



K₂EDTA-ANTIAGOAGULANTIN SOPIVUUS PLASMAN PARATHORMONIMÄÄRITYKSEEN

Fimlab Laboratoriot Oy:lle

Mia Ahtialansaari

Satu Kumpulainen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2013
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
10SBIO

MIA AHTIALANSAARI & SATU KUMPULAINEN:
K₂EDTA-antikoagulantin sopivuus plasman parathormonimääritykseen
Fimlab Laboratoriot Oy:lle

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 11 sivua
Lokakuu 2013

Parathormoni on 84 aminohaposta muodostuva lisäkilpirauhashormoni. Parathormonin määrittäminen on tarpeellista selvitetäessä tai seurattaessa hyper- tai hypokalsemiaa, munuaisten vajaatoimintaa sekä luuston ja hivenaineiden aineenvaihdunnan häiriöitä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n automaation vastuualueelle uutta tietoa parathormoninäytteenotosta ja parathormoninäytteiden säilytyksestä. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, kuinka yhteneväisiä tuloksia saadaan K₃- ja K₂EDTA-näytteenottoputkista parathormonimäärityksissä. Lisäksi opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, tapahtuuko parathormonipitoisuuksissa muutosta säilytettäessä näytteitä kokoverenä huoneenlämmössä kuuden tunnin ajan.

Parathormoninäytteitä kerättiin potilailta kolmeen putkeen, joista kaksi oli K₂EDTA-antikoagulanttia sisältäviä putkia ja yksi K₃EDTA-antikoagulanttia sisältävä putki. K₃- ja toinen K₂EDTA-näyteputki sentrifugoitiin ja plasma eroteltiin mahdollisimman pian näytteenottohetkestä. Näiden kahden putken plasmasta saatuja tuloksia verrattiin keskenään ja vertailtavia näytteitä oli 32 näyteparia. Kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta toinen K₂EDTA-näyteputki, joka oli säilytetty huoneenlämmössä, sentrifugoitiin ja eroteltiin. Näistä näytteistä saatuja tuloksia verrattiin mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen sentrifugoiduista K₂EDTA-plasmasta saatuihin tuloksiin. Säilyvyyden osalta vertailtavia näytteitä oli 47 näyteparia. Kaikki näytteet määritettiin samalla Cobas® 6000 -analysaattorilla, elektrokemiluminometrisella immunoanalyysillä.

Tulokset käsiteltiin ja analysoitiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmalla ja ohjelmaa käytettiin laskentaan sekä diagrammien ja kuvaajien piirtämiseen. Tulokset K₃- ja K₂EDTA-näyteputkien välillä olivat yhtenevät, normaaleja satunnaispoikkeamia lukuun ottamatta. Niiden välinen korrelaatiokerroin oli 0,9982. Myös kuuden tunnin jälkeen sentrifugoitujen näytteiden tulokset olivat yhtenevät mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen sentrifugoitujen näytteiden kanssa. K₂- ja 6h-K₂EDTA-tulosten osalta korrelaatiokerroin oli 0,9941 koottuamme tammikuun ja maaliskuun tulokset yhteen.

Saatujen tulosten perusteella K₂EDTA-antikoagulantti sopii parathormoninäytteenottoon. Tuloksiin perustuen tehtiin myös johtopäätös, että parathormoninäyte säilyy huoneenlämmössä kuusi tuntia sentrifugoimattomana kokoverinäytteenä. Fimlab Laboratoriot Oy päivitti ohjekirjaansa niin, että parathormoninäyte voidaan ottaa myös K₂EDTA-näyteputkeen. Jatkotutkimusaiheeksi sopisi parathormoninäytteiden esikäsittelyajan pidentäminen esimerkiksi kahteentoista tuntiin.

Asiasanat: parathormoni, K₂- ja K₃EDTA näyteputkien vertailu, K₂EDTA näytteen säilyvyys

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

MIA AHTIALANSAARI & SATU KUMPULAINEN:
Suitability of K₂EDTA Anticoagulant in Parathyroid Hormone Assay
For Fimlab Medical Laboratories Ltd.

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 11 pages
October 2013

The objective of this study was to produce more knowledge about parathyroid hormone sampling and preservation for automation unit of Fimlab Medical Laboratories Ltd. The purpose of this study was to find out how consistent results can be obtained in parathyroid hormone assay with K₃- and K₂EDTA sample tubes. Another purpose of this study was to find out possible alteration in parathyroid hormone concentration when parathyroid hormone samples were not centrifuged but left to stand as whole blood in room temperature for six hours.

Parathyroid hormone samples were collected from the patients into three sample tubes, out of which two were K₂EDTA- and one K₃EDTA anticoagulant sample tubes. K₃EDTA and the other K₂EDTA sample tube were centrifuged and plasma was separated as soon as possible after the sampling. The other K₂EDTA sample tube was centrifuged and separated after six hours after sampling.

The results between K₃- and K₂EDTA anticoagulant were congruent and indicated that K₂EDTA sample tubes are suitable for parathyroid hormone sampling. Neither did the results from the K₂EDTA samples centrifuged after six hours differ from the K₂EDTA samples centrifuged soonest possible. In conclusion parathyroid hormone samples can be preserved six hours without centrifugation in room temperature.

Key words: parathyroid hormone (PTH), comparison of K₂- and K₃EDTA sample tubes, preservation of K₂EDTA sample

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	PARATHORMONI.....	8
	2.1 Rakenne	8
	2.2 Aineenvaihdunta	10
	2.3 Kliininen merkitys	11
	2.4 Laboratoriotutkimukset.....	12
3	ETYLEENIDIAMIINITETRAETIKKAHAPPO (EDTA)	13
4	ROCHEN COBAS 6000® -ANALYSAATTORI	15
	4.1 Analysointiyksikkö e 601	16
	4.2 Esikäsittelylinjasto MPA	18
5	ELEKTROKEMILUMINOMETRINEN IMMUNOANALYYSI (ECLIA) PARATHORMONIMÄÄRITYKSESSÄ	20
	5.1 Periaate.....	21
	5.2 Parathormonimäärityksen suoritus	23
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT	24
7	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	25
	7.1 Otanta.....	25
	7.2 Korrelaatiokerroin.....	27
8	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	28
	8.1 Näytteiden keräys ja käsittely	28
	8.2 Näytteiden analysointi	31
	8.3 Parathormonitulosten käsittely	32
9	OPINNÄYTETYÖN TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA	34
	9.1 Parathormonitulosten yhteneväisyys K_3 - ja K_2 EDTA-plasmasta mitattuna.....	35
	9.2 Parathormonin säilyvyys K_2 EDTA-näyteputkessa.....	35
	9.3 Yhteenveto	35
10	POHDINTA.....	37
	LÄHTEET	43
	LIITTEET	46
	Liite 1. Tulostaulukko tammikuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista sekä tuloksista lasketut erotukset ja eroprocentit.	46
	Liite 2. Pylväsdiagrammi tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.	47
	Liite 3. Erotuskuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA- näytteiden tuloksista.	48

Liite 4. Eroprosenttikuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.	49
Liite 5. Korrelaatiokuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.	50
Liite 6. Tulostaulukko maaliskuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista ja preanalytiikan muistiinpanoista.	51
Liite 7. Tulostaulukko tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista sekä tuloksista lasketut erotukset ja eroprosentit.	52
Liite 8. Pylväsdiagrammi tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.....	53
Liite 9. Erotuskuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.	54
Liite 10. Eroprosenttikuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.....	55
Liite 11. Korrelaatiokuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.....	56

1 JOHDANTO

Laboratorioprosessiin ja sen laatuun vaikuttavat monet eri tekijät ja se on hyvin laaja kokonaisuus. Itse analyysin ohella tärkeäksi osaksi muodostuu pre- ja postanalytiikka, jotka vaikuttavat suuressa määrin prosessin onnistumiseen ja luotettavuuteen. Ilman laadukasta näytettä ei ole laadukasta tutkimusta. Näyte tulee ottaa oikeasta paikasta, oikeaan aikaan ja oikealla tavalla. (Liimatainen 2010.) Laboratoriohenkilökunnan tulee varmistaa potilaan oikea valmistautuminen, oikean näytteen ottaminen ja näytteen oikea käsittely.

Näytteitä otettaessa täytyy tietää tutkimukseen tarvittava näytemuoto (esimerkiksi kokoveri verrattuna plasmaan), näyteputki ja sen säilöntäaine tai antikoagulantti, näytemäärä sekä näytteen ja säilöntäaineen tai antikoagulantin suhde. Kun tarvitaan kokoveri tai plasmaa, hyytyminen estetään sopivalla antikoagulantilla, joista käytetyimpiä kliinisissä laboratorioissa ovat etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA), sitraatti ja hepariini. Antikoagulantin valinta on tärkeää, ettei se häiritse mittausta tai tule mitatuksi analyysin ohella. (Tapola 2004, 25.)

Antikoaguloidun (EDTA) kokoveren joutuessa *in vitro* alkaa siinä välittömästi tapahtua muutoksia, jotka kliinisissä laboratorioissa halutaan estää (Turgeon 2007, 50). Tämän johdosta täytyy huolehtia, ettei veri hyydy, eivätkä sen halutut komponentit ja analyytit muutu näytteenottohetkestä. Näytteen säilyttäminen kylmässä laskee solujen metabolista aktiivisuutta (Fremgen & Blume 2001, 178). Tämän vuoksi parathormoni tulisi ottaa kylmänäytteenottona ja säilyttää kylmässä, jos näytteet saapuvat laboratorioon kauempaa.

Opinnäytetyössämme testaamme K₂EDTA-antikoagulantin sopivuutta plasman parathormonimääritykseen sekä parathormonin säilyvyyttä K₂EDTA-näyteputkessa. Tavoitteenamme on tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n automaation vastuualueelle uutta tietoa, jota voidaan hyödyntää ohjekirjan päivityksessä parathormonin näytteenoton ja säilytyksen osalta. Opinnäytetyömme tarkoituksena on määrittää parathormonia elektrokemiluminometrisesti (ECLIA= electrochemiluminescence immunoassay) ja selvittää, onko tulostaso yhtenevä K₃- ja K₂EDTA-putkien kesken, sekä K₂- ja 6h-K₂EDTA:n

tulostasojen yhteneväisyys kuuden tunnin huoneenlämmössä säilytyksen jälkeen parathormonimäärittelyksissä.

Toimeksiantajamme on Fimlab Laboratoriot Oy:n automaation vastuualue, joka haluaisi siirtyä käyttämään K_2EDTA -antikoagulanttia parathormoninäytteenotossa nykyisen K_3EDTA -antikoagulantin sijaan. Siirtyminen K_2EDTA -antikoagulanttiin nopeuttaisi analysointia ja vähentäisi manuaalista työtaakkaa, koska Fimlab Laboratoriot Oy:llä käytössä olevat K_2EDTA -näyteputket voi laittaa suoraan esikäsitteilylinjastolle. K_3EDTA -näyteputkia ei voi suoraan laittaa esikäsitteilylinjastolle niiden pienen näytemäärän vuoksi, vaan niistä täytyy erotella plasma manuaalisesti. Lisäksi Fimlab Laboratoriot Oy halusi tuloksia K_2EDTA -näyteputken sopivuudesta, koska joistakin hoitoyksiköistä näytteitä tulee K_2EDTA -näyteputkissa. Muut verinäytteitä ottavat ammattiryhmät kuin laboratoriohenkilökunta eivät välttämättä ymmärrä EDTA-näyteputkien eroja ja niiden vaikutuksia tutkittavaan analyyyttiin.

Fimlab Laboratoriot Oy halusi myös tietää, säilyykö parathormoninäyte kokoverenä ilman esikäsitteilyä kuusi tuntia. Toimeksiantajamme ohjekirjan mukaan parathormoninäyte tulisi sentrifugoida mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen, mikä aiheuttaa ongelmia kauempaa tulevien näytteiden sentrifugoinnin sekä kuljetuksen järjestämisessä. Työmme on suunnattu laboratoriohoitajille, kemisteille ja Fimlab Laboratoriot Oy:n henkilökunnalle sekä Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opiskelijoille.

2 PARATHORMONI

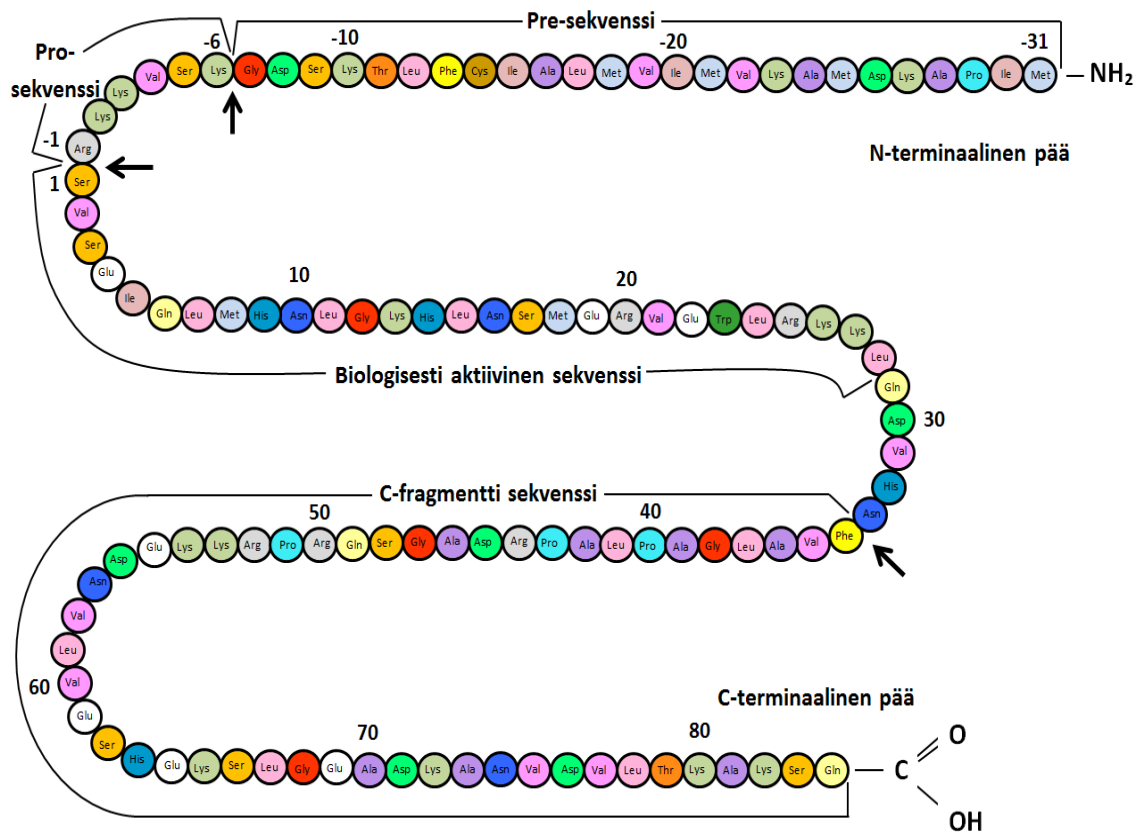
Opinnäytetyössämme käsittelemme 84 aminohaposta koostuvaa parathormonia, jolla tarkoitamme intaktia (i.e. koskematon, kokonainen) parathormonia. Parathormoni on lisäkilpirauhasen tuottama hormoni ja sillä on tärkeä rooli elimistön mineraaliaineenvaihdunnassa. Lisäkilpirauhasen tärkein tehtävä on toimia mineraaliaineenvaihdunnan säätelijänä. Lisäkilpirauhasia on neljä ja ne sijaitsevat lähellä kilpirauhasen takapintaa, nielun ja ruokatorven takana (Välimäki & Mäkitie 2009, 272). Kilpirauhasiin verrattuna lisäkilpirauhaset ovat hyvin pienikokoiset.

2.1 Rakenne

Parathormonia (PTH) syntetisoidaan pre-pro-PTH:sta, joka koostuu 115 aminohaposta. Kuviossa 1 on esitetty pre-pro-parathormoni, jonka sekvenssit ovat N-terminaalista päästä lähtien lueteltuina: pre-sekvenssi 25 aminohappoa, pro-sekvenssi 6 aminohappoa, biologisesti aktiivinen sekvenssi 28 aminohappoa, 5 väliaminohappoa ja C-fragmentti sekvenssi 51 aminohappoa. Pre-pro-parathormoni voi pilkkoutua kolmesta eri kohdasta, jotka ovat esitetty nuolilla kuviossa 1. Varsinainen parathormoni koostuu 84 aminohaposta, sisältäen biologisesti aktiivisen sekvenssin, väliaminohapot ja C-fragmentti sekvenssin, jotka muodostavat 9425 daltonia painavan proteiinihormonin. Varsinaisen parathormonin pilkkoutuessa N-terminaaliseen fragmenttiin ja C-fragmentti sekvenssiin, välissä olevat viisi aminohappoa kuuluvat biologisesti aktiivisen sekvenssin kanssa samaan ketjuun eli N-terminaaliseen fragmenttiin. (Endres & Rude 2006, 1912–1913.)

Kun pre-pro-parathormonista leikataan pre-sekvenssi pois (kuvio 1, sivu 9), jäljelle jää pro-parathormoni. Pro-parathormonista muodostuu parathormoni leikkaamalla pro-sekvenssi pois (kuvio 1, sivu 9). Parathormoni varastoidaan eritysrakkuloihin ja -granuloihin odottamaan sen käyttöä. (Isales 2009, 30–31; Välimäki & Mäkitie 2009, 272–275.) Lisäkilpirauhasista parathormoni kulkeutuu kohdekudoksiin, joiden solukalvoilla on parathormonin transmembraaniset reseptorit. Luustossa reseptoreja on osteoblasteissa ja sen esiasteissa, munuaisissa on omat reseptorit ja suolistossa reseptoreja ei

ole, vaan vaikutus on epäsuoraa. (Endres & Rude 2006, 1913; Välimäki & Mäkitie 2009, 272–275.)



KUVIO 1. Ihmisen pre-pro-parathormoni sekvensseineen ja leikkauskohtineen (mukail-
len lähteestä Strewler & Rosenblatt 1995, 1411)

Synteettinen parathormoni (aminohapot 1–34) sitoutuu ja aktivoi parathormonireseptoreja samalla lailla kuin parathormoni (84 aminohappoa). Lisäksi parathormonireseptoreihin kiinnittyy parathormonin kaltainen peptidi (PTHrP), jolla on paljon tehtäviä kalsiumaineenvaihdunnan fysiologisessa säätelyssä. Parathormonilla ja parathormonin kaltaisella peptidillä on kolmestatoista ensimmäisestä aminohaposta suurin osa (8–9) yhteisiä, siksi PTHrP kykenee kiinnittymään ja aiheuttamaan aktivaation parathormonireseptoreihin. Normaalisti aikuisilla PTHrP:ä on ihossa, hiuksissa, monissa eri sileän lihaksen kudoksissa ja keskushermostossa. Kasvainsairauksissa se kulkeutuu verenkierron mukana luustoon ja munuaisiin eli parathormonin kohdekudoksiin, toimii kuten parathormoni sitoutumalla parathormonireseptoriin ja aiheuttaa hyperkalsemian. (Endres & Rude 2006, 1913, 1928; Välimäki & Mäkitie 2009, 275–276.)

2.2 Aineenvaihdunta

Parathormonisynteesi tapahtuu solunsisäisesti lisäkilpirauhasessa, jossa tuotetaan aluksi pre-pro-parathormonia. Pre-sekvenssi kuljettaa prekursorin endoplasmakalvoston vesikkelin sisälle. Pre- ja pro-sekvenssit pilkotaan pois entsyymaattisesti ennen kuin parathormoni etenee Golgin laitteelle pakattavaksi. Prosessoinnin jälkeen parathormoni voidaan joko erittää lisäkilpirauhasesta, säilyttää tai muokata edelleen solun sisäisesti. Parathormonia erittyy verenkiertoon kokonaisuutena 1–84 pääkomponenttina sekä lyhyempänä C-terminaalisen fragmentin ja välialueen aminohapot sisältävänä sekvenssinä. Myös pro-parathormonia voi erittyä hyvin pieniä määriä verenkiertoon. (Endres & Rude 2006, 1913–1914; Bringhurst, Demay & Kronenberg 2008, 1205, 1208.)

Intaktin parathormonin puoliintumisaika on noin kaksi minuuttia verenkierrossa. Biologisesti aktiivisen N-terminaalisen fragmentin elinikä on vain muutaman minuutin ja pro-PTH muokataan verenkierrosta heti parathormoniksi. (Klemm & Klein 2007, 174.) Parathormonin metabolia tapahtuu maksassa, missä parathormoni pilkotaan biologisesti aktiiviseen sekvenssiin ja C-terminaaliseen fragmenttiin. Parathormoni poistuu myös osittain munuaisten kautta, aivan kuten inaktiiviset C-terminaaliset fragmentitkin. C-terminaalisten fragmenttien puoliintumisaika on alle tunnin ja niiden määrä sekä puoliintumisaika kasvavat merkittävästi munuaisten vajaatoiminnassa. (Endres & Rude 2006, 1914; Bringhurst ym. 2008, 1208.)

Parathormoni yhdessä D-vitamiinin ja kalsitoniinin kanssa pitää kalsium- ja fosfaattitasot vakaina luustossa sekä solun ulkoisessa nesteessä. Lisäksi ne yhdessä lisäävät kalsiumin imeytymistä suolistosta sekä fosfaatin eritystä munuaisten kautta. Parathormonin ja kalsitoniinin vuorovaikutus keskenään takaa veren kalsiumpitoisuuden muuttumattomuuden. Parathormonin eritystä inhiboi korkea kalsiumpitoisuus ja sen eritystä puolestaan lisää matala kalsiumpitoisuus. Parathormonin synteesiin ja eritykseen vaikuttaa pääsääntöisesti ionisoitunut kalsium, mutta myös fosfaatti, magnesium ja 1,25-D-vitamiini. (Klemm & Klein 2007, 174.) Luustossa parathormoni vaikuttaa suoraan osteoblasteihin muuttaen niiden aktiivisuutta tai määrää. Osteoklasteihin parathormoni vaikuttaa epäsuorasti osteoblastien aktiivisuuden kautta. (Endres & Rude 2006, 1914.)

2.3 Kliininen merkitys

Parathormonia määritetään hyperkalsemian selvittelyssä. Lisäksi parathormonin määrittäminen on tarpeellinen selvitettäessä tai seurattaessa hypokalsemiaa, munuaisten vajaatoimintaa sekä luuston ja hivenaineiden aineenvaihdunnan häiriöitä. (Endres & Rude 2006, 1915.) Lisäkilpirauhassairaudet, kohonneet tai alenneet kalsiumtasot (hyperkalsemia ja hypokalsemia), voivat johtua parathormonin erityksen muutoksista (Klemm & Klein 2007, 176–178).

Lisäkilpirauhasen liikatoiminta eli hyperparatyreoosi tarkoittaa parathormonin liikaeritystä. Hyperparatyreoosipotilailla ilmenee osteoporoosia, munuaisten vajaatoimintaa, munuaiskiviä ja patologisia murtumia. Hyperparatyreoosi voi johtua joko primaarisesta, sekundaarisesta tai tertiaarisesta syystä. Primaarinen hyperparatyreoosi on hyperkalsemian yleisin syy ja johtuu lisäkilpirauhasen viallisesta toiminnasta. (Smith & Stack 2009, 184.) Yleisin primaarisen hyperparatyreoosin aiheuttaja on yksittäinen lisäkilpirauhasadenooma ja muita syitä voivat olla useammat kuin yksittäiset lisäkilpirauhasadenoomat, lisäkilpirauhasen liikakasvu sekä harvemmin lisäkilpirauhaskarsinooma. Sekundaarinen hyperparatyreoosi johtuu muista patologisista tiloista, kuten esimerkiksi D-vitamiinin puutoksesta, munuaisten vajaatoiminnasta tai pseudohypoparatyreoosista. (Klemm & Klein 2007, 176–177; Smith & Stack 2009, 184–188.) Tertiaarinen hyperparatyreoosi voi kehittyä sekundaarista hyperparatyreoosia sairastaville potilaille, joilla sekundaarisen hyperparatyreoosin syy on hoidettu. Vaikka potilaan ei tulisi enää sairastaa hyperparatyreoosia, se silti jatkuu hoidosta huolimatta. (Smith & Stack 2009, 184.)

Lisäkilpirauhasen vajaatoiminta eli hypoparatyreoosi puolestaan johtaa alentuneeseen parathormonitasoon, joka taas aiheuttaa hypokalsemian. Oireina hypoparatyreoosipotilailla on lihasheikkoutta, vapinaa, kouristuksia ja pahimmillaan se voi johtaa sydämen pysähtymiseen. (Penttilä 2004, 129–130.) Hypoparatyreoosi voi olla perinnöllinen tai hankittu. Perinnöllinen hypoparatyreoosi voi johtua idiopaattisesta hypoparatyreoosista tai perinnöllisestä autoimmuunisyndroomasta, johon liittyy usean elimen toiminnan puutos. Hankittujen hypoparatyreoosien syinä ovat lisäkilpirauhasen poisto tai muut kaulan alueen leikkauksissa tapahtuneet vahingot, joita nykyään tapahtuu harvemmin leikkaustapojen kehittyessä. Pseudohypoparatyreoosi on harvinainen geneettinen häiriö, joka voi johtaa samanaikaisesti sekä hyper- että hypoparatyreoosiin. Pseudohypoparatyreoosissa tuotetaan parathormonia liikaa (hyperparatyreoosi), mutta se ei ole toiminta-

kykyistä (hypoparatyreoosi). (Klemm & Klein 2007, 178; Smith & Stack 2009, 192–193.) Lisäksi hypoparatyreoosi voi aiheutua autoimmuunisairaudesta (Handbook of Diagnostic Tests 2003, 230; Smith & Stack 2009, 192).

2.4 Laboratoriotutkimukset

Fimlab Laboratoriot Oy mittaa määrittymenettelyn mukaan intaktia parathormonia (fP-PTH). Tutkimus edellyttää potilaalta 12 tunnin paastoa. Paaston jälkeen otetaan laskimoverinäyte K₃EDTA-putkeen, josta erotellaan plasma sentrifugoimalla näyteputki mahdollisimman pian. (Fimlab Laboratoriot Oy 2012.) Eroteltu plasma säilyy huoneenlämmössä kaksi vuorokautta, jääkaappilämpötilassa kolme vuorokautta ja pitempiaikaiseen säilytykseen plasma pakastetaan, jossa se säilyy kuusi kuukautta (Roche Diagnostics 2012d). Tampereen yliopistollisen sairaalan ulkopuolelta tulleet näytteet otetaan kylmänäytteenottona. Plasma erotellaan mahdollisimman pian ja eroteltu plasma säilytetään jääkaapissa ennen lähetystä. fP-PTH:n viitevälinä on 1,6–6,9 pmol/l. (Fimlab Laboratoriot Oy 2012.)

Hyperparatyreoosin erotusdiagnostiikassa voidaan käyttää kalsiuminfuusiokoea (Pt-Ca-R1), jossa mitataan parathormonin ja ionisoituneen kalsiumin pitoisuuksia. Rasituskokeessa kohotetaan ionisoituneen kalsiumin plasmapitoisuutta antamalla kalsiumliuosta infuusion kautta. Ionisoituneen kalsiumin pitoisuus kohotetaan yli viitearvoajan ja tämän tulisi aiheuttaa intaktin parathormonipitoisuuden laskun. Lähtökohtaisesti hyperparatyreoosia sairastavilla parathormoni on reilusti yli viitearvojen. Jos parathormonipitoisuus ei infuusiokokeessa laske, on se merkki autonomiseksi muuttuneesta hyperparatyreoosimuodosta. Kalsiuminfuusiokoe sopii hyvin munuaistautipotilaan erotusdiagnostiikkaan, koska sekundaarisessa hyperparatyreoosissa PTH palautuu viitearvoihin tai jopa niiden alle. Potilaan tulisi paastota ennen kokeen suorittamista ja koe alkaa ottamalla nollanäytteet laskimokanyylista. Näytteiksi otetaan aina ionisoitunut kalsium ja parathormoni. Infuusio aloitetaan nollanäytteiden oton jälkeen. Infuusion aloittamisesta kolmenkymmenen minuutin kuluttua otetaan toiset näytteet ja kolmannet näytteet otetaan infuusion lopettamisen jälkeen. (Fimlab Laboratoriot Oy 2003.) Kalsiuminfuusiokoea käytetään hyvin harvoin Fimlab Laboratoriot Oy:ssä.

3 ETYLEENIDIAMIINITETRAETIKKAHAPPO (EDTA)

Etyleenidiamiinitetraetikkahappo eli EDTA on synteettinen kemikaali, jota ei sellaisenaan esiinny luonnossa. EDTA on kelatoiva yhdiste, joka sitoo itseensä kahdenarvoisia kationeja. (Greiner Bio-One 2012.) EDTA-yhdisteet ovat negatiivisesti varautuneita ja muodostavat liukenevia yhdisteitä metalli-ionien kanssa poistaen nämä ionit jatkoreaktioista (Arkin ym. 2003, 11–15). EDTA:n käyttö antikoagulanttina ja EDTA-plasman pakastaminen on todettu toimivan hyvin epästabiliin polypeptidihormonien keräämiseen ja säilytykseen (Guder, Narayanan, Wisser & Zawta 1996, 58). Koska parathormoni on epästabiili polypeptidihormoni, on EDTA:ta käytetty antikoagulanttina parathormoninäytteenotossa. Opinnäytetyössämme on käytössä 3 ml VACUETTE® K₂EDTA ja 2 ml VACUETTE® K₃EDTA putkia, joissa putkien sisäpinta on päällystetty kuivalla EDTA:lla.

Dikalium(K₂)- ja trikalium(K₃)-EDTA ovat kliinisten laboratorioden yleisesti käyttämiä antikoagulantteja, jotka sitovat verestä kahdenarvoisia kalsium-ioneja (Ca²⁺) estäen näin veren hyytymisen (Young, Bermes & Haverstick 2006, 47). Kalsium on välttämätön veren hyytymisjärjestelmälle ja sen kelatoiminen tai poistaminen inhiboi protrombiinin muuttumista trombiiniksi ja trombiinin vaikutusta fibrinogeeniin. Fibrinogeenista muodostuisi fibriniä ja näyte hyytyisi. (Arkin ym. 2003, 11.)

Erityisesti hematologisissa tutkimuksissa EDTA on erinomainen antikoagulantti, koska se säilyttää veren solukomponentit sellaisenaan, niitä vääristämättä. EDTA ei muuta solujen kokoa ja estää trombosyyttien kasautumisen eli aggregaation. Toiminta on parhaimmillaan, kun EDTA-suolojen konsentraatio veressä on 1–2 g/l. Korkeammat konsentraatiot voivat kutistaa punasoluja niiden ulkopuolella vallitsevan hypertonian vuoksi. (Young ym. 2006, 47; Arkin ym. 2003, 11–15.)

Paremmän liukoisuuden takia EDTA:ta käytetään aina suolayhdisteinä. EDTA voi olla näytteenottoputkissa joko nestemäisessä tai kuivassa muodossa. Kuivassa muodossa oleva EDTA laitetaan putkeen 0,1 % liuoksena ja siitä haihdutetaan vesi pois huoneenlämmössä. (Young ym. 2006, 47.) EDTA:n reaktiivisuus riippuu siitä, mitä suolaa käytetään sekä missä muodossa se on näyteputkessa. K₃- ja K₂EDTA liukenevat yhtä hyvin huoneenlämmössä, mutta K₃EDTA:n antikoaguloiva aktiivisuus on huonompi kuivina

yhdisteinä. Yksi gramma K_3^- tai K_2EDTA :n suolayhdistettä voi sitoa 100 mg kalsiumioneja. Suurin ero K_3^- ja K_2EDTA :lla on niiden vaikutukset liuoksen pH:hon. Jos kummastakin tekee yksiprosenttisen (massakonsentraatio) liuoksen, on K_2EDTA -liuoksen pH $4,8 \pm 1,0$ ja K_3EDTA -liuoksen pH $7,5 \pm 1,0$. (Arkin ym. 2003, 11–15.)

4 ROCHEN COBAS 6000® -ANALYSAATTORI

Cobas® 6000 -analysaattoria (kuva 1) käytetään kliinisen kemian ja immunokemian analyttien mittaamiseen ja laboratorio voi muokata haluamansa analysaattorikonaisuuden. Cobas® 6000 -analysaattori on suunnattu keskisuurille ja suurille laboratorioille, koska siihen saa yhdistettyä kolme analysointiyksikköä. Analysointiyksiköissä vaihtoehtoina ovat c 501 tai e 601, joita kumpaakin voi olla kokonaisuudessa 1–2 kappaletta. c 501 -yksikkö määrittää kliinisen kemian tutkimuksia ja e 601 -yksikkö on immunokemian analysointiyksikkö. Lisäksi Cobas® 6000 -analysaattorissa on aina keskusyksikkö ja kontrolliyksikkö. Keskusyksikössä on näytteiden sisäänsyöttö (manuaalinen, päivystysnäytteet) ja ulostulo, näytteiden kuljetus sekä joidenkin näytteiden säilytysyksikkö analysoinnin ajan. Kontrolliyksikössä ovat tietokone, näyttö, näppäimistö ja tulostin, joiden avulla hallitaan Cobas® 6000 -analysaattoria. (Roche Diagnostics Limited 2012a.)



KUVA 1. Cobas® 6000 -analysaattori: vasemmalta oikealle keskusyksikkö, c 501 kliinisen kemian yksikkö ja e 601 immunokemian yksikkö (Roche Diagnostics Limited 2012a)

Yhdellä Cobas® 6000 -kokonaisuudella voidaan analysoida 171 eri analyttia 200 analyttin valikoimasta. Tunnissa Cobas® 6000 -analysaattori voi käsitellä 600 näytettä ja näytteiden edelle voi laittaa päivystysnäytteitä. Näyttemateriaaleiksi sopivat seerumi,

plasma, virtsa sekä punktionesteet kuten likvori. Cobas® 6000 -analysointilaitteisto ottaa näytettä 1–35 µl ja tekee tarvittaessa automaattiset laimennokset tietyille analyyteille. Analysointilaitteisto määrittää testit uudelleen automaattisesti, jos havaitsee virheen toiminnassaan ja näyte on edelleen säilytysyksikön sisällä. Cobas® 6000 -analysointilaitteistoon menee vedensyöttö, josta se saa bakteereista puhdistettua, deionisoitua vettä. (Roche Diagnostics Limited 2012a.)

4.1 Analysointiyksikkö e 601

Analysointiyksikkö e 601 analysoi heterogeenisiä immunoanalyysejä, joihin kuuluvat sydänmerkkiaineet, hormonit, infektioserologiset tutkimukset sekä erilaiset markkeritutkimukset. Yksikkö pystyy tekemään 170 testiä tunnissa ja käyttää kertakäyttöisiä kärkiä, jolloin carry-over -virhettä ei synny. e 601 -yksikkö havaitsee nestepinnan ja mahdolliset hyytymät näytteestä. Määritysmenetelmänä e 601 -yksikössä on ECLIA eli elektrokemiluminometrinen immunoanalyysi. (Roche Diagnostics Limited 2012a.)

Esipesupisteellä sijaitsevat erotusasema, sekoittaja, esipesuasema ja ”sipperi” (engl. sipper, sip=imeä, siemaista). e 601 -yksikössä on kaksi erotusasemaa, joissa sijaitsee pysyvä magneetti mikropartikkelien kiinnittämiseen. Reagenssikiekolla sijaitsevat kaikki testireagenssit huoneenlämpöisinä. Mittausyksikössä on mittauskammio, johon esipesualueen ”sipperi” pipetoi näytteen. Inkubaattorissa näytteitä inkuboidaan $+37\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$ ja inkubaattorikiekko toimii myös näytteiden kuljettajana eri työpisteille. Pipetinkärkiä e 601 -yksikkö tarvitsee ”sipperin” neulassa, jolla se pipetoi näytteen mittauskammioon. Kyvetit ”gripperi” (engl. gripper, grip=tarttua) hakee jokaiselle näytteelle ja lopulta tipauttaa käytetyt kyvetit koneen alalokerossa olevaan jäteastiaan, aivan kuten pipetinkärjetkin ”sipperin” neulasta. Systemireagensseja on kolme: PreClean, ProCell ja CleanCell. Ne sijaitsevat e 601 -yksikön alaosassa. (Roche Diagnostics 2008.) Analysointiyksikön toimintapisteet ovat esitetty kuvassa 2 (sivu 17).

Elektrokemiluminometrisena mittauskammiona e 601 -yksikössä on läpivirtauskammio. Kammion sisällä on platinaelektrodi, jossa reaktio tapahtuu, sekä sen kaksiosainen vastinelektrodi. Kammion ulkopuolella on magneetti, jolla paramagneettiset mikropartikkelit saadaan kerättyä elektrodin pinnalle. Kun elektrodille johdetaan jännite, siirtyy magneetti pois elektrodin alta. Kammioon yhdistyy valomonistinputki, joka mittaa ja monis-

taa emittoituvan valon signaalin määrää. Mittauksen suorituksen jälkeen mikropartikkelit huuhdotaan CleanCell-puhdistusliuoksella pois elektrodin pinnalta. Elektrodin uudistus tapahtuu sähköpotentiaalia vaihtamalla, jonka jälkeen kammio on valmis uuteen mittaukseen. (Roche Diagnostics 2012c.)



KUVA 2. Toimintapisteet e 601 -yksikössä:

- A. Esipesupiste
- B. Reagenssikiekko (testireagenssit)
- C. Mittausyksikkö ja inkubaattori
- D. Pipetinkärkien ja kyvettien syöttö
- E. Reagenssit (systemireagenssit)

(Roche Diagnostics 2008)

Cobas® 6000 -analysointilaitteen e-reagenssipaketin yhteen testipakkaukseen kuuluu kolme pulloa. Kaikki e 601-yksikön reagenssit ovat käyttövalmiita ja niiden säilyvyys laitteessa on 4-12 viikkoa. Parathormonin testipakkauksesta saadaan tehtyä 100 parathormonimääritystä ja parathormonireagenssit säilyvät analysointilaitteessa kahdeksan viikkoa. (Roche Diagnostics 2012a.) e 601 -yksikön reagenssit tulee lisätä Cobas® 6000 -analysointilaitteeseen sen ollessa stand by -tilassa, jolloin analysointilaitteella ei voi suorittaa mitään testejä.

e 601 -yksikön kaikki testit kalibroidaan testikohtaisilla CalSet-pakkauksilla. Kontrollit ovat kylmäkuivattuja PreciControl-yhdistelmäkontrolleja, joissa on kaksi tai kolme tasoa. (Roche Diagnostics 2012a.) Fimlab Laboratoriot Oy:llä on käytössään parathormonikontrollina kaksitasoinen PreciControl Varia. Kokeellisen osuutemme aikana käytössä olleiden kontrollien parathormonin tavoitekeskiarvot olivat 6,20 pmol/l ja 19,30 pmol/l. Tavoitearvot voivat vaihdella kontrollierien välillä, Rochen toimesta tai kemistin päätöksellä.

4.2 Esikäsittelylinjasto MPA

MODULAR® PRE-ANALYTICS (MPA) on Cobas® 6000 -analysaattoriin yhdistettävä esikäsittelylinjasto (kuva 3, sivu 19). MPA:n näytteesyöttöyksikkö voi käsitellä 300 näytettä kerralla ja lukea niistä viivakoodit. Tunnistamattomat näytteet ohjautuvat näytteesyötön vieressä olevaan poistopisteeseen. Näytteet etenevät sentrifugiin, joka sentrifugoi näytteitä kymmenen minuuttia 3000 rpm -nopeudella. Sentrifugeja on samassa yksikössä kaksi ja ne voivat käsitellä 200 näytettä tunnissa. Yhteen sentrifugiin mahtuu neljäkymmentä näytettä ja MPA tasapainottaa automaattisesti sentrifugin sen jäädessä vajaaksi. Sentrifugoinnin jälkeen MPA poistaa näyteputkista korkit ja pipetoi kaikista näytteistä tytärkupit. Tytärkuppeja MPA tekee 400 tunnissa ja yhdestä näytteestä voidaan tehdä maksimissaan kymmenen tytärkuppia. (Roche Diagnostics Limited 2012b.) Fimlab Laboratoriot Oy:ssä MPA on ohjelmoitu tekemään maksimissaan vain kolme tytärkuppia (Holm 2013). Pipetti tunnistaa hyytymät tai niukan näytteen, jolloin tytärkuppeja ei näistä näytteistä tehdä. Tällaiset näytteet siirtyvät virhepuskuriin. Alkuperäiset näyteputket arkistoidaan ja tyhjennetään näytelajittelusta. Tytärkupit etenevät linjastoa pitkin Cobas® 6000 -analysaattorille. (Roche Diagnostics Limited 2012b.) Esikäsittelylinjaston eri yksiköt on esitetty kuvassa 3 (sivu 19).

Hallintatietokoneella ohjataan MPA-esikäsittelylinjaston toimintaa. Tietokoneelle tulee ilmoitukset häiriötilanteista ja sieltä voidaan ohjata näytteitä halutuille analysaattoreille. MPA-esikäsittelylinjaston voi muokata laboratorion tarpeita vastaavaksi. (Roche Diagnostics Limited 2012b.) Fimlab Laboratoriot Oy:llä on käytössään kaksi MPA-esikäsittelylinjastoa, jotka molemmat ohjaavat näytteitä omille kahdelle Cobas® 6000 -analysaattoreille. Molemmissa MPA-esikäsittelylinjastoissa on kaksi sentrifugiyksikköä

eli neljä sentrifugia linjastoa kohti. Fimlab Laboratoriot Oy ei ole yhdistänyt MPA-esikäsitteilylinjaansa viivakoodittajaa tai korkittajaa, joten ne jäävät välistä pois kuvassa 3.



KUVA 3. Esikäsitteilylinjaston osat:

1. Näytteensyöttö
2. Sentrifugi
3. Korkinpoistoyksikkö
4. Tytärkuppipipettori
5. Viivakoodittaja
6. Korkittaja
7. Näytteiden lajittelu/arkistointi
8. Virhepuskuri

(Roche Diagnostics Limited 2012b)

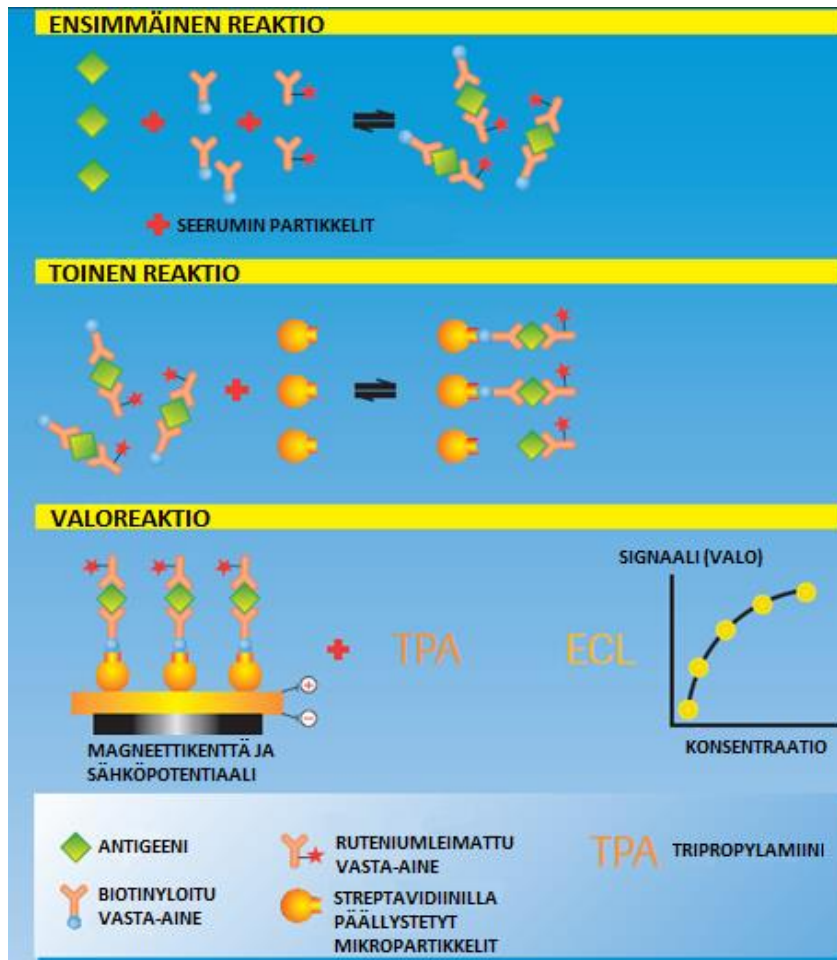
5 ELEKTROKEMILUMINOMETRINEN IMMUNOANALYYSI (ECLIA) PARATHORMONIMÄÄRITYKSESSÄ

Elektrokemiluminometrisessä reaktiossa vakaista prekursoreista eli yhdisteistä, jotka voivat muuntua toisiksi yhdisteiksi, syntyy elektrodin pinnalla erittäin reaktiivisia yhdisteitä ja nämä reagoivat edelleen toistensa kanssa tuottaen valoa. Elektrokemiluminometrian etuja ovat hyvin säilyvät käyttövalmiit reagenssit ja käytettävät vakaat, ei-radioaktiiviset leimat. Inkubaatioajat ovat lyhyitä ja herkkyys on hyvä. Mittausalue on laaja ja elektrokemiluminometrinen tekniikka soveltuu monille eri analyyteille. (Roche Diagnostics 2012c.) Menetelmä on sensitiivinen mittaamaan hyvin pieninä pitoisuuksina esiintyviä analyyttejä. Lisäksi ECLIA:n yhtenä etuna on signaalin lyhyt detektioaika, verrattuna esimerkiksi fluoresenssi-immunoanalyyysiin tai muihin kemiluminometrisiin immunoanalyyseihin. (Ashihara, Kasahara, & Nakamura 2007, 810–811.) Yleisimmin käytössä oleva leima elektrokemiluminometrisissä reaktioissa on rutenium(Ru)-kelaatti. Rutenium II on voimakkaasti luminisoiva, joten leimana se on hyvin sensitiivinen. (Ullman 2005, 227–228.)

Parathormonimäärityksissä käytetään ei-kilpailevaa immunoanalyyysiä, koska tulokset eivät olisi luotettavia kilpailevalla immunoanalyyysillä, jos intaktin parathormonin konsentraatio on matala ja/tai C-terminaalisen fragmentin konsentraatio on korkea. Ei-kilpaileva immunoanalyyysi vaatii aina kahta vasta-ainetta, jotka pystyvät samanaikaisesti sitoutumaan parathormonin epitooppeihin. Toinen vasta-aine toimii hormonin kiinnittämisessä kiinteään pintaan, ja toinen vasta-aine tuottaa jonkin mitattavan signaalin leiman avulla. Ei-kilpailevassa menetelmässä vasta-aineita lisätään ylimäärin, joka takaa sen, että kaikki analyytit tulevat mitatuksi. Ylimääräiset vasta-aineet pestään pois, jotta ne eivät vääristä tuloksia. Ei-kilpailevat immunoanalyytit ovat sensitiivisiä, spesifisiä, toistettavuudeltaan hyviä ja käytösopivuudeltaan monipuolisia. (Endres & Rude 2006, 1915-1916.)

Opinnäytetyössä käyttämämme määritysmenetelmä on Elecsys kaksoisvasta-aineperiaate (i.e. sandwich-menetelmä), jonka reaktiot ovat havainnollistettu kuviossa 2. Sandwich-menetelmää käytetään molekyylipainoltaan keskimääräistä suurempien analyyttien, kuten parathormonin määritykseen (Roche Diagnostics 2012b; 2012c). Kyseisessä parathormonimäärityksessä C-terminaalinen fragmentti ei ole haittaava tekijä,

koska testillä mitataan intaktia parathormonia. Immunoreaktiivisesta parathormonista noin 5–25 % on intaktia hormonia ja 75–95 % C-terminaalista fragmenttia. Munuaisen vajaatoiminnassa ja joissakin muissa tautitiloissa C-terminaalisen fragmentin määrä voi kasvaa huomattavasti, mutta se ei vaikuta ei-kilpailevaan tai kokonaista parathormonia mittaavaan parathormonimääritykseen. (Endres & Rude 2006, 1914–1915.)



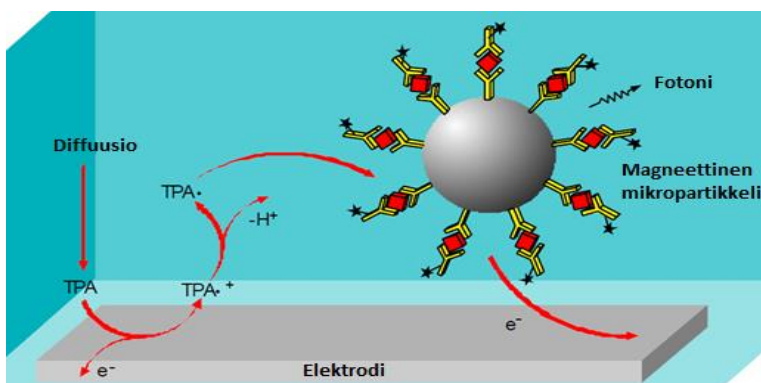
KUVIO 2. Reaktioperiaate sandwich-tekniikalla (mukailien lähteestä Roche Diagnostics 2012b)

5.1 Periaate

Määritysmenetyksessä käytetään streptavidiinilla päällystettyjä paramagneettisia mikropartikkeleja, joihin biotinyloitu vasta-aine kiinnittyy erittäin lujasti (kuvio 2). Mikropartikkelien sisällä on rautahippu, joka tekee mikropartikkeleista paramagneettisia. Biotinyloitu monoklonaalinen vasta-aine reagoi parathormonin N-terminaalisen fragmentin kanssa kiinnittyen aminohappoihin 26–32. Rutheniumkompleksilla leimatut monoklo-

naaliset vasta-aineet reagoivat parathormonin C-terminaalisen fragmentin kanssa kiinnittyen aminohappoihin 37–42. Biotinyloidut vasta-aineet, parathormoni ja rutenium-kompleksilla leimatut vasta-aineet muodostavat sandwich-kompleksin eli kaksoisvasta-ainekompleksin (kuvio 2). Sandwich-periaate voi olla yksi- tai kaksivaiheinen. Yksivaiheisessa reaktiossa vasta-ainereagenssit lisätään reaktiokyvettiin yhtä aikaa, kun taas kaksivaiheisessa reaktiossa vasta-ainereagenssit lisätään eri aikaan. (Roche Diagnostics 2012b; 2012c; 2012d.) Parathormonimäärityksessä on käytössä yksivaiheinen reaktio, koska se on mahdollinen vasta-aineiden eri sitoutumiskohtien vuoksi.

Ruteniumleimatun vasta-aineen leima on ruteniumtrisbipyridiyylin suolan N-hydroksisukkinimidi-esteri. Tätä rutenium-kompleksia on helppo liittää proteiineihin, hapteeneihin ja nukleiinihappojen aminoryhmiin, koska se on stabiili, vesiliukoinen yhdiste. (Roche Diagnostics 2012c.) Ruteniumin hapetus tapahtuu sähkövirran avulla elektrodilla. Ruteniumin viritysreaktion tarvitaan tripropylamiini (TPA). (Ullman, 2005, 227–228.) TPA hapettuu samanaikaisesti elektrodilla ruteniumin kanssa, jolloin ne molemmat luovuttavat elektronin. TPA:n radikaalikationi voi spontaanisti luovuttaa protonin, jolloin siitä syntyy TPA-radikaali. TPA-radikaali ja ruteniumkationi reagoivat keskenään ja tämä kemiallinen reaktio virittää rutenium-kompleksin, jolloin se voi emitoida fotonin. Emittointi tapahtuu 620 nm:ssä, ruteniumin tuottaessa näkyvää valoa, joka on suoraan verrannollinen analyytin määrään. Emittoinnin jälkeen rutenium palaa perustilaansa ja sykli voi alkaa uudestaan. TPA:ta kuluu reaktiossa, joten sitä tulee olla ylimäärin. Yksi antigeeni-vasta-ainekompleksi voi synnyttää useita fotoneita. (Roche Diagnostics 2012c.) Ruteniumin ja TPA:n reaktiot sekä fotonin luovutus ovat esitetty kuviossa 3.



KUVIO 3. Rutenium-kompleksin ja tripropylamiinin reaktiot elektrodilla (mukailen lähteestä Roche Diagnostics 2012c)

5.2 Parathormonimäärityksen suoritus

Parathormonimääritys kestää kokonaisuudessaan 18 minuuttia näytteen saapumisesta e 601 -yksikköön. Analysaattori pipetoi testikyvetiin 50 µl näytettä, biotinyloituja monoklonaalisia PTH-spesifisiä vasta-aineita sekä monoklonaalisia PTH-spesifisiä ruuteniumilla leimattuja vasta-aineita. Liuokset sisältävää testikyvetiä inkuboidaan inkubaatiokiekolla, jolloin reagenssit muodostavat sandwich-komplekseja. Seuraavaksi lisätään streptavidiinilla päällystettyjä mikropartikkeleita, jota seuraa toinen inkubointi. Ennen kumpaakin inkubaatiota reaktioseos sekoitetaan koeputkisekoittajalla, joka sijaitsee esipesualueella. Inkuboinnin aikana streptavidiini ja biotiini reagoivat keskenään kiinnittäen sandwich-kompleksin mikropartikkeleihin. Reaktiokyveti siirretään esipesupisteeseen, jossa paramagneettiset mikropartikkelit sidotaan kiinni ja ylimääräiset vasta-aineet huuhdotaan PreClean-liuoksella pois. Tämän jälkeen reaktioseos siirretään takaisin inkubaattorikiekolle, josta ”sipperi” siirtää reaktioseoksen läpivirtausmittauskammioon. Mittauskammiossa mikropartikkelit sidotaan magneettisesti elektrodin pintaan. Kiinnittymättömät aineet huuhdotaan pois ProCell-pesuliuoksella. Jännitteen johtaminen elektrodille aiheuttaa reaktion, joka tuottaa valomonistimella mitattavan kemiluminesoivan emission. Parathormonitulos saadaan sijoittamalla emissiotulos kalibrointikäyrälle, joka antaa sille vastaavan parathormonikonsentraation. (Roche Diagnostics 2012d.)

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT

Tavoitteenamme on tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n automaation vastuualueelle uutta tietoa, jota voidaan hyödyntää ohjekirjan päivityksessä parathormonin näytteenoton ja säilytyksen osalta. Opinnäytetyömme tarkoituksena on määrittää parathormonia elektrokemiluminometrisesti (ECLIA= electrochemiluminescence immunoassay) ja selvittää, onko tulostaso yhtenevä K_3 - ja K_2 EDTA-putkien kesken, sekä K_2 - ja 6h- K_2 EDTA:n tulostasojen yhteneväisyys kuuden tunnin säilytyksen jälkeen parathormonimäärityksissä. Määritämme näytteet itse Fimlab Laboratoriot Oy:ssä Cobas® 6000 -analysaattorilla. Esikäsitlemme näytteet mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen sekä 6h- K_2 EDTA-näyteputket kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta.

Tutkimusongelmat:

1. Kuinka yhteneväisiä tuloksia saadaan K_3 - ja K_2 EDTA-näytteenottoputkista parathormonimäärityksissä?
2. Miten kuuden tunnin säilytys huoneenlämmössä, sentrifugoimatta vaikuttaa parathormonituloksiin K_2 EDTA-putkissa?

7 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

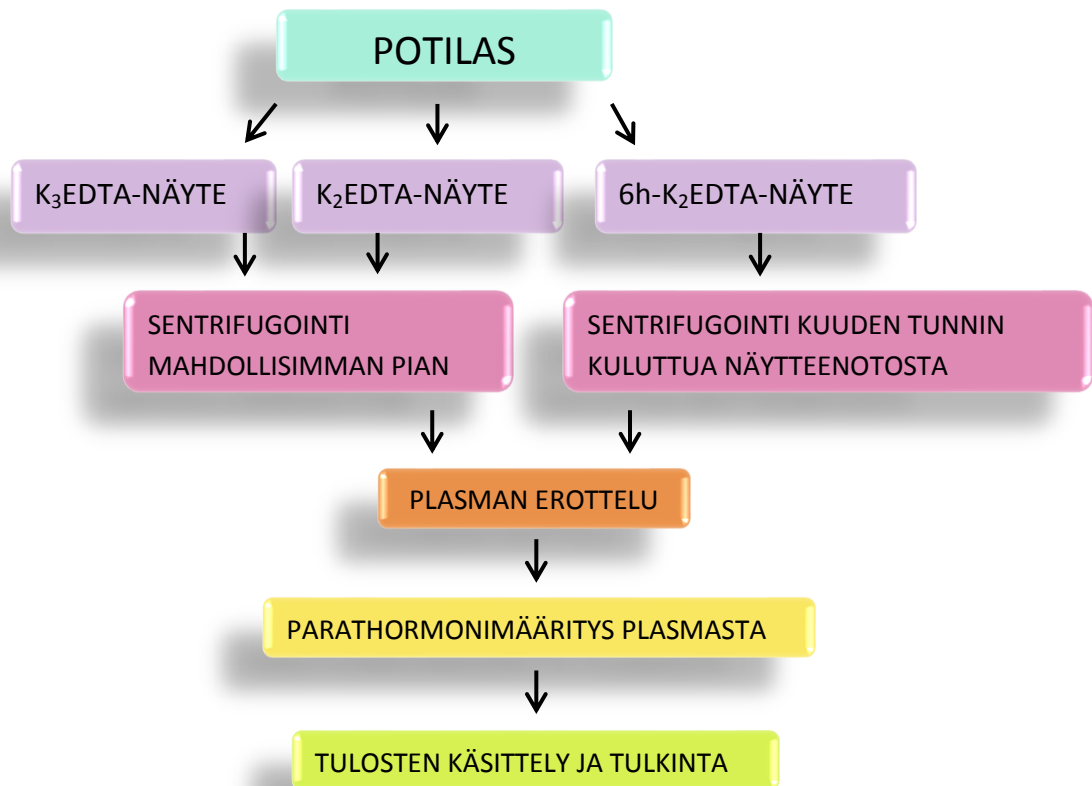
Opinnäytetyömme on kvantitatiivinen, kokeellinen työ. Kvantitatiivisen työn keskeisiä piirteitä ovat havaintoaineiston soveltuminen määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen, aineistojen saattaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon ja päätelmien teko perustuen tilastolliseen analysointiin (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 132, 136). Kvantitatiivinen menetelmä kuvaa parhaiten opinnäytetyömme luonnetta ja saatuja tuloksia. Kvantitatiivisella menetelmällä saamme selvyuden käsiteltäviin ongelmiin sekä tilastolliseen analysointiin.

Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan yhden käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttajaan (Hirsjärvi ym. 2007, 130). Työssämme muuttujina ovat K_3 - ja K_2 EDTA-antikoagulantti sekä parathormoni. Määritämme parathormonia mahdollisimman pian näytteenotosta K_3 - ja K_2 EDTA-plasmasta ja vertailemme saatuja tuloksia keskenään. Lisäksi määritämme parathormonia 6h- K_2 EDTA-plasmasta kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta. Tällöin muuttujina ovat aika ja parathormoni, koska tarkoituksena on selvittää parathormonin määrityskelpoisuus kuuden tunnin säilytyksen jälkeen.

7.1 Otanta

Otanta voi olla satunnaisesti tai ei-satunnaisesti hankittu riippuen, mitä tutkimuksella halutaan saavuttaa, tai minkälaiset resurssit tutkimukseen on käytettävissä. Satunnaisotanta lisää tutkimuksen luotettavuutta, mutta ei ole välttämättä mahdollinen esimerkiksi näytteiden saatavuuden takia. Tällöin kyseeseen tulee ei-satunnainen otanta, jossa koehenkilöt on valittu tutkijan mielenkiinnosta joko saatavuuden tai harkinnan mukaan. Ositetussa otannassa perusjoukko jaetaan ositteisiin ja näistä ositteista poimitaan otokset, jotka muodostavat koko otannan. (Metsämuuronen 2003, 31–33; Holopainen & Pulkkinen 2008, 31–34.) Opinnäytetyössämme olemme jakaneet perusjoukon osiin, joista olemme valinneet niin sanotut normaalit näytteet ja selvästi viiterajojen yläpuolella olevat näytteet. Normaalit näytteet on kerätty laboratoriohenkilökunnalta satunnaisesti, kun taas viiterajojen yläpuolella olevat näytteet on valittu ei-satunnaisesti saatavuuden mukaan.

Näytteiden keräys tapahtuu Tampereen yliopistollisen sairaalan dialyysiosastolta. Emme itse ota näytteitä, vaan näytteet ottaville sairaanhoitajille annetaan kirjallinen ohjeistus. Näytteitä otetaan vain potilailta, joilla on parathormonitutkimuspyyntö. Normaalisti parathormoninäytteitä tulee suhteellisen vähän Fimlab Laboratoriot Oy:n automaatiolle, mutta dialyysiosastolta parathormoninäytteitä tulee tiettyinä päivinä kerralla suuri määrä. Tämän vuoksi hyödynnetään dialyysiosaston näytteet, koska muuten tutkimuspyynnöllä olevia parathormoninäytteitä olisi liian hidasta ja hankalaa kerätä. Lisäksi haluamme otantaan myös viiterajojen sisällä olevia näytteitä, joita otetaan itseltämme ja laboratorion työntekijöiltä. Näytteet sentrifugoidaan heti niiden saapuessa laboratorioon ja ne määritetään Roche Cobas® 6000 -analysaattorilla. Kuuden tunnin jälkeen määritetään vain potilaiden näytteitä, joilla on parathormonitutkimuspyynnön lisäksi B-PVK-tutkimuspyyntö (perusverenkuva EDTA-kokoverestä), jonka näyte otetaan K₂EDTA-putkeen. Käsittelemättömiä parathormoninäytteitä säilytetään kuusi tuntia huoneenlämmössä, jonka jälkeen näytteet sentrifugoidaan ja niistä määritetään parathormoni. Saaduista parathormonituloksista tehdään kuvaajat, joiden avulla tuloksia analysoidaan. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden eteneminen on esitetty kuviossa 4.



KUVIO 4. Kokeellisen osuuden etenemiskaavio

7.2 Korrelaatiokerroin

Tilastanalyysissä muuttujien välistä yhteyttä voidaan tutkia käyttämällä tilastollisena tunnuslukuna korrelaatiokerrointa. Korrelaatiokertoimella verrataan kahden muuttujan välisen yhteyden voimakkuutta. Yleisimmin käytetty ja tunnettu on Pearsonin korrelaatiokerroin, jossa tarkastellaan muuttujien x ja y arvoista muodostettuja havaintopareja suhteasteikolla. x :n ja y :n välinen korrelaatiokerroin r saadaan laskettua sen määrittelyn mukaisesti kaavasta:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2] * [\sum(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Kaavassa

x_i = muuttujan x i :nnes arvo

\bar{x} = muuttujien x_i keskiarvo

y_i = muuttuja y i :nnes arvo

\bar{y} = muuttujien y_i keskiarvo

(Holopainen & Pulkkinen 2008, 233.)

Pearsonin korrelaatiokerroin mittaa ainoastaan lineaarista riippuvuutta ja kertoimen ollessa 0 lineaarista riippuvuutta ei ole. Korrelaatiokerroin vaihtelee -1:n ja 1:n välillä ja mitä lähempänä kerroin on -1:stä tai 1:stä sitä lineaarisempi riippuvuus muuttujien välillä vallitsee. Korrelaatiokertoimen lähestyessä lukua -1 on korrelaatio negatiivista eli laskevaa ja lähestyessä lukua 1 korrelaatio on positiivista, nousevaa. (Heikkilä 2008, 91.)

Korrelaatiokuvaajassa lineaarista riippuvuutta omaavien muuttujien käyttäytymistä voidaan kuvata piirtämällä hajontakaavio, jossa toinen muuttuja on x-akselilla ja toinen y-akselilla. Tähän hajontakaavioon voidaan piirtää regressiosuora hajontakuvion läpi soveltamalla se pisteiden joukkoon niin, että y-akselin suuntaisten suoran ja pisteiden etäisyyksien neliöiden summa on mahdollisimman pieni. Suoran yhtälö on $y = a + bx$, jossa a on vakio ja b suoran kulmakerroin. (Heikkilä 2008, 92–93.) Hajontakaaviota, regressiosuoraa ja korrelaatiokerrointa käytetään opinnäytetyössämme tulosten käsittelyssä ja analysoinnissa mittaamaan tulosten lineaarista riippuvuutta.

8 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Alkuperäisen suunnitelman mukaan meidän oli tarkoitus saada parathormoninäytteitä Tampereen yliopistollisen sairaalan dialyysiosastolta 16. ja 17. tammikuuta 2013. Keskustelimme Fimlab Laboratoriot Oy:n opinnäytetyöohjaajiemme kanssa ja tulimme siihen tulokseen, ettei erillisiä lupia näytteille tarvita, koska potilailla on parathormonitutkimuspyyntö. Otettu ylimääräinen EDTA-näyteputki on laboratorion laadunvarmistusta. Tavoitteenamme oli saada noin kolmenkymmenen potilaan näytteet ja analysoida ne kaikki samalla analysaattorilla. Meille oli varattu analysaattori nimeltä Urho. Menimme 8. tammikuuta pitämään keräyspäiviin liittyvää infoa dialyysiosaston sairaanhoitajille, jolloin saimme kuulla keräyspäivien olevan 9. ja 10. tammikuuta 2013. Käytännön asioiden sopiminen dialyysiosaston kanssa jäi puutteelliseksi yllättävien aikataulumuutosten takia. Samasta syystä emme ennättäneet sopia laboratorion kanssa käytännönjärjestelyistä ja informoida laboratorion henkilökuntaa näytteiden lajittelemisesta tietyille esikäsittelylinjastolle. Informaation puutteesta johtuen jotkin näytteet menivät esikäsittelylinjastolle, joka ohjasi näytteet analysaattorille nimeltään Tarmo. Tämän vuoksi jouduimme hylkäämään kymmenen potilaan näytetulokset. Olimme dialyysiosastolla kaikkina keräyspäivinä kirjaamassa näytetietoja ja seuraamassa näytteiden keräystä.

Käytyämme tammikuun kokeellisen osuuden tuloksia läpi, päätimme jatkaa kokeellista osuutta vielä yhdellä päivällä maaliskuussa. Määritimme vain K_2EDTA -näytteet ja $6h-K_2EDTA$ -näytteet, koska K_3EDTA -näytteistä tuloksia ei tarvittu lisää. Maaliskuun 7. päivä saimme näytteitä dialyysiosastolta, kun heidän potilaansa saapuivat taas laajempiin laboratoriotutkimuksiin. Tavoitteenamme oli saada 25 potilaan näytteet ja käsitellä kaikki käsin, jotta voisimme kiinnittää huomiota mahdolliseen lipeemisyyteen, hemolyysiin ja ikteerisyyteen. Kysyimme potilailta myös heidän edellisen ruokailuajankohdansa, jotta voisimme seurata sen vaikutusta näytteisiin. Poikkeavan näköiset näytteet määritimme kahteen kertaan.

8.1 Näytteiden keräys ja käsittely

Näytteiden keräys tapahtui Tampereen yliopistollisen sairaalan dialyysiosastolla 9. ja 10. tammikuuta sekä 7. maaliskuuta 2013. Dialyysiosastolta saimme kerättyä parathor-

moniviiterajojen yläpuolella olevia parathormoninäytteitä toivomamme kokoiset otannat. Parathormonitutkimuspyynnöllä dialyysiosaston sairaanhoitajat ottivat tammikuussa pyynnöstämme näytteeksi kaksi EDTA-näyteputkea, K_2 - ja K_3 EDTA. Lisäksi kaikilta potilailta oli pyydetty perusverenkuvaa (K_2 EDTA-antikoagulantti), jonka määrityksen jälkeen näyteputki siirtyi arkistoon säilytykseen. Hyödynsimme perusverenkuvänäyteputket kuuden tunnin säilytyksen jälkeen, jolloin sentrifugoimme ne ja määritimme parathormonipitoisuuden. Maaliskuussa emme tarvinneet K_3 EDTA-näyteputkia, vaan hyödynsimme ainoastaan parathormoni- ja perusverenkuvaa-tutkimuspyynnöllä olleet K_2 EDTA-näyteputket.

Ensimmäisenä näytteiden keräyspäivänä tammikuussa saimme dialyysiosastolta kymmenen potilaan näytteet. Toisena keräyspäivänä tammikuussa saimme 21 potilaan näytteet ja maaliskuun keräyspäivänä saimme 22 potilaan näytteet. Kerätyt näytteet numeroimme numerokoodein niin, että ensimmäinen numero vastaa putkea ja toinen potilasta, numerot on erotettu pisteellä. K_3 EDTA-näyteputkea vastasi numero yksi. K_2 EDTA-näyteputkea, joka sentrifugoitiin mahdollisimman pian, vastasi numero kaksi. Numero kolme vastasi 6h- K_2 EDTA-näyteputkea, joka sentrifugoitiin vasta kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta.

Dialyysiosaston sairaanhoitajat ottivat näytteet kyynärtaipeen kanyylista Luer-adaptoria käyttäen vakuumitekniikalla ennen dialyysin aloittamista. Dialyysiosaston sairaanhoitajat ottivat parathormoninäytteet K_2 EDTA-näyteputkiin, joihin he laittoivat parathormonin tutkimustarrat. Dialyysiosastolta parathormoninäytteet ovat aina tulleet K_2 EDTA-näyteputkissa, joten ylimääräisenä putkena oli suositusten mukainen K_3 EDTA-näyteputki. Teimme itse tammikuussa otettuihin ylimääräisiin K_3 EDTA-näyteputkiin käsin arkistointitarrat. K_2 EDTA-näyteputkeen, jossa oli perusverenkuvapyyntö, kirjoitimme tutkimustarraan tarkan näytteenottokellonajan. Kellonajan avulla pystyimme mittaamaan kuuden tunnin säilytysajan. Jotta näytteet tulisi esikäsiteltyä mahdollisimman pian näytteenotosta, lähti dialyysiosastolta säännöllisin väliajoin kuljetuksia laboratorioon, joiden mukana annoimme näytteiden mennä analysoitaviksi tammikuun kokeellisessa osuudessa. Maaliskuussa kuljetimme itse näytteet laboratorioon ja huolehdimme, että näytteet käsiteltiin mahdollisimman nopeasti.

Lisäksi tammikuussa keräsimme viiterajojen sisällä olevia näytteitä toisiltamme sekä vapaaehtoisilta laboratorion työntekijöiltä. Viiterajojen sisällä olevat näytteet keräs-

me itse vakuumitekniikalla kyynärtaipeen laskimosta. Ensimmäisenä keräyspäivänä tammikuussa viiterajojen sisällä olevia näytteitä oli vain kaksi ja toisena keräyspäivänä tammikuussa yhdeksän. Maaliskuussa viiterajojen sisällä olevia näytteitä ei kerätty ol- lenkaan, vaan kaikki näytteet olivat viiterajojen yläpuolella olevia dialyysiosaston näyt- teitä. Toisiltamme ja laboratorion henkilökunnalta otimme yhden K_3EDTA -näyteputken ja kaksi K_2EDTA -näyteputkea kultakin. K_3EDTA -näyteputken ja toisen K_2EDTA - näyteputken sentrifugoimme saman tien. Kun näytteet oli sentrifugoitu, erottelimme plasmat uusiin putkiin. Toiseen 6h- K_2EDTA -näyteputkeen merkitsimme näytteenotto- kellonajan ja säilytimme niitä huoneenlämmössä kuuden tunnin ajan. Kuuden tunnin säilytyksen jälkeen sentrifugoimme ja erottelimme plasman kaikista 6h- K_2EDTA - näytteistä.

Kokonaisotannaksi muodostui 64 eri potilaan näytteet, joista 42 potilaan näytteistä mää- ritettiin K_3 - ja K_2EDTA -sopivuus ja 57 potilaan näytteistä määritettiin parathormonin kuuden tunnin säilyvyys eli parathormoni K_2 - ja 6h- K_2EDTA -näyteputkista. Kokonais- otannasta kymmenen eri potilaan tulokset hylättiin, jolloin lopulliseksi otannaksi saatiin 32 potilaan K_3 - ja K_2EDTA -tulosta sekä 47 potilaan K_2 - ja 6h- K_2EDTA -tulosta. Poti- lasnumerot olivat satunnaisessa järjestyksessä tammikuussa yhdestä 42:een, joista kymmenen poistettiin eli numerot olivat yhdestä 32:een ja maaliskuussa 33:sta 54:ään.

Laboratoriossa näyteputket lajiteltiin omiin työpisteisiin ja tammikuussa parathor- monitutkimuspyynnöllä olevat K_2EDTA -näyteputket menivät kemian MPA- esikäsitteilylinjastolle. Valitettavasti puutteellisen tammikuun kokeellisen osuuden suunnittelun vuoksi ensimmäisen keräyspäivän tutkimuspyynnöllä olevat näytteet me- nivät kahdesta MPA-esikäsitteilylinjastosta linjastolle, joka ohjasi näytteet Tarmo- analysaattorille. Maaliskuussa sentrifugoimme ja erottelimme näytteet itse niin, että mitkään niistä eivät menneet esikäsitteilylinjan läpi. Maaliskuussa hemolyyttisistä, iktee- risistä, lipeemisistä tai muuten poikkeavan näköisistä näytteistä pipetoimme plasmaa kahteen näytekyvetiin rinnakkaismääritystä varten.

Esikäsitteilylinjasto, MPA, sentrifugoi näytteet ja pipetoi plasmaa tytärkuppeihin. K_3EDTA -näyteputket sentrifugoimme itse, koska vähäisen näytemäärän vuoksi niitä ei voitu laittaa MPA-esikäsitteilylinjastolle. Koska K_3EDTA -näyteputkissa ei ollut tutki- muspyyntöä, emme senkään takia olisi voineet laittaa niitä MPA-esikäsitteilylinjastolle.

MPA-esikäsitteilylinjasto ei tunnista putkia joissa ei ole tutkimuspyyntöä, kun taas suoraan analysaattorille voi syöttää näytetietoja ja tutkimuspyyntöjä manuaalisesti.

8.2 Näytteiden analysointi

Tammikuussa MPA-esikäsitteilylinjaston kautta menneet näytteet ohjautuivat kemian Cobas® 6000 -analysaattorille ja maaliskuussa itse sentrifugoimamme tutkimuspyynnöllä olleet näytteet syötimme suoraan Cobas® 6000 -analysaattorille. Cobas® 6000 -analysaattori analysoi tutkimuspyynnöllä olleet parathormoninäytteet elektrokemiluminometrisellä immunoanalyysillä e 601 -yksikössä automaattisesti ja tulokset menivät eteenpäin autovalidoinnin kautta, jos tulokset eivät poikenneet autovalidoinnin viiterajoista tai analysaattori ei havainnut ongelmia testin suorittamisessa ja sen luotettavuudessa. Keräsimme autovalidoinnin kautta menneet tulokset potilaan näyteputkessa olleen tutkimustarran henkilötunnuksella laboratorion tietojärjestelmästä jälkeenpäin.

Itse sentrifugoimamme näytteet, joissa ei ollut parathormonitutkimuspyyntöä, syötimme suoraan Urho-analysaattorille esikäsitteilylinjaston ohi. Teimme näyteputkille, joilla ei ollut tutkimuspyyntöä, manuaalisesti tutkimuspyynnöt parathormonille ja identifioimme ne näyteputkiin laitettujen numerokoodien mukaan. Tulokset tulostimme suoraan analysaattorin tietojärjestelmästä, koska ne eivät siirtyneet eteenpäin autovalidoinnin kautta.

Laboratorion henkilökunta oli kalibroinut ja kontrolloinut käytössämme olleen Urho-analysaattorin ja reagenssit. Fimlab Laboratoriot Oy:ssä kalibroinnit parathormonin reagensseille tehdään aina eränumeron (LOT) vaihtuessa. Kaksitasoinen parathormonikontrolli suoritetaan aina aamuisin, työvuorojen vaihtuessa yövuorosta aamuvuoroon. Kontrolloinnista huolehditaan myös aina kalibroinnin jälkeen. Parathormonin reagenssikasetteja oli valmiiksi lisätty normaalia enemmän Urho-analysaattorille, jota meidän oli tarkoitus käyttää. Analysoinnin jälkeen hävitimme näyteputket asianmukaisesti, potilaiden tietosuojaan huomioonottaen. Tulokset kirjjasimme ylös vain omia numerokodejamme käyttäen.

8.3 Parathormonitulosten käsittely

Tammikuun ensimmäisen keräyspäivän kymmenen tutkimuspyynnöllä ollutta näytettä hylkäsimme kokonaisotannasta, koska ne analysoitiin Tarmo-analysaattorilla. Hyväksyimme vain tulokset, jotka saimme Urho-analysaattorilta. Käsittelimme ensimmäisen keräyspäivän K_3 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteet käsin ja syötimme ne manuaalisesti suoraan Urho-analysaattorille, joten tulokset olisivat olleet käyttökelpoisia. Niistä ei kuitenkaan ollut meille hyötyä, koska molempiin vertailuihin tarvittiin K_2 EDTA-näyteputkesta mitattua tulosta ja näiltä potilailta ei käyttökelpoista K_2 EDTA-näytteiden tulosta ollut. Näitä kymmenen potilaan hylättyjä tuloksia emme käsittele tässä opinnäytetyössä.

Saadut tammikuun tulokset keräsimme Microsoft Office Excel -taulukkoon ja järjestelimme ne K_3 EDTA-putkista saatujen tulosten mukaan pienimmästä pitoisuudesta suurimpaan pitoisuuteen. Lisäksi laskimme K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tulosten erotuksen, eroprosentin ja korrelaatiokertoimen. Tulostaulukko tammikuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista on liitteenä 1. Maaliskuun tulokset ovat omassa Excel-taulukossaan K_2 EDTA-näytteiden tulosten mukaan suuruusjärjestykseen laitettuna liitteenä 6. Kaikista tammikuun ja maaliskuun kuuden tunnin säilyvyystuloksista olemme koonneet Excel-taulukon, joka on K_2 EDTA-tulosten mukaisessa suuruusjärjestyksessä liitteenä 7. Taulukkoon laitoimme maaliskuussa tehdyistä rinnakkaismäärytyksistä keskiarvon ja järjestimme taulukon potilasnumerot yhdestä 47:ään. Laskimme K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tulosten erotuksen, eroprosentin ja korrelaatiokertoimen.

Tammikuun K_3 - ja K_2 EDTA näytteiden tulostasoista ja tammi- ja maaliskuun K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tulostasoista teimme pylväsdiagrammit. Tämän lisäksi teimme sarjoista eroprosenttikuvaajat, erotuskuvaajat ja korrelaatiokuvaajat. Korrelaatiokuvaajiin on laskettu korrelaatiokertoimet. Pylväsdiagrammissa on rinnakkaiset pylväät kullekin potilaalle. K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista tehdyssä pylväsdiagrammissa ensimmäisenä on pylväs johon verrataan, eli K_3 EDTA-näytteen tulos, ja toisena pylväänä verrattava, eli K_2 EDTA-näytteen tulos. K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista tehdyssä pylväsdiagrammissa ensimmäisenä pylväänä on K_2 EDTA-näytteen tulos ja jälkimmäisenä pylväänä 6h- K_2 EDTA-näytteen tulos. Pylväsdiagrammien x-akselilla on potilaat taulukon mukaisessa järjestyksessä ja y-akselilla on parathormonipitoisuus pmol/l. Pylväsdiagrammi tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-

näytteiden tuloksista on liitteenä 2 ja pylväsdiagrammi tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista on liitteenä 8.

Erotuskuvaajissa tulokset sijoittuvat nollaviivan ylä- ja alapuolelle riippuen siitä, ovatko testattavan antikoagulantin näytetulokset nousseet vai laskeneet verrattavan antikoagulantin näytetuloksiin nähden. x-akselilla ovat potilaat taulukon mukaisessa järjestyksessä ja y-akselilla on erotus pmol/l. K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista tehdyssä erotuskuvaajassa on laskettu näiden tulosten erotus K_3 EDTA-tuloksen ollessa nollassa. K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista tehdyssä erotuskuvaajassa on laskettu, kuinka suuri erotus niiden kahden eri antikoagulantin näytetuloksilla on nollassa K_2 EDTA. Erotuskuvaajat tammikuun 2013 kokeellisesta osuudesta K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista on liitteenä 3 ja erotuskuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista on liitteessä 9.

Eroprosenttikuvaajissa tulokset sijoittuvat positiivisen tai negatiivisen eroprosentin mukaan nollaviivan ylä- tai alapuolelle. K_3 - ja K_2 EDTA-ero prosenttikuvaajassa on laskettu näiden tulosten erotus ja laskettu ero prosenttiosuus K_3 EDTA-tulokseen verrattuna. Ero prosenttikuvaajien x-akselilla ovat potilaat taulukon mukaisessa järjestyksessä ja y-akselilla ovat virheet prosentteina. Ero prosenttikuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista on liitteenä 4 ja ero prosenttikuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista on liitteenä 10.

Korrelaatiokuvaajissa x- ja y-akseleilla ovat verrattavat tulokset pmol/l. Pisteet laitettiin Excel-ohjelmalla samojen potilaiden eri tulosten yhteyskohtaan. Näiden pisteiden mukaan Excel-ohjelma piirsi lineaarisen suoran ja lasi korrelaatiokertoimen. Tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista saatu korrelaatiokuvaaja on liitteenä 5 ja korrelaatiokuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista on liitteenä 11.

9 OPINNÄYTETYÖN TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA

Tuloseroja aloimme tarkastella tammikuussa tulostasopylväsdiagrammien ja virheprosenttikuvaajien avulla. Tulostasot näyttivät pylväsdiagrammeissa yhteneviltä K_3 - ja K_2 EDTA-putkien sekä K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-putkien välillä, lukuun ottamatta muutamaa todella poikkeavaa tulosta kuuden tunnin säilyvyys -tuloksissa. Korkeammissa tuloksissa vertailutulosten muutos oli silminnähden suuri, ja matalampien tulosten erot olivat pieniä. Prosentuaalisesti erot ovat kuitenkin samaa luokkaa niin korkeilla kuin matalilakin näytteillä, koska matalammilla tuloksilla erot voivat olla hyvin pieniä, mutta silti prosentuaalinen ero kohoaa korkeaksi. Tammikuun tuloksia tarkastellessa tulimme tulokseen, ettei prosentuaalinen vertaus ole paras menetelmä kuvaamaan tulostaseroja.

Tammikuun tuloksista teimme lisäksi pohdinnan jälkeen erotuskuvaajat ja korrelaatiokuvaajat. Tammikuun tulosten perusteella päätimme jatkaa kokeellista osuutta kuuden tunnin säilyvyyden osalta, jotta saisimme siihen suuremman otannan. 25 eri potilaan näytteet eivät riitä kuuden tunnin esikäsittelyajan tulosten hyväksymiseen, varsinkin, kun kaksi tulosta poikkesi huomattavasti muista. Maaliskuun toteutuksessa päätimme kirjata ylös potilaiden paastoajan ja näytteen ulkonäön, jotta voisimme tarkastella lipemian, ikteerisyyden tai hemolyysin mahdollista vaikutusta tuloksiin. Näytteen ollessa poikkeava tai 6h- K_2 EDTA-näytteen tuloksen poiketessa hyvin paljon K_2 EDTA-näytteen tuloksesta, teimme parathormonimäärityksen uudelleen. Yhdistimme tammikuun ja maaliskuun K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tulokset ja teimme niistä tulostasopylväsdiagrammin, virheprosenttikuvaajan, erotuskuvaajan ja korrelaatiokuvaajan.

Tekemämme korrelaatiokuvaajat kertoivat vahvasta lineaarisesta riippuvuudesta molempien tutkimusten osalta. K_3 - ja K_2 EDTA-tulosten korrelaatiokerroimeksi saimme 0,9982. K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-tulosten osalta tammikuun korrelaatiokerroin oli 0,9862, mutta se nousi 0,9941:een koottuamme tammikuun ja maaliskuun tulokset yhteen. Korrelaatiokuvaajissa (liite 5 ja liite 11) korrelaatiokerroin on merkitty isolla R:llä ja korotettuna toiseen eli korrelaatiokerroin r on neliöjuuri R^2 :sta.

9.1 Parathormonitulosten yhteneväisyys K_3 - ja K_2 EDTA-plasmasta mitattuna

Testasimme K_2 EDTA-näyteputken sopivuutta parathormoninäytteenottoon 32:n eri potilaan näytteillä. Prosentuaaliset erot olivat sarjan välillä matalimmillaan 0,1 % ja korkeimmillaan 10,8 %. Numeerisesti pienin erotus oli 0,02 pmol/l ja korkein oli 5,44 pmol/l. 5,44 pmol/l erotus oli 50,24 pmol/l ja 44,80 pmol/l tulosten välillä, joten sen kliinisen merkittävyyden voisi olettaa jäävän hyvin pieneksi.

9.2 Parathormonin säilyvyys K_2 EDTA-näyteputkessa

Parathormonin kuuden tunnin säilyvyyttä testasimme 25 potilaan näytteillä tammikuussa ja jatkoimme tutkimusta 22 potilaan näytteillä maaliskuussa. Koko sarjassa matalin prosentuaalinen ero oli 0,0 % ja korkein 40,5 %. Korkeissa tuloksissa oli muutama selkeästi poikkeava tulos, joista kaksi laski 17,2 % ja 15,3 % sekä yksi nousi 40,5 %. Jos nämä kolme virhettä poistaa, oli prosentuaalinen ero matalimmillaan 0,0 % ja korkeimmillaan 11,8 %. Tulokset olivat hyviä, erittäin yhteneväisiä K_3 - ja K_2 EDTA-tulosten kanssa, lukuun ottamatta muutamaa poikkeavaa tulosta, joiden kliininen merkittävyys jää epäselväksi.

9.3 Yhteenveto

Tieteellisissä tutkimuksissa syntyy aina virheitä, vaikka niitä pyritään välttämään. Tärkeää onkin korjata löydetty virheet ja arvioida jäljelle jäävien virheiden aiheuttamaa vaikutusta tutkimustulosten tulkintaan. (Alkula, Pöntinen & Ylöstalo 1999, 74.) Vaikka opinnäytetyömme ei ole tieteellinen tutkimus, pätee sama virheisiin liittyvä lainalaisuus myös meidän kokeelliseen osuuteemme.

Molemmissa tutkimuksissa sarjojen väliset tulokset olivat tulostasoiltaan yhteneviä. Pienet erotukset olivat odotettavia, mutta syinä ei ollut K_2 EDTA-antikoagulantti tai säilytys kuusi tuntia ennen sentrifugointia. Korrelaatiokuvaajat kertovat selvästi linearisesta korrelaatiosta kertoimen ollessa molemmissa tutkimuksissa erittäin lähellä lukuarvoa 1. K_3 - ja K_2 EDTA-näytteenottoputkista saadaan parathormonimäärityksissä niin yhteneväisiä tuloksia, että K_2 EDTA-näyteputki tullaan hyväksymään parathormoninäyt-

teenottoon. Fimlab Laboratoriot Oy päivittää ohjekirjansa niin, että K₂EDTA-antikoagulantti sopii näyteputkeksi parathormonille. Kuuden tunnin säilytys huoneenlämmössä sentrifugoimatta ei oleellisesti vaikuta K₂EDTA-näyteputkista mitattuihin plasman parathormonituloksiin. Säilyvyyystutkimustuloksienne käyttöä harkitaan Fimlab Laboratoriot Oy:llä omien sisäisten logististen asioiden kannalta.

10 POHDINTA

Opinnäytetyömme aiheena oli testata, sopiiko K_2EDTA -antikoagulantti parathormoninäytteenottoon. Tämän lisäksi testasimme parathormonin säilyvyyttä K_2EDTA -antikoagulanttiputkessa kuuden tunnin ajan huoneenlämmössä sentrifugoimattomana. Opinnäytetyömme aiheen saimme Fimlab Laboratoriot Oy:ltä, automaation vastuualueelta, jonka työelämän edustajina toimivat koko prosessin ajan sairaalakemisti Päivi Holm ja laboratorioesimies Marja-Leena Torkki. Työelämän edustajat ovat olleet mukana prosessissa ja aktiivisesti läsnä opinnäytetyömme ohjauksessa.

Aihe oli mieluinen ja kiinnostava, kokeellinen työ oli luonteeltaan meille sopiva. Opinnäytetyömme, niin kirjalliselta kuin kokeelliselta osuudeltaan on edennyt koko ajan hyvin aikataulussa ja merkittäviä vastoinkäymisiä ei ole ollut. Kokeelliset osuudet ovat menneet odotuksia paremmin, ottaen huomioon vähäisen suunnittelun. Paremmalla suunnittelulla ja ennakkoinnilla syntyneet virheet olisi voitu välttää, kuten kymmenen näytteen ohjautuminen väärälle linjastolle. Tulokset ovat olleet hyviä ja selvästi hyödyllisiä Fimlab Laboratoriot Oy:lle. Opinnäytetyömme tulosten pohjalta Fimlab Laboratoriot Oy:ssä tehtiin ohjekirjapäivitys K_2EDTA :n sopivuudesta parathormoninäytteenottoon.

Tutkimuksen eettisyyttä tulee tarkastella läpi koko prosessin, jotta voidaan tehdä eettisesti oikeanlaisia ratkaisuja tutkimuksen eri vaiheissa (Hirsjärvi ym. 2007, 23). Vaikka opinnäytetyömme ei ole tieteellinen tutkimustyö, oletamme samojen sääntöjen ja ohjeistusten pätevän myös opinnäytetyöprosessiin. Pidimme tarkoin huolen potilaiden tietosuojasta ja identifioimme parathormoninäytteet juoksevilla numeroilla. Olemme opinnäytetyössämme käsitelleet potilasnäytteitä eettisesti niin, ettei potilaan henkilötietoja ole kirjattu mihinkään ylös, emmekä ole vieneet laboratorion ulkopuolelle mitään materiaalia, millä näytteitä voisi identifioida. Potilailta ei tarvinnut kysyä erillistä suostumusta opinnäytetyön otantaan osallistumisesta, koska opinnäytetyön kokeellisen osuuden koettiin olevan laboratorion sisäistä laadunarviointia. Potilaille ei aiheutunut minkäänlaista riskiä tai vaivaa opinnäytetyömme vuoksi.

Tutkimuksen tekijällä on ensisijainen vastuu oman työnsä eettisyydestä (Helsingin yliopisto 2009). Olemme työskentelyssämme pyrkineet huomioimaan eettisyyden kaikissa

työvaiheissa sekä pyrkineet toimimaan mahdollisimman luotettavasti. Suomen bioanalytikkoliiton (2006) eettisissä ohjeissa neuvotaan käyttämään hyväksytyjä menetelytapoja ja kaikissa laboratoriotutkimuksen vaiheissa vastaamaan laadusta ja luotettavuudesta. Näytteenotto ja tutkimus tulisi uusina, jos näytteenotto, näytteen kuljetus, säilytys, käsittely tai analyysin suorittaminen eivät vastaa tutkimukselle asetettuja vaatimuksia (Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006). Työskentelyssämme olemme koko keellisen osuuden ajan pyrkineet huomioimaan luotettavuuden ja huolellisuuden. Näytteiden keräys tapahtui mielestämme oikeaoppisesti ja sujuvasti sekä näytteet kuljetettiin ja säilytettiin annettujen ohjeiden mukaan. Huolehdimme itse näytteiden tarpeeksi nopeasta sentrifugoinnista. Sentrifugointiajoissa oli pieniä eroavaisuuksia näytteiden välillä, mutta niillä ei pitäisi olla merkitystä opinnäytetyöhömme ja sen tuloksiin, koska kaikki näytteet käsiteltiin reilusti annettujen aikarajojen (lukuun ottamatta kuuden tunnin näytteitä) sisällä. Lisäksi vaihtelut sentrifugointiajoissa olivat hyvin pieniä. Analysaattori oli asianmukaisesti kontrolloitu ja työskentelimme analysaattorilla samanaikaisesti analysaattorilla työskentelevän henkilön kanssa.

Opinnäytetyömme raportoinnissa olemme vältäneet plagiointia käyttämällä lähdeviitteitä. Lähteitä olemme etsineet mahdollisimman monipuolisesti niin, että kaikki lähteet olisivat mahdollisimman tuoreita ja ajantasaisia. Lähteinä olemme käyttäneet kirjoja, niin suomenkielisiä kuin englanninkielisiäkin, sekä lehtiartikkeli- ja internetlähteitä. Olemme raportoinnissa yrittäneet kuvata opinnäytetyötämme ja sen kulkua mahdollisimman realistisesti niin, että se olisi tarvittaessa toistettavissa.

Olemme raportoineet tulokset sellaisina, kuin ne ovat mittaushetkellä olleet. Emme ole missään vaiheessa kaunistelleet tai muokanneet tuloksia edustavamiksi. Olemme ainoastaan järjestäneet tulokset paremmin hallittavaan muotoon. Kuvaajia olemme käyttäneet, koska niistä saa helpommin käsityksen tuloksista. Taulukot olemme esittäneet niiden tarkkuuden vuoksi. Kuvaajissa olemme pyrkineet mahdollisimman selkeään ja kuvaavaan ulkoasuun ja skaalaan.

Luotettavuuteen eniten vaikuttavat tekijät ovat lähinnä aineiston koko ja tulosten analysoinnin luotettavuus. Aineiston luotettavuuteen vaikuttaa sekä sen koko että kattavuus, kuinka hyvin se kuvastaa tutkittavaa perusjoukkoa. Mitä tarkempia tuloksia halutaan, sitä suurempi on otoksen oltava. Otoksen koossa täytyy kuitenkin huomioida kustannukset sekä käytettävissä oleva aika. (Hirsjärvi ym. 2007, 174.) Aineistomme koko-

naisuudessaan oli 32 K_3 - ja K_2 EDTA-näyteputkista tehtyä parathormonimäärittystä sekä 47 K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näyteputkista tehtyä parathormonimäärittystä. Koemme aineiston olevan kooltaan riittävä tulosten luotettavuuden takaamiseksi. Otannassa oli suurimaksi osaksi näytteitä dialyysipotilailta, mikä kuvaa hyvin normaalia tilannetta, koska suurin osa laboratorioon tulevista parathormoninäytteistä on dialyysipotilailta. Lisäksi halusimme monipuolistaa otantaa, joten keräsimme myös näytteitä henkilöiltä, joilla oletettavasti ei ole häiriöitä mineraaliaineenvaihdunnassa. Näin ollen saimme kattavan otannan, jossa oli parathormonituloksia niin viiterajojen sisä- kuin yläpuoleltakin.

Tulosten analysoinnissa ja tulosten käsittelyssä olemme käyttäneet apuna Microsoft Office Excel -taulukkolaskentaohjelmaa, jolla olemme laskeneet laskutehtävät, kuten virheprosentit. Laskennallisia virheitä ei siis ole, mutta olemme manuaalisesti syöttäneet mittaustulokset taulukkoon. Olemme olleet hyvin huolellisia ja tarkastaneet tulosten oikeellisuuden alkuperäisistä (osittain koneelta tulostetuista) vastauksista. Koko ajan olemme työskennelleet yhdessä ja molemmat ovat tarkkailleet omaa ja toisen sekä muiden työntekijöiden toimintaa ja huolellisuutta virheiden välttämiseksi. Tuloksia olemme analysoineet yhdessä Fimlab Laboratoriot Oy:n työelämänedustajien kemisti Päivi Holmin sekä laboratorioesimies Marja-Leena Torikin kanssa. Olemme alustavasti analysoineet ja havainnollistaneet tulokset, jotka olemme esitelleet työelämänedustajille käymissämme ohjauskeskusteluissa. Työelämänedustajat ovat olleet täysin samaa mieltä tekemistämme tulosanalyyseistä ja ovat ohjanneet meitä analyysien syventävään tarkasteluun. He ovat kliinisen kemian asiantuntijoita Fimlab Laboratoriot Oy:ssä ja luotamme heidän ammattitaitoonsa ja asiantuntevuuteensa tuloksien analysoinnissa.

Keskustelimme tuloksista työelämänedustajien kanssa useaan otteeseen työn edetessä ja pohdimme työssämme ilmenneiden tuloserojen mahdollisia syitä. Korkeammilla tuloksilla oli suuret erot, mutta uskoisimme, että niiden kliininen merkitys ei ole huomattava. Monet tulokset olivat niin korkeita viitearvoihin nähden, ettei niiden muutoksella ole luullaksemme hoitoon vaikutusta. Esikäsittelyssä K_2 EDTA-putket menivät linjastolle, joten ei tiedetä, onko näytteet sentrifugoitu tarkalleen samaan aikaan kuin K_3 EDTA-putket. Käsisentrifugissa ja MPA-esikäsittelylinjastolla sentrifugointiaika on molemmissa kymmenen minuuttia, joten siitä tuloserojen ei pitäisi johtua. Ohjeistus parathormoninäytteiden esikäsittelyajan suhteen on mahdollisimman pian, mutta viimeistään kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Kaikki parathormoninäytteet joko menivät esikäsittelylinjastolle tai käsittelimme ne itse selvästi alle kahden tunnin kuluttua näyt-

teenotosta. Virhe ei siis johdu myöskään esikäsittelyajasta tai sen vaihtelusta. Tammikuussa kymmenen näytettä ohjautui Tarmo-analysointilaitteelle, joten jouduimme näytteet hylkäämään otannastamme. Koska emme saaneet tuloksia Urho-analysointilaitteelta, emme voi tietää johtuiko tulosten muutos putken antikoagulantista vai laite-eroista. Eri Cobas® 6000 -analysointilaitteilla voi olla laitekohtaisia tasoeroja, vaikka kontrollitulokset ovat sallitun vaihteluvälin sisällä. Tammikuun ensimmäisenä keräyspäivänä laitteiden kontrollitulokset erosivat matalammassa kontrollissa 4,4 % ja korkeammassa kontrollissa 7,6 %. Jos olisimme ottaneet hylkäämämme näytetulokset mukaan otantaan, olisi näytetulosten välinen prosentuaalinen ero kasvanut todellisuutta suuremmaksi.

Kokeellisten osuuksiemme aikana käytössä oli parathormonin kaksitasoinen kontrolli PreciControl Varia LOT 167407 (2012). Kontrollien alempi tavoitekeskiarvo on 6,20 pmol/l ja sen vaihteluväli on 4,53–7,87 pmol/l. 1s-kontrolliraja on 0,56 pmol/l ja se poikkeaa tavoitekeskiarvosta 9 %. Ylempi tavoitekeskiarvo on 19,30 pmol/l ja sen vaihteluväli on 14,70–23,90 pmol/l. 1s-kontrolliraja on 1,54 pmol/l ja se poikkeaa tavoitekeskiarvosta 8 %. Tämä tarkoittaa sitä, että 2s-kontrollirajat ovat alemmalla kontrollilla 18 % ja korkeammalla kontrollilla 16 % ja 3s-kontrollirajat alemmalla kontrollilla 27 % ja korkeammalla kontrollilla 24 %. (PreciControl Varia LOT 167407 2012.) Kontrollitulokset saavat poiketa tavoitearvosta alle 1s-vertaan, olla useamman kerran 1s-kontrollirajan yli ja käydä kerran yli 2s-kontrollirajan ilman hylkäystä. Teoriassa näin ollen yksittäisissä tuloksissa saa virheprosentti olla jopa 26 % ja 23 %.

Käytännössä kuitenkin sarjojen välillä ei ole noin suuria eroja, vaan tuloserot johtuvat muusta kuin mittauseroista. Alun perin ajattelimme näytteiden välisen virheprosentin olevan noin 5 %:n tasolla, mutta se oli joidenkin näytteiden välillä odotettua korkeampi. Variaatiokerroin kontrollien välillä kertoo sarjojen sisäisestä yhteneväisyydestä. Variaatiokertoimet olivat 2,26 % ja 2,04 % tammikuun kokeellisen osuuden aikana (Holm 2013). Eri päivien välillä voi tulokset vaihdella enemmän, mutta sarjojen sisällä menetelmästä johtuvaa erotusta ei pitäisi juurikaan olla.

Pohdimme myös näytteiden laatua ja siihen vaikuttavia tekijöitä. 6h-K2EDTA-putket, joissa oli viiterajat ylittävä tulos, saatiin dialyysiosastolta ja niistä määritettiin B-PVK. B-PVK määritetään Fimlab Laboratoriot Oy:llä Sysmex verenkuvaa-analysointilaitteella, joka sekoittaa putket kaksi kertaa ja ottaa näytteen ohuella neulalla korkin läpi. Näytteet

siis pysyivät koko ajan ilmatiiviinä, joten emme usko, että B-PVK:n määrittämisestä aiheutui tulostasojen muutosta.

Lipeemisyys tai ikteerisyys ei pitäisi vaikuttaa parathormonituloksiin, kun taas hyvin vahva hemolyysi voi alentaa parathormonitulosta. Jotta hemolyysillä olisi vaikutusta mittaukseen, tulisi sen olla indeksiltään 250, mikä tarkoittaa, että plasma näyttää veriseltä. Jotkut tulostasoltaan korkeista näytteistä olivat vahvasti lipeemisiä, joten mietimme, voisiko se kuitenkin vaikuttaa mittauksen toistettavuuteen. Parathormonimäärityksessä näytemäärä on pieni, joten suuri lipoproteiinien määrä voi syrjäyttää plasman vettä ja näin ollen väärentää tulosta. Maaliskuun näytteistä tarkkailimme näytteiden ulkonäköä ja teimme rinnakkaismittaukset poikkeavan näköisistä näytteistä. Sarjassa oli lipeemisiä näytteitä, joiden rinnakkaismittaukset olivat lähes samanarvoiset. Myös vaihtelua kuuden tunnin säilytyksen jälkeen oli erittäin vähän. Tästä voimme päätellä, ettei ainakaan näiden näytteiden osalla näytteen lipeemisyys johtanut tulostason muutokseen.

Kvantitatiiviseen mittaamiseen kuuluu aina satunnaisvirhe. Jos minkäänlaista eroa tulosten välillä ei olisi, olisi se paljon epäilyttävämpää. Tulosten tulkinnassa olemme ottaneet huomioon tämän ei-vältettävissä olevan virheen ja yrittäneet nähdä kokonais kuvan, eikä vain pieniä virheitä. Saimme molemmissa tutkimuksissa tarpeeksi suuren otannan, jotta voimme tehdä luotettavia päätelmiä tuloksista. Kaikissa tulossarjoissa virhe oli positiivista ja negatiivista satunnaisvirhettä, ei systemaattista. Tästä voisi päätellä, ettei virhe johdu antikoagulantista tai näytteen säilyvyydestä, koska näissä tapauksissa tulos taso menisi jompaankumpaan suuntaan tulosasteikolla.

Säilyvyystestauksesta kehittyi työn teon aikana odotettua suurempi kokonaisuus, koska alun perin tarkoituksena oli keskittyä vain lähinnä K₂EDTA:n sopivuuteen parathormoninäytteenotossa. Työelämän edustajat ehdottivat, sekä olimme itse halukkaita, jatkamaan kokeellista osuutta säilyvyyden osalta ja keräämään siihen suuremman aineiston. Lopulta säilyvyystutkimuksessa oli jonkin verran enemmän näytteitä kuin antikoagulantin sopivuutta testaavassa tutkimuksessa. Säilyvyystutkimuksen osalta tuloksemme jäivät kuitenkin toistaiseksi Fimlab Laboratoriot Oy:ssä hyödyntämättä, mutta emme koe säilyvyystestauksemme olleen turha. Fimlab Laboratoriot Oy sai kuitenkin uutta tietoa parathormonikonsentraatioiden säilyvyydestä kokoveressä ja he voivat tulostemme pohjalta miettiä mahdollisia jatkotutkimuksia. Jatkotutkimuksena voisi olla esikäsitelyajan pidentäminen esimerkiksi kahteentoista tuntiin. Lisäksi voisi testata muiden

näyteputkien sopivuutta parathormoninäytteenottoon. Hyödyllisintä olisi testata litium-hepariinigeeliputkia, koska ne ovat plasmamäärityksissä yleisimmin käytössä olevia putkia Fimlab Laboratoriot Oy:llä. Jos tutkimus olisi onnistunut ja parathormoninäytteen voisi ottaa litium-hepariinigeeliputkeen, voisi parathormonimäärityksen liittää plasmamäärityspakettiin. Mahdollista olisi testata myös esimerkiksi seerumigeeliputken sopivuutta parathormoninäytteenottoon.

Vaikka koemme opinnäytetyömme olevan onnistunut, on joitakin asioita ainakin korkeellisessa osiossa, joita olisimme tehneet toisin. Näytteiden sentrifugoinnin ja erotuksen tekisimme kokonaan itse kaikille näytteille, jolloin voisimme tarkkailla näytteiden ulkomuotoa ja mahdollisia poikkeamia näytteistä. Hemolyyttisistä, ikteerisistä ja lipeemisistä näytteistä voisi tehdä suoraan rinnakkaismääritykset ja vertailtavat näytteet voisi määrittää uudestaan, jos niiden tulokset poikkeavat toisistaan. Tavoitteenamme oli tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n automaation vastuualueelle uutta tietoa, jota voidaan hyödyntää ohjekirjan päivityksessä parathormonin näytteenoton ja säilytyksen osalta. Tavoittemme täyttyi opinnäytetyöprosessin aikana. Opinnäytetyömme vastaa asetettuihin tutkimusongelmiin.

Prosessina opinnäytetyön tekeminen on ollut mielenkiintoinen ja opettavainen kokemus. Hyvästä yhteistyöstä haluamme kiittää tukenamme olleita sairaalakemisti Päivi Holmia ja laboratorioesimies Marja-Leena Torkkia sekä koko Fimlab Laboratoriot Oy:tä. Kiitämme myös Tampereen yliopistollisen sairaalan dialyysiosastoa sujuvasta yhteistyöstä.

LÄHTEET

Alkula, T., Pöntinen, S., & Ylöstalo, P. 1999. Sosiaalitutkimuksen kvantitatiiviset menetelmät. 1.-3. painos. Juva: WSOY.

Arkin, C. F., Ernst, D. J., Marlar, A., Parish, G. T., Szamosi, D. I. & Wiseman, J. D. 2003. Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Standard – Fifth Edition. Document H1-A5. USA: NCCLS.

Ashihara, Y., Kasahara, Y. & Nakamura, R.M. 2007. Immunoassay and Immunochemistry. Teoksessa McPherson, R.A. & Pincus, M.R. (ed.) 2007. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21th Edition. USA: Saunders Elsevier, 793–818.

Bringhurst, F. R., Demay, M. B. & Kronenberg, H. M. 2008. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. Teoksessa Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. & Larsen, P. R. (ed.) 2008. Williams Textbook of Endocrinology. 11th Edition. USA: Saunders Elsevier, 1203–1268.

Endres, D. B. & Rude, R. K. 2006. Mineral and Bone Metabolism. Teoksessa Ashwood, E., Bruns, D. & Burtis, C. (ed.) 2006. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Missouri: Elsevier Saunders, 1891–1965.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2003. Kalsiuminfuusiokoe, parathormoni. Versio: 1.0. Käyttöönottopäivämäärä: 15.12.2003. Luettu: 18.2.2013.
http://fimlab.fi/lake/ohjekirja_/ohje.tpl?sivu_id=194;setid=6060;id=258

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012. Parathormoni (intakti). Versio: 1.2. Laatimispäivämäärä: 13.7.2012. Käyttöönottopäivämäärä: 2.8.2012. Luettu: 28.9.2012.
http://fimlab.fi/lake/ohjekirja/nayta.tpl?sivu_id=194;setid=6506

Fremgen, B. & Blume, W. 2001. Phlebotomy Basics With Other Laboratory Techniques. USA: Prentice-Hall.

Greiner Bio-One. 2012. Comparison of VACUETTE® K2EDTA and VACUETTE® K3EDTA tubes. Luettu: 28.9.2012.
http://www.gbo.com/en/index_1767.php

Guder, W. G., Narayanan, S., Wisser, H. & Zawta, B. 1996. Samples: From the Patient to the Laboratory. Germany: GIT VERLAG GMBH.

Handbook of Diagnostic Tests. 2003. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. 7. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Helsingin yliopisto. 2009. Tutkimusetiikka. Luettu: 15.4.2013.
www.helsinki.fi/tutkimus/tutkimusetiikka.html

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13., osin uudistettu painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2008. Tilastolliset menetelmät. 5. painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Holm, P. Sairaalakemisti. 2013. Cobas® 6000 -analysaattorin parathormonin kontrollitulokset. Henkilökohtainen tiedonanto. Annettu 21.1.2013.

Isales, C. M. 2009. Physiology of the Parathyroid Glands. Teoksessa Terris, D. J. & Gourin, C. G. (ed.) 2009. Thyroid and Parathyroid Diseases. Medical and Surgical Management. USA: Thieme Medical Publishers, Inc., 29–34.

Klemm, K.M. & Klein, M.J. 2007. Biochemical Markers of Bone Metabolism. Teoksessa McPherson, R.A. & Pincus, M.R. (ed.) 2007. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21th Edition. USA: Saunders Elsevier, 170–184.

Liimatainen, O. 2010. Laboratorioprosessien laatu; mistä elementeistä laatu koostuu. Moodi 1/2010. Helsinki: Labquality.

Metsämuuronen, J. 2003. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 2.uudistettu painos. Helsinki: International Methelp Ky.

Penttilä, I. 2004. Aineenvaihdunnan häiriöt ja niiden tutkiminen. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WS Bookwell Oy, 119–148.

PreciControl Varia LOT 167407. 2012. Elecsys and cobas e analyzers. Versio 5. Luettu: 26.9.2013. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.

Roche Diagnostics. 2008. Cobas 6000 analyzer series. Operator's Manual. Version 2.0. Päivitetty: maaliskuu 2008. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.

Roche Diagnostics. 2012a. Cobas 6000 menetelmäperiaatteet. Luettu: 12.11.2012.

Roche Diagnostics. 2012b. Elecsys -menetelmien periaatteet. Luettu 22.11.2012.

Roche Diagnostics. 2012c. Elektrokemiluminometrinen immunoanalyysi (ECLIA). Luettu: 22.11.2012.

Roche Diagnostics. 2012d. PTH. Elecsys and cobas e analyzers. Päivitetty: lokakuu 2012. Luettu 22.11.2012. Mannheim: Roche Diagnostics.

Roche Diagnostics Limited. 2012a. Cobas® 6000 analyzer series. Päivitetty 19.12.2012. Luettu 13.2.2013. http://www.cobas.com/home/products_services/cobas_6000_analyzer_series.html

Roche Diagnostics Limited. 2012b. MODULAR® PRE-ANALYTICS EVO. Päivitetty: 19.12.2012. Luettu: 13.2.2013. http://www.cobas.com/home/products_services/modular_pre_analytics_evo.html

Smith, J. A. & Stack, B. C. 2009. Pathophysiology of the Parathyroid Glands. Teoksessa Terris, D. J. & Gourin, C. G. (ed.) 2009. Thyroid and Parathyroid Diseases. Medical and Surgical Management. USA: Thieme Medical Publishers, Inc., 184–196.

Strewler, G. J. & Rosenblatt, M. 1995. Mineral Metabolism. Teoksessa Felig, P., Baxter, J. D. & Frohman, L. A. (ed.) 1995. Endocrinology and Metabolism. 3rd edition. USA: McGraw-Hill, 1407–1516.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006. Bioanalyttikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Hyväksytty Suomen Bioanalytikkoliiton liittohallituksen kokouksessa 1.9.2006 ja liittokokouksessa 18.11.2006.

Tapola, H. 2004. Näytteenotto. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy, 24–29.

Turgeon, M. L. 2007. Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science. 5th Edition. Missouri: Mosby Elsevier.

Ullman, E. F. 2005. Homogenous Immunoassays. Teoksessa Wild, D. (ed.) 2005. The Immunoassay Handbook. 3rd Edition. UK: Elsevier Ltd, 212–232.

Välimäki, M. & Mäkitie, O. 2009. Luusto ja mineraaliaineenvaihdunta. Teoksessa Välimäki, M., Sane, T. & Dunkel, L. (toim.) 2009. Endokrinologia. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 264–350.

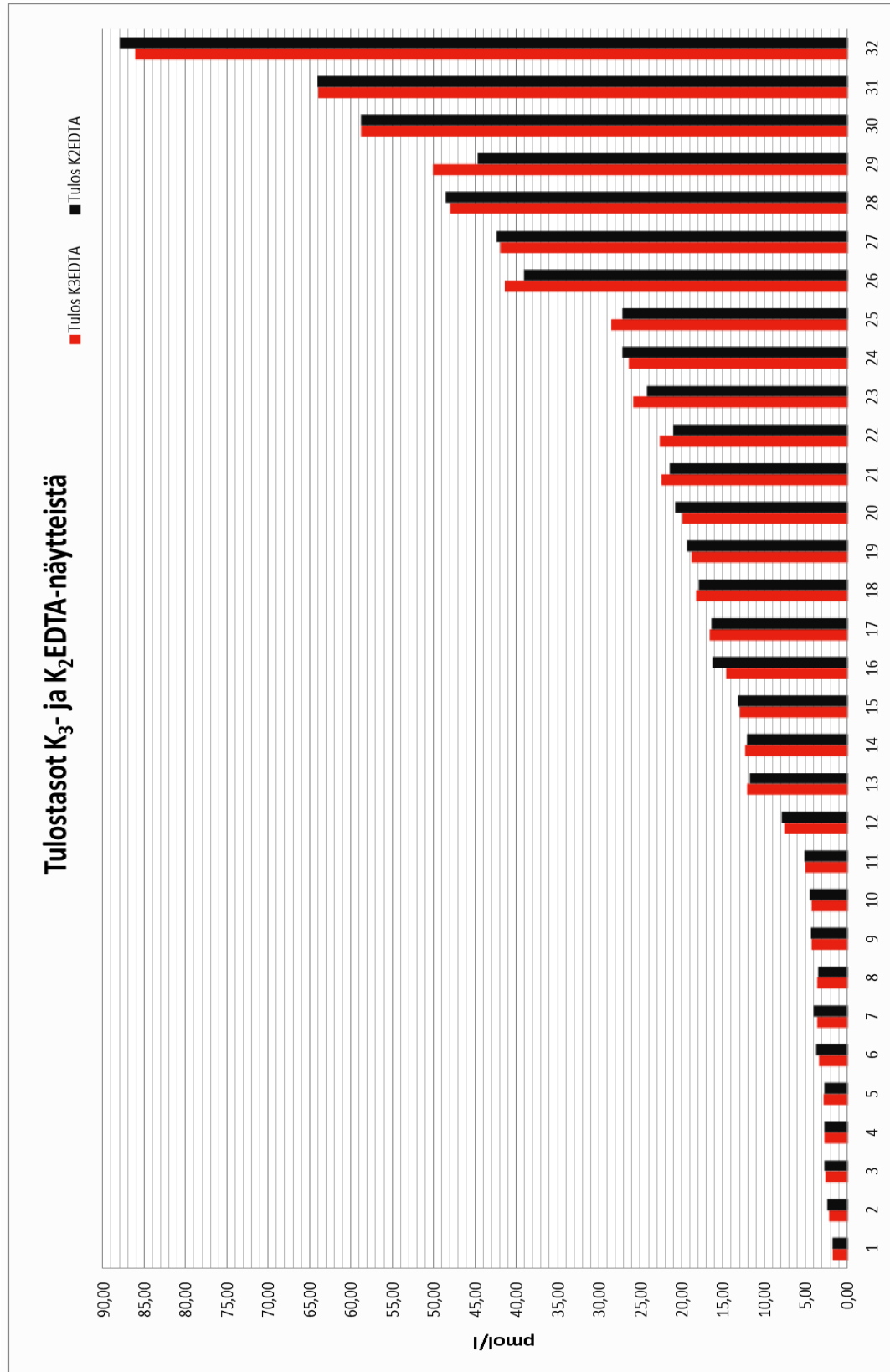
Young, D.S., Bermes, E.W. & Haverstick, D.M. 2006. Specimen Collection and Processing. Teoksessa Ashwood, E., Bruns, D. & Burtis, C. (ed.) 2006. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Missouri: Elsevier Saunders, 42–58.

LIITTEET

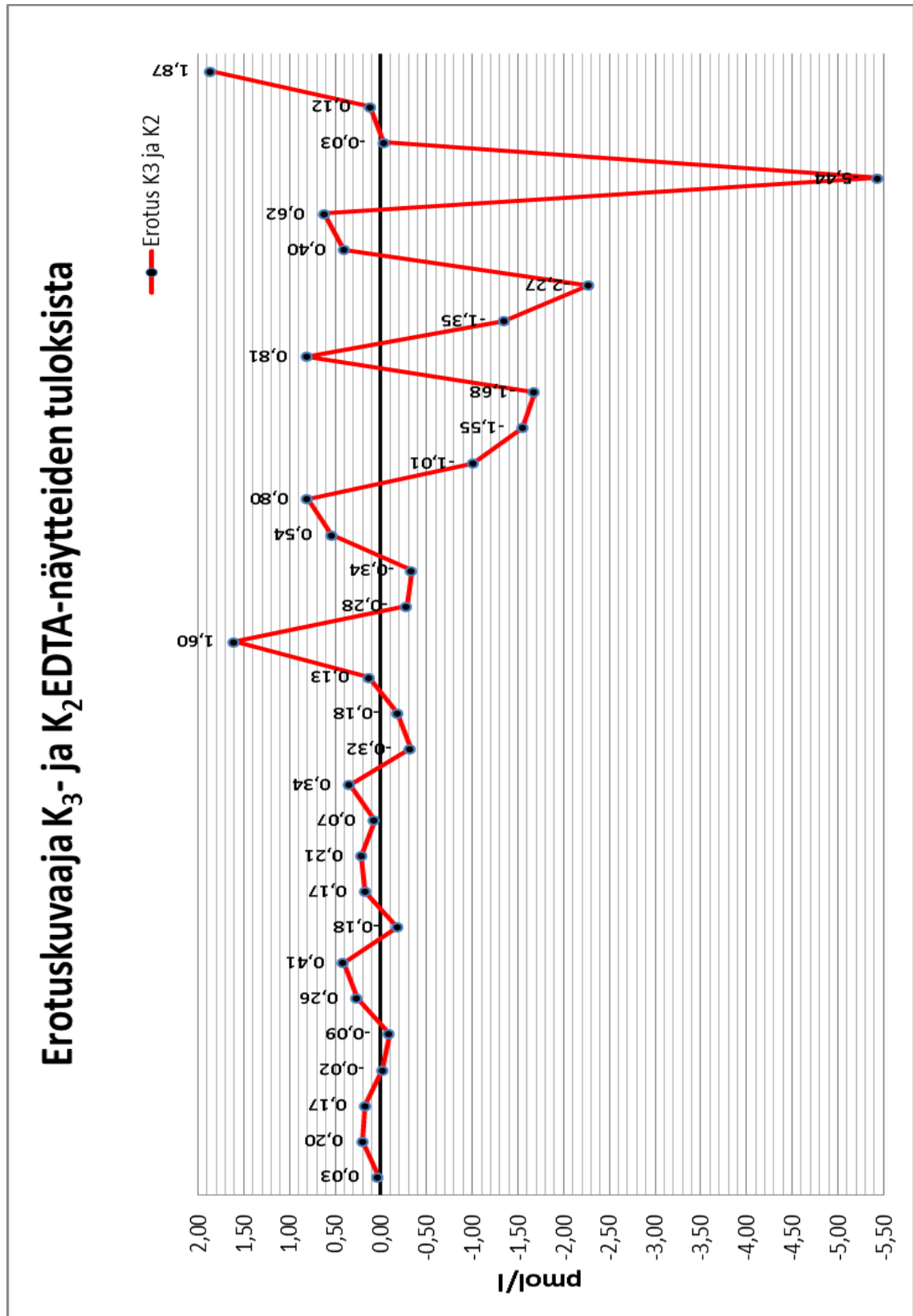
Liite 1. Tulostaulukko tammikuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista sekä tuloksista lasketut erotukset ja ero prosentit.

Tulos K ₃ EDTA (pmol/l)	Tulos K ₂ EDTA (pmol/l)	Tulos 6h- K ₂ EDTA (pmol/l)	Erotus K ₂ EDTA ja K ₃ EDTA (pmol/l)	Ero- prosentti K ₂ EDTA ja K ₃ EDTA	Erotus 6h- K ₂ EDTA ja K ₂ EDTA (pmol/l)	Ero- prosentti 6h-K ₂ EDTA ja K ₂ EDTA
1,88	1,91	2,09	0,03	1,6	0,18	9,4
2,38	2,58	2,62	0,20	8,4	0,04	1,6
2,75	2,92	2,84	0,17	6,2	-0,08	-2,7
2,89	2,87	3,10	-0,02	-0,7	0,23	8,0
3,02	2,93		-0,09	-3,0		
3,60	3,86	4,10	0,26	7,2	0,24	6,2
3,82	4,23	3,76	0,41	10,7	-0,47	-11,1
3,83	3,65	4,08	-0,18	-4,7	0,43	11,8
4,40	4,57	4,69	0,17	3,9	0,12	2,6
4,42	4,63	4,79	0,21	4,8	0,16	3,5
5,23	5,30		0,07	1,3		
7,74	8,08	7,79	0,34	4,4	-0,29	-3,6
12,22	11,90	12,38	-0,32	-2,6	0,48	4,0
12,48	12,30		-0,18	-1,4		
13,17	13,30	14,69	0,13	1,0	1,39	10,5
14,80	16,40	17,90	1,60	10,8	1,50	9,1
16,78	16,50		-0,28	-1,7		
18,44	18,10	18,52	-0,34	-1,8	0,42	2,3
18,96	19,50	19,24	0,54	2,8	-0,26	-1,3
20,10	20,90	20,95	0,80	4,0	0,05	0,2
22,61	21,60		-1,01	-4,5		
22,75	21,20	22,29	-1,55	-6,8	1,09	5,1
25,98	24,30	26,05	-1,68	-6,5	1,75	7,2
26,49	27,30	27,17	0,81	3,1	-0,13	-0,5
28,65	27,30		-1,35	-4,7		
41,47	39,20	55,09	-2,27	-5,5	15,89	40,5
42,10	42,50	45,52	0,40	1,0	3,02	7,1
48,08	48,70		0,62	1,3		
50,24	44,80	37,11	-5,44	-10,8	-7,69	-17,2
58,93	58,90	57,63	-0,03	-0,1	-1,27	-2,2
64,08	64,20	63,07	0,12	0,2	-1,13	-1,8
86,13	88,00	84,66	1,87	2,2	-3,34	-3,8

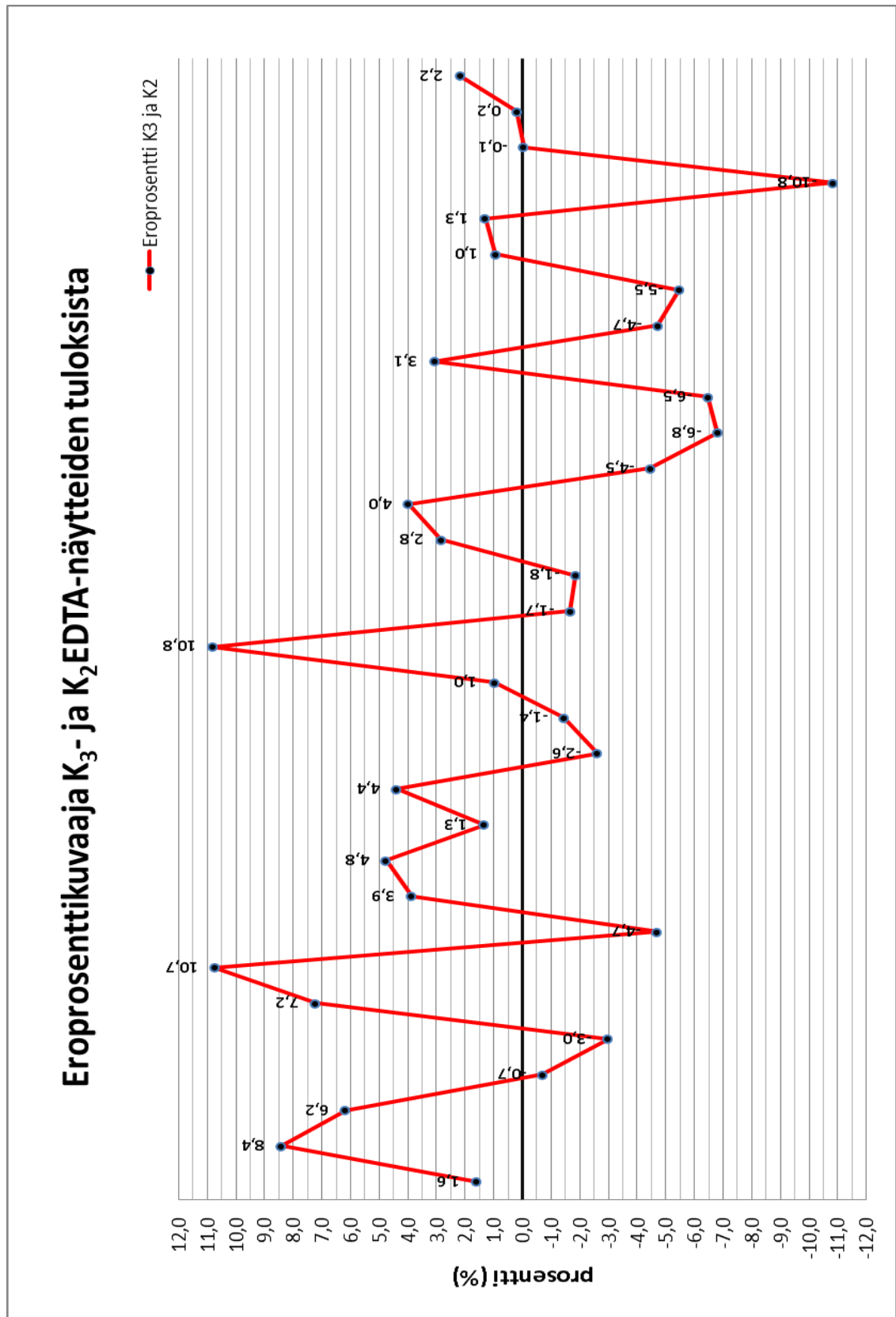
Liite 2. Pylväsdiagrammi tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.



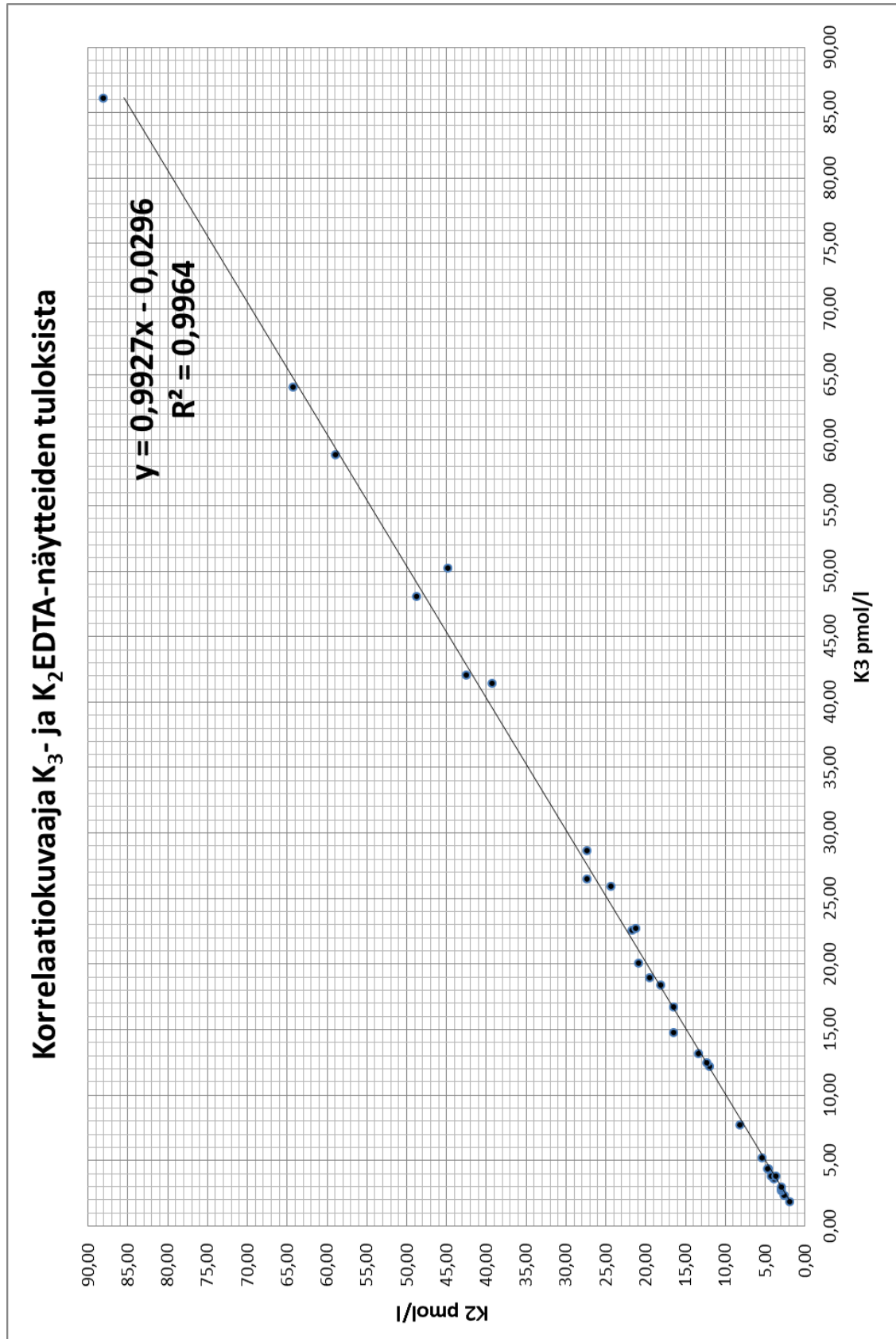
Liite 3. Erotuskuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K₃- ja K₂EDTA-näytteiden tuloksista.



Liite 4. Eroprosenttikuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.



Liite 5. Korrelaatiokuvaaja tammikuun 2013 kokeellisen osuuden K_3 - ja K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.



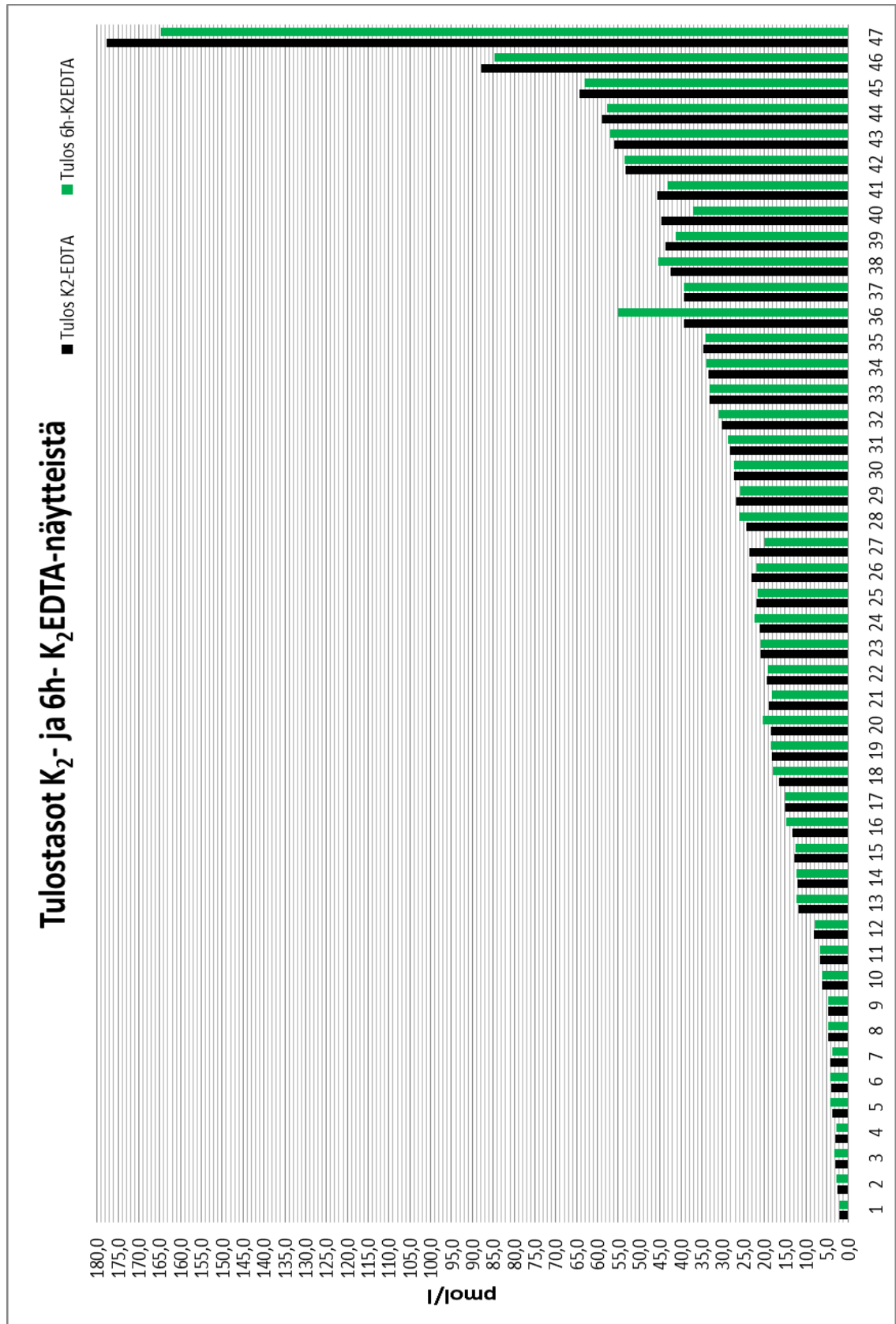
Liite 6. Tulostaulukko maaliskuun 2013 kokeellisen osuuden tuloksista ja preanalytiikan muistiinpanoista.

Syönyt (klo)	No-aika (klo)	Sentr. (klo)	Havainnot	Tulos K2-EDTA	Tulos K2-EDTA	Havainnot	Tulos K2-6h-EDTA	Tulos K2-6h-EDTA
6.00	9.00	9.45		12,1			12,4	
4.00	8.35	9.35	liev.samea	6,1	6,2	liev.samea	6,2	6,1
7.00	8.30	9.35		28,2			28,8	
6.30	8.45	9.35		33,5			33,8	
7.00	8.55	9.45		15,1			14,9	
7.00	9.10	9.45	samea	18,3	18,6	samea	21,0	19,9
6.30	8.30	9.35		43,7			41,2	
7.00	9.10	9.45		30,1			30,9	
6.30	8.30	9.35	liev.samea	12,5	12,9	liev.samea	13,2	12,0
6.45	8.40	9.35		21,8			21,7	
7.45	9.00	9.45		23,0			21,9	
13.30	14.45	15.05	voim.samea	34,2	32,2	voim.samea	34,4	31,8
14.30	14.45	15.05		45,6			43,3	
14.30	15.15	15.55		23,6			20,0	
14.30	15.05	15.55	samea	54,2	52,4	samea	52,4	54,7
14.30	14.35	15.05		19,0			18,2	
14.30	14.55	15.55		6,6			6,6	
12.00	14.40	15.05	liev.samea	178,9	176,4	liev.samea	164,4	164,9
12.30	14.55	15.55		39,4			39,3	
14.30	15.05	15.55		26,8			25,7	
14.30	14.40	15.05		34,7			34,2	
14.30	14.55	15.55		55,9			56,9	

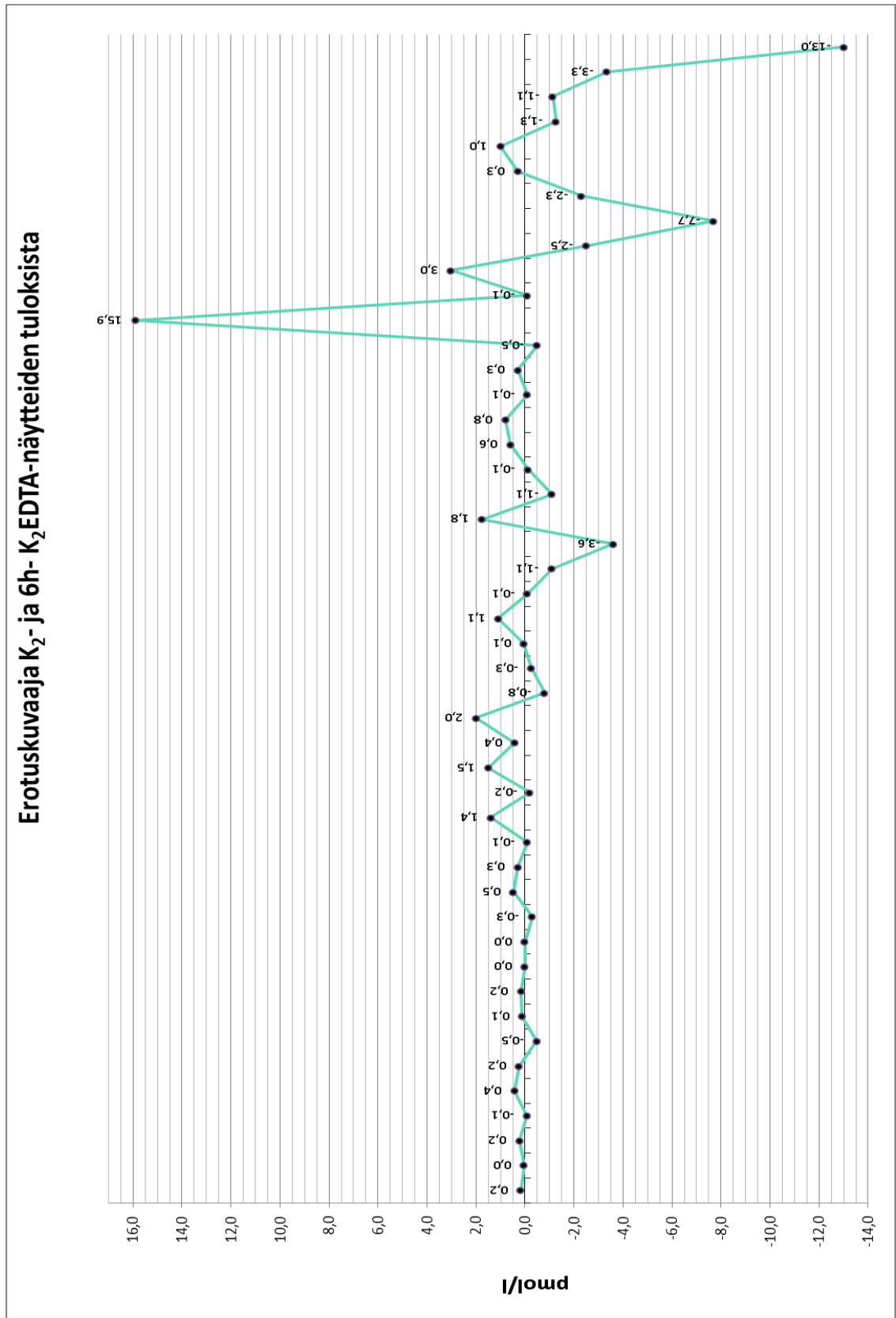
Liite 7. Tulostaulukko tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K₂- ja 6h-K₂EDTA-näytteiden tuloksista sekä tuloksista lasketut erotukset ja ero prosentit.

Tulos K ₂ - EDTA	Tulos 6h- K ₂ EDTA	Erotus	Ero- prosentti
1,91	2,09	0,18	9,42
2,58	2,62	0,04	1,55
2,87	3,10	0,23	8,01
2,92	2,84	-0,08	-2,74
3,65	4,08	0,43	11,78
3,86	4,10	0,24	6,22
4,23	3,76	-0,47	-11,11
4,57	4,69	0,12	2,63
4,63	4,79	0,16	3,46
6,20	6,20	0,00	0,00
6,60	6,60	0,00	0,00
8,08	7,79	-0,29	-3,59
11,90	12,38	0,48	4,03
12,10	12,40	0,30	2,48
12,70	12,60	-0,10	-0,79
13,30	14,69	1,39	10,45
15,10	14,90	-0,20	-1,32
16,40	17,90	1,50	9,15
18,10	18,52	0,42	2,32
18,50	20,50	2,00	10,81
19,00	18,20	-0,80	-4,21
19,50	19,24	-0,26	-1,33
20,90	20,95	0,05	0,24
21,20	22,29	1,09	5,14
21,80	21,70	-0,10	-0,46
23,00	21,90	-1,10	-4,78
23,60	20,00	-3,60	-15,25
24,30	26,05	1,75	7,20
26,80	25,70	-1,10	-4,10
27,30	27,17	-0,13	-0,48
28,20	28,80	0,60	2,13
30,10	30,90	0,80	2,66
33,20	33,10	-0,10	-0,30
33,50	33,80	0,30	0,90
34,70	34,20	-0,50	-1,44
39,20	55,09	15,89	40,54
39,40	39,30	-0,10	-0,25
42,50	45,52	3,02	7,11
43,70	41,20	-2,50	-5,72
44,80	37,11	-7,69	-17,17
45,60	43,30	-2,30	-5,04
53,30	53,60	0,30	0,56
55,90	56,90	1,00	1,79
58,90	57,63	-1,27	-2,16
64,20	63,07	-1,13	-1,76
88,00	84,66	-3,34	-3,80
177,70	164,70	-13,00	-7,32

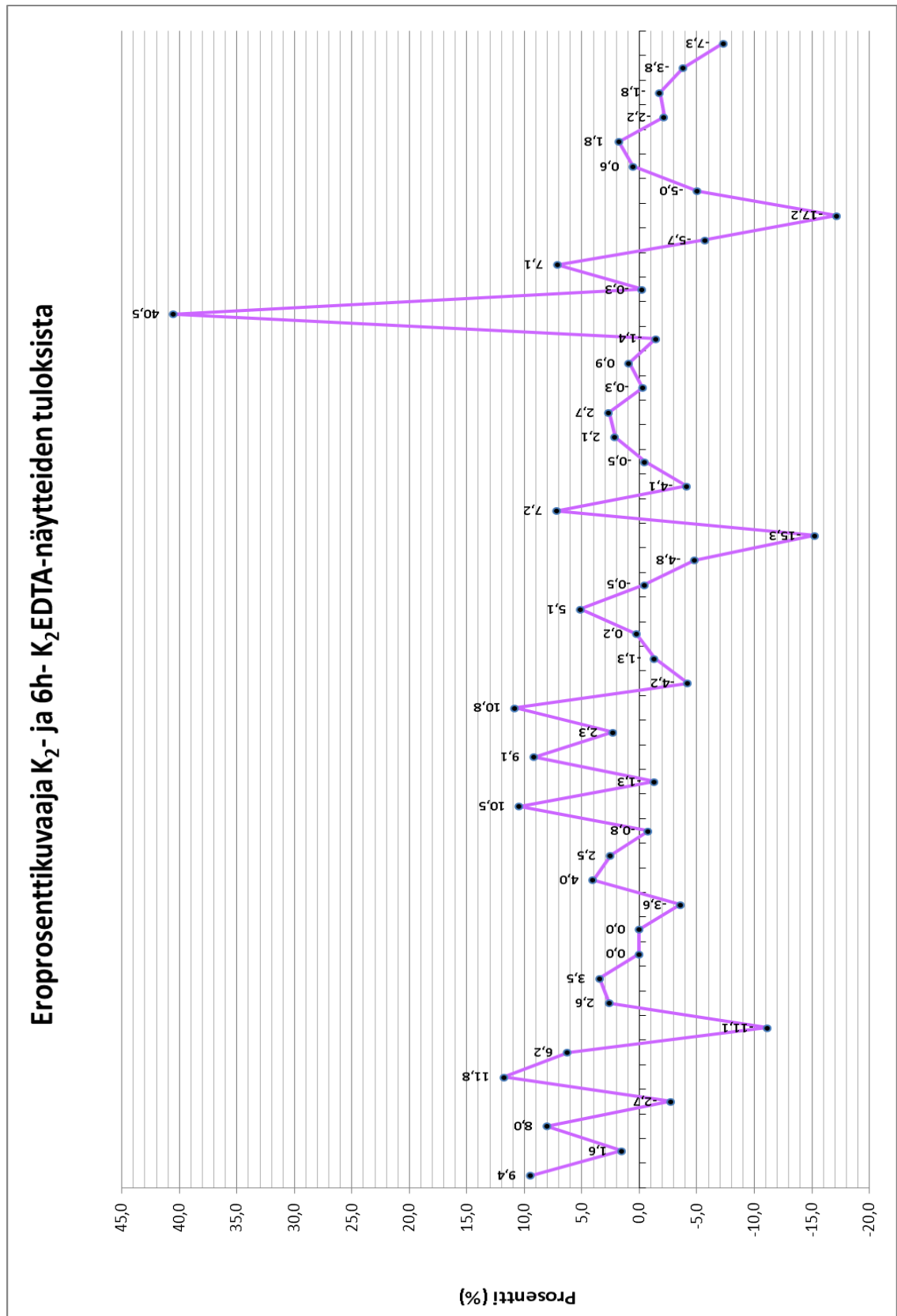
Liite 8. Pylväsdiagrammi tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K₂- ja 6h-K₂EDTA-näytteiden tuloksista.



Liite 9. Erotuskuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuk-sien K₂- ja 6h-K₂EDTA-näytteiden tuloksista.



Liite 10. Eroprosenttikuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K₂- ja 6h-K₂EDTA-näytteiden tuloksista.



Liite 11. Korrelaatiokuvaaja tammikuun ja maaliskuun 2013 kokeellisten osuuksien K_2 - ja 6h- K_2 EDTA-näytteiden tuloksista.

