



Hanna Komonen

# P5P-reagenssin määrän vaikutuksia ALAT-mittaukseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

19.11.2021

Tekijä	Hanna Komonen
Otsikko	P5P-reagenssin määrän vaikutuksia ALAT-mittaukseen
Sivumäärä	38 sivua + 2 liitettä
Aika	19.11.2021
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Yliopettaja Riitta Lumme Erikoistuva Kemisti Vesa-Petteri Kouri
<p>Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on pääosin maksassa esiintyvä entsyymi, jonka määrittäystä käytetään potilaan yleiskunnon sekä maksan kunnon seurannassa. Alaniiniaminotransferaasi arvo on usein koholla maksasairauksissa. ALAT-mittauksessa mitataan aktiivisen alaniiniaminotransferaasin määrää plasmasta tai seerumista. Aktivoituaikseen alaniiniaminotransferaasi tarvitsee koentsyymikseen B6-vitamiinin aktiivisen muodon, pyridoksaalifosfaatin (P5P). Potilaiden P5P-pitoisuudet vaihtelevat ja matalia arvoja esiintyy muun muassa alkoholin käyttäjillä ja munuaissairauksien yhteydessä. ALAT-tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi potilailla, joilla on matala B6-vitamiini, on kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen liitto (IFCC) suositellut P5P-reagenssin lisäämistä ALAT-määrittämiseen. Opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa P5P-reagenssin vaikutuksista ALAT-mittaukseen, analysoimalla ylijäämänäytteitä eri määrillä P5P-reagenssia.</p> <p>Opinnäytetyössä mitattiin ALAT-aktiivisuus yhteensä 95 ylijäämänäytteestä, jotka oli kerätty kevään 2021 aikana. Näytteistä mitattiin ALAT-aktiivisuus kolme kertaa eri määrillä P5P-reagenssia. ALAT-aktiivisuus määritettiin näytteistä käyttämällä eri vakiointeja. Opinnäytetyössä käytetyistä näytteistä 70:stä oli tiedossa B6-vitamiinipitoisuus. Näytteiden ALAT-mittaus suoritettiin HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa Siemensin Healthineers Atellica® Solution -analysaattoreilla. Saadut tulokset käsiteltiin käyttämällä Validation Manager -ohjelmistoa. Tuloksista laskettiin keskimääräinen tulostasero sekä laadittiin Bland-Altman- sekä Passing-Bablok-kuvaajat.</p> <p>Saaduilla tuloksilla voitiin todeta P5P-reagenssin poisjäämisellä olevan alkuperäisillä näytteillä keskimäärin -11,2 %:n vaikutus ja lisänäytteillä keskimäärin -11,9 %:n vaikutus ALAT-tulostasoon. P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistaminen nosti tulostasoa keskimääräisesti 15,9 % ja suurimmat muutokset nähtiin matalan tason (&lt;25 U/l) ALAT-näytteillä. Vakioinnin tekeminen ilman P5P-reagenssia ei vaikuttanut saatuihin tuloksiin. Tuloksia tarkasteltaessa ei havaittu selvää trendiä B6-vitamiinin vaikutuksista P5P-reagenssin käyttöön.</p> <p>P5P-reagenssin määrällä oli selkeä vaikutus ALAT-tuloksiin. Vaikutus on merkittävä, etenkin hoidon seurannassa, jos potilaan ALAT-aktiivisuus mitataan vaihtelevilla määrillä P5P-reagenssia. Koska opinnäytetyössä käytetyissä näytteissä oli mukana vain kolme matalan B6-vitamiinitason (&lt;51 nmol/l) näytettä, ei P5P-reagenssin vaikutuksen riippuvuutta B6-vitamiinitasosta voitu luotettavasti arvioida. Aiheesta olisi hyvä toteuttaa tulevaisuudessa laajempi tutkimus, jossa on mukana enemmän näytteitä, joiden B6-vitamiinitaso on alle viitearvojen.</p>	
Avainsanat	Alaniiniaminotransferaasi (ALAT), pyridoksaalifosfaatti, B6-vitamiini

Author	Hanna Komonen
Title	Effects of P5P reagent on ALT assay
Number of Pages	38 pages + 2 appendices
Date	19.11.2021
Degree	Biomedical Laboratory Scientist (Bachelor of Health Care)
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Riitta Lumme, Principal Lecturer Vesa-Petteri Kouri, Specializing Clinical Chemist
<p>Alanine aminotransferase (ALT) is an enzyme that is found in the liver. ALT assay is used to monitor overall patient health and condition of the liver. ALT level is often elevated in liver diseases such as hepatitis. ALT assay measures the amount of active ALT in plasma or serum. In order to activate ALT needs pyridoxal phosphate (P5P), an active form of vitamin B6, as a coenzyme. Patients' levels of P5P differ and low levels of P5P can occur in alcoholics and in kidney diseases. To make sure that measured ALT levels are valid, the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) recommends adding a P5P reagent to ALT assay. The aim of this thesis was to determine the effects of different amounts of P5P reagent on ALT assay.</p> <p>ALT assay was performed on 95 samples that had been collected during the spring of 2021. The samples were old patient samples that had all the requested assays performed and answered. ALT assay was performed three times for each sample using different amounts of the P5P reagent. An assay was also performed with a different calibration. Of the 95 samples, 70 had a known vitamin B6 concentration. The ALT assay was performed in the automation laboratory of HUS diagnostic Center situated in Meilahti using Siemens Healthineers Atellica® Solution analyser. The results were analysed using Validation Manager software. The program was used to calculate percent differences and to make Bland-Altman and Passing-Bablok plots.</p> <p>The results showed that absence of P5P reagent in the ALT assay led to -11,2 % lower ALT levels on the original samples and -11,9 % lower ALT levels on the extra samples. Doubling the amount of P5P reagent elevated the measured ALT levels by 15,9 %, affecting lower ALT levels (&lt;25 U/l) the most. Doing the calibration without the P5P reagent didn't affect the measured results. There were no clear trends visible while examining the effects of vitamin B6 on the use of P5P-reagent.</p> <p>Using the P5P reagent correctly has a clear effect on the measured ALT levels. The effects are significant especially if patients ALT levels were controlled using different amounts of P5P reagent. Because there were only three samples with a low vitamin B6 level (&lt;51nmol/l), it was not possible to reliably assess how the effect of P5P is dependent on patient vitamin B6 level. In the future it would be good to conduct a larger study about the subject and include more samples with low levels of vitamin B6.</p>	
Keywords	alanine aminotransferase (ALT), Pyridoxal-5'-phosphate, vitamin B6

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tausta	2
2.1	Tiedonhaku	2
2.2	Alaniiniaminotransferaasi	2
2.3	ALAT-mittauksessa käytettävä näytemateriaali ja sen säilyvyys	3
2.4	Alaniiniaminotransferaasin mittauseriaate	4
2.4.1	Mittauksessa käytettävät reagenssit	4
2.4.2	ALAT-mittauksessa tapahtuvat kemialliset reaktiot	5
2.4.3	P5P-reagenssin vaikutuksia ALAT-mittauksessa	6
3	Tarkoitus ja tavoitteet	7
4	Opinnäytetyön toteutus	8
4.1	Resurssit ja toteutuksen eteneminen	8
4.2	Aineisto	9
4.3	Näytteiden analysointi	10
4.3.1	Näytteiden esikäsittely ja reagenssien valmistus	10
4.3.2	Näytteiden ALAT-mittaus	11
4.3.3	Tulosten analysointi	12
5	Tulokset	15
5.1	P5P-reagenssin määrän vaikutukset ALAT-mittaukseen	15
5.1.1	Näytteiden ALAT-mittaus ilman P5P-reagenssia	16
5.1.2	ALAT-mittaus kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia	21
5.1.3	ALAT-mittaus ilman P5P-reagenssia tehdyllä vakioinnilla	24
5.2	B6-vitamiinitason merkitys ALAT-mittaukseen suhteutettuna P5P-reagenssin käyttöön	27
6	Pohdinta	29
6.1	Tulosten tarkastelu	29
6.1.1	P5P-reagenssin merkitys ALAT-mittauksessa	29
6.1.2	B6-vitamiinitason merkitys P5P-reagenssin käyttöön	32
6.2	Eettisyys	33
6.3	Luotettavuus	34
6.4	Kehittämisehdotukset ja ammatillinen kehittyminen	34
	Lähteet	36

## Liitteet

Liite 1. Tiedonhaku

Liite 2. Mitatut ALAT-tulokset ja ero prosentit

## Sanasto

**Absorbanssi** – ilmaisee näytteeseen absorboituvan eli imeytyvän valon määrä

**ALAT** – alaniiniaminotransferaasi, joka on maksassa esiintyvä entsyymi

**Aminohappo** – orgaaninen yhdiste, jossa on karboksyyli- ja aminoryhmä, toimii proteiinien rakennusosina

**Bland-Altman-kuvaaja** – pisteanalyysi, jossa vertaillaan mittauksien ero prosentteja analyysin pitoisuuteen näytteessä

**Entsyymi** – proteiini, joka toimii katalyyttinä elimistön bioreaktioissa

**Eroprosentti** – mittauksien välinen erotus jaettuna verrattavalla suureella

**IFCC** – Kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen liitto

**Inkubointi** – näytteen lämmittäminen tietyssä lämpötilassa

**Katalyytti** – käynnistää tai nopeuttaa eli katalysoi kemiallista reaktiota

**Koentsyymi** – orgaaninen yhdiste, joka toimii yhdessä entsyymin kanssa luoden aktiivisen entsyymin

**Kontrollointi** – tarkastellaan laitteen päivittäistä toimintaa, mittaamalla analytti näytteillä, joiden pitoisuus on tiedossa

**Korrelaatiokerroin** – kuvaa mitattujen tulosten välistä riippuvuutta

**Kvantitatiivinen** – määrällinen

**Kyvetti** – mittausastia

**LOT** – erätunniste

**Mittausalue** – laitevalmistajan määrittämät rajat, jolla analysaattori laskee tulokset luotettavasti

**nmol/l** – nanomoolia per litra

**Näyttenumero** – näytteenottotilanteessa näytteelle generoitu yksilöllinen numero

**Passing-Bablok-kuvaaja** – kuvaa kahden muuttujan välistä lineaarista riippuvuutta

**P5P** – pyridoksaalifosfaatti, joka on B6-vitamiinin aktiivinen muoto

**Reagenssi** – kemiallisessa mittauksessa käytettävä liuos tai aine, jossa on tarvittavia reaktiotuotteita

**Sentrifugointi** – veren eri komponenttien erottelu toisistaan sentrifugissa keskipakovoiman avulla

**Substraatti** – entsyymiin kiinnittyvä aine, joka muuttuu entsyymin vaikutuksesta

**U/l** – yksikköä per litra

**Vakiointi** – mittausmenetelmän säätäminen oikean tulostason saamiseksi

**VITA Laboratoriot Oy** – suomessa toimiva yksityinen laboratorioyritys

**Ylijäämänäyte** – potilasnäyte, josta on kaikki pyydetyt tutkimukset mitattu ja vastattu

# 1 Johdanto

Maksan kuntoa tarkastelevat testit, kuten alaniiniaminotransferaasin mittaaminen, ovat nykyisin yhä yleisemmin tilattuja laboratoriotestejä. Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on pääasiassa maksassa esiintyvä entsyymi, joka osallistuu kehon aineenvaihduntareaktioihin. ALAT-mittaus on yleinen kliinisen kemian tutkimus, jolla voidaan tarkkailla maksan kuntoa. Kohonnut ALAT-aktiivisuus veressä viittaa usein soluvaurioon maksassa. ALAT-arvoon veressä vaikuttavat muun muassa sukupuoli, ikä ja ylipaino. (Lala & Goyal & Bansal & Minter 2021.)

ALAT-mittauksessa mitataan alaniiniaminotransferaasin aktiivisuuden määrää plasmaa tai seerumista entsyymiaktiivisuusmäärityksellä. Aktivoituaan ALAT tarvitsee koentsyymikseen pyridoksaalifosfaatin. (Åkerman & Jokela 2010: 67–69.) Pyridoksaalifosfaatti (P5P) on yksi B6-vitamiinin aktiivisista muodoista, joka toimii koentsyyminä monissa eri entsyymaattisissa reaktioissa (Stover & Field 2015). Kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen liitto (IFCC) on suositellut P5P-reagenssin lisäämistä ALAT-mittaukseen. Näin voidaan varmistua, ettei potilaan pyridoksaalifosfaatin puute aiheuta virheellisen matalia ALAT-tuloksia. (Bergmeyer & Horder & Rej 1986.)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää ALAT-mittauksessa käytettävän P5P-reagenssin määrän vaikutuksia saatuihin ALAT-tuloksiin. Opinnäytetyössä suoritettiin ALAT-mittaus yhteensä 95 ylijäämänäytteestä, joista 70:stä oli tiedossa näytteen B6-vitamiinipitoisuus. ALAT-aktiivisuus mitattiin näytteistä käyttämällä eri vakioiteja ja eri määriä P5P-reagenssia. Näin pystyttiin luomaan kattava kuva P5P-reagenssin käytön vaikutuksista ALAT-mittaukseen. Eri vakioinneilla tarkasteltiin korjaisiko vakiointi väärästä P5P-reagenssin määrästä johtuvaa eroa tulostasoissa. Saadut tulokset analysoitiin Finbiosoftin Validation Manager -ohjelmistolla. Tuloksista tehtiin parivertailuja, joista piirrettiin Bland-Altman- sekä Passing-Bablok-kuvaajat sekä laskettiin keskimääräinen tulostaero sekä mittausten välinen korrelaatio.

Näytteiden analysointi suoritettiin HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa Siemens Healthineers Atellica® Solution -analysaattoreilla. Opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa ALAT-mittaukseen vaikuttavista tekijöistä. Opinnäytetyö toteutettiin yhdessä HUS Diagnostiikkakeskuksen kanssa.

## 2 Opinnäytetyön tausta

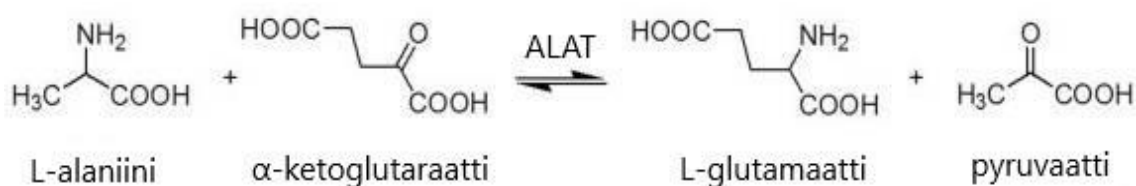
### 2.1 Tiedonhaku

Ensimmäiset tiedonhaut opinnäytetyötä varten toteutettiin käyttämällä PubMedin ja Met-Cat Finnan hakukoneita. Aineistoja haettiin hakusanoilla "vitamin B6", "alanine aminotransferase", ja "pyridoxal 5-phosphate". Saatuja tuloksia rajattiin julkaisuvuoden, kielen ja saatavuuden perusteella. Hauista saatuja tuloksia oli tuhansia rajauksienkin kanssa. Näistä tuloksista pyrittiin valitsemaan opinnäytetyön kannalta olennaiset tulokset lukemalla tulosten tiivistelmiä ja otsikkoja. Tulosten paljouden takia on kuitenkin mahdollista, että joitakin aihetta koskevia tuloksia on jäänyt huomaamatta.

Erillinen haku toteutettiin vielä Lastu Finnan hakukoneella, hakusanoilla "laboratoriolääketiede", "kliininen kemia" ja "alaniiniaminotransferaasi". Hausta saaduille tuloksille ei asetettu rajoja ja käytettävä aineisto valittiin saatujen tulosten sisällysluettelon avulla. Koska alaniiniaminotransferaasin mittausta ja P5P-reagenssin vaikutusta siihen on tutkittu 1980-luvulta alkaen, on mahdollista, että julkaisuvuoden rajaaminen vuosiin 2011–2021 on jättänyt pois aihetta koskevia tutkimuksia. Tämän vuoksi aiheesta suoritettiin vielä vapaasanahaku Googlen hakukoneella. Hakusanoina käytettiin vapaasti muotoiltuja fraaseja kuten "use of pyridoxal 5-phosphate" ja "effects of pyridoxal 5-phosphate in alanine aminotransferase". Tehdyillä hauilla haluttiin täydentää opinnäytetyön tietopohjaa, etenkin osilta, joihin ei tuntunut löytyvän edellä mainituilla hauilla toivottuja tuloksia. Opinnäytetyön tiedonhakuprosessia on kuvattu tarkemmin Liitteessä 1.

### 2.2 Alaniiniaminotransferaasi

Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) entsyymiä esiintyy erityisesti maksasolujen sytosolissa, mutta sitä esiintyy myös pieniä määriä lihaksistossa, suolistossa ja aivoissa. ALAT katalysoi aminoryhmän siirtymistä L-alaniinilta  $\alpha$ -ketoglutaraatille, lopputuotteina reaktiosta syntyy pyruvaattia ja L-glutamaattia (Kuvio 1). Tapahtuma on osa aminohappojen aineenvaihduntareaktioita. Edellä mainitussa reaktiossa tarvitaan pyridoksaalifosfaatti koentsyymiksi. (Liu & Que & Xu & Peng 2014.)



Kuvio 1. ALATin katalysoima aminohappoaineenvaihduntareaktio (Liu & Que & Xu & Peng 2014).

Alaniiniaminotransferaasi mittaus (P -ALAT) on yleinen kliinisen kemian tutkimus, jossa ALAT-aktiivisuus mitataan veren plasmasta. Testillä voidaan tarkastella maksan kuntoa ja potilaan yleistä vointia. Normaalitilanteessa ALAT-arvo on yli 17-vuotiailla naisilla alle 35 U/l ja yli 17-vuotiailla miehillä alle 50 U/l. Lapsilla (0–16 vuotta) arvo on alle 40 U/l. (HUSLAB 2021a.) Koholla oleva ALAT-arvo viittaa usein jonkin asteiseen maksavaurioon. Maksavaurion tapahtuessa maksasoluista vapautuu ALAT-entsyymiä verenkiertoon, kohottaen plasman/seerumin ALAT-arvoa. Matalat arvot ovat usein seurausta esimerkiksi ikääntymisestä. (Liu & Que & Xu & Peng 2014.)

B6-vitamiini on vesiliukoinen vitamiini, jota saadaan ravinnon kautta esimerkiksi perunoista ja pähkinöistä (Stover & Field 2015). Sen viitearvot ovat 51–183 nmol/l (HUSLAB 2021b). ALATin katalysoimassa aminohappoaineenvaihduntareaktiossa tarvittava pyridoksaalifosfaatti (P5P) on B6-vitamiinin aktiivinen muoto. Pyridoksaalifosfaatti (P5P) toimii koentsyyminä jopa 140 eri biokemiallisessa reaktiossa. Puutteellinen B6-vitamiinin, ja näin myös pyridoksaalifosfaatin, määrä voi aiheuttaa esimerkiksi mikrosyöttistä anemiamia, masennusta sekä heikentynyttä vastustuskykyä. Se voi myös aiheuttaa virheellisen matalia tuloksia ALAT-mittauksissa. B6-vitamiinin puutos voi olla seurausta munuaissairauksista, alkoholismista tai tiettyjen lääkeaineiden käytöstä. (Stover & Field 2015.)

### 2.3 ALAT-mittauksessa käytettävä näytemateriaali ja sen säilyvyys

ALAT-mittaukseen soveltuu näytemateriaaliksi seerumi tai litium-hepariini plasma (Siemens Healthineers 2019). Plasma erotellaan kokoverestä sentrifugoimalla näyteputki, jossa on ollut antikoagulanttia. Sentrifugoinnissa punasolut, valkosolut ja trombosyytit painuvat putken pohjalle ja kevyempi plasma nousee pinnalle. Plasma koostuu noin 90 % vedestä ja loput noin 10 % koostuu mm. fibrinogeenista, elektrolyyteistä, plasma proteiineista ja immunoglobuliineista. Seerumi koostuu muuten samoista aineista kuin plasma, mutta siinä ei ole fibrinogeenia. (Mathew & Sankar & Varacallo 2021.)

Näytteiden säilytys on tärkeä osa analyysiprosessia. Laittevalmistajan menetelmäperiaateohjeessa suositellaan ALAT-näytteitä säilytettävän enintään seitsemän päivää 2–8°C:ssa tai 30 päivää -20°C:ssa (Siemens Healthineers 2019). ALAT-aktiivisuuden säilymistä plasmassa ja seerumissa on tutkittu jo vuosikymmenien ajan. Vuonna 1987 toteutetussa tutkimuksessa tutkittiin seerumista ALAT-aktiivisuuden säilymistä 22°C:ssa, 4°C:ssa, -20°C:ssa ja -80 °C:ssa. Neljältätoista osallistujalta kerättiin seeruminäytteet,

joista mitattiin ALAT-aktiivisuus kolmen, kuuden, yhdeksän ja 24 tunnin välein ensimmäisenä päivänä. ALAT-aktiivisuus mitattiin myös kerran toisena, neljäntenä, kuudentena ja kahdeksantena päivänä. Osa näytteistä säilytettiin eroteltuina omaan putkeen ja osa säilytettiin verihyytymän päällä erottelemattomina. Kaikissa lämpötiloissa havaittiin ALAT-aktiivisuuden laskua ajan kuluessa. Näytteissä, joita oli säilytetty  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa, havaittiin 46 %:n ALAT-aktiivisuuden lasku kuudentena säilytyspäivänä. Saman ajan  $-80^{\circ}\text{C}$ :ssa säilytetyissä näytteissä oli ALAT-aktiivisuus laskenut 8 %. Suositeltavaa siis on, että pakastettavia näytteitä säilytetään  $-80^{\circ}\text{C}$ :ssa. (Williams & Williams & Kline & Dodd 1987.)

Vuonna 2009 julkaistussa tutkimuksessa tarkasteltiin ALAT-aktiivisuutta 25 vuotta  $-25^{\circ}\text{C}$ :ssa Janus seerumi pankissa säilytetyistä seeruminäytteistä. Tutkimuksessa todettiin 25 vuotta säilytettyjen näytteiden ALAT-aktiivisuuden laskeneen keskimäärin 73,4 % verrattuna näytteenottopäivänä mitattuun ALAT-aktiivisuuteen. Tutkimuksessa todettiin, että näytteiden pitkäaikainen säilytys voi huomattavasti vaikuttaa saatuihin tuloksiin herkempien analyyttien, kuten ALATin, kohdalla. (Gislefoss & Grimsrud & Mørkrid 2009.)

## 2.4 Alaniiniaminotransferaasin mittauseriaate

Alaniiniaminotransferaasia mitataan potilaan plasmasta entsyymiaktiivisuusmäärityksellä. Entsyymit ovat proteiineja, jotka toimivat katalyytteinä elimistön bioreaktioissa. Entsyymi reagoi aina vain tietyn rakenteen omaavan substraatin kanssa. Reaktion edellytyksenä on, että substraatti kiinnittyy entsyymiin aktiiviseen keskukseen. Jotta reaktiossa voidaan mitata entsyymien määrää, pitää substraattia olla suuri pitoisuus. Näin entsyymistä tulee reaktiota rajoittava tekijä, jota voidaan mitata. Entsyymiaktiivisuuteen vaikuttavat myös reaktioliuoksen pH, lämpötila, aktivaattorit ja inhibiittorit sekä koentsyymit. Entsyymejä mitattaessa on tärkeää, että nämä tekijät ovat huomioitu ja säädetty optimaalisiin määriin ja tasoihin. (Åkerman & Jokela 2010: 67–69.)

### 2.4.1 Mittauksessa käytettävät reagenssit

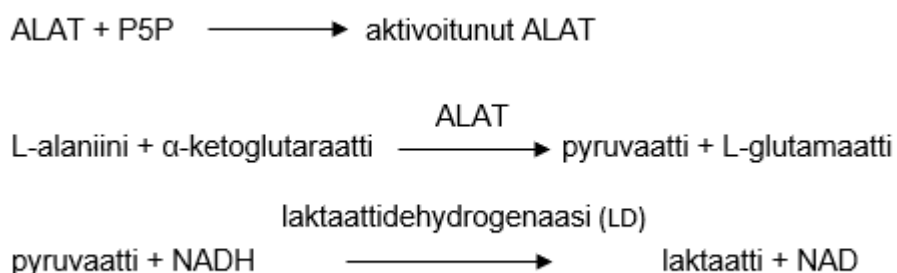
ALAT-mittauksessa käytetään kahta eri reagenssia (Atellica CH ALTPLc R1 ja Atellica CH ALTPLc R2) sekä erikseen lisättävää P5P-reagenssia (Atellica CH P5P\_L) (Siemens Healthineers 2019). Suosituksen P5P-reagenssin lisäämisestä ALAT-mittaukseen on antanut kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen liitto (IFCC). P5P-reagenssin käyttö mittauksessa lisää saatujen tulosten luotettavuutta. (Bergmeyer & Horder & Rej 1986.) IFCC on maailmanlaajuinen organisaatio, joka muun muassa asettaa globaaleja standardeja yhteistyössä muiden organisaatioiden kanssa, sekä tukee jäseniään tieteellisissä ja opetuksellisissa pyrkimyksissä. Organisaation tavoitteena on parantaa

diagnoosien tieteellistä tasoa ja laatua. (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.)

P5P-reagenssipullot tulee lisätä ALTPLc R1 -reagenssin reagenssikaivoihin ennen reagenssien lisäämistä analysaattorille. Reagenssien yhdistämisessä ensin avataan varovasti molempien pakkauksien korkit, jonka jälkeen pipetoidaan 300 mikrolitraa P5P-reagenssia ALTPLc R1 -reagenssin ensimmäiseen kaivoon. P5P-reagenssi voidaan myös kaataa kaivoon, jolloin pullon sisältö kaadetaan ravistamatta ylimääräistä reagenssia ulos pullosta. Kaivo suljetaan ja seoksen homogeenisoimiseksi ALTPLc R1 -reagenssipakkausta käännettäen varovasti. Tämän jälkeen sama prosessi toistetaan ALTPLc R1 -reagenssin toiselle reagenssikaivolle. Mittauksessa tarvittava ALTPLc R2 -reagenssi on heti käyttövalmis eikä vaadi esivalmisteluja. (Siemens Healthineers 2019.)

#### 2.4.2 ALAT-mittauksessa tapahtuvat kemialliset reaktiot

Opinnäytetyön ALAT-mittauksissa käytettävät Siemens Healthineers Atellica® Solution –analysaattorit määrittävät aktiivisen ALATin määrän näytteestä mittaamalla NADH:n (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin) absorbanssin muutoksia aineenvaihdunta-reaktioiden avulla (Kuvio 2). Absorbanssin muutoksia mitataan fotometrisesti 340/410 nm aallonpituuksilla. Reaktiossa ALATin ensin aktivoi P5P, jonka jälkeen ALAT katalysoi aminohappoaineenvaihduntareaktiota, jossa L-alaniini ja  $\alpha$ -ketoglutaraatti reagoivat. L-alaniinilta siirtyy aminoryhmä  $\alpha$ -ketoglutaraatille, jolloin lopputuotteeksi saadaan pyruvaattia ja L-glutamaattia. Pyruvaatti taas pelkistetään laktaattidehydrogenaasin (LD) katalysoimassa reaktiossa NADH:n kanssa laktaatiksi ja NAD:ksi. Joten mitä enemmän näytteessä on aktiivista ALATia, sitä enemmän pyruvaattia syntyy ja NADH:ta kuluu sen pelkistämiseen. NADH:n kulutuksen nopeus on siis suoraan verrannollinen näytteen ALAT-aktiivisuuteen. Mittauksessa käytettävillä reagensseilla varmistetaan, että reaktioiden rajoittava tekijä on ALAT. (Siemens Healthineers 2019.)



Kuvio 2. ALAT-mittauksessa tapahtuva kemiallinen reaktiosarja (Siemens Healthineers 2019).

Analysaattori aloittaa ALAT-mittauksen laimentamalla alkuperäisen näytteen yhden suhteessa viiteen. Tämän jälkeen analysaattori pipetoi laimennettua näytettä, laboratoriovettä ja ALTPlc R1 -reagenssia, joka sisältää L-alaniinia ja laktaattidehydrogenaasia sekä erikseen lisättyä P5P:tä, reaktiokyvettiin. Analysaattori mittaa ensimmäisen kerran näytteen NADH:n absorbanssin määrän. Ensimmäinen mittaus määrittää näytteen NADH-pitoisuuden. Mittauksella on tarkoitus tarkastaa näytteen tausta absorbanssi ennen kuin näytteeseen lisätään NADH:ta ALTPlc R2 -reagenssissa. Seuraavaksi samaan reaktiokyvettiin lisätään ALTPlc R2 -reagenssi, joka sisältää  $\alpha$ -ketoglutaraattia ja pelkistettyä NADH:ta. Tämän jälkeen näytteestä inkuboidaan 37 °C:ssa. Inkuboinnin aikana toteutuu edellisessä kappaleessa selitetty kemiallinen reaktiosarja. Inkuboinnin jälkeen mitataan NADH:n absorbanssin muutosta ajan funktiona, jonka avulla saadaan laskettua aktiivisen ALATin aktiivisuus plasmasta. (Siemens Healthineers 2019.)

#### 2.4.3 P5P-reagenssin vaikutuksia ALAT-mittauksessa

P5P-reagenssin vaikutuksia ALAT-mittaukseen on tutkittu jo vuosikymmenien ajan. Vuonna 2013 tehdyn kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli selvittää kuinka P5P-reagenssin käyttö vaikuttaa alaniiniaminotransferaasin mittaukseen sekä maksavaurion löytymiseen. Laboratoriot suorittavat ALAT-mittauksia P5P-reagenssin kanssa sekä ilman sitä vaikkakin yksittäiset tutkimukset ovat osoittaneet P5P-reagenssin määrällä olevan 10–20 %:n vaikutus tulostasoon. P5P-reagenssin käytön vaikutuksia maksavaurion löytymiseen ei olla systemaattisesti arvioitu eikä siitä ollut tehty kohdennettua tutkimusta. Kirjallisuuskatsauksessa todetaan eri menetelmien aiheuttavan tulostasoeroja ALAT-määrittäyksissä laboratorioden välillä. Yhtenäinen optimoitu testausmenetelmä parantaisi tutkimusten vertailukelpoisuutta. (Tarrant & Meyer & Katavolos 2013.)

Yhdysvalloissa julkaistiin tutkimus vuonna 2015, jossa tutkittiin matalan B6-vitamiinitason omaavan potilaan ALAT ja ASAT arvoja P5P-reagenssin kanssa ja ilman sitä. P5P-reagenssin kanssa mitattu ALAT-arvo oli 20 % korkeampi kuin tulos, joka mitattiin reagenssilla, jossa ei ollut P5P-reagenssia. (Mills & Greene & Bainton & Lorey & Baumann 2015.) Koreassa vuonna 2017 toteutetussa tutkimuksessa analysoitiin 2318 potilasnäytettä P5P-reagenssin kanssa sekä ilman sitä. Tutkimuksen tulokset osoittivat selvän eron mittauksien välillä. Tulostaso oli korkeampi mittauksissa, jossa oli mukana P5P-reagenssi, kuin mittauksissa, josta P5P-reagenssi puuttui. Suurimmat erot mittauksien välillä todettiin sydäninfarktipotilailla, joilla P5P-taso on usein matala. (Lee ym. 2017.)

Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa, tarkasteltiin P5P-reagenssin vaikutusta kroonista munuaissairautta sairastavien potilaiden ALAT ja ASAT tuloksiin. Tutkimukseen osallistui 104 dialyysissä käyvää potilasta sekä 69 tervettä kontrollipotilasta. Kohdehenkilöiltä otettiin seeruminäytteet, joista suoritettiin ALAT-mittaus kertaalleen ilman P5P-reagenssia ja sen kanssa. Saaduissa tuloksissa huomattiin matalampia tuloksia ALAT-mittauksissa, joissa ei käytetty P5P-reagenssia. ALAT-mittauksien keskiarvo ilman P5P-reagenssia oli 24 U/l ja vaihteluväli 17–35 U/l, P5P-reagenssin kanssa keskiarvo oli 27 U/l ja vaihteluväli 24–35 U/l. Vaikutus näkyi selvimmin matalan ALAT-tason näytteissä. (Sharma & Baruah & Thakur & Mohapatra & Sharma 2014.)

Australiassa julkaistussa tutkimuksessa haluttiin vertailla IFCC:n menetelmää ja muokattua IFCC:n menetelmää koskien P5P-reagenssin käyttöä. Muokatussa IFCC:n menetelmässä on usein joko suosituksia vähäisempi määrä tai ei ollenkaan P5P-reagenssia. Tutkimuksessa mitattiin ALAT-arvo 320 näytteestä käyttämällä molempia edellä mainittuja menetelmiä. Näytemateriaali oli kerätty potilaista, jotka todennäköisemmin kärsivät B6-vitamiinin puutoksesta. ALAT-mittauksien tulosten keskiarvo oli 4,8 U/l pienempi mittauksissa, joissa ei käytetty P5P-reagenssia. Yhteenvetona tutkimuksessa todetaan, että muokatulla menetelmällä saadaan huomattavasti matalampia tuloksia kuin IFCC:n suosittelemalla menetelmällä. Tutkimus on julkaistu posterimuodossa ja sisältää vielä vertaisarvioimatonta tietoa. (Lawrence & Saleem & Coastes & Petrou & Bisazak.)

Tutkimuksissa (Tarrant ym. 2013; Mills ym. 2015; Lee ym. 2017; Sharma ym. 2014; Lawrence ym.) todettiin yhdenmukaisesti matalampia tulostasojia ALAT-tuloksissa, jotka oli mitattu ilman P5P-reagenssia. Tulostasojen erot selittyvät pääasiassa aktivoitumattoman alaniiniaminotransferaasin poisjämisellä mittauksista. Tutkimuksissa (Lawrence ym.; Tarrantin ym. 2013) mainittiin, että on aiheellista seurata IFCC:n antamaa suositusta P5P-reagenssin käytöstä. Menetelmän yhtenäinen käyttö parantaisi tulosten vertailtavuutta laboratorioden välillä sekä saatujen tulosten oikeellisuutta.

### **3 Tarkoitus ja tavoitteet**

Opinnäytetyön tarkoituksena oli mitata P5P-reagenssin käyttömäärän vaikutusta ALAT-mittaukseen Siemens Healthineers Atellica® Solution -analysaattorilla. Työllä haluttiin selvittää, kuinka suuria eroja voidaan havaita ALAT-mittauksien tuloksissa, riippuen P5P-reagenssin määrästä. Työssä kiinnitettiin huomiota myös näytteiden B6-vitamiinitasoihin ja sen vaikutuksiin ALAT-mittauksessa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa P5P-reagenssin käyttömäärän vaikutuksista ALAT-mittaukseen. Opinnäytetyön tulosten avulla voidaan paremmin ymmärtää muun muassa P5P-reagenssin poisjäämisen vaikutuksia ALAT-mittaukseen. Saatua tietoa pystytään hyödyntämään opinnäytetyön tilaavassa yksikössä. Esimerkiksi, kun arvioidaan näytteiden uudelleen analysoinnin tarvetta, tilanteessa, jossa mittaukseen lisätyn P5P-reagenssin määrä on ollut virheellinen. Saatuja tuloksia voidaan hyödyntää kehitettäessä ALAT-määritykseen liittyviä toimintatapoja laboratorioissa, joissa on käytössä Siemens Healthineers Atellica® Solution -analysaattorit. Opinnäytetyön tavoitteena oli myös kasvattaa ja kehittää tekijäänsä ammatillisesta näkökulmasta.

Opinnäytetyössä tarkasteltiin seuraavia tutkimuskysymyksiä:

1. Miten P5P-reagenssin määrä vaikuttaa ALAT-mittauksen tulostasoon?
2. Millä tavalla P5P-reagenssin vaikutus ALAT-tulokseen on riippuvaista näytteen B6-vitamiinitasosta?

## **4 Opinnäytetyön toteutus**

Opinnäytetyön lähestymistapa tutkimuskysymykseen oli kvantitatiivinen eli määrällinen. Kvantitatiivisessa lähestymistavassa käsiteltävä aineisto on numeerisessa muodossa ja sitä usein analysoidaan tilastollisin menetelmin. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa määritetään ensin tutkimusaihe, sitten käydään läpi kirjallisuutta ja tunnistetaan tutkimuksen tavoitteet, kerätään ainestoa ja analysoidaan se ja lopuksi julkaistaan tulokset. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa pyritään usein joko kehittämään uutta teoriaa tai testaamaan vanhaa teoriaa. (Roni & Merga & Morris 2020: 7–11.)

### **4.1 Resurssit ja toteutuksen eteneminen**

Opinnäytetyö on 15 opintopisteen kokonaisuus, joka koostuu kolmesta kurssista. Yksi opintopiste vastaa noin 27 tunnin työtä (Valtioneuvoston asetus yliopistojen tutkinnoista 794/2004 § 5). Opinnäytetyö vastaa siis kokonaisuudessaan noin 405 tunnin työtä. Tästä 5 opintopistettä eli 135 tuntia oli varattu suunnitelman työstämiseen, toiset 5 opintopistettä eli 135 tuntia opinnäytetyön toteuttamiseen ja raportin tekemiseen. Loput 5 opintopistettä eli 135 tuntia kuluu työn julkaisemiseen sekä mm. kypsyysnäytteeseen.

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin aiheen valitsemisella ja suunnitelman kirjoittamisella keväällä 2021. Työn aihe valikoitui HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratorion ehdottamista aiheista. Suunnitelmalla haluttiin määrittää tutkimuskysymyk-

set sekä aikataulu opinnäytetyölle. Tiedonhaku suoritettiin osana suunnitelmaa. Suunnitelman valmistuttua työlle haettiin HUSin myöntämä tutkimuslupa työn suoritusta varten. Kevään 2021 aikana kerätyistä näytteistä (n=70) mitattiin ALAT HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa. Mittauksien aikana päätettiin suorittaa ALAT-mittaukset vielä 25 lisänäytteestä. Saadut tulokset analysoitiin käyttämällä Validation Manageri -ohjelmistoa. Tulokset kirjattiin opinnäytetyön raporttiin, joka esiteltiin seminaarissa syksyllä 2021. Opinnäytetyön toteutusta on kuvattu kuviossa 3.



Kuvio 3. Opinnäytetyön toteutuksen eteneminen.

## 4.2 Aineisto

Opinnäytetyötä varten kerättiin kevään 2021 aikana 70 potilasnäytettä HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa. Kerätyistä näytteistä tuli näytteenotto päivästä kolme päivää ennen tai jälkeen otettuna näyte B6-vitamiini mittaukseen. B6-vitamiini analysoitiin VITA Laboratoriot Oy:ssä alihankintana. Näytteet olivat ylijäämänäytteitä, joista oli kaikki pyydetyt tutkimukset analysoitu ja vastattu. Näytteet olivat litiumhepariini plasmaa sekä seerumia. Molemmat näytemuodot soveltuvat ALAT-mittaukseen, joten näytemuodolla ei ole vaikutusta saatuihin tuloksiin. Kerätyistä näytteistä erotettiin plasma/seerumi keräyshetkellä, joka pakastettiin -20 °C:kseen. Näytteisiin merkittiin tässä vaiheessa vielä näytenumero ja keräyspäivämäärä.

Näytteet analysoitiin HUS Diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa heinäkuussa 2021. Aiemmin mainituissa tutkimuksissa (Gislefoss ym. 2009; Williams ym. 1987) oli todettu näytteen pitkäaikaisen säilytyksen laskevan ALAT-arvoa. Opinnäytetyössä käytettyjä näytteitä oli säilytetty annettuja suosituksia pidempään. On siis mahdollista, että näytteiden pitkäaikainen säilytys laskee näytteiden ALAT-arvoa. Näytteiden säilytys ei ole kuitenkaan vaikuttanut saatujen tulosten vertailukelpoisuuteen keskenään, sillä kaikki analysoinnit näytteille tehtiin saman päivän aikana. Koska heti ensimmäisessä mittauksessa havaittiin huomattava määrä matalia ja alle analysaattorin mittausalueen (<9 U/l) olevia tuloksia, päätettiin suorittaa ALAT-mittaus vielä 25 ylijäämänäytteestä. Näytteet oli otettu edellisenä päivänä. Mukaan valittiin spesifisesti korkeampia

ALAT-arvoja. Näillä 25 lisänäytteellä oli tarkoitus tarkastella kuinka P5P-reagenssin määrä vaikuttaa korkeisiin ALAT-tuloksiin. Näistä 25 lisänäytteestä ei kuitenkaan ollut tiedossa B6-vitamiinitasoa, joten näytteistä saaduista tuloksista ei voitu tarkastella B6-vitamiinin vaikutusta suhteessa P5P-reagenssin käyttöön.

### 4.3 Näytteiden analysointi

Näytteistä mitattiin ALAT-aktiivisuus Siemens Healthineers Atellica Solutions -analysointilaitteilla yhden päivän aikana heinäkuussa 2021. Ennen näytteiden ALAT-aktiivisuuksien mittaamista, oli analysointilaitteilla ALAT-menetelmä vakioitu ja tulostasoa varmistettu päivittäiskontrollien avulla. Vakioinnilla tarkoitetaan mittausmenetelmän säätämistä oikean tulostason saamiseksi. Vakiointi suoritetaan kalibraattoreilla, joiden tulostasoa tiedetään. (Wang & Hoffman 2017.) Vakiointi on aina syytä suorittaa, mikäli reagenssien eränumero vaihtuu, kontrollien tulostasoa muuttuu merkittävästi tai analysointilaitteille suoritetaan suuri huolto. Laittevalmistaja on myös määritellyt tietyt intervallit, jolloin testit tulisi vakioida. (Siemens Healthineers 2019.) Päivittäiskontrollilla tarkastetaan vakioinnin onnistuminen sekä päivittäinen laitteen toiminta. Kontrolleina käytetään liuoksia, joiden mitattavien analyttien pitoisuus tiedetään. (Theodorsson 2016.) Suositeltavaa on käyttää vähintään kahta eri kontrollitasoa. Kontrolleista saatujen tulosten tulisi olla ennalta asetetussa vaihteluvälissä. (Siemens Healthineers 2019.)

#### 4.3.1 Näytteiden esikäsittely ja reagenssien valmistus

Kerätyt näytteet oli keräyspäivänä sentrifugoitu, jonka jälkeen niistä suoritettiin kaikki pyydetyt tutkimukset. Näytteistä tämän jälkeen eroteltiin plasma/seerumi tehdaspuhtaan putkeen, johon merkittiin näytteenottopäivä ja näyttenumero. Kerätyt näytteet säilytettiin -20 °C:ssa niiden mittauspäivään asti. Mittauspäivänä näytteitä sulatettiin huoneenlämmössä noin kahden tunnin ajan. Kun kaikki näytteet olivat sulaneet, niitä sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 3000 g.

Reagenssien valmistaminen oikein oli erittäin tärkeä vaihe opinnäytetyön mittauksien ja saatujen tulosten kannalta. Väärin valmistetut reagenssit laskisivat saatujen tulosten luotettavuutta ja toistettavuutta. Kaikki reagenssit olivat samaa valmistuserää (LOT). Reagensseihin pipetoitiin kaatamisen sijaan tarvittava P5P-reagenssin määrä. Näin voitiin varmistua tarkasta P5P-reagenssin määrästä. Ilman P5P-reagenssia käytettävät reagenssit olivat heti käyttövalmiita. Yhteen ALTPLC R1 -reagenssin molempiin kaivoihin pipetoitiin kaksinkertainen määrä eli 600 mikrolitraa P5P-reagenssia ja yhteen ALTPLC

R1 -reagenssin molempiin kaivoihin pipetoitiin ohjeen mukaisesti 300 mikrolitraa P5P-reagenssia.

#### 4.3.2 Näytteiden ALAT-mittaus

Näytteiden esikäsittelyn aikana luotiin analysaattoreilla erätilaus, jolla saatiin luotua jokaiselle näytteelle yksilöllinen tunniste ja viivakooditarra. Erätilauksella saatiin määritettyä mitattavaksi analytyiksi ALAT. Näytteille luotiin tunnisteet test1-test70. Erätilauksen luominen analysaattorille mahdollisti näytenumeroiden hävittämisen ja näin myös näytteiden pseudonymisoinnin. Näytenuomerolle oli luotu lista, joka yhdisti näytenuumeron juoksevaan tunnisteeseen. Kun analysaattorin luomat viivakooditarrat liimattiin näyteputkiin, katsottiin samalla, että putken näytenumero ja juokseva testinnumero vastasivat listassa olleita tietoja. Listan avulla pystyttiin yhdistämään vielä B6-vitamiinin tulos oikeaan näytteeseen tulosten käsittelyvaiheessa. B6-vitamiinituloksen yhdistämisen jälkeen voitiin hävittää lista, joka yhdisti näytenuumeron ja analysaattorilla luodun juoksevan tunnisteeseen. Tämän jälkeen tiettyä näytettä ei pystytty enää yhdistämään tiettyyn henkilöön. Tulosten käsittelyssä ja analysoinnissa käsiteltiin näytteitä analysaattorilla luoduilla tunnisteilla, joten toiminta oli anonyymiä.

ALAT-mittaukset päätettiin aloittaa käyttämällä suositusten mukaisesti valmistettua reagenssia. Ennen mittauksien aloittamista ALAT-menetelmä oli vakioitu ja tulostaso varmistettu kontrollien avulla. Näytteet asetettiin näytetelineissä analysaattoriin, jolloin analysaattori aloitti automaattisesti ALAT-mittauksen. Mittauksen jälkeen saadut tulokset siirrettiin muistitikulle ja saadulle tiedostolle luotiin nimi ALAT\_normaali. Seuraavaksi mitattiin näytteiden ALAT-aktiivisuus käyttämällä reagenssia, johon ei ollut lisätty P5P-reagenssia eli puutteellinen reagenssi. Ensin pyydettiin suositusten mukainen reagenssi pois analysaattorilta ja tilalle laitettiin puutteellinen reagenssi. Näytteiden ALAT-aktiivisuus mitattiin ja tulokset siirrettiin muistitikulle kansioon ALAT\_ilmanP5P. Sama prosessi toistettiin vielä reagenssilla, johon oli pipetoitu kaksinkertainen määrä (600 µl) P5P-reagenssia. Saadut tulokset siirrettiin muistitikulle kansioon ALAT\_2xP5P.

Kerätyille 25 lisänäytteelle luotiin samalla tavalla juoksevat eränumerot ALAT1-ALAT25 ja mitattavaksi analytyiksi valittiin ALAT. Lisänäytteistä mitattiin ensin ALAT suositellulla määrällä (300 µl) P5P-reagenssia, jonka jälkeen tulokset siirrettiin muistitikulle kansioon ALAT\_lisasarja\_normaali. Tämän jälkeen näytteistä mitattiin ALAT vielä reagenssilla, josta puuttui P5P-reagenssi. Tulokset siirrettiin muistitikulla kansioon ALAT\_lisasarja\_ilmanP5P. Lisänäytteistä päätettiin jättää pois ALATin mittaus kaksinkertaisella määrällä

P5P-reagenssia. Päätös tehtiin sen perusteella, että lisänäytteillä haluttiin tarkastella P5P-reagenssin puuttumisen vaikutusta korkeisiin ALAT-tuloksiin.

Kaikilla opinnäytetyössä mitattavilla näytteillä päätettiin vielä suorittaa mittaus, jossa vakiointi oli suoritettu reagenssilla, joka ei sisällä P5P-reagenssia. Analysaattorille vaihdettiin puutteelliset reagenssit ja suoritettiin vakiointi. Vakioinnin tuloksessa ei ollut poikkeavuuksia ja analysaattori hyväksyi tehdyn vakioinnin eikä antanut virheilmoituksia. Kaikista kerätyistä näytteistä mitattiin ALAT-aktiivisuus kyseisellä vakioinnilla, käyttämällä puutteellista reagenssia. Kokeella oli tarkoitus tarkastella kuinka ilman P5P-reagenssia tehty vakiointi vaikuttaa ALAT-tulostasoon sekä selvittää havaitsisiko analysaattori vakioinnissa ongelmia.

#### 4.3.3 Tulosten analysointi

Opinnäytetyössä mitattiin ALAT-aktiivisuuksia yhteensä 95 näytteestä. Näistä 95 näytteestä 70:stä oli tiedossa B6-vitamiinipitoisuus ja lopuilla 25 lisänäytteellä haluttiin tarkastella P5P-reagenssin vaikutusta korkeisiin ALAT-tuloksiin. Näytteistä, joista oli B6-vitamiinipitoisuus tiedossa, 32 näytteessä ALAT-taso oli alle analysaattorin mittausalueen (<9 U/l). Tämän vuoksi nämä 32 näytettä päätettiin jättää pois vertailusta, sillä tulokset eivät olisi luotettavia mittausalueen ulkopuolella. Loppujen lopuksi vertailuun otettiin siis mukaan 63 näytteen tulokset, joista 38 näytteen B6-vitamiinipitoisuus oli tiedossa. Toteutetuille mittauksille luotiin omat sarjatunnisteet Validation Manager -ohjelmistolla (taulukko 1).

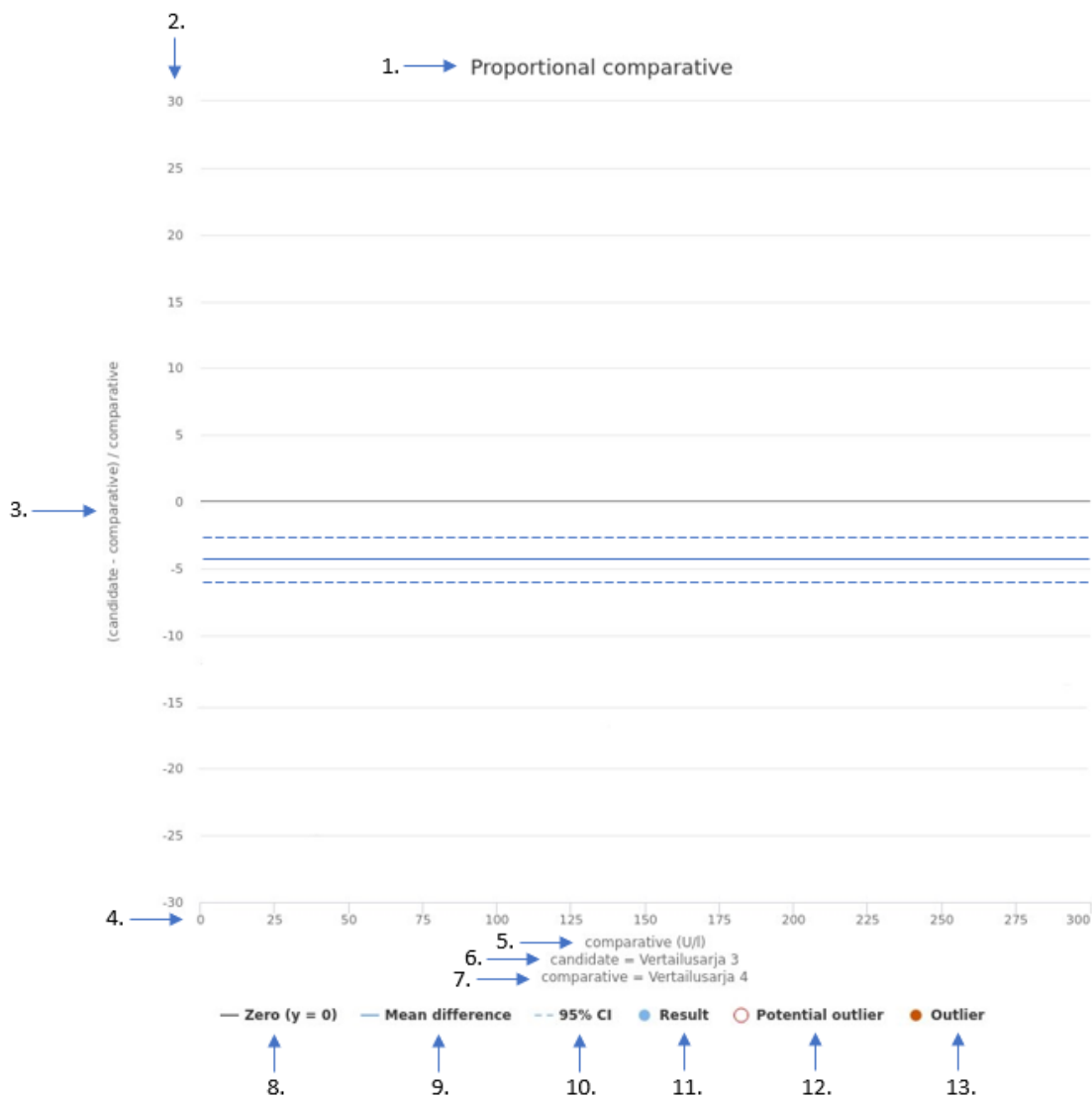
Taulukko 1. Suoritetut mittaukset ja niille annetut sarjatunnisteet Validation Manager -ohjelmistossa.

Validation Manager sarjatunniste	Suoritettu mittaus
ATELLICA MAU CH13	ALAT mitattu suositetulla määrällä P5P-reagenssia (alkuperäiset näytteet n=70)
Vertailusarja 1	ALAT-mitattu ilman P5P-reagenssia (alkuperäiset näytteet n=70)
Vertailusarja 2	ALAT-mitattu kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia (alkuperäiset näytteet n=70)
Vertailusarja 3	ALAT-mitattu ilman P5P-reagenssia vakioinnilla, joka on suoritettu ilman P5P-reagenssia (alkuperäiset ja lisänäytteet n=95)

Vertailusarja 4	ALAT-mitattu suositetulla määrällä P5P-reagenssia (lisänäytteet n=25)
Vertailusarja 5	ALAT-mitattu ilman P5P-reagenssia (lisänäytteet n=25)

Opinnäytetyössä toteutetuista ALAT-mittauksista piirrettiin Bland-Altman ja Passing-Bablok-kuvaajat sekä laskettiin saatujen tulosten keskimääräinen tulostasero. P5P-reagenssin vaikutuksia ALAT-mittaukseen eniten havainnollistava on Bland-Altman-kuvaaja. Bland-Altman pisteanalyysi on vuonna 1983 kehitetty analyysimenetelmä, joka soveltuu hyvin kahden eri menetelmän vertailuun. Sillä voidaan tarkastella kahden eri menetelmän yhteneväisyyttä eroprosenttien ja keskiarvojen avulla. Menetelmällä voidaan myös luoda rajat, johon 95 % tuloksista tulisi osua, keskiarvoeron mukaan. Passing-Bablok-kuvaajalla tutkitaan kahden eri menetelmän korrelaatiota eli riippuvuutta. Riippuvuutta kuvataan korrelaatiokertoimen avulla ( $r$ ). Kerroin saa arvoin  $-1,0$  ja  $+1,0$  väliltä. Mitä lähempänä kertoimen luku on yhtä, sitä voimakkaampaa vertailtavien riippuvuus on. Riippuvuutta mitattaessa analysoidaan vain kahden muuttujan keskinäistä riippuvuutta eikä tulostaseroja. Korkea korrelaatio ei suoranaisesti tarkoita, että verrattavat menetelmät ovat yhdenmukaiset. Passing-Bablok-kuvaajan avulla voidaan päätellä, miten tulostasero käyttäytyy. (Giavarina 2015.)

Saatuja tuloksia analysoitiin paljon käyttämällä Bland-Altman-kuvaajaa. Kuvaajia tehdessä asetettiin mittaukset joko candidateiksi eli ehdokkaiksi tai comparativeiksi eli vertaileviksi. Kuvaajissa vertaillaan ehdokkaan tuloksia vertailevan tuloksiin. Kuvaajissa y-akselille on sijoitettu verrattavien mittauksien eroprosentti. Eroprosentit on laskettu kaavalla,  $(\text{candidate} - \text{comparative})/\text{comparative}$ . X-akselilla kuvataan näytteen ALAT-arvoa comparative mittauksiksi asetetuilla tuloksilla. Kuviossa 4 on esiteltyä Validation Manager -ohjelmistolla luotu Bland-Altman-kuvaajan ominaisuuksia. Kuvioon asetettujen numeroiden selitteet löytyvät taulukosta X.



Kuvio 4. Kuviossa esitelty Validation Managerilla luodun Bland-Altman-kuvaajan ominaisuuksia.

Taulukko 2. Selitteet kuviossa 4 esitellylle Bland-Altman-kuvaajalle.

Número:	Selite:
1	Kertoo, millainen vertailu on kyseessä. Esimerkki taulukossa kyseessä suhteellinen vertailu.
2	Numerot osoittavat kuinka suuri prosentuaalinen ero mittauksien välillä oli.
3	Laskukaava, jolla ero prosentit on laskettu.
4	Numerot kertovat näytteen ALAT-arvon vertailtavassa (comparative) mittauksessa.
5	Ilmoittaa x-akselin yksiköt.

6	Ilmoittaa, mikä mittaus on asetettu vertailussa ehdokkaaksi.
7	Ilmoittaa, mikä mittaus on asetettu vertailussa vertailevaksi.
8	$y=0$ on kuvaajan nollakohta.
9	Mittausten välisten eroprosenttien keskiarvo. Näkyy yhtenäisenä sinisenä viivana kuvaajassa.
10	Kuvaa eroprosenteista lasketun keskiarvon luottamusväliä.
11	Yksittäinen pallo kuvaa yhtä saatua tulosta.
12	Ilmoittaa mahdollisen poikkeavan havainnon.
13	Ilmoittaa poikkeavan havainnon.

## 5 Tulokset

Opinnäytetyössä vertailtiin ilman P5P-reagenssia tai kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia mitattuja ALAT-tuloksia suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattuihin ALAT-tuloksiin. Saatua tuloksia tarkasteltiin myös näytteen B6-vitamiinitason funktiona. Tulokset analysoitiin käyttämällä Validation Manager -ohjelmaa sekä Microsoft Exceliä. Tehdyistä kuvaajista analysoitiin P5P-reagenssin vaikutusta ALAT-mittausten tulostason sekä ALAT-arvon vaikutusta P5P-reagenssin vaikutukseen.

### 5.1 P5P-reagenssin määrän vaikutukset ALAT-mittaukseen

Opinnäytetyön ensimmäisenä tutkimuskysymyksenä oli selvittää P5P-reagenssin vaikutuksia ALAT-mittaukseen. Vaikutusta lähdettiin tutkimaan tulosten eroprosenttien ja korrelaatioiden tarkastelulla. Kaikkien mittauksien välillä voidaan havaita vahva korrelaatio ( $r > 0,990$ ). Kuitenkin kaikissa vertailuissa havaittiin vähintään 11 %:n keskimääräinen tulostasero. Tarkat eroprosentit sekä korrelaatiokertoimet ovat esitetty taulukossa 3.

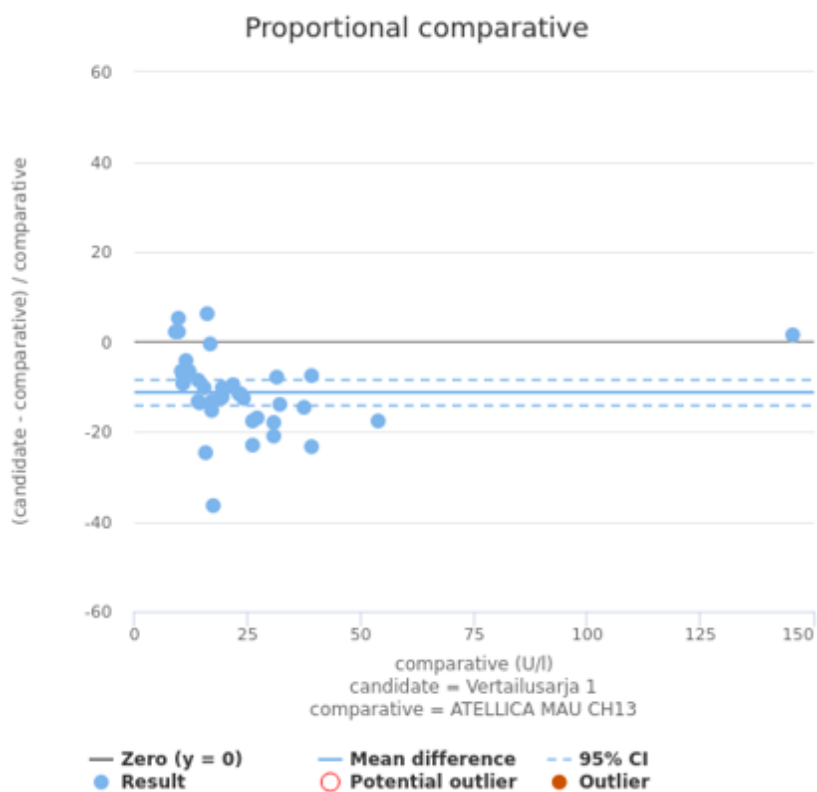
Taulukko 3. Mittauksista tehtyjen vertailujen eroprosentit sekä korrelaatiokertoimet.

Vertailussa olevat mittaukset	Mittausten välinen eroprosentti	Mittausten korrelaatio (r)	Korkein eroprosentti mitattujen välillä
Suosittelulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitatut tulokset	-11,2 %	0,993	-36,6 %

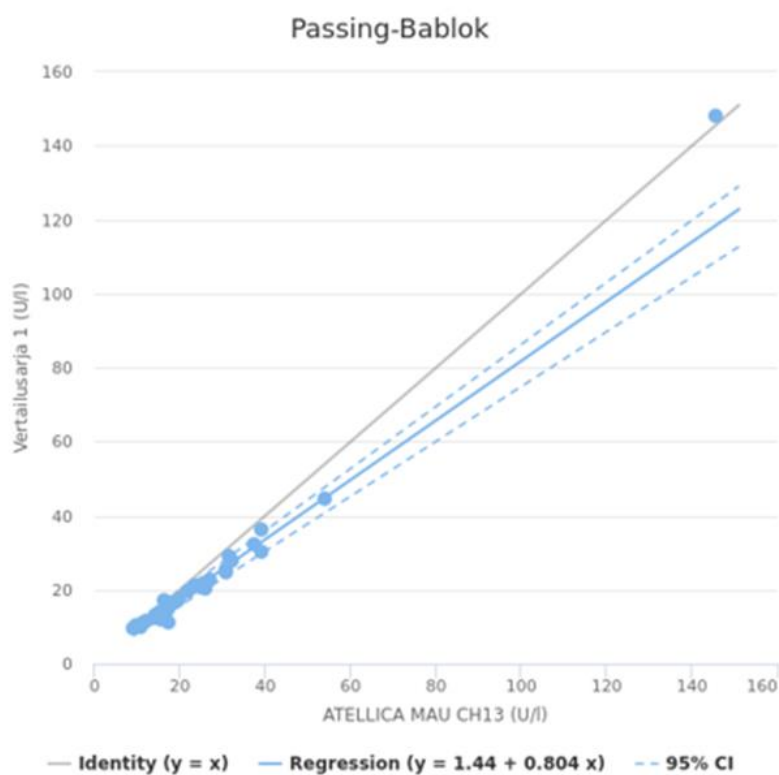
Suosittelulla määrällä P5P-reagenssia ja kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia mitatut tulokset	15,9 %	0,994	43,4 %
Suosittelulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitatut tulokset lisänäytteillä	-11,9 %	0,997	-21,5 %
Normaalilla vakioinnilla suositellulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitatut ja vakioidut tulokset	-13,5 %	0,977	47,5 %
Normaalilla vakioinnilla suositellulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitatut ja vakioidut tulokset lisänäytteet	-13,6 %	0,997	-24,6 %
Ilman P5P-reagenssia ja väärällä vakioinnilla ilman P5P-reagenssia mitatut tulokset	-1,45 %	0,993	45,1 %
Ilman P5P-reagenssia ja väärällä vakioinnilla ilman P5P-reagenssia mitatut tulokset lisänäytteet	-1,94 %	1	-4,23 %

### 5.1.1 Näytteiden ALAT-mittaus ilman P5P-reagenssia

Kuvioissa 5, 6 ja 7 vertaillaan suositellulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitattuja ALAT-tuloksia. Kyseisissä kuvioissa on alkuperäisillä näytteillä (n=70) mitatut tulokset. Matalien, alle analysaattorin mittausalueen (<9 U/l), tulosten vuoksi vertailussa oli mukana 38 näytteen tulokset. Mittausten vaihteluväli suositellulla määrällä P5P-reagenssia oli 9,1 U/l – 148 U/l ja ilman P5P-reagenssia 9,1 U/l – 146 U/l. Mittausten keskimääräinen tulostasooero oli -11,2 % eli ilman P5P-reagenssia mitatut tulokset olivat keskimäärin -11,2 % matalammat kuin suositellulla määrällä mitatut. Suurin esiintyvä eroprosentti mittauksien välillä oli -36,6 %. Kuviolla 6 tarkastellaan mittauksien riippuvuutta. Kuvaajasta saatu korrelaatiokerroin (r) oli 0,993 viitaten vahvaan lineaariseen riippuvuuteen mittauksien välillä.

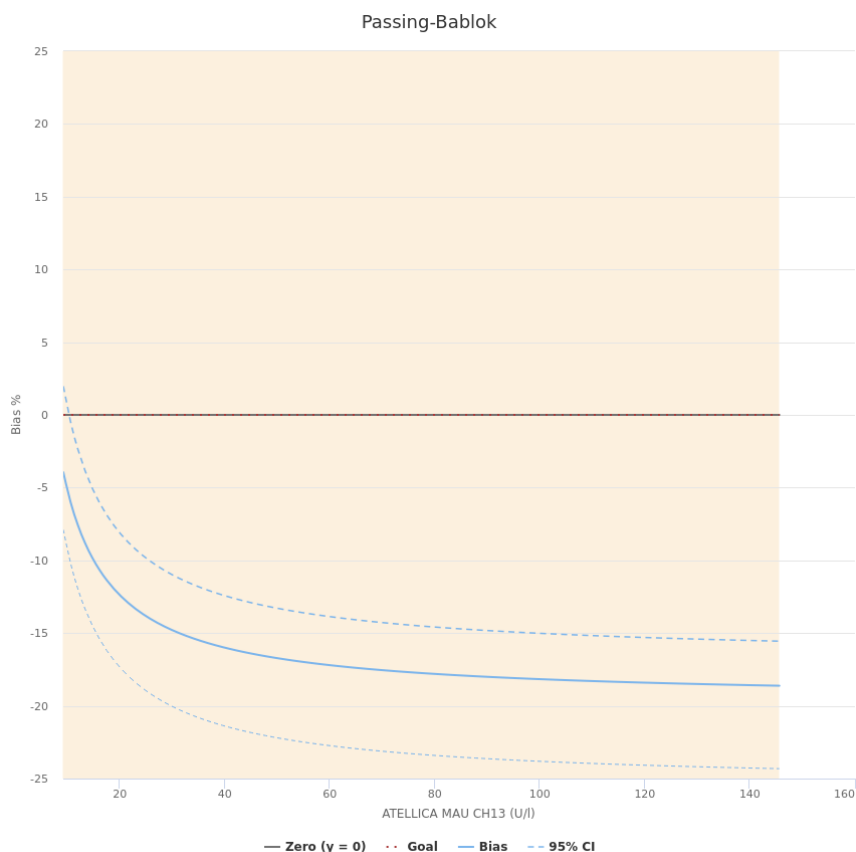


Kuvio 5. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan P5P-reagenssin puuttumisen vaikutuksia ALAT-mittaukseen alkuperäisillä näytteillä.



Kuvio 6. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla tarkastellaan ALAT-mittauksien korrelaatiota.

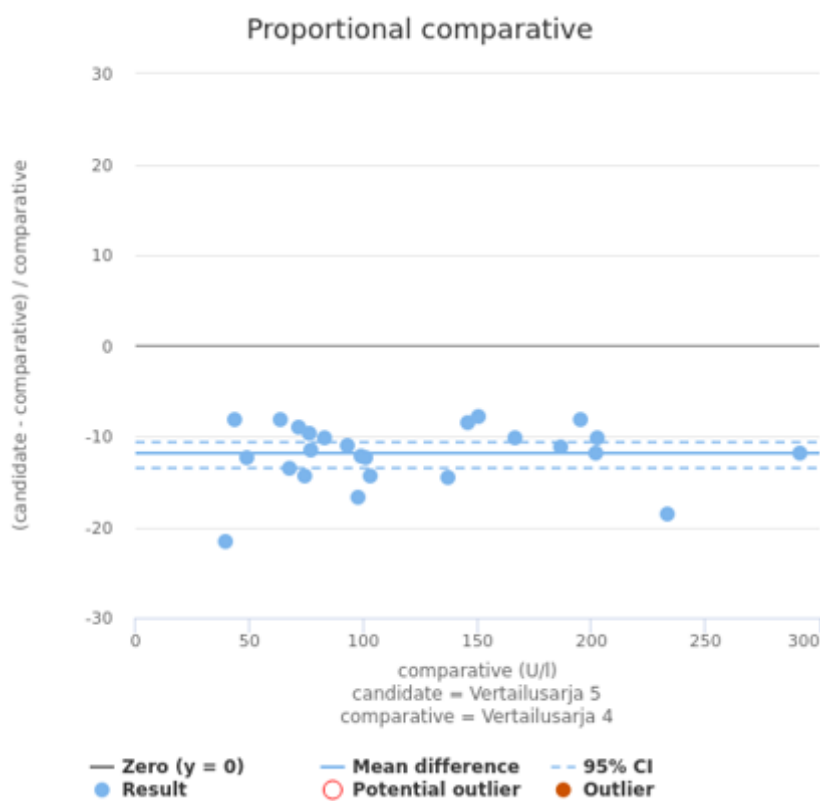
Kuviolla 7 kuvataan mittausten ALAT-arvon vaikutusta poikkeamaan Passing-Bablok-kuvaajalla. Kuvaajasta huomataan poikkeaman pysyvän suurin piirtein samankokoisena näytteen ALAT-arvon ollessa >40 U/l.



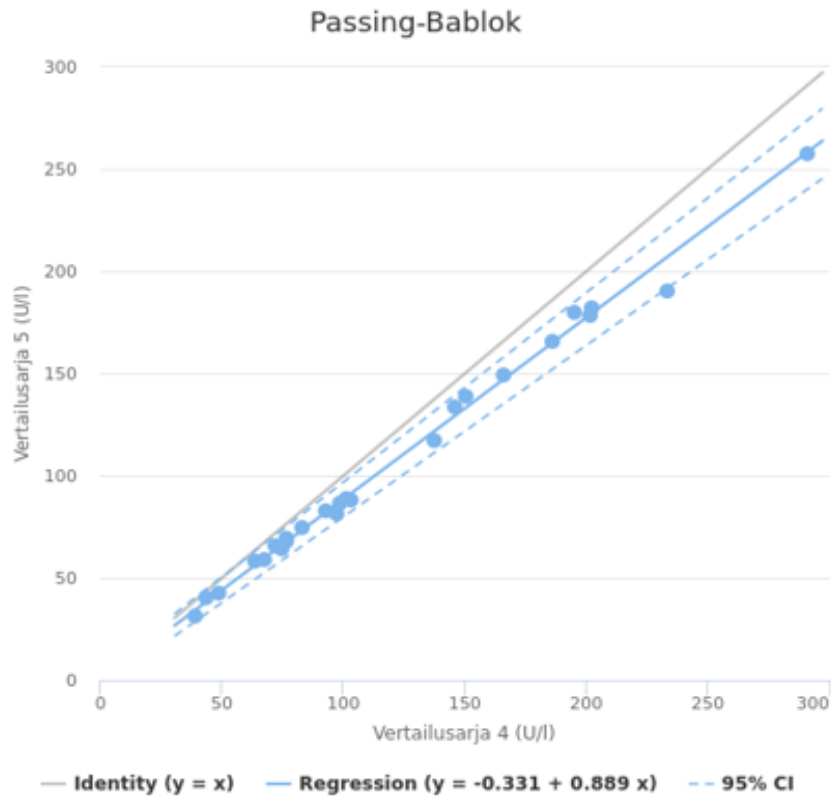
Kuvio 7. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla kuvataan mahdollisen poikkeaman käyttäytymistä suhteessa näytteen ALAT-arvoon.

Analyysipäivänä kerätyistä lisänäytteistä (n=25) suoritettiin myös vertailu, jolla tarkasteltiin P5P-reagenssin puuttumisen vaikutuksia. Mittausten vaihteluväli näytteillä oli 31 U/l – 257 U/l suositellulla määrällä P5P-reagenssia ja 39,5 U/l – 291 U/l ilman P5P-reagenssia. Mittauksien välinen keskimääräinen tulostasero oli -11,9 %. Suurin eroprosentti mittausten välillä oli -21,5 %. Tulos on siis hyvin samankaltainen kuin alkuperäisillä näytteillä saatu tulos, vaikkakin nyt mukana oli enemmän korkeamman tason ALAT-tuloksia. Kuvioissa 8, 9 ja 10 vertaillaan suositellulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitattuja ALAT-tuloksia lisänäytteillä. Kuviossa 8 huomataan, että suuri osa mitattuja tuloksia osuu eroprosentin keskiarvon lähelle. P5P-reagenssin puutos ei

siis näytä vaikuttavan erityisesti johonkin tulostasoon. Kuviolla 9 tarkastellaan mittauksien välistä korrelaatiota ja korrelaatiokerroin oli 0,997. Mittauksien välillä on siis vahva lineaarinen riippuvuus.

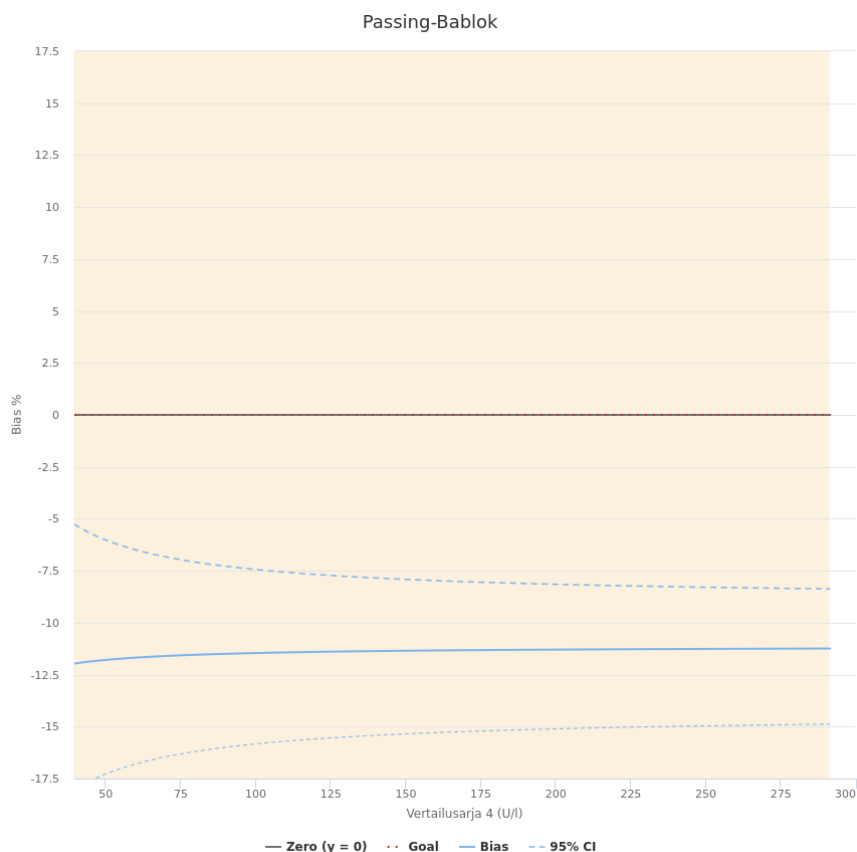


Kuvio 8. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan P5P-reagenssin puuttumisen vaikutuksia ALAT-mittaukseen lisänäytteillä.



Kuvio 9. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla tarkastellaan ALAT-mittauksien korrelaatiota lisä-  
näytteillä.

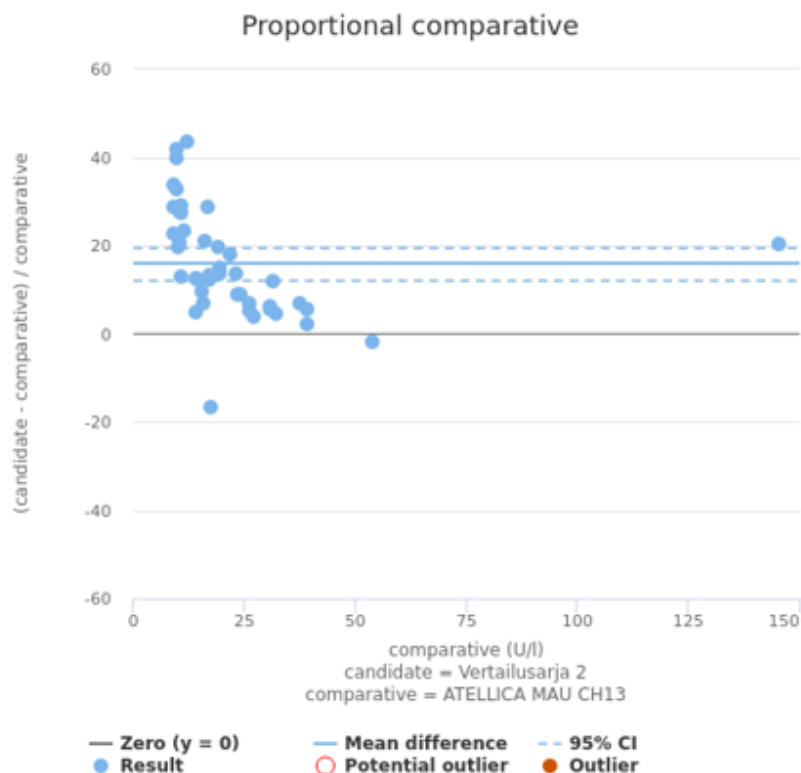
Kuviolla 10 kuvataan poikkeaman suhdetta näytteen ALAT-arvoon. Kuviosta voidaan to-  
deta poikkeaman suuruuden pysyvän suurin piirtein samana näytteen ALAT-aktiivisuu-  
den kasvaessa.



Kuvio 10. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla kuvataan mahdollisen poikkeaman suhdetta näytteen ALAT-arvoon lisänäytteillä.

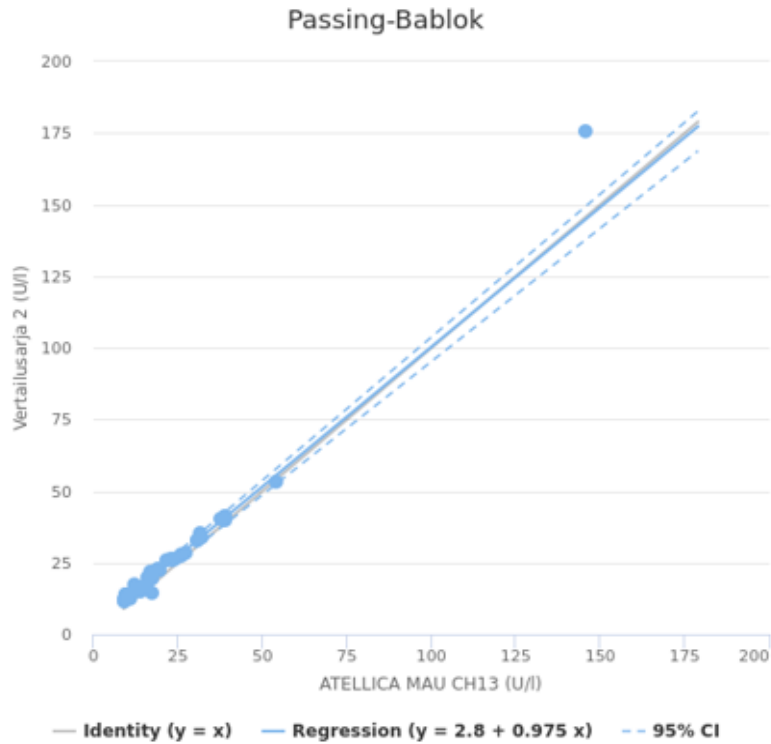
### 5.1.2 ALAT-mittaus kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia

Kuvioissa 11, 12 ja 13 verrataan kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia mitattuja ALAT-tuloksia suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattuihin ALAT-tuloksiin. Alkuperäisistä (n=70) näytteistä vertailuun otettiin mukaan 43 näytettä. Loppujen 27 näytteen ALAT-taso oli molemmilla määrillä P5P-reagenssia alle analysaattorin mittausalueen (<9 U/l). Mittausten vaihteluväli kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia oli 9,3 U/l – 175 U/l, kun suositellulla määrällä P5P-reagenssia se oli 9,1 U/l – 146 U/l. Kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia saadut ALAT-tulokset osoittautuivat keskimäärin 15,9 % korkeammiksi kuin suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitatut ALAT-tulokset. Kuvioilla 11 ja 12 tarkastellaan mittauksien yhteneväisyyttä. Kuvioista 11 huomataan P5P-reagenssin kaksinkertaisen määrän vaikuttavan etenkin mataliin ALAT-tuloksiin (<25 U/l). Matalissa tuloksissa huomataan hyvinkin suuria, jopa 40 %:n eroavaisuuksia tulosten välillä.

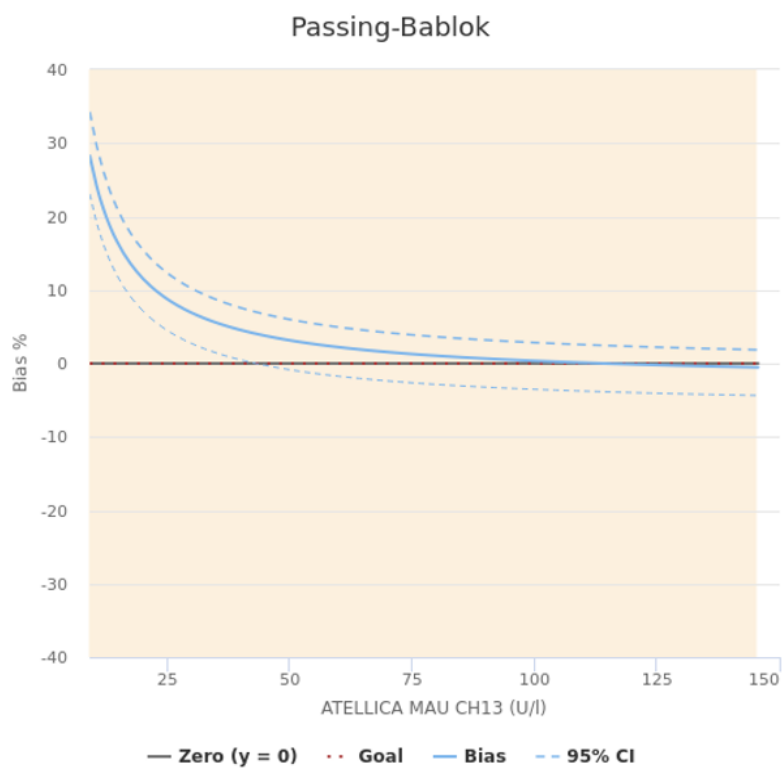


Kuvio 11. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistamisen vaikutuksia ALAT-mittaukseen.

Kuviossa 12 voidaan arvioida mittauksien riippuvuutta keskenään. Mittauksien korrelaatio kerroin on  $r = 0,994$  eli mittauksien välillä on vahva lineaarinen riippuvuus. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että mittaukset olisivat yhtenevät. Kuviolla 13 voidaan arvioida poikkeavuuden suuruutta riippuen näytteen ALAT-arvosta. Kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia voidaan havaita suurempia eroja matalilla ALAT-arvoilla (<50 U/l). Korkeammilla ALAT-arvoilla (>50 U/l) eroja ei juurikaan esiinny.



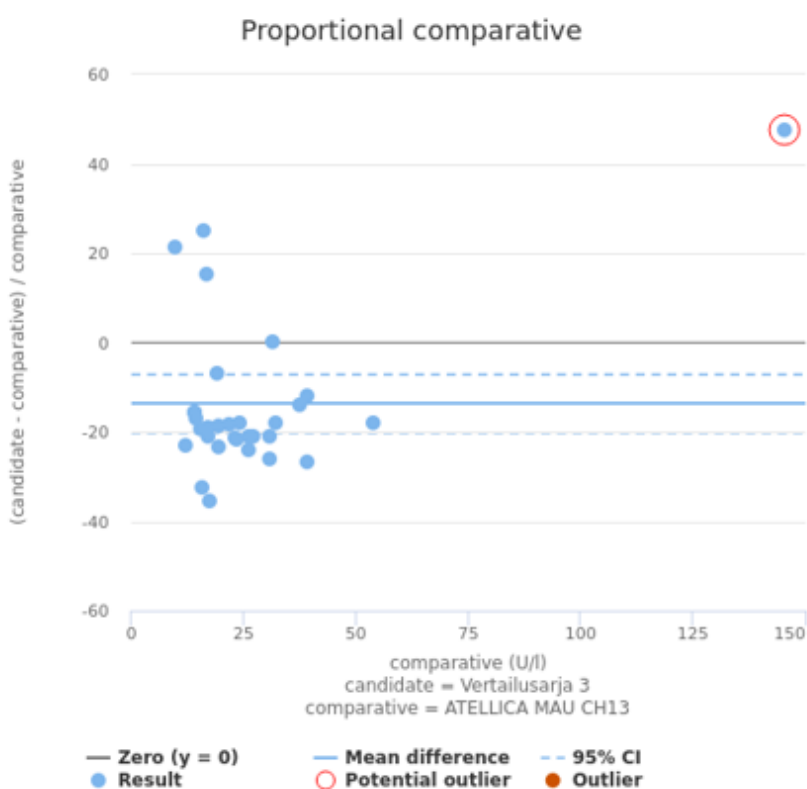
Kuvio 12. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla kuvataan kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia ja suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattujen tulosten korrelaatiota.



Kuvio 13. Passing-Bablok-kuvaaja, jolla kuvataan mahdollisen poikkeaman suuruutta suhteessa näytteen ALAT-arvoon.

### 5.1.3 ALAT-mittaus ilman P5P-reagenssia tehdyllä vakioinnilla

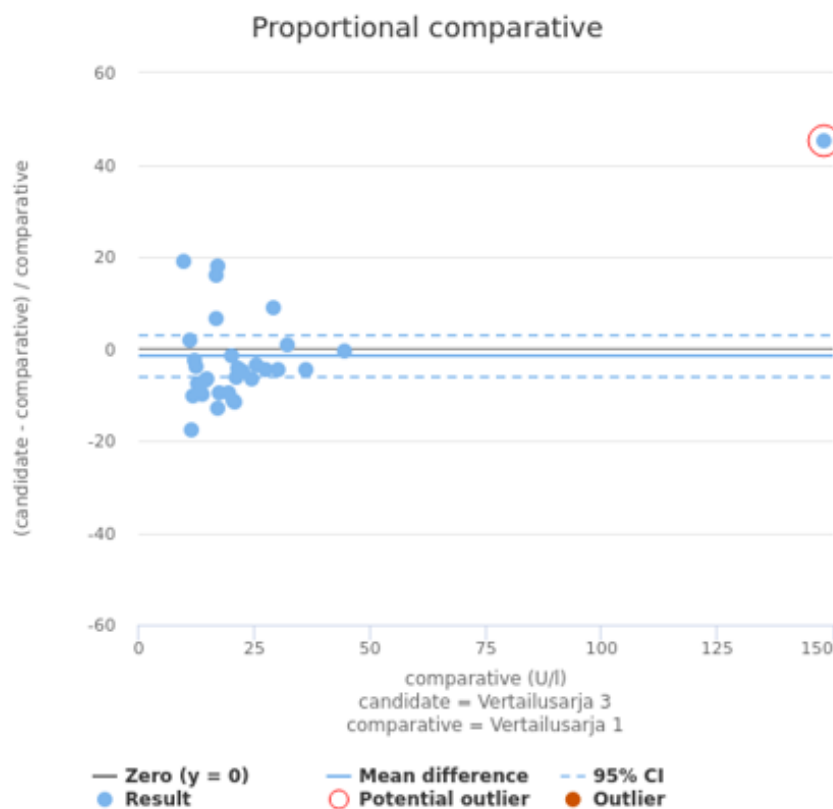
Kuvioissa 14, 15, 16 ja 17 vertaillaan ilman P5P-reagenssia tehdyn vakioinnin vaikutusta ALAT-mittaukseen. Vertailulla haluttiin selvittää voisiko vakiointi auttaa korjaamaan P5P-reagenssin puuttumisesta aiheutuvaa tulostaseroa. Kuviossa 14 vertaillaan suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattuja ALT-tuloksia, väärällä vakioinnilla tehtyyn mittaukseen. Väärällä vakioinnilla tehdyissä mittauksissa ei myöskään käytetty P5P-reagenssia. Vertailussa oli mukana alkuperäisillä näytteillä tehdyt mittaukset (n=31). Mittausten keskimääräinen tulostasero oli -13,5 %. Tulokset ovat siis hyvin samankaltaiset kuin oikein tehdyllä vakioinnilla suoritetuissa mittauksissa. Validation Manager -ohjelma on ehdottanut näytteen test19 tulosta mahdolliseksi poikkeamaksi. Tämä on hyvin mahdollista, sillä kyseisen näytteen tulos poikkeaa selvästi muista tuloksista.



Kuvio 14. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan ilman P5P-reagenssia suoritettua vakioinnin vaikutusta. Vertailun kohteena suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitatut ALAT-tulokset.

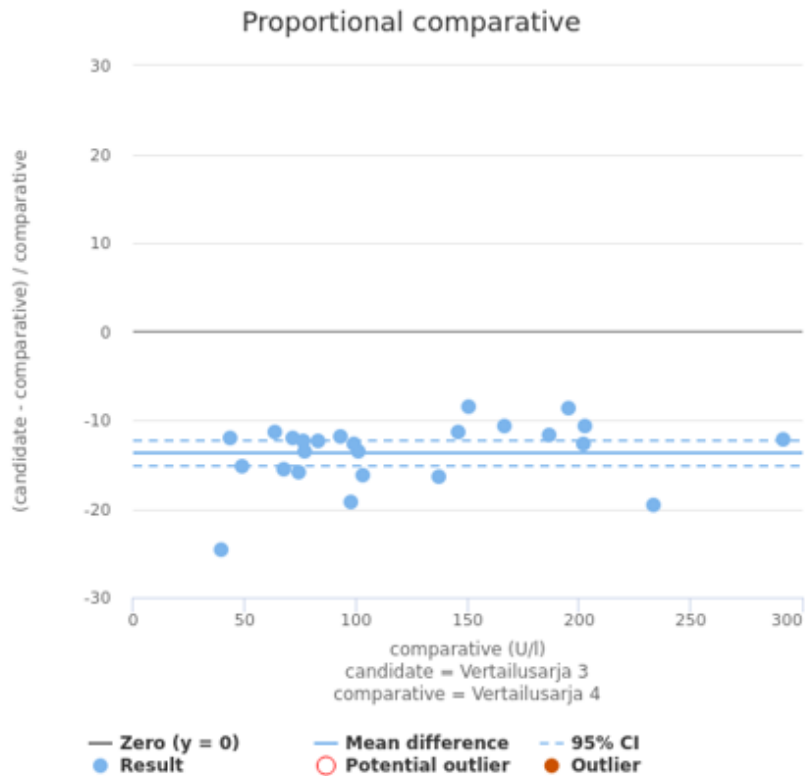
Kuviossa 15 vertaillaan alkuperäisillä näytteillä (n=31) ilman P5P-reagenssia tehtyjä mittauksia, joissa oli eri vakioinnit käytössä. Kuviosta voidaan nähdä eroprosentin olevan hyvin lähellä nollaa (-1,45 %). Vakioinnin vaikutus saatuihin tuloksiin oli siis hyvin pieni.

Vähäinen tulostasojen vaihtelu voi myös selittyä normaalilla vaihtelulla mittauksien välillä, mikä on suurta etenkin matalan ALAT-arvon näytteillä (<20 U/l). Näyte test19 on merkattu taas mahdolliseksi poikkeamaksi.



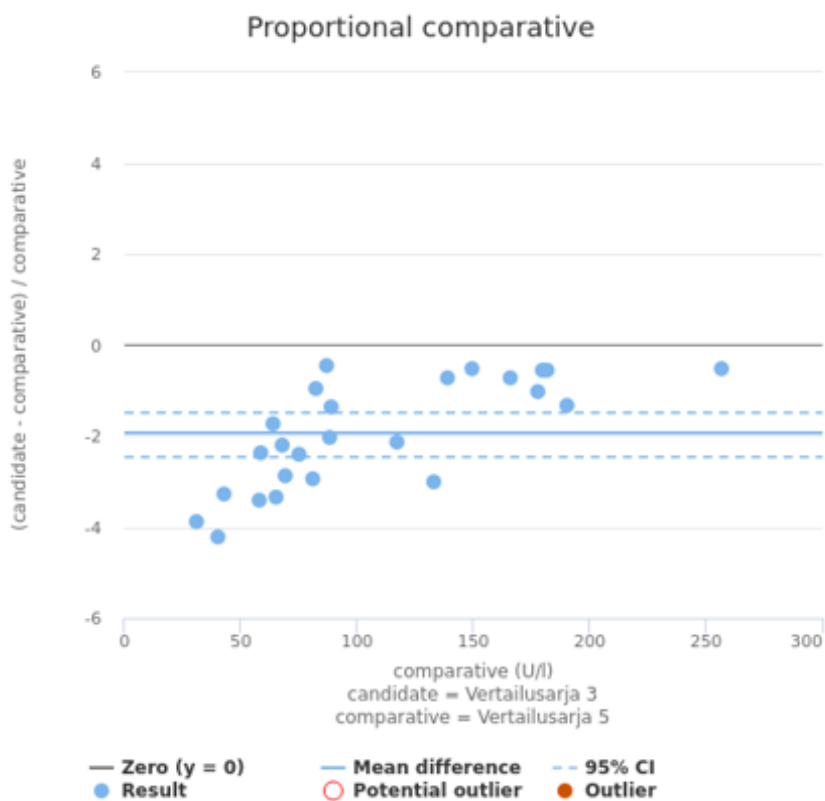
Kuvio 15. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan ilman P5P-reagenssia suoritettua vakioinnin vaikutusta. Vertailussa mukana ilman P5P-reagenssia suoritettuja mittauksia normaaliilla vakioinnilla.

Vakioinnin vaikutusta tarkasteltiin myös kerätyillä lisänäytteillä (n=25). Näin vakioinnin vaikutusta voidaan tarkastella myös korkeamman tason ALAT-näytteillä. Kuviossa 16 vertaillaan ilman P5P-reagenssia tehdyllä vakioinnilla mitattuja ALAT-tuloksia, IFCC:n suositusten mukaisesti mitattuihin ALAT-tuloksiin. Virheellisellä vakioinnilla suoritettua mittauksessa ei myöskään ollut mukana P5P-reagenssia. Kuviossa 17 vertailussa on edelleen väärällä vakioinnilla tehty ALAT-tulokset. Tuloksia verrataan nyt ilman P5P-reagenssia suoritettuihin ALAT-mittauksiin, jossa oli kuitenkin oikein suoritettu vakiointi käytössä. Kuviossa 16 huomataan, ettei ilman P5P-reagenssia tehty vakiointi muuttanut saatuja tuloksia lisänäytteillääkään. Näytteiden ero prosentti on -13,6 % eli 1,7 % suurempi kuin vertailussa, jossa kaikki näytteet oli mitattu oikein tehdyllä vakioinnilla ilman P5P-reagenssia.



Kuvio 16. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan ilman P5P-reagenssia suoritettun vakioinnin vaikutusta. Vertailun kohteena suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitatut ALAT-tulokset lisänäytteillä.

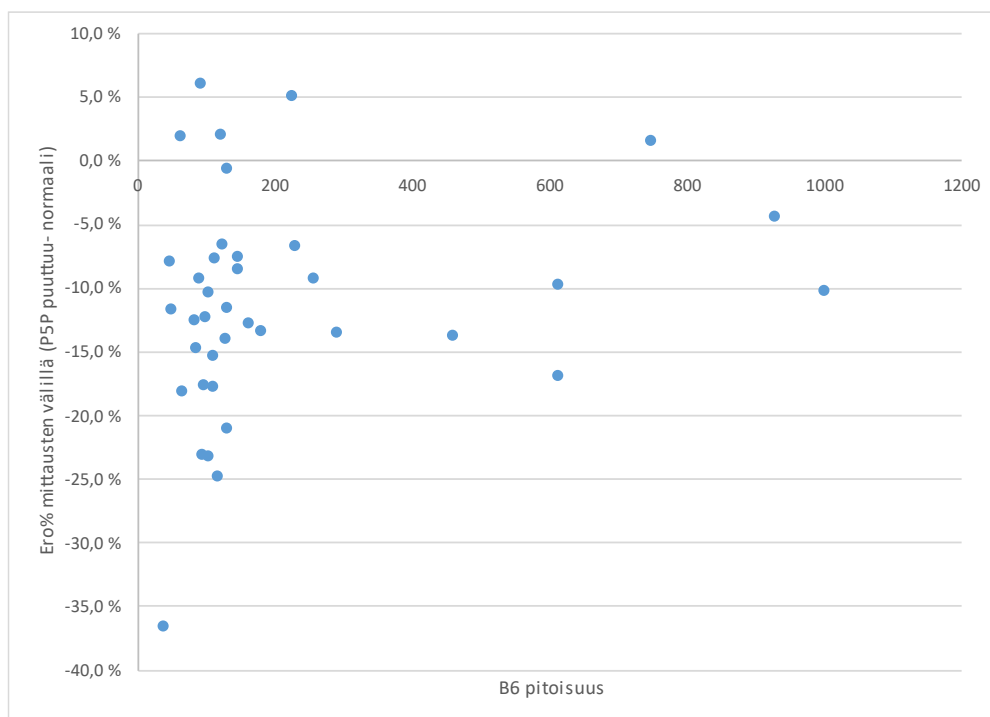
Kuviosta 17 huomataan tulosten olevan lähes samaa tulostasoa. Keskimääräinen tulos-tasoero tulosten välillä oli -1,94 %, mikä todennäköisesti johtuu normaalista vaihtelusta mittausten välillä. Kuvaajien 13, 14, 15 ja 16 sekä tuloksista laskettujen eroprosenttien perusteella voidaan tehdä johtopäätös, että vakiointi ei pysty korjaamaan P5P-reagenssin puutteesta aiheutunutta virheellistä tulostasoa



Kuvio 17. Bland-Altman-kuvaaja, jossa vertaillaan ilman P5P-reagenssia suoritettua vakioinnin vaikutusta. Vertailussa mukana ilman P5P-reagenssia suoritettuja mittauksia normaaliilla vakioinnilla lisänäytteistä.

## 5.2 B6-vitamiinitason merkitys ALAT-mittaukseen suhteutettuna P5P-reagenssin käyttöön

Opinnäytetyössä haluttiin tarkastella B6-vitamiinitason vaikutuksia P5P-reagenssin puutteesta aiheutuvaan tulostaseroon. Vaikutusta lähdettiin tarkastelemaan suosittelulla määrällä P5P-reagenssia ja ilman P5P-reagenssia mitattujen tulosten eroprosentin avulla. Eroprosenttia mittausten välillä verrattiin näytteen B6-vitamiinipitoisuuteen. Alkuperäisistä 70 näytteestä vertailuun voitiin ottaa mukaan 38 näytteen tulokset. Saadut tulokset esitellään kuviossa 18. Tuloksissa ei ole havaittavissa selkeää trendiä B6-vitamiinipitoisuuden ja määritetyn eroprosentin välillä.



Kuvio 18. Kuvaajassa suositellulla määrällä ja ilman P5P-reagenssia saatujen tulosten ero-prosentti verrattuna näytteen B6-vitamiinipitoisuuteen.

Mittauksissa oli kolme näytettä, joiden B6-vitamiinipitoisuus oli alle viitearvojen (<51 nmol/l). Matalien B6-vitamiinitason omaavien näytteiden eroprocentit ja B6-vitamiinitasot ovat esitetty taulukossa 3.

Taulukko 4. Matalan B6-vitamiinitason omaavien näytteiden eroprocentit ja B6-vitamiinipitoisuus.

Näytetunniste:	Mitattu eroprocentti (%)	Näytteen B6-vitamiinipitoisuus (nmol/l)
23	-7,9	45
32	-36,6	36
59	-11,6	48

## 6 Pohdinta

### 6.1 Tulosten tarkastelu

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada lisää tietoa P5P-reagenssin vaikutuksista ALAT-mittaukseen. Lisätiedolla pystytään paremmin ymmärtämään ALAT-mittaukseen liittyviä mahdollisia virhelähteitä. Tavoitteen saavuttamiseksi ja aiheen keskittämiseksi ideoitii kaksi tutkimuskysymystä. Ensimmäisellä tutkimuskysymyksellä pyrittiin selvittämään P5P-reagenssin määrän vaikutuksia ALAT-mittauksesta saatuihin tuloksiin. Toisella tutkimuskysymyksellä pyrittiin saamaan vastaus B6-vitamiinitason vaikutuksesta P5P-reagenssin puutteesta aiheutuvaan tulostasoon. Opinnäytetyössä oli tarkoitus saada vastaukset tutkimuskysymyksiin suorittamalla ALAT-mittaus eri määrillä P5P-reagenssia ja analysoimalla saadut tulokset.

Opinnäytetyötä varten kerättyjä näytteitä oli säilytetty laitevalmistajan suosituksia pidempään ja aikaisempien tutkimusten mukaan (Gislefoss ym. 2009; Williams ym. 1987) voidaan olettaa tämän laskeneen näytteiden ALAT-aktiivisuutta. Näytteiden ALAT-aktiivisuus olisi säilynyt todennäköisesti paremmin, jos näytteitä olisi säilytetty  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa kuten Williamsin ym. (1987) tutkimuksesta käy ilmi. Säilyvyys ei kuitenkaan vaikuta opinnäytetyössä mitattuihin tuloksiin, sillä kaikki mittaukset suoritettiin saman päivän aikana. Näin ei aiheutunut ALAT-aktiivisuuden muutoksia mittausten välissä ja mitatut tulokset olivat vertailukelpoisia keskenään. Säilyvyys kuitenkin laski joidenkin näytteiden ALAT-arvoa alle analysaattorin mittausalueen ( $<9\text{ U/l}$ ), jolloin niitä ei voitu käyttää vertailuissa, laskien opinnäytetyön otoskokoa.

#### 6.1.1 P5P-reagenssin merkitys ALAT-mittauksessa

Ensimmäiseen tutkimuskysymykseen vastaavat mittaukset, jotka suoritettiin ilman P5P-reagenssia sekä kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia. Ilman P5P-reagenssia mitatuissa tuloksissa havaittiin selvät prosentuaaliset erot verrattuna suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattuihin tuloksiin (taulukko 3). Korkeamman ALAT-aktiivisuuden lisänäytteissä oli hieman korkeampi keskimääräinen tulostasoo verrattuna alkuperäisiin näytteisiin, jossa oli mukana enemmän matalan ALAT-tason näytteitä. Molemmissa vertailuissa osassa näytteistä laskettu eroprosentti oli positiivinen. Tarkoittaen, että ilman P5P-reagenssia mitattu tulos on ollut korkeampi kuin P5P-reagenssilla mitattu tulos. Näissä tuloksissa mittausten eroprosentti on kuitenkin pieni ja erot mittausten välillä johtuvat todennäköisesti normaalista hajonnasta mittausten välillä.

Korrelaatiokertoimen sekä Passing-Bablok-kuvaajan avulla pystyttiin arvioimaan mittauserojen kehittymistä. Alkuperäisillä näytteillä mittauksissa havaittava ero vaikuttaa pysyvän suurin piirtein samankokoisena, kun näytteen ALAT-aktiivisuus on  $>40$  U/l. Lisänäytteillä mittausten välinen ero vaikuttaa pysyvän tasaisesti -12 %:ssa ALAT-aktiivisuuden kasvaessa. Suoritetuilla vertailuilla korrelaatiokerroin oli lähellä yhtä, mutta mittauksien keskimääräinen tulostasoero poikkesi huomattavasti. Tämä johtunee siitä, että vertailussa oli sama menetelmä eri reagensseilla.

Ilman P5P-reagenssia mitatuista tuloksista tehdyt vertailut olivat hyvin linjassa aikaisemmin tehtyjen tutkimusten (Tarrant ym. 2013; Mills ym. 2015; Lee ym. 2017; Sharma ym. 2014; Lawrence ym.) kanssa. Tarrantin ym. (2013) kirjallisuuskatsauksessa todettiin ilman P5P-reagenssia mitattujen tulosten tulostason olevan keskimäärin noin 10-20 % matalammat. Millsin ym. (2015) toteuttamassa yksittäistutkimuksessa havaittiin ALAT-arvon laskevan 20 % ja Sharman ym. (2014) tutkimuksessa havaittiin noin 11 %:n keskimääräiset tulostasoerot. Opinnäytetyön tuloksia tarkasteltaessa huomataan ilman P5P-reagenssia mitattujen tulosten keskimääräisten tulostasoerojen (taulukko 3) olevan hyvin samankaltaiset kuin aikaisemmissa tutkimuksissa (Tarrant ym. 2013; Mills ym. 2015; Sharma ym. 2014).

Ilman P5P-reagenssia saatujen tuloksien merkitystä voidaan pohtia myös kontrolleille asetettujen SD-rajojen avulla. Vertailussa tarkastellaan ilman P5P-reagenssia mitattua tulosta niin sanottuun tavoitearvoon, joka on tässä tapauksessa suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattu tulos. HUSLAB (2020) on asettanut ALAT-mittauksen matalan tason kontrollille  $\pm 2$  SD kontrollirajan noin 12 %:iin ja korkean tason kontrollille  $\pm 2$  SD kontrollirajan noin 10 %:iin. Opinnäytetyön tuloksia tarkasteltaessa näytteet jaettiin matalan ( $<50$  U/l) ja korkean ( $>50$  U/l) tason näytteisiin. Näin tuloksia voitaisiin vertailla luotettavammin kontrolleille asetettuihin SD rajoihin. Alkuperäisten sekä lisänäytteiden matalan tason näytteiden ( $n=39$ ) keskimääräinen eroprosentti oli -11,5 % ja korkean tason näytteiden ( $n=24$ ) keskimääräinen eroprosentti oli -11,3 %. Matalan tason näytteiden keskimääräinen tulostasoero menisi siis vielä kontrollille asetetun 12 %:n rajan sisään, vaikkakin joidenkin yksittäisten näytteiden eroprosentti oli huomattavasti suurempi. Korkean tason näytteiden keskimääräinen tulostasoero olisi taas mennyt selvästi yli kontrollille asetetusta 10 %:n rajasta. Saadut tulokset aiheuttaisivat kontrollirikkeen tai olisivat hyvin lähellä sen aiheuttamista. Kuitenkin molemmat tulokset vaatisivat menetelmän toiminnan tarkastelua sekä mahdollisesti menetelmän vakioinnin.

CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) asettaa suosituksia mm. laboratorioden ulkoiselle laadunarvioinnille. Nykyään ulkoisessa laadunarvioinnissa ALAT-mittauksien väliseksi eroiksi suositellaan 15 %:n rajaa. (Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) 2019.) Ilman P5P-reagenssia mitattuja tuloksia tarkasteltaessa huomataan tämän 15 %:n rajan toteutuvan kaikkien laskettujen keskimääräisten tulostaserojen kohdalla. Kuitenkin kun tuloksia tarkastellaan yksittäin, huomataan että näytteistä 13/63 eli noin 20 %:ssa tulokset ylittävät CLIA:n asettaman 15 %:n rajan. P5P-reagenssin puuttuminen ALAT-mittauksesta aiheuttaisi siis merkittäväälle osalle potilaista liian matalan ALAT-tuloksen.

Kaksinkertaisella määrällä P5P-reagenssia mitatut ALAT-tulokset osoittivat myös huomattavan eron verrattuna suositellulla määrällä P5P-reagenssia mitattuihin tuloksiin. Saadut tulokset olivat keskimäärin 15,9 % korkeampia. Mittauksissa havaitut erot korostuivat etenkin matalan ALAT-arvon (<25 U/l) näytteillä ja tasaantuivat ALAT-arvon kasvaessa. ALAT-arvon noustessa (>50 U/l) erot mittauksien välillä häviävät melkein kokonaan. Mittauksien välinen riippuvuus oli vahva vaikkakin erot mittauksien välillä oli huomattavat. P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistamisesta ei löytynyt aikaisempia tutkimuksia, joten on vaikea sanoa, olivatko saadut tulokset linjassa odotusten kanssa.

Vakioinnin vaikutusta P5P-reagenssin puutteesta aiheutuvaan tulostaseroon tarkasteltiin suorittamalla vakiointi reagenssilla, josta puuttui P5P-reagenssi. Tehdyistä vertailuista (kuviot 13, 14, 15 ja 16) voidaan huomata, ettei vakioinnin suorittaminen ilman P5P-reagenssia vaikuttanut merkittävästi saatuihin tuloksiin. Erot mittauksissa olivat hyvin samankaltaiset kuin oikeaoppisesti suoritettulla vakioinnilla saadut. Vakiointi vaikutti aiheuttavan epävakaampia tuloksia, jonka takia suurin mittausten välinen ero prosentti oli jopa 47,5 %. Pienet vaihtelut saaduissa eroprosenteissa ovat todennäköisesti seurausta normaalista tulostasovaihteluista mittauksien välillä. Vakiointi ei siis merkittävästi vaikuttanut P5P-reagenssin puutteesta johtuviin tulostaseroihin.

Opinnäytetyössä toteutetuissa mittauksissa todettiin huomattavia eroja saaduissa tulostasoiissa riippuen P5P-reagenssin määrästä. Noin 11 %:n tulostasero mittauksien välillä ei välttämättä ole kliinisesti merkitsevä, jos tulos on joka tapauksessa viitearvojen sisäpuolella tai hyvin korkea. Tulokset kuitenkin muuttuvat kliinisesti merkittäviksi etenkin, jos potilaan ALAT-arvo on viitearvon tuntumassa (<50 U/l). Todellisuudessa viiterajojen ulkopuolella oleva tulos voi esiintyä viiterajojen sisäpuolella ja näin normaalina tuloksena, mikäli P5P-reagenssia ei ole käytetty mittauksessa. Esimerkiksi näytteellä test63 ALAT-arvo on suositellulla määrällä P5P-reagenssia 54,1 U/l ja ilman P5P-reagenssia

44,5 U/l. Kyseisessä näytteessä mittausten eroprosentti on ollut -17,7 %. Potilaan hoidon seurannassa ja arvioinnissa voi myös tapahtua virheitä, jos ALAT mitataan välillä ilman P5P-reagenssia ja välillä sen kanssa. Silloin saadut tulokset eivät ole vertailukelpoisia keskenään ja hyvinkin suuria tulotason vaihteluja saattaa esiintyä.

Tulosten peilaaminen HUSLABissa ALAT-menetelmälle asetettuihin kontrollirajoihin ja CLIA:n asettamaan ulkoiseen laadunarvioinnin rajaan osoittaa kuinka merkittävästi P5P-reagenssin puuttuminen vaikuttaa ALAT-tuloksiin. Merkittäviä tulostaseroja voidaan havaita kaikilla ALAT-tasoilla. P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistamisella ei ole kovinkaan suurta kliinistä merkitystä. Suurimmat muutokset havaittiin matalan tason (<25 U/l) ALAT-arvoilla, jolloin tulos pysyy viitearvojen sisällä eikä muutos ole siis kliinisesti merkittävä. On tärkeää, että reagenssin lisäysvaiheessa P5P-reagenssia osataan lisätä oikeaoppisesti muiden reagenssien sekaan. Etenkin kun P5P-reagenssin määrän vaihtelut molempiin suuntiin aiheuttivat huomattavia eroja ALAT-mittauksissa.

#### 6.1.2 B6-vitamiinitason merkitys P5P-reagenssin käyttöön

P5P-reagenssin puuttumisen vaikutuksen riippuvuutta näytteen B6-vitamiinitasosta haettiin tarkastella toisessa tutkimuskysymyksessä. Kuviolla 18 pystyttiin tarkastelemaan aiheuttaako esimerkiksi B6-vitamiinin puute suurempia eroja mitattujen ALAT-tulosten välille riippuen käytetystä P5P-reagenssin määrästä. Tuloksista ei saatu selvää vastausta B6-vitamiinin vaikutuksille ALAT-mittauksissa. Opinnäytetyössä käytetyistä näytteistä mukana oli vain kolme vertailukelpoista näytettä, joiden B6-vitamiinitaso oli alle viitearvojen (<51 nmol/l). Kirjallisuudessa (Stover & Field 2015; Liu ym. 2014) kerrotaan B6-vitamiinin aktiivisen muodon eli pyridoksaalifosfaatin (P5P) aktivoivan ALATin. Ja koska ALAT-mittauksessa mitataan juuri aktiivisen ALATin määrää on oletettavaa, että P5P-reagenssin puuttuminen vaikuttaa erityisesti juuri hyvin matalan B6-vitamiinitason näytteissä, joissa on valmiiksi puutteellinen määrä P5P:tä. Tällöin ALAT ei aktivoidu ja jää mittauksen ulkopuolelle.

Opinnäytetyössä mukana oli kuitenkin vain kolme vertailuun soveltuvaa näytettä, mikä on otoskokona liian pieni tulosten luotettavaan arviointiin. Näytteen test32 tulokset voisivat viitata matalan B6-vitamiinitason korostavan mittauksien välistä eroprosentti ja näin myös P5P-reagenssin puuttumisen vaikutuksia. Kahdella muulla matalan B6-vitamiinitason omaavalla näytteellä eroprosentit olivat kuitenkin lähellä keskimääräistä tulostaseroa. Näytteiden test23 ja test59 tulokset ovat ristiriidassa näytteen test32 tulosten kanssa. Viiterajoissa tai korkeammalla olevalla B6-vitamiinipitoisuudella ei vaikuta ole-

van selkeää merkitystä P5P-reagenssista johtuviin tulostasoeroihin. Mittauksien keskimääräiset tulostasoerot vaihtelevat hyvin laajasti myös saman B6-vitamiinipitoisuuden omaavilla näytteillä.

Näitä yksittäisiä tuloksia tarkastelemalla ei voida siis varmuudella todeta miten näytteen B6-vitamiinitaso vaikuttaa P5P-reagenssin puutteesta aiheutuvaan tulostasoeroon. Yksittäisiä näytteitä tarkasteltaessa esiintyy kahdenlaisia tuloksia. Näytteistä test23 ja test59 saadut tulokset tukevat väitettä, että näytteen B6-vitamiinitaso ei vaikuttaisi merkittävästi P5P-reagenssin puutteesta johtuvaan tulokseen. Näytteen test32 tulokset puolestaan osoittavat näytteen B6-vitamiinitasolla olevan vaikutusta P5P-reagenssin puutteesta johtuvaan tulostasoeroon. Jotta kysymykseen saataisiin luotettava vastaus tulisi koe toistaa laajemmalla otoskoolla.

## 6.2 Eettisyys

Opinnäytetyön eettisyyttä on hyvä pohtia pitkin opinnäytetyöprosessia. Eettisyys saa tutkijan pohtimaan, mikä on moraalisesti oikein tutkimuksen edetessä. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto, Arene ry, on säätänyt suositukset koskien opinnäytetyön eettisyyttä. Suositusten mukaan työn eettisyyttä ohjaa työn aikana tehdyt sopimukset osapuolten välillä, opiskelijan saama koulutus ja ohjaus, plagiointiohjelmien käyttö ja lain-säädäntö kuten tietosuojalaki sekä eettiset normistot. Opinnäytetyötä tehdessä tulee noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä ja välttää epärehellistä toimintaa, joka voisi esimerkiksi vaikuttaa tuloksiin. Hyvästä tieteellisestä käytännöstä on vuonna 2012 sovittu ohjeet suomalaisten tiedeyhteisöjen välillä. Yhteisöillä oli tavoitteena luoda eettisyyden ohjenuora, jota tieteilijät ja tutkijat kaikilla aloilla voivat noudattaa. (Kettunen & Kärki & Näreaho & Päällysaho 2019.)

Opinnäytetyötä tehdessä noudatettiin edellä mainittuja ohjeita ja suosituksia. Työlle hankittiin suunnitteluvaiheessa HUSLABin myöntämä tutkimuslupa. Tutkimuslupa tulee hakea aina, kun tutkimuksen kohteena ovat HUSin potilaat tai heistä otetut näytteet ja/tai hyödynnetään HUSin tiloja, laitteita tai henkilökuntaa tutkimuksessa. Tutkimusluvalla arvioidaan mm. työn eettisyyttä. (Tutkimuslupa, opinnäytetyön tutkimuslupa ja tietolupa.) Osapuolten välille laadittiin myös Metropolian sopimus opintoihin liittyvästä projektista, jossa määriteltiin muun muassa työn kesto sekä sen sisältö. Opinnäytetyössä saadut tulokset esitettiin mahdollisemman läpinäkyvästi ilman ulkopuolisia vaikutuksia. Käytetyt lähteet merkittiin selkeästi Metropolian kirjallisen työn ohjeita noudattaen. Plagioinnin estämiseksi opinnäytetyö palautettiin Turnitinin. Työstä löytyi 1 %:n verran samankaltai-

suuksia, jotka olivat pääasiassa liittojen nimistä ja työn etusivun asettelusta johtuvia. Plagioinnin osalta työ voidaan siis katsoa hyvin onnistuneeksi. Opinnäytetyössä kerätyt näytteet olivat pseudonymisoidut, eli näytteiden tietoja ei voida liittää henkilöön ilman lisätietoja. On hyvä kuitenkin ottaa huomioon tietosuojaa ja henkilötietojen käsittelyä koskevat lait ja suositukset. Henkilötietojen käsittely tarkoittaa mitä tahansa toimintaa, johon liittyy esimerkiksi henkilötietojen poistamista tai säilyttämistä. Niiden poistossa tulee noudattaa huolellisuutta ja varmistaa, ettei näytteitä voida jäljittää takaisin potilaisiin. (Henkilötietojen käsittely.)

### 6.3 Luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan mitata tarkkailemalla reliabiliteettia eli toistettavuutta ja validiteettia eli pätevyyttä. Tämän opinnäytetyön luotettavuutta lisää akkreditoitujen menetelmien käyttäminen. Näytteet analysoidaan samalla laitetypillä ja reagensseilla, jotka ovat käytössä potilasnäytteiden analysointiin HUSLABissa. Mittausmenetelmä on vakioitu ja menetelmän tulostasoa tarkastettu päivittäiskontrollien avulla, tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Tutkimuksen suorittamisen tarkka kuvaus ja saatujen tulosten avoin raportointi takaavat tutkimuksen toistettavuuden. Luotettavuuteen voi vaikuttaa näytteiden pitkäaikainen säilytys  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa, joka on voinut lisätä matalien ALAT-tulosten osuutta työssä. Säilytyksellä ei pitäisi olla vaikutusta mittausalueella oleviin tuloksiin, eikä tehtyihin vertailuihin, koska ALAT-aktiivisuudet mitattiin kaikki saman päivän aikana.

Työn tulosten luotettavuutta voi mahdollisesti heikentää liian suppea otos sekä tutkimuksen paikkakohtaisuus. On myös mahdollista, että tutkimuksen tulosten toistettavuus saattaa kärsiä otos koosta. Laajemmalla otoksella olisi mahdollista saada kattavampia tuloksia, jolloin erot mahdollisten toistettujen tutkimusten välillä olisivat pienemmät. Tutkimuksen pieni otosmäärä voi rajoittaa tutkimuksen soveltamista muihin tuleviin tutkimuksiin. Kyseisellä tutkimuksella on tarkoitus selvittää P5P-reagenssin käytön vaikutuksia ALAT-määrityksessä Siemens Healthineersin Atellica® Solution -analysaattoreilla. Tutkimuksen tuloksia ei siis voida luotettavasti suoraan soveltaa muihin analysaattoreihin tai muiden valmistajien reagensseihin, vaikkakin P5P-reagensilla on oletettavasti saman kaltaisia vaikutuksia samaa menetelmäperiaatetta käytävissä mittauksissa.

### 6.4 Kehittämisehdotukset ja ammatillinen kehittyminen

Opinnäytetyössä toteutetussa tutkimuksessa oli ideaalia suppeampi otoskoko. Koska ainoana näytteiden keräyskriteerinä oli B6-vitamiinin määrittäminen kolmen vuorokauden sisällä, ei näytteiden ALAT-tasoissa ollut suuria vaihteluja. Samankaltainen mittausvertailu

olisi hyvä suorittaa suuremmalla otoskoolla, näytteillä, joissa on korkeita sekä matalia ALAT-arvoja. Näin suoritettujen mittausvertailun tuloksien toistettavuus paranisi opinnäytetyössä toteutettuun mittaukseen verrattuna. Mittauksien kannalta olisi myös hyvä, jos kerättyjä näytteitä olisi säilytetty mahdollisimman vähän aikaa ja optimaalisessa lämpötilassa ALATin huonon säilyvyyden takia. P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistamisesta ei ole suoritettu juuri lainkaan tutkimuksia. Tulevaisuudessa olisi hyvä tutkia lisää myös P5P-reagenssin määrän kaksinkertaistamisen vaikutuksia. Opinnäytetyössä todettiin P5P-reagenssin puuttumisen vaikuttavan saatuun ALAT-tulokseen laskevasti. Olisi hyvä myös harkita työntekijöiden perehdyttämistä P5P-reagenssin oikeanlaiseen lisäämiseen ALTP Lc R1 -reagenssin joukkoon.

Opinnäytetyössä toteutetuissa mittauksissa oli mukana vain kolme näytettä, joissa B6-vitamiinitaso oli alle viitearvojen (<51 nmol/l). Jotta pystyttäisiin luotettavasti arvioimaan, miten P5P-reagenssin vaikutus ALAT-tulokseen on riippuvainen B6-vitamiinitasosta, olisi opinnäytetyössä toteutettu vertailu hyvä toistaa laajemmalla otoskoolla. Vertailuun olisi hyvä saada mukaan suurempi määrä alle viitearvojen olevia B6-vitamiinitasoja (<51 nmol/l). Laajemman vertailun avulla pystyttäisiin arvioimaan, kuinka B6-vitamiinitaso vaikuttaa P5P-reagenssin puutteesta aiheutuvaan eroon tuloksessa.

Opinnäytetyön tekeminen sujui koko prosessin ajan hyvin ja aikataulussa pysyttiin. Työn tavoitteet saavutettiin pääosin ja työ kehitti tekijäänsä alansa ammattilaisena. Työskentely yhteistyötahojen kanssa kehitti tärkeitä kommunikointi- ja yhteistyötaitoja. Opinnäytetyön toteutti yksi bioanalytikko-opiskelija. Yksin työskenteleminen opetti vastuuta ja itsenäisen työskentelyn taitoja. Opinnäytetyössä pääsi harjoittelemaan laajan kirjallisen työn sekä tieteellisen tekstin kirjoittamista. Työn tekemisessä vaadittiin kvantitatiivisen tutkimuksen periaatteiden osaamista ja työn toteutus opetti kuinka suorittaa tutkimuksellinen työ. Saatujen tulosten analysoiminen, käyttämällä Validation Manageri -ohjelmaa, lisäsi tuntemusta tilastollisista menetelmistä. Taulukoiden ja numeeristen arvojen tulkinta kehitti kriittistä ajattelua. Työn tekeminen syvensi jo hankittuja klinisen kemian tietoja ja taitoja. Lisäksi mittauksien suorittaminen laajensi osaamista käytetyn analysaattorin toiminnasta. Opinnäytetyöprosessiin kuuluvat seminaarit ja opponoinnit paransivat esiintymistaitoja ja siirsivät ajattelumaailmaa ammatillisempaan näkökulmaan.

## Lähteet

Bergmeyer, H. U. & Horder, M. & Rej, R. 1986. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 24 (7). 481–495. <[https://www.researchgate.net/profile/Robert-Rej/publication/282061414\\_Aproved\\_recommendation\\_1985\\_on\\_IFCC\\_methods\\_for\\_the\\_measurement\\_of\\_catalytic\\_concentration\\_of\\_enzymes\\_Part\\_2\\_IFCC\\_method\\_for\\_aspartate\\_aminotransferase\\_L-aspartate\\_2-oxoglutarate\\_aminotransferase\\_EC\\_/links/5746ee6d08ae9ace84264a87/Approved-recommendation-1985-on-IFCC-methods-for-the-measurement-of-catalytic-concentration-of-enzymes-Part-2-IFCC-method-for-aspartate-aminotransferase-L-aspartate-2-oxoglutarate-aminotransferase-EC.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Robert-Rej/publication/282061414_Aproved_recommendation_1985_on_IFCC_methods_for_the_measurement_of_catalytic_concentration_of_enzymes_Part_2_IFCC_method_for_aspartate_aminotransferase_L-aspartate_2-oxoglutarate_aminotransferase_EC_/links/5746ee6d08ae9ace84264a87/Approved-recommendation-1985-on-IFCC-methods-for-the-measurement-of-catalytic-concentration-of-enzymes-Part-2-IFCC-method-for-aspartate-aminotransferase-L-aspartate-2-oxoglutarate-aminotransferase-EC.pdf)>. Viitattu 15.6.2021.

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) 2019. Proficiency Testing Regulations Related to Analytes and Acceptable Performance. *Fed Reg* 2019 84. 1536–1567. <<https://www.federalregister.gov/d/2018-28363>>. Viitattu 18.11.2021.

Giavarina, Davide 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica* 25 (2). 141–151. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470095/>>. Viitattu 1.10.2021.

Gislefoss, Randi E. & Grimsrud, Tom K. & Mørkrid, Lars 2009. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (5). 596–603.

Henkilötietojen käsittely. Tietosuojavaltuutetun toimisto. Verkkodokumentti. <<https://tietosuoja.fi/henkilotietojen-kasittely>>. Viitattu 20.5.2021.

HUSLAB 2020. Kliinisen kemian analyttiset laatutavoitteet.

HUSLAB 2021a. Alaniiniaminotransferaasi, plasmasta. Tutkimusohjekirja. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1024.html>>. Viitattu 11.9.2021.

HUSLAB 2021b. B6-vitamiini, verestä, paastotilassa. Tutkimusohjekirja. <[https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=6080&terms=b6](https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=6080&terms=b6)>. Viitattu 11.9.2021.

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. About IFCC. Verkkosivusto. <<https://www.ifcc.org/about/>>. Viitattu 12.9.2021.

Kettunen, Jyrki & Kärki, Anne & Näreaho, Susanna & Päällysaho, Seliina 2019. Ammattikoerkeakoulujen Opinnäytetöiden eettiset suositukset. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. <[https://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%C3%84YTET%C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?\\_t=1578480382](https://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%C3%84YTET%C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?_t=1578480382)>. Viitattu 17.5.2021.

Lala, Vasimahmed & Goyal, Amandeep & Bansal, Pankaj & Minter, David A. 2021. Liver Function Tests. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482489/>>. Viitattu 12.9.2021.

Lawrence, J. & Saleem, M. & Coastes, P. & Petrou, T. & Bisazak, T. Addition of Pyridoxal Phosphate Cofactor To Aminotransferase Reagent Produces A Clinically Significant Increase In Measurement Of ALT And AST For Patients Who Are Deficient In The Cofactor. SA Pathology. <<https://www.aacb.asn.au/documents/item/3047>>. Viitattu 5.10.2021.

Lee, Jee-Soo & Lee, Kyunghoon & Kim, Sung Min & Choi, Moon Suk & Jun, Sun Hee & Song, Woon Heung & Song, Sang Hoon & Park, Kyoung Un & Song, Junghan 2017. Effects of Pyridoxal-5'-Phosphate on Aminotransferase Activity Assay. Lab Med Online 7 (3). 128–134. <<https://labmedonline.org/journal/list.html?key1=title&keyword1=Effects+of+Pyridoxal-5%E2%80%B2-Phosphate+on+Aminotransferase+Activity+Assay&oper2=and&key2=author&keyword2=&oper3=and&key3=keywords&keyword3=&oper4=and&key4=abstract&keyword4=&year1=&year2=&TG=&pn=search>>. Viitattu 17.5.2021.

Liu, Zhengtao & Que, Shuping & Xu, Jing & Peng, Tao 2014. Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept: A Review. International Journal of Medical Sciences 11 (9). 925–935. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4081315/>>. Viitattu 20.5.2021.

Mathew, Joscilin & Sankar, Parvathy & Varacallo, Matthew 2021. Physiology, Blood Plasma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>>. Viitattu 30.9.2021.

Mills, John R. & Greene, Dina N. & Bainton, James & Lorey, Thomas S. & Baumann, Nikola A. 2015. Fluctuating Serum Aspartate Aminotransferase Activity in a Complicated Pregnancy. Clinical Case Study. Clinical Chemistry 61 (10). 1241–1245. <[https://www.researchgate.net/publication/282430441\\_Fluctuating\\_Serum\\_Aspartate\\_Aminotransferase\\_Activity\\_in\\_a\\_Complicated\\_Pregnancy](https://www.researchgate.net/publication/282430441_Fluctuating_Serum_Aspartate_Aminotransferase_Activity_in_a_Complicated_Pregnancy)>. Viitattu 17.5.2021.

Roni, Saiyidi & Merga, Margaret & Morris, Julia 2020. Conducting Quantitative Research in Education. Springer. Springer Nature Singapore Pte Ltd. E-kirja. 7–11.

Sharma, Lokesh K. & Baruah, Ankur & Thakur, Bhaskar & Mohapatra, Himanshu & Sharma, Neera 2014. Effects of pyridoxal phosphate in analysis of aminotransferase activity in patients undergoing hemodialysis. The Indian Journal of Basic and Applied Research (IJBAR) 5 (5). 226–229. <[https://www.researchgate.net/publication/298353509\\_Effects\\_of\\_pyridoxal\\_phosphate\\_in\\_analysis\\_of\\_aminotransferase\\_activity\\_in\\_patients\\_undergoing\\_hemodialysis](https://www.researchgate.net/publication/298353509_Effects_of_pyridoxal_phosphate_in_analysis_of_aminotransferase_activity_in_patients_undergoing_hemodialysis)>. Viitattu 27.9.2021.

Siemens Healthineers 2019. Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc). Menetelmäperiaatteen ohje.

Stover, Patrick J & Field, Martha S 2015. Vitamin B-6. Advances in Nutrition 6 (1). 132–133. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288272/>>. Viitattu 18.5.2021.

Tarrant, Jacqueline & Meyer, Denny & Katavolos, Paula 2013. Use of optimized aminotransferase methods in regulated preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology* 42 (4). 535–538. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/vcp.12082>>. Viitattu 18.5.2021.

Theodorsson, Elvar 2016. Quality Assurance in Clinical Chemistry: A Touch of Statistics and A Lot of Common Sense. *Journal of Medical Biochemistry* 35 (2). 103–112. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346785/>>. Viitattu 10.10.2021.

Tutkimuslupa, opinnäytetyön tutkimuslupa ja tietolupa. HUS. <<https://www.hus.fi/tutkimus-ja-opetus/tutkijan-ohjeet/tutkimuslupa-opinnaytetyon-tutkimuslupa-ja-tietolupa>>. Viitattu 13.10.2021.

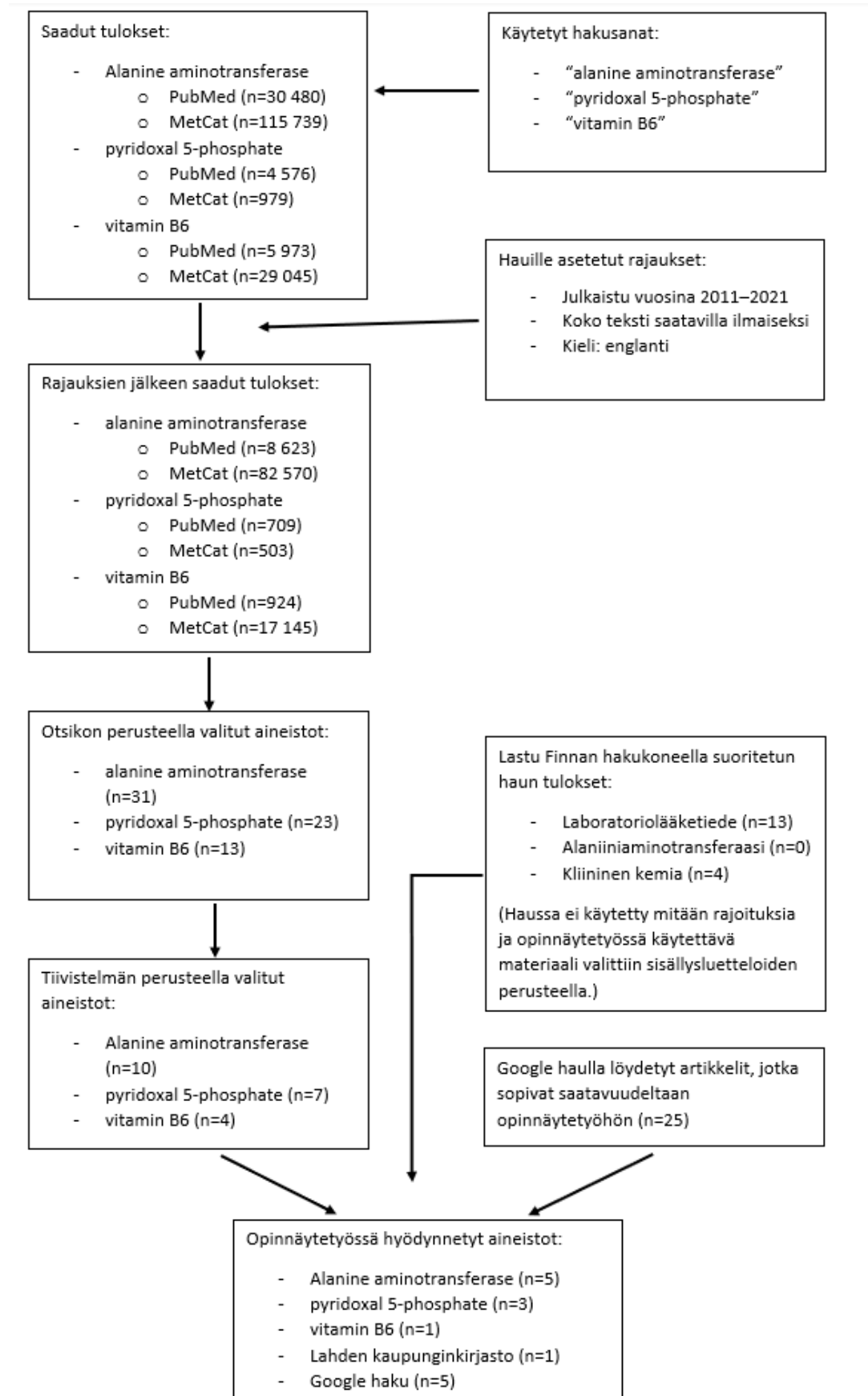
Valtioneuvoston asetus yliopistojen tutkinnoista 794/2004. Annettu Helsingissä 19.8.2004. <<https://finlex.fi/fi/laki/alkup/2004/20040794>>. Viitattu 11.10.2021.

Williams, K.M. & Williams, Alan E. & Kline, Linda M. & Dodd, Roger Y. 1987. Stability of serum alanine aminotransferase activity. *The Journal of AABB. Transfusion* 27 (5). 431–433.

Wang, Lili & Hoffman, Robert 2017. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* 79. 1.3.1–1.3.27. <[https://tsapps.nist.gov/publication/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=921423](https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=921423)>. Viitattu 12.10.2021.

Åkerman, Kari & Jokela, Hannu 2010. Entsymaattiset menetelmät. Teoksessa Niemelä, Onni & Pulkki, Kari (toim.). *Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia*. 3.painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 67–69.

## Tiedonhaku



## Mitatut ALAT-tulokset ja ero prosentit

Näyte tunniste	ALAT tulos	ilman P5P	2 x P5P	vakioitu ilman P5P	B6-vitamiini tulos	ilman P5P ero%	2 x P5P ero%	vakiointi ilman P5P ero%
test1	< 9,0	< 9,0		9,4 < 9,0	83	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test2	21,8	19,7	25,7	17,8	613	-9,6 %	17,9 %	-18,3 %
test3	10,9	9,9	12,3 < 9,0		255	-9,2 %	12,8 %	#VALUE!
test4	< 9,0	< 9,0	9,5 < 9,0		66	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test5	9,8	10	13,9	11,9	62	2,0 %	41,8 %	21,4 %
test6	9,1 < 9,0		11,7 < 9,0		212	#VALUE!	28,6 %	#VALUE!
test7	< 9,0	9,1	11,2 < 9,0		50	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test8	< 9,0	< 9,0	9,3 < 9,0		57	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test9	31	24,5	32,9	22,9	129	-21,0 %	6,1 %	-26,1 %
test10	26,1	20,1	27,9	19,8	93	-23,0 %	6,9 %	-24,1 %
test11	14,2	12,3	16	12	289	-13,4 %	12,7 %	-15,5 %
test12	16,3	17,3	19,7	20,4	90	6,1 %	20,9 %	25,2 %
test13	39,2	30,1	40	28,7	103	-23,2 %	2,0 %	-26,8 %
test14	37,6	32,1	40,2	32,4	84	-14,6 %	6,9 %	-13,8 %
test15	14,2	13	14,9	12	144	-8,5 %	4,9 %	-15,5 %
test16	10,2 < 9,0		12,2 < 9,0		78	#VALUE!	19,6 %	#VALUE!
test17	< 9,0	< 9,0	9,3 < 9,0		130	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test18	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0	209	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test19	145,6	148	175,4	214,8	747	1,6 %	20,5 %	47,5 %
test20	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test21	39,3	36,3	41,5	34,6	110	-7,6 %	5,6 %	-12,0 %
test22	17,1	14,5	19,2	13,5	109	-15,2 %	12,3 %	-21,1 %
test23	31,7	29,2	35,5	31,8	45	-7,9 %	12,0 %	0,3 %
test24	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0	141	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test25	17	16,9	21,9	19,6	129	-0,6 %	28,8 %	15,3 %
test26	11,5	11	14,2 < 9,0		928	-4,3 %	23,5 %	#VALUE!
test27	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0	159	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test28	< 9,0	9,8	10 < 9,0		277	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test29	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0	71	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test30	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0	79	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!

Liite 2

2 (3)

test31	< 9,0		9,3	10,8 < 9,0		64	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test32		17,5	11,1	14,6	11,3	36	-36,6 %	-16,6 %	-35,4 %
test33		24,3	21,2	26,5	19,9	160	-12,8 %	9,1 %	-18,1 %
test34	< 9,0	< 9,0		9,6 < 9,0		1320	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test35	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		218	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test36	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		82	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test37	< 9,0	< 9,0		9,3 < 9,0		55	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test38	< 9,0	< 9,0		11,4 < 9,0		83	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test39		31	25,4	32,7	24,5	64	-18,1 %	5,5 %	-21,0 %
test40	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		55	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test41	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		172	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test42		19,6	17,2	22,5	15	98	-12,2 %	14,8 %	-23,5 %
test43		23,6	20,9	25,7	18,5	129	-11,4 %	8,9 %	-21,6 %
test44		14,6	12,6	16,4	12,1	459	-13,7 %	12,3 %	-17,1 %
test45	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		68	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test46	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		252	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test47		9,2	9,4	11,3 < 9,0		120	2,2 %	22,8 %	#VALUE!
test48	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		111	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test49		15,8	11,9	16,9	10,7	116	-24,7 %	7,0 %	-32,3 %
test50		10,9	9,9	13,9 < 9,0		89	-9,2 %	27,5 %	#VALUE!
test51		32,2	27,7	33,7	26,4	127	-14,0 %	4,7 %	-18,0 %
test52		19,7	17,7	22,4	16	1001	-10,2 %	13,7 %	-18,8 %
test53		12,2	11,4	17,5	9,4	123	-6,6 %	43,4 %	-23,0 %
test54	< 9,0	< 9,0		9,3 < 9,0		82	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test55		15,5	13,9	17	12,5	102	-10,3 %	9,7 %	-19,4 %
test56		19,2	16,8	23	17,9	82	-12,5 %	19,8 %	-6,8 %
test57		27,3	22,7	28,4	21,6	613	-16,8 %	4,0 %	-20,9 %
test58		9,8	10,3	13 < 9,0		223	5,1 %	32,7 %	#VALUE!
test59		23,3	20,6	26,5	18,3	48	-11,6 %	13,7 %	-21,5 %
test60		9,8 < 9,0		13,7 < 9,0		131	#VALUE!	39,8 %	#VALUE!

Liite 2

3 (3)

test61		10,5	9,8	13,4 < 9,0		228	-6,7 %	27,6 %	#VALUE!
test62	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		77	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test63		54,1	44,5	53,1	44,3	108	-17,7 %	-1,8 %	-18,1 %
test64	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		302	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test65		9,2 < 9,0		12,3 < 9,0		618	#VALUE!	33,7 %	#VALUE!
test66		10,6 < 9,0		12,8 < 9,0		140	#VALUE!	20,8 %	#VALUE!
test67		26,2	21,6	27,6	20,7	95	-17,6 %	5,3 %	-21,0 %
test68		10,7	9,9	13,8 < 9,0		146	-7,5 %	29,0 %	#VALUE!
test69	< 9,0	< 9,0	< 9,0	< 9,0		285	#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!
test70		17,3	15	19,6	14	179	-13,3 %	13,3 %	-19,1 %
ALAT1		76,6	69,2		67,2		-9,7 %		-12,3 %
ALAT2		77	68,1		66,6		-11,6 %		-13,5 %
ALAT3		63,6	58,4		56,4		-8,2 %		-11,3 %
ALAT4		43,8	40,2		38,5		-8,2 %		-12,1 %
ALAT5		48,8	42,8		41,4		-12,3 %		-15,2 %
ALAT6		99	86,9		86,5		-12,2 %		-12,6 %
ALAT7		39,5	31		29,8		-21,5 %		-24,6 %
ALAT8		101,5	88,9		87,7		-12,4 %		-13,6 %
ALAT9		146	133,5		129,5		-8,6 %		-11,3 %
ALAT10		103,1	88,3		86,4		-14,4 %		-16,2 %
ALAT11		233,6	190,2		187,70		-18,6 %		-19,6 %
ALAT12		72,1	65,6		63,4		-9,0 %		-12,1 %
ALAT13		150,6	138,9		137,9		-7,8 %		-8,4 %
ALAT14		202,1	178,2		176,4		-11,8 %		-12,7 %
ALAT15		291,4	257,1		255,8		-11,8 %		-12,2 %
ALAT16		97,6	81,3		78,9		-16,7 %		-19,2 %
ALAT17		186,5	165,8		164,6		-11,1 %		-11,7 %
ALAT18		83,5	75		73,2		-10,2 %		-12,3 %
ALAT19		202,5	181,9		180,9		-10,2 %		-10,7 %
ALAT20		195,5	179,7		178,7		-8,1 %		-8,6 %
ALAT21		137,5	117,4		114,9		-14,6 %		-16,4 %
ALAT22		93,1	82,8		82		-11,1 %		-11,9 %
ALAT23		68	58,8		57,4		-13,5 %		-15,6 %
ALAT24		74,8	64		62,9		-14,4 %		-15,9 %
ALAT25		166,5	149,5		148,7		-10,2 %		-10,7 %