



Emmi Hurskainen

Kissan seerumin amyloidi A:n määrittäminen Eurolyser Cube Vet-laitteella

Seerumi- ja plasmanäytetulosten vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

21.4.2023

Tekijä	Emmi Hurskainen
Otsikko	Kissan seerumin amyloidi A:n määrittäminen Eurolyser Cube Vet-laitteella – seerumi- ja plasmanäytetulosten vertailu
Sivumäärä	32 sivua + 1 liite
Aika	21.4.2023
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava Laboratoriohoitaja Line Virtanen
<p>Kissan seerumin amyloidi A on yksi akuutin faasin proteiineista, jonka pitoisuus kohoaa tulehduksen ja kudოსvaurioiden aikaisessa vaiheessa. Akuutin faasin proteiinit ovat maksan tuottamia proteiineja, joita virtaa plasmasta kudokseen tulehduksen aikana. Seerumin amyloidi A on herkkä biomarkkeri, ja sen pitoisuuden avulla voidaan seurata tulehduksen kulkua. Seerumin amyloidi A:n määrittämiseen Espoon eläinsairaalassa käytetään Eurolyser Cube Vet- analysointilaitetta ja SAA VET-testiä. SAA VET-testi on validoitu vain seeruminäytteelle.</p> <p>Seeruminäytteen hankaluutena koetaan kuitenkin seerumin hyytymiseen vaadittava pitkä aika. Lisäksi seeruminäyte tarvitsee plasmanäytettä pidemmän sentrifugoimisen. Näin ol- len tulosten valmistumiseen seeruminäytteestä menee noin 50 minuuttia ja tulokset halut- taisiin saada nopeammin.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla seerumi- ja plasmanäytetuloksia, kun käy- tetään Eurolyser Cube Vet- analysointilaitetta. Opinnäytetyön tavoitteena oli kerätä luotettavia tutkimustuloksia, joiden perusteella voitiin vastata tutkimuskysymyksiin.</p> <p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin määrällisenä tutkimuksena ja se etsii vastauksia seuraaviin kysymyksiin. Eroaako plasmasta mitattu kissan seerumin amyloidi A-tulos seerumista mi- tatusta tuloksesta? Jos eroaa, niin kuinka paljon? Onko mahdollinen ero tilastollisesti mer- kittävä? Opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Espoon eläinsairaalan kanssa ja Eurolyser Diagnostica GmbH tuki opinnäytetyötä lahjoittamalla tutkimukseen SAA VET-testejä.</p> <p>Opinnäytetyön tutkimusta varten 41 kissalta määrätettiin seerumin amyloidi A:n pitoisuus sekä plasma- että seeruminäytteestä ja saatua aineistoa analysoitiin tilastollisten menetel- mien avulla. 26 kissan seerumin amyloidi A:n pitoisuus jäi alle SAA VET- testin mittausalue- en mittausrajan ja yksi näyte ehti vanhentua ennen analysointia. Lisäksi kaksi näytettä meni mittausalueen mittausrajan yli, joten lopulliseen tulosanalyyysiin otettiin mukaan 12 kissan näytteet.</p> <p>Analysoidun aineiston perusteella seeruminäytteistä mitattiin aavistuksen korkeampia see- rumin amyloidi A:n pitoisuuksia, kuin plasmanäytteistä. Seeruminäytteiden keskihajonta oli hieman pienempi kuin plasmanäytteiden keskihajonta. Tulosten mukaan tilastollisesti mer- kittävää eroa seerumi- ja plasmanäytteen välillä ei kuitenkaan ollut. Tuloksia tarkastellessa tulee kuitenkin ottaa huomioon, että lopulliseen tulosanalyyysiin käytettiin vain 12 näytteen tuloksia, joten tulosta ei voida pitää luotettavana eikä tulosta voida yleistää. Tästä tutki- muksesta saadut tulokset ovat siten hyvin suuntaa antavia, mutta luotettavuuden ja yleistä- misen kannalta tarvittaisiin suurempi otos.</p>	
Avainsanat	Seerumin amyloidi A, plasma, seerumi, litiumhepariini, seerumi- ja plasmanäytteen vertailu

Author	Emmi Hurskainen
Title	Determination of serum amyloid A in feline with Eurolyser Cube Vet analyzer - Comparison of serum and plasma samples
Number of Pages	32 pages + 1 appendices
Date	21.4.2023
Degree	Biomedical Laboratory Scientist (Bachelor of Health Care)
Degree Programme	Degree Programme in Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Lecturer Line Virtanen, Biomedical Laboratory Scientist
<p>Feline serum amyloid A is one of the acute phase proteins, the concentration of which increases in the early phase of inflammation and tissue damage. Acute phase proteins are proteins formed in and flow from plasma to the tissue during inflammation. Serum amyloid A is a sensitive biomarker, and its concentration can be used to monitor the status of inflammation. The Eurolyser Cube Vet analyzer and the SAA VET test are used for the determination of serum amyloid A level at the Espoo veterinary hospital. The SAA VET test is only validated to be used with serum sample.</p> <p>However, the difficulty of the serum sample is the required time for the serum to clot which is long. In addition, the serum sample needs a longer centrifugation than the plasma sample. Therefore, it takes about 50 minutes to get the results from the serum sample, and it is preferred to get the results faster.</p> <p>The purpose of this thesis was to compare serum and plasma sample results when using the Eurolyser Cube Vet analyzer. The aim of the thesis is to collect reliable research results, based on which the research questions can be answered.</p> <p>This thesis was carried out as a quantitative study, and it seeks answers to the following questions. Does the cat serum amyloid A result measured in plasma differ from the result measured in serum? If different, how much? Is the possible difference statistically significant? The thesis was carried out in cooperation with Espoo Veterinary Hospital and Eurolyser Diagnostica GmbH supported the thesis by donating SAA VET tests to the research.</p> <p>During this study the concentration of serum amyloid A was measured from 41 cats and from both plasma and serum samples. The obtained data was analyzed using statistical methods. The concentration of amyloid A in the serum of 26 cats was below the measurement limit range of the SAA VET test. One of the samples was kept too long in the freezer and it expired before the analysis. In addition, two samples exceeded the measurement limit range, so eventually the samples of 12 cats were included in the result analysis.</p> <p>Based on the analyzed material, slightly higher concentrations of serum amyloid A were measured in the serum samples than in the plasma samples. The standard deviation of the serum samples was slightly smaller than the standard deviation of the plasma samples. However, according to the results, there was no statistically significant difference between the serum and plasma samples. When looking at the results, however, it should be considered that the results of only 12 samples were used for the final analysis, so the result cannot be considered reliable, and the result cannot be generalized. The results obtained from this study are thus very indicative, but in terms of reliability and generalization, more data would be needed.</p>	
Keywords	Serum amyloid A, plasma, serum, lithium heparin, comparison of plasma and serum

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Kissa eläinsairaalan potilaana	2
3	Plasma- ja seeruminäyte	3
3.1	Plasma- ja seeruminäytteen erot	3
3.2	Hepariini	6
3.3	Plasma- ja seeruminäytteen vertailu	7
4	Seerumin amyloidi A (SAA)	9
4.1	Kliininen merkitys	9
4.2	Seerumin amyloidi A:n (SAA) määrittäminen	10
5	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	11
6	Opinnäytetyön toteuttaminen ja menetelmät	12
6.1	Tiedonhaku	12
6.2	Aineisto ja aineiston analysointi	13
6.3	Mittaus- ja määrittämenetelmä	15
6.4	Tulosten analysointi	16
6.5	Opinnäytetyön tulokset	18
7	Pohdinta	23
7.1	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	23
7.2	Opinnäytetyön luotettavuus	24
7.3	Opinnäytetyön eettisyys	26
7.4	Jatkotutkimukset	27
7.5	Ammatillinen kasvu	27
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. SPSS-tulokset	

1 Johdanto

Seerumin amyloidi A on pienimolekyylinen proteiini, joka on löydetty melkein 50 vuotta sitten. Se on yksi akuutin faasin proteiineista, jota syntetisoidaan maksassa. (Shridas & Patrick & Tannock 2021.) Kissan seerumin amyloidi A:n pitoisuutta tutkitaan, kun halutaan selvittää, onko kissalla tulehdusta, sillä seerumin amyloidi A:n pitoisuus nousee kudosaivaurion ja tulehduksen aikaisessa vaiheessa (SAA VET test kit 2022).

Seerumin amyloidi A:n määrittämiseen kissalla on käytetty yleisesti seeruminäytettä, mutta seeruminäytteen hankaluutena koetaan näytteen hyytymiseen tarvittava pitkä odotusaika. Lisäksi seerumin erottamiseen solupelletistä tarvitaan 10 minuutin sentrifugointi. Plasmanäytteen käsittely sen sijaan on nopeampaa, sillä se ei tarvitse hyytymisaikaa ja plasman erottaminen solupelletistä voidaan tehdä lyhyemmällä 2 minuutin sentrifugoimisella. Näytteen nopeampi käsittelyaika mahdollistaisi tulosten nopeamman valmistumisen, mikä puolestaan vähentäisi kissan eläinlääkäriasemalla viettämää aikaa. On tutkittu, että kissat kokevat stressiä eläinlääkärissä käymisestä ja kissan stressi vaikuttaa kissan fyysisen ja psyykkisen hyvinvoinnin lisäksi myös fysiologisiin parametreihin sekä laboratoriotuloksiin (Stoneburner & Naughton & Sherman & Matthews 2020; Tuominen 2017).

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, voidaanko kissan seerumin amyloidi A (SAA) määrittää seerumin lisäksi plasmasta, kun käytetään Eurolyser Cube Vet- analyysia. Opinnäytetyössä verrataan plasmasta ja seerumista mitattuja arvoja keskenään ja pyritään selvittämään, ovatko plasmasta mitatut arvot samanlaisia, kuin seerumista mitatut arvot.

Jos tutkimuksessa selviää, että kissojen seerumin amyloidi A voidaan määrittää seerumin lisäksi plasmasta, voitaisiin pitoisuus määrittää jatkossa nopeammin. Tämä voisi osaltaan vähentää kissan kokemaa stressiä eläinlääkärissä, sillä siellä vietetty aika lyhenee. Myös verinäytteenottoon käytetty aika voisi olla lyhyempi, jos tarvittavien verinäyteputkien määrää voitaisiin vähentää. Näin verinäytteenotto voisi olla kissalle vähemmän stressaavaa tai ainakin stressi voisi olla ajallisesti lyhytkestoisempaa. Monet muut analyysit voidaan yleensä suorittaa plasmanäytteestä, joten useimmiten seeruminäytteen ottaminen voitaisiin jättää kokonaan välistä. Opinnäytetyön yhteydessä teh-

dyn tutkimuksen avulla haluttiin selvittää, soveltuuko plasma näytemuodoksi ja voidaanko plasmasta mitatut arvot vastata luotettavasti, sillä analyysiin soveltuvasta näytemuodosta löytyy ristiriitaista tietoa.

Espoon eläinsairaala on yksi seitsemästä Suomen Evidensian päivystävistä eläinsairaaloista (Eläinsairaalat palvelevat 24 h. Evidensia). Evidensian tunnuslause eläinhoidossa on potilaiden kohtaaminen tunteella ja hoitaminen tieteellä. Yrityksen arvoihin kuuluu tarjota laadukasta palvelua, joka perustuu tutkittuun tietoon. (Yritys. Evidensia.) Tämä opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Espoon eläinsairaalan kanssa ja sen tarve perustui tähän laadukkaan ja luotettavan palvelun tarjoamiseen.

2 Kissa eläinsairaalan potilaana

Tilastokeskuksen mukaan Suomessa oli 371 000 kissataloutta vuonna 2016 ja noin 590 000 kissaa. Kulutustutkimuksen mukaan lemmikkieläimiin kulutettu rahamäärä on kasvanut vuodesta 2012 vuoteen 2016 ja eniten lemmikkieläimiin liittyvistä kuluista ovat kasvaneet eläinlääkärin ja muiden lemmikkipalveluiden kulut. (Suomen virallinen tilasto 2020.) Viime vuosien aikana kissojen hyvinvoinnista on keskusteltu julkisuudessa paljon, mutta kissojen arvostus Suomessa on tällä hetkellä edelleen kaksijaakoista. Osaa kissoista hoidetaan erittäin hyvin ja niitä arvostetaan rakkaina lemmikkieläiminä. Valitettavasti suuri osa kissoista elää kuitenkin edelleen aliarvostettuina ja niiden hyvinvointia laiminlyödään. (Salminen 2020: 7–15.)

Yhdeksi kissojen hyvinvoinnin ongelmaksi nostetaan Ruokaviraston tekemässä kyselyssä arvostuksen puute, sekä omistajien tietämättömyys kissan lajityypillisestä käytäytymisestä. Tietämättömyys kissan tarpeista aiheuttaa kissalle stressiä ja stressi puolestaan lisää kissan terveysongelmia. (Salminen 2020: 7–15.) Muun muassa Suomen eläinsuojelu tekee jatkuvaa työtä kissojen hyvinvoinnin ja arvostuksen puolesta (Tietoa kissakriisistä 2022).

Eläinsairaala on ympäristönä kissoille stressaava outoine hajuineen ja äänineen. Lisäksi kissat kokevat usein vieraat ihmiset sekä muut eläimet pelottavina. Ne häiriintyvät ympäristön äänistä ja ympärillä tapahtuvasta liikehinnästä. Kissan kokema stressi voi aiheuttaa kissalle useita fyysisiä ja psyykkisiä oireita, jotka voivat puolestaan vaikuttaa kissan yleiseen terveyteen ja hyvinvointiin. (Stoneburner ym. 2020: 34.)

Fyysisten ja psyykkisten oireiden lisäksi, stressi vaikuttaa myös fysiologisiin parametreihin ja laboratoriotuloksiin. Stressi kissoilla-kirjallisuuskatsaus mainitsee useita tutkimuksia, joissa stressin vaikutusta laboratoriotuloksiin on tutkittu. Kirjallisuuskatsauksen mukaan, kissan eläinlääkärin vastaanotolla kokema stressi vaikuttaa laboratoriotulosten osalta ainakin verenkuvaan, veriplasman glukoosipitoisuuteen, seerumin laktaatti- ja kortisolipitoisuuksiin sekä aiheuttaa muutoksia virtsan pH-arvossa. (Tuominen 2017: 38–44.)

3 Plasma- ja seeruminäyte

Koska veri on tärkeä ja helposti saatavilla oleva biologinen materiaali, on sitä käytetty kliinisen kemian laboratoriotutkimuksiin jo pitkään. Veri on nestemäistä kudosta, joka koostuu verisoluista sekä soluväliaineesta eli plasmasta. Verisoluja ovat punasolut eli erytrosyytit, valkosolut eli leukosyytit ja verihiutaleet eli trombosyytit. Veren ensisijainen tehtävä on kuljettaa pienimolekyylisiä yhdisteitä eri puolelle kehoa. Veri kuljettaa muun muassa happea ja hiilidioksidia, erilaisia ravinteita sekä hormoneja. Molekyylien kuljetamisen lisäksi veri säätelee solunulkoisen nesteen happamuutta eli pH:ta ja ionikonsentraatiota sekä elimistön lämpötilaa. Veressä olevat valkosolut osallistuvat elimistön immuunijärjestelmään, kun taas trombosyyttien tehtävä on verenvuodon tyrehtyttäminen. Veri on yhteydessä kaikkiin kehon elimiin ja kudoksiin. Verestä saatavaa plasmaa ja seerumia tutkimalla saadaan tietoa elimistön muutoksista, sillä kudოსvauriot ja patologiset muutokset elimistössä näkyvät sekä plasman että seerumin kemiallisessa koostumuksessa, muun muassa proteiinikoostumuksessa. Tämän vuoksi suuri osa kliinisistä testeistä perustuu nykyään plasman tai seerumin tutkimiseen. (Psychogios ym. 2011.)

3.1 Plasma- ja seeruminäytteen erot

Veren sisältämiä eri aineosia tutkittaessa näytemuotona voidaan käyttää kokoverta, seerumia tai plasmaa. Kun halutaan tutkia kokoverta tai plasmaa, tulee verinäyte ottaa sopivaa antikoagulanttia sisältävään verinäyteputkeen. Antikoagulantti on lisäaine, joka estää veren hyytymisen ilman, että mitattava aineosa muuttuu merkittävästi ennen analysointia. Antikoagulantti estää veren hyytymisen joko sitomalla kalsiumia tai estämällä trombiinin aktiivisuutta. On erittäin tärkeää, että veri ja sen sisältämät aineosat säilyisivät mahdollisimman samankaltaisina näytteenoton jälkeen, kuin mitä ne ovat elimistön sisällä. Näin saadaan mahdollisimman oikeanlaista tietoa elimistöstä, kun tehdään la-

boratoriotutkimuksia. Verihiutaleet ja hyytymistekijät aktivoituvat heti, kun suonen seinämä läpäistään neulalla verinäytteenoton yhteydessä. Ne myös jatkavat toimintaansa verinäyteputkessa, jos se ei sisällä hyytymistä estäviä aineita. (WHO 2002: 5.)

Plasmaa voidaan saada usean eri antikoagulantin avulla. Eri laboratoriotestit vaativat erilaisen näytemuodon riippuen analyysiin käytettävästä testistä. Osa kliinisen kemian tutkimuksista voidaan suorittaa vain seerumista tai litiumhepariinilla antikoaguloidusta näytteestä, kun taas esimerkiksi hematologiset tutkimukset vaativat EDTA:lla antikoaguloidun näytteen. (Lippi ym. 2018.) Taulukossa 1 on esitetty eri verinäyteputkien sisältämät lisäaineet ja kerrottu mitä antikoagulanttia voidaan käyttää missäkin tutkimuksessa (Taulukko 1). Vuonna 1996 on laadittu kansainvälinen standardi, joka määrittelee laskimoverinäytteelle sopivat antikoagulantit sekä niiden pitoisuudet. Laboratoriotutkimuksissa kaikkialla maailmassa käytetään nykyään plasmanäytteille standardoituja antikoagulantteja. (WHO 2002: 5.) Ilman verinäytteenottoputkeen lisättyjä hyytymisenestoaineita, veri hyytyy verinäytteenottoputkessa 4–8 minuutissa (Ruskoaho & Kerkelä 2023).

Taulukko 1. Erilaisia laboratoriotutkimusten yhteydessä käytettäviä verinäyteputkien sisältämiä lisäaineita. (Lippi ym. 2018).

Lisäaine	Näytemuoto	Tutkimus
Natriumsitraatti	Plasma, kokoveri	Hyytymistutkimukset
Lisäaineeton/hyytymisaktivaattori	Seerumi	Kliinisen kemian tutkimukset, immunokemian tutkimukset
Litiumhepariini	Plasma	Kliinisen kemian tutkimukset, immunokemian tutkimukset
Natriumhepariini	Plasma	Hivenainetutkimukset
EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo)	Kokoveri, plasma	Hematologiset ja immunokemialliset tutkimukset
Glykolyysin estäjä	Plasma	Glukoositutkimus
ACD (Happo-sitraatti-dekstroosi)	Kokoveri	Veriryhmämääritykset

Plasma on verisolujen nestemäistä väliainetta ja se sisältää kaikki veren aineosat, lukuun ottamatta puna- ja valkosoluja sekä verihiutaleita. Plasma saadaan verinäytteestä ottamalla verinäyte antikoagulanttia sisältävään verinäyteputkeen ja sentrifugoimalla verinäyte. Sentrifugoinnin jälkeen solut ovat painuneet putken pohjaan (ns. solupelletti) ja plasma erottuu verisolujen päälle, josta se voidaan kerätä talteen. Väriiltään plasma on hieman kellertävää ja läpinäkyvää. Veren kokonaistilavuudesta plasmaa on noin 50–55 %. (Psychogios ym. 2011.)

Seeruminäytteelle ei käytetä antikoagulanttia, vaan se otetaan joko lisäaineettomaan tai hyytymistä aktivoivaa lisäainetta sisältävään verinäyteputkeen. Verinäytteenoton jälkeen veren annetaan hyytyä putkessa, jonka jälkeen seeruminäyte sentrifugoidaan.

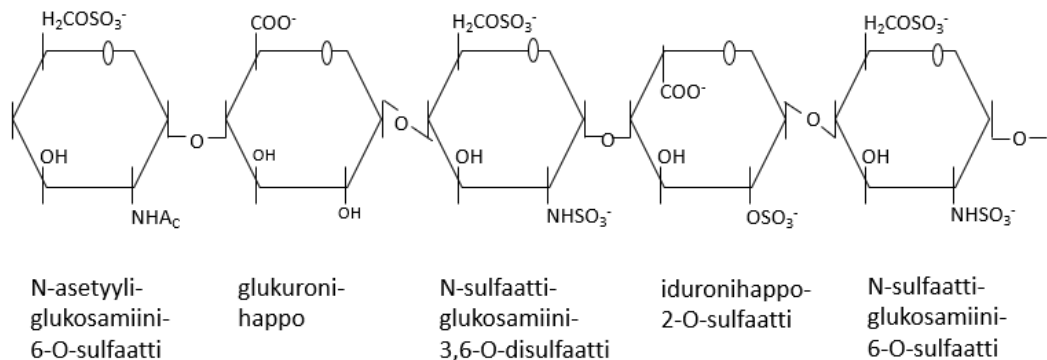
Hyytymä painuu putken pohjalle ja seerumi erottuu hyytymän päälle. Seerumi eli verihera eroaa plasmasta siten, seerumi ei sisällä hyytymistekijöitä, joita ovat fibrinogeeni, protrombiini ja muut hyytymistekijät. Tämän vuoksi seerumi on myös koostumukseltaan vähemmän viskoosia kuin plasma. (Psychogios ym. 2011.)

Sekä plasma että seerumi ovat vesiliuoksia, niistä noin 95 % on vettä. Plasma ja seerumi sisältävät valkuaisaineita, epäorgaanisia aineita ja orgaanisia yhdisteitä, jotka ovat liuenneina veteen. Lisäksi plasmassa ja seerumissa on myös kaasuja, erilaisia mineraaleja, pigmenttiaineita, hormoneja, lipoproteiineja, entsyymejä sekä aineenvaihdunnan jäännöstuotteita kuten ureaa ja uraattia. Nykytiedon mukaan plasman ja seerumin koostumus pienimolekyylisten yhdisteiden osalta näyttää olevan hyvin samankaltainen. Suurin ero näyttäisi olevan juuri hyytymisprosessiin osallistuvissa yhdisteissä. Joidenkin muidenkin yhdisteiden kuin hyytymistekijöiden lisäksi on kuitenkin myös raportoitu pieniä eroja niiden suhteellisessa jakautumisessa plasman ja seerumin välillä. (Psychogios ym. 2011.) Plasman aineosat vastaavat kuitenkin paremmin potilaan patologista tilannetta kuin seerumin aineosat ja joidenkin aineosien muutokset voidaan välttää käyttämällä antikoagulantteja (WHO 2002: 5).

Plasman käyttäminen laboratoriokokeissa nopeuttaa tulosten saamista, sillä plasma ei tarvitse hyytymisaikaa, vaan se voidaan sentrifugoida ja analysoida välittömästi. Seeruminäytteen sen sijaan tulee antaa hyytyä riittävän pitkään ennen näytteen sentrifugointia. On tutkittu, että veren hyytymisaika voi vaihdella eri yksilöiden välillä ja näytteen tulisi antaa hyytyä huoneenlämmössä 30–60 minuuttia ennen seerumin sentrifugointia, jotta hyytyminen ehtii varmasti tapahtua. (Sotelo-Orozco & Chen & Hertz-Picciotto & Slupsky 2021; Kennedy ym. 2021; Vignoli ym. 2022.) Lisäksi plasmaa erottuu 15–20 % enemmän samasta verimäärästä kuin seerumia (WHO 2002: 6).

3.2 Heparini

Heparini, joka on yksi antikoagulanteista, koostuu pentasakkaridiketjusta, joka sisältää sulfaattiryhmiä (Kuva 1). Heparini on vesiliukoinen glykosaminoglykaani, jota löytyy elimistöstä syöttösolujen eritysjyväsistä proteiineihin kiinnittyneinä. (Ruskoaho & Kerkelä 2023.)



Kuva 1. Hepariniin molekyylikaava. (Ruskoaho & Kerkelä 2023.) Kuva muokattu.

Hepariniin toiminta perustuu siihen, että se osallistuu veren hyytymisjärjestelmään estämällä trombiinin ja hyytymistekijöiden toimintaa. Trombiini on molekyyli, joka on keskeisessä osassa hyytymän muodostumisessa ja se osallistuu monen hyytymistekijän toimintaan. Hepariniä esiintyy veressä fraktioimattomana hepariinina (UFH) sekä pienimolekyylisenä hepariinina. Fraktioimaton hepariini tehostaa trombiinin inaktivoitumista sitoutumalla antitrombiiniin, ja nimenomaan antitrombiini III:een, joka on tärkein hyytymistekijöiden fysiologinen antikoagulantti. Antitrombiini III on glykosyloitunut yksiketjuinen 432 aminohapon pituinen polypeptidi. Antitrombiini III:sta muodostuu maksassa ja se neutralisoi trombiinin lisäksi myös muita hyytymistekijöitä. (Chen 2011; Ojanen 2016; Ruskoaho & Kerkelä 2023.) Fraktioimattoman hepariniin sitoma antitrombiini tehostaa trombiinin inaktivoitumista, kun taas veressä oleva pieni molekyylinen hepariini osallistuu veren hyytymisjärjestelmään estämällä hyytymistekijä FXa:n toimintaa (Chen 2011.)

3.3 Plasma- ja seeruminäytteen vertailu

Seerumia on totuttu pitämään kliinisissä tutkimuksissa referenssinä, johon plasman ja kokoveren tuloksia verrataan, sillä se saadaan hyytyneestä verestä ilman, että joudutaan käyttämään hyytymistä estäviä aineita, eli antikoagulantteja (Sotelo-Orozco ym. 2021). Vignoli ym. (2022) toteavat tutkimuksessaan, että plasma- ja seeruminäytteiden vertailusta on tehty jo aiemmin useita tutkimuksia ja voidaan todeta, että näytemuodolla on väliä, riippuen siitä mitä näytteestä halutaan tutkia. Heidän mukaansa on tutkittu, että se miten eri aineenvaihduntatuotteet vuorovaikuttavat keskenään, poikkeaa toisistaan plasmassa ja seerumissa.

Yhdysvalloissa tehdyssä tutkimuksessa vertailtiin koiran aminohappopitoisuuksia kokoveren, seerumin ja plasman välillä. Vaikka aminohappoanalyysit ovat vielä eläinanalytiikassa harvinaisia, ihmisiltä plasman aminohappopitoisuuksia määritetään rutiininomaisesti esimerkiksi vastasyntyneillä synnyttäneiden aineenvaihduntahäiriöiden havaitsemiseksi. Aminohappoanalyyseissä käytetään yleisesti plasmaa, mutta tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, voiko määrittämiseen koirilla käyttää seerumia. (Blake ym. 2022.)

Tutkimuksessa havaittiin, että aminohappopitoisuudet olivat yleisesti korkeammat seerumi- kuin plasmanäytteissä. Samankaltaisia tuloksia on saatu myös aiheesta aiemmin tehdyissä tutkimuksissa. Tämä johtuu osittain siitä, että joutuessaan kehon ulkopuolelle, verisolut vapauttavat aminohappoja hyytymisprosessin aikana. Lisäksi tutkimuksessa huomattiin, että kolmella aminohapolla oli suuria eroavaisuuksia plasma- ja seerumipitoisuuksissa. (Blake ym. 2022.)

Näillä kolmella aminohapolla on todettu samanlaisia pitoisuuseroja myös aiemmin ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa, kun on verrattu aminohappopitoisuuksia seerumi- ja plasmanäytteissä. Tämän tutkimuksen tutkimustulokset viittaavat siihen, että seerumilla, kokoverellä ja plasmalla ei voida käyttää samoja viitearvoja. Tutkimuksen mukaan koiran seerumin ja plasman aminohappoprofiilit ovat keskenään enemmän samankaltaisia kuin kokoverestä määritettynä, mutta niitä ei silti voida verrata suoraan keskenään ja siitä syystä seerumilla ja plasmalla tulisi olla omat viitearvot. (Blake ym. 2022.)

Toisessa yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa verrattiin eroja aineenvaihduntatuotteiden profiileissa seeruminäytteen ja plasmanäytteen välillä, kun antikoagulantteina oli käytetty joko EDTA:ta, sitraattia, fluoridia, happo-sitraatti-dekstroosia tai hepariinia. Analyysimenetelmänä tässä tutkimuksessa oli ydinmagneettinen resonanssispektrometria. Tämän tutkimuksen mukaan lähimpänä seerumiputken tuloksia olivat hepariiniputken tulokset. (Sotelo-Orozco ym. 2021.)

Hepariininäytteiden kohdalla vain kolme aineenvaihduntatuotetta erosi merkittävästi seeruminäytteistä ja EDTA-plasmasta viidellä aineenvaihduntatuotteella nähtiin merkittävä ero. Fluoridiputkilla eroja nähtiin yhdellätoista aineenvaihduntatuotteella viidestäkymmenestä. Suurin osa näistä aineenvaihduntatuotteiden eroista johtui seerumin korkeammista aminohappotasosta verrattuna hepariiniplasmaan, EDTA-plasmaan ja fluoridiplasmaan. Suurimmat erot nähtiin sitraattiplasman sekä happo-sitraatti-dekstroosi-

plasman tuloksissa seerumiin verrattuna. Nämä erot johtuivat suurimmalta osalta anti-koagulanttien itsensä aiheuttamista piikeistä resonanssispektrometriassa. (Sotelo-Orozco ym. 2021.)

Kaiken kaikkiaan tässä tutkimuksessa havaittiin, että hepariiniplasman, ja sen jälkeen EDTA- ja fluoriplasman, analyysillä oli samanlaiset aineenvaihduntatuotteiden profiilit seerumin kanssa. Erityisesti hepariiniplasmalla oli lähes identtinen metabolinen sormenjälki seerumin kanssa. Myös aiemmin tehdyt tutkimukset tukevat tätä tulosta. Tutkimuksen tehneet tutkijat suosittelevat jatkossakin aineenvaihduntatuotteiden tutkimuksiin seeruminäytettä, koska näin voidaan välttää esimerkiksi aminohappotasojen erot. Jos seeruminäytettä ei ole saatavilla, tutkimus osoittaa, että sekä hepariiniplasma, että EDTA-plasma vastaavat tarkasti seerumista saatuja tuloksia. (Sotelo-Orozco ym. 2021.)

4 Seerumin amyloidi A (SAA)

Seerumin amyloidi A (SAA) proteiinit ovat 104–112 aminohappotähteen pienimolekyyli-painoisten proteiinien ryhmä, joka on kuvattu ensimmäisen kerran melkein 50 vuotta sitten. Ihmisen genomissa on neljä SAA geeniä, joista kaksi geeniä tuottavat SAA1 ja SAA2 proteiineja. SAA1 ja SAA2 ovat akuutin faasin proteiineja. (Shridas & Patrick & Tannock 2021.) Akuutin faasin proteiinit ovat maksan tuottamia proteiineja, joita virtaa plasmasta kudokseen tulehduksen aikana (Hänninen 2011). Seerumin amyloidi A on pieni hydrofobinen proteiini, jota esiintyy plasmassa kietoutuneena plasman high-density lipoproteiinin kanssa ja sen molekyylipaino on 9–14 kDa. (Waugh & Haining & Harvie & Ridyard & Eckersall 2022.) SAA:n synteesi tapahtuu pääasiassa maksassa, kuten muillakin akuutin faasin proteiineilla, mutta myös muut kudokset kykenevät syntetisoimaan sitä tarvittaessa. Muita syntetisointiin pystyviä solutyyppejä ovat muun muassa rasvasolut, lihassolut sekä suolistosolut. (Shridas & Patrick & Tannock 2021.)

4.1 Kliininen merkitys

SAA on herkkä biomarkkeri, jonka pitoisuus nousee tulehduksen ja kudonvaurion aikaisessa vaiheessa (SAA VET test kit 2022). On osoitettu, että kolme merkityksellisintä akuutin faasin proteiinia kissalla ovat seerumin amyloidi A (SAA), alfa-1-glykoproteiini (AGP) ja haptoglobiini (Hp). Seerumin amyloidi A on näistä tärkein. Kissoilla kohon-

neita seerumin amyloidi A:n pitoisuuksia on raportoitu muun muassa diabeteksen, tarttuvan vatsakalvontulehduksen, leikkausten, infektioautien, munuaisten vajaatoiminnan ja virtsateiden sairauksien yhteydessä (Paltrinieri 2007).

Viimeisten vuosikymmenten aikana on tehty paljon tutkimuksia seerumin amyloidi A:han liittyen. Sen tiedetään olevan yhteydessä muun muassa sydän- ja verisuonitautihin, kuten ateroskleroosiin. SAA ei ole vain merkki taudista, vaan sen on todettu olevan aktiivisesti mukana näiden tautien patogeneesissä. Vielä ei kuitenkaan täysin ymmärretä sen osallistumismekanismeja. (Shridas & Patrick & Tannock 2021.)

Kohonneet SAA-tasot on yhdistetty toistuvasti sepelvaltimotapahtumiin sekä aivohalvaukseen. Sydän- ja verisuonitautien lisäksi seerumin amyloidi A liittyy myös raskausajan diabetekseen. On tutkittu, että raskausajan diabeteksestä kärsivillä naisilla sekä hemoglobiini HbA1c, että SAA1 pitoisuudet ovat koholla. Hemoglobiini HbA1c on arvo, joka kertoo veren glukoosipitoisuudesta. Näiden lisäksi seerumin amyloidi A:n oletetaan liittyvän istukan toimintahäiriöihin siten, että sekä SAA1:n että proteiinien väärinlaskostumisesta kertovien raskausvyöhykkeen proteiinien (PZP) tasot korreloivat aikaisen vaiheen raskausmyrkytyksen eli pre-eklampsian kanssa. Pre-eklampsia ja istukan toimintahäiriö aiheuttaa naisilla riskin sairastua tulevaisuudessa sydän- ja verisuonitautihin, mutta sen syntymekanismia ei vielä tiedetä. On toiveita, että tulevaisuudessa voidaan löytää yhteys näiden raskauskomplikaatioiden ja äidin sydän- ja verisuonitautihin sairastumisen lisääntyneen riskin välillä SAA1 ja PZP tasojen avulla. Tämä tutkimus on kuitenkin uusi ja se vaatii tutkijoiden mukaan vielä lisätutkimuksia. (Fosheim ym. 2023.)

4.2 Seerumin amyloidi A:n (SAA) määrittäminen

Espoon eläinsairaalassa kissan seerumin amyloidi A:n (SAA) määrittäminen tehdään Eurolyser SAA VET -testillä ja määrittämiseen käytetään Eurolyser Cube Vet-analysaattoria. Laitetoimittajan julkaiseman parametritaulukon mukaan, kissan seerumin amyloidi A voidaan määrittää ainoastaan seerumista (Eurolyser Cube-Vet parametritaulukko 2022). Toisaalta valmistajan julkaisemassa käyttöohjeessa kerrotaan, että määrittäminen voidaan tehdä joko litiumhepariiniplasmasta tai seerumista (SAA VET test kit 2022). Eurolyser SAA VET -testi on validoitu vain seeruminäytteelle, joten plasmasta analysoituja tuloksia ei voida vastata luotettavasti (Paananen 2022).

Vuonna 2021 julkaistussa validointitutkimuksessa todetaan, että Eurolyser SAA VET-testillä voidaan luotettavasti määrittää kissan seerumin amyloidi A-pitoisuus seeruminäytteestä. Tutkimuksessa todetaan myös, että Eurolyser SAA VET- testillä on suurta epätarkkuutta matalilla ja kohtalaisilla SAA-pitoisuuksilla. (Escribano ym. 2021). Howardin ja Graubnerin julkaisemassa tutkimuksessa verrattiin seerumin amyloidi A-pitoisuuksia plasma- ja seeruminäytteissä. Tutkimus tehtiin hevosilla, ja siinä käytettiin eri valmistajan testiä, mutta se perustui samaan lateksiagglutinaation immunoturbidimetrisen määrittämiseen, kuten Eurolyserin testi. Tämän tutkimuksen mukaan, hevosten seerumin amyloidi A voidaan määrittää joko litiumhepariiniplasmasta tai seerumista. (Howard & Graubner 2013.)

Vastaavia kissan plasman ja seerumin vertailututkimuksia ei juurikaan ole tehty, ainakaan sellaisia julkaisuja ei löydetty tätä opinnäytetyötä tehtäessä. Eikenen SAA-VET validointitutkimuksessa verrattiin kahta eri analyysimenetelmää toisiinsa, mutta tutkimuksessa ei vertailtu seerumi- tai plasmatuloksia keskenään. Analyysimenetelmien vertailuun käytettiin kuitenkin sekä seerumi- että plasmanäytteitä, ja niiden oletettiin antavan samat tulokset. Oletus perustui aiheesta tehtyyn tutkimukseen, joka esiteltiin American College of Veterinary Pathologistsin järjestämässä kokouksessa syksyllä 2021. (Waugh ym. 2022.) Kyseinen tutkimus ei ollut yleisesti saatavilla, eikä sitä pystytty hyödyntämään tässä opinnäytetyössä. Eikenen SAA-VET-testin validoinnissa referenssinä käytetty LZ-SAA on myös validoitu vain seeruminäytteelle. (Hansen & Schaap & Kjellaard-Hansen 2006).

5 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla, eroaako plasmasta määritetyn kissan seerumin amyloidi A:n pitoisuus seerumista mitatusta pitoisuudesta. Lisäksi pyrittiin selvittämään, onko mahdollinen ero tilastollisesti merkittävä. Opinnäytetyöllä haettiin vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Eroaako plasmasta mitattu SAA seerumista mitatusta tuloksesta?
- Jos tulokset eroavat, niin kuinka paljon ne eroavat toisistaan?
- Onko ero tilastollisesti merkittävä?

Opinnäytetyön tavoitteena oli kerätä luotettavia tutkimustuloksia, joiden perusteella voidaan vastata tutkimuskysymyksiin. Tutkimustulosten perusteella voidaan päättää,

mistä näytemuodosta kissan seerumin amyloidi A voidaan jatkossa määrittää. Jos tutkimuksella pystytään osoittamaan, että kissan seerumin amyloidi A voidaan määrittää plasmasta, Espoon eläinsairaalassa voidaan jatkossa saada kissan seerumin amyloidi A:n tulokset nopeammin.

Tavoitteena oli myös lisätä laatua ja luotettavuutta luomalla Espoon eläinsairaalaan yhtenäiset toimintatavat kissan seerumin amyloidi A:n määrittämiseen, sekä tuottaa lisää uutta laadukasta ja tutkittua tietoa kyseisestä määrittämisestä. Näiden lisäksi pyrkimyksenä oli lisätä tietoisuutta eri näytemuotojen vaikutuksesta tulokseen vertailemalla tutkimustuloksia eri näytemuodoista.

6 Opinnäytetyön toteuttaminen ja menetelmät

Opinnäytetyö toteutettiin syksyn 2022 ja kevään 2023 välisenä aikana. Toteutukseen sisältyi suunnitteluvaihe, jonka aikana luotiin opinnäytetyösuunnitelma. Suunnitelman hyväksymisen jälkeen aloitettiin näytteiden kerääminen tutkimukseen. Näytteet opinnäytetyön tutkimukseen kerättiin Espoon eläinsairaalassa 21.12.2022-20.3.2023.

Tämä opinnäytetyö toteutettiin määrällisenä tutkimuksena, sillä tutkimuksessa etsittiin vastausta siihen, kuinka paljon tulokset eri näytemuotojen välillä mahdollisesti eroavat. Määrällinen tutkimus etsii vastauksia sellaisiin kysymyksiin kuten kuinka paljon ja miten usein. Määrällistä tutkimusta kutsutaan myös nimellä kvantitatiivinen tutkimus ja tulokset esitetään usein numeerisessa muodossa. Määrällisen tutkimuksen avulla pyritään selittämään asioiden välistä suhdetta ja erojen merkitystä. (Vilkkä 2007: 14–18.) Tästä tutkimuksesta saatava tieto on tarkkaa numeraalista faktaa, jota verrataan tilastollisin keinoin. Määrällisesti aineistoa pyrittiin keräämään runsaasti, jotta voitaisiin varmistaa tulosten luotettavuus.

6.1 Tiedonhaku

Tiedonhakuun käytettiin useita erilaisia tieteellisiä tietokantoja. Suurin osa teoriatiedosta oli englanninkielistä ja tämän vuoksi käytetyt hakusanat olivat pääosin englanniksi. Hakusanoina käytettiin muun muassa seuraavanlaisia yhdistelmiä: ”comparison of serum and plasma”, ”differences between serum and plasma”, ”stress of cats”, ”serum amyloid A” ja ”serum amyloid A and feline”. Teoriatietoa haettiin muun muassa Pubmed ja ScienceDirect tietokannoista ja tietoa haettiin vain artikkeleista, joihin oli vapaa pääsy koko artikkeliin. Artikkelin tuli olla myös tyypiltään joko katsausartikkeli tai

tutkimusartikkeli. Lisäksi tiedonhaussa hyödynnettiin oppikirjoja, sekä muun muassa Eurolyser Diagnostican julkaisemaa materiaalia. Tähän opinnäytetyöhön ja tutkimukseen haluttiin käyttää mahdollisimman paljon tuoretta tutkimustietoa, mutta välillä jouduttiin hyödyntämään myös vanhempaa materiaalia.

6.2 Aineisto ja aineiston analysointi

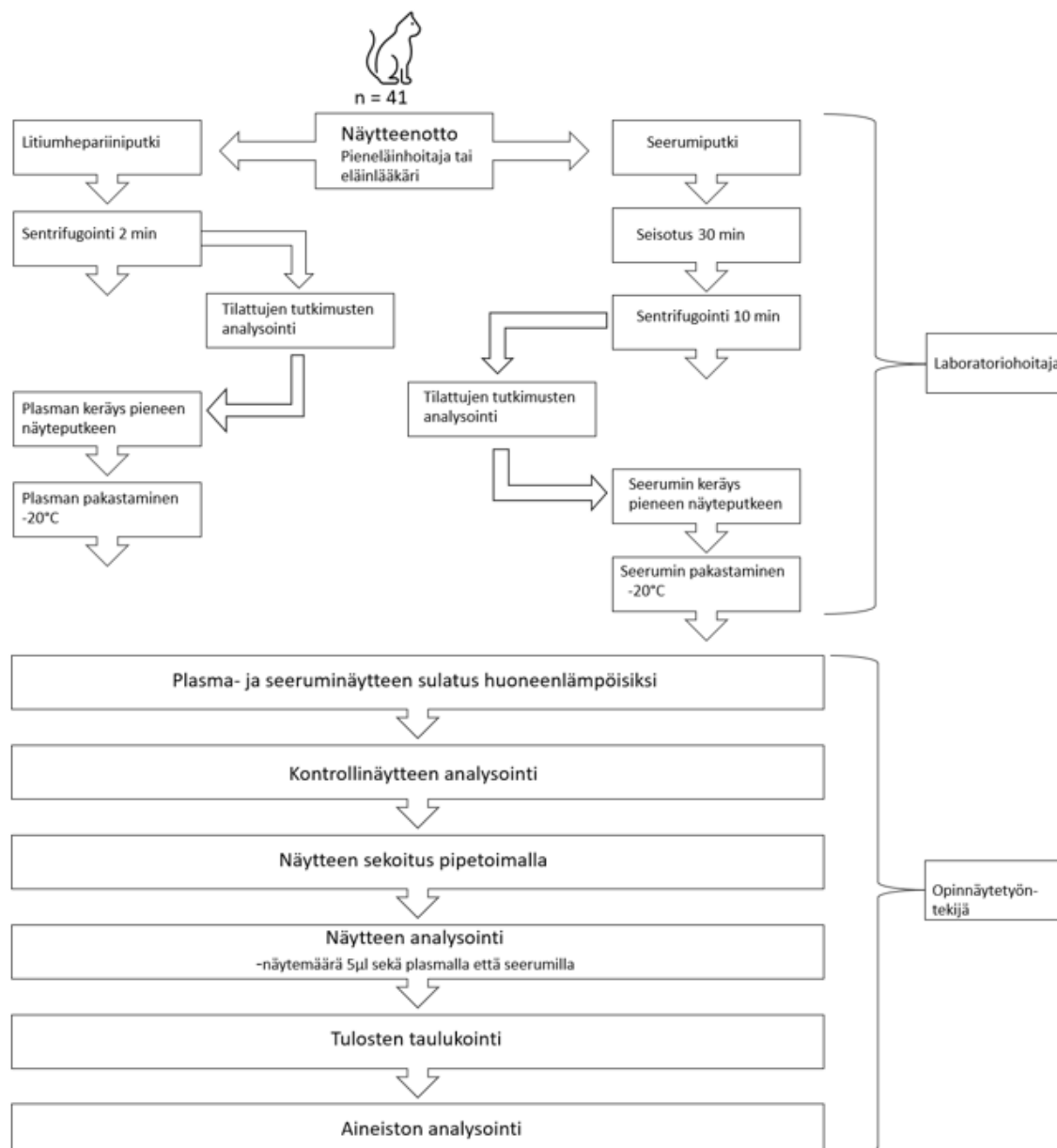
Opinnäytetyötä varten kerättiin ylijääneitä verinäytteitä, joita oli otettu Espoon eläinsairaalaan tutkimuksiin tulleilta kissoilta. Opinnäytetyöhön käytettiin vain eläinlääkärin määräyksestä diagnostiikkiin tarkoituksiin otettuja verinäytteitä. Tutkimuksessa hyödynnettiin myös muista kuin SAA-tutkimuksista ylijääneitä verinäytteitä. Seerumin amyloidi A:ta ei välttämättä aina analysoida kissan verinäytteestä, joten tähän tutkimukseen kerättiin myös muihin tutkimuksiin otetut verinäytteet. Ylijääneet verinäytteet kerättiin talteen, jos kissalta oli otettu sekä seerumi- että plasmanäyte. Näin verinäytteitä saatiin kerättyä mahdollisimman paljon opinnäytetyön tutkimukseen. Opinnäytetyön tutkimusta varten ei kerätty mitään taustatietoja kissoista tai niiden omistajista. Verinäytteiden ottamisen toteuttivat eläinsairaalassa työskentelevät eläintenhoitajat sekä eläinlääkärit. Kissoilta otettiin verta samalla kertaa litiumhepariini- ja seerumiputkiin. Tutkimusta varten saatiin kerättyä 41 kissan ylijääneet verinäytteet. Näytteet kerättiin ja analysoitiin 3 kuukauden aikana ja loppuun jätettiin aikaa aineiston analysointia varten.

Kun verinäytteet saapuivat laboratorioon, ne käsiteltiin ohjeen mukaisesti. Litiumhepariininäyte sentrifugoitiin eli lingottiin heti näytteenoton jälkeen. Seeruminäytteen annettiin hyytyä huoneenlämmössä 30 minuuttia ennen sentrifugointia. Käsitteilyn jälkeen verinäytteistä suoritettiin kaikki niistä tilatut laboratoriotutkimukset. Kun verinäytteistä oli saatu kaikki halutut tutkimustulokset, eikä niitä enää tarvinnut säilyttää, otettiin ylijäänyt plasma ja seerumi talteen opinnäytetyön tutkimusta varten. Kerätty plasma tai seerumi siirrettiin pieneen näyteputkeen. Putkeen merkittiin juokseva näyttenumero sekä kirjain A tai B. Näiden avulla erotettiin, onko kyseessä seerumi- (A) vai plasmanäyte (B). Näyteputkiin merkittiin myös näytteenottopäivänmäärä. Tämän jälkeen plasma- ja seeruminäytteet sisältäneet putket pakastettiin. Plasma- ja seeruminäytteet säilyvät tutkimuskelpoisina -20°C:ssa kaksi viikkoa SAA-määrittystä varten (SAA VET test kit 2022).

Opinnäytetyön tutkimuksessa seerumin amyloidi A määritettiin litiumhepariiniplasmasta sekä seerumista. Näytteet analysoitiin Espoon eläinsairaalan Eurolyser Cube Vet -analyysaattorilla. Pakastettujen seerumien sekä plasmojen annettiin sulaa huoneenlämpöiseksi ja ne sekoitettiin pipetoimalla plasmaa edestakaisin ennen näytteen pipetoimista,

jotta näyte olisi mahdollisimman tasalaatuinen. Testin tekemiseen tarvittiin 5µl plasmaa tai seerumia.

Tähän opinnäytetyöhön tehdyt SAA-analyysit toteutettiin kahdella eri analysaattorilla, joten laitteiden välisestä erosta syntyvä vaihtelu on mahdollista. Analysoinnin toteutti yksi operaattori ja näin vältettiin pipetointitekniikasta syntyvät erot. Ennen jokaista tutkimusnäytteen analysointikertaa, laitteella suoritettiin kontrollinäytteen analysointi laadunvarmistukseksi. Näytteistä saadut tulokset kerättiin taulukkoon. Taulukkoon merkittiin näytteen juokseva numero, analysointipäivämäärä ja saadut tulokset sekä seerumille, että plasmalle. Myös kontrollinäytteen tulokset merkittiin samaan taulukkoon. Taulukkoon ei kerätty mitään muita tietoja, joten tutkimustuloksia ei voida yhdistää tiettyyn eläimeen tai yksilöön. Tutkimusasetelma on kuvattu myös alla olevassa kaaviossa (Kuvio 1).



Kuvio 1. Tutkimusasetelma.

6.3 Mittaus- ja määritysmenetelmä

Eurolyser SAA VET -testissä määritysmenetelmänä on lateksiagglutinaatio. Lateksiagglutinaatiotesti perustuu SAA-vasta-aineilla herkistettyjen lateksihukkasten agglutinaation aiheuttaman sameuden muutoksen optiseen mittaukseen. SAA VET-testissä kanin polyklonaalisilla vasta-aineilla sekä hiiren monoklonaalisilla vasta-aineilla herkistetyt lateksihukkaset reagoivat näytteessä olevan kissan SAA-antigeenin kanssa saaden aikaan saostuman. Analysaattori havaitsee ja mittaa tämän sameuden muutoksen. Eurolyser Cube Vet-analysaattorissa mittausmenetelmänä on fotometrinen päätepistemittaus ja se mittaa valonsäteiden absorptiota aallonpituudella 546 nm, silloin kun määritetään

SAA pitoisuutta. Analyysaattorilla voidaan analysoida myös muita testejä, jolloin se voi käyttää myös muita aallonpituuksia. Mitattu absorptio muutetaan matemaattisten kaavioiden avulla testitulokseksi, jonka laite ilmoittaa pitoisuutena $\mu\text{l/ml}$. Mittausalue SAA VET-testissä on kissoille 10–150 $\mu\text{g/ml}$. Analyysiä suoritettaessa, 5 μl näytettä pipetoidaan puskuriliuosta sisältävään näytekyvetiin ja näytekyveti suljetaan reagenssikorkilla. Analyysaattori sekoittaa automaattisesti näytteen sekä reagenssin, joka on testipaketin mukana tulevassa korkissa. (SAA VET test kit 2022; Cube-Vet user manual 2019.)

6.4 Tulosten analysointi

Tutkimuksesta saatu aineisto kerättiin taulukkoon ja aineiston tilastolliseen analysointiin käytettiin IBM SPSS-ohjelmiston versiota 27 sekä Excel laskentataulukko-ohjelmistoa. Aineistoa varten saatiin mittaustulokset 41 näytteestä, joista kaikista analysoitiin sekä seerumi- että plasmanäyte.

Otoskokoon vaikuttavat useat tekijät. Pääsääntöisesti voidaan ajatella, että sen tarkempi tutkimus, mitä enemmän otoksia. Vastaavasti pienellä otosmäärällä tutkimuksen luotettavuus laskee. Kokonaisotantaa käytetään otantamenetelmänä yleisesti silloin, kun perusjoukko on pieni, esimerkiksi alle sata havaintoyksikköä. Kokonaisotannassa tutkimukseen otetaan koko perusjoukko. (Vilka 2007: 51–57.) Tässä tutkimuksessa pienen näytemäärän vuoksi käytettiin kokonaisotantaa. Perusjoukkona tässä tutkimuksessa päätettiin käyttää niitä näytteitä, jotka olivat saaneet mittaustuloksen yli $>10,0$ $\mu\text{g/ml}$, sillä mittausalueen alle jääneet tulokset eivät ole luotettavia. Lisäksi ne eivät ole saaneet tarkkaa numeraalista arvoa, jonka jatkoanalysointia voitaisiin suorittaa tilastollisten menetelmien avulla.

Tulosten jatkoanalysointi suoritettiin näytteillä, jotka olivat saaneet mittauksessa arvon 10,0–150 $\mu\text{g/ml}$ ($n=12$). Sekä seerumi- että plasmatuloksille laskettiin keskiarvot, keskihajonta ja jokaisen seerumi- ja plasmanäytteen keskinäinen ero. Näytteille laskettiin Pearsonin korrelaatiokerroin ja tehtiin regressioanalyysi. Lisäksi suoritettiin aineiston normaalijakaumatesti, määritettiin luottamusväli sekä testattiin hypoteesi parittaisten otosten T-testin avulla.

Keskihajonnan avulla voidaan kertoa, kuinka paljon havaintojen arvot poikkeavat keskiarvosta. Keskihajontaa tarvitaan, kun määritetään aineiston normaalijakaumaa. Normaalijakauma lasketaan keskiarvon ja keskihajonnan avulla. Se kuvaa sitä, kuinka aineisto jakautuu keskiarvon ympärille. Keskiarvon avulla määritetään käyrän korkeus ja

keskihajonta puolestaan määrittää käyrän leveyden. Kun 95 % aineistosta jää korkeintaan kahden keskihajonnan päähän keskiarvosta ja 68 % yhden keskihajonnan päähän, puhutaan normaalisti jakautuneesta aineistosta. Koska useat tilastotieteen menetelmät toimivat vain normaalijakautuneessa aineistossa, on normaalijakauma testattava ennen muita tilastollisia analyysejä. (Heikkilä 2014: 86, 99–104.) Normaalijakauma testataan Shapiro-Wilk-testillä. Sitä käytetään silloin kun otoskoko on 50 tai sen alle. (Tähinen & Laakkonen & Broberg 2020: 98.) Luottamusväli ilmaisee sen, mille välille keskiarvosta mitattuna aineisto sijoittuu. Yleisimmin käytetään joko 95 % tai 99 % luottamusväliä. Se kertoo, että 95 % tai 99 % varmuudella aineisto sijoittuu annettuun luottamusväliin. (Heikkilä 2014: 104–105.) Tässä opinnäytetyössä käytettiin 95 % luottamusväliä.

Mitatuista seerumin amyloidi A:n pitoisuuksista tarkastellaan plasma- ja seerumitulosten välistä riippuvuutta. Siihen käytetään Pearsonin korrelaatiokerrointa, joka kertoo kahden muuttujan välisen lineaarisen riippuvuuden suuruuden. Korrelaatiokertoimen etumerkki kertoo muuttujien välisen riippuvuuden suunnan. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on arvoa 1, sitä lineaarisempaa suhde muuttujien välillä on. (Heikkilä 2014: 192–193).

Hypoteesi on perusteltu väittämä, joka perustuu tutkijan ennakkokäsitykseen aiheesta. Sen pohjana voi olla esimerkiksi aiheesta aiemmin tehty tutkimus. Hypoteesia testaamalla pyritään selvittämään tutkimuskysymys, johon tutkija haluaa saada vastauksen. Hyvä hypoteesi on muodostettu lyhyesti ja ytimekkäästi ja se täytyy pystyä testaamaan mittaamalla tai havainnoimalla aineistoa. (Heikkilä 2014:180–181.)

Ryhmien välistä eroa testataan asettamalla oletuksista tilastolliset hypoteesit, jossa nollahypoteesi (H_0) väittää, ettei eroa ole, kun taas vastahypoteesin (H_1) mukaan tilastollista eroa on. Hypoteeseista vain toinen voi olla kerrallaan voimassa ja nollahypoteesin kumoamiseen tarvittavan eron tulee olla riittävän suuri, niin että eron ei voida tulkita johtuvan sattumasta. (Heikkilä 2014:182.)

Tässä opinnäytetyön tutkimuksessa hypoteesien testaamisella selvitettiin, onko seerumi- ja plasmanäytteen ero tilastollisesti merkitsevä. Hypoteesit asetettiin seuraavasti:

- H_0 = seerumista ja plasmasta mitatut tulokset eivät eroa toisistaan
- H_1 = seerumista ja plasmasta mitatut tulokset eroavat toisistaan

Hypoteesia testattiin tekemällä aineistolle parittaisen otosten T-testi, jotta nähtiin, onko mahdollinen ero tilastollisesti merkittävä. T-testin avulla voidaan tarkastella kahden muuttujan välistä yhteyttä ja eritoten kahden eri ryhmän keskiarvojen välistä yhteyttä. T-testiä voidaan myös käyttää luotettavasti pientenkin aineistojen kohdalla. P-arvo kertoo merkitsevyydestä, mitä lähempänä nollaa p-arvo on, sen sitä huonommin aineisto vastaa nollahypoteesia ja nollahypoteesi hylätään. (Tähtinen ym. 2020: 40, 132–134.) Tilastollisesti merkittävän tuloksen raja-arvona käytetään tässä opinnäytetyössä arvoa $p < 0,05$.

6.5 Opinnäytetyön tulokset

Opinnäytetyön tulosten avulla pyrittiin selvittämään, eroaako plasmasta määritetty kissan seerumin amyloidi A:n pitoisuus seerumista mitatusta pitoisuudesta. Tämän lisäksi pyrittiin selvittämään, onko mahdollinen ero tilastollisesti merkittävä. Aikaisempaan tutkimustietoon perustuen voitiin olettaa, että seerumin ja plasman väliset erot eivät olisi merkitseviä (Sotelo-Orozco ym. 2021; Blake ym. 2022).

Näytteiden kokonaismäärä oli 41 näytettä ($n=41$). 41 näytteestä 26 näytettä sai tuloksen $<10,0 \mu\text{g/ml}$. Tämä kertoo, että kissan SAA-arvo ei ole kohonnut. Kaikki 26 näytettä saivat saman tuloksen sekä plasma- että seeruminäytteestä mitattuna.

15 näytteestä mitattiin kohonneita SAA-arvoja. Näistä yksi näyte jätettiin pois aineiston jatkoanalysoinnista, sillä se ehti vanhentua ennen näytteen analysointia. Kahden näytteen mittaustulokset menivät SAA VET-testin mitta-alueen ulkopuolelle, ja myös ne jätettiin pois jatkoanalysoinnista. Mitään näytteistä ei laimennettu. (Taulukko 2.)

Taulukko 2. Näytteet, joiden pitoisuus on mittausalueella. SAA VET- testin mittausalue on 10-150µg/ml. *) Näyte vanhentunut, ei otettu mukaan jatkoanalysointiin, **) Näytteen pitoisuus testin mittausalueen ulkopuolella, ei otettu mukaan jatkoanalyysiin.

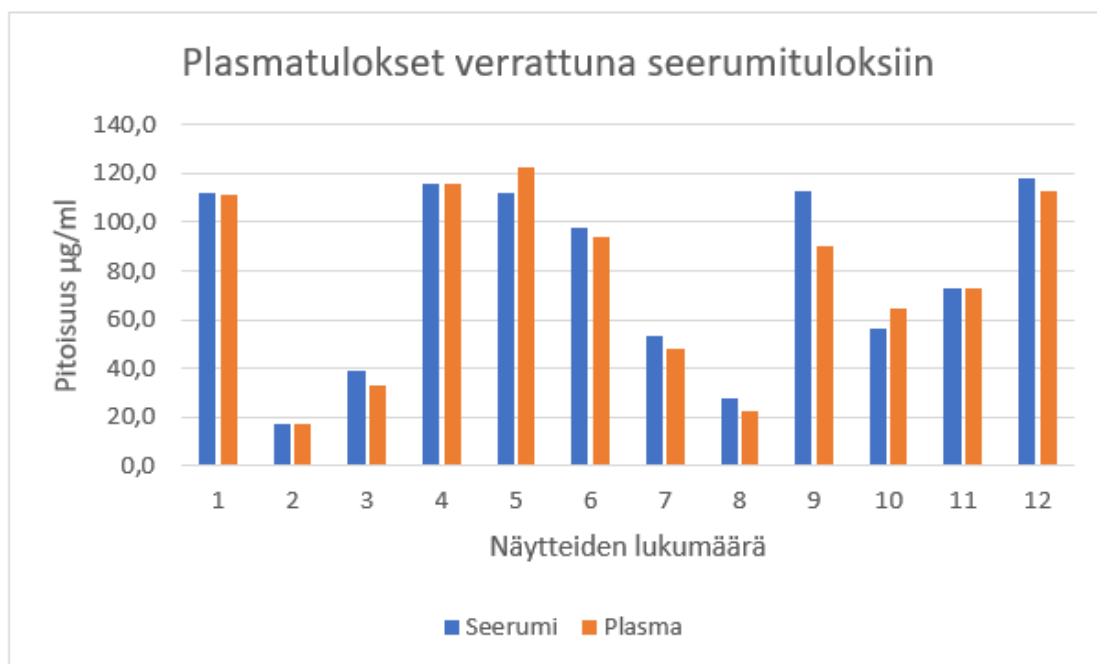
Näytteiden lukumäärä (n=15)	Näyte-numero	Seerumi (µg/ml)	Plasma (µg/ml)
1	7	111,8	111,1
2	13	17,1	17,4
3	17	38,7	32,7
4	20	115,5	116,1
5	23	112,2	122,8
6	27	98,0	93,9
7	28	53,0	48,1
8	30	27,4	22,4
9	31	112,9	90,1
10	32	56,4	64,7
11	35	72,6	73,1
12	36	118,0	112,9
*)13	37	35,1	17,0
**)14	40	224,5	205,9
**)15	41	161,8	198,8

Ensimmäinen tutkimuskysymys oli, eroaako plasmasta mitattu SAA-arvo seerumista mitatusta tuloksesta. Plasma- ja seeruminäytteistä mitatut arvot on koottu pylväsdiagrammiin, josta nähdään erot visuaalisesti (Kuvio 2). Seeruminäytteen tulokset ovat keskimäärin suurempia ($ka_s = 77,8\mu\text{g/ml}$ ja $ka_p = 75,4\mu\text{g/ml}$). Seerumin keskihajonta

on pienempi kuin plasman keskihajonta ($sd_s = 38,0$ ja $sd_p = 38,1$). Seerumin suhteellinen keskihajonta on pienempi kuin plasmalla ($CV\%_s = 48,8\%$ ja $CV\%_p = 50,6\%$). (Taulukko 3).

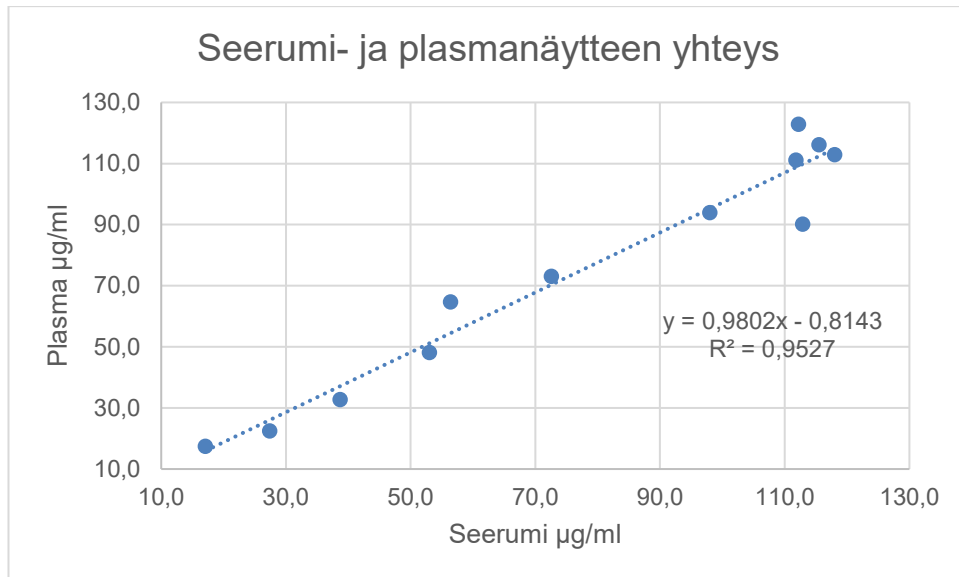
Taulukko 3. Seerumi- ja plasmanäytteille lasketut keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta sekä luottamusväli.

Näytemuoto	Keskiarvo ($\mu\text{g/ml}$)	Keskihajonta	Suhteellinen keskihajonta (CV%)	95 % luottamusväli ($\mu\text{g/ml}$)
Seerumi	77,8	38,0	48,8	53,7–101,9
Plasma	75,4	38,1	50,6	51,2–99,7



Kuvio 2. Plasmasta mitattuja arvoja verrattuna seerumista mitattuihin arvoihin.

Aineistolle laskettiin Pearsonin korrelaatiokerroin sekä tehtiin regressioanalyysi. Seerumi- ja plasmanäytteellä on voimakas positiivinen korrelaatio ($r=0,97606$) ja selitysaste on 95 % ($R^2=0,9527$).



Kuvio 3. Seerumi- ja plasmanäytteiden yhteys

Toinen tutkimuskysymys oli, kuinka paljon tulokset eroavat toisistaan. Kun laskettiin muutosprosentti seerumi- ja plasmanäytteiden keskiarvojen välille, nähtiin että plasmanäytteen ero seeruminäytteeseen verratuna on -3 %, kun n=12 (Taulukko 4).

Taulukko 4. Mittausalueella olleista arvoista lasketut keskiarvo, erotus sekä muutosprosentti n=12.

Näytteiden lukumäärä (n=12)	Näyte-numero	Seerumi (µg/ml)	Plasma (µg/ml)	Ero	Ero%
1	7	111,8	111,1	-0,7	-1 %
2	13	17,1	17,4	0,3	2 %
3	17	38,7	32,7	-6,0	-16 %
4	20	115,5	116,1	0,6	1 %
5	23	112,2	122,8	10,6	9 %
6	27	98,0	93,9	-4,1	-4 %
7	28	53,0	48,1	-4,9	-9 %
8	30	27,4	22,4	-5,0	-18 %
9	31	112,9	90,1	-22,8	-20 %
10	32	56,4	64,7	8,3	15 %
11	35	72,6	73,1	0,5	1 %
12	36	118,0	112,9	-5,1	-4 %
Ka		77,8	75,4	2,4	-3 %

Seuraavaksi kohonneista SAA-arvoista testattiin aineiston normaalijakauma Shapiro-Wilk -testillä. Seerumin p-arvo oli 0,058 (n=12) ja plasman p-arvo 0,235 (n=12). Seerumin ja plasman erojen p-arvo oli 0,074. Näistä voitiin päätellä, että aineisto on normaalisti jakautunutta. (Taulukko 5.)

Taulukko 5. Aineiston normaalijakauma Shapiro-Wilk –testillä testattuna (n=12). Kaikki aineisto on normaalijakautunutta, $p>0,05$.

Näytemuoto	Näytteiden lukumäärä (n)	p-arvo
Seerumi	12	0,058
Plasma	12	0,235
Seerumin ja plasman ero	12	0,074

Kolmas ja viimeinen tutkimuskysymys oli, onko ero tilastollisesti merkittävä. Tämän selvittämiseksi aineistolle tehtiin parittaisten otosten T-testi. Hypoteesi asetettiin aiempien tutkimustulosten, sekä SAA VET-testin valmistajan käyttöohjeen perusteella.

T-testin mukaan (Liite1), plasmanäytteiden keskiarvo 75,4 $\mu\text{g/ml}$ (keskihajonta=38,1 ja n=12) oli pienempi kuin seeruminäytteiden keskiarvo 77,8 $\mu\text{g/ml}$ (keskihajonta=38,0 ja n=12). Parittaisten otosten T-testi osoitti, että ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä $t(11) = 0,981$, $p>0,05$ ($p=0,348$).

7 Pohdinta

Työn tarkoituksena oli selvittää, voidaanko kissan seerumin amyloidi A määrittää seerumin sijaan plasmasta. Tätä tarkoitusta varten analysoitiin 41 kissan seerumi- ja plasmanäytteet ja niistä saatua aineistoa vertailtiin tilastollisten menetelmien avulla. Saatuja tuloksia verrattiin aiheeseen liittyvään aiempaan tutkimustietoon.

7.1 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Tuloksista voidaan todeta, että seeruminäytteillä saadaan hieman korkeampia tuloksia eikä niissä ole yhtä suurta hajontaa kuin plasmatuloksilla. Aineiston analysoinnin pe-

rusteella plasmatulosten keskiarvo eroaa -3 % seerumituloksista. T-testi osoitti, että tulosten erolla ei ole tilastollista merkitystä, joten siltä osin plasmanäytettä voitaisiin käyttää seeruminäytteen sijaan. Kun mittaus tulos jää alle 10,0 µg/ml, ovat tulokset seerumi- ja plasmanäytteillä toisiaan vastaavat. Kuten Blake ym. (2022) tutkimuksessaan toteavat, seerumi- ja plasmatulosten välillä on samankaltaisuutta, mutta eroa on kuitenkin sen verran, että samoja viitearvoja ei voida käyttää. Seerumi- ja plasmatuloksia ei siis voida suoraan verrata keskenään, mutta ne antavat samansuuntaisia tuloksia, joten kissan seerumin amyloidi A:n määrittäminen plasmasta lienee mahdollista.

Tässä opinnäytetyön tutkimuksessa saatuja tuloksia tukee myös tutkimus, jossa verrattiin aineenvaihduntatuotteiden profiileja seeruminäytteen ja plasmanäytteen välillä. Tutkimuksen mukaan nimenomaan hepariiniplasman tulokset vastaavat lähimmäksi seeruminäytteen tuloksia. Tutkijoiden mukaan hepariiniplasmaa voidaan käyttää aineenvaihduntaprofiilin tutkimiseen, jos seeruminäytettä ei ole saatavilla. (Sotelo-Orozco ym. 2021.)

Näyttäisi siis siltä, että tämän tutkimuksen tulokset viittaisivat samankaltaisiin tuloksiin kuin aiemmat tutkimukset. Näiden tulosten perusteella plasmatulokset eroavat hieman seerumituloksista, mutta tilastollisesti merkittävää eroa ei ole. Näin ollen, voidaan ajatella, että ainakin osassa näytteenotossa voidaan jatkossa jättää seeruminäyte ottamatta. Tulevaisuudessa tulokset voisivat myös mahdollisesti valmistua nopeammin ja näin kissan viettämä aika eläinlääkäriasemalla lyhenisi. Näin voitaisiin vähentää jatkossa myös kissan kokemaa stressiä. (Stoneburner ym. 2020: 34.) Koska ammattitaitoni ei riitä kertomaan, onko tämä näytemuotojen välinen ero mahdollisesti kliinisesti merkittävä, jätän päätöksen tekemisen eläinsairaalan eläinlääkärien tehtäväksi.

7.2 Opinnäytetyön luotettavuus

Tuloksia tarkasteltaessa pitää ottaa huomioon näytteiden vähäinen määrä tässä opinnäytetyön tutkimuksessa. Varsinkin niitä näytteitä, joista saatiin mitattua kohonneita SAA-arvoja, oli todella vähän. Lisäksi näissä näytteissä seerumin amyloidi A pitoisuus vaihteli paljon. Tarkempaa ja luotettavampaa johtopäätöstä varten, tulisi näytteitä analysoida huomattavasti suurempi määrä. Olisi myös hyvä saada näytteitä kerättyä niin paljon, että ne voitaisiin jakaa pitoisuuden mukaan ainakin mataliin ja korkeisiin pitoisuuksiin. Näin voitaisiin tutkia myös sitä, miten näytteen pitoisuus mahdollisesti vaikuttaa seerumi- ja plasmatulosten eroihin.

Noudattamalla hyvää tieteellistä käytäntöä, lisätään tutkimuksen luotettavuutta. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu muun muassa huolellinen ja tarkka sekä rehellinen työskentely ilman tulosten vääristelyä. Tiedonhankintatapojen tulee olla eettisesti kestäviä ja tutkimukseen liittyvät eettiset kysymykset tulee pitää mielessä koko tutkimuksen ajan. Tarvittaessa niihin tulee hakea konsultointiapua asiantuntijoilta. Määrällisessä tutkimuksessa hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu myös kaiken kivun ja haitan minimointi, jota aiheutuu aineiston keräämisen yhteydessä. Tulosten raportoinnissa tulee noudattaa avoimuutta ja tulokset tulee raportoida tieteellisen tutkimuksen vaatimusten mukaan. (Vilkkä 2007: 90–91.)

Omalta osaltani olen noudattanut hyvää tieteellistä käytäntöä, tehnyt työni huolella ja raportoinut tulokset rehellisesti. Olen pyrkinyt etsimään luotettavia lähteitä, jotka tarjoaisivat tuoreen tutkitun ja luotettavan tiedon. Olen pyrkinyt hyödyntämään tutkimuksessa ajantasaista tietoa plasman ja seerumin vertailuun liittyen. Aineiston keruu ei ole aiheuttanut ylimääräistä kipua tai haittaa tutkittaville kissoille.

Näytemäärä tässä analyysissä on 5 μ l. Se on varsin pieni määrä pipetoitavaksi ja jäinkin miettimään tulosten luotettavuutta tältä kannalta. Käsitykseni mukaan käytössä olleita pipettejä ei huolleta säännöllisesti, eikä nykyisillä työntekijöillä ollut tietoa koska ne olisi kalibroitu ja huollettu viimeksi. Laittevalmistajalta saadun tiedon mukaan, yhden tietyn tilavuuden pipetoimiseen kykenevät pipetit olisi hyvä vaihtaa vuoden välein uusiin pipetteihin. Minulla ei ole tietoa, toimitaanko laboratoriossa näin. Jäin pohtimaan tämän vaikutusta tutkimuksen tuloksiin ja sitä kuinka paljon vaihtelua tuloksiin tulee, jos pipetoitu näytemäärä ei ole tarkka.

Näytteet olivat alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaan tarkoitus analysoida käyttämällä yhtä analysaattoria, jotta laitteiden välinen vaihtelu olisi voitu välttää. Valitettavasti juuri viimeisenä näytteenkeräyspäivänä analysaattoriin tuli vika, ja se jouduttiin toimittamaan huoltoon. Tilalle saatiin korvaava analysaattori, mutta sen saapumista odotellessa yksi näytteistä ehti vanhentua muutamalla päivällä. Koska näytteitä saatiin kerättyä aiottua vähemmän, päätettiin tämäkin näyte silti analysoida. Seerumi- ja plasmatuloksen välillä oli kuitenkin niin suuri ero verrattuna muihin mittaustuloksiin, että näyte päätettiin jättää pois aineiston analysoinnista.

Satunnaisen ja systemaattisen virheen mahdollisuutta mittaustuloksissa ei voida pois sulkea, sillä mittaukset jokaisesta näytteestä suoritettiin vain kerran. Tämä vaikuttaa opinnäytetyön tutkimuksen reliabiliteettiin eli luotettavuuteen (Heikkilä 2014: 28). Luotettavuuden lisäämiseksi mittaukset tulisi suorittaa useamman kerran samasta näytteestä.

Näytteiden pipetoinnin suoritti yksi henkilö, joten pipetointitekniikasta tuleva vaihtelu voitiin minimoida tässä opinnäytetyön tutkimuksessa. Näytteiden käsittelyn suorittivat koulutetut bioanalyytikot, joilla oli riittävä tieto muun muassa seerumin hyytymisaikaan liittyvistä tekijöistä. Näin ollen, kaikki tutkimuksessa käytetyt näytteet on käsitelty oikeaoppisesti ja sovitulla tavalla. Näytteiden käsittelystä vastasi kaksi henkilöä ja seerumin hyytymiseen käytetty aika mitattiin ajastimella. Nämä seikat lisäävät opinnäytetyön tutkimuksen reliabiliteettia.

Mittaamalla ja vertaamalla seerumi- ja plasmatuloksia saatiin vastaus haluttuihin tutkimuskysymyksiin, joten tutkimusta voidaan siltä osin pitää validina. Validiteetti kuvaa tutkimuksen pätevyyttä, eli kykyä mitata haluttua asiaa (Heikkilä 2014: 27). Opinnäytetyön tutkimusraportissa on pyritty kuvaamaan ja selittämään tarkasti, miten aineisto valittiin ja millä kriteereillä osa saaduista tuloksista jätettiin pois tulosanalyysistä. Tämä lisää tutkimuksen validiteettia.

Tälle työlle on tehty myös Turnitin plagiointitarkastus ja näin voidaan osoittaa luotettavasti, että työ on omaa tuotostani. Plagiointitarkistuksen tulokseksi saatiin 12 % samankaltaisuus.

7.3 Opinnäytetyön eettisyys

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa säädetään tarkasti, minkälaisia henkilötietoja voidaan kerätä ja mihin tarkoitukseen niitä voidaan käyttää. Asetuksen mukaan tietoja tulee kerätä mahdollisimman vähän ja kerättyjä tietoja tulee säilyttää ainoastaan sen aikaa, kuin on tarpeellista. (Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EU) 2016/679 artikla 5.) Tähän opinnäytetyöhön kerätty tutkimusaineisto anonymisoidiin niin, että tuloksia ei voida yhdistää potilastietoihin. Aineisto numeroitiin juoksevilla numeroinnilla, eikä tutkimusaineistoon kerätty nimi-, osoite-, ikä- tai rotutietoja, sillä nämä eivät olleet merkityksellisiä tämän tutkimuksen kannalta.

Laboratoriotutkimuksia voi määrätä ainoastaan eläinlääkäri ja näytteitä otetaan vain, mikäli eläinlääkäri on katsonut ne tarpeelliseksi ja määrännyt ne otettaviksi. Näin vältetään tuottamasta ylimääräistä kipua tai kärsimystä eläimelle, sillä lain mukaan tarpeettoman kivun tuottaminen eläimelle on kiellettyä (Eläinsuojelulaki 247/1996 § 3). Tutkimukseen kerättiin näytteet kissoilta, jotka joka tapauksessa olivat tulossa verinäytteenottoon. Näin voitiin välttää tarpeettoman kivun, kärsimyksen ja stressin tuottaminen tutkimuksessa mukana olleille kissoille.

Opinnäytetyön prosessissa on noudatettu hyvän tieteellisen käytännön peruseriaatteita. Sekä suunnittelu-, toteutus- että raportointivaiheessa on pyritty täyteen avoimuuteen sekä rehellisyyteen. Teoriatiedon yhteydessä on pyritty antamaan kunnia alkupe räisen tutkimuksen ja tiedon tuottajalle huolehtimalla oikeaoppisesta lähdeviittauksesta. Näin käytetty lähdemateriaali on helposti löydettävissä ja tieto tarkistettavissa. Hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti opinnäytetyössä mukana olleet yritykset on mainittu. Mitään ylimääräisiä tietoja ei ole kerätty, joten tietosuojalainsäädäntöä on noudatettu. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023.)

7.4 Jatkotutkimukset

Jotta näitä tuloksia voitaisiin pitää luotettavina ja hyödyntää laajemminkin, pitäisi tutkimusta jatkaa ja näytteitä analysoida lisää. Tämä tutkimus antaa kuitenkin hieman näyttöä siitä, että plasmanäytteistäkin voitaisiin todeta ainakin se, jos kissan seerumin amyloidit A on kohonnut.

Olisi mielenkiintoista tutkia myös, miten pakastamisen aikana syntyneet hyytymät plasmassa vaikuttavat tulokseen, vai vaikuttavatko ollenkaan. Nyt mitattiin mielenkiinnosta muutamia näytteitä tuoreena ennen pakastamista, jotta voitiin hieman alustavasti tarkastella voisiko pakastettaessa syntyneet hyytymät vaikuttaa tulokseen. Näiden muutamien mittauksen perusteella tulokset näyttivät vaihtelevan satunnaisesti. Koska mitattuja arvoja ei ole kuin muutama, näistä ei voida tehdä mitään johtopäätöksiä, vaan asia vaatisi laajempaa tutkimista.

7.5 Ammatillinen kasvu

Tämän opinnäytetyön aikana opin paljon uutta sekä syvensin jo aiemmin opittua tietoa. Opin hakemaan tehokkaammin tietoa eri tietokannoista ja tieteellisten artikkelien lukeminen helpottui ja nopeutui työn edetessä. Suuren kehitysharppauksen otin erityisesti englanninkielisten artikkeleiden kanssa, sillä aihealueet olivat usein melko haastavia.

Ammatillinen osaamiseni syveni teorian tiedon etsimisen myötä, kun palasin opintojen aikana käytyjen asioiden pariin perehtyen niihin vielä syvemmin. Opinnäytetyöprojekti oli suuri ja haastava, eritoten kun sen toteutti yksin. Uskon, että tästä projektista, ja sen aikana opituista taidoista, on minulle tulevaisuudessa paljon hyötyä myös työelämässä.

Lähteet

Blake, Amanda B. & Ishii, Patricia E. & Phillips, Robert K. & Lidbury, Jonathan A. & Steiner, Joerg M. & Suchodolski, Jan S. 2022. Analytical Validation of an Assay for Concurrent Measurement of Amino Acids in Dog Serum and Comparison of Amino Acid Concentrations between Whole Blood, Plasma, and Serum from Dogs. *Metabolites*. 12(10): 891.

Chen, Dawei 2011. Hepariniin vaikutus veren hyytymisjärjestelmän aktivaatioon lasten sydänkatetointitoimenpiteessä. Tutkielma, syventävät opinnot. Helsingin yliopisto. Lääketieteellinen tiedekunta. Kliininen laitos. Lasten ja nuorten sairaala. <<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/32869/chen%20tutkielma.pdf?sequence=3&isAllowed=y>>. Viitattu 3.4.2023.

Cube-Vet user manual 2019. EUROLyser. Eurolyser Diagnostica GmbH. 743d205a-b58d-42a2-9d80-881db508638f / DP4 / 2019-10-10. Itävalta 2019.

Eläinsairaalat palvelevat 24 h. Eläinlääkäriasemat. Evidensia. <<https://evidensia.fi/elainlaakariasema/elainsairaalat-palvelevat-24h/>>. Viitattu 1.10.2022.

Eläinsuojelulaki 247/1996. Annettu Helsingissä 4.4.1996. <<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1996/19960247>>. Viitattu 6.10.2022.

Escribano, Damián & Bustillo, Alba Ortín & Marín, Luis Pardo & Rabasco, Andrea Navarro & Herrera, Pablo Ruiz & Cerón, Jose J. & Tvarijonaviciute, Asta 2021. Analytical Validation of Two Point-of-Care Assays for Serum Amyloid A Measurements in Cats. *Animals (Basel)*. 11(9): 2518.

Eurolyser Cube-Vet parametritaulukko 2022. Triolab. Päivitetty 3.8.2022. <<https://www.triolab.fi/wp-content/uploads/2022/08/parametritaulukko-scil-eurolyser-cube-vet-ja-solo.pdf>>. Viitattu 8.12.2022.

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EU) 2016/679. Annettu 27.4.2016. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R0679&from=FI#d1e1793-1-1>>. Viitattu 6.10.2022.

Fosheim, Ingrid K. & Jacobsen, Daniel P. & Sugulle, Meryam & Alnaes-Katjavivi, Patji & Fjeldstad, Heidi E.S. & Ueland, Thor & Lekva, Tove & Staff, Anne C. 2023. Serum amyloid A1 and pregnancy zone protein in pregnancy complications and correlation with markers of placental dysfunction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* MFM. 5(1): 100794.

Howard, Judith & Graubner, Claudia 2013. Comparison of paired serum and lithium heparin plasma samples for the measurement of serum amyloid A in horses using an automated turbidimetric immunoassay. *The Veterinary Journal*. 199(2014): 457–460.

Hansen, A.E. & Schaap, M.K. & Kjelgaard-Hansen, M. 2006. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidimetric immunoassay for determination of feline SAA concentration. *Veterinary Research Communications*. 30(8). 863–872.

Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. E-kirja. Helsinki: Edita Publishing Oy. 27–28, 86–193.

Hänninen, Arno 2011. Akuutin tulehdusreaktion immunologinen säätely. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 127(16). 1679-87. <<https://www.duodecim-lehti.fi/duo99721>>. Viitattu 10.2.2023.

Kennedy, Adam D. & Ford, Lisa & Wittmann, Bryan & Conner, Jesse & Wulff, Jacob & Mitchell, Matthew & Evans, Anne M. & Toal, Douglas R. 2021. Global biochemical analysis of plasma, serum and whole blood collected using various anticoagulant additives. *PLoS One*.16(4). <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33831088/>>.

Lippi, Giuseppe & Meyer, Alexander von & Cadamuro, Janne & Simundic Ana-Maria 2018. Blood Sample quality. *Diagnosis* 6 (1). De Gruyter. <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dx-2018-0018/html>>. Viitattu 2.4.2023.

Ojanen, Jennina 2016. Antitromboottisten lääkeaineiden enantiomeerien kromatografiin fraktiointi. Kandidaatin työ. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Teknillinen tiedekunta. Kemianteeniikan koulutusohjelma. <https://lutpub.lut.fi/bitstream/handle/10024/120205/Kandidaatinty%c3%b6_Ojanen.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Viitattu 3.4.2023.

Paananen, Heidi 2022. Tuotespesialisti. Eurolyser CUBE-VET-erikoiskemian analysaattori. Triolab Oy. Puhelinkeskustelu 22.11.2022.

Paltrinieri, Saverio 2007. The feline acute phase reaction. *The Veterinary Journal*. 177(2008): 26–35.

Psychogios Nikolaos & Hau, David D. & Peng, Jun & Guo, An Chi & Mandal, Rupasri & Bouatra, Souhaila & Sinelnikov, Igor & Krishnamurthy, Ramanarayan & Eisner, Roman & Gautam, Bijaya & Young, Nelson & Xia, Jianguo & Knox, Craig & Dong, Edison & Huang, Paul & Hollander, Zsuzsanna & Pedersen, Theresa L. & Smith, Steven R. & Bamforth, Fiona & Greiner, Russ & McManus, Bruce & Newman, John W. & Goodfriend, Theodore & Wishart, David S. 2011. The Human Serum Metabolome. *PLoS One*. 6(2):e16957.

Ruskoaho, Heikki & Kerkelä, Risto 2023. Hepariini. Teoksessa Ruskoaho, Heikki & Kerkelä, Risto & Kantele, Anu & Korpi, Esa & Moilanen, Eeva & Piepponen, Petteri & Rysä, Jaana & Savontaus, Eriika & Tenhunen, Olli. *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. E-kirja. Duodecim.

SAA VET test kit 2022. Package insert. Eurolyser Diagnostica GmbH. Doc-ID: e586c9cf-9282-433d-ac1c-1a802306b6a4. Latest revision: DP 8.0. Päivitetty

26.4.2022. <<https://www.euolyser.com/veterinary-diagnostics/point-of-care-tests/saa-test/>>. Viitattu 1.12.2022.

Salminen, Sari 2020. Kissojen hyvinvointi Suomessa 2019. Raportti kissojen hyvinvointia koskevan kyselyn tuloksista. Ruokavirasto. Eläinten hyvinvoinnin ja tunnistamisen yksikkö. 6.10.2020. <https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/op-paat-ja-lomakkeet/viljelijat/elainten-pito/elainten-suojelu-ja-kuljetus/kissojen_hyvinvointi_suomessa_2019_fi_06102020-final.pdf>. Viitattu 2.12.2022.

Shridas, Preetha & Patrick, Avery C. & Tannock, Lisa R. 2021. Role of Serum Amyloid A in Abdominal Aortic Aneurysm and Related Cardiovascular Diseases. *Biomolecules*. 11(12): 1883.

Sotelo-Orozco, Jennie & Chen, Shin-Yu & Hertz-Picciotto, Irva & Slupsky, Carolyn M. 2021. A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 8: 682134.

Stoneburner, Regan M. & Naughton, Brian & Sherman, Barbara & Mathews, Kyle G. 2020. Evaluation of a stimulus attenuation strategy to reduce stress in hospitalized cats. *Journal of Veterinary Behavior*. 41 (2021) 33–38.

Suomen virallinen tilasto 2020. Lähes joka kolmannessa kotitaloudessa oli lemmikki vuonna 2016. Kotitalouksien kulutus 2016. Tilastot. Julkaistu 20.4.2020. <https://stat.fi/til/ktutk/2016/ktutk_2016_2020-04-20_tie_001_fi.html>. Viitattu 1.12.2022.

Tietoa kissakriisistä 2022. SEY Suomen eläinsuojelu. Eläinsuojelu. Kissakriisi. <<https://sey.fi/suojelemme-elaimia/tietoa-kissakriisista/>>. Viitattu 8.12.2022.

Tuominen, Krista 2017. Stressi kissoilla -kirjallisuuskatsaus. Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma. Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto. Farmakologian ja toksikologian oppiaine. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Helsingin yliopisto. <<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/198908/Tuominen%20Krista%20stres-sikissoilla.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Viitattu 9.12.2022.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan HTK-ohje 2023. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja 2/2023. 1. painos. Helsinki: Tutkimuseettinen neuvottelukunta. <https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf>.

Tähtinen, Juhani & Laakkonen, Eero & Broberg, Mari 2020. Tilastollisen aineiston käsittelyn ja tulkinnan perusteita. Turun yliopiston kasvatustieteiden tiedekunnan julkaisusarja C. Oppimateriaalit 22. 2. uudistettu painos. Turku: Turun yliopiston kasvatustieteiden laitos. 40, 98, 133–134. <https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/149687/Tilastollisen_aineiston_k%c3%a4sittelyn_ja_tulkinnan_perusteita_2020.pdf?sequence=5&isAllowed=y>. 40, 98, 133–134.

Vignoli, Alessia & Tenori, Leonardo & Morsiani, Cristina & Turano, Paola & Capri, Miriam & Luchinat, Claudio 2022. Serum or Plasma (and Which Plasma), That Is the Question. *Journal of proteome research*. 21(4): 1061–1072.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8981325/>>.

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

Waugh, Elspeth M. & Haining, Hayley & Harvie, James & Ridyard, Alison E. & Eckersall, P. David 2022. Validation of an automated immunoturbidimetric assay for feline serum amyloid A. *BMC Veterinary Research* (2022) 18:359.

WHO 2002. World Health Organization. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Stability of blood, plasma and serum samples. Rev 2. Geneva. 2002:5–6. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65957/WHO_DIL_LAB_99.1_REV.2.pdf;jsessionid=86A49CC0D5CB8C55B8042A4D993C3744?sequence=1

Yritys. Evidensia. <<https://evidensia.fi/yritys/>>. Viitattu 1.10.2022

SPSS-tulokset

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
Seerumi	Mean	77,8000	10,96490	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	53,6664	
		Upper Bound	101,9336	
	5% Trimmed Mean	78,9389		
	Median	85,3000		
	Variance	1442,749		
	Std. Deviation	37,98354		
	Minimum	17,10		
	Maximum	118,00		
	Range	100,90		
	Interquartile Range	70,45		
	Skewness	-,371	,637	
	Kurtosis	-1,610	1,232	
Plasma	Mean	75,4417	11,01090	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	51,2068	
		Upper Bound	99,6765	
	5% Trimmed Mean	76,0352		
	Median	81,6000		
	Variance	1454,879		
	Std. Deviation	38,14288		
	Minimum	17,40		
	Maximum	122,80		
	Range	105,40		
	Interquartile Range	75,90		
	Skewness	-,322	,637	
	Kurtosis	-1,451	1,232	
Ero	Mean	-2,3583	2,40481	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-7,6513	
		Upper Bound	2,9346	
	5% Trimmed Mean	-1,9426		
	Median	-2,4000		
	Variance	69,397		
	Std. Deviation	8,33050		
	Minimum	-22,80		
	Maximum	10,60		
	Range	33,40		
	Interquartile Range	5,65		
	Skewness	-,980	,637	
	Kurtosis	3,042	1,232	

SPSS-tulokset

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Seerumi	,231	12	,076	,866	12	,058
Plasma	,158	12	,200 [*]	,913	12	,235
Ero	,248	12	,041	,874	12	,074

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Seerumi	77,8000	12	37,98354	10,96490
	Plasma	75,4417	12	38,14288	11,01090

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Seerumi & Plasma	12	,976	<,001

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Seerumi - Plasma	2,35833	8,33050	2,40481	-2,93461	7,65128	,981	11	,348

Paired Samples Effect Sizes

		Standardizer ^a	Point Estimate	95% Confidence Interval		
				Lower	Upper	
Pair 1	Seerumi - Plasma	Cohen's d	8,33050	,283	-,301	,855
		Hedges' correction	8,62861	,273	-,290	,825

a. The denominator used in estimating the effect sizes.

Cohen's d uses the sample standard deviation of the mean difference.

Hedges' correction uses the sample standard deviation of the mean difference, plus a correction factor.