

Satu Korhonen ja Heini Väänänen

Ammonium-ionipitoisuuden säilyminen
laboratorioprosessissa ja laitevertailu
PocketChem™ Ba 4430 –
(NH₄⁺)vieritestilaitteella ja Cobas Integra 400
plus –analyssaattorilla spiroergometria
laktaattinäyttein –tutkimuksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

25.10.2012

<p>Tekijät Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Satu Korhonen ja Heini Väänänen Ammonium-ionipitoisuuden säilyminen laboratorioprosessissa ja laitevertailu PocketChem™BA 4430 –(NH₄⁺)vieritestilaitteella ja Cobas Integra 400 plus – analysaattorilla spiroergometria laktaattinäyttein – tutkimuksessa</p> <p>49 sivua + 5 liitettä 25.10.2012</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Bioanalytiikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Suuntautumisvaihtoehto</p>	
<p>Ohjaajat</p>	<p>Lehtori Hilikka Tukkiniemi Sairaanhoitaja Helena Honkala Yliääkäri Päivi Piirilä Sairaalakemisti Annukka Mäki</p>
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Meilahden kliinisen fysiologian laboratorion toivomuksesta. Työssä tehtiin PocketChem™Ba 4430 –ammonium-ionivieritestilaitteen ja Cobas Integra 400 plus -analysaattorin välinen laitevertailu, jolla selvitettiin antaako vieritestilaitte Meilahden laboratoriossa ammonium-ionimääritykseen käytettävän Cobas Intergran kanssa yhteneviä tuloksia. Työssä selvitettiin myös vaikuttaako laboratorioprosessi spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimuksen aikana otettujen verinäytteiden ammonium-ionipitoisuuksiin. Laboratorioprosessilla tässä työssä tarkoitetaan näytteenoton jälkeisiä ammonium-ioninäytteiden säilytysolosuhteita ja käsittelytoimenpiteitä. Suositusten mukaan ammonium-ioninäytteet tulisi laboratorioprosessin aikana sentrifugoida mahdollisimman nopeasti ja analysoida 60 minuutin kuluessa näytteenotosta. Työssä tutkittiin tapahtuuko prosessissa jotain, mikä vaikuttaisi kliinisesti merkitsevästi ammonium-ionituloksiin. PocketChem™Ba -vieritestilaitteella tutkittiin lisäksi ammonium-ionipitoisuuden säilymistä kokoveressä.</p> <p>Näytteet kerättiin spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen aikana Neurologian klinikan tutkimukseen vapaaehtoisesti osallistuvilta verrokkipotilailta. Tutkimusaineistona oli 36 näyteparia, joista toinen näyte tutkittiin kokoverenä vieritestilaitteella ja toinen plasmanäytteenä analysaattorilla. Laboratorioprosessin kulun seuranta varten työssä tutkittiin näytteiden käsittelyaikoja näytteenoton jälkeen. Vieritestilaitteen luotettavuuden varmistamiseksi laitteella tutkittiin sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistettavuutta. Tulokset käsiteltiin SPSS- ja Excel-ohjelmilla.</p> <p>Tulosten mukaan vieritestilaitteen ja analysaattorin tuloksilla on huomattava tasoero. Vieritestilaitte ei ole sarjan sisäiseltä ja sarjojen väliseltä toistettavuudeltaan luotettava. Kokoveren säilyvyystutkimuksen tuloksia ei voitu pitää luotettavina virhelähteiden takia. Laboratorioprosessia tarkasteltaessa selvisi, että suurin osa näytteistä käsiteltiin suositusajoissa.</p>	

Avainsanat	spiroergometria laktaattinäyttein, ammonium-ioni, säilyvyys, laitevertailu, aikaseuranta, laboratorioprosessi, vieritestilaite
------------	--

Authors Title	Satu Korhonen ja Heini Väänänen Effect of the Laboratory Process on Ammonium-ion Concentration and the Comparison of PocketChem™BA 4430 meter and Cobas Integra 400 plus Analyzer in Lactate Exercise Test
Number of Pages Date	49 pages + 5 appendices 25 October 2012
Degree	Name of the degree Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Senior Lecturer Hilikka Tukkiniemi Bachelor of Health Care Helena Honkala Senior Physician Päivi Piirilä Chemist Annukka Mäki
<p>This study was made for the Laboratory of Clinical Physiology, Meilahti Hospital, Helsinki, Finland. In this study we compared the PocketChem™Ba 4430 palm-sized ammonia meter and the Cobas Integra 400 Plus analyzer to find out if the devices gave similar ammonium-ion results. We also investigated if the laboratory process of blood samples affected the ammonium-ion results of the clinical spiroergometric lactate exercise test. The laboratory process includes quick transportation of the samples to the sorting area, to centrifugation and to the Cobas Integra 400 Plus analyzer. According to the instructions, the analysis of the ammonium-ion samples should take place within 60 minutes. With the PocketChem™Ba we also studied the maintaining of the ammonium-ion concentration in the whole blood samples.</p> <p>In this study, we had 36 pairs of samples. We investigated the handling of some of the samples during the laboratory process in detail. We examined the repeatability of the interior and interjacent result series with the PocketChem™Ba 4430 palm-sized ammonia meter to clarify the reliability of the device. The results of this study were processed with SPSS and Excel statistical programs and using the Dahlberg formula.</p> <p>The results showed that the PocketChem™Ba palm-sized ammonia meter did not give reliable results compared to the Cobas Integra analyzer. The repeatability of the interior and interjacent result series of the PocketChem™Ba 4430 meter were not up to standard. According to the results most of the samples were analyzed in their time frame but there were some delays in the laboratory process during the spiroergometric laboratory test, but those delays did not affect the ammonium-ion results significantly.</p>	
Keywords	ammonium-ion, clinical exercise testing, spiroergometry, lactate, analyzer comparison, laboratory process, quick test

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tietoperusta	2
2.1	Spiroergometria laktaattinäyttein	2
2.1.1	Tutkimuksen suorittaminen ja vasta-aiheet	4
2.2	Ammonium-ioni	5
2.2.1	Ammonium-ioni elimistössä	6
2.2.2	Ammonium-ioniin liittyvät häiriöt ja sairaudet	7
2.2.3	Ammonium-ioninäytteen käsittely ja viitearvot	8
2.2.4	Ammonium-ionin säilyvyys ja laatu	9
2.3	Vieritestaus	10
2.4	Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus	11
3	Ammonium-ionimäärityksen menetelmät ja laitteet	12
3.1	Cobas Integra 400 plus –analysaattori	12
3.2	PocketChem™Ba 4430 –vieritestilaite	13
4	Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset	15
5	Tutkimuksen toteutus	16
5.1	Aineiston keräys	17
5.2	Työn suorittaminen	17
5.2.1	Laitevertailu	19
5.2.2	Laboratorioprosessin seuranta	20
5.2.3	Säilyvyystutkimus	21
5.2.4	Tulosten käsittely	22
6	Tutkimustulokset	23
6.1	Laitevertailu	23
6.1.1	Vieritestilaitteen vakiointi	27
6.1.2	Plasmakontrollien mittaus vieritestilaitteella	27
6.2	Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus	28
6.3	Laboratorioprosessin vaikutus ammonium-ionipitoisuuksiin	29
6.4	Kokoveren säilyvyystutkimus	34
7	Johtopäätökset ja tulosten luotettavuus	36

7.1	Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus	37
7.2	Laitevertailu	38
7.2.1	Plasmakontrollit ja referenssi	40
7.3	Laboratorioprosessin vaikutus ammonium-ionipitoisuuksiin	40
7.3.1	Prosessiajat kaikista näytteistä	40
7.3.2	Laboratorioprosessin seuranta vaihe vaiheelta	42
7.4	Kokoveren säilyvyystutkimus	43
8	Pohdinta	45
	Lähteet	49
	Liitteet	
	Liite 1. Tulosten seurantataulukot	
	Liite 2. Ammonium-ioninäytteiden pitoisuusmuutokset seisotusten aikana	
	Liite 3. Sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset	
	Liite 4. Laitevertailun tulokset	
	Liite 5. Laitevertailun tulosten erotukset ($\mu\text{mol/l}$) ja erotusprosentit	

1 Johdanto

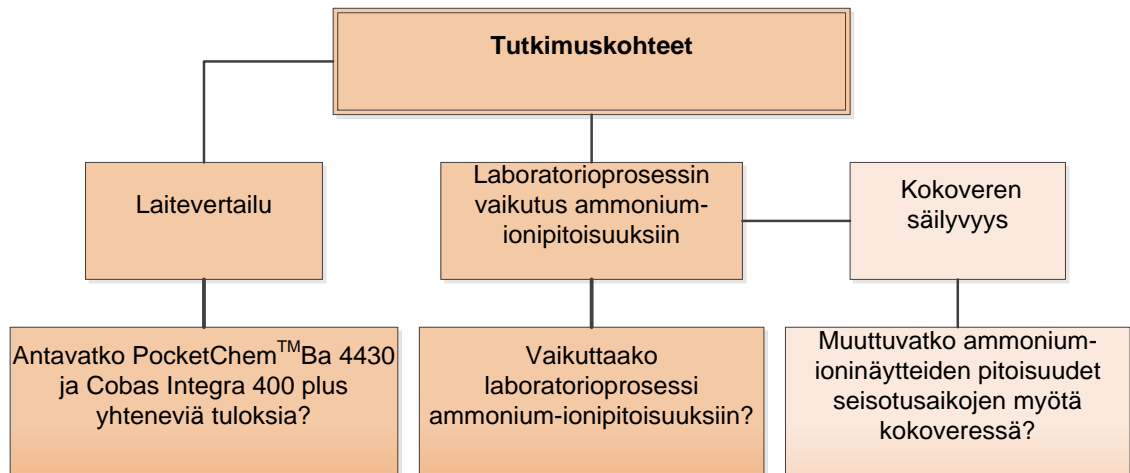
Meilahden kliinisen fysiologian laboratoriossa tehdään kliinisiä spiroergometriä rasiuskokeita, joiden aikana potilaista voidaan ottaa laskimoverinäytteitä laktaatti-, ammonium-ioni- ja verikaasupitoisuuksien määrittämiseksi varten. Määrittämiseksi tehdään, jos potilaalla epäillään lihassetabolian häiriöitä. Näytteitä otetaan rasituksen aikana yhteensä yhdeksän kertaa ja niitä viedään useammassa erässä analysoitavaksi kliinisen kemian analysaattoriin. Ammonium-ionipitoisuus ei kuitenkaan säily hyvin verinäytteessä, mikä vaikeuttaa määrittämistä ja voi mahdollisesti heikentää tulosten luotettavuutta. (Honkala – Mäki – Piirilä – Tukkiniemi 2012.)

Työssä tehtiin PocketChemTMBa 4430 $-(\text{NH}_4^+)$ -vieritestilaitteen ja Cobas Integra 400 plus –analysaattorin välinen laitevertailu, jolla selvitettiin antaako vieritestilaitte Cobas Intergran kanssa yhteneviä ammonium-ionituloksia. Vieritestilaitteiden käytössä tulisi ottaa huomioon, että testien tarkkuus ja toistettavuus eivät yleensä ole yhtä hyviä kuin laboratorioden analysaattoreilla (Ihalainen ym. 2002: 162). Tämän takia opinnäytetyössä tutkittiin PocketChemTMBa 4430 –vieritestilaitteen sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistettavuutta.

Suosituksen mukaan ammonium-ioninäytteet tulisi laboratoriossa aikana kylmäseentrifugoida mahdollisimman nopeasti ja analysoida 60 minuutin kuluessa näytteenotosta (Uotila 2009). Opinnäytetyössä tutkittiin toteutuuko laboratoriossa suosituksen mukaisesti ja vaikuttaako laboratoriossa mahdollisesti kliinisesti merkitsevästi spiroergometria laktaatinäyttein –tutkimuksen aikana otettujen verinäytteiden ammonium-ionipitoisuuksiin (Honkala ym. 2012). Laboratoriossilla tässä työssä tarkoitetaan näytteenoton jälkeisiä ammonium-ioninäytteiden säilytysolosuhteita ja käsittelytoimenpiteitä, eli kuljetusta jäissä Meilahden sairaalan automaatiolaboratorion lajitteluun, sentrifugointia ja kuljetusta analysaattoriin.

PocketChemTMBa 4430 –vieritestilaitteella mitattiin kokoverinäytteistä ammonium-ionipitoisuus välittömästi näytteenoton jälkeen. Rasiuskokeen aikana otetut ja normaalin laboratoriossa läpikäyneet plasmanäytteet analysoitiin Cobas Integra 400 plus –analysaattorilla. PocketChemTMBa 4430 -vieritestilaitteella tutkittiin lisäksi ammonium-ionipitoisuuden säilymistä kokoverinäytteessä, jotta voitiin selvittää kuinka hyvin ammonium-ionipitoisuus säilyy kokoveressä ennen sentrifugointia. Opinnäytetyö

pyrittiin toteuttamaan Meilahden klinisen fysiologian laboratorion toiveiden mukaan ja sen tarpeisiin vastaten. Ohessa jaottelu opinnäytetyön eri tutkimuskohteista (kuvio 1).



Kuvio 1. Tutkimuskohteet

2 Tietoperusta

2.1 Spiroergometria laktaatinäyttein

Kun havainnoidaan ja mitataan elimistön eri toimintoja rasiustilanteessa, saadaan lisätietoa niin yksittäisistä elintoiminnoista, kuin myös näiden toimintojen sujuvasta yhteistoiminnasta tai sen puutteesta potilaalla. Spiroergometria tarkoittaa kliinistä rasiustakoetta, jossa potilasta rasiutetaan esimerkiksi kuntopyörällä hengityskaasuseurannassa. (Tikkanen 1997: 38.) Verikokeiden ottaminen kliinisen rasiustakokeen aikana auttaa diagnostiikassa sekä lihassetabolian toiminnan tarkastelussa (Honkala 2011: 6). Verikokeiden avulla voidaan seurata laskimoveren laktaatti-, ammoniakki- ja happisaturaatioarvoja (Haapalahti 2012: 6).

On sairauksia, joissa tapahtuu muun muassa laktaatin tai ammonium-ionin pitoisuuksien vaihtelua. Esimerkiksi McArdlen taudissa laktaattipitoisuuden nousu rasiutuksessa jää vaimeaksi tai puuttuu kokonaan, mitä voidaan selvittää ottamalla laktaatinäytteitä rasiuksen aikana. (Tarnopolsky ym. 2002: 359.) Myofosforylaasientsyymin puute johtaa McArdlen taudissa lihaksissa anaerobisen glykolyysin häiriöön. Tällaisissa lihasten aineenvaihdunnan häiriöissä eli metabolisissa

myopatioissa tyypillisiä oireita ovat rasitukseen liittyvät lihaskivut ja -kouristukset sekä lihasten herkkä väsyminen. Tällöin lihaksen aineenvaihdunnan häiriö altistaa potilaan lihaskudoksen vaurioitumiselle rasituksen tai infektion yhteydessä. (Löfberg ym. 2010: 1676.) Normaalisti laktaattitaso tulisi nousta rasituksessa 3-5 kertaiseksi lähtötasoon verrattuna. Taudeista riippuen laktaattipitoisuus saattaa nousta kuitenkin huomasti korkeammaksi, tai pitoisuus jää matalammaksi, tai se ei nouse ollenkaan. (Haapalahti 2012: 6.)

Spiroergometria laktaatinäyttein -tutkimuksessa ammonium-ioniarvon tulisi nousta rasituksen aikana noin 50–55 $\mu\text{mol/l}$ lähtötasoon nähden. Ammonium-ionin viitearvot ja keskiarvot rasituksessa on esitelty taulukossa 1. Lihassetabolian häiriöissä ammonium-ioniarvo voi jäädä liian matalaksi, tai se voi olla hyvinkin korkea (>200 $\mu\text{mol/l}$). Ammonium-ionipitoisuus, sekä muidenkin rasituskokeessa otettujen näytteiden pitoisuudet tulisi suhteuttaa rasitusasteeseen. (Haapalahti 2012: 6.)

Taulukko 1. Ammonium-ioninäytteen viitearvot ja keskiarvot (mukailten Haapalahti 2012: 7).

Ammoniikki ($\mu\text{mol/l}$)		
	Viitearvo	Keskiarvo \pm 2SD
Lepo	23,00	12.0 – 33
Kevyt rasitus	22,33	12.0 – 32
Maksimirasitus	70	38 – 110
2 min. rasituksen jälkeen	104,44	69 – 140
4 min. rasituksen jälkeen	96,63	31 – 128
6 min. rasituksen jälkeen	96,75	45 – 126
10 min. rasituksen jälkeen	66,5	50 – 84
20 min. rasituksen jälkeen	42,57	29 – 57
30 min. rasituksen jälkeen	26,33	3.6 - 49.7

Spiroergometria tutkimuksen avulla voidaan saada laaja kuva potilaan elintoiminnoista rasituksen aikana. Tutkimuksen aikana saadaan tietoa keuhkojen ja hengityksen toiminnasta, verenkiertoelimistön toiminnasta rasituksen aikana, sekä lihasten toiminnasta ja siihen vaikuttavista tekijöistä. (Tikkanen 1997: 38.) Tutkimuksen avulla saadaan tietoa yksilön anaerobisen metabolian ilmaantumisherkkyydestä ja kaasujenvaihduntakapasiteetista (Sovijärvi 2003: 245). Spiroergometria tutkimusta käytetään kardiorespiratoristen sairauksien diagnostiikassa, sekä riskien, hoitovasteen ja työkyvyn arvioinnissa (Haapalahti 2012: 1).

Hengityskaasuseurannalla ja hapenkulutusmittauksella tutkitaan potilaan kokonaissuorituskykyä. Spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimuksessa kaasuanalyysi auttaa arvioimaan onko raskaus viety riittävän pitkälle, eli onko tutkimus diagnostisessa mielessä onnistunut. Spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimus ei ole kovin yleinen tutkimus. (Honkala ym. 2012.)

2.1.1 Tutkimuksen suorittaminen ja vasta-aiheet

Ennen tutkimusta tiettyjen lääkkeiden kohdalla suositellaan lääketaukoa. Kyseisiä lääkkeitä ovat esimerkiksi Digitalis, beetasalpaajat ja kalsiumestäjät. Mahdollisesta lääketauosta päättää lähettävä lääkäri. Asiakkaan tulisi olla myös neljä tuntia tupakoimatta, kaksi tuntia ilman kahvia, teetä, kolajuomia ja muita piristäviä aineita. Myös raskasta ateriaa tulisi välttää, mutta täysin ravinnotta ei tulisi olla. Alkoholia ei saisi nauttia puoleentoista vuorokautteen. (Honkala 2011: 1.)

Yleisin käytetty kliininen raskausmuoto Suomessa on polkupyöräraskaus, mutta erityistilanteissa voidaan myös käyttää käsikampirasitusta tai kävelymattoa (Haapalahti 2012: 1). Raskauskokeessa potilasta kuormitetaan asteittain ja samalla seurataan sydämen ja verenkierron toimintaa, sekä havainnoidaan potilaan sen hetkistä tilaa ja mahdollisia oireita. Kokeen yhteydessä tehdään myös usein keuhkojen toimintakokeita, kuunnellaan keuhkoja ja sydäntä. Potilaalta mitataan tutkimuksen aikana hengityksen ventilaation suuruus ja uloshengitysilman hapen ja hiilidioksidin pitoisuudet. Lääkäri valvoo koetta ja hoitohenkilökunta avustaa oheismittausten suorittamisessa. (Tikkanen 1997: 38.)

Raskautta kasvatetaan portaittain niin kauan, kunnes subjektiivinen raskautaso on vähintään 90 % maksimista. Poikkeuksena ovat tilanteet, joissa ilmenee suoritusta rajoittavia oireita, tai havaitaan mittauslöydös, joka edellyttää raskautuksen keskeyttämistä. (Haapalahti 2012: 1-5.) Spiroergometria laktaattinäyttein – tutkimuksessa verinäytteet otetaan ennen raskautusta, kevyessä raskautuksessa, maksimiraskautuksessa, sekä raskautuksen loputtua palautumisvaiheessa kahden, neljän, kuuden, kymmenen, kahdenkymmenen ja kolmenkymmenen minuutin välein. Näytteitä otetaan siis kaiken kaikkiaan yhdeksän kertaa. (Haapalahti 2012: 6.)

Sydänfilmiä eli EKG:tä rekisteröidään koko tutkimuksen ajan mahdollisten rytmii- tai johtumishäiriöiden ja sydänlihaskemian huomaamiseksi. EKG:stä mitataan

automaattisesti myös syketaajuus. Verenpaine mitataan lepovaiheessa sekä makuulla että istuen, rasituksen aikana jokaisella portaalla, ja palautumisvaiheessa, sekä vielä rasituksen jälkeen. Valtimoveren happikyllästeisyyttä tarkkaillaan pulssioksimetrillä. Syketaajuuden tulee täsmätä EKG:llä mitattuun. Asiakkaalta kysytään myös subjektiivisia tuntemuksia. (Haapalahti 2012: 1-5.)

Asiakkaan kasvoille laitetaan ennen tutkimuksen aloittamista naamari, jonka kautta mitataan uloshengitysilman virtausta, ja samalla analysoidaan happi- ja hiilidioksidipitoisuutta. Minuuttiventilaatiota sekä hengitystaajuutta ja -tilavuutta mitataan virtausanturilla varustetulla laitteella eli pneumotakografilla. Asiakkaalta mitataan uloshengityksen sekuntikapasiteettia eli FEV₁ -arvoa. Mittaukset tapahtuvat lähtötilanteessa ja rasituksen jälkeen, ja tarvittaessa otetaan vielä ylimääräisiä puhalluksia. (Haapalahti 2012: 1-5.) Tutkimuksen vasta-aiheita ja suhteellisia vasta-aiheita on esitelty taulukossa 2. Ratkaisut suhteellisten vasta-aiheiden osalta tehdään potilaan kokonaistilanteen ja lähetteen kysymyksenasettelun pohjalta (Honkala 2011: 1).

Taulukko 2. Vasta-aiheet ja suhteelliset vasta-aiheet spiroergometriatutkimuksen tekemiseen (mukaillen Honkala 2011: 1).

Vasta-aiheet	Suhteelliset vasta-aiheet
Akuutti infektiosairaus	Nopea eteisvärinä tai -lepatus
Akuutti sydäninfarkti tai sen epäily	Tuoreeksi epäilty vasen haarakatkos
Epästabiili angina pectoris	Hallitsematon hypertensio
Dekompensoitu sydämen vajaatoiminta	Aorttastenoosi
Hoitamaton vaarallinen rytmihäiriö	Vaikea respiratorinen sairaus
II° - III° eteiskammiokatkos	
Akuutti myo- tai perikardiitti	
Metabolinen sairaus tasapainottomassa vaiheessa	
Akuutti keuhkoveritulppa	
Muu akuutti vaikea sairaus	

2.2 Ammonium-ioni

Tutkimuksessamme määrittämiä tehdään ammonium-ionille (NH₄⁺), ei ammoniakille (NH₃), vaikkakin kirjallisuudessa nimitystä ”ammoniikki” saatetaan käyttää näistä molemmista muodoista. Plasman pH on 7.40 ja siinä suurin osa ammoniakista on ionisoituneessa muodossa (99 %) ja loput liuenneena ammoniakkikaasuna (NH₃) (Uotila 2010a: 108). Plasmassa on normaalisti vain hyvin vähän ammoniakkia. (Niemelä – Parkkila 2010: 176).

2.2.1 Ammonium-ioni elimistössä

Kaikkialla elimistössä syntyy jatkuvasti proteiinien kataboliatuotteena aminohappoja, joiden aineenvaihdunnan primaarisena hajoamistuotteena muodostuu ammoniumioneja (Uotila 2010a: 108). Ruoan proteiinien hajotessa ja imeytyessä muodostuu runsaasti ammoniakkia (Uotila 2010a: 108). Suolistossa bakteerit hajottavat sekä aminohappoja että amiineja, jonka seurauksena vapautuu ammoniakkia (Niemelä – Parkkila 2010: 176). Bakteerientsyymit vapauttavat ammoniakkia myös suolen seinämän läpi tihkuvasta ureasta (Hiltunen ym. 2009: 399).

Vapautunut ammoniakki imeytyy porttilaskimoon. Terveen henkilön porttilaskimossa ammonium-ionin pitoisuus onkin 5-10 kertaa korkeampi kuin yleisessä verenkierrossa. (Uotila 2010a: 108.) Terve maksa kykenee huolehtimaan saapuvasta ammoniakista ja käyttämään sen joko urean tai amiinien synteesiin (Niemelä – Parkkila 2010: 176).

Maksassa ammoniakki liittyy ureakiertoon. Maksan ureakerrossa tapahtuu sarja mitokondriaalisia ja sytoplasmaattisia reaktioita, joissa ammoniakki sitoutuu tehokkaasti ureaan. (Uotila 2010a: 108.) Maksasolut muodostavat ammoniakista virtsaan erittyvää ureaa, eli virtsa-ainetta, koska ammoniakki on myrkyllistä ihmiselimistölle (Bjälle – Haug – Sand – Sjaastad – Toverud 2008: 358).

Elimistöstä happoa poistetaan normaalisti ammonium-ioniin sidottuna 30–60 mmol vuorokaudessa. Valtaosa virtsassa olevista protoneista sidotaan ammoniakkiin, jota syntyy tubulussoluissa glutaminaasin katalysoimassa glutamiinin deaminaatioreaktiossa. Ammoniakki diffundointuu helposti tubulusten luumeniin, jossa se reagoi vety-ionien kanssa. Ammonium-ioni eritetään virtsaan, koska se ei varauksensa vuoksi pääse takaisin tubulussoluun. (Uotila 2010b: 112.)

Ammoniakin tuotantoa tapahtuu lihasrasituksen yhteydessä ja tuotannon määrä riippuu lihastyön määrästä. Ammoniakin tuotannon merkitys lihastyöskentelyn yhteydessä on kuitenkin epäselvä. On mahdollista että ammoniakki neutralisoi maitohappoa, jota kertyy pitkittyneessä lihasrasituksessa. Lihaksisto voi säilyttää ammonium-ioneja pitkiäkin aikoja. (Lowenstein 1972: 382–383, 402.)

2.2.2 Ammonium-ioniin liittyvät häiriöt ja sairaudet

Kliinisen hengityskaasuseurannassa tapahtuvan rasiuskokeen (laktaattinäyttein) yhteydessä ammonium-ionimäärityksellä tutkitaan lähinnä lihassairauksia, jotka liittyvät esimerkiksi puriiniaineenvaihdunnan häiriöihin (Honkala ym. 2012). Puriinit ovat kaksirenkaisia orgaanisia emäsrakenteita (Kivelä ym. 2002: 551). Puriineja saadaan ruoasta ja niitä syntyy myös jatkuvasti solujen tuhoutuessa elimistössä. Elimistö muodostaa puriineista nukleiinihappoja, jotka ovat DNA:n ja RNA:n rakenneosia. (Julkunen – Konttinen 2010: 1477–78.) Puriininukleotidisyklissä aminohapoista vapautuu ammoniakkia, jota muodostuu maksimissaan yksi mooli yhtä moolia puriininukleotideja kohden (Lowenstein 1972: 388).

Korkeita ammonium-ionipitoisuuksia voivat aiheuttaa maksataudit, suolistoverenvuodot, ureasyklin entsyymipuutokset, aminohappoaineenvaihdunnan entsyymipuutokset ja valproaattihoito, joka estää ureasykliä (Uotila 2009). Ammonium-ionipitoisuudet voivat olla myös korkeita, jos porttilaskimon paine on lisääntynyt. Tällöin verenkierto suolistosta voi ohjautua maksan ohittavia kollateraalisuonia pitkin. Korkeita pitoisuuksia esiintyy lisäksi Reyen syndroomassa ja orgaanisten happojen geneettisissä entsyymipuutostiloissa. Munuaisten vajaatoiminnassa ureapitoisuus nousee vähentyneen erityksen johdosta, jolloin ammoniakin pitoisuus nousee, myös asidoosi vähentää ureakierron toimintaa. (Uotila 2010a: 108.) Ammoniumionin lievempiä nousuja voivat aiheuttaa infektiot, häiriöt elektrolyytti- ja happoemästasapainossa, proteiinipitoiset dieetit ja fyysinen rasitus (Uotila 2009). Vastasyntyneillä esiintyvä transientti hyperammonemia on tila, jossa tuntemattomasta syystä johtuen veren ammoniakkipitoisuus on korkea (Uotila 2010a: 109).

Ureasyklin häiriöissä ylimääräisestä hukkatyypistä ei päästä eroon, ja se alkaa kertyä elimistöön ammonium-ionin muodossa. Ureasyklin jokaisesta eri vaiheesta huolehtii aina erityinen entsyymi, jonka puutos katkaisee ketjun toiminnan. Kunkin entsyymin oikeasta rakentumisesta huolehtii perimän yksi geeni, ja mikäli molemmat vastingeenit ovat vaurioituneet toimimattomiksi, menetetään myös niiden ”koodaama” entsyymi. Häiriön takia elimistöön kertyvä ammonium-ioni voi aiheuttaa myrkytystilan, kriisin ja pahimmillaan kuoleman, sillä ammoniakkimyrkytys haittaa monia solutoimintoja, ja erityisen vaarallinen se on hermosoluille. (Palolampi – Salokorpi 2004: 1-3.) Ammonium-ionin neurotoksisia vaikutuksia ei ole vielä pystytty täysin selittämään,

mutta vaikuttaisi siltä, että ammonium-ioni häiritsee glutamaatin aineenvaihduntaa. Glutamaatti on glutamiinin esiaste aivoissa. (Koolman – Roehm 2005: 182.)

Korkea ammonium-ionipitoisuus häiritsee aivojen aineenvaihduntaa, sekä voi aiheuttaa maksakooman (Uotila 2009). Maksakooma on vaikea myrkytystila, jota voi esiintyä esimerkiksi monissa kirrotisoivissa maksasairauksissa, joissa ammoniakkin ja eräiden muiden myrkyllisten yhdisteiden pitoisuudet nousevat korkeiksi. Seurattaessa saman potilaan peräkkäisiä ammoniakkinäytteitä, saadaan kuva taudin suunnasta ja hoidon onnistumisesta, vaikka ammoniakkipitoisuus ei korreloikaan kovin hyvin kooman vakavuuteen. (Niemelä – Parkkila 2010: 176.)

2.2.3 Ammonium-ioninäytteen käsittely ja viitearvot

Plasmamenetelmällä määritettävä ammoniakkinäyte otetaan paasto- ja kylmänäytteenottona EDTA-putkeen. Paasto ei toteudu spiroergometriatutkimuksessa, sillä asiakkaiden tulisi syödä kevyesti, jotta he jaksaisivat pyöräillä. Näytteen analysoinnissa käytetään plasmaa, jossa on EDTA-antikoagulanttia. Seerumia ei tulisi käyttää, koska ammoniakkia saattaa muodostua vielä hyytymisen aikana. (COBAS INTEGRA 400/800 2011: 1.) Kapillaarinäytteistä saadaan jonkin verran korkeampia tuloksia, joten laskimo- tai valtimonäytteet ovat suositeltavampia näytemuotoja (Uotila 2006: 110–111).

Näyte tulisi ottaa ilman staasia ja putken tulisi täyttyä kokonaan, eikä putken korkkia saisi avalla. Heti näytteenoton jälkeen näyteputki tulisi laittaa jäihin ja viedä kylmäseentrifugoitavaksi. Sentrifugoinnin tulisi tapahtua viimeistään 15 minuutin sisällä näytteenotosta 2000 g:n voimalla. Analysoinnin tulisi tapahtua 20–30 minuutin kuluttua näytteenotosta. (COBAS INTEGRA 400/800 2011: 1; Uotila 2006: 10.) HUSLABin suosituksena on erotella plasma välittömästi näytteenoton jälkeen ja analysoida ammonium-ioninäytteet 60 minuutin kuluessa näytteenotosta. Kokoverestä ammonium-ionimääritys tulee tehdä heti näytteenoton jälkeen. (Uotila 2009.)

Ammonium-ionipitoisuuden määrittäminen tulisi tapahtua näytteenottopaikan välittömässä läheisyydessä ja hemolysoituneita plasmanäytteitä ei voida käyttää määrittämisessä, sillä punasolujen ammoniumionipitoisuus on plasmaa 2-3 kertaa korkeampi. (Uotila 2006: 110; Uotila 2010a: 109.) Ikteeriset näytteet voidaan analysoida, jos bilirubiinin taso on alle 188 $\mu\text{mol/l}$. γ -Globuliinin ollessa yli 3 g/dl, ammonium-ionipitoisuus näytteessä

nousee merkitsevästi. Näytteen lipeemisyydellä voi olla merkitystä ammonium-ionipitoisuuteen. (COBAS INTEGRA 400/800 2011: 2.)

Paastonäytteenä otetun ammonium-ionin viitearvo on aikuisilla ja yli viikon ikäisillä lapsilla alle 50 $\mu\text{mol/l}$ (Uotila 2009). Viiteylärajanä plasman ammonium-ionille pidetään täysiaikaisilla vastasyntyneillä 100 $\mu\text{mol/l}$ ja keskosilla 150 $\mu\text{mol/l}$. Ammonium-ionipitoisuuden ylittäessä 176 $\mu\text{mol/l}$ voi ihminen joutua koomaan, ja yli 300 $\mu\text{mol/l}$ pitoisuuksilla seurauksena voi olla pysyvä aivovaurio jo muutaman tunnin kuluessa. Ammonium-ionimääritystä tarvitaan kiireellisenä kaikkina vuorokauden aikoina, erityisesti vastasyntyneitä ja pieniä lapsia hoitavien klinikoiden tarpeisiin, sillä pysyvän aivovaurion mahdollisuus on olemassa. (Uotila 2010a: 108–109.)

2.2.4 Ammonium-ionin säilyvyys ja laatu

Ammonium-ioni ei säily hyvin verinäytteessä, mikä vaikeuttaa määrittystä. Kokoveressä ammonium-ionipitoisuus säilyy erityisen huonosti, mutta se on epästabiili myös erotellussa plasmassa. Kylmässä plasmanäytteessäkin ammoniumionipitoisuus alkaa nousta nopeasti aminohappojen deaminaatiosta johtuen. (Uotila 2006: 110; Uotila 2010a: 109.) Deaminaatiolla tarkoitetaan aminohappojen hapetusta edeltävää aminoryhmien poistoa, jota tapahtuu esimerkiksi silloin kun aminohappoja käytetään soluissa energiantuotantoon (Aminohappojen hapetus 2006).

Mikäli plasmanäytettä ei voida analysoida nopeasti, tulisi se pakastaa $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Plasmanäyte vaikuttaisi olevan kylmäsäilytyksessä stabiili vain noin tunnin ajan, jopa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ammonium-ioninäyte on epästabiili, ja pidempi säilytys tulisikin tapahtua $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, mutta jo $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ voi olla riittävä. (Uotila 2010a: 109.)

Ilmakontaminaatio voi nostaa näytteen ammonium-ionipitoisuutta, erityisesti ilma jossa on tupakansavua. Tämän takia potilaan tulisi välttää usean tunnin ajan tupakointia ennen näytteenottoa. (Uotila 2006 110–111.) Sisäilmaan voi lisäksi vapautua ammoniakkia joistakin rakennusmateriaaleista, maaleista ja lakoista, puhdistus- ja pesuaineista sekä ihmisten ja eläinten eritteistä (Epäorgaaniset yhdisteet 2012). Ammoniakki on myös helposti kaasuuntuva yhdiste. Ammonium-ionipitoisuus voi tästä syystä muuttua, jos näyte pääsee kosketuksiin ilman kanssa esimerkiksi näyteputken korkkia avattaessa (Piirilä 2012).

Vuodesta 2006 lähtien Labquality on tarjonnut laboratorioille tilattavaksi ammonium-ionimäärityksen ulkoisia laadunarviointikierroksia. Laadunarviointikierroksiin osallistuville laboratorioille toimitetaan kaksi määritettävää näytettä kolme kertaa vuodessa. Ammonium-ionikontrolleina voidaan käyttää suljetuissa ampulleissa säilytettyjä puskuripohjaisia näytteitä, jotka eivät sisällä aminohappoja, proteiineja ja amiineja. Nämä puskuripohjaiset näytteet on todettu riittävän stabiileiksi ulkoiseen laadunarviointiin. Biologisissa materiaaleissa ammonium-ioni on liian epästabiili kontrolliksi. Humaaniperäisiä näytteitä, jotka vastaisivat todellisia potilasnäytteitä, ei voida huonon säilyvyyden takia käyttää kontrolleina, mikä korostaa laboratorion sisäisen laadunarvioinnin merkitystä ulkoisen laadunarvioinnin lisänä. (Uotila 2010a: 108–111.)

2.3 Vieritestaus

Vieritutkimuksilla tarkoitetaan laboratoriotutkimuksia, jotka tehdään potilaan vierellä hoitoyksikössä. Vieritutkimukset nopeuttavat palveluprosesseja, ja testejä on mahdollista tehdä myös laboratorion ollessa suljettuna, eli päivystysaikoina. (Kouri 2008: 259.) Vieritestejä tekevissä organisaatioissa tulee ottaa huomioon (Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista, 12. §) lain ammattimaiselle käytölle asettamat vaatimukset. Lain vaatimusten mukaan käyttäjän tulee varmistua, että terveydenhuollon laitetta käytävällä henkilöllä on tarvittava koulutus ja kokemus sekä laitteen käytöstä, että tarpeelliset merkinnät ja käyttöohjeet. Käyttäjän tulee huolehtia siitä, että laite sijoitetaan, säädetään, ylläpidetään ja huolletaan asianmukaisesti. Lakiesityksessä (esitys laiksi lääkinnällisistä laitteista) on vielä tarkemmin määritelty vastuut ja siinä korostetaan myös työnantajan vastuuta. (Ilanne-Parikka ym. 2009: 276.)

Koska vieritestilaitteen tulosten perusteella tehdään välittömiä hoitoon liittyviä päätöksiä, tulisi tulosten olla laadullisesti samaa tasoa kuin laboratoriossa saatavat tulokset. (Ilanne-Parikka ym. 2009: 275.) Vieritestilaitteen käytössä tulisi kuitenkin ottaa huomioon, että testien tarkkuus ja toistettavuus eivät yleensä ole yhtä hyviä kuin laboratorioden analysaattoreilla, joten niitä ei voida käyttää suoraan taudin diagnostiikassa. Käyttötarkoitus on enemmän esimerkiksi hoidon seurannassa. Vieritestien tulisi kuitenkin antaa mahdollisimman luotettavia tuloksia, koska niiden tulokset voivat johtaa välittömiin jatkotoimenpiteisiin potilaan kohdalla. (Ihalainen ym. 2002: 162–163.)

Hoitoyksiköiden ja laboratorioiden pitää pohtia yhdessä, missä tilanteissa vieritestilaitteen virheellisestä tuloksesta on erityisesti vaaraa potilaalle, ja miten kyseisiä virheitä voitaisiin ehkäistä. Tuloksissa esiintyy myös satunnaishajontaa, sekä erilaisia poikkeamia. Näitä yhdessä kutsutaan kokonaisvirheeksi. Hoitavan lääkärin on tiedettävä kuinka suuri kokonaisvirhe on hyväksyttävää ja kuinka usein se voidaan ylittää. Nykyään vieritestilaitteet ovat pääsääntöisesti käyttövarmoja ja usein virheet syntyvätkin näytteenotossa. Muita ongelmia ovat määritysohjeista poikkeaminen ja virheelliset tulkinnot. (Kouri 2008: 259.)

Suomessa vierianalytiikka on lisääntynyt viime vuosina ja lisääntyy edelleen, sillä vieritestaus nopeuttaa potilaiden diagnosointia ja hoidon seurantaa. Vieritestauksessa ongelmina ovat kuitenkin esimerkiksi itse testin oikeaoppinen suorittaminen ja laadunohjauksen vähyys. (Liikanen 2006: 147–149.) Myös vieritestilaitteiden kasvava kysyntä ja laitteiden lisääntyminen ovat saaneet aikaan sen, että testien soveltamisessa on erilaisia käytäntöjä, tai ei ole paneuduttu kunnolla laitteen ohjeistukseen. (Ihalainen ym. 2002: 161.)

Hyvällä perehdyttämisellä varmistetaan, että henkilöt pystyvät itsenäisesti tutkimaan tarvittavat näytteet oikealla tavalla. Testin käyttäjän tulisi tuntea testin tarkoitus, hallita laitteen käyttäminen ja pystyä tulkitsemaan laitteen antama tulos sekä tietämään laitteen eri rajoitukset. Ennen perehdyttämisen aloittamista tulisi olla ennakkoon laadittu ja hyväksytty perehdyttämisohje ja perehdytyksen tulee olla jatkuvaa. Varsinaista perehdytystä ei anna laitteen myyjä, vaan siitä vastuussa oleva henkilö, esimerkiksi kemisti tai mikrobiologi. (Ihalainen ym. 2002: 169.)

2.4 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus

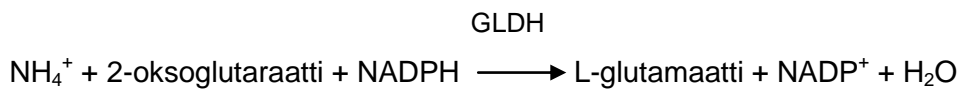
Sarjan sisäisellä ja sarjojen välisellä toistettavuudella voidaan tutkia laitteen luotettavuutta ja suorituskykyä. Sarjan sisäistä toistettavuutta voidaan tutkia tekemällä näytteistä rinnakkaismäärittäyksiä. HUSLABin laatutavoitteissa sanotaan, että sarjan sisäinen variaatio saa olla alle 50 µmol/l ammonium-ioninäytteissä 4 % ja yli 50 µmol/l näytteissä sarjan sisäinen variaatio saa olla 2 %. (Mäki 2012). Sarjojen välisessä toistettavuudessa HUSLABin laatutavoitteiden mukaan sarjojen välinen variaatio saa olla alle 50 µmol/l ammonium-ionipitoisuuksilla 8 % ja yli 50 µmol/l pitoisuuksilla 3 %.

3 Ammonium-ionimäärityksen menetelmät ja laitteet

3.1 Cobas Integra 400 plus –analysaattori

Cobas Integra 400 plus on täysin automaattinen pöytätasolle asetettava laboratorioanalysaattori, jossa neljä erilaista mittausmenetelmää: immunoturbidometrinen, fotometrinen, potentiometrinen, ja fluoresenssi-polarisaatioon perustuva immunologinen mittaus. Monen eri menetelmän ansiosta analysaattorilla voidaan tehdä monipuolisesti erilaisia määryksiä (Roche 2012.)

Ammonium-ioninäytteiden analysoinnissa voidaan käyttää Cobas Integra 400 plus -analysaattoria (Mäntykoski 2010: 1). Analysaattorin käyttämä menetelmä perustuu entsymaattiseen päätepestemenetelmälliseen reaktioon ja tulos annetaan yksikössä $\mu\text{mol/l}$ (Mäntykoski 2010: 1). Menetelmän reaktiokaavio on seuraavanlainen:



Reaktiota katalysoi glutamaattidehydrogenaasientsyymi. Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin eli NADP^+ :n pitoisuus on suoraan verrannollinen ammonium-ionin konsentraatioon. Menetelmässä määritetään NADPH :n häviämisenopeutta. Absorbanssin vähenemistä mitataan fotometrisesti aallonpituudella 340 nm. (COBAS INTEGRA 400/800 2011: 1; Mäntykoski 2010: 1.) Käytettävät reagenssit ja reaktioliuokset ammonium-ionin analysoimiseen on listattu taulukossa kolme.

Taulukko 3. Reagenssit ja reaktioliuos ammonium-ionin määrittämiseen COBAS INTEGRA 400 plus -analysaattorilla (mukaanlaskien Mäntykoski 2012: 1).

Ainesosat/komponentit	Konsentraatio
N,N-bis[2-Hydroxyethyl] glycine	100 mmol/l
GLDH	4,2kU/l
2-Oxoglutaratti	15 mmol/l
NADPH	0,15 mmol/l
Natriumatsidi	0,04 %
pH	8,3

Analysaattori vakioidaan aina, kun reagenssierä vaihtuu, tai jos kontrollien poikkeavat tulokset antavat syyn vakioinnin tarkastamiseen. Kontrollit ajetaan Cobas Integralla päivittäin tasoilla 40 µmol/l ja 150 µmol/l. (Mäki 2012.)

3.2 PocketChem™Ba 4430 –vieritestilaite

Vieritestilaitteena tutkimuksessa toimi PocketChem™Ba 4430. Vieritestilaite on melko pieni, noin 124 mm leveä ja noin 38 mm korkea. Laite painaa noin 250 g. Laite toimii tavallisilla kahdella AA pattereilla tai AC adapterilla. Ammonium-ionin analysointia varten vieritestilaitteeseen tarvitaan 20 µl kokoverta. (ARKRAY.) Verinäytettä ei tarvitse ottaa kylmänäytteenottona. Laitteessa on lämpötilasensori, jonka avulla se voi myös säätää lämpötilan analysointikelpoiseksi. Huoneenlämmön tulisi olla kuitenkin 10–35 celsius asteen välillä, eikä lämpötila saisi vaihdella. (ARKRAY 2003.)

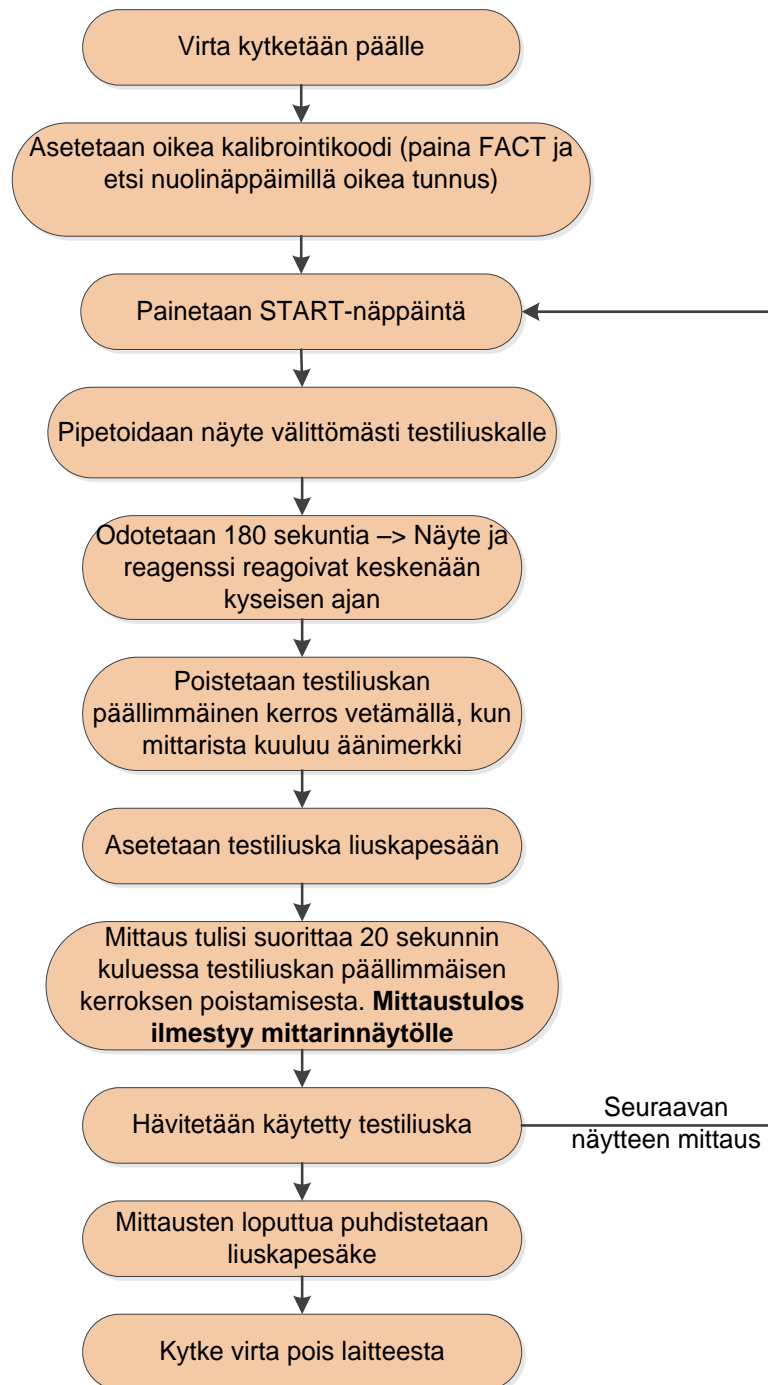
Ammonium-ionin mittaus perustuu mikro-diffuusiomenetelmään. Reaktio periaate on, että pipetoidusta näytteestä ammonium-ioni muuttuu ammoniakkikaasuksi, joka kulkeutuu näytetyynyn läpi. Kun veri pipetoidaan tyynylle, alkaa reaktio, jossa emäksinen puskuri kyllästyttää näytteen emäksiseksi. Kyseisen reaktion aiheuttamana näytteessä oleva ammonium-ioni kaasuuntuu ammoniakkikaasuksi. Ammoniakkikaasu läpäisee välilevyn huokoset aina indikaattitasolle asti, mikä laukaisee värin muodostumisen. Värin asteen kehittyminen on verrannollinen tuotettuun ammoniakkikaasun konsentraatioon. (ARKRAY 2003.) Laitteen käyttämä aallonpituus on 635 nm (LED). Laite mittaa heijastuneen valon saadakseen värin tason, jonka avulla saadaan tulos (ARKRAY.) Ohessa kuva (kuvio 2), josta nähdään kokoverinäytteen

pipetointi testiliuskalle ja PocketChem™Ba 4430 -vieritestilaite analysoimassa testiliuskaa.



Kuvio 2. Näytteen pipetointi kelkalla olevalle testiliuskalle (vas.) ja vieritestilaite PocketChem™Ba 4430 (oik.).

Ennen kuin näyteliuskan voi irrottaa ja asettaa koneeseen, pitää odottaa 180 sekuntia, eli kolme minuuttia, jonka aikana mikro-diffuusioreaktio tapahtuu. Tuloksen analysoimiseen menee 20 sekuntia. Testiliuskoina käytetään Ammonia TestKit II – liuskoja, ja yhdessä pakkauksessa on 50 liuskaa. (ARKRAY.) Vieritestilaitteen mukana tullut kelkka (kuvio 3), jolla testiliuskoja pidetään, ehkäisee lämmön siirtymisen alustasta testiliuskalle, eli se estää lämpötilan vaikutusta mittaustulokseen ja suojaa tasoa mahdollisilta veriroiskeilta (Veren ammoniakkimittari 2004: 10). Laitteen mittausalue on 7-286 $\mu\text{mol/l}$. Avattu liuska pitää käyttää välittömästi, sillä muuten liuska saattaa reagoida ilmassa olevan ammonium-ionin kanssa ja antaa virheellisen tuloksen (ARKRAY 2003.) Vieritestilaitteen käyttö tutkimuksen aikana on esitetty kuviossa 3.



Kuvio 3. PocketChem -vieritestilaitteen käyttöohje.

4 Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset

PocketChem™BA 4430 –vieritestilaitteen ja Cobas Integra 400 plus –analysointilaitteen välisen laitevertailun tarkoituksena oli selvittää ovatko vieritestilaitteen tulokset

yhteneviä Meilahden sairaalan laboratoriossa ammonium-ionimäärittämiin käytettävän analyyttimen tulosten kanssa, ja antaako vieritestilaitte luotettavia tuloksia. Tarkoituksena oli lisäksi selvittää soveltaisiko vieritestilaitte käytettäväksi spiroergometriatutkimuksen kaltaisten kliinisten rasituskokeiden yhteyteen.

Työn tarkoituksena oli myös tutkia vaikuttaako laboratorioprosessi mahdollisesti kliinisesti merkitsevästi spiroergometria laktaattinäytteiden – tutkimuksen aikana otettujen verinäytteiden ammonium-ionipitoisuuksiin ja toteutuuko laboratorioprosessi suositusten mukaisesti. Tarkoituksena oli seurata kliinisessä rasituskokeessa otettuja ammonium-ioninäytteitä laboratorioprosessissa, sekä selvittää tapahtuuko laboratorioprosessissa viiveitä tai käsittelyvirheitä, jotka voisivat vaikuttaa heikentävästi ammonium-ionitulosten luotettavuuteen.

Kokoveren säilyvyyttutkimuksen tarkoituksena oli selvittää muuttuuko näytteen ammonium-ionipitoisuus, jos verinäytettä säilytetään kylmässä kokoverenä tiettyjä aikoja ennen näytteen sentrifugointia. Tutkimme onko mahdollisella sentrifugointiviiveellä laboratorioprosessissa kliinisesti merkitsevää vaikutusta näytteiden ammonium-ionipitoisuuksiin, ja missä vaiheessa viive on niin suuri, että se vaikuttaa tuloksiin. Työssä pyrittiin vastaamaan seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

- Antavatko PocketChem™BA 4430 –vieritestilaitte ja Cobas Integra 400 plus –analysointilaitte yhteneviä tuloksia?
- Vaikuttaako laboratorioprosessi ammonium-ionipitoisuuksiin?
- Muuttuvatko ammonium-ioninäytteiden pitoisuudet seisotusaikojen myötä kokoveressä?

5 Tutkimuksen toteutus

Opinnäytetyö toteutettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelmassa ja työn ohjaavana opettajana toimi lehtori Hilikka Tukkiniemi ja työelämäohjaajana sairaanhoitaja Helena Honkala. Meilahden sairaalan sairaalakemisti Annukka Mäki ja ylilääkäri Päivi Piirilä ohjeistivat opinnäytetyön aikana oleellisen tiedon hankinnassa ja antoivat neuvoja työn suoritusta ja tulosten käsittelyä koskeviin asioihin. Kliinisen kemian puolen yhdyshenkilönä toimi laboratoriohoitaja Ulla Peltola, joka ohjeisti esimerkiksi Cobas Integra 400 plus -analysointilaitteeseen liittyvissä

asioissa. Mirja Ahonen VWR International Oy:stä esitteli PocketChem™Ba – vieritestilaitteen ja vieritestihoitaja Päivikki Alastalo ohjeisti vieritestilaitteen käytössä. Työn käytännön osuus suoritettiin helmikuussa 2012 neljänä eri päivänä, neljän eri spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimuksen yhteydessä.

5.1 Aineiston keräys

Näytteet kerättiin Neurologian klinikan järjestämään tutkimukseen osallistuneilta neljältä terveeltä ja vapaaehtoiselta verrokkipotilaalta. Verrokkit eivät olleet varsinaisia potilaita, vaan olivat ominaisuuksiltaan, kuten iän ja sukupuolen kannalta vastaavia kuin varsinaiset Neurologian klinikan tutkimukseen osallistuvat potilaat. Opinnäytetyöhön terveet verrokkipotilaat valittiin sen takia, että otokseen saataisiin ammonium-ioninäytteitä eri pitoisuustasoilta. Sairailla henkilöillä pitoisuudet olisivat saattaneet olla esimerkiksi vain poikkeavan korkeita tai matalia, jolloin olisi ollut mahdotonta tarkastella esimerkiksi vieritestilaitteen suorituskykyä useilla eri pitoisuusalueilla. Ammonium-ioninäytteitä otettiin jokaisesta verrokista yhdeksän kertaa vieritestilaitetta ja analysaattoria varten, eli näytteitä otettiin kaiken kaikkiaan 36 näyteparia. Otanta tutkimuksessa oli pieni tutkimuksen harvinaisuudesta johtuen. Verrokeista käytettiin nimityksiä potilas 1, potilas 2, potilas 3 ja potilas 4.

5.2 Työn suorittaminen

Ennen spiroergometriatutkimuksen aloittamista potilas ilmoittautui laboratoriossa. Vaatteiden vaihtamisen jälkeen potilasta haastateltiin ja ohjeistettiin tutkimusta varten. Tämän jälkeen tehtiin tarvittavat toimenpiteet, kuten spirometriapuhallukset, sydänfilmin elektrodien kiinnittäminen potilaaseen ja pulssioksimetrien kiinnitys. Kaikki toimenpiteet suoritettiin HUSLABin ohjeistuksien mukaan. (Haapalahti 2012: 2-3.)

Lääkäri pisti potilaan käsivarteen laskimokanyylin, josta otettiin kaikki tutkimuksen aikana otettavat verinäytteet. Poikkeustilanteissa voidaan näyte ottaa pistämällä, esimerkiksi jos kanyyli on liikkunut suonesta pois. Ensimmäiset verinäytteet otettiin sen jälkeen, kun potilas on ollut levossa 15 minuuttia. Ennen varsinaisten verikokeiden ottoa irrotettiin kanyylista mandriini, joka estää veren valumisen kanyylista. Sitten asetetaan holkki paikalleen ja otetaan hukkaputki, tai tiputetaan pari tippaa verta esimerkiksi tehdaspuhtaalle sellupaperille. Tämän jälkeen otetaan verikokeet.

(Lindholm 2011: 1-2.) Ensimmäisenä verinäytteenä otettiin PocketChemille menevä ammonium-ioni ja tämän jälkeen otettiin loput näytteet eli ammonium-ioni Cobas Integralle, laktaattinäytteet, verikaasunäytteet ja Neurologian tutkimukseen otetut näytteet. Näytteenoton jälkeen kanyyliin laitettiin uusi mandriini. Näin toimittiin jokaisen näytteen kohdalla.

Näytteenottoputket säilytettiin ennen näytteenottoa ja näytteenoton jälkeen jäämurskassa. PocketChemin putket säilytettiin koko ajan huoneenlämmössä. Tutkimusta oli suorittamassa kolme hoitajaa, joista yksi otti verinäytteet, ja toinen antoi putkia verinäytteenottoa varten, sekä tarroitti putket. Kolmas hoitaja ei kuulunut kliinisen fysiologian laboratorioon, vaan Neurologian klinikan tutkimushoitajiin. Tutkimuksen aikana usein yksi erillinen henkilö vie näytteet sentrifugoitavaksi näytteiden lajitteluun. Neurologian klinikan hoitaja hoiti tässä tapauksessa kaikkien näytteiden viemisen lajitteluun. Putket numeroitiin yhdestä yhdeksään, jolloin tiedettiin, mikä näyte oli kyseessä. Vieritestilaitteelle menevä putket tarroitettiin ylimääräisillä tarroilla ja myös ne numeroitiin. Lepovaiheen verinäytteet hoitaja pystyi viemään lajitteluun heti, mutta rasiuksen jälkeen näytteitä otettiin niin lyhyellä aikavälillä, että hoitaja joutui kyseiset näytteet tuomaan näytteenottojen jälkeen samalla kertaa sentrifugoitavaksi.

Näytteet vietiin Meilahden laboratorion lajitteluun, jossa ne odottivat sentrifugointia jäämurskassa. Tämän jälkeen lajittelun henkilökuntaan kuuluva työntekijä sentrifugoi näytteet. Näytteet sentrifugoitiin kylmänäytteinä eli kuudessa celsiusasteessa. Sentrifugoinnin jälkeen näyte ei ollut enää jäissä, vaan se kuljetettiin huoneenlämmössä analysaattorille. Tutkimuksen aikana käytettiin kahta sentrifugia, koska toinen saattoi olla varattuna. Tässä tutkimuksessa käytettiin Rotixa 50 RS Hettich -sentrifugeja. Laitteiden ohjelma oli asetettu kylmänäytteiden sentrifugointiin. Näytteeseen kohdistuva sentrifugaalivoima oli aina 2000 g ja näyteputkia pyöritettiin kymmenen minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen automaatiolaboratorion työntekijät kuljettivat näytteet Cobas Integra –analysaattoriin analysoitaviksi. Analysoinnin suoritti automaatiolaboratorion henkilökuntaan kuuluva laboratoriohoitaja.

5.2.1 Laittevertailu

Laittevertailussa näytteitä oli yhteensä 36 näyteparia. Näytteet analysoitiin PocketChem™Ba 4430 –vieritestilaitteella ja Cobas Integra 400 plus –analysointilaitteella. Vieritestilaitteeseen oli asetettu Ammonia Test Kit II –liuskoille sopiva ohjelma, mikä lukee liuskapaketin kyljessä. FACT-näppäintä pohjaan painamalla esiin tulee valikko, missä nuolinäppäinten kautta voi valita oikean ohjelman.

Tämän jälkeen voidaan aloittaa näytteiden analysointi. Vieritestilaitteella tutkitut näytteet analysoitiin kaikki samalla tavalla. Ensin näytteitä sekoitettiin kymmenen kertaa ja liuska otettiin varovasti pois alumiinipakkauksestaan. Tämän jälkeen liuska asetettiin kelkalle, jonka jälkeen pipetoitiin 20 µl kokoverta liuskalle ja painettiin vieritestilaitteesta välittömästi Start-näppäintä, jolloin näyttöön syttyi aika (180 sekuntia). Seuraavien 180 sekunnin aikana näyte reagoi liuskalla puskurin kanssa, joka mahdollistaa tuloksen saamisen. Kun aika oli kulunut, kone piti äänen, jonka jälkeen liuskan päällimmäinen osa irrotettiin liuskasta ja alempi osa asetettiin laitteen liuskapesään, jolloin analysointi tapahtui 20 sekunnin kuluessa. Tarkemmin reaktiosta on kerrottu PocketChemiä koskevassa kappaleessa (ks. kappale 3.2). Tämän jälkeen saatiin tulos näytölle ja tulos kirjattiin kaavakkeelle. Tulosten käsittelyssä käytetyt kaavakkeet ovat nähtävissä liitteessä 1, heti aikaseurantataulukon jälkeen.

Vieritestilaitteella tehtiin laitevertailunäytteille rinnakkaiset määrykset potilas 1:n näytteille, potilas 3:n kolmelle näytteelle ja potilas 4:n kolmelle näytteelle. Rinnakkaismääryksiä ei tehty yhdellekään potilas 2:n näytteille, eikä potilas 3:n ja 4:n kuudelle näytteelle. Rinnakkaismäärykset tehtiin välittömästi laitevertailua varten määritetyn tuloksen saamisen jälkeen. Rinnakkaismääryksiä tehtiin vieritestilaitteen sarjan sisäisen toistettavuuden tutkimista varten.

Toinen tutkimuksen suorittajista analysoi näytteitä vieritestilaitteella ensimmäisenä ja kolmantena tutkimuspäivänä, ja toinen toisena ja neljäntenä tutkimuspäivänä. Tällöin toinen tutkimuksen suorittaja oli seuraamassa näytteiden kulkua laboratorioprosessissa. Cobas Integralle menevät näytteet kulkivat normaalisti laboratorioprosessin läpi ja automaatiolaboratorion henkilökunta käsitteli näytteet ja analysoi ne.

Ennen näytteiden analysointia vieritestilaitte oli tutkimusaamuna vakioitu sen omalla vakiointi- eli referenssiliuskalla. Tämä tapahtui niin, että painettiin FACT-painiketta pohjassa ja nuolinäppäinten avulla etsittiin ja valittiin CHE-ohjelma. Tämän jälkeen vakiointiliuska asetettiin laitteeseen ja aloitettiin mittaus. Vakion viitearvot olivat nähtävillä vakiointiliuskan paketissa. Vieritestilaitteella analysoitiin myös Cobas Integralle tarkoitetut normaalin tason kontrollit jokaisena tutkimuspäivänä kaksi kertaa, ennen tutkimusta ja tutkimuksen jälkeen. Kontrollit otettiin 15 minuuttia ennen analysointia pakkasesta ja annettiin lämmetä huoneenlämmössä. Tämän jälkeen kontrollinäytettä sekoitettiin ja analysoitiin samalla tavalla kuin muutkin näytteet. Kontrolleista tehtiin aina rinnakkaiset määrytykset. Kontrolleilla oli aina sama LOT-numero.

Koko tutkimuksen ajan käytössä olivat aina samat välineet, joilla oli samat LOT-numerot. Tutkimusten loppuvaiheessa otettiin kuitenkin käyttöön uusi Ammonia TestKit II -liuskapaketti edellisen paketin loppuessa, jolloin myös liuskojen LOT-numero vaihtui. LOT-numeron muutos syötettiin koneen tietoihin. Päivän päätteeksi laite puhdistettiin ohjeiden mukaisesti.

5.2.2 Laboratorioprosessin seuranta

Vaiheittain tapahtunut aikaseuranta suoritettiin ajanpuutteen vuoksi vain tiettyjen näytteiden kohdalla. Vain toinen tutkimuksen suorittajista pääsi seuramaan näytteitä laboratorioprosessissa, jolloin vain tiettyjen näytteiden seuranta oli mahdollista. Esimerkiksi seurattaessa tiettyä näytettä analysaattorille, saattoi lajitteluun tulla jo seuraava erä ammonium-ioninäytteitä sentrifugoitavaksi sekä molempia tarvittiin vieritestilaitteen tulosten tekemiseen, koska rinnakkaisnäytteiden takia oli kova kiire ja tarvittiin apua tulosten merkitsemiseen. Tällöin sentrifugiin menneiden näytteiden tietyt käsittelyajat olisivat jääneet merkitsemättä ja kiireen takia olisi voinut tapahtua virheitä esimerkiksi tietojen ja tulosten merkitsemisessä, tai näytteen käsittelyssä.

Kaikkien potilaiden kohdalla vaihe vaiheelta seurattiin samassa vaiheessa otettuja näytteitä. Seurattavat näytteet olivat ensimmäisenä otettu, eli leponäyte, sekä viimeisenä otettu, eli 30 minuuttia rasituksen jälkeen otettu näyte. Näytteenoton jälkeen toinen meistä seurasi tutkimushoitajaa lajitteluun, jossa hoitaja laittoi näytteet itse sentrifugoitumaan, tai sanoi muille hoitajille tuoneensa näytteitä. Emme kuljettaneet

itse missään vaiheessa näytteitä, koska pyrimme siihen, että näyte kulkisi laboratorioprosessin läpi niin kuin se normaalistikin menisi.

Odotimme sentrifugin vieressä sentrifugoinnin loppua, jonka jälkeen odotimme hoitajan vievän näyteputken analysaattorille. Emme sanoneet milloin sentrifugointi oli valmis, koska se vaikuttaisi tulostemme luotettavuuteen. Kun näyte vietiin analysoitavaksi, odotimme niin kauan, että näyte laitettiin Cobas Integraan analysoitavaksi. Kirjasimme ylös tarkat kellonajat jokaisessa laboratorioprosessin eri käsittelyvaiheessa, eli näytteenottoajan, näytteen saapumisen laboratorioon, näytteen laittamisen sentrifugiin, näytteen poistamisen sentrifugista ja näytteen laittamisen analysaattoriin. Seurantakaavio on nähtävissä liitteessä 1. Muiden näytteiden kohdilla vertasimme näytteenottoaikaa ja näytteen valmistumisaikaa keskenään, mistä pystyi päättelemään olivatko näytteet kulkeneet koko laboratorioprosessin viiveettä, eli analysoitu 60 minuutin kuluessa näytteenotosta.

5.2.3 Säilyvyystutkimus

Kokoveren säilyvyystutkimukseen valittiin tutkittaviksi yhteensä viisi näytettä kolmesta eri potilaasta. Ensimmäinen säilyvyystutkimusnäyte oli otettu yhden potilaan viimeisenä otetusta, eli yhdeksännestä näyteputkesta (potilas 2, näyte 9). Muut neljä säilyvyystutkimusnäytettä otettiin kahden muun potilaan seitsemänsistä (potilas 3, näyte 7 ja potilas 4, näyte 7) ja yhdeksänsistä (potilas 3, näyte 9 ja potilas 4, näyte 9) putkista. Säilyvyystutkimus suoritettiin niin, että näyteputkista otettiin ruiskulla näytettä Eppendorf-putkiin, jotka laitettiin jäihin. Jokaisesta näyteputkesta siis otettiin näytettä ainoastaan yhteen Eppendorf-putkeen. Näytteet eroteltiin Eppendorf-putkiin, koska seisotusaikojen välit eivät olleet kovinkaan suuret, jolloin näyte ehtisi lämmetä ja kylmentyä nopeammin. Tavallisella 5/3 ml EDTA-putkella olisivat putken lämmitys ja kylmennys kestäneet liian kauan.

Näytteen siirtäminen pyrittiin tekemään mahdollisimman nopeasti, ettei näyte reagoisi mahdollisesti ilmassa olevan ammoniakin kanssa, tai näytteessä oleva helposti kaasuuntuva ammoniakki ei pääsisi haihtumaan. Näytettä seisotettiin 15 minuuttia, minkä jälkeen se otettiin pari minuuttia ennen mittaamista pois jäistä, lämmitettiin käsissä, sekoitettiin ja suoritettiin mittaus. Tämän jälkeen samaa näytettä seisotettiin toiset 15 minuuttia jäissä, minkä jälkeen näytettä käsiteltiin jälleen samalla tavoin ja analysoitiin tulos uudelleen. Näin tehtiin samalle Eppendorf-putkessa olevalle

näytteelle yhteensä kuusi kertaa, eli seisotusmääritysten ajat olivat 15 minuuttia, 30 minuuttia, 45 minuuttia, yksi tunti, yksi tunti ja 15 minuuttia, sekä yksi tunti ja 30 minuuttia.

Pyrimme lisäksi tekemään jokaisen seisotusnäytteen kaikkien seisotuskertojen määrittämisestä rinnakkaiset määritykset vieritestilaitteen sarjan sisäisen toistettavuuden tutkimista varten. Ensimmäiselle seisotettavalle näytteelle (potilas 2, näyte 9) ei kuitenkaan tehty rinnakkaisia määrittämiä. Kolmelle seisotusnäytteelle (potilas 3, näytteet 7 ja 9, sekä potilas 4, näyte 9) tehtiin jokaisessa seisotusvaiheessa rinnakkaismäärittäykset. Yhdelle näytteelle (potilas 4, näyte 7) tehtiin kaikki muut rinnakkaismäärittäykset, paitsi ensimmäisen seisotuskerran määrittämiselle, jolloin näytteenotosta oli kulunut 15 minuuttia. Cobas Integraa ei käytetty kokoveren säilyvyystutkimuksessa, koska putkia olisi tarvittu jokaiseen seisotuskertaan omansa, koska näyte pitää sentrifugoida ennen analysointia. Teimme jokaisena tutkimuspäivänä ennen spiroergometriatutkimusta ja tutkimuksen jälkeen PocketChem™Ba 4430 –vieritestilaitella määrittäykset Cobas Integran kontrolleilla selvittääksemme vieritestilaitteen sarjojen välistä toistettavuutta

5.2.4 Tulosten käsittely

Tuloksia käsiteltiin Excel-taulukko-ohjelmalla ja SPSS PASW –tilasto-ohjelmalla. Excel-ohjelmaa käytettiin esimerkiksi laskettaessa tulosten korrelaatiokertoimia ja keskihajontoja. Ohjelman avulla teimme myös erilaisia taulukoita ja kuvaajia. Normaali jakaumaan perustuvaa testausta ei voida käyttää luotettavasti, jos otosten koot ovat pieniä. Jos perusjoukoissa satunnaismuuttujien jakauma on kuitenkin likimain normaali, voidaan käyttää t-testiä, joka on parametrinen testi. Ellei normaalisti jakautumisesta voida olla varmoja, voidaan t-testin sijasta käyttää Mann-Whitneyn testiä tai Wilcoxonin testiä. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 187, 198.) SPSS PASW –tilasto-ohjelmalla teimme Wilcoxonin testin lisäksi myös t-testin (paired-samples t-test), joka antoi tilastolliselta merkitsevyydeltään vastaavia tuloksia kuin Wilcoxon. Valitsimme kuitenkin tutkimusten tulosten käsittelyyn vain Wilcoxonin testin, sen takia että otos oli pieni. Wilcoxonin testin avulla saimme laitevertailun tuloksille laskettua p-arvot.

Variaatiokertoimet vieritestilaitteen sarjan sisäisessä toistettavuudessa laskettiin käyttämällä HUSLABin käyttämää Dahlbergin kaavaa (ks. kuvio 4). Kyseistä kaavaa

voidaan käyttää kun selvitetään jonkin laitteen tai menetelmän soveltuvuutta kliiniseen käyttöön. (Mäki 2012.) Saimme Exceliin ohjelmoidulla Dahlbergin kaavalla laskettua vertailun variaatiokertoimet, eli CV-prosentit, sekä tulosten erotusten keskihajonnat ja erotuksen neliön keskihajonnat. Dahlbergin kaavassa x_{i1}, x_{i2} ovat rinnakkaismääritysten tulokset ja n tarkoittaa tulosten lukumäärää, Σ on summa, jossa i käy 1:stä n :ään, ja i on summausindeksi (Siloaho ym. 1997: 202.) Dahlbergin kaavaa käytetään yleisesti HUSLABissa, kun tehdään menetelmävertailua (Mäki 2012).

$$s_0 = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$$

Kuvio 4. Laskukaava

6 Tutkimustulokset

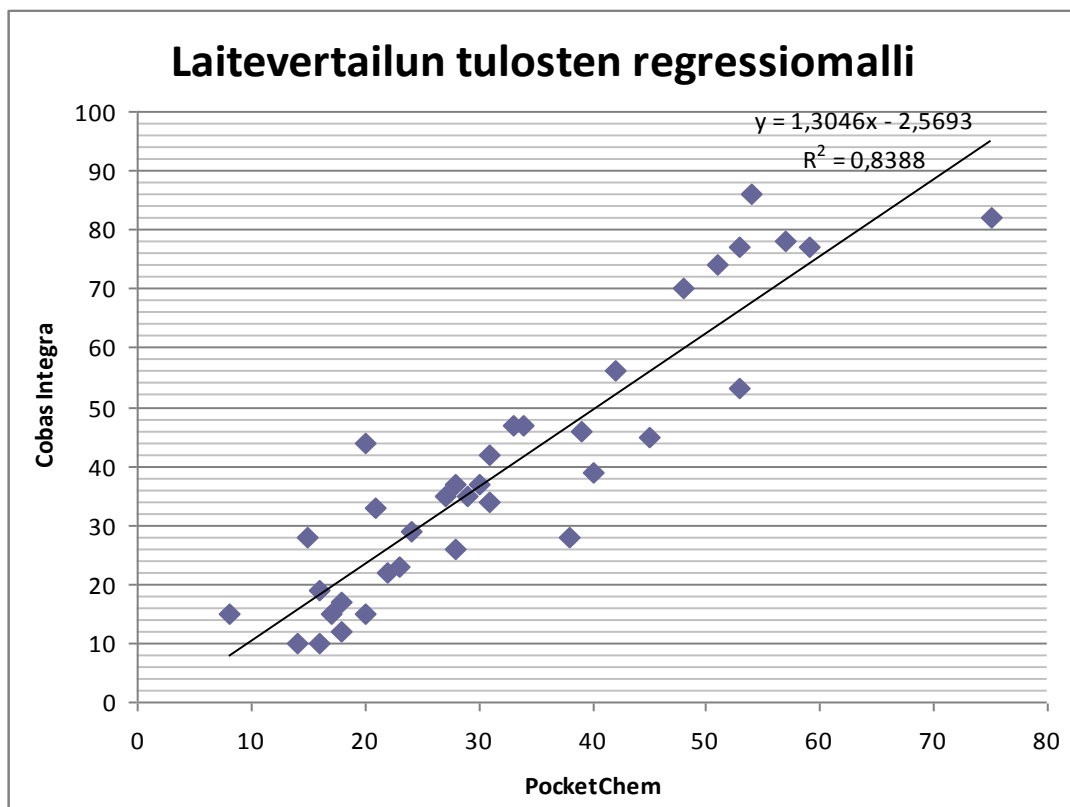
6.1 Laittevertailu

Laittevertailussa saadut tulokset on taulukoitu liitteessä neljä. Laittevertailussa tuloksia saatiin molemmista laitteista yhteensä 36 kappaletta, eli jokaisen neljän verrokkipotilaan yhdeksästä eri näytteestä. Näitä laitteiden antamia tuloksia verrattiin toisiinsa. Tutkimme antaako PocketChemTMBa 4430 -vieritestilaite luotettavasti samoja tuloksia, kuin Cobas Integra 400 plus –analysointilaitte.

Laittevertailun tulosten (ks. liite 4) erotus oli suurimmillaan 32 $\mu\text{mol/l}$, kun taas neljän näytteen erotus oli 0 $\mu\text{mol/l}$. Tulosten erotuksissa oli suuria vaihteluita. Erotusprosenttien erot ovat väliltä 0-60 %. Suurin osa erotusprosentteista sijoittui lähelle 30 %:a, mutta erotusprosenttien vaihtelut ovat hyvinkin suuria. Erotusprosenttien ja erotusten ($\mu\text{mol/l}$) kviot ovat nähtävissä liitteessä 5. Kuvioissa näkyy PocketChemin ja Cobas Integran tulosten eroavaisuudet selvästi. Tulosten erot ovat pienempiä matalammilla tuloksilla, kun taas suurissa tuloksissa vieritestilaite antaa selvästi matalampia tuloksia kuin analysointilaitte. Suurimmaksi osaksi PocketChem antaa matalampia tuloksia Cobas Integraan nähden.

Tulosten välisten erotusten ja erotusprosenttien suuruuden takia vieritestilaitte PocketChem™Ba 4430 ei tämän tutkimuksen perusteella anna Cobas Integran kanssa yhteneviä tuloksia. Erotusprosentti laitteiden tulosten välillä saisi olla HUSLABin kriteerien mukaan vain 8 % (Mäki 2012). Tämä ei kuitenkaan toteudu, koska laskiessa erotusprosentin kaikista näytteistä saadaan erotusprosentiksi 10 %. Lisäksi tulee tarkastella yksittäisiä erotusprosentteja (ks. liite 4), joista nähdään että yksittäisten tulosten kohdalla erot voivat olla todella suuria. Vaikka kaikkien tulosten perusteella laskettu erotusprosentti olisi lähellä suosituksia, voidaan monien yksittäisten tulosten suurien erotusprosenttien perusteella todeta, ettei vieritestilaitte anna yhteneviä tuloksia Cobas Integran kanssa.

Regressiokuvaajaan (ks. kuvio 5) on sijoitettu kaikkien potilaiden näytteet Cobas Integralla ja PocketChem-vieritestilaitteelta. Näkyvillä on kuvaajan lauseke, jossa kulmakerroin kertoo että Cobas Integran tulokset ovat keskimäärin 1,3 kertaa suurempia kuin PocketChemin tulokset. Kuviossa näkyy regressiosuora, jonka ympärillä tulokset ovat sinisinä pisteinä. Yksi piste vastaa Cobas Integralla ja PocketChemillä samasta näytteestä tehtyä tulosta. Kuviossa näkyy, että etenkin pienemmillä pitoisuuksilla muutamat tulokset asettuvat suoralle tai lähelle suoraa, eli kyseiset tulokset ovat lähellä toisiaan. Suurin osa tuloksista ei kuitenkaan asetu suoralle, mikä puolestaan kertoo siitä, että analysaattorin ja vieritestilaitteen tulokset eroavat toisistaan.

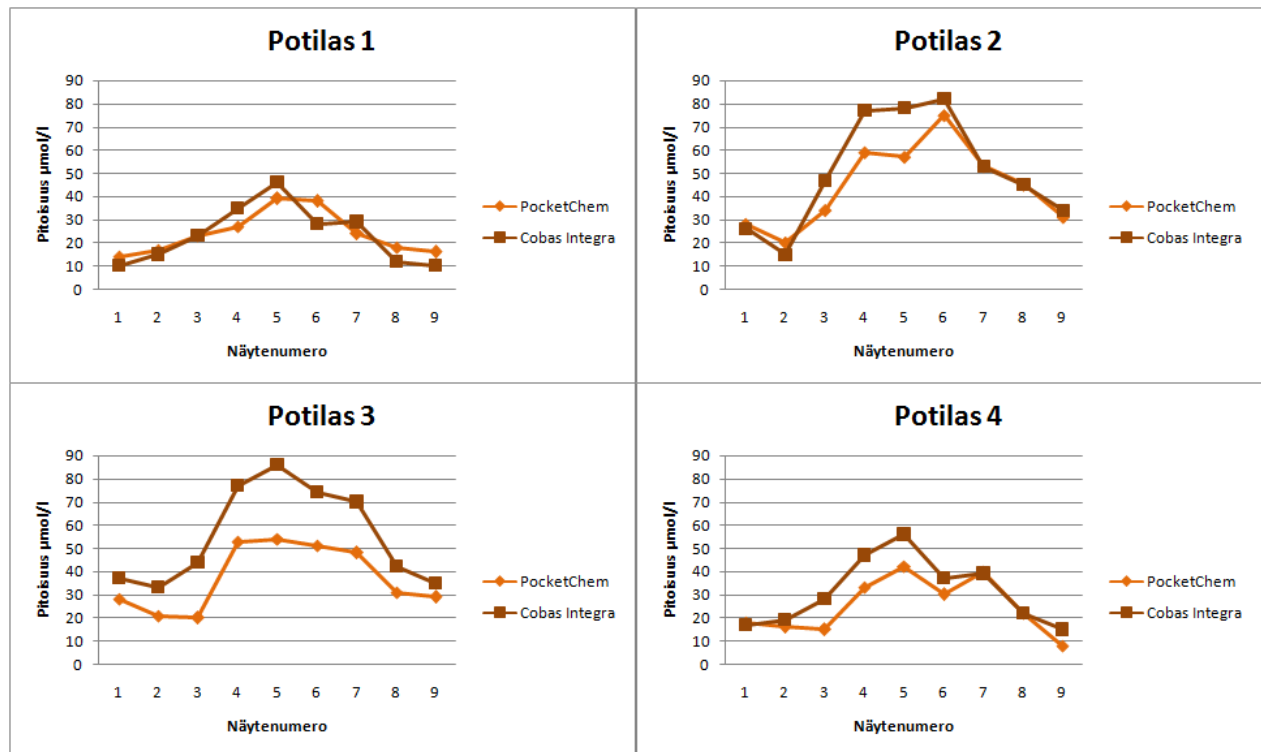


Kuvio 5. Laitevertailun tulosten ($\mu\text{mol/l}$) regressiosuora.

Laitevertailun potilaskohtaisten näytteiden kuvaajissa (ks. kuvio 6) on esitetty vieritestilaitteen ja analysaattorin antamat potilaskohtaiset tulokset omina käyrinä. Toinen tutkimuksen suorittajista analysoi vieritestilaitteella näytteet potilailta 1 ja 3, ja toinen potilailta 2 ja 4. Kuvaajista näkyy, että PocketChem (vaalea käyrä) antaa pääosin matalampia tuloksia kuin Cobas Integra (tumma käyrä).

Molempien laitteiden käyrät noudattavat suunnilleen samaa linjaa, ja laskut ja nousut sijoittuvat samoille kohdille. Kuvaajista näkyy, että laitteiden antamat tulokset poikkeavat usein toisistaan, ja jokaisen potilaan kohdalla paikoitellen pitoisuusero on suuri, eli käyrien pisteet eivät ole lähellä toisiaan. Potilas 1:sen, 2:sen ja 4:sen kohdalla vieritestilaitte ja analysaattori antavat muutamien näytteiden kohdalla samat tulokset (käyrien pisteet ovat päällekkäin), kun taas potilas 3:sen kohdalla kaikki vieritestilaitteen antamat tulokset ovat matalampia kuin Cobas Integran tulokset. Potilas 1:sen ja potilas 4:sen ammonium-ionipitoisuudet ovat keskimäärin matalampia kuin potilas 2:sen ja 3:sen pitoisuudet. Lisäksi on havaittavissa molempien laitteiden

tulosten osalta terveiden verrokkien normaali veren ammonium-ionipitoisuuden nousu spiroergometrian rasisus- ja palautumisvaiheessa.



Kuvio 6. Laitevertailun potilaskohtaiset kuvaajat.

Laitevertailun nollahypoteesiksi asetettiin H_0 : Eri laitteilla samoista näytteistä mitatut tulokset eivät eroa toisistaan. Vastahypoteesiksi asetettiin H_1 : Eri laitteilla samoista näytteistä mitatut tulokset eroavat toisistaan. P-arvot on laskettu erikseen jokaisen potilaan näytteille (ks. taulukko 4). Potilaiden 1 ja 2 p-arvot olivat nollahypoteesin mukaisia. Tulosten välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, sillä p-arvot olivat yli 0.05 (Holopainen – Pulkkinen 2008: 177).

Potilaiden 3 ja 4 nollahypoteesi hylätään p-arvon mukaan ja vaihtoehtoinen hypoteesi astuu voimaan, eli laitteiden tulosten välillä on tilastollisesti merkitsevää eroa. Nollahypoteesi hylätään, koska p-arvot ovat alle 0.05 (Holopainen – Pulkkinen 2008: 177). Potilaskohtaisten tulosten Pearsonin korrelaatiokertoimet on listattu taulukkoon 4. Korrelaatiokertoimet osoittavat että tuloksilla on voimakas lineaarinen yhteys.

Taulukko 4. Laitevertailun tulosten potilaskohtaiset p-arvot ja Pearsonin korrelaatiokerroimet.

Potilas	P-arvo	Korrelaatiokerroin
1	0.779	0,87
2	0.091	0,95
3	0.008	0,95
4	0.035	0,90

6.1.1 Vieritestilaitteen vakiointi

Vieritestilaitteen luotettavuutta seurattiin vieritestilaitteen omalla referenssiliuskalla yhden kerran jokaisena tutkimuspäivänä ennen muita mittauksia (ks. taulukko 5). Tavoitearvoina liuskalle olivat 65–79 $\mu\text{mol/l}$, ja tulokset sijoittuivat tavoitearvojen sisälle jokaisella mittauskerralla.

Taulukko 5. Referenssitaulukko.

Referenssi	$\mu\text{mol/l}$
24.helmi	72
27.helmi	72
28.helmi	71
29.helmi	72

6.1.2 Plasmakontrollien mittaus vieritestilaitteella

Jokaisena tutkimuspäivänä ennen spiroergometriatutkimusta ja tutkimuksen jälkeen teimme PocketChem™Ba 4430 -vieritestilaitteella määrytykset Cobas Integran kontrolleilla (ks. taulukko 6). Kontrollit on koostumukseltaan valmistettu plasmamäärittystä varten ja vieritestilaitte on suunniteltu kokoverimäärittäykseen. Kontrollien ammonium-ionipitoisuus oli 40 $\mu\text{mol/l}$. Eri päivinä mitattujen tulosten keskiarvot vieritestilaitteella olivat 78 $\mu\text{mol/l}$, 70 $\mu\text{mol/l}$, 67 $\mu\text{mol/l}$ ja 70 $\mu\text{mol/l}$, eli tasaisesti korkeampia kuin 40 $\mu\text{mol/l}$.

Taulukko 6. PocketChem–vieritestilaitteella mitatut plasmakontrollit ($\mu\text{mol/l}$).

Tutkimuspäivä	Ennen tutk. kontrolli	Ennen tutk. rinnakkainen	Jälkeen tutk. kontrolli	Jälkeen tutk. rinnakkainen	Keskiarvo	Keskihajonta
24.helmi	77	81	70	82	78	5,4
27.helmi	70	66	72	73	70	3,1
28.helmi	68	64	73	64	67	4,3
29.helmi	72	66	65	78	70	6,0

6.2 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus

Vieritestilaitteen sarjan sisäisen toistettavuuden tulokset on esitelty liitteessä 3. Rinnakkaisnäytepareja oli kerätty yhteensä 38. Tutkimukseen otettiin mukaan kaikki näytteet, joista oli tehty rinnakkaiset pitoisuusmittaukset vieritestilaitteella. Nollanäytteet määritettiin heti näytteenoton jälkeen, ja rinnakkainen määrittäminen tehtiin välittömästi nollanäytteen määrittämisen jälkeen.

Erotukset nollanäytteen ja rinnakkaisnäytteen välillä vaihtelivat. Joissakin tuloksissa erotus oli lähellä $0 \mu\text{mol/l}$, mutta jotkin erotukset ylittivät $10 \mu\text{mol/l}$, mikä tarkoittaa suurta eroa nollanäytteen ja rinnakkaisnäytteen välillä.

Variaatiokerroin kaikkien näytteiden kohdalla oli 16 %, mikä ei riitä täyttämään HUSLABin laatutavoitteita sarjan sisäisen toistettavuuden suhteen. Yli $50 \mu\text{mol/l}$ näytteitä oli viisi kappaletta ja niistä variaatiokertoimen tulokseksi saatiin 12 %, mikä ei täytä laatukriteereitä. Alle $50 \mu\text{mol/l}$ näytteissä variaatiokertoimen tulokseksi saatiin 16 %, mikä ei myöskään täytä HUSLABin laatukriteereitä. Otanta oli alle $50 \mu\text{mol/l}$ pitoisuuksissa 33 näytettä.

Sarjojen välistä toistettavuutta mitattaessa tulee huomioida, että HUSLABin laatutavoitteiden mukaan sarjojen välinen variaatio saa olla alle $50 \mu\text{mol/l}$ ammoniumionipitoisuuksilla 8 % ja yli $50 \mu\text{mol/l}$ pitoisuuksilla 3 %. Kontrollien variaatiokertoimeksi saatiin 5 %, mikä ei yllä laatutavoitteisiin, koska kontrollien pitoisuudet olivat yli $50 \mu\text{mol/l}$. Sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden kokonaisvariaatioksi saatiin 9 %. Tulokset ovat esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Sarjojen välisen toistettavuuden tulokset

	Kontrolli ($\mu\text{mol/l}$)
24.helmi	77
27.helmi	70
28.helmi	68
29.helmi	72
24.helmi	70
27.helmi	72
28.helmi	73
29.helmi	65
Keskiarvo	70,9
Keskihajonta	3,6
CV%	5

6.3 Laboratorioprosessin vaikutus ammonium-ionipitoisuuksiin

Näytteiden laboratorioprosessiaikojen tutkimiseen kuuluvia näytteitä oli yhteensä 36 kappaletta. Osa näytteistä oli analysoitu yli tunnin kuluttua näytteenotosta, mikä ylittää HUSLABin suositukset. Prosessiajat olivat eräiden näytteiden kohdalla kaksinkertaisia joidenkin muiden näytteiden aikoihin verrattuna.

Prosessiaikojen tuloksia on käsitelty potilaskohtaisesti taulukoissa 8-11, joihin on huomioitu analysaattorissa näytteen analysointiin kuluva aika. Jos kyseinen aika otetaan huomioon, jokaisen tuloksen kohdalla pitää vähentää yhteensä 10 minuuttia, koska analysaattorin pipetoidessa näytteen, tuloksen saamiseen menee noin 10 minuuttia. Tässä vaiheessa ei ammonium-ionipitoisuuden pitäisi enää muuttua. (Mäki 2012.) Kaikki paitsi viisi näytettä oli analysoitu alle tunnissa. Yksi näyte ylitti suositusajan minuutilla, kaksi muuta näytettä ylitti ajan viidellä ja kuudella minuutilla. Kahden muun näytteen suositusajan ylitykset olivat kymmenen ja 14 minuuttia.

Laboratorioprosessin aikaseuranta kaikille näytteille on esitelty minuutin tarkkuudella ja jaoteltu näytteenoton kellonaikaan ja näytteen vastauksen kellonaikaan. Tuloksen vastaamiseen kulunut aika on selvitetty laskemalla näytteen vastaamisajan ja näytteenottoajan erotus. 1-9 näytenuumerot kertovat, minkä vaiheen näytteestä on kyse.

- 1= Lepovaiheen verinäyte
- 2= Kevyen rasituksen verinäyte
- 3= Maksimirasituksen verinäyte
- 4= 2 min rasituksen jälkeen verinäyte
- 5= 4 min rasituksen jälkeen verinäyte
- 6= 6 min rasituksen jälkeen verinäyte
- 7= 10 min rasituksen jälkeen verinäyte
- 8= 20 min rasituksen jälkeen verinäyte
- 9= 30 min rasituksen jälkeen verinäyte

Prosessiaikoja tarkasteltaessa taulukossa 8 huomataan, että näytteet on aikaisintaan saatu analysoidua 30 minuutissa. Pisin prosessiaika on 56 minuuttia. Keskimäärin aikaa on mennyt 42 minuuttia. Potilas 1:n kaikki näytteet on analysoitu alle 60 minuutissa. 30 minuutissa on tehty ne näytteet, jotka saadaan vietyä analysoitavaksi heti. Pidemmät prosessiajat ovat näytteillä, joita otetaan rasituksen jälkeen, tai kevyen rasituksen vaiheessa.

Taulukko 8. Potilas 1:sen prosessiajat.

Potilas 1	Näyte otettu	Näyte vastattu	Prosessiaika
1	8:58	9:38	0:30
2	9:09	10:15	0:56
3	9:16	10:15	0:49
4	9:18	10:15	0:47
5	9:20	10:15	0:45
6	9:22	10:22	0:50
7	9:27	10:15	0:38
8	9:36	10:27	0:41
9	9:47	10:27	0:30

Taulukon 9 potilaan 2 prosessiajat ovat edellisen potilaaseen nähden hieman korkeampia. Yksi näyte ylittää 60 minuutin suositusajan yhdellä minuutilla. Näyte kolme alittaa suositusajan vain kolmella minuutilla. Nopein prosessiaika on näytteellä yhdeksän (35 minuutissa). Prosessiaika oli keskimäärin 45 minuuttia, mikä on lähellä potilas 1:n keskiarvoa. Näytteen kuusi aika on pienempi, kuin sitä ennen otettujen näytteiden prosessiajat.

Taulukko 9. Potilas 2:sen prosessiajat.

Potilas 2	Näyte otettu	Näyte vastattu	Prosessiaika
1	9:07	10:01	0:44
2	9:17	10:28	1:01
3	9:31	10:28	0:57
4	9:35	10:28	0:43
5	9:37	10:28	0:41
6	9:39	10:28	0:39
7	9:43	10:28	0:45
8	9:52	10:47	0:45
9	10:02	10:47	0:35

Taulukon 10 yksi näyte ylittää suositusajan viidellä minuutilla. Kaksi näytettä alittaa suositusajan alle kymmenellä minuutilla. Prosessiajan keskiarvo on 47 minuuttia, mikä on hyvin lähellä edellisen potilaan keskiarvoa. Lyhyin prosessiaika on näytteellä kahdeksan (34 minuuttia).

Taulukko 10. Potilas 3:sen prosessiajat.

Potilas 3	Näyte otettu	Näyte vastattu	Prosessiaika
1	10:55	11:50	0:45
2	11:05	12:20	1:05
3	11:16	12:20	0:54
4	11:19	12:20	0:51
5	11:20	12:20	0:50
6	11:22	12:20	0:48
7	11:27	12:20	0:43
8	11:36	12:20	0:34
9	11:46	12:34	0:38

Taulukon 11 potilas 4:n prosessiajat ovat keskimäärin kaikkein korkeimmat (50 minuuttia) muiden potilaiden keskiarvoihin nähden. Potilas 4:n tuloksista kolme ylitti 60 minuutin ajan. Tulokset ylittyivät kuudella minuutilla, 10 minuutilla ja 14 minuutilla. Pienin prosessiaika kaikkien potilaiden näytteistä oli potilas 4:n ensimmäisenä otetulla näytteellä. Näytteet 3 ja 5 jäävät hieman alle 60 minuutin. Ensimmäisen näytteen prosessiaika on yli puolet lyhyempi kuin toisena otetun näytteen prosessiaika.

Taulukko 11. Potilas 4:sen prosessiajat.

Potilas 4	Näyte otettu	Näyte vastattu	Prosessiaika
1	10:41	11:14	0:23
2	10:49	12:05	1:06
3	10:56	12:05	0:59
4	10:58	12:22	1:14
5	11:00	12:05	0:55
6	11:02	12:22	1:10
7	11:07	11:52	0:35
8	11:16	11:52	0:26
9	11:27	12:22	0:45

Näytteet (n=8), joita seurattiin vaihe vaiheelta koko laboratorioprosessin läpi, on esitelty taulukossa 12. Taulukosta nähdään esimerkiksi potilas 1 ensimmäisen näytteen kohdalla, että näyte on saapunut lajitteluun kolmen minuutin kuluttua näytteenotosta, sitten se on seisonut lajittelun pöydällä neljä minuuttia ennen sentrifugiin laittoa, tämän jälkeen se on otettu 10 minuutin kuluttua pois sentrifugista, ja kuljetettu nopeasti yhden minuutin aikana analysaattoriin. Taulukkoon on myös laskettu eri käsittelyaikojen keskimääräiset ajat ja keskihajonnat.

Taulukko 12. Laboratorioprosessin seuranta vaihe vaiheelta.

Näytteet	Lajittelu (min)	Sentrifugiin (min)	Fuugattu (min)	Analysaattorille (min)
Potilas 1 (näyte 1)	3	4	10	1
Potilas 2 (näyte 1)	3	10	11	3
Potilas 3 (näyte 1)	9	1	10	5
Potilas 4 (näyte 1)	4	1	12	1
Potilas 1 (näyte 9)	4	5	11	8
Potilas 2 (näyte 9)	5	3	13	13
Potilas 3 (näyte 9)	4	4	11	2
Potilas 4 (näyte 9)	4	1	>40	?
Keskiarvo	4,5	3,6	14,8	4,7
Keskihajonta	1,9	3	10,3	4,4

Kaikki tarkempaan seurantaan valitut näytteet kulkivat laboratorioprosessin läpi suositusaikojen sisällä (ks. luku 6.3). Taulukon 12 tulokset on esitelty minuuttien muodossa. Esimerkiksi potilaan 1 näytteen 1 kohdalla näyte on tuotu lajitteluun 3 minuutin kuluessa näytteenotosta, laitettu sentrifugiin 4 minuutin kuluttua lajitteluun tuomisesta, otettu sentrifugista 10 minuutin kuluttua, ja viety analysaattoriin minuutin kuluessa sentrifugista poistamisen jälkeen. Ammonium-ioninäyte tulisi sentrifugoida 15 minuutissa (Uotila 2006: 110). Tuloksia tarkasteltaessa nähdään, että kaikki seuratut näytteet oli sentrifugoitu suositusajan sisällä.

Keskiarvojen mukaan eri näytteiden käsittelyvaiheiden ajat olivat jokaisen laboratorioprosessin vaiheessa pieniä ja lisäksi yksittäiset suuremmat tulokset nostavat taulukossa keskiarvoja ja –hajontoja. Nähdään että kaikki seuratut näytteet on tuotu lajitteluun alle kymmenessä minuutissa näytteenotosta. Lajittelussa näytteet on laitettu

sentrifugiin 10 minuutin kuluessa, suurin osa alle viidessä minuutissa. Sentrifugista näytteet on otettu pois alle 15 minuutissa fuugauksen (kesto 10 minuuttia) aloittamisesta, yhtä näytettä lukuun ottamatta (ks. seuraava kappale). Analysaattorille näytteet on kuljetettu pääosin viimeistään viiden minuutin kuluessa sentrifugista poistamisen jälkeen, mutta kaksi näytettä ovat kulkeneet analysaattoriin pidemmän ajan (8 ja 13 minuuttia) kuluttua.

Kiireen takia potilas 4:n näytettä yhdeksän ei ole ehditty seurata silloin, kun se on otettu pois sentrifugista ja kun se on viety analysaattorille. Tämän takia tulos on merkitty kysymysmerkillä. Kiire johtui näytteen pitkästä seisomisajasta (>40 min.) sentrifugissa, jolloin seurantatutkimuksen suorittajan oli 40 minuutin jälkeen lähdettävä auttamaan vieritestilaitteen käyttäjää klinisen fysiologian laboratorioon. Kuitenkin katsottaessa taulukosta 11 kyseisen näytteen prosessointiajan tulosta nähdään, että kyseinen näyte on analysoitu 45 minuutin kuluessa näytteenotosta, mikä on suositusaikojen puitteissa. Näyte onkin siis viety analysaattoriin pian tutkimuksen suorittajan poistuttua.

6.4 Kokoveren säilyvyystutkimus

Ohessa on esitelty taulukko 13, jossa on taulukoitu kokoveren ammoniumionisäilyvyystutkimukseen valitut näytteet ja sulkuihin on merkitty nollanäytteen mittauksen tulos. Näytteiden seisotustuloksista on lisäksi laskettu keskiarvot ja keskihajonnat. Keskiarvoja ja nollanäytteen tuloksia tarkasteltaessa nähdään, että joissakin tuloksissa keskiarvo oli lähellä nollanäytteen tulosta, mutta joidenkin näytteiden kohdilla kyseinen tulos poikkeaa hyvinkin paljon. Yksittäiset suuresti poikkeavat tulokset vaikuttavat keskiarvoihin ja –hajontoihin.

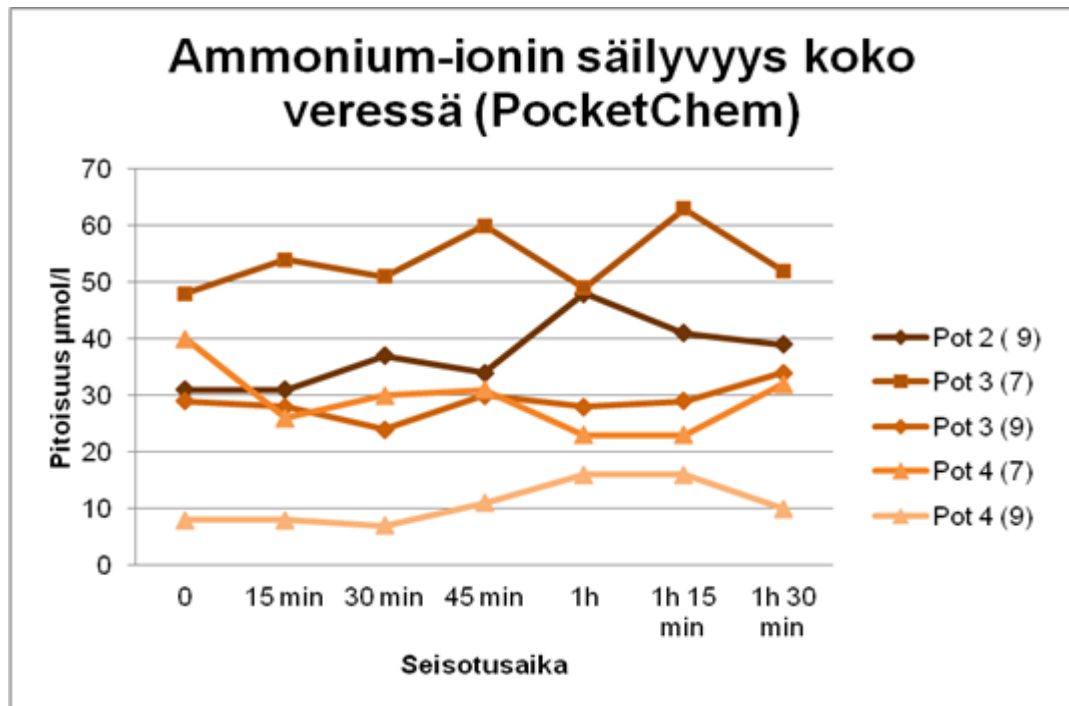
Seisotusmittausten tulokset vaihtelevat jokaisen näytteen kohdalla runsaasti nollanäytteen pitoisuuden molemmiin puolin. Potilas 3:n näytteen yhdeksän ja potilas 4:n näytteen yhdeksän pitoisuudet pysyvät tasaisimpina eri seisotusvaiheiden aikana. Potilas 4:n näytteen seitsemän seisotuspitoisuudet poikkeavat täysin nollanäytteen pitoisuudesta. Neljän näytteen tapauksessa pitoisuudet ovat yhteneviä nollanäytteiden kanssa ensimmäisten seisotusten (15 min.) kohdalla, mutta yhden näytteen (potilas 4, näyte 7) pitoisuusero on jo ensimmäisen seisotuksen kohdalla 14 $\mu\text{mol/l}$.

Taulukko 13. Säilyvyysnäytteiden tulokset ($\mu\text{mol/l}$).

Seisotus	Potilas 2 näyte9	Potilas 3 näyte7	Potilas 3 näyte 9	Potilas 4 näyte 7	Potilas 4 näyte 9
Nollanäyte	31$\mu\text{mol/l}$	48$\mu\text{mol/l}$	29$\mu\text{mol/l}$	40$\mu\text{mol/l}$	8 $\mu\text{mol/l}$
15 min	31	54	28	26	8
30 min	37	51	24	30	7
45 min	34	60	30	31	11
1h	48	49	28	23	16
1h 15 min	41	63	29	23	16
1h 30 min	39	52	34	32	10
Keskiarvo	38	55	29	28	11
Keskihajonta	6	5	3	4	4

Kuviossa 7 nähdään, näytteiden pitoisuusvaihtelut eri seisotusvaiheissa. X-akselilla oleva nolla tarkoittaa nollanäytettä. Suurimmaksi osaksi näytteiden tulokset pysyivät tasaisina aina 30 minuuttiin asti. Potilas 4:n seitsemännessä näyteputkessa tapahtui kuitenkin suuri romahdus pitoisuudessa jo 15 minuutin kohdalla. Potilas 3:n yhdeksäs näyte ja potilas 4:n yhdeksäs näyte pysyivät tasaisimpina koko seisotuksen ajan.

Suurinta vaihtelua pitoisuuksissa tapahtui potilas 2:n yhdeksännessä näytteessä ja potilas 3:n seitsemännessä näytteessä. Vaikka potilas 4:n seitsemäs näyte laskee pitoisuudeltaan todella paljon, se pysyy silti laskettuaan melko samoissa lukemissa, eivätkä tulokset vaihtelee niin paljon kuin kahdessa muussa näytteessä.



Kuvio 7. Ammonium-ionin säilyvyys kokoveressä.

7 Johtopäätökset ja tulosten luotettavuus

Vieritestilaitteen tulosten luotettavuuteen vaikuttavat useat erilaiset tekijät. Luonnollisesti liian suuri näytemäärä tai vajaa näytemäärä vaikuttavat tulosten luotettavuuteen. Lisäksi virheellisiä tuloksia voivat aiheuttaa korkea tai alhainen hematokriitti, veressä olevat proteiinit sekä antikoagulantit. Tutkimuksessa pyrimme toimimaan mahdollisimman luotettavasti, käytimme näyteputkissa suositeltua antikoagulanttia (EDTA), pipetoimme oikealla näytemäärällä (20 µmol/l) ja toimimme laitteen käyttöohjeiden mukaisesti.

Tutkimuksessa vieritestilaitteella käytettiin kapillaarien sijaan pipettiä, vaikka laitevalmistaja ohjeistaa kapillaarin käyttöön. Pipetointia käytettiin, koska näyte otettiin laskimoverinäytteenä, eikä ihopistosnäytteenä, mihin vierestilaite on tarkoitettu ensisijaisesti käytettävän. Pipetointi on myös nopeampi tapa saada näyte annosteltua ja pipetoitua näytetyynylle. Pipetoidessa veri voi levittäytyä tyynylle eri tavalla kuin kapillaaria käytettäessä, mikä voi vaikuttaa entsyymaattiseen reaktioon ja voi johtaa ammonium-ionipitoisuuden muutokseen. Emme ehtineet harjoitella laitteen käyttöä

kovinkaan hyvin ennen tutkimusnäytteiden analysointia, minkä takia virheiden mahdollisuus etenkin tutkimusten alussa on ollut suuri. Näytteitä tuli myös yhdessä rasiuksen vaiheessa kahden minuutin välein, jolloin oli kiire analysoida näytteitä, kirjata tarvittavat tiedot ylös ja esikäsitellä seuraavaa näytettä. Kiireessä tapahtuu helposti virheitä, joita ei välttämättä edes itse tule huomioitua.

Näytteen analysoinnin aloittaminen vieritestilaitteella viivästyi muutaman näytteen kohdalla, koska rinnakkaisnäytteen tekeminen oli kesken, ja näytteiden oton välillä oli rasiuksen jälkeen vain kaksi minuuttia aikaa. Etenkin säilyvyystutkimusta tehdessä saattoi seisotusaika olla pitempi, kuin oli tarkoitus. Tämä voi vaikuttaa tuloksiin, esimerkiksi antaen virheellisen korkeita tuloksia, koska ammoniakkia syntyy jatkuvasti lisää kokoverinäytteessä. Vieritestilaitteessa käytettävien liuskojen LOT-numero vaihtui myös loppuvaiheessa, mutta sen ei pitäisi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

7.1 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus

Tarkasteltaessa vieritestilaitteella määritettyjen rinnakkaisnäytteiden erotuksia, näyttäisivät rinnakkaiset tulokset silmämääräisesti suhteellisen yhteneviltä, vaikka myös hajontaa tuloksissa näkyy. Sarjan sisäisessä toistettavuudessa variaatiokerroimet kuitenkin olivat suuria (16 % ja 12 %), joten toistettavuutta ei voida pitää hyvänä. Variaatiokerroimien tulosten luotettavuutta heikentää otoksen pieni koko. Yli 50 µmol/l ylittäviä näytteitä oli tutkimuksessa vain viisi, joten saatu variaatiokerroin (12 %) ei ole kovin luotettava. Otanta oli hieman suurempi (n=33) alle 50 µmol/l näytteiden kohdalla, joten tulosten luotettavuus on hieman parempi kuin suurien tulosten kohdalla. Tulosten perusteella voidaan päätellä, että koska vieritestilaitteen sarjan sisäinen toistettavuus ei yllä HUSLABin laatuavoitteisiin, ei vieritestilaitteita ole tämän tyyppisessä kliinisessä käytössä kovin luotettava.

Vieritestilaitteen sarjojen välisen toistettavuuden variaatiokerroin ylitti myös HUSLABin laatuavoitteet. Tulee kuitenkin ottaa huomioon, että Cobas Integran kontrollit on suunniteltu plasmamenetelmää varten, minkä takia kokoverimenetelmää käyttävä vieritestilaitte ei välttämättä suoriudu kontrollien määrittämisestä yhtä tehokkaasti, kuin määrittämisestä kokoverimateriaalilla. Kontrollien ammonium-ionipitoisuus oli 40 µmol/l, mutta oli oletettavissa että vieritestilaitte ei anna eri menetelmänsä takia plasmanäytettä vastaavasta materiaalista samaa tulosta. Tulokset kontrollien kohdalla kuitenkin pysyivät tasaisesti korkeampina ja lähes samoina tutkimuspäivästä riippumatta.

7.2 Laitevertailu

Laitevertailussa vieritestilaitteen tulokset kirjattiin ylös suoraan laitteen näytöltä, mutta analysaattorin tulokset saatiin tulosteena kemistiltä. Cobas integra 400 plus -analysaattorin tulospapereita oli muokattu niin, että potilaiden henkilöllisyyttä ei voitu niistä selvittää.

Laitevertailutulosten perusteella johtopäätöksiä tehdessä, tulee huomioida kaikki vieritestilaitteen tulosten luotettavuuteen vaikuttavat osatekijät. Näitä osatekijöitä ovat analysoinnin aikana ollut kiire, näytteen ilmakontaminaatio, ja analyysin tekijöiden kokemattomuus, mikä vaikuttaa muun muassa pipetointitarkkuuteen. Tuloksiin voi myös vaikuttaa se, että toinen tekijöistä pipetoi potilas 1:n sekä potilas 3:n näytteet ja toinen tekijä pipetoi potilas 2:n sekä potilas 4:n näytteet. Toisaalta eri työntekijöiden pitäisi riittävästi perehdyttyinä pystyä tekemään vieritestilaitteella yhtä luotettavia tuloksia, ilman että luotettavuus heikentyisi.

Viimeisten näytteiden kohdalla jouduimme vaihtamaan Ammonia Test Kit II liuskoja, jolloin muuttui myös LOT-numero. Tulosten luotettavuus ei pitäisi huonontua LOT-numeron muuttuessa.

Cobas Integralle kulkeneet näytteet analysoitiin asiantuntijoiden toimesta ja lähes kaikki näytteet (viiden näytteen analysointiaika oli yli 60 min, ks. luku 6.3) analysoitiin suositusaikojen sisällä, joten vastaavia tulosten luotettavuuteen vaikuttavia osatekijöitä ei plasmanäytteiden käsittelyprosessia tarkasteltaessa löytynyt. Tietenkin on olemassa mahdollisuus että asiantuntijoillekin on käynyt virheitä työskentelyssä, mutta sellaista ei tullut ilmi tutkimuksen aikana.

Potilas 1:n ja potilas 4:n ammonium-ionipitoisuudet olivat keskimäärin matalampia kuin potilas 2:n ja 3:n, mikä luultavasti johtuu fyysisen kunnon mukaisesta rasituksen tasosta ja muista yksilöllisistä fysiologisista tekijöistä. Potilas 1:n, 2:n ja 4:n kohdilla vieritestilaitte ja analysaattori antoivat muutamien näytteiden kohdalla samat tulokset, kun taas potilas 3:n kohdalla kaikki vieritestilaitteen antamat tulokset ovat selvästi matalampia kuin Cobas Integran antamat tulokset. Tämä johtunee vieritestilaitteesta tai sen käytöstä, sillä potilas 3 jokaisen eri näytteen kohdalla tulos on tosiaan huomattavasti matalampi. On epätodennäköistä että saman potilaan jokaisella

näytteenottokerralla olisi tapahtunut jokin virhe, jonka perusteella toiseen ammonium-ioniputkeen olisi tullut suurempi pitoisuus kuin toiseen, tai että Cobas Integran kohdalla olisi ollut tuona tutkimuspäivänä jotakin käyttöongelmia, sillä niistä ei mainittu.

Vieritestilaitteella näyte joutuu pipetoinnissa ilmakontaminaatioon, mikä voisi vaikuttaa tuloksiin. Vieritestilaitteeseen myös vaatii huoneenlämpöisen näytteen, joten ammonium-ionipitoisuus ei ole välttämättä pysynyt yhtä hyvin samana, kuin mitä se oli Cobas Integralle menevissä putkissa, jotka laitettiin välittömästi jäihin. Kuvion 6 perusteella vaikuttaisi siltä, että pitoisuuksien ollessa korkeita erot tulosten välillä ovat myös suurempia kuin matalammilla pitoisuuksilla, mikä voisi johtua ammonium-ionin epästabiliilista luonteesta. Pitoisuuden ollessa näytteessä suurempi, muutoksetkin pitoisuudessa näkyisivät herkemmin.

Erotusprosentti olisi laitevertailussa saanut HUSLABin kriteerien mukaan olla vain 8 %, mutta laskiessa kaikkien tulosten perusteella erotusprosentti, saadaan tulokseksi 10 %. Erotusprosentti on lähellä 8 %, mutta yksittäisten tulosten erotusprosentteja tarkasteltaessa nähdään, että erot voivat olla hyvinkin suuria. Tämän takia voidaan päätellä, että vieritestilaitteeseen ei anna yhteneviä tuloksia Cobas Integran kanssa. Erotusten hajontaa havainnollistaa hyvin liitteessä 5 olevat kuviot, joista nähdään tulosten väliset erot, sekä miten tuloksien välinen ero on suurempi, mitä korkeimmista pitoisuuksista on kyse.

P-arvot oli laskettu erikseen jokaisen potilaan näytteille (ks. taulukko 4). Potilaiden 1 ja 2 p-arvot olivat nollahypoteesin mukaisia. Potilaiden 3 ja 4 nollahypoteesi hylättiin p-arvojen mukaisesti, ja vaihtoehtoinen hypoteesi astui voimaan. Käytännössä tässä tutkimuksessa tulosten tilastollisella merkitsevyydellä Wilcoxonin testillä laskettuna ei ole suurta merkitystä, vaan tuloksia oli mielekkäämpi tarkastella esimerkiksi CV-prosenttien ja erotusprosenttien avulla. Vaikka potilaiden 1 ja 2 tuloksilla ei olisi p-arvon perusteella laitteiden tulosten välistä tilastollisesti merkitsevää eroa, niin CV-prosentit kuitenkin kertovat, että tulosten yhteneväisyys ei tämän tutkimuksen mukaan ole riittävän hyvä kliinistä käyttöä ajatellen.

P-arvot eivät siis olleet tähän tutkimukseen sopivia, vaan enemmän tietoa vieritestilaitteen ja Cobas Integran tuloksista, saatiin variaatiokertoimien ja erotusprosenttien avulla. Variaatiokertoimien mukaan tulokset (kaikilla tuloksilla 24%, <30 µmol/l tuloksilla 27 %, ja >30 µmol/l tuloksilla 21 %) PocketChemTMBa 4430 -

vieritestilaite ei anna Cobas Integran kanssa yhteneviä tuloksia, mikä puolestaan kertoo siitä, ettei vieritestilaite ole tarpeeksi luotettava, jotta sitä voitaisiin käyttää esimerkiksi ainoana laitteena ammonium-ionin mittauksessa, vaan tarvitaan luotettavampi laite tarkempiin mittauksiin. Täytyy kuitenkin ottaa huomioon, että tutkimuksen otos (n=36) on pieni, jolloin muutamatkin suuresti toisistaan poikkeavat tulokset muuttavat CV-prosentteja ja erotusprosentteja paljon, vaikka tulosmateriaali muuten olisi keskihajonnaltaan suhteellisen homogeeninen.

7.2.1 Plasmakontrollit ja referenssi

Vieritestilaitteella mitattujen kontrollien tuloksissa tulee ottaa huomioon, että Cobas Integran kontrollit on suunniteltu plasmamenetelmää varten, minkä takia kokoverimenetelmää käyttävä vieritestilaite ei välttämättä suoriudu kontrollien määrittämisestä yhtä tehokkaasti, kuin määrittämisestä kokoverimateriaalilla. Kontrollien ammonium-ionipitoisuus oli 40 $\mu\text{mol/l}$. Oli kuitenkin oletettavissa että vieritestilaite ei anna eri menetelmänsä takia plasmanäytettä vastaavasta materiaalista samaa tulosta. Mittaussarjojen tulosten keskiarvot vieritestilaitteella olivat 67–78 $\mu\text{mol/l}$ välillä, eli tasaisesti korkeampia kuin 40 $\mu\text{mol/l}$.

Vieritestilaitteen luotettavuutta seurattiin vieritestilaitteen omalla referenssiluokalla, josta saimmekin päivittäin lähes saman tuloksen (ks. taulukko 5), joka asettui hyvin tavoitearvoihin (65–79 $\mu\text{mol/l}$), eli vieritestilaite mittasi referenssiluokat luotettavasti.

7.3 Laboratorioprosessin vaikutus ammonium-ionipitoisuuksiin

7.3.1 Prosessiajat kaikista näytteistä

Laboratorioprosessissa kahden näytteen tulosten suositusaikojen ylitykset (10 ja 14 minuuttia), voivat vaikuttaa ammonium-ionipitoisuuteen, jolloin tulos olisi epäluotettava. Minuutin, viiden tai kuuden minuutin verran suositusajan ylittäneet näytteet olivat kaikki näytteitä, jotka otetaan kevyen rasituksen vaiheessa, eli toisella näytteenottokerralla. Nämä ylitykset olivat melko pieniä, joten ne eivät välttämättä vaikuta ammonium-ioni pitoisuuteen merkittävästi. Kaksi suurinta viivettä syntyi potilas 4:n näytteille neljä ja kuusi, mitkä otetaan rasituksen jälkeen kahden minuutin välein. Potilas 4:llä oli myös eniten prosessiajan ylityksiä muihin potilasnäytteisiin verrattuna. Myös kaikkien

potilaiden kesken näytteiden prosessiajat vaihtelivat paljonkin keskenään. Ajat vaihtelivat aina noin 30 minuutista lähelle tuntiin.

Täytyy huomioida, että näytteen jäädessä kiinni esimerkiksi tuloksen viitearvojen ylityksen takia, saattaa näyte jäädä jonoon vastaamattomana, ja vasta hoitajan sen tarkistaessa ja vastatessa tulee vastausaika koneelle. Suositusajan ylittäviä näytteitä voi todellisuudessa olla siis vähemmän kuin viisi. Myös ne ajat, jotka ylittävät vain hieman 60 minuuttia, voivat olla oikeasti analysoitu alle 60 minuutissa.

Prosessiaikojen vaihtelevuus johtunee suurimmaksi osaksi siitä, että näytteitä ei voida spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimuksessa viedä heti laboratorioon analysoitavaksi, koska näytteitä otetaan toiseksi otetun näytteen jälkeen hyvin tiuhasti. Näytteitä ei ehditä välttämättä viedä sentrifugoitavaksi ennen muiden näytteiden ottamista. Näytteet odottavat aluksi kuljetusta lajitteluun/automaatiolaboratorioon, jonka jälkeen ne viedään sentrifugoitavaksi. Sentrifugoitavana voi olla muitakin näytteitä, jolloin näytteet voivat joutua seisomaan tässäkin vaiheessa. Näytteitä ei myöskään välttämättä heti sentrifugoinnin jälkeen viedä analysoitavaksi, vaan ne voivat seistä sentrifugissa, tai lajittelun pöydällä. Näytteiden ottojärjestystä ei välttämättä tarkasteta, kun ne laitetaan analysoitavaksi, jolloin myöhemmin otettu näyte meneekin analysoitavaksi ennen aikaisemmin otettua näytettä. Tällainen tilanne on voinut tapahtua esimerkiksi taulukko 7 näytteiden 7 ja 8 prosessiaikojen kohdalla. Ero ei ole kuitenkaan kovinkaan merkittävä. Kuitenkin joissakin tilanteissa näytteiden laitto analysaattoriin oikeassa järjestyksessä voisi olla tärkeää, jotta pysytään suositusajoissa.

Erot näytteiden prosessajoissa voivat johtua siitä, että lajittelussa/automaatiolaboratoriossa on ollut siinä vaiheessa kiire, kun näytteet on tuotu laboratorioon. Näytteiden tuonnin aikana on voinut olla ihmisiä tauolla, mikä voi tietenkin vaikuttaa näytteiden kulkuun laboratorioprosessissa, koska on vähemmän työntekijöitä. Viimeisenä tutkimuspäivänä sentrifugin parissa työskenteli myös perehdytettävä työntekijä, mikä saattoi vaikuttaa käsittelyaikoihin.

Kolme kappaletta suositusajan ylittävistä näytteistä (n=5) on otettu kevyen rasituksen vaiheessa. Otannan pienuuden takia on vaikea sanoa onko kyseessä sattumaa vai ei. Lisätutkimukset olisivat tarpeellisia, jos haluttaisiin selvittää onko kyseessä sattuma, ja missä vaiheessa kyseisiä viiveitä tapahtuu laboratorioprosessissa. Prosessiaikojen

ylityksen syynä voi olla se, että näytettä ei ole ehditty viedä sentrifugoitavaksi heti, vaan on jouduttu odottamaan muita näytteitä. Maksimirasituksessa otettavan näytteen ottovaihe voi tulla hyvinkin nopeasti kevyen rasituksen näytteen jälkeen, jolloin näytteitä ei välttämättä ehditä viedä lajitteluun. Näytteet saadaan tällöin vietyä aikaisintaan 10 minuutin rasituksen jälkeen, jolloin toisena otettu putki joutuu seisomaan tässä vaiheessa jo ainakin yli 10 minuuttia. Toisaalta näyte voi seistä myös, kuten edellä jo mainittiin, odottaessa sentrifugiin menoa, sentrifugoinnin jälkeen, tai jos sitä ei viedä heti analysoitavaksi.

Potilas 1:llä ei yksikään näyte ylittänyt 60 minuutin suositusaikaa. Potilas 2:n ja 3:n näytteistä vain yhdet ylittivät suositusajan. Potilas 4:n näytteistä kolme yhdeksästä ylittivät suositusajan. Potilas 4:n tuloksissa oli myös kaksi suurinta suositusajan ylittävää tulosta. Syitä tähän voi olla monia. Kyseessä voi olla pelkkä sattuma, koska otanta on niin pieni, mutta aiheuttajana voi olla mikä vain edellä mainituista viivetekijöistä tai useampi näistä. Vaikka potilasnäytteiden prosessiajat vaihtelivat melko paljon, olivat kaikkien potilaiden näytteiden prosessiaikojen kokonaiskeskiarvot lähellä toisiaan, mikä kertoo siitä, että suurimmaksi osaksi näytteet kuitenkin käsitellään keskimäärin yhtä nopeasti. Kokonaiskeskiarvojen avulla ei kuitenkaan voida havaita näytteitä, jotka ylittävät suositusajan, koska otannassa on myös hyvin pieniä aikoja. Prosessiaikojen vaihtelut on kuitenkin tärkeää ottaa huomioon ja selvittää, miksi viivästymisiä syntyy, sekä voisiko niitä jotenkin ehkäistä?

7.3.2 Laboratorioprosessin seuranta vaihe vaiheelta

Näytteitä seurattiin tarkemmin jokaisen potilaan ensimmäisen ja viimeisen näytteen kohdalla, milloin näytteet on voitu viedä heti sentrifugoitavaksi. Seurattujen näytteiden kaikki käsittelyajat olivat suhteellisen nopeita ja näytteet analysoitiin suositusaikojen puitteissa. Yhden näytteen kohdalla kiireiden takia jouduttiin jättämään seuranta kesken (potilas 4, näyte 9), eikä saatu tietää milloin näyte meni analysaattorille. Prosessiaikoja tarkasteltaessa taulukosta 11 huomataan, että näyte on vastattu kuitenkin 45 minuutissa, eli suositusaikojen sisällä. Keskiarvoja tarkasteltaessa näyttäisi siltä, että eri näytteiden käsittelyvaiheiden ajat olivat jokaisen laboratorioprosessin vaiheessa nopeita. Ammonium-ionin pitoisuus ei pitäisi suositusaikojen sisällä muuttua merkittävästi, joten ammonium-ionin tulokset ovat tässä seurannassa sen perusteella luotettavia.

Työntekijät työskentelivät jokaisessa prosessin vaiheessa asiantuntevasti ja ohjeita noudattaen. Näytteet otettiin spiroergometriassa oikeaoppisesti, ja ammonium-ioniputkia käsiteltiin ennen näytteenottoa ja sen jälkeen ohjeiden mukaisesti. Täysin luotettavasti ei voida vetää johtopäätöstä, että näytteet kulkevat viiveettä jokaisen laboratorioprosessin vaiheen läpi, tai että viivettä eri vaiheissa syntyy vain muutamia kertoja, koska otanta on tässä tutkimuksessa pieni. Myöskään ei voida tietää, onko näytteen vastaamisessa vain kestänyt pitempään, mikä olisi aiheuttanut tuloksiin kyseiset viiveet. Tarvittaisiin suurempi otanta, jotta voitaisiin sanoa varmaksi, tuleeko viiveitä, ja jos tulee, vaikuttaako se tulosten luotettavuuteen. Kun nyt tiedetään suunnilleen, milloin suurimmat prosessiajat syntyvät, voitaisiin mahdollisesti tehdä tutkimus, mikä painottaa näiden näytteiden tarkkaan seurantaan.

7.4 Kokoveren säilyvyystutkimus

Kokoveren ammonium-ionin säilyvyystutkimus tehtiin veritestilaitteella, koska laite analysoi näytteet kokoverenä, jolloin tulos saadaan nopeammin ja seisotusajat ovat tarkasti tiedossa. Cobas Integralla olisi pitänyt näytteitä aluksi seisottaa, jonka jälkeen näyte olisi sentrifugoitu ja vasta sitten viety analysoitavaksi. Sentrifugointi kestää 10 minuuttia ja analysaattorille vieni vie myös hieman aikaa. Analysaattorilla voi olla myös muiden näytteiden ajo kesken, milloin näyte joutuisi seisomaan kauemmin. Nämä asiat voisivat vaikuttaa ammonium-ionipitoisuuteen, joten ajateltiin, että vieritestilaitteella saataisiin tulos luotettavammin.

Yhdelle seisotusnäytteelle oli varattu yksi Eppendorf-putki, eli jokaiselle seisotusvaiheelle ei ollut omaa putkea. Tämä on kuitenkin suuri luotettavuuteen vaikuttava tekijä, jota ei valitettavasti tiukan aikataulun aikana ehditty tarkemmin ottaa huomioon. Yhden Eppendorf-putken korkkia jouduttiin avaamaan monta kertaa (ilmakontaminaatio), pipetoimaan useasti, ja putken lämpötilaa muuttamaan, mitkä varmasti ovat vaikuttaneet jo muutenkin epästabiliin ammonium-ionin pitoisuuksiin. Luotettavuuteen vaikuttivat myös vieritestilaitteen sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistettavuudesta saadut tulokset, mitkä eivät tutkimuksen mukaan täyttäneet HUSLABin laatutavoitteita. Nämä molemmat virhelähteet yhdessä aiheuttavat sen, että tulokset ovat hyvinkin epäluotettavia eikä voida sanoa luotettavasti säilyvätkö näytteet kokoverenä pidempään kuin 15 minuuttia.

Kokoveren säilyvyytutkimuksen tulokset ovat nähtävissä taulukossa 13 ja seisotusnäytteiden muutos nollanäytteeseen verrattuna on eroteltu liitteessä 2. Täytyy kuitenkin huomioida, että tulokset eivät ole luotettavia. Luotettavuuden parantamiseen olisi auttanut toisenlainen tutkimusasetelma ja esitutkimus, sekä runsaampi harjoittelu, mutta kiireen takia näin ei valitettavasti toimittu.

Tulosten vaihtelussa tulee myös muistaa ottaa huomioon, että ammonium-ioni on itsessään hyvinkin epästabiili, jopa eroteltuna. Se kaasuuntuu helposti, jolloin putkea avattaessa ammoniakkia "pakenee" ilmaan, ja toisaalta kokoveressä tapahtuu jatkuvasti deaminaatiota, mikä lisää ammonium-ionipitoisuutta näytteessä (Piirilä 2012; Uotila 2006: 110). Tulosten erot voivat johtua myös siitä, että vieritestilaitteen mittaustarkkuus voi olla puutteellinen sen heikon sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden takia.

Näytteiden pitoisuudet ovat yleensä yhteneviä niiden nollanäytteiden kanssa ensimmäisten seisotusten (15 min.) kohdalla, mutta sitten näytteiden tuloksilla esiintyy pitoisuusvaihteluita. Osa seisotusmittauksista oli kuitenkin jopa tunnin jälkeen lähellä nollanäytteen tulosta. Pitoisuusvaihtelut voivat johtua edellä mainituista näytteiden vääränlaisista käsittelyistä, tai vieritestilaitteen sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistettavuudesta. Tietenkin myös molemmat tekijät voivat vaikuttaa tuloksiin, jonka takia tämän tutkimuksen perusteella ei voida arvioida säilyvyyttä.

Korkeiden pitoisuuksien kohdalla oli tässä otannassa selvästi enemmän vaihtelua tulosten kohdalla, kuin matalissa pitoisuuksissa. Valitettavasti matalia pitoisuuksia oli tässä säilyvyytutkimuksessa kuitenkin vain kahdessa potilasnäytteessä, ja otanta muutenkin pieni (n=5). Ei siis juurikaan voida päätellä, ovatko matalat ammonium-ionipitoisuudet stabiilimpia kokoveressä kuin suuret pitoisuudet. Asiaa tulisi tutkia tarkemmin, jotta voitaisiin varmistaa oliko asialla yhteyttä, ja jos oli, niin mistä kyseinen asia johtuu.

Säilyvyyttä olisi hyvä tutkia myös niin, että näyte olisi stabiilimmassa tilassa koko tutkimuksen ajan. Yhdestä putkesta tulisi tällöin esimerkiksi pipetoida näytettä vain kerran, jotta näytteeseen ei tulisi mahdollisesti ilmasta ammoniakkia, eikä ammonium-ioni kaasuuntuisi, jolloin näyteputken avaaminen saattaa haihduttaa ammonium-ioni huoneilmaan. Huoneenlämpöisessä kokoveressä tapahtuu ammonium-ionin deaminaatiota herkemmin kuin kylmässä, jolloin pitoisuus saattaa muuttua, kun

näytettä lämmitetään. (Uotila 2006: 110). Jos putkia olisi jokaiselle seisotusajalle omansa, näytettä ei tarvitsisi ottaa pois jäistä ja lämmittää useampaan kertaan eikä näytteen putkea tarvitsisi avalla. Olosuhteiden stabiloiminen olisi siis ensiarvoisen tärkeää, jos ammonium-ionin säilyvyyttä halutaan tutkia tarkemmin. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan vain sanoa, että ammonium-ioni on liian epästabili tällä tavoin toteutetun tutkimuksen suorittamiseen. Tutkimuksen virhetekijöiden ja vieritestilaitteen heikon sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden takia tuloksia ei voida pitää luotettavina.

8 Pohdinta

Opinnäytetyössä toteutettiin laitevertailu PocketChemTMBa 4430 -vieritestilaitteen ja Cobas Integra 400 plus -analysointilaitteen välillä. Laitevertailussa laitteiden tulosten väliseksi erotusprosentiksi saatiin 10 %. HUSLABin ohjeistuksen mukaan erotusprosentti on liian suuri kliinistä käyttöä ajatellen, jotta vierestilaite olisi tarpeeksi luotettava. Erotusprosentin pitäisi olla 8 % tai alle, jonka se tässä laitevertailussa kuitenkin ylittää, eli laitteiden tulosten välillä oli selkeä tasoero. Tulokset erosivat toisistaan pääosin sitä enemmän, mitä suurempi ammonium-ionin pitoisuus oli. Tulokset olivat lähempänä toisiaan, kun ammonium-ionipitoisuudet olivat matalia. Opinnäytetyömme otos oli kuitenkin pieni ja tutkimukseen liittyi monia mahdollisesti tulosten luotettavuuteen vaikuttavia osatekijöitä, joten erilaisella järjestelyllä ja valmistautumisella tasoero olisi voinut olla matalampi. Eri tutkimuskohteisiin liittyviä tulosten luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä on käsitelty tarkemmin luvussa 7.

Seurasimme kahdeksaa näytettä vaihe vaiheelta laboratorioprosessissa, ja ainoastaan yhden näytteen kohdalla näyte seiso sentrifugoituna pöydällä pidemmän aikaa (>40 min.). Näyte analysoitiin silti suositusajan sisällä, joten pidemmän seisomisen ei pitäisi vaikuttaa ammonium-ioni näytteen tulokseen, sillä näyte oli seisomisvaiheessa jo sentrifugoitu. Laboratorioprosessissa ei näiden kahdeksan tarkemmin seurattua näytteen kohdalla tapahtunut käsittelyvirheitä tai viiveitä, jotka olisivat vaikuttaneet negatiivisesti tulosten luotettavuuteen, ja kaikki kahdeksan näytettä analysoitiin suositusajan mukaisesti.

Suurin osa kaikista laboratorioprosessitutkimuksen näytteistä (n=36) kulki laboratorioprosessin läpi suositusajan (60 min.) sisällä. Viiden näytteen kohdalla

suositusaika ylittyi. Enimmillään tämä ylitysaika oli 14 minuuttia, mikä on saattanut vaikuttaa ammonium-ionipitoisuuteen. Suurimmalta osin tässä otoksessa näytteet analysoitiin kuitenkin suositusaikojen sisällä, mikä viittaisi siihen että laboratorioprosessi sujuisi yleisesti ottaen suositusaikojen mukaan, eikä siten vaikuttaisi merkittävästi tuloksiin ja heikentäisi tulosten luotettavuutta.

Kliinisen fysiologian laboratorion toivomana laboratorioprosessin tutkimusasetelmana olisi ollut käyttää PocketChem™Ba 4430 -vieritestilaitetta mittaamaan ammonium-ionipitoisuuden lähtötilanne heti näytteenoton jälkeen, ja sen jälkeen tarkastella muuttuuko pitoisuus näytteessä, joka kulkee laboratorioprosessin läpi Cobas Integra 400 plus -analysaattorille.

Tutkimustuloksistamme kuitenkin nähdään, että PocketChem™Ba 4430 -vierestilaite ei ole sarjan sisäiseltä toistettavuudeltaan eikä sarjojen väliseltä toistettavuudeltaan tarpeeksi luotettava, jotta sen antamia tuloksia voitaisiin mielekkäästi tulkita tällä tavoin. Variaatiokerrointa laskiessa saimme sarjan sisäisen toistettavuuden variaatiokerroimeksi kaikkien vieritestilaitteen rinnakkaisten näytteiden kohdalle 16 %, mikä ei riitä täyttämään HUSLABin laatutavoitteita. Sarjojen välisen toistettavuuden variaatiokerroin oli 5 %, mikä ei myöskään täytä HUSLABin laatutavoitteita, koska vieritestilaitteen tulokset olivat yli 50 µmol/l ja prosentiarvo oli liian suuri. Tämän takia alkuperäisen tutkimuskysymyksen selvittämiseksi käytettiin muita keinoja, eli prosessiaikojen seuranta tarkemmalla otoksella ja kaikkien näytteiden prosessiaikojen selvittämistä.

Vieritestilaitteella tehtiin myös säilyvyystutkimusta, jolla selvitettiin kuinka ammonium-ioninäyte säilyy kokoverinäytteessä. Viiden näytteen tutkimustuloksiksi saatiin, että ammonium-ionipitoisuus säilyisi kokoveressä suunnilleen samalla tasolla, vaikka näytettä ei sentrifugoitaisi 15 minuutissa. Pitoisuus säilyi lähes samana neljän näytteen kohdalla ainakin 30 minuuttiin asti. Säilyvyystutkimuksen luotettavuutta kuitenkin heikentää se, että vieritestilaitteen suhteellisen heikon sarjan sisäisen ja sarjojen välisen toistettavuuden takia näytteiden tulosten välillä on voinut olla suurta hajontaa, ja tulokset ovat saattaneet tästä syystä heitellä. Lisäksi säilyvyystutkimuksessa oli monia virhelähteitä, joita on käsitelty luvussa 7.4. Näiden tekijöiden perusteella kokoveren säilyvyystutkimuksen tuloksista ei voida vetää luotettavia johtopäätöksiä.

Tutkimuksemme ei aiheuttanut vapaaehtoisille verrokeille ylimääräisiä toimenpiteitä, koska tutkittavat ammonium-ioninäytteet otettiin samalla kertaa kuin kaikki muutkin näytteet. Työssä kuitenkin piti ottaa huomioon verrokkien yksityisyysuoja, ja tämän takia heidän nimiään, henkilötunnuksiaan tai mitään muitakaan tietoja mistä heidät voitaisiin mahdollisesti tunnistaa kirjattu ylös missään vaiheessa tutkimusta. Verrokeista käytettiin nimityksiä potilas 1, potilas 2, potilas 3 ja potilas 4. Putkissa oli viivakooditarrat, joissa oli verrokkien tietoja, mutta putket hävitettiin päivän loputtua tietosuojattuun biojätteeseen. Putket oli eroteltu numeroilla 1-9, mitkä kertovat näytteenottojärjestyksen ja missä vaiheessa näyte on otettu. Näytteitä käsiteltiin koko tutkimuksen ajan luottamuksellisesti ja kunnioittavasti. Yksityisyysuoja koskee verrokkien lisäksi myös työelämän tietoja, joita ei saa luovuttaa eteenpäin. Selvitimme ensin työelämältä, mitä lähteitä voimme käyttää työssämme ja mitkä asiat ovat salassa pidettäviä.

Pyrimme opinnäytetyössämme tuottamaan mahdollisimman luotettavia tuloksia, jotka palvelisivat mahdollisimman hyvin työelämää. Vakioimme laitteen aina ennen oikeiden näytteiden analysointia, ja sovimme, miten suoritamme eri vaiheet, jotta jokainen vaihe olisi suoritettu samalla tavalla kuin aikaisemmat. Tutkimuksen aikana emme esimerkiksi vaihtaneet kertaakaan pipettiä toiseen, ja käytimme saman LOT-numeron omaavia välineitä, jotta välttyttäisiin sitä kautta aiheuttamasta virheellisiä tuloksia. Vieritestilaitte puhdistettiin ohjeiden mukaan aina päivittäin viimeisen näytteen analysoinnin jälkeen. Vieritestilaitteen käytön harjoittelu jäi kuitenkin melko vähäiseksi, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa saatuihin tuloksiin.

Sen, että meitä oli kaksi suorittamassa tutkimusta, ei pitäisi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen merkittävästi, sillä työelämässäkkin usean eri työntekijän tulee voida käyttää vieritestilaitetta. Kuitenkin se, että meille molemmille vieritestilaitte oli ennalta tuntematon, on voinut vaikuttaa muun muassa pipetointitarkkuuteen. Lisäksi tutkimustilanteessa ollut kiire on voinut vaikuttaa työskentelyn tarkkuuteen. Jos vieritestilaitetta haluttaisiin käyttää spiroergometria tutkimuksessa ammonium-ionimäärityksiin, ei vastaavaa kiirettä analysoinnissa kuitenkaan välttämättä olisi, sillä silloin ei tarvitsisi tehdä rinnakkaisia näyteanalysointeja. Tällöin kuitenkin tarvittaisiin yksi ylimääräinen hoitaja analysoimaan näytteet vieritestilaitteella. Vieritestilaitte on kokemuksemme mukaan kuitenkin suhteellisen helppokäyttöinen, joten perehdytys laitteen käyttöön olisi nopeaa.

Jokaiseen otantatutkimukseen sisältyy virhemahdollisuus, jonka riski on sitä suurempi, mitä pienempi otos on kyseessä. Tämän takia otoskoko pyritään saada mahdollisimman suureksi, mutta suuren otoksen poimimisen esteenä ovat usein esimerkiksi aika, hallittavuus ja kustannukset. (Holopainen – Pulkkinen 2008: 38.) Opinnäytetyömme tutkimusotanta olisi voinut olla suurempi, jolloin tulokset olisivat olleet myös luotettavampia. Spiroergometria laktaattinäyttein –tutkimus on kuitenkin harvinainen, joten on vaikeaa kerätä suurta tulosmateriaalia.

Jatkotutkimusehdotuksena vieritestilaitteeseen liittyen olisi hyvä testata onko tuloksilla eroavaisuutta, mikäli ammonium-ioninäyte otetaan joko pipetillä tai kapillaarilla. Vieritestilaitteen testiliuskojen mukana tuli kapillaareja, joita tutkimuksessa voisi käyttää. Samalla voisi myös tutkia onko tuloksilla eroa luotettavuuden kannalta, jos näytteet otetaan ihopistosnäytteenä kapillaarilla tai jos näyte otetaan verinäyteputkeen laskimoverikokeena. Vieritestilaitteen sisäistä toistettavuutta voisi myös tutkia suuremmalla näytemäärällä. Lisäksi ammonium-ionin säilyvyyttä kokoveressä voisi tutkia suuremmalla näytemäärällä.

Laboratorioprosessiin liittyen tutkimuksia voisi jatkaa niin, että ammonium-ioninäytteitä otetaan kerralla useampi, joista yksi menee normaalisti laboratorioprosessin läpi, toinen näyte kulkisi analysointiin niin nopeasti kuin mahdollista (esimerkiksi opinnäytetyöntekijän toimesta) ja loppujen näytteiden kohdalla näytteet seisoisivat tarkoituksella yli suositusaikojen. Näin saataisiin luotettavampaa tietoa, miten laboratorioprosessissa tapahtuvat viiveet voivat vaikuttaa näytteen tulosten luotettavuuteen. Kaikki näytteet siis analysoidaisiin samalla analysaattorilla. Tutkimusehdotuksena on myös selvittää, kuinka eri tekijät vaikuttavat näytteen ammonium-ionipitoisuuteen. Tutkimus voidaan suorittaa esimerkiksi tekemällä sarjoja selkeästi ilmakontaminoiduilla tai väärässä lämpötilassa säilytetyillä näytteillä.

Lähteet

Amonihappojen hapetus 2006. Oppimateriaali. Suomen virtuaaliyliopisto.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/aminohappojen_hapetus/2/> Luettu 2.10.2012.

ARKRAY 2003. AMMONIA TEST KIT II™ Test for Blood Ammonia Level.
Pakkausseloste. Tarkastettu 2009.

ARKRAY. PocketChem™BA4140. Laite-esittelyn esite.

Bjålie, Jan G. – Haug, Egil – Sand, Olav – Sjaastad, Oystein V. – Toverud, Kari C.
2008. Ihminen. Fysiologia ja anatomia. 1.-5. painos. Mannila, Kari – Oikarinen, Leena
(suom.). Helsinki: WSOY.

COBAS INTEGRA 400/800 2011. Ammonia. Menetelmäseloste. Versio 7. Roche.

Epäorgaaniset yhdisteet. Ammoniakki 2012. Kemikaali ohjeistus. Valvira. Sosiaali- ja
terveysalan lupa- ja valvontavirasto. Verkkodokumentti.
<[http://www.valvira.fi/ohjaus_ja_valvonta/terveydensuojelu/asumisterveys/kemikaalit/e
paorgaaniset_yhdisteet](http://www.valvira.fi/ohjaus_ja_valvonta/terveydensuojelu/asumisterveys/kemikaalit/e
paorgaaniset_yhdisteet)>. Luettu 9.10.2012.

Haapalahti, Petri 2012. Spiroergometria. HUSLAB Menetelmäohje.

Hiltunen, Erkki – Holmberg, Peter – Jyväskylä, Erkki – Kaikkonen, Matti – Lindblom-
Yläne, Sari – Nienstedt, Walter – Wähälä, Kristiina (toim.) 2009. Galenos. Johdanto
lääketieteen opintoihin 1. painos. Helsinki: WSOY.

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

Honkala, Helena – Mäki, Annukka – Piirilä, Päivi – Tukkiniemi, Hilikka 2012. HYKS,
kliinisen fysiologian laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 31.1.

Honkala, Helena 2011. Kliininen rasisuskoe, spiroergometria. HUSLAB Työohje.

Ihalainen, Jarkko – Koskela, Markku – Metso, Tuula – Puhkainen, Eino – Pulkki, Kari –
Seppälä, Erkki – Siloaho Maritta – Voipio-Pulkki, Liisa-Maria, 2002. Suositus
vieritestauksesta terveydenhuollossa. Moodi 26 (5). 161–169.

Ilanne-Parrikka, Pirjo – Joutsu-Korhonen, Lotta – Jylhä, Anneli – Lassila, Riitta – Linko-
Parvonen, Anna-Maria – Linko, Linnéa – Linko, Solveig – Meneses, Ennamaria –
Muukkonen, leila – Nissinen, Antti – Nokelainen, Satu – Porkkala-Sarataho, Elina –
Puhakainen, Eino – Savolainen, Eeva-Riitta – Siitonen, Anja – Suni, Jukka – Vuento,
Risto – Åkerman, Kari 2009. Vieritestaus terveydenhuollossa. Moodi 33 (6). 275–276.

Julkunen, Heikki – Konttinen, Yrjö T. 2010. Kihdin muuttuva kuva. Lääketieteellinen
Aikauskirja Duodecim 126 (12). 1477–85.

Kivelä, Tero – Haarala, Risto – Marianne Jansson – Kontula, Kimmo – Maamies, Sari – Saano, Veijo – Teppo, Lyly 2002. Nienstedt, Walter – Pirttimaa, Hannele (toim.). Lääketieteen termit. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Koolman, Jan – Roehm, Klaus-Heinrich 2005. Color atlas of biochemistry. Robertson, Michael (suom.). 2. painos. Stuggart:Thieme.

Kouri, Timo 2008. Vieritutkimukset – tehokkuutta vai tuhlausta?. Pääkirjoitus. Suomen lääkärilehti 63 (4). 259.

Liikanen, Eeva 2006. Vieritestien käyttö ja sen kehittäminen. Moodi 30 (3). 147–149.

Lindholm, B. 2011. Kliininen rasisuskoe, spiroergometria laktaattinäyttein. HUSLAB työohje.

Lowenstein, J. M. 1972. Ammonia Production in Muscle and Other Tissues: the Purine Nucleotide Cycle. Physiological Reviews 52 (2). 382–413.

Löfberg, Mervi – Junes, Matti – Seppänen, Heidi – Rautakorpi, Ilkka – Paetau, Anders – Härkönen, Matti – Somer, Hannu 1993. McArden tauti. Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim 109 (19). 1676.

Mäki, Annukka 2012. Kemisti. Meilahden kliininen kemia ja hematologia. Helsinki. Konsultaatio. 28.9.

Mäntykoski R. 2010. Plasman ammonium-ioni. Menetelmäohje. (Laatinut Mäntykoski, R, tarkastanut Mäki A., hyväksynyt Aarnisalo P.).

Niemelä, Onni – Parkkila, Seppo 2010. laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.). Helsinki: kandidaattikustannus Oy.

Palolampi, Eero – Salokorpi, Teija 2004. Ureasyklin toimintahäiriöt (ASA-uria, OTC-puutos, CPS-puutos). Tiivistelmä. Rinnekoti-Säätiö. Lasten kuntoutuskoti. Helsinki. Verkkodokumentti.

<http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.rinnekoti.fi%2Fuser_data%2Fdoc%2Flastenkuntoutuskoti%2Fpienryhmat%2FUreasyklin_%2520toimintahairiot.doc&ei=bSF9UMa4CMKA4gT8llG4Bw&usq=AFQjCNFKZGMc-pNPoqKJebBVuu28YS0aeA>. Luettu 30.09.2012.

Piirilä, Päivi 2012. Yliääkäri. Kliinisen fysiologian ja isotooppilääketieteen laboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto. 12.9.

Roche 2012. COBAS® INTEGRA 400 plus. Roche. Tuote-esittely. Verkkodokumentti. <<http://www.roche-diagnostics.co.in/Products/Pages/COBASINTEGRA400plus.aspx>>. Luettu 24.10.2012.

Siloaho, Maritta – Elg, Peter – Leppänen, Esa – Loikkanen, Minna – Puukka, Raija – Ruopuro, Marja-Leena – Saarmala, Hannu 1997. Ohjeita mittausepävarmuuden arvioimiseksi ja laskemiseksi kliinisen kemian laboratoriossa. Moodi 21 (4). 196–203.

Sovijärvi, Anssi 2003. Spiroergometria. Teoksessa Sovijärvi, Anssi – Ahonen, Aapo – Hartiala, Jaakko – Länsimies, Esko – Savolainen, Sauli – Turjanmaa, Väinö (toim.): Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Tarnopolsky, Mark – Stevens, Leslie – MacDonald, Jay R. – Rodriguez, Christine – Mahoney, Douglas – Rush, Jim – Maguire, John 2002. Diagnostic utility of a modified forearm ischemic exercise test and technical issues relevant to exercise testing. *Muscle&Nerve* 27.359–366.

Tikkanen, Heikki 1997. Spiroergometria. *Moodi* 21 (1). 38–39.

Uotila, Lasse 2010a. Ammoniakkimäärityksen ulkoinen laadunarviointi. *Moodi* 34 (2). 108–111.

Uotila, Lasse 2010b. Laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.). Helsinki: kandidaattikustannus Oy.

Uotila, Lasse 2009. Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/1071.html>> Luettu 13.2.2012.

Uotila, Lasse 2006. Uusi laadunarviointikierros: Ammoniakin määrittäminen. *Moodi* 30 (2). 110–111.

Veren ammoniakkimittari 2004. PocketChem™BA PA 4130. ARKRAY. Käyttöohje.

Tulosten seuranta-aulukot

Prosessin aikaseuranta

Potilas X

ANALYSAATTORI

	Näyte otettu	Näyte tuotu laboratorioon	Näyte sentrifugoitu	Näyte viety analysaattoriin	Kommentit/huomautukset
Potilasnumero	Klo	Klo	Klo	Klo	
1 Lepo					
1 30 min jälkeen					
2 Lepo					
2 30 min jälkeen					
3 Lepo					
3 30 min jälkeen					
4 Lepo					
4 30 min jälkeen					

Näytteen analysointi vieritestilaitteella

Potilas X

Vieritestilaitemittaukset

Näyte numero	Näyte otettu Klo	Näytteen analysointi aloitettu Klo	Näyte analysoitu Klo	Näyte seisonut Klo	Tulos	Kommentit/huomautukset esim. Näyte ei tullut hyvin, hemolysoitunut
1						
1. rinnakkainen						
2						
2. rinnakkainen						
3						
3. rinnakkainen						
4						
4. rinnakkainen						

Näyte numero	Näyte otettu Klo	Näytteen analysointi aloitettu Klo	Näyte analysoit u Klo	Näyte seison ut Klo	Tulos	Kommentit/huomautukset esim. Näyte ei tullut hyvin
5						
5. Rinnakka inen						
6						
6. Rinnakka inen						
7						
7. Rinnakka inen						
8						
8. Rinnakka inen						
9						
9. Rinnakka inen						

Näytteen analysointi vieritestilaitteella
Referenssit ja kontrollit

Kontrollit ja referenssi	1. tulos	Rinnakkaistulos	Kommentit/huomautukset
Referenssi			
Kontrolli aamupäivä			
Kontrolli aamupäivä rinnakkainen			
Kontrolli iltapäivä			
Kontrolli iltapäivä rinnakkainen			

Näytteen analysointi vieritestilaitteella

Potilas X

Seisotus aika	7 tulos	Analysointi aika	9 tulos	Analysointi aika
Seisotus 15 min				
15 min rinnakkainen				
Seisotus 30 min				
30 min rinnakkainen				
Seisotus 45min				
45 min rinnakkainen				
Seisotus 1h				
1h rinnakkainen				
Seisotus 1h 15 min				
1h 15 min rinnakkainen				
Seisotus 1h 30 min				
1h 30 min rinnakkainen				

Ammonium-ioninäytteiden pitoisuusmuutokset seisotusten aikana

Tulosten yksikköinä käytetty $\mu\text{mol/l}$.

Seisotus	Potilas 2 näyte 9	Muutos nollanäytteeseen
Nollanäyte	31	-
15	31	0
30	37	-6
45	34	-3
1h	48	-17
1h 15 min	41	-10
1h 30 min	39	-8

Seisotus	Potilas 3 näyte 7	Muutos nollanäytteeseen
Nollanäyte	48	-
15	54	-6
30	51	-3
45	60	-12
1h	49	-1
1h 15 min	63	-15
1h 30 min	52	-4

Seisotus	Potilas 3 näyte 9	Muutos nollanäytteeseen
Nollanäyte	29	-
15	28	1
30	24	5
45	30	-1
1h	28	1
1h 15 min	29	0
1h 30 min	34	-5

Seisotus	Potilas 4 näyte 7	Muutos nollanäytteeseen
Nollanäyte	40	-
15	26	14
30	30	10
45	31	9
1h	23	17
1h 15 min	23	17
1h 30 min	32	8

Seisotus	Potilas 4 näyte 9	Muutos nollanäytteeseen
Nollanäyte	8	-
15	8	0
30	7	1
45	11	-3
1h	16	-8
1h 15 min	16	-8
1h 30 min	10	-2

Sarjan sisäisen toistettavuuden tuloksetTulosten yksikköinä käytetty $\mu\text{mol/l}$.

Nollanäyte	Rinnakkainen	Keskiarvo	Erotus
14	17	16	-3,0
17	14	16	3,0
23	25	24	-2,0
27	28	28	-1,0
39	41	40	-2,0
38	38	38	0,0
24	28	26	-4,0
18	23	21	-5,0
16	20	18	-4,0
28	31	30	-3,0
21	28	25	-7,0
29	23	26	6,0
18	16	17	2,0
16	15	16	1,0
15	17	16	-2,0
54	49	52	5,0
51	46	49	5,0
60	49	55	11,0
49	67	58	-18,0
63	49	56	14,0
52	58	55	-6,0
28	26	27	2,0
24	23	24	1,0
30	30	30	0,0
28	31	30	-3,0
29	32	31	-3,0
34	25	30	9,0
30	26	28	4,0
31	32	32	-1,0
23	32	28	-9,0
23	38	31	-15,0
32	30	31	2,0
8	10	9	-2,0
7	11	9	-4,0
11	12	12	-1,0
16	14	15	2,0
16	9	13	7,0
10	12	11	-2,0

Laitevertailun tulokset

Tulosten yksikköinä käytetty $\mu\text{mol/l}$.

Näyte no.	Cobas Integra	PocketChem	Keskiarvo	Erotus	Erotusprosentti
1	10	14	12	4	40
2	15	17	16	2	13
3	23	23	23	0	0
4	35	27	31	-8	23
5	46	39	43	-7	15
6	28	38	33	10	36
7	29	24	27	-5	17
8	12	18	15	6	50
9	10	16	13	6	60
1	26	28	27	2	8
2	15	20	18	5	33
3	47	34	41	-13	28
4	77	59	68	-18	23
5	78	57	68	-21	27
6	82	75	79	-7	9
7	53	53	53	0	0
8	45	45	45	0	0
9	34	31	33	-3	9
1	37	28	33	-9	24
2	33	21	27	-12	36
3	44	20	32	-24	55
4	77	53	65	-24	31
5	86	54	70	-32	37
6	74	51	63	-23	31
7	70	48	59	-22	31
8	42	31	37	-11	26
9	35	29	32	-6	17
1	17	18	18	1	6
2	19	16	18	-3	16
3	28	15	22	-13	46
4	47	33	40	-14	30
5	56	42	49	-14	25
6	37	30	34	-7	19
7	39	40	40	1	3
8	22	22	22	0	0
9	15	8	12	-7	47

Laitevertailun tulosten erotukset ($\mu\text{mol/l}$) ja erotusprosentit.

