tulkintaa ja menetelmän kokonaisarviointia. Validoinnissa tarvittava analysoitava vähimmäisnäytemäärä on riippuvainen siitä, mitä parametreja halutaan määrittää. Näyteiden lukumäärän on oltava tarpeeksi suuri, jotta laskettavien parametrien luotettavuus on halutulla tasolla. Käsiteltäviä analyysituloksia oli tässä validoinnissa kuitenkin enemmän kuin näytteitä, sillä osa näytteistä tutkittiin rinnakkaismäärityksinä. Validointi edellyttää systemaattista ja säädeltyä tulosten dokumentointia sekä raportointia. Perusteellinen suunnittelu ja väljä aikataulu olivat toteutettavan validoinnin analyysien toteuttamisessa tärkeitä, jotta ongelmatilanteisiin pystyttiin varautumaan etukäteen.

### 3.4 Opinnäytetyössä määritettävät parametrit

Määritettävät validointiparametrit olivat alun perin *lineaarisuus*, *mittausalue*, *sarjan sisäinen toistuvuus* ja *sarjojen välinen toistettavuus*, jotka muodostavat yhdessä toistotarkkuuden sekä *mittausepävarmuus* ja *menetelmien vertailu*. Validoinnin aikana tarjoutui mahdollisuus määrittää lisäksi *siirtymävirhe* ja *oikeellisuus*. Opinnäytetyötä ohjaava asiantuntija valitsi määritettävät parametrit SPR Veripalvelun validointiohjeiden Tutkimusmenetelmien validointi (Yleisohje LP-YO-011 2008) ja Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien validointi (Yleisohje LP-YO-012 2008) mukaisesti. Rutiinikäyttöön harkittu uusi tutkimusmenetelmä tulee validoida ennen menetelmän käyttöönottoa, mutta CE-merkityille menetelmille, kuten LeukoSure™-menetelmä on, ei tarvitse suorittaa täydellistä validointia. Tästä johtuen oli toteutettavaan validointiin valittu määritettäväksi ainoastaan keskeisimmät validointiparametrit. Validoinnin tarkoituksena oli tässä tapauksessa varmistaa, että validoitava menetelmä antaa luotettavia tuloksia normaalisti laboratorion rutiinityöskentelyssä käytettävistä näytematriiseista, joita ovat SPR Veripalvelun tuottamat valkosoluttomat veri- ja soluvalmisteet. (Yleisohje LP-YO-011 2008: 1–2.)

*Lineaarinen* tarkoittaa sananmukaisesti suoraviivaisuutta. Menetelmän lineaarisuus kertoo näytteistä saatujen tulosten ja tutkittavan parametrin todellisen näytteissä olevan pitoisuuden korrelaatiosta. Toisin sanoen lineaarinen mittausalue on alue, jolla olevien tulosten voidaan katsoa olevan luotettavia. Menetelmän lineaarinen mittausalue voi olla rajallinen, eli menetelmä ei välttämättä anna tarkkoja ja täsmällisiä tuloksia kaikilla mitattavan suureen todellisilla pitoisuuksilla. (Saari 2010.) Kvantitatiivisia menetelmiä koskevassa SPR Veripalvelun validointiohjeessa suositellaan määrittämään lineaarisuus vähintään viidellä eritasoisella näytteellä, joiden pitoisuudet kattavat halutun pitoisuusalueen. Tutkimuksissa ei kuitenkaan tarvitse kattaa menetelmän koko lineaarisuusaluetta, vaan tutkittavaksi alueeksi riittää pitoisuusalue, jolla menetelmää on tarkoitus käyttää. Eritasoisia näytteitä voidaan valmistaa myös itse, mutta kaikkien näytteiden pitoisuudet tulee olla ennestään tunnettuja. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 2; Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008: 1, 4–5.) Tässä opinnäytetyössä lineaarisuussarjoista saatuja tuloksia voitiin käyttää lisäksi sarjan sisäisen toistuvuuden laskennassa.

*Mittausalue* on menetelmän pitoisuusalue minimiarvosta maksimiarvoon, jolla menetelmää halutaan käyttää. Tällä alueella menetelmällä tulee olla käyttötarkoitukseensa sopiva tarkkuus, toistotarkkuus ja lineaarisuus. Tässä validoinnissa tarkkuuden osalta luotettiin valmistajan ilmoittamiin arvoihin ja toistotarkkuus sekä lineaarisuus määritettiin itse. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 2.) Validoitavalla menetelmällä saatavien tulosten tulee olla lineaarisia valitulla mittausalueella ja validoinnin tulee kattaa koko valittu mittausalue (Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008: 1, 5).

Toistotarkkuus käsittää kaksi parametria: *sarjan sisäinen toistuvuus* ja *sarjojen välinen toistuvuus*. Tässä opinnäytetyössä analysoitiin samoja näytteitä monena rinnakkaisena saman sarjan sisällä, jotta sarjan sisäinen toistuvuus voitiin määrittää. Kvantitatiivisia menetelmiä koskevassa SPR Veripalvelun validointiohjeessa suositellaan määrittämään sarjan sisäinen toistuvuus kolmella eri tasolla (matala, keskitaso ja korkea) tehden kuusi toistoa kullakin tasolla. Sarjojen välisessä toistuvuudessa puolestaan analysoidaan samoja näytteitä esimerkiksi eri sarjoissa ja eri päivinä. Vaatimuksena parametrin määrittämisessä on vähintään kuuden eri näytesarjan analysoiminen. Lineaarisuusmäärittämisestä saatavia tuloksia voidaan käyttää sarjojen välisen toistuvuuden laskennassa. Tuloksista laskettiin tässä validoinnissa keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta sekä 95 % luottamusväli. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 3; Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008: 6.)



*Mittausepävarmuudella* kuvataan oletettua vaihtelua menetelmällä saatavissa tuloksissa joko prosenttiluvuilla tai absoluuttisina yksikköinä. Tässä opinnäytetyössä absoluuttisella yksiköllä tarkoitetaan jäännösvalkosolujen määrää tilavuudessa (esimerkiksi valkosolua/ $\mu$ l). Mittausepävarmuutta laskettaessa huomioidaan validointikohtaisesti menetelmän toistotarkkuuteen olennaisesti vaikuttavia tekijöitä. Näitä keskeisiä tekijöitä voivat olla muun muassa vakioden epävarmuus, pipetoinnin epävarmuus ja muut preanalyttiset tekijät. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 4; Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008: 9.)

SPR Veripalvelun Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien validointi -yleisohjeen mukaisesti validoinnin yhteydessä on syytä määrittää mahdollinen *siirtymävirhe*, jota voi esiintyä automaattisilla analysaattoreilla, pipetointiasemilla ja läpivirtauskyveteillä. Siirtymävirheellä tarkoitetaan edellisenä analysoidun näytteen partikkeleiden siirtymistä seuraavana analysoitavaan näytteeseen, jolloin saatava analysointitulokset on virheellisen matala tai korkea. Käytännössä siirtymävirhettä tutkitaan analysoimalla validointisarjoja, joissa on vaihtelevasti matalan ja korkean tason näytteitä. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 5.)

*Oikeellisuudella* tarkoitetaan virheettömyyttä, paikkansapitävyyttä ja totuudenmukaisuutta (MOT Kielitoimiston sanakirja 8.4 Professional 2012. s.v. oikeellisuus). Validoitavan menetelmän LeukoSure™ oikeellisuutta tarkasteltiin tässä opinnäytetyössä ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla, jolloin omaa tulostasoa voitiin verrata laaduntarkkailukierroksen keskiarvoon (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 7).

*Menetelmävertailu* tuli suorittaa toteutetussa validoinnissa, koska validoitava menetelmä LeukoSure™ voisi mahdollisesti korvata käytössä olevan menetelmän Leucocount™. Menetelmävertailussa tutkittiin, antaako validoitava menetelmä samanlaisen tulostason kuin käytössä oleva menetelmä. Menetelmävertailu toteutettiin käytännössä siten, että samat näytteet analysoitiin validoitavalla menetelmällä (LeukoSure™) sekä vertailumenetelmällä (Leucocount™). Kvantitatiivisten menetelmien validointiparametrien määrittäminen -ohjeen mukaisesti menetelmävertailuun valittavien näytteiden tulee edustaa eri tasoja ja luotettavuuden takaamiseksi näytteitä tulee olla vähintään 6–10. (Yleisohje LP-YO-012 2008: 1; Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008: 10.)

### 3.5 Muuta taustatietoa

Beckman-Coulter Navios™ -virtaussytometreja on Suomessa käytössä muillakin tahoilla kuin SPR Veripalvelussa. Esimerkiksi Fimlab (entinen Pirkanmaan Sairaanhoidopiirin Laboratoriokeskus) tekee CD34-positiivisten kantasolujen määrittämiä Navios™-virtaussytometreilla (Fimlab 2011) ja Julkisten hankintojen tietokannasta HILMA:sta löytyy tieto Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoidopiirin päätöksestä hankkia kaksi Navios™-virtaussytometriä Meilahden sairaalan laboratorioon (HILMA 2012). Tämän opinnäytetyön kanssa samaan aikaan on valmistumassa toinen opinnäytetyö, joka on Minna Huovisen tekemä valkosolujen sopivuuskokeen validointi SPR Veripalvelun Navios™-virtaussytometreille. Navios™-virtaussytometreille ei ole ilmeisesti tehty Suomessa aiemmin opinnäytetöitä tai muita päättötöitä tai niitä ei ole vain tallennettu sähköisiin tietokantoihin.

LeukoSure™- ja Leucocount™-menetelmistä ei löytynyt tietoa, että niitä olisi käytössä missään muussa laboratoriossa Suomessa. Tätä selittää hyvin se seikka, että molemmat menetelmät on tarkoitettu jäännösvalkosolujen laskentaan veri- ja soluvalmisteista, mutta Suomessa veri- ja soluvalmisteiden tuottaminen on keskitetty SPR Veripalveluun, joten menetelmille ei ole käyttöaihetta muualla Suomessa. Aiheesta löytyy kuitenkin mainintoja muun muassa verensiirtojen immunologiaa ja verensiirtojen haittavaikutuksia käsittelevissä artikkeleissa ja muista julkaisuista. Esimerkiksi Irma Matinlaurin (2004) artikkelissa Verivalmisteiden immunologiset vaikutukset on koottu tietoa mahdollisista jäännösvalkosolujen aiheuttamista verensiirron haittavaikutuksista.

Teoksessa Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine 11<sup>th</sup> edition (Klein - Anstee 2005: 546–610) kappaleessa 13. *Immunology of leucocytes, platelets and plasma components* on koottuna hyvin laajasti kansainvälisesti merkittäviä tutkimuksia ja julkaisuja, jotka käsittelevät verensiirtojen ja jäännösvalkosolujen immunologisia mekanismeja ja merkitystä veri- tai soluvalmistetta saaneen potilaan kannalta. Perustiedot verensiirtoja koskevasta immunologiasta ovat pysyneet samana vuosikymmeniä, mutta uusilla tutkimuksilla voidaan tulevaisuudessa parantaa verensiirtojen turvallisuutta ja ennaltaehkäistä verensiirtojen haittavaikutuksia, kun verensiirtojen taustalla olevat immunologiset mekanismit tarkentuvat.

## 4 Jäännösvalkosolujen määrittäminen

Seuraavissa kappaleissa esitellään tarkemmin opinnäytetyössä jäännösvalkosolujen määrittämissä käytetyt menetelmät ja analysaattori. Validoitavana menetelmänä oli Beckman-Coulter LeukoSure™ ja vertailumenetelmänä toimi Becton-Dickinson Leuco-count™. Analyysit suoritettiin Beckman-Coulter Navios™ -virtaussytometreilla.

### 4.1 LeukoSure™-menetelmä

Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmä on pakkaus reagensseja, joita käytetään jäännösvalkosolujen laskentaan punasolu- ja trombosyyttivalmisteista virtaussytometrialla. Analysoitavat näytteet esikäsitellään menetelmän reagensseilla ja analysoinnissa käytettävän virtaussytometrin asetukset määritetään LeukoSure™-menetelmän vaatimusten mukaisesti. Menetelmän kriittisimmät vaiheet ovat näytteen ja sisäisen vakion reagenssin pipetoimiset, koska analysaattorilta saatavat tulokset perustuvat näiden tarkkoihin tilavuuksiin ja sisäisen vakion reagenssin pitoisuuteen. LeukoSure™-menetelmä on suunniteltu laskemaan jäännösvalkosolujen määrä vaaditulla tasolla, jolla varmistetaan valkosoluttomien verituotteiden laadunvalvonnan onnistuminen. (Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausseloste.) Menetelmän sisältämät reagenssit on kuvattuna kuviossa 3.



Kuvio 3. LeukoSure™-menetelmän reagenssit: leimareagenssi, lysireagenssi ja sisäisen vakion reagenssi.

Reagenssipakkaus sisältää kolme eri reagenssia: LeukoSure™-lyysireagenssi (Lyse Reagent), LeukoSure™-leimareagenssi (Stain Reagent) ja LeukoSure™-sisäisen vakion reagenssi (Fluorospheres). Reagenssien käyttökunto tulee tarkistaa ennen niiden käyttämistä, eikä silmämääräisesti muuttuneita tai huonontuneita reagensseja tule käyttää analysoinnissa. Myös suuret variaatiot kontrollinäytteissä voivat viitata reagenssien huonontuneeseen käyttökuntoon. Reagenssien käyttäminen ei vaadi esivalmisteluita ja reagensseja tulee käyttää suoraan alkuperäisistä pulloista. Reagenssien ja esikäsiteltyjen näytteiden altistuminen valolle tulee minimoida reagenssien säilyvyyden, toimintakunnon sekä luotettavien tuloksien takaamiseksi. (Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmän pakkausseloste.)

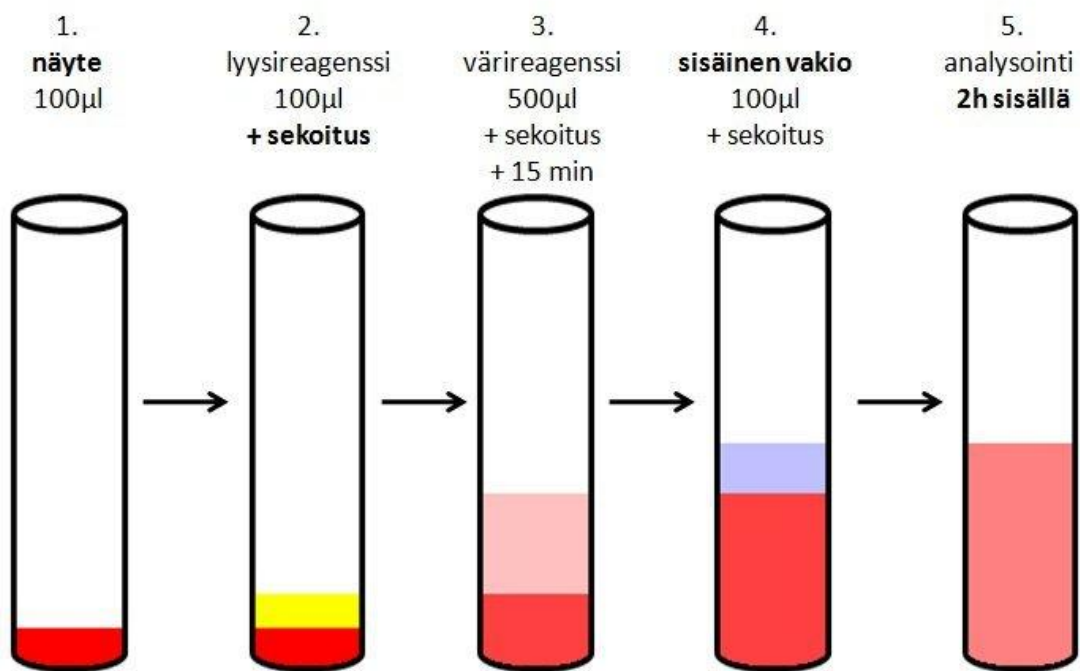
Reagenssien käsittelyssä tulee noudattaa menetelmän pakkausselosteessa lueteltuja käyttöturvallisuussäännöksiä ja käsittelyssä tulee käyttää suojahanskoja. Leimareagenssin sisältämä propidiumjodidi on mutageeninen aine ja sisäisen vakion reagenssin sisältämä formaldehydi on myrkyllistä hengitettynä, ja joutuessaan kosketuksiin ihon tai silmien kanssa. (Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmän pakkausseloste.)

Muita menetelmässä tarvittavia välineitä pakkauksen sisältämien reagenssien lisäksi ovat: pipetti ja pipetinkärjet, ajastin, testiputkia, sekoittaja (vorteksi), virtausytometri, laitteentarkistusreagenssit Flow-Set™ (fluorospheres) ja Flow-Check™ (fluorospheres), IsoFlow™-vaippaneste (sheath fluid), COULTER CLENZ™ -puhdistusneste (cleaning agent) sekä analysoitavasta näytemateriaalista riippuen Leuko-Trol™ -trombosyyttien kontrollinäytekkaus tai Leuko-Trol™ -punasolujen kontrollinäytekkaus. (Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmän pakkausseloste.)

Tutkittavat näytteet esikäsitellään reagenssipakkauksen lyysireagenssilla, leimareagenssilla ja sisäisen vakion reagenssilla ennen analysointia virtausytometrillä. Lyysireagenssi hajottaa näytteessä olevat punasolut ja permeabilisoi valkosolut, eli muuttaa solujen solukalvot läpäiseviksi leimausvaihetta varten. Leimareagenssi sisältää nukleiinihappospesifistä fluoresoivaa väriainetta propidiumjodidia, joka värjää valkosolujen DNA:ta. Näin ollen virtausytometrillä mitattaessa näytteestä emittoituva fluoresenssin määrä on suoraan verrannollinen näytteen valkosolujen pitoisuuteen. Leimareagenssi sisältää lisäksi RNA:ta tuhoavaa entsyymiä, jolloin propidiumjodidi sitoutuu ainoastaan DNA:han. Näytteitä on inkuboitava 15 minuuttia pimeässä väriaineen optimaalisen kiinnittymisen takaamiseksi. Näytteisiin lisätään sisäisen vakion reagenssi

juuri ennen analysointia, minkä avulla saadaan laskettua näytteiden jäännösvalkosolupitoisuus (valkosolua/ $\mu\text{l}$ ). Sisäisen vakion reagenssi sisältää tunnetun pitoisuuden kalibraatiohelmiä. Näytteet on analysoitava kahden tunnin kuluessa sisäisen vakion reagenssin lisäämisestä, jotta saatuja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Näytteiden esikäsittelyohje on esitetty liitteessä 1. Käytettävälle virtausytometrille, joka on tässä opinnäytetyössä Beckman-Coulterin Navios™, on asetettava LeukoSure™-menetelmän vaatimat käyttöasetukset, jotka on esitetty menetelmän pakkausselosteessa kappaleessa *Flow cytometric analysis*. (Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmän pakkausseloste.) Näytteiden esikäsittely LeukoSure™-menetelmällä on esitettyä kuviossa 4.

## LeukoSure™ esikäsittely



Kuvio 4. Näytteen esikäsittely LeukoSure™-menetelmällä, ratkaisevat työvaiheet on lihavoitu.

### 4.2 Leucocount™-menetelmä

Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän tavoin Becton-Dickinson Leucocount™-menetelmä on pakkaus reagensseja, joita käytetään jäännösvalkosolujen laskentaan veri- ja soluvalmisteista virtausytometrialla. Analysoitavat näytteet esikäsitellään menetelmän reagensseilla ja analysoinnissa käytettävän virtausytometrin ase-

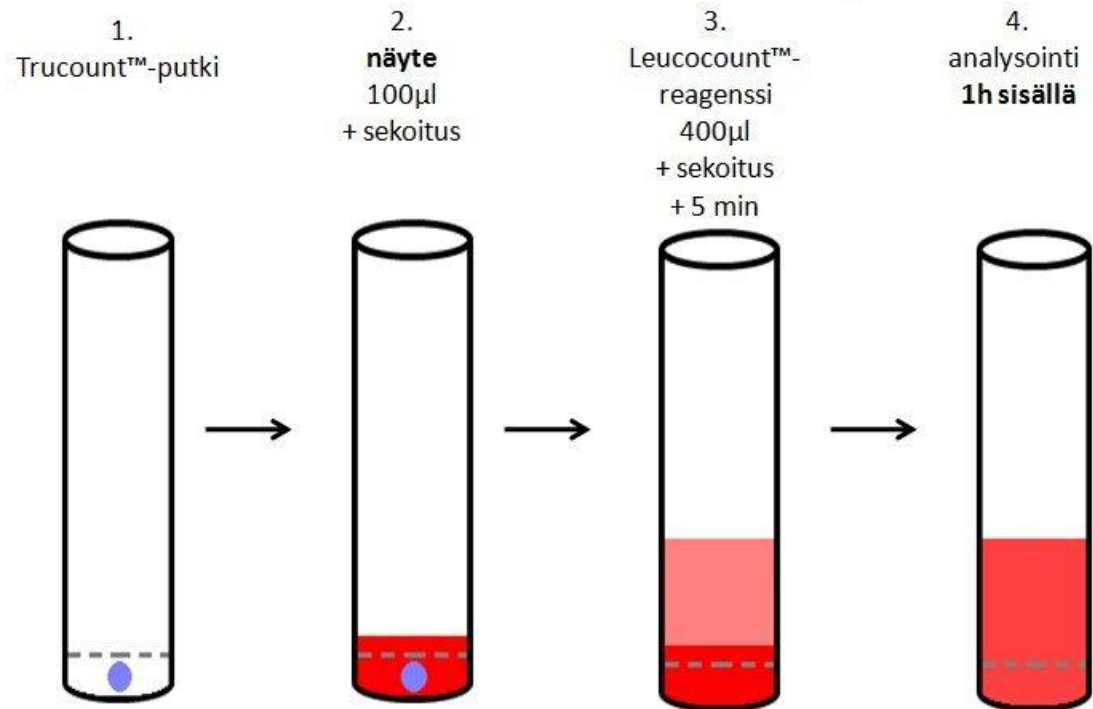
tukset määritetään Leucocount™-menetelmän vaatimusten mukaisesti. Leucocount™-menetelmä on suunniteltu laskemaan jäännösvalkosolujen määrä vaaditulla tasolla, jolla varmistetaan valkosoluttomien verituotteiden laadunvalvonnan onnistuminen. (BD Leucocount™-menetelmän pakkausseloste.) Leucocount™-menetelmää käytettiin validoitavan LeukoSure™-menetelmän vertailumenetelmänä.

Menetelmässä käytetään näytteille ja kontrolleille Trucount™-näyteputkia. Trucount™-näyteputkien pohjalla on valmiina tunnettu määrä fluoresoivia helmiä (kalibraatiohelmet), jotka toimivat menetelmän sisäisenä vakiona. Lisäksi menetelmään kuuluu Leucocount™-reagenssi, joka sisältää nukleiinihappospesifistä valkosoluja värjäävää fluoresoivaa väriainetta (propidiumjodidi), trombosyyttien ja retikulosyyttien RNA:ta tuhoavaa entsyymiä, solukalvoja permeabilisoivaa detergenttiä ja puskureita, jotka vakuuttavat näyteolosuhteita. Trucount™-näyteputket tulee käyttää tunnin kuluessa putkien poistamisesta alkuperäispakkauksesta. (BD Leucocount™-menetelmän pakkausseloste.)

Reagenssien ainesisällöt ovat Leucocount™-menetelmässä samankaltaiset kuin LeukoSure™-menetelmässä, joten reagenssien käsittelyssä ja käyttöturvallisuudessa on noudatettava samaa varovaisuutta. Myös muut tarvittavat välineet ovat vastaavat LeukoSure™-menetelmän kanssa. Leucocount™-menetelmän toimintavarmuuden takaamiseksi tulee kontrolleina käyttää BD Leucocount™-kontrolleja tai vastaavia käyttöön sopivia kontrolleja. Käytettävän virtaussytometrin toimintakunnon arvioimisessa tulee käyttää BD Calibrate™ -kalibraatiohelmiä (beads). (BD Leucocount™-menetelmän pakkausseloste.)

Tutkittavat näytteet pipetoidaan sisäistä vakiota sisältäviin Trucount™-näyteputkiin ennen analysointia virtaussytometrillä. Näytteiden päälle pipetoidaan Leucocount™-reagenssia, jonka jälkeen putket sekoitetaan vorteksoimalla ja putkia inkuboidaan huoneenlämmössä pimeässä 5 minuuttia. Esikäsittelyn tarkoituksena on värjätä ainoastaan näytteiden sisältämät valkosolut. Näytteiden esikäsittelyohje on esitettyinä liitteessä 3. Käytettävälle virtaussytometrille on asetettava Leucocount™-menetelmän vaatimat käyttöasetukset, jotka on esitetty menetelmän pakkausselosteessa kappaleessa 7. *Procedure – Instrument Setup*. (BD Leucocount™-menetelmän pakkausseloste.) Näytteiden esikäsittely Leucocount™-menetelmällä on esitettyinä kuviossa 5.

## Leucocount™ esikäsitely



Kuvio 5. Näytteen esikäsitely Leucocount™-menetelmällä, ratkaisevat työvaiheet on lihavoitu.

### 4.3 Menetelmien eroja ja yhteneväisyyksiä

Validoitava menetelmä LeukoSure™ ja menetelmävertailussa käytetty Leucocount™-menetelmä ovat hyvin samankaltaisia suorituksiltaan ja toimintaperiaatteiltaan. Molemmissa menetelmissä näytteet esikäsitellään menetelmän reagensseilla ennen analysointia virtausytometrillä ja jäännösvalkosolujen pitoisuuksien laskenta perustuu tunnettuun näytetilavuuteen sekä tunnettuun sisäisen vakion pitoisuuteen. LeukoSure™-menetelmän esikäsitelyyn sisältyy kaksi pipetointivaihetta enemmän verrattuna Leucocount™-menetelmään, joten pipetointivirheiden riski on LeukoSure™-menetelmän kohdalla suurempi. LeukoSure™-menetelmässä on kuitenkin etuna, että näytteet säilyvät analysointikelpoisina pidempään kuin käytettäessä Leucocount™-menetelmää, joten LeukoSure™-menetelmällä voidaan teoriassa tutkia suurempia näytemääriä yhdessä työlistassa. Valkosoluja leimaavana fluoresoivana väriaineena on kummassakin menetelmässä propidiumjodidi. (BD Leucocount™-menetelmän pakkausseloste; Beckman-Coulter LeukoSure™-menetelmän pakkausseloste.)

#### 4.4 Navios™-virtaussytometri

SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorioon käyttöönotettavat Beckman-Coulter Navios™ -virtaussytometrit mittaavat kahden eri laserin avulla (sininen 488 nm ja punainen 638 nm) näytteiden sisältämistä soluista aiheutuvaa suorasirontaa (FS on forward scatter), sivuttaissirontaa (SS on side scatter) ja näytteissä ja kontrollinäytteissä oleviin soluihin spesifisesti sitoutuneista fluoresoivista väriaineista aiheutuvaa fluoresenssisäteilyä kahdeksalla eri aallonpituudella, mittauskanavilla FL 1-8. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että sinisellä laserilla mitataan suorasirontaa, sivuttaissirontaa sekä fluoresenssia viidellä eri mittauskanavalla (FL 1-5). Punaisella laserilla puolestaan mitataan fluoresenssia kolmella eri mittauskanavalla (FL 6-8). Analysaattorin etuna on helppokäyttöisyyden lisäksi muun muassa automaattinen näytteiden sekoitus ennen analysointia. Analysaattorin ohjauksessa ja tulosten käsittelyssä käytetään Windows-pohjaista käyttöjärjestelmää. Yhteen näytekaruselliin mahtuu 32 näytettä. (Beckman-Coulter Navios™ 2011.) Kuva Navios™-virtaussytometrasta on esitettyinä kuviossa 6.



Kuvio 6. SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion Navios™-virtaussytometri.

LeukoSure™-menetelmässä jäännösvalkosoluja katsottiin kanavien FS, SS ja FL 1-3 avulla. Käytettävät kanavat valittiin menetelmävalmistajan ohjeiden mukaisesti.



## 5 LeukoSure™-menetelmän validoinnin suoritus

Validoinnin analyysit toteutettiin vuoden 2012 toukokuun aikana, jolloin jäännösvalkosolututkimukset suoritettiin laadunvalvontalaboratoriossa vielä Becton-Dickinsonin FACS Calibur™-virtaussytometreillä. Leucocount™-menetelmän validointi Navios™-analysaattoreille oli vielä kesken, joten laboratorion henkilökunta teki kyseisen menetelmän validointianalyysejä samaan aikaan kanssani Navios™-analysaattoreilla. Myös muut SPR Veripalvelun osastot käyttivät Navios™-analysaattoreita analyyseihinsä, joten LeukoSure™-menetelmän validointiin käytettävää analysointiaikaa oli rajallisesti.

Laadunvalvontalaboratorion työntekijät suorittivat menetelmävertailussa käytetyn Leucocount™-menetelmän analyysit alusta loppuun, lukuun ottamatta yhtä Leucocount™-näytesarjaa, jonka esikäsittelyn ja analysoinnin suoritin itse. Suoritin itse kaikki LeukoSure™-menetelmällä tehdyt esikäsittelyt ja niistä tehdyt virtaussytometriset analysoinnit. Yhteistyö opinnäytetyön asiantuntijaohjaajan kanssa oli hyvin tiivistä koko opinnäytetyöprosessin ajan, sillä toteutettava validointi perustui pääosin häneltä saatavaan ohjaukseen. Myös muilta SPR Veripalvelun työntekijöiltä oli mahdollista saada tarvittaessa ohjausta.

### 5.1 Näyteaineisto

Tuotetuista veri- ja soluvalmisteista jäännösvalkosolututkimuksiin valittava näytemäärä on SPR Veripalvelun laatuvaatimusten mukaisesti 1 % vuosittain tuotettujen veri- ja soluvalmisteiden määrästä. Kyseessä on satunnaisotos. Näytteet valitaan viikoittain SPR Veripalvelun laadunvalvonnan näytteenottosuunnitelman mukaisesti Helsingin ja Oulun soluerotteluyksiköissä. Valitut satunnaiset näytteet toimitetaan Helsingin Kivihaassa sijaitsevaan laadunvalvontalaboratorioon tutkittavaksi. PSVS (punasolut valkosoluton) ja TRVS4 (trombosyytit valkosoluton) muodostavat suurimman osan jäännösvalkosolututkimuksiin tulevista näytteistä. Osa näytteistä voi olla myös erikoisvalmisteita kuten PSVSIUS, jotka ovat kohdunsisäiseen verensiirtoon tarkoitettuja sädetetyt punasolut. Hemaferesilla kerättyjen valkosoluttomien trombosyyttivalmisteiden (TRFVS4) jäännösvalkosolupitoisuuksia seurataan tutkimalla viikoittain yksi valmiste jokaiselta hemaferesilaitteelta. Lisäksi menetelmää käytetään materiaalien (valmiste tai näytteenottopussi) käyttöönototarkistuksissa sekä laitekontroleja tutkittaessa (trombaferesilaitteet). (Valkeajärvi 2012b.)

### 5.1.1 PSVS-, TRVS- ja TRFVS-valmisteet

Validointiin otettavat näytteet valittiin Leucocount™-menetelmällä esikäsitellyistä ja FACS Calibur™-virtaussytometreillä analysoiduista jäännösvalkosolututkimuksiin tulleista veri- ja solunäytteistä. Näytteet valittiin niiden tulostason perusteella ja ne analysoitiin LeukoSure™-menetelmällä Navios™-virtaussytometreilla. Menetelmävertailuun valitut näytteet analysointiin lisäksi Leucocount™-menetelmällä käyttäen samoja Navios™-virtaussytometreja. Validoinnissa oli näytteinä valkosoluttomia punasoluvalmisteita (PSVS) n=20, valkosoluttomia trombosyyttivalmisteita (TRVS4) n=20 ja valkosoluttomia hemaferesilla kerätyjä trombosyyttivalmisteita (TRFVS4) n=3.

Valkosolujen hajoamisesta johtuen, tuli PSVS-näytteet analysoida kolmen vuorokauden sisällä näytteenotosta (näyte otettu valmisteesta säilöntäaineettomaan näyteputkeen) ja TRVS4- sekä TRFVS-näytteet vuorokauden sisällä näytteenotosta, jotta tuloksia voitiin pitää luotettavina näytemateriaalin säilymisen suhteen. Kaikki näytteet tuli kuitenkin mieluiten analysoida vuorokauden sisällä näytteenotosta. Näytteiden analysointikelposuutta tuli tarkastella lisäksi silmämääräisesti, sillä hemolyyttisiä, lipeemisiä ja hyytymiä sisältäviä näytteitä ei tullut käyttää. Näytteet säilytettiin validoinnin aikana SPR Veripalvelun ohjeiden mukaisesti. Punasolunäytteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa ja trombosyyttinäytteet säilytettiin huoneenlämmössä. (Valkeajärvi 2009; Yleisohje, liite 2 LV-YO-007-L2 2012.)

Jäännösvalkosoluja tutkittaessa on analyysin raja-arvo punasoluvalmisteilla alle  $1 \times 10^6$  valkosolua/valmiste ja trombosyyteilla alle  $0,25 \times 10^6$  valkosolua/valmiste. Veri- ja soluvalmisteiden jäännösvalkosolupitoisuudet eivät saa ylittää näitä raja-arvoja täyttääkseen laadunvalvonnan kriteerit. Trombosyyttivalmisteilla tämä raja-arvo on alempi, koska yksi valmiste koostuu neljän eri luovuttajan trombosyyteistä. Näistä valmistepusseja kuvaavista laadunvalvontarajoista on laskettu analysaattoreilta saatavien primaarituloksien laadunvalvontaraja, jolloin näytteen tulos ilmaistaan yksikössä valkosolua/ $\mu$ l. Tässä validoinnissa käsiteltiin vain analysaattoreilta saatavan primaaridatan tuloksia (valkosolua/ $\mu$ l) eikä tuloksia käännetty muuntokaavion avulla yksiköksi valkosolua/valmiste.

Validoinnin suurimpana mielenkiinnon kohteena, menetelmän koko mitausalueelta, oli menetelmän toistettavuus laadunvalvontarajan tasossa. Analysaattorilta saatavan primaarituloksen laadunvalvontaraja on 2–5 valkosolua/ $\mu$ l. Primaaridataa koskeva tarkka

laadunvalvontaraja lasketaan aina valmistekohtaisesti ottaen huomioon muun muassa valmisteen paino, jolle on myös asetettu omat laatuvaatimuksensa. Suurin osa tutkittavista näytteistä noudattaa kuitenkin vielä alemmaa jäännösvalkosolutasoa, joka on alle 1 valkosolu/ $\mu$ l. Tämä oli toinen suuren mielenkiinnon kohteena oleva menetelmän mittausalue. Nämä kaksi mittausaluetta olivat myös menetelmän minimialuetta. Menetelmän toistettavuus voi olla erilaista eri mittausalueilla. Esimerkiksi menetelmien lineaarisuuden epävarmuus usein kasvaa menetelmän minimi- ja maksimimittausalueilla. Laadunvalvontarajan tasolla on analyysitulosten kuitenkin oltava mahdollisimman oikeita ja toistettavia. Toteutetussa validoinnissa pyrittiin todistamaan, että validoitavalla menetelmällä saatavat tulokset ovat luotettavia keskittymällä edellä esitettyihin menetelmän mielenkiintoisimpiin mittausalueisiin. (Valkeajärvi 2012a; Valkeajärvi 2012b.)

Toteutettuun validointiin valittiin näytteitä edellä mainituilta validoitavan menetelmän tietyiltä mielenkiintoisimmilta mittausalueilta. Minimialueen näytteiden valinta oli yksinkertaista, koska näytteet oletettavasti noudattavat laatukriteereitä, jolloin niiden valkosolupitoisuus on alle 2–5 valkosolua/ $\mu$ l. Suuremman mittausalueen näytteet olivat ongelmallisempia validoinnin kannalta, sillä ne ovat ”epänormaaleja” näytteitä laadunvalvontatutkimuksissa. Jos näytteen valkosolupitoisuus ylittää laadunvalvontarajan, kertoo se silloin suodatuksen tai sädetyksen epäonnistumisesta, jolloin valmisteelle asetetut laatukriteerit eivät ole täyttyneet. Vain pieni osa laadunvalvontatutkimuksiin tulevista näytteistä ei täytä laatukriteerejä, joten validoinnin kannalta optimaalisen näyttemäärän kerääminen suuremman mittausalueen todellisista näytteistä ei ollut mahdollista. Korkean tason näytteitä jouduttiin tästä johtuen valmistamaan itse menetelmän lineaarisuutta ja mittausaluetta tutkiviin validointisarjoihin.

### 5.1.2 Kontrollit

Tutkimuksissa käytettiin varsinaisen näyteaineiston rinnalla kontrollinäytteitä. Laadunvalvontalaboratoriossa käytettiin Leucocount™-menetelmän kanssa neljää BD Leucocount™ Combo Control Kit -kontrollia. Punasolu- ja trombosyyttimatriiseille oli molemmille omat kontrolliparinsa, joista toinen oli matalan tason kontrolli ja toinen oli korkean tason kontrolli. Matalien kontrollien taso oli noin 2 valkosolua/ $\mu$ l ja korkeiden noin 20 valkosolua/ $\mu$ l. Kyseisillä kontrolleilla tarkastettiin menetelmävertailussa käytettyjen Leucocount™-näytesarjojen oikea tulostaso. Näitä kontrolleja oli käytettävä aluksi myös LeukoSure™-menetelmän validoinnin analyseissä, koska menetelmävalmistajan omat kontrollit eivät saapuneet laboratorioon ennen validoinnin aloittamista.

LeukoSure™-menetelmän validointirajoissa ja niiden oikean tulostason varmistamisessa siirryttiin käyttämään Beckman-Coulterin vastaavia punasolu- ja trombosyyttimatriiseille tarkoitettuja kontrolleja, kun ne saapuivat laboratorioon. Leuko-Trol™ RBC -kontrollipakkaus sisälsi matalan ja korkean tason punasolumatriisin kontrollit. Leuko-Trol™ PLT -kontrollipakkaus sisälsi puolestaan matalan ja korkean tason trombosyyttimatriisin kontrollit. Matalien kontrollien taso oli noin 2 valkosolua/μl ja korkeiden noin 20 valkosolua/μl. Validoinnissa käytettiin kahta pakkausta kontrolleja, jotka olivat kuitenkin samaa valmistuserää.

### 5.1.3 Ulkoiset laaduntarkkailunäytteet

LeukoSure™- ja Leucocount™-menetelmät osallistuivat validointiensa aikana UK NE-QAS matalan tason valkosolut -laaduntarkkailukierrokselle. Laaduntarkkailunäytteitä oli yhteensä kuusi, kolme punasolumatriisissa ja kolme trombosyyttimatriisissa. Näytteet analysoitiin molemmilla Navios™-virtaussytometreilla.

## 5.2 Validointisarjat

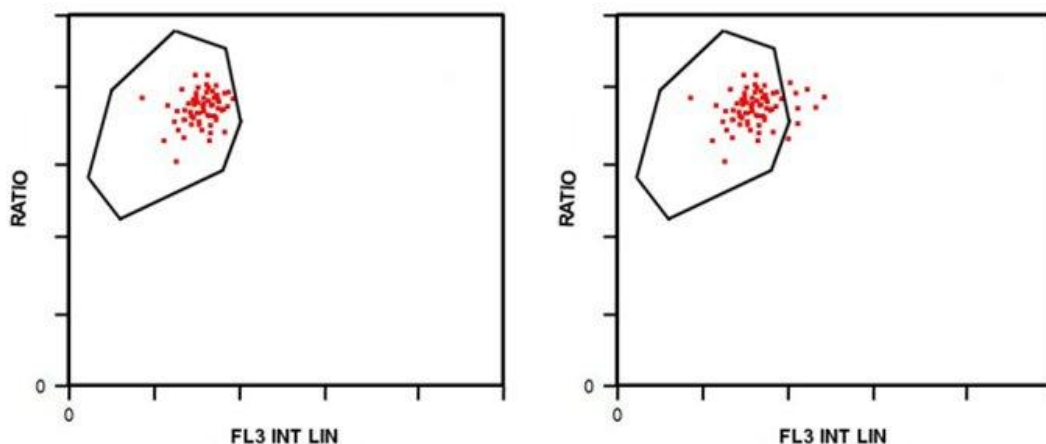
Validointisarjojen koot määritettiin siten, että samat esikäsitellyt näytteet ehdittiin analysoida molemmilla Navios™-analysaattoreilla menetelmäohjeessa määritetyn analysointikelpoisuusaajan sisällä. Osa validointisarjoista oli käytännön syistä hyvin pitkiä jolloin näytteiden analysointikelpoisuusaika olisi ylittynyt. Tällöin molemmille analysaattoreille esikäsiteltiin omat näytesarjat samoista näytteistä. Validointisarjan luonteesta riippuen sarja voitiin jakaa myös kahtia, jolloin alkuosa näytesarjasta analysoitiin toisella laitteella yhtä aikaa kun loppuosa sarjasta analysoitiin toisella, jonka jälkeen näytteet vaihdettiin toisinpäin. Validointisarjoissa tehtiin runsaasti näytteiden toistoja, jotta määritettäville tilastollisille parametreille saataisiin riittävä luotettavuus.

Validointisarjat suunniteltiin mahdollisimman tehokkaiksi, jotta yhdestä validointisarjasta voitiin saada informaatiota useamman parametrin määrittämiseen ja jotta tarvittava määrä analyyskejä täytyi kaikkien tutkimuskysymyksinä esitettyjen validointiparametrien määrittämiseksi. Lisäksi sarjojen suunnittelussa otettiin huomioon, että ne oli mahdollista analysoida validointiin varatun ajanjakson sisällä. Jokaisen validointisarjan työlistaan merkittiin analysoitavien näytteiden ja kontrollien määrä, järjestys, näytenumero, kontrollien erätiedot, päivämäärä, analysoimiseen kulunut aika laitekohtaisesti sekä oliko

analyysit suoritettu rinnakkaisilta virtausytometreilla samoista näyteputkista vai oliko näytteet esikäsitelty erikseen kummallekin analysaattorille.

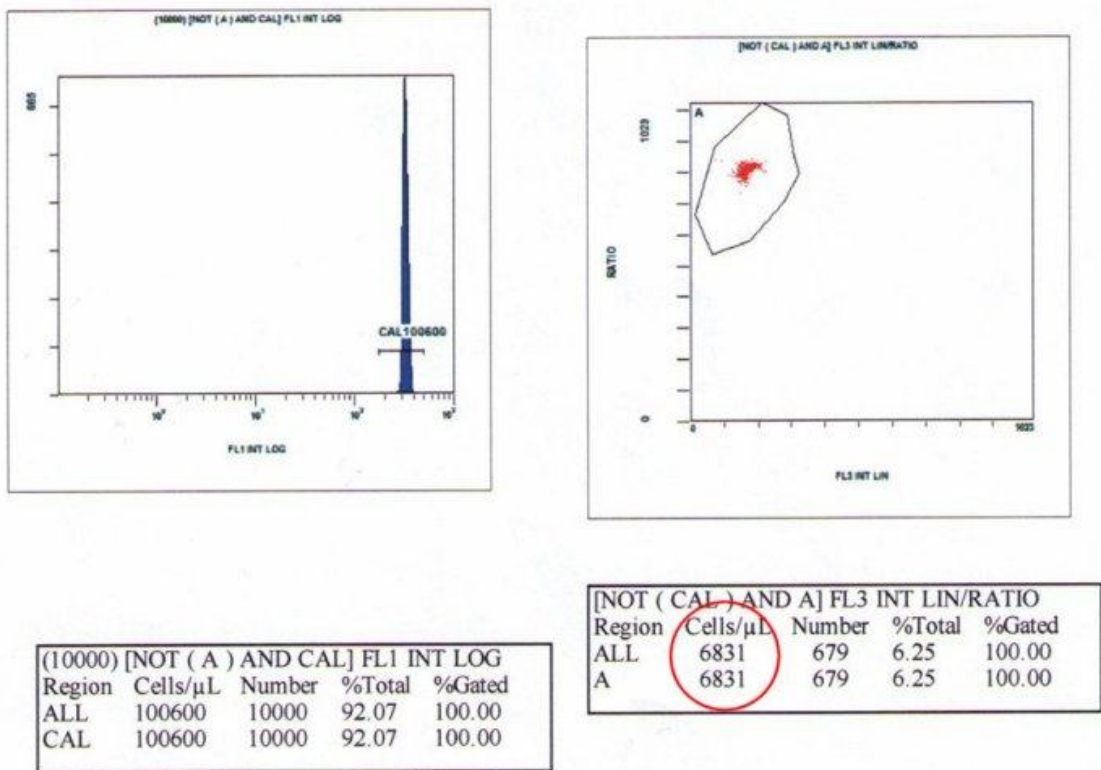
### 5.3 Analysointi Navios™-virtausytometreilla

Esikäsitellyt näytteet (LeukoSure™ ja menetelmävertailua varten Leucocount™) analysoitiin molemmilla SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion Navios™-virtausytometreillä. Rinnakkaiset virtausytometrit ovat laitenumeroiltaan LV-43016 ja LV-43017. Molemmille analysaattoreille asetettiin ensiksi menetelmävalmistajan suosittelemat käyttöasetukset. Asetuksia säädettiin tämän jälkeen laitekohtaisesti että saadut tulostasot saatiin optimaalisiksi eli tuloskuvaajien jäännösvalkosoluiksi määritetyt alueet sisälsivät todella kaikki näytteen jäännösvalkosolut. Analysaattorit ovat identtiset, mutta silti virtausytometrisilta mittauskanaviltaan yksilölliset, joten kummankin analysaattorin lopulliset asetuksen poikkesivat toisistaan. Toisen analysaattorin (LV-43016) asetuksia oli lisäksi muutettava kesken validoinnin, koska laitteiden välisessä tulostasossa huomattiin merkittävä ero, vaikka analysaattorin asetukset olivat näennäisesti kunnossa. Kyseisellä analysaattorilla saatiin merkittävästi matalampia tuloksia kuin rinnakkaisella laitteella. Alhaisen tulostason syyksi selvisi tuloskuvaajaan määritetyn jäännösvalkosolujen tapahtuma-alueen ulkopuolelle jääneet jäännösvalkosolut, joita ei voinut nähdä menetelmävalmistajan ohjeiden mukaisesti muodostetusta hajontakaaviosta. Toisin sanoen analysaattori havaitsi näytteissä olleet jäännösvalkosolut, mutta vääristä asetuksista johtuen vain osa niistä laskettiin lopulliseen jäännösvalkosolutulokseen. Kuviossa 7 on esitettyä yksinkertaistetut kaaviokuvat oikeiden näytetapahtumien jäämisestä raja-alueen ulkopuolelle.



Kuvio 7. LeukoSure™-menetelmän alkuperäisillä asetuksilla saatavasta hajontakaaviosta (vasen kuvio) ei voitu havaita rajausalueen ulkopuolelle jääviä tapahtumia (oikea kuvio), jos virtaussytometrin asetukset ja näytetapahtumien rajausalue oli määritetty väärin.

Kuviossa 8. ovat esitettyinä esimerkkikuvaajat LeukoSure™-menetelmällä saatavista primaarituloksista Navios™-virtaussytometreilta. Sisäisen vakion -reagenssin oikeaa tulostasoa seurataan yhden kuvaajan avulla ja toisen kuvaajan avulla seurataan näytteessä olevia jäännösvalkosoluja. Analyysoija laskee jäännösvalkosolupopulaatioon ainoastaan manuaalisesti tehdyn rajauksen sisäpuolelle sijoittuvat mittaustapahtumat, jotka näkyvät kuvassa punaisina pisteinä. Rinnakkaisten Navios™-analyysoijien optimaaliset asetukset ja muutokset analyysoijan LV-43016 asetuksissa on esitetty liitteessä 3.



Kuvio 8. Esimerkki LeukoSure™-menetelmällä saatavista primaarituloksista Navios™-virtaussytometreilta. Vasemmassa kaaviossa oleva sininen piikki merkitsee näytteessä olevaa sisäistä vakiota ja oikeassa kuviossa oleva punainen hajontakuvaava vastaa näytteessä olevia jäännösvalkosoluja. Primaaritulos on ympyröity punaisella, mutta laiteasetuksista johtuen tulos on jaettava sadalla oikean tuloksen saamiseksi. Eli tässä tapauksessa näytteen jäännösvalkosolupitoisuus oli 68,31 valkosolua/μL.

## 5.4 Tulosten käsittely

Navios™-virtaussytometreiltä saadut primaaritulokset tulostettiin jokaisesta analyysistä ja ne kerättiin säilytettäväksi validointikansioon. Primaaritulokset säilytetään SPR Veri-palvelun käytäntöjen mukaisesti. Tulokset siirrettiin manuaalisesti Microsoft Excel 2010 -ohjelman taulukoihin.

Navios™-analysointilaitteelta saatavat primaaritulokset ovat valmistajan tuotetietojen mukaan mahdollista muuttaa suoraan Microsoft Excel -tiedostoiksi ilman erillistä käsin kirjaamista. Manuaalinen kirjaaminen oli kuitenkin tässä opinnäytetyössä tehokkaampi ja yksinkertaisempi vaihtoehto tulosten siirtämiseksi. Kirjaamisessa oli kuitenkin tiedotettava kirjaamisvirheiden riski.

## 6 Tulokset

SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion asiantuntija tulkitse ja kokosi opinnäytetyönä tehdyt validointianalyysit SPR Veripalvelun viralliseen validointiraporttiin Jään-  
nösvalkosolujen määrittäminen valkosoluttomista verivalmisteista virtaussytometrisesti LeukoSure™-kitillä : Menetelmän sisäänajo Navios virtaussytometreille. Kaikki analyysit suoritettiin rinnakkain molemmilla Navios™-virtaussytometreilla. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2.) Seuraavaksi esitetään tulokset kappaleessa 2. *Tutkimuskysymykset ja tavoitteet* esitettiin opinnäytetyön tutkimuskysymyksiin 1–8. Tutkimuskysymystä 9., joka käsittelee LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemuksia verrattuna Leucocount™-menetelmään, pohditaan kappaleessa 8.2 *LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset*.

### 6.1 Lineaarisuus ja mittausalue

LeukoSure™-menetelmän lineaarisuus ja mittausalue voitiin laskea samoista näytesarjoista, mutta punasolumatriisille (PSVS) ja trombosyttimatriisille (TRVS4) oli tehtävä omat laimennossarjansa.

SPR Veripalvelun soluerottelu valmisti sovittuina ajankohtina punasoluvalmisteita, joiden suodatukset jätettiin tarkoituksella kesken. Kyseisiä soluvalmisteita tehtiin validointia varten kolme ja ne kuuluivat kokonaan validointiin eli valmisteita annettu potilaille.

Laadunvalvontalaboratorio laimensi suodatamatonta PSVS valmistetta saman yksikön suodatetulla näytteellä eri valkosolupitoisuuksiin. Samoja lineaarisuusnäytteitä käytettiin myös Leucocount™-menetelmän validoinnissa Navios™-analysaattoreille. SPR Veripalvelun aikaisemmissa Leucocount™-menetelmän validoinneissa PSVS-tuotteiden laimennossarjoja valmistettiin käyttäen saman luovuttajan PSVS-valmistetta ja buffy coat -kerrosta. Käytettäessä eri luovuttajien verivalmisteita ei tutkimuksissa oltu saatu yhtä luotettavia ja lineaarisia tuloksia. Näin ollen tässä kyseisessä validoinnissa käytettiin edellä esitettyä tapaa valmistaa itse eritasoisia näytteitä. (Valkeajärvi 2012a; Valkeajärvi 2012a.)

Myös TRVS4-valmisteista itse tehtävien eritasoisten näytteiden valmistaminen oli hie-man ongelmallista tässä validoinnissa, sillä TRVS4-valmisteiden kysyntä on niin suurta, että oli vaikeaa saada samanlaista näyteparia kuin edellä kuvattu saman luovuttajan suodatettu PSVS-valmiste ja valkosolut sisältävä buffy coat -kerros. Trombosyyttivalmisteiden saamiseksi oli odotettava, että jonkin trombosyyttivalmisteeseen erottelussa tapahtui virhe, jolloin kyseinen valmiste poistettiin punaisena trombosyyttivalmisteena, jonka jälkeen kyseinen valmiste oli mahdollista saada validointinäytteeksi. Laimennettavana näytteenä näissä tapauksissa käytettiin saman yksikön buffy coat -pussia ja laimentimena punaista trombosyyttivalmistetta. (Valkeajärvi 2012a; Valkeajärvi 2012a; Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 6.) Kyseisiä valmisteita saatiin validoinnin aikana kaksi ja myös laadunvalvontalaboratorio käytti näytteitä validoidessaan Leucocount™-menetelmää Navios™-analysaattoreille. Yksi trombosyyttien lineaarisuussarjoista jouduttiin valmistamaan käyttämällä korkean tason trombosyyttikontrollia sekä analysaattorin ajoliuosta, koska validointiin tarvittavaa kolmatta oikeaa näytettä ei saatu (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 6).

Molemmassa näytematriiseissa tutkittiin kolmea näytettä (PSVS n=3 ja TRVS4 n=3). Näistä kolmesta näytteestä valmistettiin omat laimennossarjansa, jotka sisälsivät vähintään viisi eri tulostasoa välillä  $0-40 \times 10^6$  valkosolua/l. Lisäksi jokainen laimennossarja valmistettiin kolmena rinnakkaisena näyteputkena. Näytesarjojen tulokset on esitettyinä liitteessä 4. ja kooste tuloksista on esitettyinä taulukossa 1.

Taulukko 1. Taulukkoon on koottuna yhteen LeukoSure™-menetelmän lineaarisuuden ja mitta-usalueen keskeisimmät tulokset näytematriiseittain (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 7).



Matriisi	Mittausalue x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	Suoran yhtälö		R <sup>2</sup>
		kulmakerroin	leikkauspiste	
PSVS	0,2–110	0,87–1,21	-0,9–0	≥ 0,996
TRVS	0,4–42	0,89–1,10	-0,3–0,5	≥ 0,991

Punasolumatriisin mittausalue oli 0,2–110 x10<sup>6</sup> valkosolua/l ja trombosyyttimatriisin mittausalue oli 0,4–42 x10<sup>6</sup> valkosolua/l. Hyväksymiskriteeri mittausalueelle oli 0–20 x10<sup>6</sup> valkosolua/l, joten LeukoSure™-menetelmän mittausalue oli hyväksyttävä molemmilla näytematriiseilla. Lineaarisuuden (R<sup>2</sup>) hyväksymiskriteeri oli ≥ 0,991, joten LeukoSure™-menetelmän lineaarisuus oli hyväksyttävä sekä punasolumatriisissa (≥ 0,996) että trombosyyttimatriisissa (≥ 0,991). (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2, 7.)

## 6.2 Sarjan sisäinen toistettavuus

LeukoSure™-menetelmän sarjan sisäisen toistettavuuden laskemiseksi tarvittiin kolme näytettä punasolumatriisista (PSVS n=3) sekä trombosyyttimatriisista (TRVS4 n=3). Jokainen näyte analysoitiin kuutena rinnakkaisena yhden validointisarjan sisällä. Myös matalan ja korkean tason punasolumatriisin ja trombosyyttimatriisin kontrollinäytteet tehtiin kuutena rinnakkaisena määrittämisessä kolmessa eri validointisarjassa. Jokainen rinnakkainen näyte esikäsiteltiin erikseen. Primaarituloksista laskettiin suhteellinen keskihajonta eli RSD %. Tulokset ovat esitettynä liitteessä 5. Taulukkoon 2. on koottuna yhteen keskeisimmät tulokset sarjojen sisäisestä toistettavuudesta.

Taulukko 2. Taulukossa on esitettynä RSD-prosenttina korkeimmat kyseisillä tulostasoilla saadut toistettavuudet kontrolli- tai näytematriisissa (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 4).

Tulostaso x 10 <sup>6</sup> valkosolua/l	Todettu RSD %
0–1	< 118
1–5	< 31
5–43	< 10

Matalalla tulostasolla  $0-1 \times 10^6$  valkosolua/l suhteellinen keskihajonta oli korkeimmillaan  $< 118 \%$ , joka on melko korkea. Validointisarjojen tuloksista voitiin todeta, että suhteellinen keskihajonta oli matalalla tulostasolla suurta kaikilla näytematriiseilla (PSVS, TRVS4 ja TRFVS) sekä molemmilla analysointilaitteilla. Korkeammilla tulostasoilla suhteellinen keskihajonta oli huomattavasti pienempää. LeukoSure™-menetelmän suuri hajonta matalan tulostason näytteissä ei ole kuitenkaan ongelma tai este menetelmän käytölle, koska se ei estä jäännösvalkosolujen laadunvalvontarajojen ylittämisen havaitsemista. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 4).

### 6.3 Sarjojen välinen toistettavuus

LeukoSure™-menetelmän sarjojen välisen toistettavuuden laskemiseksi kerättiin yhteen koko validointijakson aikana analysoitujen kontrollinäytteiden tuloksia molemmista kontrollimatriiseista (punasolu ja trombosyytti) molemmilta tulostasoilta (matala ja korkea). Sarjojen välistä toistettavuutta jouduttiin ensiksi seuraamaan toisen menetelmävalmistajan Becton-Dickinsonin kontrolleilla kunnes validoinnissa saatiin käyttöön validoitavan menetelmän oman valmistajan kontrollit (Beckman-Coulter). Lopullisissa tuloksissa ei kuitenkaan voitu ottaa laskentaan mukaan alussa käytettyjen kontrollien tuloksia, sillä niitä ei ollut kertynyt tarpeeksi kontrollien vaihtoon mennessä. Tulokset on siis laskettu LeukoSure™-menetelmän omien kontrollien mukaan. Liitteessä 6. on esiteltynä tarkemmat tulokset, mutta taulukkoon 3. on koottuna yhteen keskeisimmät tulokset.

Taulukko 3. Taulukossa on esitettyä validoinnissa saadut suhteelliset keskihajonnat näytematriiseittain ja tulostasoittain.

Kontrollinäyte	Tuloskeskiarvo $\times 10^6$ valkosolua/l	RSD %	n
trombosyytti, matala	2,0	30,0	19
punasolu, matala	2,0	20,8	19
trombosyytti, korkea	19,0	7,1	10
punasolu, korkea	21,4	6,4	7

Valmistajan ilmoittamien arvojen mukaisesti tulostasolla  $1-4 \times 10^6$  valkosolua/l suhteellinen keskihajonta (RSD %) on  $\leq 38$  % ja validoinnissa saatu arvo tulostasossa  $2 \times 10^6$  valkosolua/l oli 30 %. Vastaavasti valmistajan ilmoittamien arvojen mukaisesti tulostasolla  $4-40 \times 10^6$  valkosolua/l suhteellinen keskihajonta on  $\leq 19$  % ja validoinnissa saatu arvo tulostasossa  $20 \times 10^6$  valkosolua/l oli 7,1 %. Näin ollen saadut sarjojen väliset toistettavuudet olivat valmistajan antamien arvojen mukaiset. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 5).

#### 6.4 Mittausepävarmuus

LeukoSure™-menetelmän mittausepävarmuus laskettiin matalalle kontrollille, punasolumatriisille (PSVS) ja trombosyyttimatriisille (TRVS4) kahdella eri tulostasolla, jotka olivat matala tulostaso  $< 1 \times 10^6$  valkosolua/l ja  $2-3 \times 10^6$  valkosolua/l. Mittausepävarmuus  $U$  laskettiin alla esitetyllä kaavalla, jossa  $RSD$  tarkoittaa suhteellista keskihajontaa, lyhenne  $sis$  merkitsee sarjojen sisäistä hajontaa ja  $väl$  sarjojen välistä hajontaa. Sarjojen välisen toistettavuuden arvoksi valittiin korkein havaittu sarjojen välinen hajonta, joka oli 30,0 % (taulukko 3.). Keskeiset tulokset LeukoSure™-menetelmän mittausepävarmuudesta on koottuna taulukkoon 4. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 5-6.)

$$U(\%) = 2 \cdot \sqrt{RSD(sis)^2 + RSD(väl)^2}$$

Taulukko 4. Taulukossa on esitettyä matalalle kontrollille, punasolumatriisille sekä trombosyyttimatriisille lasketut mittausepävarmuudet tulostasoilla  $< 1 \times 10^6$  valkosolua/l ja  $2-3 \times 10^6$  valkosolua/l. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 6).

Näyte	U %	
	Tulostaso $< 1 \times 10^6$ valkosolua/l	Tulostaso $2-3 \times 10^6$ valkosolua/l
Matala kontrolli	ei näytettä	87
PSVS	244	ei näytettä
TRVS4	112	71

Mittausepävarmuuden hyväksymiskriteeri oli  $\leq 110$  %, joka oli laskettu valmistajan antamien toistettavuustietojen perusteella. LeukoSure™-menetelmän mittausepävarmuus tasolla  $2-3 \times 10^6$  jäännösvalkosolua/l oli 87 % joten LeukoSure™-menetelmän mittaus-

epävarmuus kyseisellä tasolla oli hyväksyttävä. Mittausepävarmuutta tutkittiin kuitenkin myös toisella mielenkiinnon kohteena olevalla tulostasolla, joka oli  $< 1 \times 10^6$  jäännösvalkosolua/l, mutta tällä tasolla mittausepävarmuus ylitti hyväksymiskriteerit kummallakin näytematriisilla. Näin ollen mittausepävarmuuden tutkimiseksi tulisi tehdä lisävalidointeja, jotta sen hyväksyttävyys myös matalalla tulostasolla voitaisiin varmistaa. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2, 5–6).

## 6.5 Siirtymävirhe

LeukoSure™-menetelmän validointiin sisältyi tutkittavan analyytin, eli jäännösvalkosolujen, mahdollisen siirtymävirheen määrittäminen käytettäessä Navios™-virtaussytometrejä. Määrittämisessä käytettiin seuraavanlaista validointisarjaa, jossa vuorottelivat matalan tason ja korkean tason näytteet:

$M_1M_2M_3$   $K_1K_2M_4$   $K_3K_4M_5$   $M_6M_7M_8$   $K_5K_6M_9$   $K_7K_8M_{10}$   $K_9K_{10}M_{11}$

$M$  merkitsee yhtä matalan tason PSVS-näytettä, joka toistuu sarjan aikana 11 kertaa.  $K$  merkitsee puolestaan korkean tason punasolumatriisin kontrollinäytettä, joka toistuu sarjan aikana 10 kertaa. Korkean tason näytteenä oli käytettävä kontrollinäytettä, koska tarpeeksi korkeaa PSVS-näytettä ei ollut saatavilla. Kummallekin virtaussytometrille laskettiin oma siirtymävirhe vertaamalla korkean tason näytteiden jälkeen analysoitujen matalan tason näytteiden ( $M_4M_5M_9M_{10}M_{11}$ ) keskiarvoa  $X_{KORKEA}$  matalan tason näytteiden jälkeen analysoitujen matalan tason näytteiden ( $M_2M_3M_6M_7M_8$ ) keskiarvoon  $X_{MATALA}$ . Siirtymävirhe laskettiin erotuslaskuna:  $siirtymävirhe = X_{KORKEA} - X_{MATALA}$ . (Validointisuunnitelma STR-90-5815-4S 2012: 3-4; Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 6.)

Navios™ LV-43016:lla siirtymävirhe oli 0,02 valkosolua/l ja Navios™ LV-43017:lla 0,06 valkosolua/l eli yhteenvetona matalien näytteiden keskiarvo oli korkeiden näytteiden jälkeen  $0,02-0,06 \times 10^6$  valkosolua/l korkeampi kuin matalien näytteiden jälkeen. Siirtymävirhettä tapahtui siis hieman, mutta ero ei ole kuitenkaan merkitsevä, kun arvioinnissa huomioidaan matalan tulostason mittausepävarmuus, jota siirtymävirhe ei saanut ylittää. Tarkemmat tulokset ovat liitteenä 7. (Validointisuunnitelma STR-90-5815-4S 2012: 3-4; Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 6.)

## 6.6 Oikeellisuus

LeukoSure™-menetelmä osallistui ulkoiselle laaduntarkkailukierrokselle (UK NEQAS), joka sisälsi kolme punasolumatriisin näytettä ja kolme trombosyyttimatriisin näytettä. Myös Leuocount™-menetelmä osallistui samalle laaduntarkkailukierrokselle. LeukoSure™-menetelmän käyttäjiä osallistui laaduntarkkailukierrokselle viisi laboratoriota ja Leuocount™-menetelmän käyttäjiä osallistui 38 laboratoriota. Koska LeukoSure™-menetelmän käyttäjiä oli niin vähän, niin SPR Veripalvelun asiantuntija päätyi vertaamaan LeukoSure™-menetelmällä saatuja arvoja Leuocount™-menetelmän kierrosmediaaneihin ja kierroshajontoihin, jolloin kierroshajonta oli suurempaa sallien suuremmat poikkeamat kierroshajonnasta. Oman tulostason oikeellisuutta jäännösvalkosolujen määrittämisessä arvioitiin molemmilla Navios™-virtaussytometreilla erikseen (LV-43016 ja LV-43017). Jokainen näyte analysoitiin kahtena rinnakkaisena. Taulukossa 5. esitetyt kummaltakin analysaattorilta saadut tulokset ovat näiden rinnakkaisten tulosten keskiarvot. Z-score laskettiin alla olevan kaavan avulla. Laaduntarkkailukierroksen kierrosmediaani, kierroshajonta sekä laitekohtaiset tulokset ja jokaiselle näytteelle laskettu z-score on esitettyinä taulukossa 5. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 7.)

$$z - \text{score} = \left( \frac{\text{laitekohtainen tulos} - \text{kierrosmediaani}}{\text{kierrosmediaani}} \times 100 \% \right) : \text{kierroshajonta}$$

Taulukko 5. Taulukossa on esitettyinä kuudesta UK NEQAS laaduntarkkailunäytteestä saadut tulokset kummallakin Navios™-analysointilaitteella. RBC merkitsee punasolumatriisin näytettä ja PLT merkitsee trombosyyttimatriisissa olevaa näytettä. Hyväksymisrajojen ylitykset on korostettu. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 7.)

Laaduntarkkailunäyte	Kierrosmediaani x10 <sup>6</sup> valkosolua/l (Leucocount™)	Kierroshajonta RSD % (Leucocount™)	(LeukoSure™) LV-43016		(LeukoSure™) LV-43017	
			Tulos	z-score	Tulos	z-score
			x10 <sup>6</sup> valkosolua/l		x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	
RBC 457	1,26	24,6	0,8	-1,5	1,91	<b>2,1</b>
RBC 458	3	17	1,76	<b>-2,4</b>	2,57	-0,8

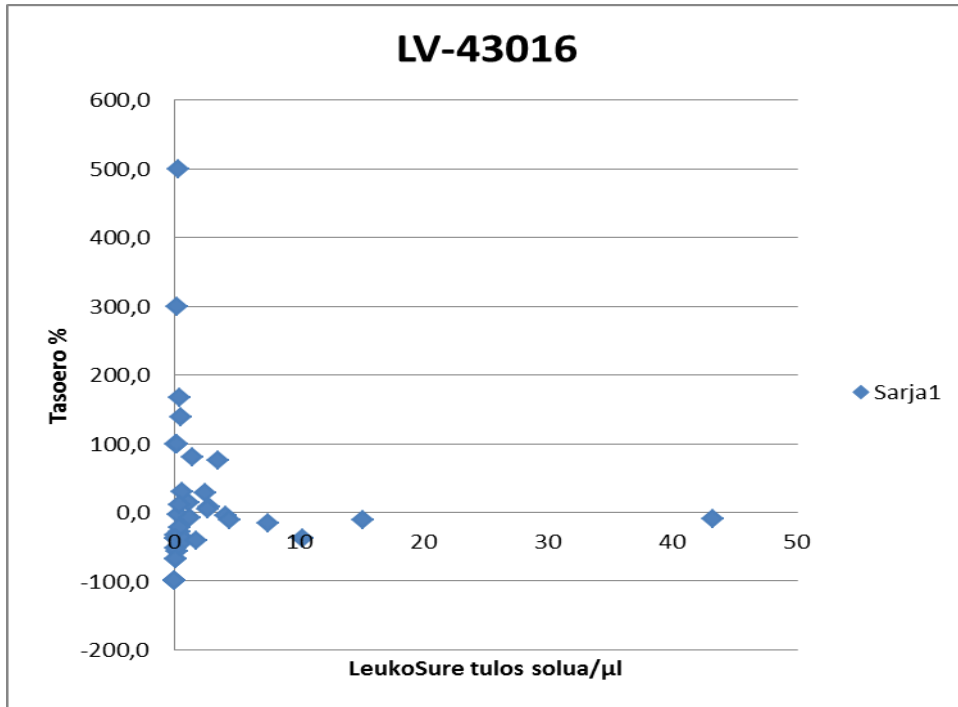
RBC 459	17,68	11,6	10,27	<b>-3,6</b>	17,41	-0,1
PLT 457	19,18	11,2	15,09	-1,9	17,11	-1,0
PLT 458	5,61	21,5	4,38	-1,0	4,28	-1,1
PLT 459	9,36	11,5	7,45	-1,8	8,15	-1,1

”Jos z-score ylittää arvon 2, oma tulos on kauempana kierroksen mediaanista kuin 95 %:lla muista kierrokseen osallistujista” (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 7). Kun z-score on 0, on oma tulos sama kuin laaduntarkkailukierroksen kierrosmediaani. Oikeellisuuden eli z-scoren hyväksymiskriteeri oli  $\leq 2$ , mutta tulos ei myöskään saanut alittaa arvoa -2. Navios™-virtaussytometrillä LV-43017 kaikkien näytteiden oikeellisuus oli hyväksyttävä. Kyseisellä analysaattorilla z-score ylittyi näytteen RBC 457 kohdalla, kun tuloksia verrattiin Leucocount™-menetelmän käyttäjäryhmään, mutta tulos oli hyväksyttävä verrattaessa LeukoSure™-käyttäjäryhmään (kierrosmediaani  $1,34 \times 10^6$  valkosolua/l ja keskimääräinen kierroskeskihajonta 24,3 %). Tällöin näytteen RBC 467 z-score oli 1,7. Toisen Navios™-virtaussytometrin LV-43016 kohdalla z-score ylittyi näytteillä RBC 458 (-2,4) ja RBC 459 (-3,6). Lisäksi kyseiselle analysaattorille oli tehtävä muutoksia LeukoSure™-menetelmän ajopohjaan ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden analysoimisen jälkeen, joten kyseisen analysaattorin tulostason oikeellisuutta ei voitu todentaa validoinnin aikana vaan sen osoittamiseksi olisi tehtävä lisävalidointeja. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2, 8.)

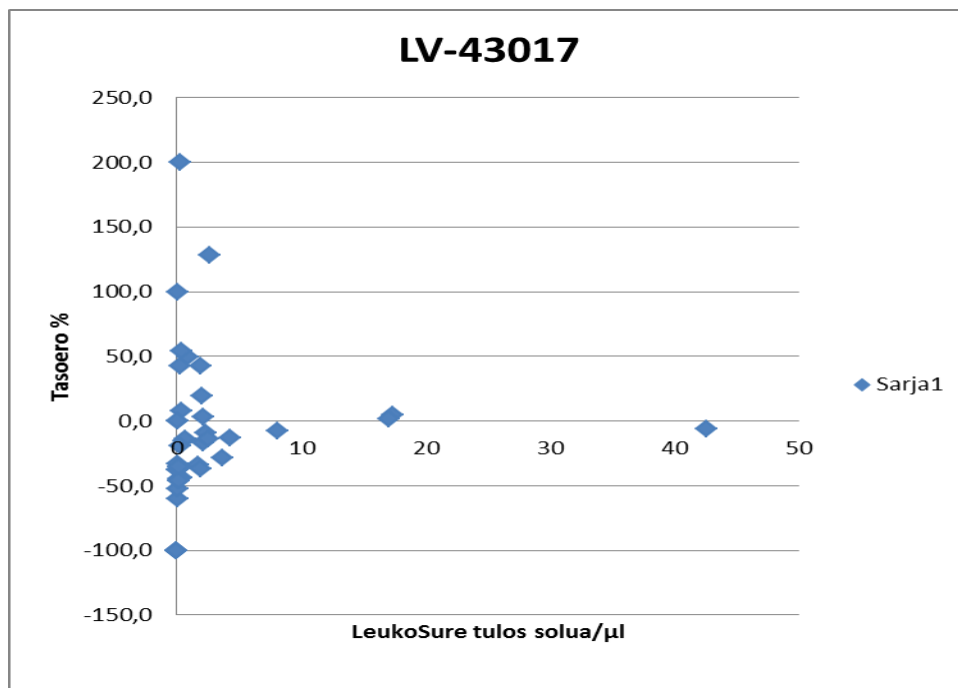
## 6.7 Menetelmien vertailu

LeukoSure™-menetelmän vertailumenetelmänä käytettiin Leucocount™-menetelmää, jota validoitiin samaan aikaan samoille Navios™-virtaussytometreille. Vertailumenetelmän analyysit suorittivat kuitenkin SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion oma henkilökunta yhtä validointisarjaa lukuun ottamatta, jonka esikäsittelin ja analysoin itse. Menetelmävertailun tulokset laskettiin PSVS-näytteiden (n=20), TRVS4-näytteiden (n=20) ja TRFVS4-näytteiden (n=3) perusteella, jotka kaikki analysoitiin yhtenä rinnakkaisena molemmilla määritysmenetelmillä. Näytekohtainen tulosten tasoero laskettiin alla esitetyn kaavan mukaisesti. Saadut tulokset sijoitettiin kuvaajille, jotka ovat esitettyinä kuvioissa 9. ja 10.. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2, 8.)

$$\text{näytekohtainen tasoero} = \frac{\text{LeukoSure}^{\text{TM}}\text{-tulos} - \text{Leucocount}^{\text{TM}}\text{-tulos}}{\text{Leucocount}^{\text{TM}}\text{-tulos}} \times 100 \%$$



Kuvio 9. Kuviossa on esitettyinä sinisinä neliöinä LeukoSure™-menetelmän näytekohtainen tasoero verrattuna Leucocount™-menetelmään Navios™-virtausytometrillä LV43016 (Validointiraportti Liite 5 STR-90-5815-4R-L5 2012).



Kuvio 10. Kuviossa on esitettyinä sinisinä neliöinä LeukoSure™-menetelmän näytekohtainen tasoero verrattuna Leucocount™-menetelmään Navios™-virtausytometrillä LV43017 (Validointiraportti Liite 5 STR-90-5815-4R-L5 2012).

Kuvioissa 9. ja 10. y-akselilla havaittava ero nollatasoon merkitsee LeukoSure™-menetelmän tasoeroa Leucocount™-menetelmään ja x-akselilla nähdään mitä tulostasoa näytteet edustivat. Suurin osa näytteistä edusti matalaa tulostasoa ( $\leq 1,5 \times 10^6$  valkosolua/l), jossa menetelmien tasoeron vaihtelu oli suurta, kuten kuvioista 9. ja 10. voidaan havaita. Menetelmien tasoeron suuruus oli välillä -100–500 %, kun huomioitiin molemmat analysaattorit ja kaikki näytteiden tulostasot. Tarkasteltaessa tulostasoa  $> 1,5 \times 10^6$  valkosolua/l oli analysaattorilla LV-43016 tasoeron vaihteluväli -41–76 % ja analysaattorilla LV-43017 tasoeron vaihteluväli -37–20 %. Menetelmävertailun hyväksymiskriteerinä oli, että tasoeron näytetuloksilla tuli olla alle kyseiselle tulostasolle määritetyn mittausepävarmuuden. Hyväksymiskriteeri toteutui analysaattorilla LV-43017, kun tarkasteltavan tulostasona oli  $2-3 \times 10^6$  valkosolua/l ja mittausepävarmuus tällä tasolla oli 71 %, mutta analysaattorin LV-43016 kohdalla hyväksymiskriteeri ylitettiin. Tulostaso  $2-3 \times 10^6$  valkosolua/l on laadunvalvontarajan taso. Tulosten hajontaa kasvatti näytteiden määrittäminen yksinkertaisina sekä analysaattorin LV-43016 kohdalla vääränlaiset LeukoSure™-menetelmän ajopohja-asetukset, joita muutettiin kesken validoinnin. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 8.)

#### 6.8 Yhteenveto tärkeimmistä tuloksista ja johtopäätökset

Validoinnin perusteella LeukoSure™-menetelmä soveltuu jäännösvalkosolujen kvantitatiiviseen laskentaan veri- ja soluvalmisteista. LeukoSure™ voidaan ottaa SPR Veri-palvelun laadunvalvontalaboratoriossa Leucocount™-menetelmän varamenetelmäksi, mutta sen käyttöönotto vaatii lisävalidointeja, joissa tarkennetaan mittausepävarmuutta. Suuremman aineiston analysoinnilla menetelmän mittausepävarmuus saatettaisiin todeta pienemmäksi. LeukoSure™-menetelmän mittausepävarmuus oli suurempi kuin Leucocount™-menetelmän mittausepävarmuus, joten LeukoSure™-menetelmää käytettäessä jäännösvalkosolujen validointirajojen ylittämisten havaitseminen olisi epävarmempaa. Validoinnin aikana toisen rinnakkaisen Navios™-virtaussytometrin asetuksia täytyi muuttaa, joten kyseisen analysaattorin tulostason oikeellisuus tulisi osoittaa lisävalidointien avulla. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2, 9–10.)



## 7 Tulosten luotettavuus

Tulosten luotettavuutta pohdittaessa täytyy osata arvioida opinnäytetyötä sekä kokonaisuutena että yksittäisinä osa-alueina. Mitkä asiat ovat voineet heikentää tutkimustulosten luotettavuutta ja mitkä asiat puolestaan ovat edistäneet sitä?

Reliabiliteetti kuvaa tutkimuksen luotettavuutta. Luotettavuus tarkoittaa tulosten pysyvyyttä eli tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tutkimuksen reliabiliteetti on hyvä, kun toistetussa mittauksessa saadaan täsmälleen sama tulos riippumatta tutkijasta. (Vilka 2007: 177.)

Tämä opinnäytetyö ei ole reliabeli siinä suhteessa, että suoritin ainoastaan itse LeukoSure™-menetelmällä tehdyt analyysit, jolloin tulosten tutkijasta riippumattomuutta ei voida todentaa. Leucocount™-vertailumenetelmällä tehdyt analyysit suorittivat kuitenkin laboratorion muu henkilökunta yhtä validointisarjaa lukuun ottamatta. Validoinnissa tehtiin niin paljon näytteiden toistoja, jotta menetelmän toistotarkkuudesta saatiin luotettava arvio.

Validiteetti tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä ollaan mittaamassa. Tutkimus on validi, kun siihen ei sisälly systemaattista virhettä. (Vilka 2007: 179.)

Menetelmävertailun avulla ja menetelmän oikeellisuuden arvioinnilla (ulkoisen laadunarviointi) pystytään toteamaan, että LeukoSure™-menetelmää voidaan käyttää juuri sen suunniteltuun käyttötarkoitukseen eli jäännösvalkosolujen määrittämiseen SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa käytettävistä näytematriiseista. Näin ollen opinnäytetyön validiteetti on hyvä. Toisen Navios™-analysaattorin (LV-43016) kohdalla validoinnin alkupuolen analyysissä tapahtui systemaattista virhettä, koska analysaattorin asetukset eivät olleet optimaaliset.

Käytettyjen virtausytometrien toimintakunto oli oltava laitevalmistajan suositusten mukainen. Navios™-virtausytometriä päivittäiset huollot kirjattiin virallisiin huoltodokumentteihin ja virtausytometriä päivittäisen toimintakunnon tarkastuksen yhteydessä otettiin tulosteet ajetuista laitteentarkistusreagenssien Flow-Set™ (fluorospheres) ja Flow-Check™ (fluorospheres) tuloksista. Molemmat dokumentaatiot säilytetään SPR Veripalvelun käytäntöjen mukaisesti.

Luotettavien tulosten saamiseksi opinnäytetyössä käytettiin valmistajan suositusten mukaisesti kalibroituja pipettejä. Menetelmän yksi kriittinen työvaihe oli täsmällisen

näytemäärän ja sisäisen vakion -reagenssin pipetoiminen, sillä tulosten laskeminen perustui tunnettuun näytetilavuuteen ja tunnettuun sisäisen vakion pitoisuuteen.

Reagenssien käyttökunto ja kelpoisuus tuli varmistaa ennen niiden käyttöä. Reagenssien ja esikäsiteltyjen näytteiden altistuminen valolle tuli minimoida, sillä valo olisi voinut vaikuttaa analyysikelpoisuuteen heikentävästi. LeukoSure™-menetelmän sisäisen vakion reagenssi olisi pitänyt pakkausselosteen mukaan sekoittaa vorteksoimalla 10–12 sekuntia, mutta pullo ei muotonsa vuoksi soveltunut sekoitettavaksi vorteksilla, joten sekoitin reagenssin käsin. Lisäksi sekoittamisen kanssa tuli olla varovainen, että reagenssia ei olisi jäänyt korkkiin, joten reagenssin sekoittaminen homogeeniseksi oli haastavaa. Lisäksi kyseinen reagenssi oli väritöntä, joten myös sen pipetoiminen oli vaikeaa. Sisäisen vakion reagenssi oli suljettu metallisella sinetillä, joka tuli poistaa kokonaisuudessaan, sillä sinetin joutuminen reagenssiin olisi voinut heikentää reagenssin käyttökuntoa reagoimalla sen kanssa epäsuotuisasti. (Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausseloste; BD Leucocounture™ -menetelmän pakkausseloste.)

Näytteiden kanssa tuli analysoida päivittäin kontrollinäytteitä menetelmän luotettavuuden arvioimiseksi. Näytteiden välillä suositeltiin ajettavaksi IsoFlow™-vaippanestettä sisältävä testiputki, joka huuhtelee laitteistoa. Tästä ohjeistuksesta kuitenkin poikettiin, sillä laitteiston huuhtelu jokaisen näytteen välissä ei olisi ollut käytännöllistä. Ylimääräiset huuhtelut olisivat kasvattaneet validointisarjojen kokonaisanalysointiaikaa, jolloin pitkissä validointisarjoissa olisi näytteiden analysointikelpoisuus esikäsiteltyjen jälkeen ylittynyt. Laitteisto huuhdeltiin jokaisen validointisarjan välissä vettä sisältävällä testiputkella. Siirtymävirhettä tutkittaessa pystyttiin toteamaan, että laitteistoa ei tarvitse huuhdella jokaisen näytteen välillä, koska siirtymävirhettä ei tapahtunut. (Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausseloste; BD Leucocounture™ -menetelmän pakkausseloste.)

Näytteiden käsittelyssä käytettiin suojahanskoja kontaminoitumisen estämiseksi ulkopuolisella DNA:lla tai RNA:lla, koska menetelmissä käytettävät väriaineet pystyivät kiinnittymään myös kontaminantteihin, josta olisi voinut seurata analyysituloksen kasvaminen tai tulosten tulkinnan vaikeutuminen. (Valkeajärvi 2009.) Näytteet tuli olla otettuna oikeanlaisiin näyteputkiin ja ne oli tutkittava tietyn aikavälin sisällä näytteenotosta. (Yleisohje, liite 2 LV-YO-007-L2 2012.) Muutaman trombosyyttimatriisia edustavan näytteen kohdalla analysointikelpoisuus ylittyi noin vuorokaudella, koska muuten tarvit-

tavat näytemäärät eivät olisi täytyneet. Analysointikelpoisuuden ylityksellä ei ollut kuitenkaan merkitystä validoinnin luotettavuuden kannalta. Validoinnilla haluttiin selvittää LeukoSure™-menetelmän kykyä mitata jäännösvalkosolujen pitoisuuksia, joten mahdolliset muutokset kyseisten näytteiden valkosolupitoisuuksissa säilytyksen aikana eivät olisi vaikuttaneet menetelmän mittauskyykyyn.

Punasolujen hajottaminen lyysireagenssilla olisi voinut epäonnistua, mikä olisi voinut johtaa vääriin analyysituloksiin. Näyte olisi tällöin voinut näyttää samealta ja näytteen valonsirontahistogrammissa olisi ollut havaittavissa muutoksia. Lisäksi näytteissä saattoi esiintyä nukleiinihappoja sisältäviä punasoluja, joihin väriaine olisi kiinnittynyt, jolloin analysaattori olisi laskenut kyseiset punasolut osaksi valkosolupopulaatioita. Punasolujen hajottamisen onnistumista varmistettiin riittävällä sekoittamisella vorteksoimalla lyysireagenssin lisäämisen jälkeen eikä ongelmia lyysireagenssin toiminnassa ilmennyt. (Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausseloste.)

Primaaritulosten siirtäminen Navios™-analysaattoreilta saatavista tulosteista Excel-taulukoihin tapahtui manuaalisesti. Tulosten syöttämisessä tuli noudattaa huolellisuutta ja järjestelmällisyyttä, jotta kirjaamisessa ei tapahtunut virheitä. Suoritin kirjaamisen usein lähes reaaliajassa sitä mukaan kun Navios™-analysaattorit antoivat tuloksia. Keräsin tulosliuskat järjestelmällisesti yhteen, liitin mukaan asiantuntijan antaman kyseisen validointisarjan lomakkeen ja mapitiin tulokset päivämäärän mukaan validointikansioihin. Jokaiseen validointisarjaan on selkeästi merkittynä, minä päivänä analyysit on suoritettu ja mikä validointisarja on kyseessä, joten tulosliuskojen etsiminen kansioista tarvittaessa on yksinkertaista.

Kokonaisuudessaan voidaan siis todeta, että opinnäytetyön reliabiliteetti ja valideetti olivat hyviä. Olin valmistautunut validointianalyysien tekoon ja mahdollisten virhelähteiden ennaltaehkäisemiseen huolella. Näin ollen pystyin arvioimaan omia työskentelytapojani sekä käyttämiäni jäännösvalkosolujen määritysmenetelmiä ja virtausytometrejä kriittisesti. LeukoSure™-menetelmällä saatiin toistettavia tuloksia ja se soveltui käyttötarkoitukseensa eli jäännösvalkosolujen mittaamiseen veri- ja soluvalmisteista. Validoinnin onnistumista kuvaa myös se, että kaikkiin tutkimuskysymyksiin saatiin vastaus.

## 8 Pohdinta

Opinnäytetyö on ollut pitkä ja vaativa prosessi, jota on syytä pohtia myös sen suuremmassa merkityksessä. Mitä tällä opinnäytetyöllä on saavutettu tähän mennessä ja mihin se voi vielä johtaa?

### 8.1 Tutkimuksen eettisyys

Opinnäytetyön toteuttamisesta sovittiin sekä suullisesti että kirjallisesti kaikkien osapuolten kesken (opiskelija, työelämä sekä oppilaitos). Metropolia Ammattikorkeakoulu ja SPR Veripalvelu sopivat oppilaitoksen käytännön mukaisen vakiosopimuksen, jossa sovittiin muun muassa opinnäytetyön aikataulusta, toiminnan ohjauksesta ja valvonnasta sekä toiminnan sisällöstä. Lisäksi sopijaosapuolet allekirjoittivat SPR Veripalvelun käytäntöjen mukaiset opinnäytetyön tutkimuslupahakemuksen sekä opinnäytetyön tutkimuslupaan liittyvät sopimusehdot.

Veripalvelutoiminnan toteuttamista säätelevät monet suositukset, asetukset ja lait. EU:n jäsenmaiden veripalvelutoimintaa koskevat lainsäädökset on pyritty yhdenmukaistamaan EU:n veridirektiivillä (Euroopan Parlamentin ja Neuvoston direktiivi 2002/98/EY). Direktiivi on annettu ”laatu ja turvallisuusvaatimusten asettamisesta ihmisveren ja veren komponenttien keräämisestä, tutkimista, käsittelyä, säilytystä ja jakelua varten” (Euroopan Parlamentin ja Neuvoston direktiivi 2002/98/EY). (SPR Veripalvelu 2012a.) EU:n veridirektiiviä noudattaen on Suomeenkin asetettu vuonna 2005 Veripalvelulaki. Lain luvussa 2 määritellään veripalvelutoiminnan toteuttamisesta ja sisällöstä. Luku säätelee muun muassa henkilöstöä, laatujärjestelmää, dokumentaatiota, jäljitettävyyttä sekä veriturvatoimintaa koskevat kriteerit. (Veripalvelulaki 197/2005.) Lisäksi SPR Veripalvelun toimintaa ohjaa Sosiaali- ja terveysministeriön asetus veripalvelusta 258/2006 (SPR Veripalvelu 2012a). Veripalvelutoimintaa ohjaavat lait ja asetukset takaavat toiminnan eettisyyden toteutumisen.

Laboratoriopalveluiden tuottamisessa on tärkeänä kriteerinä toiminnan sisäinen ja ulkoinen laadun valvonta. Sisäistä ja ulkoista valvontaa toteutetaan monilla erilaisilla toimenpiteillä, joista voidaan käyttää myös nimitystä laatujärjestelmä. Laatujärjestelmän valvomisen toteutumiseksi tulee työprosessit ja palveluketjut kuvata ja dokumentoida. Toimien kokoaikainen dokumentointi parantaa muun muassa tietoisuutta omien työprosessien ja palveluiden laadusta ja mahdollistaa nopean reagoimisen laatujärjestelmän

poikkeamiin. (Linko – Ahonen – Eirola – Ojala 2000: 150–151.) Esimerkiksi SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorio toteuttaa sisäistä laadunvalvontaa tutkimalla soluerottelussa valmistettujen veri- ja soluvalmisteiden laadun kautta valmistusprosessin luotettavuutta. Toisaalta taas laadunvalvontalaboratoriolle asetettujen vaatimusten toteutumista valvoo Fimea (Lääkealan turvallisuus ja kehityskeskus), joka on toimien ulkoista valvontaa. (SPR Veripalvelu 2012a). Veri- ja plasmavalmisteiden laadunvalvonnan tutkimusten tulee täyttää niille asetetut vaatimukset, jotta valmisteita voidaan käyttää ilman pelkoa potilaiden terveyden puolesta.

Koska opinnäytetyön aihe kuuluu osana SPR Veripalvelun normaaliin laadunvalvonnan prosessiin, ei opinnäytetyön toteuttamista varten tarvinnut hakea erillistä tutkimuslupaa. Verenluovuttajien yksityisyysuoja toteutuu tutkimuksissa. Validoinnissa käytettävät näytteet olivat vapaaehtoisten verenluovuttajien veri- ja soluvalmisteista otettuja näytteitä. Veri- ja soluvalmisteista tehtävä jäännösvalkosolujen analysointi ei kerro tutkimuksena luovuttajasta ja hänen terveydentilastaan vaan tutkimus kertoo SPR Veripalvelun veri- ja soluvalmisteita koskevien tuotantomenetelmien ominaisuuksista. Tulosten perusteella ei siis voida tehdä minkäänlaista diagnoosia luovuttajan terveydentilasta. Verenluovuttajien jäljittäminen on kuitenkin mahdollista sitä vaativissa tilanteissa (Veripalvelulaki 197/2005 § 9).

Myös pienimuotoista tieteellistä tutkimusta tehdessään on tutkijan hyvä pohtia ajoittain, miksi teen tätä työtä? Laboratoriotyöskentelyssä unohtuu helposti työn inhimillinen puoli. Tällöin esimerkiksi veri mielletäänkin vain näytemateriaaliksi, josta saadaan erilaisilla analyyseillä numeerisia tuloksia, joita tarkastellaan tietokoneelta. Tämänkin opinnäytetyön toteuttamisen perimmäisenä tarkoituksena on ollut potilaiden hoidon parantaminen ja potilasturvallisuuden lisääminen, vaikka se kuulostaa aluksi melko kaukaiselta ajatukselta. Tarkoin säädellyt työskentelytavat ja käytettävien menetelmien toimintavarmuus takaavat saatavien tulosten luotettavuutta. Jäännösvalkosolututkimuksissa saatavista vääristä negatiivisista tuloksista voisi seurata kyseisiä veri- tai soluvalmisteita saaville potilaille vaarallisia seurauksia. Väärät positiiviset tulokset taas aiheuttaisivat potilaiden hoidon kannalta arvokkaiden veri- ja soluyksiköiden hylkäämisen.

SPR Veripalvelu on voittoa tavoittelematon yritys, joten erityisesti sen on muiden laboratorioden tavoin pyrittävä koko ajan tehostamaan toimintaansa ja tekemään luotettavia laboratoriotutkimuksia taloudellisesti. Halvempi ei ole kuitenkaan aina parempi, joten käytettävien menetelmien valinnan ei tule perustua ainoastaan hintaan. Menetelmi-

en valinnassa on pyrittävä kokonaisvaltaiseen ajatteluun, jossa menetelmiä vertaillaan taloudellisuuden lisäksi myös käytännössä, jolloin menetelmien todelliset ”plussat ja miinukset” tulevat vasta esille. Käytännön testauksessa voikin ilmetä jokin ennalta arvaamaton ongelma tai toisaalta myös jokin merkittävä laboratoriota hyödyttävä ominaisuus.

## 8.2 LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset

Tässä kappaleessa pohditaan tutkimuskysymystä 9. Mitkä ovat LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset verrattuna Leucocount™-menetelmään?

Validoitava LeukoSure™-menetelmä on edullisempi kuin käytössä oleva Becton-Dickinsonin Leucocount™-menetelmä, joten LeukoSure™ olisi käytössä mahdollisesti taloudellisempi vaihtoehto. LeukoSure™-menetelmän käyttöönotossa olisi lisäksi etuna, että reagenssien tuotetuki sekä Navios™-virtaussytometrien laitetuki olisi keskitettyä Beckman-Coulterille. Ongelmatilanteiden ratkaiseminen olisi näin ollen sujuvampaa, kun yhteydenotto yhteen organisaatioon riittäisi. LeukoSure™-menetelmän kustannuksia tulisi kuitenkin arvioida kokonaisuutena mukaan luettuna välinekustannukset ja henkilöstökustannukset. LeukoSure™-menetelmässä on kaksi pipetointivaihetta enemmän kuin Leucocount™-menetelmässä, joten näytesarjojen pipetoiminen oli melko raskasta ja aikaa vievää, varsinkin verrattuna Leucocount™-menetelmään. Esimerkiksi 200 näytteen analysoinnissa LeukoSure™-menetelmällä on pipetoitava yhteensä 800 kertaa kun taas Leucocount™-menetelmällä 400 kertaa, joka on aika suuri ero käyttäjän kannalta sekä ajallisesti että työergonomisesti. Lisäksi näytteiden inkubointiaika on LeukoSure™-menetelmässä 10 min pidempi mitä Leucocount™-menetelmässä. LeukoSure™-menetelmässä oli hyvää kahden tunnin analysointikelpoisuus, joka mahdollistaa pidempien sarjojen tekemisen kerralla kun taas Leucocount™-menetelmässä analysointikelpoisuus oli vain tunnin. Näytteiden pipetoiminen ja inkubointi oli kuitenkin aikaa vievää, joten samassa ajassa yhden pitkän LeukoSure™-näytesarjan kanssa pystyi tekemään saman verran näytteitä kahdessa erässä Leucocount™-menetelmällä. Näin ollen töiden rytmittäminen (pipetoinnit, inkubointi, työlistan teko, näytteiden ajaminen) oli Leucocount™-menetelmällä helpompaa mitä LeukoSure™-menetelmällä, mutta tämä riippuu tietysti myös itse tekijästä. Normaalien näytesarjojen tekeminen ja töiden rytmittäminen on kuitenkin erilaista mitä validointisarjojen, jotka tuli analysoida molemmilla virtaussytometreilla. Työskentelytapojen rutinoituessa pidemmällä aikavälillä

työskentely myös tehostuu ja järkeistyy, joten LeukoSure™-menetelmän todellisia kustannuksia voitaisiin arvioida vasta tällöin.

LeukoSure™-menetelmässä voidaan oletettavasti käyttää EDTA-putkiin otettuja näytteitä, kun taas Leucocount™-menetelmässä niitä ei suositella käytettäväksi. EDTA-putkien sopivuus tutkimuksiin tulisi kuitenkin varmistaa menetelmän valmistajalta. Jos LeukoSure™-menetelmä otettaisiin käyttöön, voitaisiin laboratoriossa harkita valmisteenäytteidensä ottamista EDTA-putkiin mistä olisi etua muissa samasta näytteestä tehtävissä tutkimuksissa.

LeukoSure™-menetelmän reagenssien kanssa ilmeni myös muutamia käytännön ongelmia, jotka hankaloittivat työskentelyä. Esimerkiksi reagenssien määrät olivat epätasapainossa. Lyysireagenssia ja sisäisen vakion -reagenssia piti olla pakkaustietojen mukaan saman verran (20 ml), mutta sisäisen vakion -reagenssia oli pullossa silmämääräisesti vähemmän kuin lyysireagenssia. En mitannut kumpi reagensseista vastasi ilmoitettua mittaa. Sisäisen vakion -reagenssi loppui reagensseista ensimmäisenä molemmissa testipakkauksissa ja lyysireagenssia jäi vielä hieman jäljelle, vaikka olin käyttänyt pipetoimisessa samaa tekniikkaa. Kumpaakaan reagensseista ei oltu mitoitettu ollenkaan pipetointivaraa, jolloin pakkauksessa ilmoitettu testimäärä ei ole käytännössä mahdollista. Yhdellä pakkauksella sai esikäsiteltyä noin 145 näytettä eli 55 näytettä vähemmän, mitä oli oletettu.

Yhden näytteen analysointiaika oli LeukoSure™-menetelmällä noin 140–180 sekuntia, mutta ajoaika saattoi olla jopa 210 sekuntia, kun taas Leucocount™-menetelmällä ajoaika oli noin 100–160 sekuntia. Yhdessä näytteessä ero ajoajassa ei tunnu isolta, mutta isommissa sarjoissa tällä erolla ajo-ajassa voi olla jo merkitystä.

LeukoSure™-menetelmän ja Navios™-virtausytometriä käyttö oli todella nopeaa oppia, sillä molemmat olivat hyvin helppokäyttöisiä. LeukoSure™-menetelmä on myös suoritukseltaan hyvin samankaltainen kuin laadunvalvontalaboratoriossa käytössä oleva jäännösvalkosolujen tutkimusmenetelmä Leucocount™, joten perehdytyksen kannalta LeukoSure™ olisi yksinkertaista ja nopeaa ottaa käyttöön.

### 8.3 Opinnäytetyön ja sen tulosten hyödynnettävyys

Työn tulokset esitellään SPR Veripalvelussa ja SPR Veripalvelun kirjastoon luovutetaan valmis kansitettu opinnäytetyö. Opinnäytetyön tulokset ja työn toteuttamisesta syntyneet pohdinnat ovat varmasti SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratorion henkilökuntaa kiinnostavia, koska työn aihe koskettaa heidän arkityötään. Opinnäytetyössä käytetyt Navios™-virtaussytometrit ovat myös muiden SPR Veripalvelun osastojen lähes päivittäisessä käytössä, joten työn tulokset voivat kiinnostaa myös heitä.

Jäännösvalkosolujen tutkiminen on melko spesifisesti veripalvelutoiminnan aluetta, joka on Suomessa keskitetty SPR Veripalvelulle. Opinnäytetyön tuloksilla LeukoSure™-menetelmän suhteen ei oletettavasti ole käyttöä muilla laboratoriotahoilla Suomessa. Opinnäytetyö ei tuo lisää tietoa Navios™-virtaussytometreista jo olemassa olevan tiedon lisäksi, joten niidenkään osalta ei opinnäytetyö luultavimmin hyödytä muita laboratoriotahoja. Validoinnilla saavutetut käyttäjäkokemukset LeukoSure™-menetelmästä ja Navios™-virtaussytometrasta ovat puolestaan arvokasta tietoa valmistajalle Beckman-Coulterille. Opinnäytetyön seurauksena opinnäytetyötä ohjaava SPR Veripalvelun asiantuntija tapasi Beckman-Coulterin edustajan jokaakseen käyttäjäkokemuksia ja menetelmää koskevia parannusehdotuksia.

Validoinnin tuloksista on julkaistu SPR Veripalvelussa talon sisäinen virallinen validointiraportti (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012), jonka on kirjoittanut opinnäytetyötä ohjannut asiantuntija. Opinnäytetyötä voidaan käyttää pohjatietona ja apuna menetelmään perehdyttämisessä, jos LeukoSure™-menetelmää tullaan lisävalidoimaan ja jos se joskus päädytään ottamaan käyttöön SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa.

### 8.4 Jatkotutkimuskohteita

LeukoSure™-menetelmää tulisi validoida lisää, että se voitaisiin ottaa käyttöön SPR Veripalvelun laadunvalvontalaboratoriossa jäännösvalkosolujen tutkimusmenetelmänä. Menetelmän mittausepävarmuutta tulisi tarkentaa suuremman näyteotoksen avulla ja toisen Navios™-virtaussytometrin tulostason oikeellisuus tulisi todentaa ulkoisen laadunvalvonnan avulla. (Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012: 2.) Menetelmän käyttöönoton harkinnassa tulisi lisäksi huomioida käytännön erot LeukoSure™- ja Leuco-



count™-menetelmien välillä, joita on arvioitu kappaleessa 8.2 *LeukoSure™-menetelmän käyttäjäkokemukset*.

## 8.5 Oma oppiminen

Opinnäytetyöprosessi on ollut tärkeä vaihe kypsyessäni opiskelijasta oman alani asiantuntijaksi ja tasavertaiseksi ammattilaiseksi. Opinnäytetyön avulla olen päässyt osoittamaan valmiuteni soveltaa koulutukseni antamia tietoja ja taitoja. Tärkeimpänä tavoitteena minulle ei ole ollut täydellinen loppuraportti vaan koko ajan tapahtuva oppimisprosessi. Opinnäytetyö on kehittänyt ja vahvistanut ammattitaitoja kokonaisvaltaisesti. Prosessi on opettanut minulle suunnitelmallisuutta, kokonaisuuksien hallintaa ja jäsentelyä, yhteistyö- ja neuvottelutaitoja, tieteellistä kirjallista raportointia sekä monia muita työelämässä tarvittavia taitoja. Kirjoittamisessa suurimmiksi haasteiksi koin tiedonhaun sekä tekstin kokoamisen sujuvaksi ja mielenkiintoiseksi kokonaisuudeksi luotettaviin, monipuolisiin ja ajantasaisiin lähteisiin perustuen. Pidän edelleen oikeana vaihtoehtona, että päätin toteuttaa opinnäytetyöni yksin enkä parin kanssa. Muun muassa ajan hallinta oli yksinkertaisempaa yksin, vaikka ajoittain työskentelyssä olisi ollut tarvetta toiselle mielipiteelle. Opponenttini ja muut läheiset olivat kuitenkin hyvin mukana tuke-  
massa ja antamassa neuvoja. Tärkeimmäksi motivaation lähteeksi koin opinnäytetyöni toteuttamisen merkityksellisyyden veripalvelutoiminnan kannalta.

Opinnäytetyöprosessi on ollut pitkä ja rasittava, mutta onneksi myös palkitseva niin ammatillisesti kuin ihmisenä kasvamisessakin. Tärkeimmäksi opetukseni opinnäytetyön aloittamisesta olen oppinut sen, että koulu ja ”pakollisten velvoitteiden” suorittaminen eivät ole tärkeimmät asia elämässä. Tasapainoiseen elämään kuuluvat myös nukkuminen, harrastaminen sekä tärkeimpänä läheiset ihmissuhteet, mutta myös omasta ammatista ja siitä tulevista oivalluksista ja oppimisesta nauttiminen.

Kuten jo totesin aikaisemmin, on opinnäytetyössä tärkeintä koko ajan tapahtuva oppimisprosessi. Erilaiset vastoinkäymiset ja ”omat mokat” ovat tärkeä osa oppimista, joten en kadu mitään opinnäytetyössäni tekemiäni valintoja. Ei ole siis syytä jäädä pohti-  
maan menneitä vaan ajatukset on suunnattava tuleviin haasteisiin valmiina bioanalytikkona.

## Lähteet

- Auvinen, Marja-Kaisa 2009. Verensiirto: käyttöaiheet, suoritus ja haitat. Verkkodokumentti. Päivitetty 15.9.2009.  
<[http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00392&p\\_haku=verensiirto](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00392&p_haku=verensiirto)>. Lääkärin käsikirja. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 17.9.2012.
- BD Leucocount™ -menetelmän pakkausseloste.
- Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausseloste.
- Beckman-Coulter Navios™ 2011. Beckman-Coulter. Verkkodokumentti.  
<<http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/flow-cytometry/flow-cytometers/navios/index.htm>>. Luettu 14.10.2012.
- Fimlab 2011. CD34-positiivisten kantasolujen määrityksen tulostaso nousee 21.3.2011. Laboratoriotiedote. Verkkodokumentti.  
<[http://www.laboratorio.fi/tiedotteet/index.tpl?sivu\\_id=30;id=654](http://www.laboratorio.fi/tiedotteet/index.tpl?sivu_id=30;id=654)> Julkaistu 18.3.2011. Luettu 16.10.2012
- HILMA 2012. Jälki-ilmoitus: Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri: Virtaussytometri 2011. Verkkodokumentti. Julkaistu 1.2.2012.  
<<http://www.hankintailmoitukset.fi/fi/notice/view/2012-036785/>>. Luettu 7.10.2012.
- Impola, Ulla 2012. Virtaussytometria. Power Point -esitys. SPR Veripalvelu.
- Juvonen, Eeva – Koistinen, Jukka 2007. Veritautipotilaan verensiirrot. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.) 2007: Veritaudit. Duodecim. 682–690.
- Juvonen, Eeva – Savolainen, Eeva-Riitta 2007. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.) 2007: Veritaudit. Duodecim. 198–216.
- Klein, Harvey – Anstee, Davis (toim.) 2005. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine 11<sup>th</sup> edition. Malden, Mass: Blackwell Publishing.
- Koskimies, Saija 1995. Valkosolujen immunologiset vaikutukset verensiirroissa. Teoksessa Leikola, Juhani – Myllylä, Gunnar (toim.) 1995: Verensiirrot. Helsinki: Duodecim. 174–182.
- Koski, Tomi 2010. Verensiirtoihin liittyvät laboratoriotutkimukset. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.) 2010: Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. Keuruu: Kandidaattikustannus Oy. 293–300.
- Lillevang, ST. – Kristensen, T. 1992. Transfusion-associated graft-vs-host disease. Ugeskr Laeger 154 (43). 2964–2968.
- Linko, Linnéa – Ahonen, Esa – Eirola, Raija – Ojala, Merja 2000. Laboratoriopalvelut hoitotyön tukena. Juva: WSOY.
- Matinlauri, Irma 2004. Verivalmisteiden immunologiset vaikutukset. Duodecim 120 (7). 867–875.

MOT Kielitoimiston sanakirja 8.4 Professional 2012. MOT sanakirjasto. Helsinki: Kotimaisten kielten tutkimuskeskus ja Kielikone.

Punainen Risti Veripalvelu 2010. Veripalvelun vuosi 2010.

Saari, Leena 2010. Kemiaallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus : Kemian ja toksikologian yksikkö. Evira. Verkkodokumentti. Julkaistu 13.10.2010.

>[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely\\_toiminta\\_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena\\_saari\\_13.10.10.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoiminta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf)> Luettu 16.10.2012

Savolainen, Eeva-Riitta – Pelliniemi, Tarja-Terttu – Koski, Tomi 2010. Hematologian analysaattorit. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.) 2010: Laboratoriolääketiede : Kliininen kemia ja hematologia. Keuruu: Kandidaattikustannus Oy. 79–92.

Sosiaali- ja terveysministeriön asetus veripalvelusta 258/2006. Annettu Helsingissä 21.3.2006.

SPR Veripalvelu 2012a. Euroopan yhteiset säädökset veriturvatoiminnasta. Verkkodokumentti. Päivitetty 25.7.2007. <<http://www.veripalvelu.fi/www/650>>. Luettu 19.10.2012.

SPR Veripalvelu 2012b. Veripalvelusanasto. Verkkodokumentti. Päivitetty 14.10.2010. <<http://www.veripalvelu.fi/www/veriturva>> Luettu 12.9.2012.

SPR Veripalvelu 2012c. Veriturvatoiminta ja verensiirron haittavaikutukset. Verkkodokumentti. Päivitetty 5.1.2010. <<http://www.veripalvelu.fi/www/veriturva>> Luettu 19.10.2012.

Stubbs, JR. 2011. Transfusion-related acute lung injury, an evolving syndrome: the road of discovery, with emphasis on the role of the Mayo Clinic. Transfusion Medicine Reviews 25 (1). 66–75.

Validointisuunnitelma STR-90-5815-4S 2012. Jäännösvalkosolujen määrittäminen valkosoluttomista verivalmisteista virtausytometrisesi LeukoSure™-kitillä. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Validointiraportti STR-90-5815-4R 2012. Jäännösvalkosolujen määrittäminen valkosoluttomista verivalmisteista virtausytometrisesi LeukoSure™-kitillä: menetelmän sisäänajo Navios virtausytometrille. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Valkeajärvi, Anne 2012a. Asiantuntija. SPR Veripalvelu, tuotantolaboratorio. Suulliset tiedonannot. 12.1–7.9.2012.

Valkeajärvi, Anne 2012b. Asiantuntija. SPR Veripalvelu, tuotantolaboratorio. Sähköpostikeskustelut. 12.1–24.10.2012.

Valkeajärvi, Anne 2009. Virtausytometria laadunvalvontatutkimuksissa. Power Point -esitys. SPR Veripalvelu.

Verensiirto-opas 2006. Suomen Kuntaliitto. Helsinki.

Veripalvelulaki 197/2005. Annettu Helsingissä 1.4.2005.

Veriturvaraportti 2010. SPR Veripalvelu.

Verivalmisteiden käytön opas 2009. SPR Veripalvelu.

Vilkkä, Hanna 2007. Tutki ja mittaa : Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.

Yleisohje, liite 2 LV-YO-007-L2 2012. Näytteiden säilyvyys. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje LP-YO-011 2008. Tutkimusmenetelmien validointi. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje LP-YO-012 2008. Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien validointi. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje, liite 3 LP-YO-012-L3 2008. Kvantitatiivisten menetelmien validointiparametrien määrittäminen. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje TLA-YO-001 2011. Toiminnankuvaus: tuotantolaboratorio. Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki.

Zimring, James 2009. Leucoreduction of Blood Products. Teoksessa: Hillyer, Christopher – Shaz, Beth – Zimring, James – Abshire, Thomas (toim.) 2009. Transfusion Medicine and Hemostasis : Clinical and Laboratory Aspects. Amsterdam; Boston: Elsevier Publications. 215–218.

## Näytteiden esikäsittely LeukoSure™-menetelmällä

1. Merkitse näyteputki jokaiselle näytteelle ja Leuko-Trol™ kontrollinäytteille.
2. Lisää 100 µl näytettä jokaiseen putkeen. Pyyhi pipetin kärjen ulkopinta varovasti koskettamatta kärjen suuaukkoa ennen näytteen pipetoimista.
3. Lisää 100 µl LeukoSure™ lysesireagenssia ensimmäiseen putkeen ja vorteksoi heti 5–10 sekuntia.
4. Lisää 500 µl LeukoSure™ leimareagenssia putkeen ja vorteksoi heti.
5. Inkuboi huoneenlämmössä (20 - 25°C) pimeässä 15 minuuttia.
6. Toista vaiheet 2–5 jokaiselle näytteelle ja kontrollille.
7. Lisää jokaiseen näyteputkeen 100 µl LeukoSure™ sisäisen vakion reagenssia juuri ennen näytteiden analysointia. Käytä samaa pipettiä kuin näytteiden pipetoinnissa. Pyyhi pipetin kärjen ulkopinta varovasti koskettamatta kärjen suuaukkoa ennen näytteen pipetoimista. Vorteksoi varovasti.
8. Näytteet tulee analysoida kahden tunnin kuluessa LeukoSure™ sisäisen vakion reagenssin lisäämisestä.

Huomautus: Optimaalisten tulosten saavuttamiseksi aja näytteiden välillä IsoFlow™ vaippanestettä sisältävä testiputki.

Ohje on suomennos Beckman-Coulter LeukoSure™ -menetelmän pakkausselosteen kappaleesta Procedure for lysing and staining.

**Näytteiden esikäsittely Leucocount™-menetelmällä**

1. Ota 200–400 µl hyvin sekoitettua tutkittavaa punasolu- tai trombosyyttivalmistetta puhtaaseen näyteputkeen 48 tunnin sisällä valmisteen käsittelystä valkosolujen poistamiseksi.

2. Poista BD Trucount™ -putket säilytyspakkauksestaan ja merkitse jokaiselle näytteelle oma putki. Sulje pakkaus uudelleen. Näytteet tulee valmistella tunnin kuluessa putkien poistamisesta säilytyspakkauksestaan.

Huom. Putkien käyttökunto tulee varmistaa ennen käyttöä. BD Trucount™ -putken helmipelletin tulee olla ehjä ja sen tulee sijaita putken pohjalla. Muussa tapauksessa putkea ei tule käyttää.

3. Lisää 100 µl hyvin sekoitettua näytettä (trombosyytti, punasolu, kontrolli) vastaavasti merkattuun BD Trucount™ -putkeen.

4. Lisää 400 µl BD Leucocount™ reagenssia jokaiseen putkeen.

5. Laita putkiin korkit ja vorteksoi varovasti. Vältä liikaa sekoittamista. Älä vorteksoi yli 15 sekuntia.

6. Inkuboi putkia 5 minuuttia pimeässä tilassa huoneen lämmössä.

Ohje on suomennos Becton-Dickinson Leucocount™ -menetelmän pakkausselosteen kappaleesta 7. Procedure – Staining Procedure.

**LeukoSure™-menetelmän asetukset Navios™-virtausytometreilla**

Asetukset validoinnin alkaessa rinnakkaisilla Navios™-virtausytometreilla LV-43016 ja LV-43017:

	LV-43016	LV-43017
FS	180 V, gain 5	177 V, gain 5
SS	390 V, gain 10	355 V, gain 10
FL1	275 V	295 V
FL2	398 V	408 V
FL3	320 V	317 V

Virtausytometrille LV-43016 tehdyt asetusmuutokset validoinnin aikana:

	LV-43016
FS	180 V, gain 5
SS	390 V, gain 10
FL1	275 V
FL2	428 V
FL3	350 V

FS = Forward Scatter eli suorasisironta

SS = Side Scatter eli sivuttaissironta

FL1–3 = fluoresenssin mittauskanavat 1–3

(Validointisuunnitelma Liite 1 STR-90-5815-4S-L1 2012.)

**LeukoSure™-menetelmän lineaarisuus ja mittausalue**

Lineaarisuus ja mittausalue punasolu- (PSVS) ja trombosyyttimatriiseissa (TRVS4) esitettynä Navios™-virtausytometrikohtaisesti (LV-43016 ja LV-43017).

Matriisi	Näyte	Mittausalue x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	LV-43016		LV-43017	
			Suoran yhtälö	R <sup>2</sup>	Suoran yhtälö	R <sup>2</sup>
PSVS	1	0,6-90	0,90 x – 0,2	0,999	0,87 x – 0,01	0,999
	2	0,2-28	1,13 x – 0,1	0,999	1,21 x -0,2	0,999
	3	0,7-110	1,13 x – 0,9	0,997	1,08 x - 0,7	0,996
TRVS	1	0,4-41	1,10 x – 0,1	0,999	0,95 x -0,3	0,997
	2	0,4-20	0,89 x + 0,5	0,991	0,92 x + 0,3	0,999
	3	0,4-42	1,05 x – 0,2	0,999	0,95 x - 0,2	0,998

R<sup>2</sup> = lineaarisuus

(Validointiraportti Liite 4 STR-90-5815-4R 2012.)



### Sarjan sisäinen toistettavuus LeukoSure™-menetelmässä

Yhdessä analyysisarjassa n=6. Tulokset on eriteltyä Navios™-analysointireittain LV-43016 ja LV-43017. Taulukossa on korostettuna kunkin kontrollin (matalan ja korkean tason punasolumatriisin kontrollit sekä matalan ja korkean tason trombosyyttimatriisin kontrollit) korkein toistettavuus ja näytteissä kunkin tulostason korkein toistettavuus.

Kontrolli	LV-43016		LV-43017	
	Tuloskeski-arvo x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	RSD %	Tuloskeski-arvo x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	RSD %
LV-Low-PLT	1,6	25,2	1,9	27,0
	2,3	10,8	1,7	21,8
	1,1	<b>31,4</b>	1,2	16,6
LV-Low-RBC	2,1	10,2	2,1	27,8
	1,9	28,2	2,1	24,9
	2,0	<b>28,3</b>	2,3	25,4
LV-High-PLT	*	*	19,9	6,8
	19,6	5,7	20,0	5,0
	19,5	<b>9,7</b>	20,4	5,9
LV-High-RBC	*	*	21,9	7,2
	20,7	7,2	19,4	<b>7,9</b>
	21,6	7,5	20,8	6,6
Näytematriisi				
PSVS	0,1	<b>118</b>	0,3	46,5
	0,5	59,9	0,7	36,2
	0,3	56,5	0,3	45,4
TRVS4	0,3	47,1	0,5	35,0
	43,2	<b>5,0</b>	42,6	3,8

	2,7	<b>18,9</b>	2,1	14,5
TRFVS	0,1	64,5	0,1	100,2
	0,4	19,6	0,4	50,0

\*) ei tulosta, koska laitteen asetuksia muutettiin määrittelyn jälkeen

PLT = trombosyyttimatriisi

RBC = punasolumatriisi

PSVS = punasolut valkosoluton

TRVS4 = trombosyytit valkosoluton

TRFVS = hemaferesillä kerätyt trombosyytit valkosoluton

(Validointiraportti Liite 2 STR-90-5815-4R-L2 2012.)

### Sarjojen välinen toistettavuus LeukoSure™-menetelmässä

Alla olevassa taulukossa on esitetty sarjojen välinen toistettavuus Navios™-analysointilaitteilla LV-43016 ja LV-43017:

Kontrollinäyte	n	LV-43016		LV-43017	
		Tuloskeskiarvo x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	RSD %	Tuloskeskiarvo x10 <sup>6</sup> /l	RSD %
trombosyytti, matala	8-11	2,2	24,0	1,9	34,5
punasolu, matala	8-11	2,0	14,3	2,0	25,2
trombosyytti, korkea	3-7	18,9	10,1	19,0	7,1
punasolu, korkea	2-5	21,3	6,9	21,4	6,8

Alla olevassa taulukossa on esitetty sarjojen välinen toistettavuus molemmat Navios™-analysointilaitteet yhdessä:

Kontrollinäyte	Tuloskeskiarvo x10 <sup>6</sup> valkosolua/l	RSD %	n
trombosyytti, matala	2,0	30,0	19
punasolu, matala	2,0	20,8	19
trombosyytti, korkea	19,0	7,1	10
punasolu, korkea	21,4	6,4	7

(Validointiraportti Liite 3 STR-90-5815-4R-L3 2012.)

## LeukoSure™-menetelmän siirtymävirhe

Navios™ LV-43016

Navios™ LV-43017

		Tulos solua/μl
1	M <sub>1</sub>	0,1
2	M <sub>2</sub>	0
3	M <sub>3</sub>	0,1
4	K <sub>1</sub>	2,31
5	K <sub>2</sub>	2,52
6	M <sub>4</sub>	0,2
7	K <sub>3</sub>	1,81
8	K <sub>4</sub>	1,91
9	M <sub>5</sub>	0,3
10	M <sub>6</sub>	0,2
11	M <sub>7</sub>	0,1
12	M <sub>8</sub>	0
13	K <sub>5</sub>	0,8
14	K <sub>6</sub>	0,8
15	M <sub>9</sub>	0
16	K <sub>7</sub>	0,8
17	K <sub>8</sub>	1,11
18	M <sub>10</sub>	0
19	K <sub>9</sub>	1,11
20	K <sub>10</sub>	0,8
21	M <sub>11</sub>	0

X(korkea) 0,1  
 X(matala) 0,08  
 Erotus 0,02

		Tulos solua/μl
1	M <sub>1</sub>	0
2	M <sub>2</sub>	0,10
3	M <sub>3</sub>	0,10
4	K <sub>1</sub>	24,14
5	K <sub>2</sub>	20,62
6	M <sub>4</sub>	0,10
7	K <sub>3</sub>	22,23
8	K <sub>4</sub>	21,93
9	M <sub>5</sub>	0,30
10	M <sub>6</sub>	0
11	M <sub>7</sub>	0
12	M <sub>8</sub>	0,10
13	K <sub>5</sub>	21,43
14	K <sub>6</sub>	22,64
15	M <sub>9</sub>	0,10
16	K <sub>7</sub>	20,32
17	K <sub>8</sub>	21,33
18	M <sub>10</sub>	0,10
19	K <sub>9</sub>	21,43
20	K <sub>10</sub>	21,43
21	M <sub>11</sub>	0

X(korkea) 0,12  
 X(matala) 0,06  
 Erotus 0,06