

Aino Helakallio

fE-Folaattimäärityksen esikäsittelyn pipetointiprosessin muutos

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.1.2014

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Aino Helakallio fE-folaattimäärityksen esikäsittelyn pipetointiprosessin muutos 24 sivua + 4 liitettä 6.1.2014
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Yliopettaja Riitta Lumme Kemisti Leena Tervo
<p>Tämän opinnäytetyön keskeisenä tavoitteena oli selvittää onko punasolujen folaattimäärityksen esikäsittelyn pipetointiprosessin muutoksella yhteyttä punasolujen folaattipitoisuuksiin. Pipetointimenetelmää muutettiin ja muutoksen tavoitteena oli yksinkertaistaa ja tehostaa punasolujen folaattinäytteiden esikäsittelyä. Lisäksi selvitettiin onko esikäsiteltyjen näytteiden pakastamisella yksi tai kaksi vuorokautta yhteyttä punasolujen folaattipitoisuuksiin. Esikäsiteltyjen näytteiden pakastaminen on oleellista laiterikkotilanteissa. Näytteet analysoitiin käyttäen ARCHITECT-analysaattoria.</p> <p>Kokeellinen osuus toteutettiin Kirurgisessa sairaalassa ja aineisto koostui 30 potilasnäytteestä. Jokaisesta valitusta potilasnäytteestä tehtiin neljä erillistä analyysia. Näytteet analysoitiin käyttäen käytössä olevaa esikäsittelymenetelmää sekä testattavaa esikäsittelymenetelmää ja näiden menetelmien tulosten yhteyttä tutkittiin. Lisäksi pakastamisen yhteyttä punasolujen folaattipitoisuuteen testattiin pakastamalla testattavalla esikäsittelymenetelmällä esikäsiteltyjä näytteitä yksi ja kaksi vuorokautta. Tulokset on käsitelty Excel-taulukkolaskentaohjelmalla ja niistä on tehty lineaarinen regressio sekä laskettu variaatiokerroinprosentteja.</p> <p>Kokeellisen osuuden tuloksissa selvisi, että testattu esikäsittelymenetelmä oli pääosin toimiva ja antoi samansuuruisia tuloksia kuin käytössä oleva esikäsittelymenetelmä. Eroa huomattiin pienissä (alle 400 nmol/l) punasolujen folaattipitoisuuksissa. Pakastamisen yksi tai kaksi vuorokautta ei havaittu vaikuttavan tuloksiin. Testattavan menetelmän mahdollinen käyttöönotto vaatii jatkotutkimuksia etenkin pienien folaattipitoisuuksien kohdalla.</p>	
Avainsanat	esikäsittely,punasolujen folaatti

Author(s) Title Number of Pages Date	Aino Helakallio The change in pre-treatment method when analyzing folic acid concentration in red blood cells 24 pages + 4 appendices 6 January 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	
Instructor(s)	Riitta Lumme, Principal Lecturer Leena Tervo, Eur.Clin.Chem
<p>The main objective of this thesis was to determine whether the change of pre-treatment method in analyzing folic acid concentration in red blood cells have connection to the folic acid concentration in red blood cells. The pre-treatment method done by pipetting was changed and the aim was to simplify and optimize the pre-treatment method. One of the objectives was also to examine whether the freezing of one or two days of pre-treated red blood cell folic acid samples have an effect of the concentrations of the samples . Freezing the prepared samples is essential in analyzer failure situations. The samples were analyzed using the Abbott ARCHITECT analyzer.</p> <p>The experimental part was done in Surgical Hospital and the sample material consisted of 30 patient samples. Four separated analysis were done in each patient sample. The samples were analyzed using a current pre-treatment method, as well as test pre-treatment method and the contacts of these results were studied. In addition, the connection of folic acid concentrations in erythrocytes was studied before and after freezing the pre-treated samples for one and two days. The results were treated as an Excel spreadsheet and linear regression and coefficient of variation of per cent were calculated.</p> <p>The results showed that the tested pre-treatment was mainly functioning and the results of the tested pre-treatment method and the currently used pre-treatment method were in the same range. The difference in result was noted in small folic acid concentrations in red blood cells (under 400 nmol/l). Freezing of pre-treated samples one or two days did not to have an effect of the result.</p>	
Keywords	folic acid, pre-treatment

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Folaatti ja sen merkitys	2
3	Punasolujen folaatin määritysmenetelmä	3
3.1	Esikäsittely ja menetelmäperiaate ARCHITECT-analysaattorissa	4
3.2	Muita punasolujen folaatin määritysmenetelmiä	5
3.3	Määritysmenetelmien vertailu	6
4	Työn tarkoitus ja tavoite	7
5	Kokeellinen osuus ja sen toteutus	8
6	Tulokset	13
6.1	Testattavan pipetointiprosessin muutoksen yhteys folaattipitoisuuteen	14
6.2	Pakastamisen yhteys folaattipitoisuuteen testattavalla pipetointitavalla	16
6.3	Tulosten luotettavuuden arviointi ja eettisyys	18
7	Tulosten tulkinta	20
8	Pohdinta	21
	Lähteet	24
	Liitteet	
	Liite 1. Reagenssien tiedot	
	Liite 2. Testipipetoinnin tulokset	
	Liite 3. Testattavan menetelmän tulokset	
	Liite 4. Pakastettujen näytteiden tulokset	

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriopalveluita tarjoavan liikelaitoksen HUSLABin kanssa. HUSLAB on johtavassa asemassa Suomessa kliinisten laboratoriopalveluiden tarjoajana (HUSLAB 2013). HUSLABin alueelta tulevat kaikki punasolujen folaatti –määritykset (fE-Folaat) analysoidaan Kirurgisessa sairaalassa Helsingissä.

Kirurgisessa sairaalassa on käytössä yksi ARCHITECT i2000SR –analysointilaitteisto, jolla kaikki punasolujen folaatti -näytteet analysoidaan. Punasolujen folaatti –määritys sisältää esikäsittelyvaiheen. Esikäsittely sisältää pipetointia ja näytteen seisotusta. Näin ollen näytteen esikäsittely vaatii tarkkuutta ja vie aikaa. Tämän takia työprosessiin on mietitty muutoksia. Tarkoituksena oli testata muutettua pipetointiprosessia. Prosessin muutoksella pyritään yksinkertaistamaan työtä ja näin säästämään työaikaa. Yksinkertaistamalla prosessia virheiden mahdollisuus myös pienenee.

Tämä opinnäytetyö keskittyi punasolujen folaatin analysoinnin käsin tehtävän esikäsittelyn muutoksen testaamiseen. Muutetulla pipetointiprosessilla esikäsittelyjen näytteiden tuloksia verrattiin käytössä olevalla menetelmällä esikäsittelyjen näytteiden tuloksiin. Lisäksi myös testattiin esikäsittelyjen näytteiden pakastamista ja miten pakastaminen on yhteydessä analyysin tulostasoon. Esikäsittelyjen näytteiden pakastamisen mahdollisuus on olennaista laboratorion henkilökunnalle, koska analysointilaitteita on Kirurgisessa sairaalassa käytössä vain yksi ja varalaitte sijaitsee Meilahden sairaalassa. Näytteiden kuljetus ja analysoinnin siirto Meilahden sairaalaan on haastavaa, joten esikäsittelyjen näytteiden pakastamisen mahdollisuus toisi lisää aikaa analysointilaitteen korjaamiselle laiterikon sattuessa. Jos esikäsittelyjen näytteiden pakastaminen olisi mahdollista, voisi työn kasautumista estää ja esikäsittellä näytteet valmiiksi odottamaan laitevian korjaamista.

Taustana työssä on esitelty punasolujen folaattipitoisuuden määrittämiseen käytössä olevia menetelmäperiaatteita. Menetelmäperiaatteet on esitelty yksitellen ja niiden eroja ja samankaltaisuuksia on vertailtu. Taustana on esitelty myös folaattia ja sen kliinistä merkitystä. Opinnäytetyössä pyritään vastaamaan asetettuihin tutkimuskysymyksiin ja tuomaan hyötyä laboratorion toimintaan. Lisäksi opinnäytetyön

tavoitteena on myös tukea ammatillista kehittymistä sekä olla osoituksena ammatillisesta osaamisesta.

2 Folaatti ja sen merkitys

Folaatti esiintyy ravinnossa monenlaisina yhdisteinä ja sen aktiivinen muoto ihmisen aineenvaihdunnassa on tetrahydrofolaatti. Folaatti luetaan B-ryhmän vitamiineihin. (Aro 2013.) Folaatti toimii kofaktorina entsyymaattisissa aineenvaihduntareaktioissa, joissa siirretään yhtä hiiliyksikköä. Folaatti on välttämätöntä muun muassa nukleiinihapposynteesissä ja aminohappojen metaboliassa. Folaatin metabolia on myös yhteydessä B12-vitamiinin metaboliaan. (Harvey – Ferrier 2011: 374–375.)

Folaatin puute voi johtua lisääntyneestä tarpeesta, huonosta folaatin imeytymisestä ohutsuolessa tai vähäisestä folaattia sisältävästä ravinnosta. Folaatin puute johtaa megaloblastiseen anemiaan. Megaloblastisessa anemiassa luuytimeen ja verenkiertoon kerääntyy suuria punasolujen esiasteita, megaloblasteja, joissa DNA:n synteesi on poikkeavaa ja solut eivät kykene jakautumaan normaalisti. Tämä vaikuttaa veren kykyyn kuljettaa happea. Folaatin puute aiheuttaa myös muutoksia sikiökehityksessä. (Harvey – Ferrier 2011: 374–375.)

Punasolujen folaattipitoisuuden voi määrittää kokoverinäytteestä K_2 EDTA (dipotassium) tai K_3 (tripotassium) EDTA –näyteputkesta (Abbott 2010: 4). K_2/K_3 EDTA toimii näytteessä antikoagulanttina ja estää näytteen hyytymisen. HUSLABin (2013) ohjekirjan ohjeistuksen mukaan fE-Folaat –näyte tulee suojata suoralta auringonvalolta, mutta sitä ei tarvitse enää suojata foliolla. Näyte tulee toimittaa analysoitavaksi mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Jos näyte on perillä vuorokauden kuluessa näytteenotosta, se voidaan lähettää huoneenlämpöisenä. Jos näytteen toimituksessa kestää pidempään, näytteestä analysoidaan hematokriitti lähettävässä yksikössä, jonka tulos lähetetään näytteen mukana. Tämän jälkeen näyte pakastetaan ja lähetetään pakastettuna. Näyte säilyy neljä vuorokautta jääkaapissa.

Punasolujen folaatti (fE-Folaat) määritetään mieluiten paaston jälkeisestä näytteestä ja näytteestä analysoidaan aina myös hematokriitti. Hematokriitti kertoo, kuinka suuri määrä prosentuaalisesti veressä on punasoluja (Eskelinen 2010). Punasolujen folaatti pitoisuus on siis aina suhteutettu punasolujen määrään veressä. fE-Folaat –tulos

saadaan jakamalla kokoveren folaattipitoisuus (B-Folaat) hematokriitillä. fE-Folaat -määritys sisältää folaattipitoisuuden sekä punasoluista että plasmasta. (Abbott 2010: 5, 11.) HUSLABin käyttämät viitearvot ovat kaikille 208–972 nmol/l (fE-Folaatti 2013).

Folaatin puutteen voi luotettavimmin todeta määrittämällä folaattipitoisuuden punasoluista. Seerumista määritetty folaattipitoisuus on herkkä ruokavalion vaikutuksille ja se kuvastaa folaattipitoisuuden tasapainoa lyhyemmällä aikavälillä. (Folaatti 2013.) Punasolujen folaattipitoisuus taas kuvastaa ravitsemuksellista tilannetta muutamien edeltävien kuukausien osalta ja näin antaa paremman kuvan folaatin kudospitoisuudesta (fE-Folaatti 2013).

3 Punasolujen folaatin määritysmenetelmä

Tässä kappaleessa esitellään tarkemmin punasolujen folaattipitoisuuden analysointiin käytettävän menetelmän periaate ja näytteen esikäsittelyn vaiheet käytettäessä ARCHITECT-analysaattoria. Kappaleessa esitellään myös muita esikäsittelytapoja, joita käytetään analysoitaessa punasolujen folaattipitoisuuksia muissa analysaattoreissa. Esitellyt esikäsittelytavat valittiin analysaattoreiden perusteella, joissa niitä käytetään. Tämän tarkoituksena on antaa näkökulmia muista mahdollisista näytteiden esikäsittelymenetelmistä.

Punasolujen folaattia analysoidaan kilpailevalla immunokemiallisella menetelmällä. Menetelmä perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen vuorovaikutukseen, jota hyväksikäytetään folaatin erottamiseen muusta näytteen aineksestä. Folaatti kilpailee sitoutumispaikoista leimattujen konjugaattien kanssa. Kemiallisella reaktiolla saadaan aikaan konjugaattien leimojen valoreaktio, jonka voimakkuudesta voidaan päätellä folaattipitoisuus näytteessä. Valon voimakkuus on kääntäen verrannollinen punasolujen folaatin määrään.

Jotta punasolujen folaattipitoisuus voitaisiin analysoida, täytyy näytteen punasolut hemolysoida. Hemolysointi toteutetaan näytteen esikäsittelyvaiheessa ennen näytteen analysoimista analysaattorissa. Esikäsittelyn tärkein merkitys on näytteen punasolujen hemolysointi, mutta menetelmästä riippuen esikäsittelyllä voi olla myös muita tarkoituksia, kuten esimerkiksi folaatin rakenteen muuttaminen analysaattorilla mitattavaan muotoon. Esikäsittelyn mahdollisiin muihin tarkoituksiin vaikuttaa myös käytettävä analyysimenetelmä ja sen aiheuttamat rajoitteet.

3.1 Esikäsittely ja menetelmäperiaate ARCHITECT-analysaattorissa

Punasolujen folaattipitoisuus (fE-Folaat) analysoidaan Kirurgisessa sairaalassa käyttäen ARCHITECT i2000SR –analysaattoria. Menetelmä perustuu mikropartikkeleiden immunologiseen sitoutumiseen ja kemiluminosenssiin (CMIA, kemiluninesenssi-mikropartikkeli-immunomääritys). Punasolujen folaattipitoisuutta määritettäessä, näyte ensimmäiseksi esikäsitellään käsin pipetoiden. Näytteeseen lisätään hemolysointireagenssia (Folate Lysis Reagent) ja näytettä seisotetaan 90 minuuttia (\pm 5 min), jotta punasolut hemolysoituvat. Seisotuksen jälkeen pieneen määrään hemolysoitua näytettä lisätään analyysiliuosta (RBC Lysis Diluent), jolla punasoluihin sitoutunut folaatti saadaan mitattavaan muotoon. (Abbott 2010: 2, 5.) Hemolysointireagenssi, Folate Lysis Reagent sisältää askorbiinihappoa ja analyysiliuos, RBC Lysis Diluent sisältää sitruunahappoa (Abbott 2010: 2).

Analysaattorissa näyte esikäsitellään kaksivaiheisesti. Ensimmäisessä vaiheessa näyte pipetoidaan näytekyvetiin ja käsitellään dithiothreitol:lla eli DTT:lla, jolloin saadaan folaatti irtoamaan sitä sitovasta proteiinista (Folate Binding Protein, FBP). Esikäsitelyn toisessa vaiheessa näyteliuos siirretään uuteen näytekyvetiin ja kyvetiin lisätään kaliumhydroksidia (KOH), joka denaturoi folaattia sitovan proteiinin. Näin folaatti saadaan pysymään vapaana, eikä se sitoudu uudestaan folaattia sitovaan proteiiniin. (Karppinen 2013; Abbott 2010: 2.)

Esikäsitelyn jälkeen näyte siirretään kolmanteen kyvetiin. Näyteliuokseen lisätään folaattia sitovalla proteiinilla (Folate Binding Protein, FBP) päällystettyjä paramagneettisia mikropartikkeleita ja menetelmä kohtaista laimennetta. Näytteessä oleva folaatti sitoutuu päällystettyihin mikropartikkeleihin. Seuraavaksi näyte pestään, jolloin sitoutumaton aines huuhtoutuu pois. Mikropartikkeleihin sitoutunut folaatti pysyy näytekyvetissä mikropartikkeleiden magneettisuuden ansiosta. Akridiniumleimattu konjugaatti lisätään näytekyvetiin pesun jälkeen. Se sitoutuu mikropartikeleissa kohtiin, joihin ei ole sitoutunut folaattia. Pre-trigger ja trigger -liuokset lisätään viimeisenä kyvetiin ja ne aikaansaavat akridiniumleimatun konjugaatin kemiluminosenssireaktion. Kemiluminosenssi mitataan suhteellisina valo yksiköinä eli RLU:na (Relative Light Unit). Kemiluminosenssin määrä on kääntäen verrannollinen folaattipitoisuuteen eli mitä enemmän folaattia näytteessä on, sitä pienempi on RLU-luku. (Abbott 2010:2.)

Menetelmä sisältää myös rajoitteita. Jos potilas on hoidon takia saanut hiiren monoklonaalisia vasta-aineita sisältäviä tuotteita, voi hänellä ilmetä humaani vasta-aineita hiiren proteiineille. Menetelmän käyttämä reagenssi sisältää hiiren monoklonaalisia vasta-aineita, joten tällaisia näytteitä ei voi analysoida menetelmää käyttäen. Tietyillä kemoterapiassa käytetyillä lääkeaineilla, kuten metotreksaatilla, aminopteriinilla ja foliinihappolla on samankaltainen molekyyli rakenne kuin folaatilla. Nämä aineet voivat reagoida virheellisesti folaattia sitovan proteiinin kanssa. (Abbott 2010:7.)

3.2 Muita punasolujen folaatin määritysmenetelmiä

Esikäsitteily punasolujen folaatti -näytteille voi olla joko yksi- tai kaksivaiheinen. Yksivaiheisessa esikäsitteilyssä pieneen määrään homogeeniseksi sekoitettua kokoverinäytettä lisätään hemolysoivaa reagenssia. Reagenssi voi olla esimerkiksi askorbiinihappoa. Lisättävän hemolysoivan reagenssin määrä riippuu sen konsentraatiosta ja käytettävästä näytemäärästä. Reagenssin lisäämisen jälkeen näytettä seisoitetaan täydellisen hemolysoinnin saavuttamiseksi huoneenlämmössä 90 minuuttia. Tämän kaltainen esikäsitteilymenetelmä on käytössä analysoitaessa punasolujen folaattipitoisuutta esimerkiksi Rochen cobas e ja Siemensin ADVIA Centaur –analysointilaitteilla (Roche 2011: 1; Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011: 3).

Rochen cobas e –analysointilaitteissa hemolysoituun näytteeseen lisätään esikäsitteilyreagensseja, jotka irrottavat folaatin sitä sitovasta proteiinista. Tämän jälkeen näytettä inkuboidaan rutheniumilla leimatun folaattia sitovan proteiinin kanssa, joka muodostaa kompleksin näytteen folaatin kanssa. Muodostuneiden kompleksien määrä riippuu näytteen folaattipitoisuudesta. Seuraavassa vaiheessa samaan näyteastiaan lisätään streptavidiinilla päällystettyjä mikropartikkeleita ja biotiinilla leimattua folaattia. Biotiinilla leimattu folaatti kiinnittyy vapaisiin rutheniumilla leimattuihin folaattia sitoviin proteiineihin, joihin ei ole kiinnittynyt näytteestä peräisin olevaa folaattia. Nämä muodostuneet kompleksit kiinnittyvät mikropartikkeleihin biotiinin ja streptavidiinin välisellä sidoksella. Reaktioseos siirretään mittauslaskulle, jossa mikropartikkelit kiinnittyvät magneettisesti elektrodin pinnalle ja kiinnittymätön aines pestään pois. Pesun jälkeen elektrodiin johdettu jännite ja reaktiopuskuri aikaansaa kemiluminosenssireaktion. Muodostunut valon määrä on kääntäen verrannollinen näytteessä olevaan folaattipitoisuuteen. (Roche 2011: 1.)

Siemensin ADVIA Centaur -analysaattorissa hemolysoitunäyte ensimmäiseksi esikäsitellään, jotta folaatti saadaan irtoamaan folaattia sitovasta proteiinista. Seuraavaksi näytekyvetiin lisätään biotiinilla leimattua folaattia sitovaa proteiinia ja avidiinilla päällystettyjä paramagneettisia partikkeleita. Biotiinilla leimattu folaattia sitova proteiini kiinnittyy paramagneettisten partikkeleiden avidiiniin ja folaatti sitoutuu kompleksissa biotiinilla leimattuun folaattia sitovaan proteiiniin. Sitoutumaton materiaali pestään pois. Seuraavaksi lisätään akridiniumesterillä leimattua folaattia, jolloin saadaan muodostumaan immunokemiallinen kompleksi. Tämän jälkeen sitoutumaton aines pestään jälleen pois. Lopuksi joukkoon lisätään reagenssia, joka aikaansaa kemiluminosenssi reaktion. Kemiluminosenssin määrä mitataan suhteellisina valo yksikköinä (RLU). Syntyvän valon määrä on kääntäen verrannollinen folaatin määrään näytteessä. (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011: 2–3; Immonen 2013.)

3.3 Määrittämenetelmien vertailu

Tässä esitetyillä punasolujen folaattinäytteiden analysointiin käytettävillä menetelmillä on hyvin samanlainen periaate. Esikäsitelyssä eroina voidaan nähdä hemolysointiin käytettävien reagenssien vahvuus ja käytettävän näytteen määrä. Käytettävä näytemäärä vaikuttaa tietenkin myös esikäsitelyssä käytettävien reagenssien määriin. Aikaisemmassa kappaleessa esitetyissä menetelmissä, Siemensin ADVIA ja Rochen cobas e -analysaattoreilla esikäsitely on yksivaiheinen ja ARCHITECT-analysaattorissa esikäsitely on kaksivaiheinen.

Kaikissa esitellyissä menetelmissä käytetään hyväksi vasta-aine-antigeeni –reaktiota, jossa keskeisessä osassa toimii mikropartikkeli, joka muodostaa yhdessä muiden osien kanssa kiinteän faasin ja mahdollistaa ylimääräisen aineksen poistamisen pesemällä. ARCHITECT-analysaattorin käyttämässä menetelmässä mikropartikkelit ovat päällystetty folaattia sitovalla proteiinilla ja se voi kiinnittyä siihen suoraan, kun taas Siemensin ADVIA Centaur –analysaattorissa ja Rochen cobas e –analysaattorissa mikropartikkelit ovat päällystetty streptavidiinilla ja avidiinilla, joten kiinnittyminen partikkeliin on monivaiheisempi.

ARCHITECT-analysaattorin menetelmässä näytteen folaatti kiinnittyy suoraan folaattia sitovalla proteiinilla päällystettyihin mikropartikkeleihin ja mikropartikkeleiden tyhjiksi

jääviin kohtiin sitoutuu akridiniumilla päällystetty konjugaatti. Cobas e –analysointimenetelmässä näytteen folaatti sitoutuu rutheniumilla leimattuun folaattia sitovaan proteiiniin. Vapaaksi jääviin rutheniumilla leimattuihin folaattia sitoviin proteiineihin kiinnittyy biotiinilla leimattua folaattia. Tämä muodostunut kompleksi kiinnittyy mikropartikkeleihin biotiinin ja streptavidiniin sidoksella. Menetelmässä näytteen folaatti ei missään vaiheessa kiinnity mikropartikkeleihin. ADVIA Centaur –analysointimenetelmässä näytteen folaatti kiinnittyy biotiinilla leimattuun folaattia sitovaan proteiiniin. Leimattu folaattia sitova proteiini on kiinnittynyt paramagneettisiin partikkeleihin biotiinin ja avidiinin välityksellä. Tämän jälkeen liuokseen lisätään akridiniumesterillä leimattua folaattia, joka sitoutuu tyhjiin biotiinilla leimattuihin folaattia sitoviin proteiineihin.

4 Työn tarkoitus ja tavoite

Työn tarkoituksena oli selvittää pipetointiprosessin muutoksen yhteyttä punasoluista analysoituun folaattipitoisuuteen. Lisäksi selvitettiin pipetointimuutoksen yhteyttä esikäsitellyn näytteen säilyvyyteen pakastettuna. Opinnäytetyö koskee ARCHITECT i2000SR –analysointimenetelmällä tehtävää punasolujen folaatti –tutkimusta, jossa käytetään immunokemiallista mittaumenetelmää.

Opinnäytetyön idea on työelämälähtöinen ja pipetointiprosessin muutoksella on tarkoitus yrittää yksinkertaistaa työtä laboratoriossa. Testattavalla esikäsitellyllä prosessilla jää pois yksi pipetointikerta ja yhden näyteputken tarroitus potilastarralla. Tämä säästäisi työaikaa ja myös vähentäisi virheiden mahdollisuutta. Säästynyt työaika tuo myös säästöjä kustannuksiin. Abbottin edustajan, Karppisen (2013) mukaan nykyistä kaksi vaiheista pipetointimenetelmää käytetään käsin tehtävässä esikäsitelyssä käytettävän RBC Lysis Diluent -reagenssin menekin pienentämiseksi. Käytössä olevalla menetelmällä RBC Lysis Diluentia käytetään 100 µl näytettä kohden. Testattavassa menetelmässä kyseistä reagenssia käytetään 550 µl näytettä kohden. Toisaalta esikäsitelyssä käytettävän toisen reagenssin, Folate Lysis Reagent, käyttö testattavassa menetelmässä vähenee puoleen. Käytettävässä menetelmässä sitä lisätään 1 ml näytettä kohden, mutta testattavassa menetelmässä sitä käytetään 500 µl näytettä kohden.

Työssä on tavoitteena löytää vastaus seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

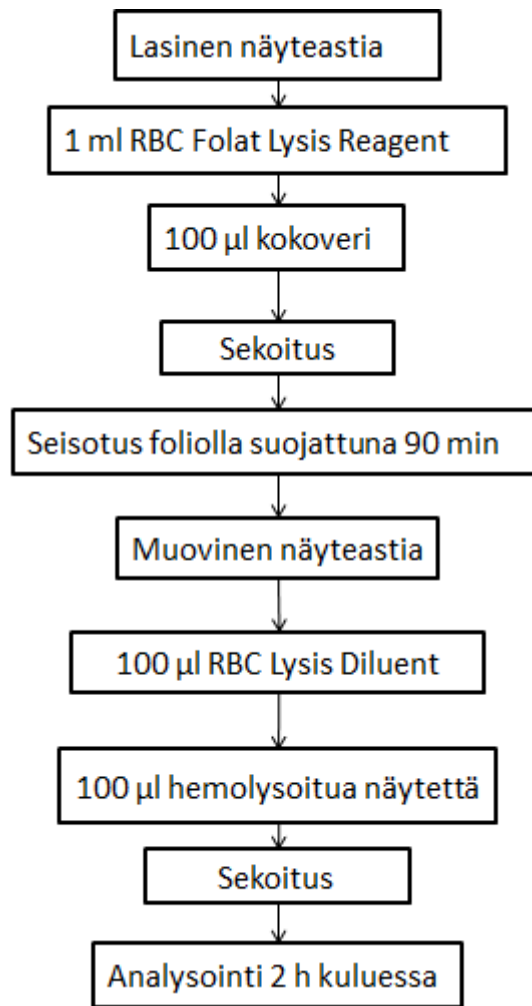
1. Onko esikäsittelyn pipetointiprosessin muutoksella yhteyttä punasolujen folaattipitoisuuksiin?
2. Onko testattavalla pipetointitavalla yhteyttä näytteen punasolujen folaattipitoisuuteen, kun näytteitä pakastetaan (-18 °C) yksi tai kaksi vuorokautta?

Testattavasta pipetointimenetelmästä ei ole löytynyt aikaisempaa tutkimusmateriaalia. Punasolujen folaattipitoisuuden säilyvyydestä on aiemmin tehty tutkimuksia ja opinnäytetöitä. Niissä on kuitenkin keskitytty paljolti valoaltistuksen vaikutukseen folaattipitoisuudessa. Metropolia Ammattikorkeakoulussa on tehty vuonna 2012 opinnäytetyö valoaltistuksen vaikutuksesta punasolujen folaatti pitoisuuteen ja esikäsittelyllä hemolysoitujen näytteiden säilyttämistä pakastettuna. Tässä työssä on tarkoituksena testata kokonaan esikäsitellyn näytteen pakastamista yksi tai kaksi vuorokautta ja sen yhteyttä punasolujen folaatti –pitoisuuteen.

Kokeellisella osuudella verrataan Abbottin ohjeistuksen mukaisen esikäsittelyn ja testattavan esikäsittelyn yhteyttä toisiinsa sekä myös testattavalla menetelmällä esikäsiteltyjen näytteiden punasolujen folaattipitoisuuden säilymistä pakastettuna. HUSLABin Kirurgisessa sairaalassa näytteet käsitellään Abbottin ohjeistuksen mukaisesti.

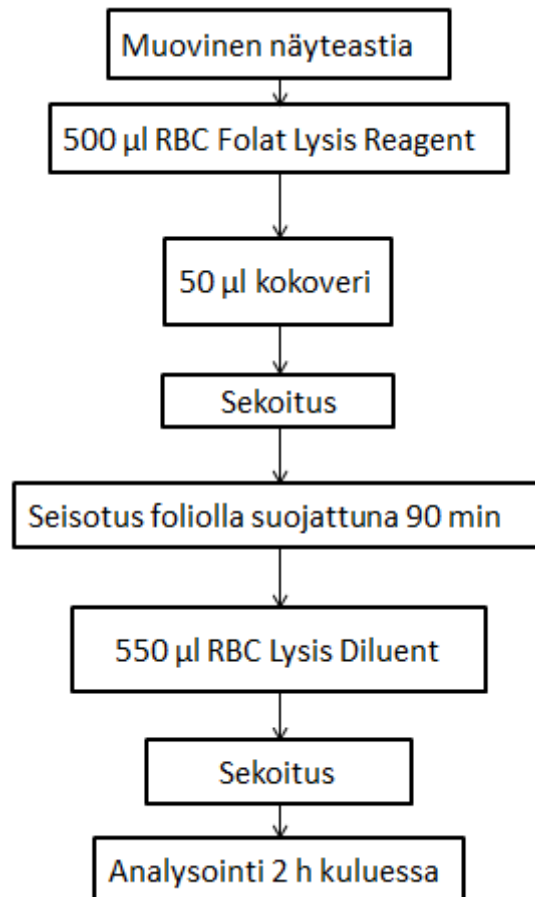
5 Kokeellinen osuus ja sen toteutus

Abbottin ohjeiden mukaisesti, joiden mukaan Kirurgisessa sairaalassa toimitaan, kokoverinäyte otetaan EDTA-putkeen. Hemolysointiliuosta (Folate Lysis Reagent) pipetoidaan erilliseen lasiseen näyteastiaan 1,0 ml ja homogeeniseksi sekoitettua kokoverinäytettä pipetoidaan saamaan näyteastiaan 100 µl. Näyteastia korkitetaan, liuos sekoitetaan ja annetaan seistä huoneenlämmössä (15–30 °C) 90 minuuttia (± 5 min) valolta suojattuna. Seisotuksen jälkeen uuteen näyteastiaan pipetoidaan analyysiliuosta (RBC Lysis Diluent) 100 µl ja hemolysoitua näytettä myös 100 µl. Liuos sekoitetaan ja näyteliuos on analyysikelpoinen seuraavat kaksi tuntia. (Abbott 2010: 5.) Kirurgisessa sairaalassa näytteet käsitellään muuten ohjeistuksen mukaisesti, mutta näytteitä ei korkiteta vaan ne peitetään foliolla. Pipetointiprosessi on kuvattu alla olevassa kuviossa 1.



Kuvio 1. Käytetyn menetelmän pipetointiprosessi

Testattavassa esikäsittelyssä yksinkertaistetaan menetelmää ja vähennetään yksi pipetointikerta ja yksi näyteastia. Ainesuhteet näytteen ja reagenssien välillä pysyvät samana. Hemolysointiliuoksen käytettyä tilavuutta pienennetään ja analyysiliuoksen tilavuutta kasvatetaan. Testattava pipetointiprosessi on esitetty alla olevassa kuviossa (Kuvio 2). Hemolysointiliuosta pipetoidaan erilliseen muoviseen näyteastiaan 500 µl ja samaan astiaan pipetoidaan homogeeniseksi sekoitettua kokoverinäytettä 50 µl. Näyte sekoitetaan. Näytteen seisotus tapahtuu samoin kuin yllä on mainittu. Seisotuksen jälkeen samaan näyteastiaan lisätään 550 µl analyysiliuosta.



Kuvio 2. Testattavan menetelmän pipetointiprosessi

Kirurgisen sairaalan laboratoriossa on vain yksi ARCHITECT i2000SR –analysointilaitteisto, joten laiterikon sattuessa näytteet on esikäsitelty normaalisti ja säilytetty pakastimessa kunnes ne on voitu analysoida. Esikäsiteltyjen näytteiden säilyvyyttä pakastimessa on testattu. Tämä on ollut suuri työntekoa ja -järjestelyä helpottava menettelytapa, joten muutetulla esikäsiteltytavalla käsiteltyjen näytteiden säilymistä pakastettuna halutaan myös selvittää.

Pakastamisen vaikutusta esikäsiteltyihin näytteisiin testataan pakastamalla testattavalla menetelmällä esikäsiteltyjä näytteitä yksi ja kaksi vuorokautta. Jokaisesta valitusta potilasnäytteestä tehdään yhteensä neljä erillistä näytettä. Yksi näytteistä pipetoidaan ohjeistuksen mukaisesti ja kolme näytettä testattavalla menetelmällä. Testattavalla menetelmällä pipetoiduista näytteistä yksi analysoidaan heti ja kaksi muuta pakastetaan. Toista näytteistä pakastetaan yksi vuorokausi ja toista kaksi

vuorokautta. Ennen analysointia näytteet sulatetaan ja analysoidaan mahdollisimman nopeasti sulamisen jälkeen.

Kokeellisesta osuudesta saadut tulokset esitellään hematokriittiarvo huomioiden. Tuloksista on laskettu keskiarvo, variaatiokerroin prosentteina (CV%) ja lineaarinen regressio. Lineaarisella regressiolla verrataan toisiinsa käytössä olevaa pipetointimenetelmää ja testattavaa pipetointimenetelmää. Lisäksi lineaarinen regressio laskettiin myös pakastettuina säilytettyjen näytteiden ja käytössä olevalla menetelmällä analysoitujen näytteiden välillä.

Variaatiokerroin kuvaa tulosten hajontaa ja se usein ilmaistaan prosentteina. Mitä suurempi variaatiokerroin on, sitä enemmän hajontaa tuloksissa esiintyy. Lineaarisella regressiolla voidaan havainnollistaa aineiston tulosten mahdollista lineaarista riippuvuutta toisistaan. Lineaarisen regression kuvaajissa on esitetty myös suoran yhtälö ja selitysaste (R^2). Selitysaste kuvaa kuinka suuren osan selittävä muuttuja (x-akseli) selittää selitettävän muuttujan (y-akseli) vaihtelusta (Heikkilä 2008).

Kokeellinen osuus suoritettiin Kirurgisessa sairaalassa syksyllä 2013. Seuraavissa kappaleissa on esitelty kokeellisen osuuden kulku vaiheittain. Työn toteutusta ohjeisti ja valvoi kemisti Leena Tervo. Näytteiden valitsemisessa ja työn toteutuksessa auttoi laboratoriohoitaja Tarja Porkka.

Pipetointitarkkuus on tärkeässä osassa punasolujen folaatti näytteiden esikäsittelyssä. Tämän takia ennen varsinaisen kokeellisen työn aloitusta suoritettiin testipipetointi. Tämän ideana oli verrata itse esikäsittelemieni näytteiden tuloksia laboratorion henkilökunnan esikäsittelemien näytteiden tuloksiin. Näin voitiin varmistaa, että näytteiden tulostaso on sama ja että pipetointi on tasalaatuista ja luotettavaa. Testipipetoinnissa analysoitiin 20 näytettä ja ne esikäsiteltiin käytössä olevan ohjeistuksen mukaisesti.

Kokeellisessa osuudessa käytetty näyttemateriaali on peräisin Kirurgiseen sairaalaan tulleista näytteistä, joista on pyynnön mukaisesti analysoitu punasolujen folaattipitoisuus ja hematokriitti. Laboratorion henkilökunta oli analysoinut käytännön toteutuksessa käytetyn näytteet jo aiemmin normaalisti. Näiden aiemmasta analysoinnista saatujen tulosten perusteella, voitiin valita näytteitä eri punasolujen folaattipitoisuudesta. Näytteen olivat saapuneet laboratorioon perjantaina ja ne olivat

analysoitu maanantaina. Näytteitä oli säilytetty jääkaapissa ohjeistuksen mukaisesti viikonlopun ajan.

Näytteitä valittiin kolmekymmentä kappaletta ja niiden punasolujen folaattipitoisuudet vaihtelivat välillä 155–2394 nmol/l. Näytteitä pyrittiin valitsemaan viitearvojen (208–972 nmol/l) ala- ja yläpuolelta. Näytteiden rajallisuuden takia viitearvoja alittavia pitoisuuksia löytyi kuitenkin vain yksi. Viitearvoissa olevia pitoisuuksia oli aineistossa 23 kappaletta. Viitearvon ylittäviä pitoisuuksia oli kuusi kappaletta. Näytteiden pitoisuudet on esitelty taulukossa 1. Näytteiden keskiarvo oli 650 nmol/l. Kaikkien näytteiden punasolujen folaattipitoisuudet ovat liitteessä 1.

Taulukko 1. Näytteiden punasolujen folaattipitoisuudet

Pitoisuus	Näytemäärä	Vaihteluväli (nmol/l)
< 208 nmol/l	1	155
208 - 972 nmol/l	23	291 - 810
> 972 nmol/l	6	1047 - 2394

Kaikki kokeellisessa osuudessa käytetyt näytteet esikäsiteltiin samana päivänä. Ensimmäisenä työhön valitut 30 näytettä tarroitettiin numeroiduilla tarroilla potilaiden henkilötietojen peittämiseksi sekä näytteiden identifiointiseksi. Käytettävät näyteputket myös numeroitiin juoksevalla numeroinnilla. Samasta näytteestä tehdyistä rinnakkaisissa oli sama näytenumero (1-30), mutta jokaisella näytteellä oli oma tunnustenumero, jonka avulla näytteet voitiin erottaa toisistaan. Näytteitä oli säilytetty jääkaapissa ja niiden annettiin olla huoneenlämmössä noin puoli tuntia ennen ensimmäisen esikäsittelyn aloittamista.

Näytteitä käsiteltäessä noudatettiin samoja periaatteita kaikkien näytteiden kohdalla. Kokoverinäytteet sekoitettiin pöytäsekoittajassa homogeenisiksi. Reagenssit pipetoitiin näyteastioihin ruiskukärkisellä annostelijalla. Näytteiden pipetoinnissa käytettiin automaattipipettia ja suoraa pipetointitapaa. Pipetoinnissa käytettiin erikoispiPETINKÄRKIÄ, joissa suuaukko on suurempi. Tämän avulla näyttemateriaali saadaan paremmin pois pipetinkärjestä. Kokoverta pipetoitaessa kärki pyyhittiin ulkopuolelta ylimääräisestä verestä tarkemman tilavuuden saavuttamiseksi. Näytteiden ja reagenssien sekoittamiseen käytettiin Vortex Mixer –sekoittajaa. Seisotuksen aikana

näytteet peitettiin kevyesti foliolla näytteiden suojaamiseksi valolta. Folio myös estää näytteiden haihtumista. Ennen analysaattoriin laittoa näytteistä poistettiin mahdolliset ilmakuplat.

Näytteiden käsittely aloitettiin käytössä olevalla esikäsittelytavalla. Näytteiden seisotuksen aikana pipetoitiin testattavalla menetelmällä esikäsiteltävät näytteet, jotka analysoitiin saman päivän aikana. Käytössä olevalla esikäsittelytavalla ja testattavalla esikäsittelytavalla käsitellyt näytteen laitettiin analysaattoriin yhtä aikaa. Analysaattoriin laitton jälkeen aloitettiin säilyvyyttä testaavien näytteiden pipetointi.

Pakastimeen laitettavien näytteiden kohdalla noudatettiin samoja käytäntöjä kuin aiemminkin. Valmiiksi pipetoidut näytteet pakastettiin styrox-laatikoissa. Näytteet suojattiin pakastamisen ajaksi ensin parafilmillä. Parafilmisuojaus jälkeen koko styrox-laatikko käärittiin folioon. Näytteet siirrettiin pakastimeen heti pipetoinnin ja suojaamisen jälkeen.

Seuraavana päivänä analysoitiin yhden vuorokauden ajan pakastetut näytteet. Näytteet analysoitiin mahdollisimman pian sulamisen jälkeen. Näytteet sulatettiin huoneenlämmössä. Näytteet siirrettiin sulamaan styrox-laatikosta näytetelineeseen, jotta ne sulaisivat nopeammin. Näytteiden sulamisaika oli epävarma, joten ensimmäisen vuorokauden näytteiden sulamista seurattiin ja kaksi vuorokautta pakastettujen näytteiden annettiin sulaa yhtä kauan. Ennen analysointia, sulaneet näytteet sekoitettiin Vortex Mixer –sekoittajalla ja mahdolliset ilmakuplat poistettiin näytteestä.

6 Tulokset

Tässä kappaleessa on esitelty kokeellisessa osuudessa saatuja tuloksia. Tulokset on jaoteltu osioihin tutkimuskysymysten perusteella. Ensimmäisenä esitellään testattavan esikäsittelymenetelmän yhteys punasolujen folaattipitoisuuteen. Seuraavaksi esitetään testattavalla esikäsittelyllä käsiteltyjen ja pakastamalla säilytettyjen näytteiden punasolujen folaattipitoisuudet ja niiden yhteys käytetyllä tavalla esikäsiteltyihin punasolujen folaattipitoisuuksiin. Tuloksia on havainnollistettu graafisilla kuvaajilla, joilla on esitetty lineaarista regressiota. Poikkeavat tulokset on poimittu taulukoihin.

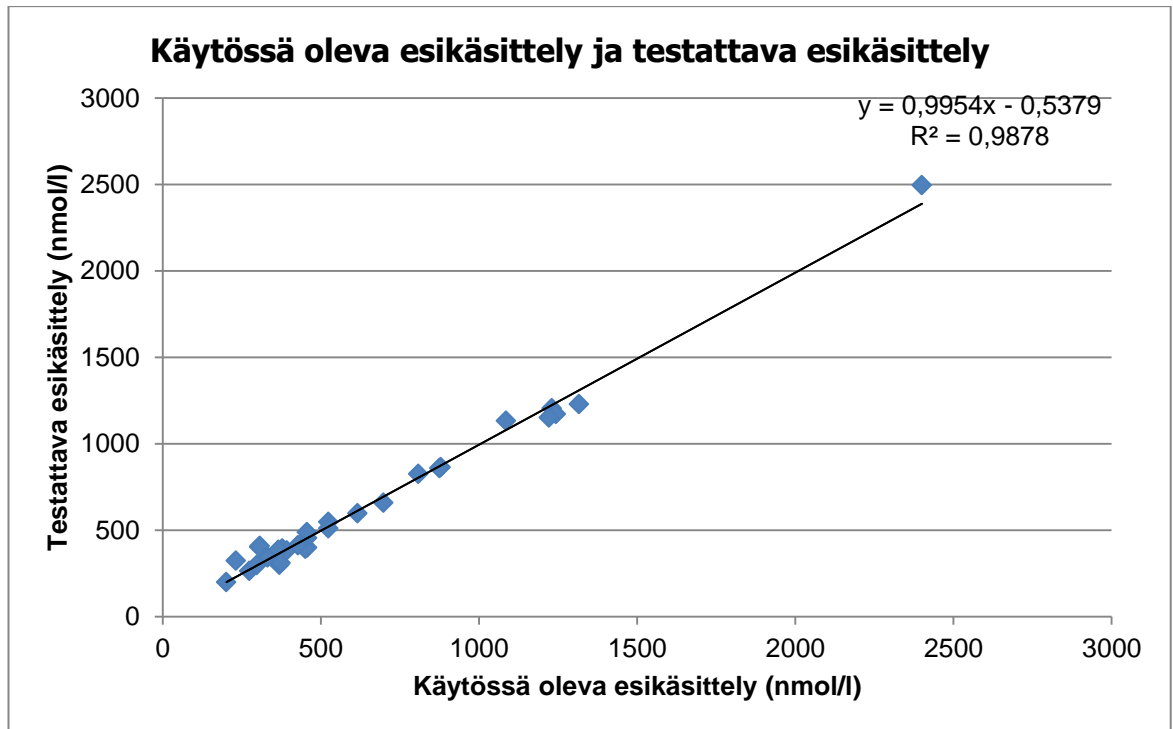
Tuloksien käsittelystä poistettiin kokonaan yksi näyte (näyte 17). Näytteen tuloksissa esiintyvä vaihtelu oli niin suurta, että näyte päätettiin poistaa tuloksista.

Tulosten tulkinnassa on hyödynnetty menetelmäohjeessa kerrottua menetelmän mittausepävarmuutta. Mittausepävarmuus on ilmoitettu variaatiokerroinprosentteina. Mittaustarkkuus punasolujen folaattipitoisuuden mittaamiseen on pienempi tai yhtä suuri kuin 11 %, kun tulokset vaihtelevat välillä 340–1450 nmol/l. Pitoisuuksissa, jotka ovat alle 340 nmol/l, tulokset eivät saa vaihdella enempää kuin 37,4 nmol/l. (Abbott 2010: 7.)

Ennen kokeellisen työn aloittamista suoritettiin testipipetointi, jonka tavoitteena oli varmistaa pipetoinnin laatuja ja tasaisuutta. Testipipetoinnin tuloksissa ei huomioitu näytteen hematokriittiarvoa, koska se ei ollut olennaista. Tuloksista laskettiin variaatiokerroin prosentteina (CV%). Variaatiokerroin vaihteli 0,6–18,3 % välillä. 18 näytteen osalta variaatiokerroin oli alle 10 %. Tarkat tulokset testipipetoinnista ovat liitteessä 2. Suurimmassa osassa testipipetoinnin näytteissä variaatiokerroinprosentti oli pienempi kuin sallittu 11%.

6.1 Testattavan pipetointiprosessin muutoksen yhteys folaattipitoisuuteen

Alla on esitetty kuvaajalla käytössä olevalla esikäsitelymenetelmällä ja testattavalla tavalla esikäsiteltyjen näytteiden lineaarinen regressio (Kuvio 3). Kuvaajassa on näkyvissä myös suoran yhtälö sekä selitysaste.



Kuvio 3. Lineaarinen regressio käytössä olevan esikäsittelymenetelmän ja testattavan menetelmän välillä.

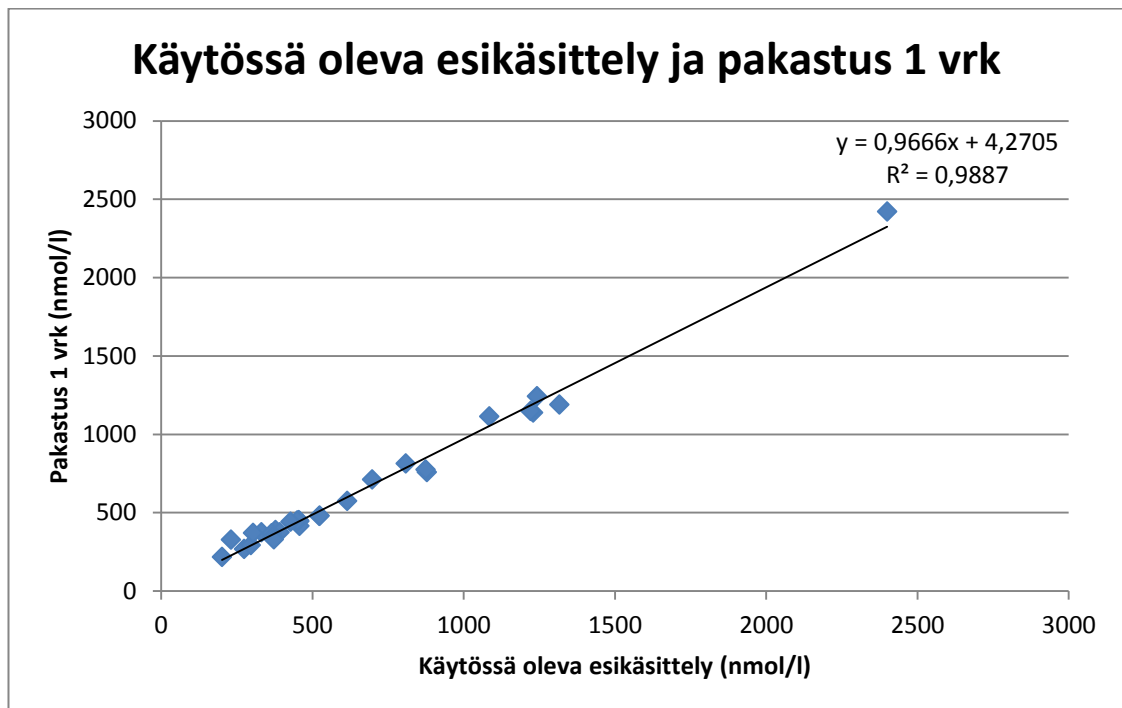
Alla olevasta taulukossa (Taulukko 2.) on taulukoitu näytteitä, joissa variaatiokerroin prosentteina on suurempi tai lähellä menetelmäohjeessa variaatiokerroinoprosenttina mainittua mittausepävarmuutta (11 %). Muissa näytteissä tulokset alittavat ilmoitetun rajan. Taulukossa on eritelty näytteen numero, punasolujen folaattipitoisuus käytössä olevalla menetelmällä ja testattavalla menetelmällä sekä näistä tuloksista laskettu variaatiokerroin. Tarkat tulokset löytyvät liitteestä 3.

Taulukko 2. Näytteet, joissa variaatiokerroin ylittää mittausepävarmuuden (11 %.)

Näyte	Käytössä oleva esikäsittely (nmol/l)	Testattava esikäsittely (nmol/l)	CV%
25	231	322	23
22	305	403	20
28	369	299	15
30	373	310	13
8	451	390	10
5	457	399	10

6.2 Pakastamisen yhteys folaattipitoisuuteen testattavalla pipetointitavalla

Pakastamisen yhteyttä punasolujen folaattipitoisuuteen testattiin pakastamalla testattavalla menetelmällä esikäsiteltyjä näytteitä 1 ja 2 vuorokautta. Alla on esitetty kuvaajat (Kuvio 4 ja 5), joissa on lineaarinen regressio käytössä olevalla esikäsitellyllä käsiteltyjen näytteiden ja pakastettujen näytteiden välillä. Ensimmäisessä kuvaajassa on esitetty näytteiden pitoisuudet yhden vuorokauden pakastamisen jälkeen ja seuraavassa kuvaajassa on pitoisuudet kahden vuorokauden pakastamisen jälkeen.



Kuvio 4. Lineaarinen regressio käytössä olevan menetelmän ja testattavalla menetelmällä esikäsiteltyjen sekä yhden vuorokauden pakastettujen näytteiden välillä.



Kuvio 5. Lineaarinen regressio käytössä olevan menetelmän ja testattavalla menetelmällä esikäsitelyjen sekä kahden vuorokauden pakastettujen näytteiden välillä.

Taulukkoon 3 on kerätty näytteitä, joiden variaatiokerroin prosentteina on poikkeava joko yhden tai kahden vuorokauden pakastamisen kohdalla tai molemmissa. Muissa näytteissä tulosten variaatiokerroinprosentti oli alle 11 %. Kaikkien näiden näytteiden tulokset löytyvät liitteistä (Liite 4). Taulukossa on esitetty näytteen punasolujen folaattipitoisuus käytössä olevalla menetelmällä esikäsiteltyinä sekä myös punasolujen folaattipitoisuudet yhden ja kahden vuorokauden pakastamisen jälkeen. Pakastetut näytteet olivat esikäsitelty testattavalla menetelmällä. CV% 1 vrk –sarakeessa on laskettu variaatiokerroin yhden vuorokauden pakastamisen jälkeen saatujen tuloksien ja käytössä olevalla esikäsitelyllä saatujen tuloksien välillä. CV% 2 vrk –sarakeen tulokset on laskettu samalla tavalla, mutta käyttäen kahden vuorokauden pakastamisen jälkeen saatuja tuloksia.

Taulukko 3. Näytteet, joissa variaatiokerroin ylittää tai on lähellä sallittua mittausepävarmuutta käytössä olevan esikäsittelymenetelmän ja pakastamisen jälkeen saatujen tulosten välillä.

Näyte	Käytössä oleva esikäsittely (nmol/l)	Pakastus 1vrk (nmol/l)	Pakastus 2vrk (nmol/l)	CV% 1 vrk	CV% 2 vrk
25	231	325	345	24	28
22	305	370	333	14	6
30	373	327	323	9	10
5	457	413	384	7	12
23	524	480	439	6	13
29	616	573	530	5	11
2	879	757	816	11	5

6.3 Tulosten luotettavuuden arviointi ja eettisyys

Kokeellinen osuus pyrittiin tekemään tarkasti ohjeita noudattaen ja toteuttamaan vaiheet samanlaisina kaikkien näytteiden kohdalla. Analysaattorille oli ennen kokeellisen osuuden näytteiden analysointia tehty normaalit päivittäiset kontrolliajot ja niiden tulokset olivat viitearvojen sallimissa rajoissa. Näytteet olivat valikoituja, jo aikaisemmin analysoituja potilasnäytteitä, joten näytteiden preanalyttisiin tekijöihin ei voitu vaikuttaa ennen niiden saapumista laboratorioon. Näytteistä oletettiin, että ne ovat otettu ja kuljetettu annettujen ohjeiden mukaisesti. Näytteet olivat yhtä vanhoja ja niitä oli laboratoriossa analysoinnin jälkeen säilytetty jääkaapissa. Näytteiden hematokriitti tulokset oli analysoitu laboratorion normaalien työkäytänteiden mukaisesti, jos hematokriittiarvoa ei oltu jo analysoitu näytteen lähettävässä toimipaikassa.

Ennen näytteiden käsittelyä tapahtunut putkien tarroitus on ollut tärkeässä osassa tulosten tulkinnessa. Vain putkien tarroitusten perusteella on pystytty tunnistamaan näyte ja vertailemaan näytteitä keskenään. Mahdollisten sekaannusten välttämiseksi näyteputkia säilytettiin telineessä aina samassa järjestyksessä ja ennen pipetointia

putkien tarrat tarkistettiin. Ennen pipetointia näytteet sekoitettiin huolellisesti homogeenisiksi tasosekoittajassa.

Menetelmän esikäsittely on monivaiheinen, mikä aiheuttaa virhelähteitä. Esikäsittely sisältää paljon pipetointia, joten pipetointitarkkuus on merkittävässä osassa tuloksissa. Pipetoinnin tarkkuutta ja tasaisuutta selvitettiin ennen kokeellisen osuuden toteutusta testipipetoinnilla. Näin voitiin varmentaa pipetoinnin laatua. Pipetointiin käytettiin riittävästi aikaa huolimattomuusvirheiden mahdollisuuden minimoimiseksi. Verinäytteiden pipetointi suoritettiin automaattipipetillä ja erikoiskärjillä. Erikoiskärkien avulla voitiin paremmin varmistaa tarkka näytemäärä. Pipetointikärjet myös pyyhittiin ulkopinnalta ylimääräisen näytemateriaalin poistamiseksi. Tämänkin toimenpiteen tarkoituksena oli parantaa pipetointitarkkuutta.

Käytetyistä reagensseista tarkistettiin säilymisaika ja varmistettiin, että niitä oli säilytetty ohjeen mukaisesti. Reagenssien pipetointiin käytettiin moniannostelijapipettiä. Moniannostelijapipetillä pipetointi on helpompaa ja ergonomisempaa, mikä edesauttaa pipetointitarkkuutta. Kaikki käytetyt pipetit olivat kalibroituja. Seisotuksen aikana näytteet olivat peitetyinä foliolla. Folion tarkoituksena on toimia valosuojana sekä estää haihtumista.

Ennen analysointia näytteistä poistettiin mahdolliset sekoittamisesta aiheutuneet ilmakuplat pasteur-pipetillä. Kaikki näytteet pyrittiin analysoimaan esikäsittelyn jälkeen niin pian kuin mahdollista. Tällä rajoitettiin näytteiden haihtumista ja muuta mahdollista näytteessä tapahtuvaa muutosta.

Mahdollisten tuntemattomien muutosten takia pakastettuja näytteitä sulatettiin yhtä kauan ja ne pyrittiin analysoimaan niin pian kuin mahdollista sulattamisen jälkeen. Tällä pyrittiin estämään sulatuksen jälkeisen seisottamisen mahdollisesti aiheuttamat muutokset näytteeseen. Pakastimesta ottamisen jälkeen näytteet purettiin styrox-laatikosta näytetelineeseen väljästi sulamisen nopeuttamiseksi ja sulamisaika otettiin ylös. Sulaneet näytteet sekoitettiin homogeenisiksi sillä pakastaminen saattaa aiheuttaa kerrostumista näytteeseen. Mahdolliset muodostuneet ilmakuplat poistettiin pakastetuista näytteistäkin pasteur-pipetillä.

Kokeellisessa osuudessa käytetty aineisto oli suhteellisen pieni. Käytetyllä näytemäärällä voitiin kuitenkin saavuttaa perustietoa testattavan menetelmän

toimivuudesta ja saada selvyyttä mahdollisista ongelmakohtista. Työssä käytetyt näytteet valittiin tavallisten potilasnäytteiden joukosta. Tämä kavensi mahdollisuuksia näytteiden valintaan eikä valinnassa voitu varmistaa, että kaikki pitoisuudet olisivat yhtä hyvin edustettuina. Mukaan valituissa näytteissä on kuitenkin edustettuina sekä korkeita että matalia punasolujen folaattipitoisuuksia.

Työn teossa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä niiltä osin kuin se työtä koskee. Hyvän tieteellisen käytännön keskeisimmäksi sisällöksi Tutkimuseettinen neuvottelukunta (2012) nimeää muun muassa rehellisyyden, huolellisuuden ja tarkkuuden tutkimustyössä. Neuvottelukunta myös painottaa muiden tekemän tutkimuksen arvostusta eli lähdeviitteiden oikeaa merkintää.

Työn toteuttamisessa noudatettiin myös bioanalyytikon eettisiä ohjeita. Näissä bioanalyytikon eettisissä ohjeissa (2006) veloitetaan bioanalytikkaa sitoutumaan salassapitovelvollisuuteen potilasta ja näytteitä koskevista tiedoista. Työn toteutuksessa käytettiin hyväksytyjä menettelytapoja ja toteutettiin laadukasta ja luotettavaa laboratoriotutkimusprosessia. Näytemateriaalia käsiteltiin potilaan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. (Bioanalyytikon, laboratoriohoitaja eettiset ohjeet 2006.) Tutkimukseen mukaan valitut näytteet numeroitiin ennen käsittelyä ja niitä käsiteltiin ilman potilastietoja. Potilastietoja ei julkaistu missään vaiheessa. Näin potilaiden yksityisyydensuoja voitiin taata.

7 Tulosten tulkinta

Käytössä olevan esikäsitelymenetelmän ja testattavan menetelmän välinen yhteys on tulosten perusteella hyvä. Selitysaste (R^2) näiden muuttujien välillä on 0,9878, mikä tarkoittaa, että käytössä oleva esikäsitelymenetelmä selittää 99 prosenttia testattavan menetelmän vaihtelusta. Piirretystä kuvaajasta (kuvio 3.) voidaan myös havaita, että pisteet sijoittuvat hyvin lineaariselle suoralle. Tästä voidaan siis todeta, että kuvaajan tarkkuudella katsottuna, tuloksissa ei ole suuria poikkeamia.

Taulukossa (taulukko 2.) esitetään kuusi näytettä, joissa variaatiokerroinprosentti on suuri verrattuna mittausepävarmuuteen. Näissä näytteissä variaatiokerroinprosentti on lähellä tai yli laitevalmistajan ilmoittaman mittausepävarmuuden variaatiokerroinprosenttia (11 %).

Taulukon tuloksista voi huomata, että kaikkein suurimmat poikkeamat tuloksista tulivat näytteistä, joiden punasolujen folaattipitoisuus oli pieni (231–373 nmol/l). Suuremmissa pitoisuuksissa variaatiokerroinprosentti oli pienempi kuin sallittu 11 %. Menetelmäohjeen mittausepävarmuuden perusteella alle 340 nmol/l:n tuloksiin sovelletaan sääntöä, jonka perusteella pitoisuus saa vaihdella vain 37,4 nmol/l. Näistä kuudesta poimitusta näytteestä, kahteen voidaan soveltaa tätä sääntöä. Pitoisuuserot näissä näytteissä ylittävät sallitun 37,4 nmol/l muutoksen.

Pakastettuina säilytettyjen esikäsiteltyjen näytteiden kohdalla tulokset ovat samankaltaisia kun näytteitä säilytettiin yksi tai kaksi vuorokautta pakastimessa. Selitysaste molemmissa tapauksissa on samansuuruinen, yhden vuorokauden pakastuksessa 0,9887 ja kahden vuorokauden pakastuksessa 0,9907 (kuvio 4 ja 5). Tämä tarkoittaa, että käytössä olevalla esikäsitelymenetelmällä saadut tulokset selittävät 99 prosenttia pakastettujen näytteiden tulosten vaihtelusta. Kuvaajien perusteella voidaan myös nähdä, että pisteet sijoittuvat hyvin lineaariselle suoralla.

Taulukossa 3 esitettyjen variaatiokerroinprosenttien perusteella voidaan huomata, että tulosten vaihtelu pakastamisen jälkeen oli suurempaa kuin ilman pakastamista. Neljän (näytteet 25, 22, 5 ja 23) näytteen kohdalla variaatiokerroin ylittää menetelmäohjeessa kerrotun mittausepävarmuuden. Näistä näytteistä vain näytteen 25 variaatiokerroinprosentti on yli sallitun 11 %:n sekä yhden (CV% 24) että kahden vuorokauden (CV% 28) pakastamisen jälkeen.

Variaatiokertoimen perusteella poikkeavista näytteistä kahdessa (näyte 25 ja 22) punasolujen folaattipitoisuus oli alle 400 nmol/l (231–305 nmol/l). Näihin alle 340 nmol/l:n pitoisuuksiin sovellettavan säännön mukaan, tulokset saavat erota vain 37,4 nmol/l. Näytteen 25 osalta tulokset eroavat yhden ja kahden vuorokauden pakastamisen jälkeen suuresti alkuperäisestä tuloksesta. Näytteen 22 osalta tulos poikkeaa sallituista rajoista vain yhden vuorokauden pakastamisen jälkeen.

8 Pohdinta

Opinnäytetyö keskeisimpänä tavoitteena oli selvittää punasolujen folaattipitoisuuden esikäsiteltyä testattavaa pipetointimenetelmän toimivuutta verrattuna käytössä olevaan

pipetointimenetelmään. Lisäksi haluttiin myös selvittää onko esikäsiteltyjä näytteitä mahdollista pakastaa ja onko pakastettujen esikäsiteltyjen näytteiden ja pakastamattomien näytteiden folaattipitoisuuksien välillä yhteyttä. Kokeellisessa osuudessa suoritettujen näytteiden analysointi vastasi näihin kysymyksiin osittain. Kokeellisessa osuudessa saavutetut tulokset olivat onnistuneita ja niiden perusteella pystyttiin tekemään päätelmiä testattavan esikäsitelymenetelmän toimivuudesta ja esikäsiteltyjen näytteiden pakastamisen mahdollisista vaikutuksista.

Kokeellisessa osuudessa saadut tulokset olivat lupaavia testattavan esikäsitelymenetelmän kohdalta. Saatujen tulosten perusteella testattava pipetointimenetelmä toimii hyvin kun punasolujen folaattipitoisuus ylittää 400 nmol/l. Kuitenkin tätä pienemmissä pitoisuuksissa tulosten välillä oli enemmän hajontaa. Koska tulokset testattavalla menetelmällä vaihtelivat paljon alle 400 nmol/l:n pitoisuuksissa, voi jatkotutkimuksena esittää testattavan esikäsitelymenetelmän luotettavuuden varmistamista pienillä pitoisuuksilla (Tervo 2013).

Pakastaminen aiheutti tuloksiin enemmän vaihtelua. Tässä kohtaan näytteiden punasolujen folaattipitoisuudella ei näytä olevan selvää yhteyttä tulosten vaihteluun. Yhden ja kahden vuorokauden pakastamisen välillä ei voida sanoa olevan eroa. Tuloksista on myös kiinnostavaa huomata, että tulokset kahden vuorokauden pakastamisen jälkeen eivät ole säännöllisesti pienempiä verrattuna yhden vuorokauden ajan pakastettuihin näytteisiin.

Esikäsiteltyjen näytteiden pakastamisen mahdollisuus on kuitenkin merkittävä tekijä esikäsitelymenetelmää valittaessa. Kirurgisessa sairaalassa on käytössä vain yksi analysaattori punasolujen folaattipitoisuuden määrittämiseen ja laiterikon sattuessa on työn sujuvuuden kannalta merkittävää, että saapuvat näytteet voidaan samana päivänä esikäsitellä ja esikäsitellyt näytteet pakastaa. Näin punasolujen folaattipitoisuuden analysoinnin työläin ja eniten aikaavievä vaihe on valmiiksi tehty eikä työ kasaannu seuraaville päiville. Näin toimittaessa laiterikon korjaannuttua, voidaan kertyneet näytteet analysoida joutuisammin.

Työssä käytetty näytemäärä oli melko pieni, joten testattavaa menetelmää voisi tutkia myös laajemmalla näytemäärällä. Tähän työhön valitut näytteet olivat peräisin Kirurgiseen sairaalaan lähetetyistä potilasnäytteistä. Tavoitteena oli valita näytteitä tasaisesti eri pitoisuuksista, niin että mukana kokeellisessa osuudessa olisi näytteitä,

jotka alittavat viiterajat että näytteitä, jotka ylittävät viiterajat. Näytteiden rajallinen määrä aiheutti rajoituksia näytteiden valintaan, joten kaikkia pitoisuuksia ei pystytty valitsemaan samaa määrää. Tähän vaikuttaa tietenkin myös punasolujen folaattipitoisuuden laajat viitearvot.

Opinnäytetyöstä syntyneitä tuloksia ei vielä voida suoraan hyödyntää Kirurgisen sairaalan laboratorion toiminnassa. Tulokset kuitenkin vaikuttavat lupaavilta ja lisätutkimusten jälkeen testattava esikäsittelemenetelmä voidaan mahdollisesti ottaa käyttöön riippuen lisätutkimuksista saaduista tuloksista. (Tervo 2013.)

Opinnäytetyön tekeminen on ollut pitkä prosessi, joka on opettanut paljon kokeellisen työn tekemisestä. Haasteena työn toteuttamisessa on ollut erityisesti kiireinen ja ajoittain tiukka aikataulu. Aikataulullisista ongelmista huolimatta työ eteni suunnitelmien mukaisesti. Kokeellisen osuuden suorittaminen Kirurgisessa sairaalassa oli myös ajoittain haastavaa. Sain toteuttaa ja suunnitella työn kulun melko itsenäisesti, mikä oli hyvin opettavaista, koska työtä täytyi tehdä lomittain eri näytesarjojen välillä. Kaiken kaikkian opinnäytetyöprosessi on ollut työläs, mutta palkitseva.

Lähteet

Abbott 2010. Architect system. Folate. Menetelmäkuvaus. 1 – 11.

Aro, Antti 2013. Folaatti ja foolihappo. Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. Päivitetty 4.3.2013.

<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skr00043o/tk.koti?p_artikkeli=skr00043>. Luettu 18.9.2013.

Bioanalyttikon, laboratoriohoitaja eettiset ohjeet 2006. Suomen Bioanalyttikko ry.

Eskelinen, Seija 2012. Punasolujen määrä (B-Eryt) ja hematokriitti (B-Hkr).

Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.10.2012.

<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03032>. Luettu 19.9.2013.

fE-Folaat 2013. Tutkimusohjekirja. HUSLAB. Verkkodokumentti. Päivitetty 17.10.2013.

<http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1414&terms=folaat> Luettu 19.10.2013

fE-Folaatti. 2013. Laboratorio-ohjekirja. Vaasan keskussairaala. Verkkodokumentti.

Päivitetty 1.3.2013. <<http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja.htm>>. Luettu 19.9.2013.

Folaatti. 2013. Laboratorio käsikirja. Yhtyneet Medix laboratoriot. Verkkodokumentti.

Päivitetty 30.5.2013.

<<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dlistview%26indexLetter%3DF&objectType=product&directoryType=&productOID=131>>. Luettu 19.9.2013

Harvey, Richard – Ferrier, Denise 2011. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry.

5. painos. Baltimore: Wolters Kluwer.

Heikkilä, Tarja 2008. Tilastollinen tutkimus. 7. painos. Helsinki:Edita.

HUSLAB. Liikelaikokset ja tukipalvelut. HUS. Verkkodokumentti. <<http://www.hus.fi/hus-tietoa/liikelaikokset-ja-tukipalvelut/huslab/Sivut/default.aspx>>. Luettu 20.9.2013.

Hyvä tieteellinen käytäntö. 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Verkkodokumentti.

<<http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanto>>. Luettu 25.9.2013.

Immonen, Heikki 2013. Product Specialist. Siemens Healthcare Diagnostics.

Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 14.11.2013.

Karppinen, Mikko 2013. Customer support and Quality. Diagnostics Division. Abbott.

Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 8.10.2013.

Roche 2011. Folate RBC. Menetelmäkuvaus. 1 – 4.

Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011. Folate (FOL). Menetelmäkuvaus. 1 – 16.

Tervo, Leena 2013. Kemisti. HUSLAB. Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 17.12.2014.

Reagenssien tiedot

ARCHITECT Folate Reagent Kit

- LOT 31903UI00
- exp. 25.12.2014

ARCHITECT Folate RBC Lysis Diluent

- LOT 28179UI00
- exp. 12.1.2014

ARCHITECT Lysis Reagent

- LOT 29050UI00
- exp. 20.3.2014

Testipetoinnin tulokset

Näyte	Tulos (nmol/l)	Oma tulos (nmol/l)	CV%
1	111,1	115,8	2,9
2	205,4	188,8	6,0
3	140,4	141,5	0,6
4	247,0	231,1	4,7
5	99,4	90,1	6,9
6	97,4	85,4	9,3
7	184,1	182,5	0,6
8	150,2	154,5	2,0
9	74,4	66,5	7,9
10	337,1	350,3	2,7
11	196,3	194,5	0,7
12	101,8	84,7	13,0
13	142,9	125,7	9,1
14	201,1	195,2	2,1
15	152,1	117,3	18,3
16	272,8	257,1	4,2
17	195,8	183,7	4,5
18	131,6	115,0	9,5
19	238,6	229,2	2,8
20	149,7	143,2	3,1

Testattavan menetelmän tulokset

Näyte	HKR (%)	Normaali menetelmä (nmol/l)	Testattava menetelmä (nmol/l)	CV%
1	40	457	454	0,47
2	27	879	864	1,23
3	42	378	392	2,71
4	30	1230	1205	1,47
5	30	457	399	9,64
6	45	331	341	2,10
7	37	456	488	4,86
8	33	451	390	10,14
9	35	2400	2495	2,74
10	33	274	263	2,87
11	35	808	825	1,46
12	44	201	198	1,05
13	48	1243	1172	4,18
14	45	297	296	0,21
15	37	698	658	4,14
16	42	875	857	1,40
17	42	307	408	20,03
18	37	523	546	3,07
19	42	1085	1132	2,98
20	37	1221	1151	4,19
21	44	392	382	1,74
22	35	305	403	19,65
23	37	524	510	1,88
24	39	1316	1228	4,90
25	45	231	322	23,19
26	42	366	385	3,63
27	37	428	411	2,82
28	30	369	299	14,68
29	43	616	597	2,14
30	36	373	310	13

Pakastettujen näytteiden tulokset

Näyte	HKR (%)	Normaali menetelmä (nmol/l)	Pakastus 1 vrk (nmol/l)	CV%
1	40	457	445	1,92
2	27	879	757	10,57
3	42	378	387	1,80
4	30	1230	1137	5,60
5	30	457	413	7,10
6	45	331	373	8,35
7	37	456	450	0,93
8	33	451	448	0,33
9	35	2400	2421	0,60
10	33	274	266	2,06
11	35	808	812	0,30
12	44	201	216	5,01
13	48	1243	1241	0,09
14	45	297	290	1,50
15	37	698	709	1,11
16	42	875	773	8,75
17	42	730	770	3,79
18	37	523	477	6,49
19	42	1085	1113	1,81
20	37	1221	1148	4,37
21	44	392	372	3,62
22	35	305	370	13,72
23	37	524	480	6,21
24	39	1316	1189	7,19
25	45	231	325	23,95
26	42	366	367	0,18
27	37	428	441	2,11
28	30	369	345	4,76
29	43	616	573	5,01
30	36	373	327	9,31

Näyte	HKR (%)	Normaali menetelmä (nmol/l)	Pakastus 2 vrk (nmol/l)	CV%
1	40	457	469	2,30
2	27	879	816	3,99
3	42	378	383	1,65
4	30	1230	1152	3,20
5	30	457	384	2,71
6	45	331	362	4,11
7	37	456	463	3,70
8	33	451	437	7,98
9	35	2400	2431	1,84
10	33	274	277	3,57
11	35	808	765	5,36
12	44	201	185	4,87
13	48	1243	1254	4,82
14	45	297	259	9,47
15	37	698	685	2,84
16	42	875	872	1,19
17	42	307	333	14,37
18	37	523	482	8,88
19	42	1085	1130	0,13
20	37	1221	1170	1,15
21	44	392	385	0,59
22	35	305	333	13,34
23	37	524	439	10,67
24	39	1316	1228	0,01
25	45	231	345	4,86
26	42	366	330	10,87
27	37	428	415	0,65
28	30	369	344	9,75
29	43	616	530	8,49
30	36	373	323	2,91