



Kide-Pilvi Vaeltaja

# Cobas e411-analysaattorin B12-vitamiinin menetelmätestaus: toistettavuus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

7.5.2024

## Tiivistelmä

Tekijä(t):	Kide-Pilvi Vaeltaja
Otsikko:	Cobas e411-analysaattorin B12-vitamiinin menetelmätestaus: toistettavuus
Sivumäärä:	27 sivua + 0 liitettä
Aika:	7.5.2024
Tutkinto:	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma:	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaaja(t):	Suska Veltheim, Lehtori

---

Kliiniset päätökset perustuvat useasti laboratoriotutkimusten tuloksiin, joihin päädytään potilaan oireenkuvan mukaan. Potilasnäytteiden tutkimustulosten luotettavuutta arvioidaan kliinisissä laboratorioissa laadunvalvontamenetelmillä. Toistettavuutta käytetään yhtenä laatukriteereistä mittaamenetelmälle, minkä mittaamisella varmistetaan tutkimuksen tulosten reliabiliteetti.

B12-vitamiinin puutos aiheuttaa neurologisia oireita esimerkiksi muutoksia tuntoaistimuksessa ja sekavuutta. Näiden lisäksi B12-vitamiinin puutokseen voi liittyä muita oireita kuten väsymystä ja ruokahaluttomuutta. Veren kuvassa B12-vitamiinin puutos havaitaan megaloblastisena anemiana. B12-vitamiinin puutos yhdistetään aivo- ja sydänsairauksiin, koska elimistöön kerääntyy vaurioittavia molekyylejä metabolisten reaktioiden vähetessä, joihin B12-vitamiinia tarvitaan.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata Metropolian Ammattikorkeakoulun Cobas e411-analysaattorin kokonais-B12-vitamiinin mittaamenetelmän toistettavuutta sarjan sisäisestä ja sarjojen välisistä toistettavuuksista. Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa, että analysaattorilla saadaan mitattua näytteistä kokonais-B12-vitamiinin pitoisuus luotettavasti sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistettavuuksista Metropolian verifiointivaatimuskriteereitä mukaillen.

Menetelmän toistettavuuden mittaaminen tehtiin käyttämällä laaduntarkkailussa käytettäviä kontrollinäytteitä, joista toisen kokonais-B12-vitamiini pitoisuus vastasi viiteväliä (PreciControl Varia 1) ja toisen pitoisuus ylitti viitevälin (PreciControl Varia 2). Sarjojen välistä toistettavuutta mitattiin analysoimalla samaa näytettä kymmenenä peräkkäisenä päivänä ja sarjan sisäistä toistettavuutta mitattiin analysoimalla samaa näytettä kymmenen kertaa peräkkäin. Lopuksi mittaustulokset analysoitiin ja arvioitiin.

Mittaustulokset eivät luotettavasti kuvastaneet B12-vitamiinin mittaamenetelmän toistettavuutta Cobas e411-analysaattorilla eivätkä tulokset vastanneet tavoitteen mukaisia laatuvaatimuksia. Tuloksia kyetään hyödyntämään B12-vitamiinin verifiointiin, jota tarvitaan tulevaisuudessa Hymy-kylän laboratoriotuotinnassa.

Avainsanat: toistettavuus, Cobas e411-analysaattori, B12-vitamiini, reliabiliteetti

---

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

## Abstract

Author(s): Kide-Pilvi Vaeltaja  
Title: Repeatability testing of vitamin B12 on Cobas e411 analyzer  
Number of Pages: 27 pages + 0 appendices  
Date: 7 May 2024

Degree: Bachelor of Health Care  
Degree Programme: Biomedical Laboratory Science  
Instructor(s): Suska Veltheim, Lecturer

---

The results of clinical laboratory tests are often used as a basis for a treatment or diagnosis for a patient. Hence the clinical laboratory test results need to be reliably correct and truthful. Thus, the results are monitored by quality control methods. One of the critical measurements for quality control is repeatability.

Deficiency of vitamin B12 causes neurological symptoms such as changes in sensory senses and incoherence. Moreover, it can cause other symptoms like tiredness or lack of appetite. Characteristically deficiency of vitamin B12 is noticeable in red blood cells as megaloblastic anemia. Since vitamin B12 plays a vital part of specific metabolic reactions its deficiency causes accumulation of damaging molecules which are linked to brain and heart diseases.

The purpose of this thesis was to test the repeatability and intermediate precision of the measuring method for vitamin B12 on Cobas e411 analyzer. The aim of the testing was to prove that the already validated Cobas e411 analyzer can measure vitamin B12 reliably within the realm of repeatability and intermediate precision which means the results would follow the criteria of slightly modified principles of verification used by Metropolia University of Applied Sciences.

The testing was done by using quality control samples from Cobas in two levels: PreciControl Varia 1 and PreciControl Varia 2 which of one corresponding to normal vitamin B12 levels and the other one corresponding to high levels of vitamin B12. Measuring of the samples for intermediate precision happened during ten consecutive days and repeatability was tested by measuring the same sample for ten times.

Lastly, the results yielded from the testing showed that the repeatability of the measuring method of vitamin B12 on Cobas e411 analyzer did not portray reliably the repeatability of the measuring method and the results didn't meet their aimed quality criteria. However, the results provide valuable information for future verification of vitamin B12 on Cobas e411 analyzer.

Keywords: repeatability, Cobas e411 analyzer, vitamin B12, reliability

---

The originality of this thesis has been checked using Turnitin Originality Check service.

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Verifiointi, oikeellisuus ja toistettavuus	2
2.1	Verifiointi	2
2.2	Oikeellisuus	3
2.3	Toistettavuus	3
3	B12-vitamiini	4
3.1	Merkitys diagnostiikassa	4
3.2	B12-vitamiinin kemiallinen rakenne ja rooli elimistössä	6
3.2.1	B12-vitamiini kofaktorina elimistön reaktioissa	7
3.3	Kulkeutuminen ja imeytyminen elimistössä	8
3.3.1	Kuljettajaproteiinit mukana B12-vitamiinin imeytymisessä	8
4	B12-vitamiinin mittausmenetelmä Cobas e411-analysaattorilla	9
4.1	Inkubaatiovaiheiden tapahtumat	10
4.2	Mittausvaihe	11
4.3	ECLIA mittausmenetelmä B12-vitamiinin analysoinnissa	12
4.4	Analysoinnin häiritsevät tekijät	12
5	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymys	13
6	Opinnäytetyön menetelmät	13
6.1	Aineisto	13
6.1.1	Aineiston analysointimenetelmä	14
6.1.2	Toistettavuuden parametrit	14
6.2	Aineiston keruu	15
7	Tulokset	17
7.1	Sarjan sisäinen toistettavuus	17
7.2	Sarjojen välinen toistettavuus	18
8	Pohdinta	19
8.1	Tulosten tarkastelu	19
8.2	Luotettavuus	21
8.3	Johtopäätökset	23

8.4	Eettisyys	23
8.5	Kehittämisehdotukset	24
8.6	Ammatillinen kasvu	25
	Lähteet	26

# 1 Johdanto

Potilaalle annettava hoito ja diagnostiset päätökset perusteellaan suurelta osin kliinisten laboratoriotutkimusten tuloksilla. Laboratoriokokeiden tuloksiin pohjautuvat perustellut voidaan hyväksyä, jos tutkimuksen pyytäjä, usein lääkäri, on valinnut oikean tutkimuksen ja hänelle raportoidaan virheetön tulos oikea-aikaisesti. Lisäksi ehtona on, että tulos ohjaa oikeiden johtopäätösten äärelle potilaan hoitoa koskevista päätöksistä tai diagnostiikasta. (Grönroos & Koskinen 2014.)

Laboratoriotoiminnassa käytetään laadunvarmistusmenetelmiä, jotta virheettömät laboratorio tutkimustulokset voidaan vastata tutkimuksen pyytäjälle eivätkä virheelliset tulokset pääse lääkärille asti aiheuttamaan virhettä potilaan hoitoon. Laadunvarmistusmenetelmiin lukeutuvat sisäinen laadunohjaaminen, kuten kontrollinäytteiden ajaminen säännöllisesti, ja ulkoinen laadunarviointi, jossa laboratorion laitteilla analysoidaan ulkoisen laadunarvioijan tuottamia laaduntarkkailunäytteitä. Laaduntarkkailunäytteillä tarkastellaan, saadaanko laboratorion analysaattorilla yhtä lailla samoja tuloksia samasta näytteestä kuin muiden laboratorioden analysaattoreilla on saatu. (Grönroos & Koskinen 2014.) Yksi merkittävistä määreistä laaduntarkkailussa on toistettavuus, jolla varmennetaan lyhyellä aikavälillä tehtyjen mittauksien tulosten yhtäläisyyttä näytteen ja olosuhteiden ollessa samat. Toistettavuutta tarkistetaan myös analysaattoreiden mittausmenetelmistä, kun mittausmenetelmää ollaan ottamassa käyttöön. (Grönroos & Koskinen 2014; Hägg 2016: 30).

Opinnäytetyön tarkoituksena oli mitata mittausmenetelmän toistettavuutta kokonais-B12-vitamiinista Cobas e411-analysaattorilla. Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa, että Cobas e411-analysaattorilla saadaan mitattua kokonais-B12-vitamiinituloksia luotettavasti sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistettavuuksista Metropolian verifiointi-vaatimuskriteereitä mukaillen. Tavoitteen kohdistuminen verifiointi kriteereiden tasolle johtui siitä, että Metropolian Cobas e411-analysaattorille ei ollut kokonais-B12-vitamiinin mittausmenetelmää vielä toteuttamishetkellä verifioitu. Opinnäytetyösopimus tehtiin Metropolian Ammattikorkeakoulun kanssa.

Mittausmenetelmän testaamisella edistetään B12-vitamiinin verifiointia, mitä hyödynnetään tulevaisuudessa Hymy-kylän laboratoriotoiminnassa. Verifioinnilla taataan se, että kyseinen validoitu analysaattori mittaa luotettavasti B12-vitamiinia ISO 15189: 2022

standardin mukaisesti. Tällöin verifiointilla todennettu oikeellisuus yhdessä oikein suoritun laadunvalvonnan kanssa takaavat analysoitujen tulosten luotettavuuden ja laboratoriotulokset voidaan vastata asiakkaalle. Hymy-kylä on Metropolian tuottama asiakaslähtöinen hyvinvointi- ja terveystalvveluja tarjoava innovaatiokeskittymä, jossa Metropolian opiskelijat oppivat ja tekevät asiakastyöskentelyä ohjaavien opettajien huomassa. Hymy-kylässä opiskelijat pääsevät harjoittamaan osaamista työelämää edeltävästi ja asiakas saa vastavuoroisesti kiireettömässä ympäristössä yksilöllistä palvelua. Bioanalytiikan opinto-ohjelman osuus Hymy-kylässä pienimuutoisena laboratoriotoinnina on vielä kehitysvaiheessa. (HyMy-Kylä - hyvinvointia Myllypurosta 2024.)

## 2 Verifiointi, oikeellisuus ja toistettavuus

### 2.1 Verifiointi

Verifiointi on prosessi, jonka tarkoituksena on todistaa objektiivisesti todeksi, että menetelmällä saadaan toistetusti ja luotettavasti oikeita tuloksia (SFS 15189: 12). Verifiointiprosessi perustuu ISO 15189: 2022 standardiin, joka määrittelee suurilta osin Euroopassa tehtävää kliinistä laboratoriotoinninta (SFS 15189: 5). Rutiininomaisesti verifiointi tehdään, kun analysaattorilla ollaan ottamassa käyttöön mittausmenetelmää tai laboratorion toiminnassa tapahtuu muutoksia esimerkiksi laitteissa, tietojärjestelmässä, näytematriisissa, analyysimenetelmässä tai näytteenkäsittelystä. Ehtona verifiointin suorittamiselle on, että verifioitava analysaattori on validoitu, mikä voi olla suoritettu diagnostisen tuotteiden valmistajan toimesta ennen laitteen saapumista laboratorioon. Lisäksi verifioitavalle analysaattorille tarvitsee olla vastaparina samanlainen jo verifioitu analysaattori, jotta näiden analysaattoreiden mittaamia tuloksia samoista näytteistä voidaan verrata. Ennen verifiointin aloittamista laaditaan verifiointisuunnitelma. (Hägg 2016: 7–10.)

Verifiointisuunnitelmassa kuuluu olla tilastollisesti laskennalliset parametrit, joilla osoitetaan verifioitavan analysaattorin mittausmenetelmän tuloksien luotettavuutta ja objektiivista totuutta siihen käyttötarkoitukseen, johon analysaattoria aiotaan hyödyntää. Verifiointisuunnitelmat ovat joko laboratorikohtaisia tai jonkun muun tahon, esim. viranomaisten tai organisaatioiden, asettamien ehtojen mukaisia. Näistä syistä verifiointisuunnitelmat vaihtelevat laboratorikohtaisesti. (Hägg 2016: 7–10, 14.) Suunnitelmaan dokumentoidaan mittauksien aikana kaikki olennaiset tiedot; näytteistä, reagensseista,

verifioitavasta laitteesta, mittausmenetelmästä, kuka on suorittanut verifiointin ja milloin se on tehty. Verifiointiraportista, jonka täyttämiseen on käytetty verifiointisuunnitelmaa, tulee esimerkiksi ilmetä, mitä tuloksia on saatu ja miten tuloksia on analysoitu ja arvioitu toistettavuuksien varmistamiseksi. (Hägg 2016: 7–9: Metropolian verifiointisuunnitelma.) Kokonais-B12-vitamiinin toistettavuuksien mittaamisessa on hyödynnetty ja se on dokumentoitu Metropolian verifiointisuunnitelmakaavaketta mukaillen.

## 2.2 Oikeellisuus

Oikeellisuus ilmaistaan suureen mitattujen arvojen keskiarvon ja suureen vertailuarvon yhtäpitävyytenä. Keskiarvon selvittäminen tarkoittaa periaatteessa äärettömän monesti toistettua suureen mittaukseen, jonka tuloksista keskiarvo lasketaan. Oikeellisuus näkyy validoinnissa mittausmenetelmän oikeellisuuden selvittämisenä ja verifiointissa mittausmenetelmän oikeellisuuden varmistamisena. (Hägg 2016: 7–9, 27.) Opinnäytetyön kohdalla suure on kokonais-B12-vitamiini, jonka mittausmenetelmän oikeellisuutta testattiin toistuvasti analysoiden samaa näytettä Cobas e411-analysaattorilla.

## 2.3 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa lyhyen aikavälin sisällä mitattujen tulosten välistä yhteenpitävyyttä, kun mittaamiseen vaikuttavat tekijät ovat pidetty samoina. Tällöin olosuhteet, näytteet, menetelmä, mittauksen suorittaja, laite ja laboratorio ovat samat. (Hägg 2016: 30.) Menetelmän toistettavuutta voidaan testata useilla rinnakkaismäärityksillä, joissa vaihtelee näytemateriaali ja mitattavan analyytin pitoisuus. Näytteiksi toistettavuuksien mittaamiseen sopii varsinaiset näytteet (esim. potilasnäytteet), laboratorion sisäisen laadunvalvonnan näytteet (kuten kontrollinäytteet), vertailumateriaali tai saantokoenäytteet. Näytteistä mitatuista tuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta ja CV% eli variatiokerroin. (Hägg 2016: 31; Metropolian verifiointisuunnitelma.)

## 3 B12-vitamiini

### 3.1 Merkitys diagnostiikassa

Tarpeeksi pitkälle edennyt B12-vitamiinin puutos alkaa näkymään oireina ja pienenä seerumipitoisuutena, joihin B12-vitamiinin puutoksen diagnostiikka perustuu. (Freese & Voutilainen & Mutanen 2021; Färkkilä 2018.) Toksisia vaikutuksia ei ole havaittu olevan B12-vitamiinin kohdalla suurista saantimääristä huolimatta (Freese ym. 2021). Koska länsimaisesta tasapainoisesta ruokavaliosta saa B12-vitamiinia tarpeeksi, puutukseen harvemmin liittyvät ravinnosta johtuvat syyt. Vegaaninen ruokavalio ilman B12-vitamiinin käyttöä lisäravinteena aiheuttaa kuitenkin yleisen poikkeaman tähän, mutta muuten puutteen taustalla on yleensä B12-vitamiinin imeytymishäiriö. (Freese & Voutilainen & Mutanen 2021; Färkkilä 2018.)

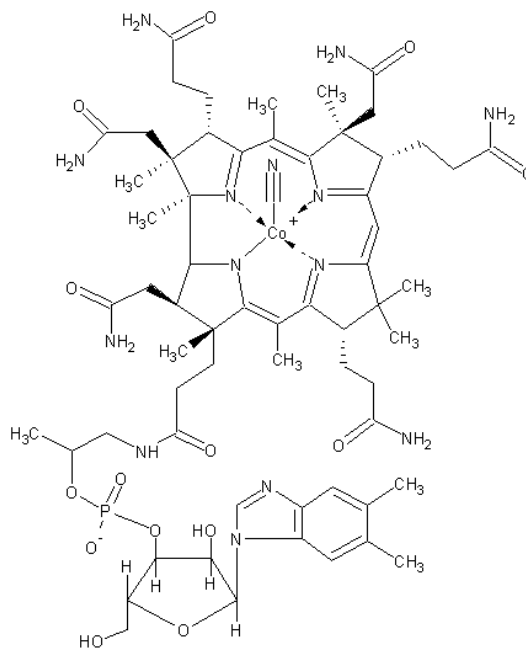
B12-vitamiinin puutos aiheuttaa neurologisia oireita kuten hermoston osalta raajojen puutuneisuutta, pistelyä, värinän tuntemuksen katoamista ja kognitiivisia oireina sekavuutta. Näiden lisäksi B12-vitamiinin puutos voi näyttäytyä väsymyksenä, ruokahaluttomuutena, lievänä keltaisuutena, steriiteettinä ja kielessä sen sileytenä, arkuutena ja infektiokerkkyytenä. (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018.)

Veressä B12-vitamiinin puutos näkyy punasoluissa megaloblastisena anemiana, kuten folaatinkin puute. Syy megaloblastisen anemian kehittymiselle johtuu punasolujen tuman kypsymisen hidastumisesta samalla kun sytoplasma kasvaa normaalissa tahdissa, jolloin soluista tulee tilavuudeltaan suurikokoisia ja niiden muoto muuttuu kaksoiskoverasta pyöreämmiksi. Tuman kypsymistä säätelee DNA-synteesi, joka estyy B12-vitamiinin johdoksen, metyylikobalamiinin, ehtymisestä, mikä toimii kofaktorina folaatin varastomuodon, metyylietrahydrofolaatin, demetyloimisreaktiossa. (Loikas 2015.) Tuman merkitys punasolulle hyödyllisenä soluelimenä täyttyy vain punasolun elinkaareissa sen kypsymisen aikana, minkä vuoksi varttuneesta punasolusta tuma on surkastunut pois (Siitonen & Koistinen 2015).

Veren seerumista B12-vitamiinin pitoisuutta mitataan transkobalamiini II:een sitoutuneena, mikä antaa viitteitä elimistön aktiivisen B12-vitamiinin osuudesta. Transkobalamiini II:een sitoutunut B12-vitamiini on n. 10–30 % kokonais-B12-vitamiinipitoisuudesta. Kokonais-B12-vitamiinipitoisuus ei ole yhtä luotettava, koska siihen lukeutuu myös haptokorriiniin sitoutuneet kobalamiinianalogit, jotka eivät ole biokemiallisesti hyödyllisessä muodossa. (Färkkilä 2018.) B12-vitamiinin verikokeesta saadun tuloksen tulkintaa voidaan täydentää homokysteiinin ja metyyylimalonaatin määrytyksillä, joiden pitoisuuksien suurenemista tapahtuu B12-vitamiinin puutoksessa. Tämä johtuu siitä, että niitä ei kulu tavanomaiseen tapaan, koska reaktioita, joissa elimistö käyttää B12-vitamiinia, ei tapahdu yhtä runsaasti. (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018.) Seerumista voidaan todeta lisäksi konjugoitumattoman bilirubiinin ja laktaattidehydrogenaasin pitoisuuksien suurenemista, koska normaalia aikaisemmin hajoavat megaloblastiset punasolut lisäävät kyseisten analyyttien pitoisuutta. Mainitut tutkimukset voivat olla tarpeellisia esimerkiksi erotusdiagnostiikassa, jos oireet viittaavat selkeästi B12-vitamiinin puutokseen, vaikka yksinään seerumin B12-vitamiinin määrytyksellä, saadaan viiterajoilla olevia tuloksia. (Färkkilä 2018.)

### 3.2 B12-vitamiinin kemiallinen rakenne ja rooli elimistössä

B12-vitamiini kuuluu kemialliselta rakenteeltaan kobalamiineihin ja koostuu korriinirenkasta, minkä keskellä on koboltti-atomi, sekä sitä reunustavista sivuhaarakkeista (ks. kuva 1). Sivuhaarakkeiden avulla kobalamiini osallistuu reaktioihin, mikä mahdollistaa sen ominaisuudet ja määrittelee reaktioaktiivisuuden (Freese ym. 2021; Loikas 2015.)



Kuva 1. B12-vitamiinin kemiallinen rakenne (Azazelli 2005).

Korriinidia hyödynnetään kobalamiinin ja B12-vitamiinin ohella yhteisnimenä tarkoittamaan aktiivisia ja epäaktiivisia kobalamiineja. Epäaktiivisista kobalamiineista käytetään nimeä kobalamiinianalogit. (Freese ym. 2021; Loikas 2015.)

### 3.2.1 B12-vitamiini kofaktorina elimistön reaktioissa

B12-vitamiinin tiedetään toimivan kofaktorina kahdessa eri reaktiossa seuraaville entsyymeille: *metyylimalonyyli-koentsyymi-A-mutaasi (MMUT)* ja *5-metyylitetrahydrofolaatti-homokysteiini-metyylitransferaasi (MTR)* (Freese ym. 2021; Halczuk & Kaźmierczak-Barańska & Karwowski & Karmańska & Cieślak 2023; Loikas 2015; McCorvie & Ferreira & Yue & Froese 2023).

MMUT ohjaa mitokondriossa mutaasireaktiota, jossa propionihapon metaboliassa muodostunutta metyylimalonyyli-koentsyymi-A:ta muutetaan sukkinylikoentsyymi-A:ksi osaksi soluhengitystä. Kyseiseen reaktioon MMUT tarvitsee 5'deoksiadenosyylikobalamiinin kofaktoriksi. (Loikas 2015; McCorvie ym. 2023.)

MTR muodostaa homokysteiinistä ja metyylitetrahydrofoolihaposta, metyylikobalamiinin avustuksella, metioniinia ja tetrahydrofoolihappoa, jotka ovat perustuksellisia molekyylejä proteiinien translaatioissa ja post-translaation metyloinnissa. (Loikas 2015; McCorvie ym. 2023.)

Aiemmin mainittu homokysteiini on lisääntyneissä pitoisuuksissa yhdistetty terveyden heikkenemiseen ja erityisesti sydän- ja aivosairauksiin. Koska B12-vitamiini on tärkeässä roolissa osana homokysteiinin muutosreaktiota metioniiniksi, pidetään B12-vitamiinia yhtenä tärkeimmistä ravintoaineista folaatin ohella aivojen terveyden ylläpitämisessä. (Jakubowski 2018; Viridi & McKee & Nuthi & Jadavji 2023.)

### 3.3 Kulkeutuminen ja imeytyminen elimistössä

B12-vitamiini on vesiliukoinen vitamiini ja imeytyy reseptorivälitteisesti kolmen eri kobalamiinia sitovan proteiinin kautta; sisäinen tekijä, haptokorriini ja transkobalamiini.

Näissä erikoistuneissa proteiineissa sitoutuneena kobalamiini kulkeutuu ruoansulatuselimistöstä verenkiertoon solujen ja kohde-elinten käyttöön. Sisäinen tekijä (intrinsic factor, IF) sitoutuu kaikista spesifisimmin B12-vitamiinin aktiiviseen muotoon, kun taas haptokorriini (haptocorrin, HC, transkobalamiini I) tekee yleisemmin komplekseja myös kobalamiinianalogien kanssa. Transkobalamiini (transcobalamin, TC, transkobalamiini II) kuljettaa B12-vitamiinia kaikkialle kudoksiin verrattuna haptokorriiniin, joka vie korrinoideja ainoastaan maksasoluille. (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018; McCorvie ym. 2023.) Taulukossa 1 on koottu B12-vitamiinin kuljettajaproteiinien ominaisuuksia.

Taulukko 1. B12-vitamiinin kuljettajaproteiinien ominaisuudet (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018; McCorvie ym. 2023 mukailten).

	Sitoutuminen		Sijainti			Kuljettaa verestä	
	Aktiiviseen B12-vitamiiniin	Kobalamiini-analogeihin	Suolisto	Enterosyytti	Verenkierto	Varastointiin	Solujen käyttöön
<b>IF</b>	x	x	x	x			
<b>HC</b>	x	x	x		x	x	
<b>TC</b>	x			x	x		x

Haptokorriinia tavataan sekä verenkierron, että ruoansulatuselimistössä, mutta sisäistä tekijää vain suolistossa ja enterosyytissä, jossa B12-vitamiini vapautuu transkobalamiinin matkaan verenkiertoon (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018; McCorvie ym. 2023).

#### 3.3.1 Kuljettajaproteiinit mukana B12-vitamiinin imeytymisessä

Sylkirauhasten erittämä haptokorriini ja ravinnosta saatu B12-vitamiini kohtaavat ensimmäisen kerran suussa. Näiden välinen kompleksi muodostuu kuitenkin vasta mahalaukussa, minkä tarkoituksena on suojata B12-vitamiinia suolahapon aiheuttamalta hydrolyysireaktiolta. (Färkkilä 2018; McCorvie ym. 2023.)

Ravinnossa B12-vitamiini on sitoutuneena proteiiniin, jonka mahalaukun limakalvon peptisten solujen erittämä pepsiini pilkkoo vapauttaen B12-vitamiinin. Haptokorriini-

B12-vitamiini kompleksi jatkaa matkaansa ruoansulatuselimistössä ohutsuoleen, jonka duodenumissa kompleksi hajoaa haiman erittämän trypsiinin vaikutuksesta. Haptokorriinista vapautunut B12-vitamiini kiinnittyy sisäisen tekijään. Sisäistä tekijää erittää mahalaukun parietaalisolut, jotka myös syntetisoivat sitä. IF-B12-vitamiini-kompleksi pysyy endosytoosilla imeytymään jo suoraan ohutsuolen seinämän läpi, mutta runsain osuus komplekseista jatkaa matkaansa terminaaliseen ileumiin. IF-B12-vitamiini-kompleksien päämääränä on enterosyyttien pinnalla olevat spesifiset cubiliini-reseptorit, joiden kautta ne pääsevät enterosyytteihin. IF-B12-vitamiini-kompleksit pilkkoutuvat enterosyyteissä, joiden basaaliosissa IF:stä vapautunut kobalamiini sitoutuu välittömästi enterosyyttien syntetisoimaan transkobalamiini II:teen. (Färkkilä 2018; McCorvie ym. 2023.)

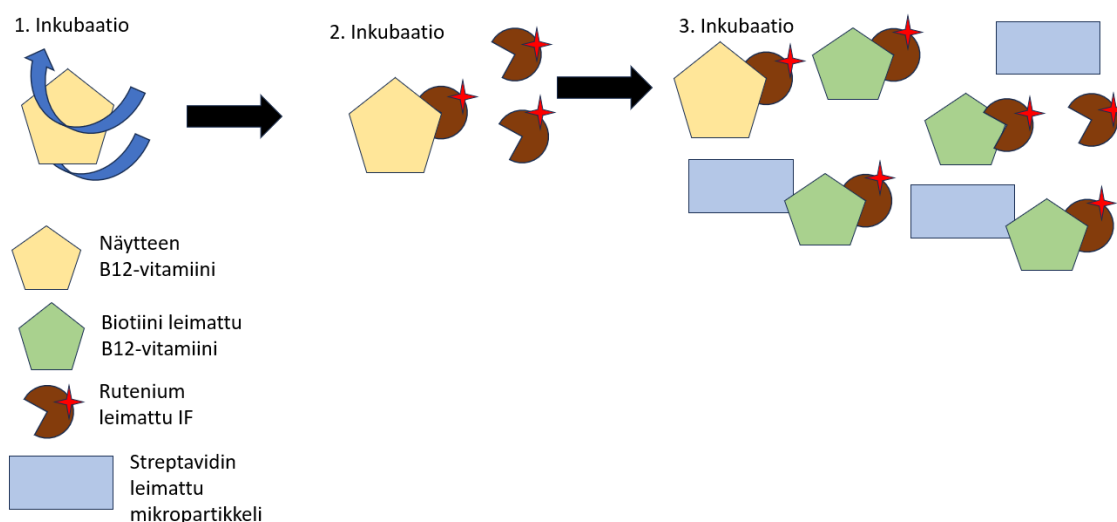
Reseptorit, joiden kautta B12-vitamiini pääsee verenkierrosta solujen käyttöön, ovat runsaimmillaan solukalvolla riippuen solukierrosta. Sen vuoksi B12-vitamiinin imeytymisen soluihin on tehokkainta jakautuvissa soluissa. Jos solussa on ylimäärä B12-vitamiinia, erittyy B12-vitamiini apo-transkobalamiinissa sitoutuneena takaisin verenkiertoon muiden solujen käyttöön. Maksasoluista haptokorriini-B12-vitamiinikompleksit voi erittyä sappeen, jolloin B12-vitamiini vapautuu enterohepatiittiseen kiertoon. (Freese ym. 2021.) Osaksi tästä syystä B12-vitamiini varastot riittävät monesti useiksi vuosiksi estämään puutosoireet (Freese ym. 2021; Färkkilä 2018).

#### **4 B12-vitamiinin mittausmenetelmä Cobas e411-analysaattorilla**

B12-vitamiinin analysointi Cobas e411-analysaattorilla on nelivaiheinen. Näistä kolme ensimmäistä ovat inkubaatioita ja viimeinen on mittausvaihe. Analysaattori käyttää viittä eri reagenssia reaktioihin, jotka tapahtuvat inkubaatioiden aikana. Kokonaisuudessaan näytteen analysointiin kuluu 27 minuuttia ja analysoitava näyte on plasmaa tai seerumia. (Cobas 2023: 1.)

## 4.1 Inkubaatiovaiheiden tapahtumat

Inkubaatiovaiheiden reaktiot ovat havainnollistettu kuvassa 2. Ensimmäisessä inkubaatioissa; esikäsittelyreagenssit saattavat näytteen B12-vitamiinin reaktiovapaaseen muotoon. Kuvassa 2 siniset taipuneet nuolet kuvastavat proteiinia, jossa näytteessä oleva B12-vitamiini on sitoutuneena. Toisen vaiheen inkubaatioissa; proteiinista vapautunut B12-vitamiini muodostaa kompleksin reagenssin rutenium-leimattun (Ru) sisäisen tekijän (intrinsic factor, IF) kanssa. Muodostuneen B12-vitamiini-IF-Ru-kompleksin pitoisuus on suoraan verrannollinen näytteen B12-vitamiini pitoisuuteen. Kolmannessa inkubaatioissa näytekaivoon lisätään reagensseja, joissa on magneettisesti reagoivia streptavidin päällystettyjä mikropartikkeleita ja biotiini-leimattua B12-vitamiinia. Jäljellä olevat IF-Ru-partikkelit kiinnittyvät biotiini-leimattuihin B12-vitamiineihin muodostaen biotiini-B12-vitamiini-IF-Ru-komplekseja. Kyseiset kompleksit kiinnittyvät mikropartikkeleihin streptavidinin ja biotiinin välisen sidoksen ansiosta. Lopputuotteena on siis mikropartikkeli-streptavidin-biotiini-B12-vitamiini-IF-rutenium-kompleksi. (Cobas 2023: 1.)

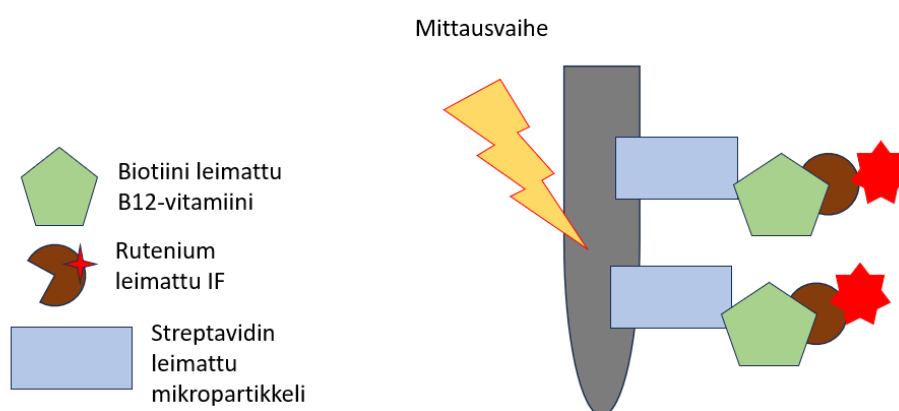


Kuva 2. B12-vitamiinin analysointi Cobas e411-analysaattorilla: inkubointireaktiot (Cobas 2023: 1 mukailten).

Reagenssissa on tietty tunnettu pitoisuus rutenium-leimattua sisäistä tekijää, jota on tarkoituksellisesti ylimäärä näytteen B12-vitamiinin pitoisuuteen suhteutettuna. Tällöin ylijäämä rutenium-leimattua sisäistä tekijää riittää reagoimaan lisätyn biotiini-leimattun B12-vitamiinin kanssa. (Cobas 2023: 1.)

## 4.2 Mittausvaihe

Analysaattori aspiroi näyte-reagenssi-liuoksen näytökaivosta mittauskaivoon. Mittauskaivossa oleva elektrodi nappaa magneettisesti pintaansa mikropartikkelit ja niissä olevat kompleksit. Jotta ylimääräinen materiaali häipyä häiritsemästä mittausta, huuhtoo analysaattori mittauskaivoa systeemiliuoksilla. Kuvassa 3 esitetään itse mittausvaihe, jossa elektrodiin johdettu sähkö on kulkeutunut mikropartikkeli-kompleksin päässä olevaan ruteniumiin aiheuttaen kemilumisenssisen emission, jonka valomonistin mittaa. (Cobas 2023: 1.)



Kuva 3. B12-vitamiinin analysointi Cobas e411-analysaattorilla: mittausvaihe (Cobas 2023: 1 mukailten).

Kemilumisenssisen reaktion aikana ruteniumista irtoaa elektroneja ja emittoituu valoa (Cobas 2023: 1; Zhang & Zhang & Yang & Qi & Zhang 2018). Valomonistimella mitattu valon emittoituminen antaa numeerisen arvon, jota vertaamalla vakiontikäyrään saadaan lopulta tulos sille, kuinka paljon näytteessä oli B12-vitamiinia (Cobas 2023: 1). Valomonistimen mittaama arvo on kääntäen verrannollinen näytteen B12-vitamiinin pitoisuuteen. Mitä suurempi arvo mitataan, sitä pienempi määrä näytteessä on B12-vitamiinia ja vastaavasti toisin päin. (Zhang ym. 2018.)

### 4.3 ECLIA mittausmenetelmä B12-vitamiinin analysoinnissa

Cobas e 411-analysaattori käyttää ECLIA menetelmää B12-vitamiinin mittaamiseen (Cobas 2023: 1). Mittausmenetelmänä ECLIA koostuu kahdesta eri osasta: ECL = elektrokemilumisenssi (eng. electrochemiluminescence) ja IA = immunomääritys (eng. immunoassay). Elektrokemilumisenssisessä mittausmenetelmässä hyödynnetään elektrodipintoja elektronien siirtoreaktioihin, jotta saadaan aikaan valon emittoitumista. (Zhang ym. 2018.) Tämä tapahtuu Cobaksella analysoinnin mittausvaiheessa. Inkubaatioiden aikana tapahtuvat reaktiot perustuvat immunomäärityksen kilpailevaan periaatteeseen. Koska sisäinen tekijä sitoutuu spesifisesti B12-vitamiiniin, on komponenttien välinen reaktio lähes verrattavissa antigeeni-vasta-aine-sitoutumisen spesifisyyteen. (Cobas 2023: 1.)

### 4.4 Analysoinnin häiritsevät tekijät

Mittausta eivät häiritse ikteerisyys (bilirubiini  $\leq 1112 \mu\text{mol/l}$ ), hemolytyisyys ( $\text{Hb} \leq 0,025 \text{ mmol/l}$ ), lipeemisyys (lipidit  $\leq 17,1 \text{ mmol/l}$ ), immunoglobuliinit ( $\text{IgG} \leq 28 \text{ g/l}$ ,  $\text{IgA} \leq 16 \text{ g/l}$  ja  $\text{IgM} \leq 10 \text{ g/l}$ ), reumatoidi faktorit ( $\leq 1500 \text{ IU/ml}$ ) tai biotiini ( $\leq 205 \text{ nmol/l}$ ), jos analyytien pitoisuudet eivät ylitä mainittuja rajoja (Cobas 2023: 3).

Cobas suosittelee menetelmäohjeessa ainakin 8 tunnin taukoa suuren annostuksen ( $> 5 \text{ mg/vrk}$ ) biotiini lääkityksestä ennen verinäytteenottamista potilailta, joilla on vastaava lääkitys käytössä. Muutoin tuloksissa voi virheellisesti ilmetä korkea B12-vitamiini pitoisuus. Suuri proteiinin konsentraatio näytteessä häiritsee merkittävästi mittausmenetelmää. Vastaavanlaisten näytteiden näytekylveteissä muodostuu suuren proteiinipitoisuuden takia geeliä, mikä saattaa keskeyttää analysoinnin. (Cobas 2023: 3.)

## 5 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymys

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata Cobas e411-analysaattorin kokonais-B12-vitamiinin mittausten menetelmän toistettavuutta. Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa, että analysaattorilla saadaan analysoitua kokonais-B12-vitamiinin pitoisuuden mittaustuloksia luotettavasti sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistettavuuksista Metropolian verifiointi-vaatimuskriteereitä mukaillen. Tutkimuskysymys oli:

1. Kuinka Metropolian Cobas e411-analysaattorin mittaamien tuloksien variaatiokertoimet sarjan sisäisestä ja sarjojen välisistä toistettavuuksista vertautuvat laitevalmistajan ilmoittamiin variaatiokertoimien tulostasoihin?

## 6 Opinnäytetyön menetelmät

Opinnäytetyö toteutettiin empiirisenä tutkimuksena, minkä Heikkilä (2014) määrittää havainnoivana tutkimuksena. Tutkimusmenetelmänä käytettiin kvantitatiivista menetelmää, jolla pystytään hahmottamaan sen hetkistä olemassa olevaa tilannetta. Kvantitatiivisella menetelmällä saadaan määrällistä tietoa, jota voidaan analysoida tilastollisin menetelmin. (Heikkilä 2014: 15.) Tutkimusasetelman suunnittelussa käytettiin Metropolian verifiointisuunnitelmakaavaketta.

### 6.1 Aineisto

Toistettavuuksien mittaamisessa käytetyt näytteet olivat Cobaksen valmistamia kontrollinäytteitä: PreciControl Varia level 1 ja level 2. Kokonais-B12-vitamiinin pitoisuudet kontrollinäytteissä olivat: PreciControl Varia 1:ssä väliltä 240–476 pmol/l, keskiarvoltaan 358 pmol/l, ja PreciControl Varia 2:ssä väliltä 441–1005 pmol/l, keskiarvoltaan 723 pmol/l (Cobas Value Sheet). Fimlabin (2023) laboratorion kokonais-B12-vitamiini pitoisuuden viiteväli on 145–570 pmol/l. Huslabilla (2024) ja Synlabilla (2021) viitevälit ovat samat eli 138–652 pmol/l. Toistettavuuksien mittauksessa käytössä olleista kontrollinäytteistä PreciControl Varia 1 osoittaa siis kokonais-B12-vitamiinin viitevälin pitoisuutta ja PreciControl Varia 2 taas viitevälin ylittäviä korkeita kokonais-B12-vitamiinin pitoisuutta. Laboratorioiden viitevälien ala-arvot ovat matalampia kuin kontrollierän PreciControl Varia 1:ssä ja molemmat kontrollinäytteet voisivat saada samoja arvoja pitoisuuksien 441–476 pmol/l väliltä.

Kontrollinäytteiden valmistaja oli myös määrittänyt kontrollinäytteille keskihajonnan suuruuden 1 SD:lle, jota käytetään  $\pm 1$  SD-välin laskemiseen keskiarvon ympärille (ks. taulukko 2). Taulukossa 2 on myös mittauksessa käytössä olleiden kontrollinäytteiden erä- ja vanhenemistiedot. Kontrollinäytteiden keskihajontaa käytetään laaduntarkkailussa arvioitaessa mittauksen tulosten tarkkuutta eli paikkansa pitävyyttä (LabCe).

Taulukko 2. Kontrollinäytteiden tiedot (Cobas Value Sheet mukailten).

	LOT	EXP	pitoisuusväli	ka	1 SD	1 SD-väli
<b>PreciControl Varia 1</b>	71538899	31.5.2025.	240–476	358	53.4	304,6– 411,4
<b>PreciControl Varia 2</b>	71538899	31.5.2025.	441–1005	723	39.4	683,6– 762,4

Toistettavuuksien mittauksista saatiin numeerisia arvoja, mitkä ovat analysaattorin analysoimien kontrollinäytteiden tulokset. Sarjan sisäinen toistettavuus saatiin analysoimalla yhtä tiettyä kontrollinäytettä kymmenen kertaa peräkkäin. Sarjojen välistä toistettavuutta mitattiin taas analysoimalla samaa näytettä kymmenenä peräkkäisenä päivänä. Sarjojen välisen toistettavuuden mittausten tuloksilla osoitettiin, kuinka tulos muuttuu päivien välillä. Koska toistettavuusmittauksien tavoitteena oli verifiointin mukainen luotettavuus, oli tarkoituksen mukaista, ettei tulos muuttuisi merkittävästi mittausten välissä.

### 6.1.1 Aineiston analysointimenetelmä

Kontrollinäytteiden tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Tuloksien laskemiseen ja esittämiseen käytettiin Exceliä. Tuloksista analysoitua variaatiokerrointa verrattiin laitevalmistajan ilmoittamaan variaatiokertoimen tulostasoon.

### 6.1.2 Toistettavuuden parametrit

Parametrien laskukaavat ja matemaattiset merkitsemistavat löytyvät taulukosta 3. Keskiarvo tässä kontekstissa tarkoittaa näytteiden kokonais-B12-vitamiinin keskimääräistä pitoisuutta, kun jokaisen yksittäisen tuloksen mittausarvot ovat jaettu tasan jokaiselle

havainnolle. (Hägg 2016: 31; Nummenmaa & Holopainen & Pulkkinen 2014: 74–75). Keskihajonta kuvaa havaintoarvojen keskimääräistä hajontaa eli kuinka kaukana havaintoarvot ovat jakauman keskiarvosta (Nummenmaa & Holopainen & Pulkkinen 2014: 82–83). Variaatiokertoimella kuvataan tulosjoukon suhteellista hajontaa eli sillä ilmoitetaan kuinka monen keskiarvon päässä muuttujan arvot keskimäärin ovat keskiarvosta. Variaatiokerroin esitetään usein prosenttina, jolloin nähdään kuinka monta prosenttia tuloksien arvot keskimäärin poikkeavat keskiarvosta. (Nummenmaa & Holopainen & Pulkkinen 2014: 84.)

Taulukko 3. Toistettavuuden parametrien laskukaavat (Nummenmaa & Holopainen & Pulkkinen 2014: 74–75, 82–84 mukaillen).

Keskiarvo	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$
Keskihajonta	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$
Variaatiokerroin	$V = \frac{s}{\bar{x}}$

## 6.2 Aineiston keruu

Menetelmän testaus suoritettiin 23.1.–2.2.2024. Aloituspäivänä 23.1. tutustuttiin analysaattorin käyttöön ja huoltotoimenpiteisiin. Näihin lukeutuivat esimerkiksi ennen käyttöä laitteelle tehtävät toimenpiteet, joilla laite käynnistetään ja varmennetaan, että analysaattori toimii asiaan kuuluvalla tavalla, ja käytön lopettamistoimenpiteet. Toimenpiteet olivat laitevalmistajan määrittämän protokollan mukaisia. Huoltotoimenpiteistä pidettiin kirjaa koko menetelmän testaamisen ajan. Samoina päivinä analysaattoria käytettiin

myös laboraatiotunneilla, mutta toistettavuuden testaaminen tehtiin näiden tuntien ulkopuolisella ajalla. Analysaattorin laitepäiväkirjasta näkyi, että opiskelijoiden käytössä analysaattoria huollettiin samoilla periaatteilla ja heidän käytössään yksi analysaattorin pipeteistä (S/R-pipetti) oli puhdistettu 31. tammikuuta.

Testauksessa käytössä olleelle Cobas e411-analysaattorille ei ollut aiemmin suoritettu kokonais-B12-vitamiinin vakiointia, mikä tehtiin ensimmäisenä ennen mittauksessa käytettyjen kontrollinäytteiden analysointia. Vakiointi ei ensimmäisellä kerralla onnistunut ja analysaattori pyysi mittauskammion pesun, joka tehtiin. Vakiointi ajettiin uudelleen ja se onnistui toisella kerralla hyvin. Onnistuneella vakioinnilla myös kontrollit onnistuivat. Syyksi epäonnistuneelle vakioinnille epäiltiin mittauskammion tarvitsemaa pesua, jonka analysaattori oli pyytänyt.

Sarjan sisäinen toistettavuus tehtiin 29.1. jolloin käytettiin 23.1. liuotettua kontrollinäytettä ja samana päivänä (29.1.) liuotettua kontrollinäytettä. Kontrollinäytteet olivat yhtäläisiä REF-, LOT- ja EXP- tiedoiltaan. Täysin samasta kontrolliliuotuksesta ei pystytty toistettavuuksia mittaamaan, koska analysaattori ei kykene mittaamaan samasta näyteannostelukiposta kymmentä peräkkäistä näytettä, minkä vuoksi kontrollinäytemateriaali jaettiin kymmeneen eri näyteannostelukippoon. Samana päivänä liuotettua kontrollinäytettä ei yksinään myöskään olisi riittänyt näyteannostelukippoihin, jolloin käytettiin molempia liuotuseriä. PreciControl Varia 2 näytteistä 5. ja 6. näyte jouduttiin uusimaan, koska analysaattori ei ollut kyennyt pipetoimaan näytteitä ensimmäisellä mittauksella. Mittausten jälkeen jäljelle jäänyt kontrollimateriaali kerättiin niiden alkuperäispulloihin.

Sarjojen välistä toistettavuutta mitattiin analysoimalla kontrollinäytteet kerran päivässä jokaisena menetelmän testaus päivänä. Analysoinnissa käytettiin ensin 23. tammikuuta liuotettuja kontrollinäytteitä, mutta mittauksien tulosten suureneminen ja kontrollimateriaalin hupeneminen aiheutti sen, että viimeiset mittaukset olivat eri liuotuserästä. Näihin luokituvat viimeisten neljän päivän (30.–31.1. ja 1.–2.2.) tulokset. Huomioitava on myös se, että myöhemmin liuotettua kontrollierää oli käytetty edeltävästi jo sarjan sisäisen toistettavuuden analysoinnissa, mikä suoritettiin 29. tammikuuta.

Reagensseja ja kontrollinäytteitä säilytettiin analysointien välissä jääkaapissa. Reagenssit olisivat säilyneet koko mittausmenetelmän testaamisen ajan myös analysaattorilla, mutta analysaattoria käyttivät myös opiskelijat laboraatio-oppituntien aikana samoina päivinä, minkä vuoksi todettiin laadun olevan tasaisempaa, jos reagenssit ovat

välillä jääkaapissa. Tämän lisäksi opiskelijoiden käytössä olevissa analysaattoreissa harvemmin säilytetään reagensseja vaan ne palautetaan jääkaappiin oppituntien päätteeksi, minkä vuoksi samalla tavalla toimiminen menetelmän testaamisen aikana vastaa myös totuudenmukaisemmin laboratorion sen hetkisiä käytäntöjä.

Reagenssit ja kontrollit piti lämmittää takaisin analysaattorin lämpötilaan seisottamalla niitä huoneenlämmössä. Seisotusajat vaihtelivat ja olivat reagenssien kohdalla 45–85 minuuttia ja kontrollinäytteiden kohdalla 15–30 minuuttia. Seisotuksessa otettiin huomioon se, että liuoksien vähetessä ovat niiden tarvitsema lämpenemisaika lyhyempi. Lämpenemisajoista pidettiin kirjaa koko toistettavuuksien mittauksien ajan.

## 7 Tulokset

### 7.1 Sarjan sisäinen toistettavuus

Sarjan sisäisen toistettavuuden mittauksissa käytettiin aikaisemmin valmistettua kontrollia, jota oli tähän asti säilytetty koko ajan jääkaapissa, sekä samana päivänä liuotettua saman LOT:n kontrollia. Sarjan sisäisen toistettavuuden mittaustulokset on koottu taulukkoon 4. Kontrollinäytteiden liuotuspäivät ovat erotettu toisistaan taulukossa tähdellä, jolloin tähdettömät kontrollinäytteet ovat 23.tammikuuta liuotetusta erästä ja tähdelliset 29. tammikuuta liuotetusta erästä (ks. taulukko 4).

Taulukko 4. Sarjan sisäisen toistettavuuden mittaustulokset

Sarjan sisäinen	1	2	3	4	5*	6*	7*	8*	9*	10*
PreciControl Varia 1	359,3	378,3	367,9	341,5	352	348,4	371,9	344	350,5	355,9
PreciControl Varia 2	731,7	744,7	733,8	739,7	737,5	720,7	740,5	739,2	729,1	717,9

Taulukko 5. Sarjan sisäisen toistettavuuden analysointitulokset mittauksista

	ka	s	CV%-tulokset	Tavoiteltu Cv%
<b>PreciControl Varia 1</b>	356,97	11,63	3,26	2,7
<b>PreciControl Varia 2</b>	733,48	8,31	1,13	2,2

PreciControl Varia 1:n kohdalla huomataan, että Metropolian Cobas e411-analysointilaitteilla mitatut tulokset eivät pysy tavoitellussa valmistajan ilmoittamassa variaatiokertoimen tulostasossa (ks. taulukko 5). Laittevalmistajan ilmoittamaan variaatiokertoimeen prosenttiyksikköjen ero on 0,56 ja näiden prosentuaalinen eroavaisuus on ~ 21 %. PreciControl Varia 2:n kohdalla sarjan sisäinen toistettavuus pysyi tavoitellussa laitevalmistajan ilmoittaman tulostasossa (ks. taulukko 5). Sarjan sisäisessä toistettavuudessa näkyy, että matalamman tason kontrollin (PreciControl Varia 1) keskihajonta on laaja, minkä vuoksi laatutavoite ylittyy (ks. taulukko 5).

## 7.2 Sarjojen välinen toistettavuus

Sarjojen välisen toistettavuuden mittaustulokset on koottu taulukkoon 6. Liotuspäivältään eroavat kontrollinäytteet, joiden vaihdos tapahtui 30. tammikuuta, näkyvät taulukossa korostetusti tähdellä (ks. taulukko 6).

Sarjojen välinen	23.1.	24.1.	25.1.	26.1.	27.1.	29.1.	30.1.*	31.1.*	1.2.*	2.2.*
<b>PreciControl Varia 1</b>	348,3	332	366	370,8	402,4	418,1	388,1	364,4	343,8	366,1
<b>PreciControl Varia 2</b>	731,3	709,6	734,9	745,1	775,3	757,6	772,9	718,1	696,6	718,4

Taulukko 6. Sarjojen välisen toistettavuuden mittaustulokset

Taulukko 7. Sarjojen välisen toistettavuuden analysointitulokset mittauksista

	ka	s	CV%-tulokset	Tavoiteltu Cv%
<b>PreciControl Varia 1</b>	370	25,21	6,81	4,2
<b>PreciControl Varia 2</b>	735,98	25,22	3,43	4,1

PreciControl Varia 1:n mitattu variaatiokerroin ylittää tavoitellun laitevalmistajan ilmoittaman variaatiokertoimen (ks. taulukko 7). Prosentuaalinen eroavaisuus on ~ 62 % ja numeerisesti prosenttiyksikköinä ero on 2,61. PreciControl Varia 2:n mitattu variaatiokerroin pysyy kuitenkin tavoitellussa laitevalmistajan ilmoittamassa variaatiokertoimen rajoissa ja tulos on itseasiassa jopa valmistajan ilmoittamaa tulostasoa parempi (ks. taulukko 7).

## 8 Pohdinta

### 8.1 Tulosten tarkastelu

Toistettavuuksien mittaustulokset eivät ole pysyneet analysaattorin valmistajan ilmoittamassa tulostasossa eivätkä tulokset täten vastaa mukailtuja Metropolian verifiointi-vaatimuskriteereitä. Korkeamman tason kontrollilla (PreciControl Varia 2) analysoitiin laitevalmistajan ilmoittamaan tulostason sopivia mittaustuloksia, mikä ei toteutunut normaalitason kontrollin (PreciControl Varia 1) mittaustuloksissa. Sarjojen välisessä toistettavuudessa PreciControl Varia 1:llä ero mittaustulosten variaatiokertoimen ja laitevalmistajan ilmoittaman variaatiokertoimen välillä oli jopa n. 62 %.

Miettiessä syitä toistettavuuksien mittaustuloksiin palattiin tarkastelemaan menetelmäohjeita. Menetelmäohjeissa lukee, että Cobas e411-analysaattorilla tarvitsee kokonais-B12-vitamiinin mittausten menetelmälle suorittaa joka seitsemäs päivä uusi vakiointi, kun samat reagenssit ovat olleet käytössä analysaattorilla (Cobas 2023: 3). Tämä johtunee siitä, että reagenssit vanhenevat seitsemännen päivän kohdalla. Menetelmäohjeessa kerrotaan myös, että reagenssit säilyvät avaamisen jälkeen 60 päivää, jos reagensseja

säilytetään vaihtelevasti jääkaapissa ja analysaattorilla, kunhan reagenssien säilytysaika analysaattorilla ei ylitä kymmentä kertaa kahdeksan tuntia (Cobas 2023: 2). Tekijälle menetelmäohjeista jäi epäselväksi, kuinka avatut reagenssit vanhenevat, jos niitä säilytetään jääkaappilämpötilassa muu aika, minkä eivät ole analysaattorilla analysointien aikaan, ja miten se vaikuttaa reagenssien tarpeeseen vakioinnille. Etenkin, koska jääkaappilämpötila poikkeaa analysaattorin reagenssien säilytysosion lämpötilasta, jolloin tarve uudelle vakioinnille saattaisi olla myöhäisempi. Tekijä päätti luottaa siihen, että kontrollituloksissa näkyisi tarve uudelle vakioinnille tai analysaattori ilmoittaisi vakiointitarpeesta, kuten sen toiminnalle kuuluu. Jälkikäteen ajateltuna olisi ollut hyödyllisempää vahvistaa ymmärrystä ottamalla yhteyttä laitevalmistajaan.

Mittaustulosten analysointitulosten perusteella on kuitenkin todennäköisestä, että yksi syy mittaustuloksille on puuttuva vakiointi, koska analysaattorille tehtiin vain kerran vakiointi 23. tammikuuta reagensseille, jotka avattiin toistettavuuksien mittaamista varten. Tekijällä on siis käynyt virhe, koska vakiointia ei tehty lainkaan uudestaan ensimmäisen päivän onnistuneen vakioinnin jälkeen. Tätä näkemystä tukee myös se, että seitsemännen mittauspäivän kohdalla aiemmalla kontrolliliuotus erällä tulokset ylittivät selkeästi 1 SD:n rajan, minkä vuoksi vaihdettiin mittaamiseen tuoreempi kontrolliliuotus erä, jolla analysointi uusittiin. Tuoreemman kontrolliliuotus erän tulokset näkyvät taulukossa 6, päivän 30. tammikuuta kohdalla. Mittauksien aikana jo epäiltiin tuloksien toistettavuutta ja pyrittiin pitämään mittausten tulokset 1 SD:n välillä. Tiedettiin, että analysaattori ilmoittaisi, jos vakiointi olisi vanhentunut, mutta näin ei käynyt kertaakaan testaamisen aikana, minkä vuoksi muutos kohdistui kontrolliin. Jos kontrollinäytteiden tulokset olisivat ylittäneet 2 SD:n rajan tai laaduntarkkailun sääntöjä, olisi vakioinnin tekeminen uudelleen ollut ensimmäinen vaihtoehto.

On mahdollista, että kontrollinäytteiden tulokset reagensseille olisivat ylittäneet 2 SD:n rajan jo kuudentena mittauspäivänä, mikä reagensseille oli seitsemäs päivä niiden avaamisesta, jos reagensseja olisi säilytetty analysaattorilla koko testaamisen ajan. Näin ei kuitenkaan päässyt tapahtumaan, koska reagensseja säilytettiin jääkaapissa koko analysointien ulkopuolinen aika. Ohjeiden tulkitsemisvirhe on siis vaikuttanut tuloksiin. Sarjan sisäinen toistettavuus mitattiin kuudentena mittauspäivänä eli seitsemäntenä päivänä reagenssien avaamisesta, minkä vuoksi sarjan sisäisen toistettavuuden mittaustuloksia ei myöskään voi pitää luotettavina.

Reagenssien vanhentumisen näkyminen seitsemänneistä mittauspäivästä lähtien ei kuitenkaan selitä, miksi neljänneistä päivästä lähtien PreciControl Varia 1:n keskihajonta on yhtä lailla liian laaja aiheuttaen sen, että mittaustulokset eivät tuonakaan aikana pysy valmistajan ilmoittamassa variaatiokertoimessa. Tähän on voinut vaikuttaa virhe vakioinnin ja/tai kontrollien liuottamisissa joko tekijän tai välineiden takia. Analyysaattori hyödyntää vakiointia mitatun arvon tulkintaan, minkä vuoksi vakioinnissa oleva virhe vaikuttaa merkittävästi tuloksiin aiheuttaen systemaattisen virheen. Koska virhe on tällöin aineiston keräämiseen liittyvässä tekijässä, on koko aineisto samansuuntainen, mikä kuvastaa systemaattisen virheen piirteitä. (Heikkilä 2014: 186.)

Virheet näkyvät paremmin PreciControl Varia 1:n mittaustuloksissa verrattuna PreciControl Varia 2:een, silti edes ”onnistuneita” PreciControl Varia 2:n tuloksia ei voi pitää luotettavina, koska vakiointi on epäluotettava ainakin jo viimeisen viiden mittauspäivän kohdalla, ellei jopa aiemmin systemaattisen virheen vuoksi.

Tuloksiin on todennäköisesti vaikuttanut myös reagenssien ja kontrollinäytteiden seisoittamisaikojen vaihtelut huoneenlämpötilassa. Toisaalta reagenssit ja kontrollinäytteet tarvitsivat lyhyemmän ajan lämpiämiseen sitä mukaa kun liuoksia hupeni.

Mielenkiintoista menetelmän testaamisen tuloksissa on se, että korkeamman tason kontrollinäytteen tulokset pysyivät valmistajan ilmoittamalla tulostasolla virheistä huolimatta, mutta normaalin tason kontrollinäytteen tulokset eivät pysyneet. Spekuloiden syynä voi olla eroavaisuudet siinä, että reagenssien vanheneminen näkyy aikaisemmin kokonais-B12-vitamiinin mittausvälissä normaalin pitoisuuden näytteissä, kun taas korkean pitoisuuden näytteissä myöhemmin.

## 8.2 Luotettavuus

Luotettavuutta arvioidaan validiteetin ja reliabiliteetin käsitteillä. Validiteetti kuvastaa, onko onnistuttu mittaamaan sitä, mitä piti, ja missä määrin. Reliabiliteetti on mittauksen kyky tuottaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tätä voidaan todentaa toistuvilla mittauksilla samasta tilastoyksiköstä. Samanlaiset tulokset kertovat, että mittaus on reliaabeli. (Heikkilä 2014: 186–187.)

Mittausmenetelmän toistettavuuden testaaminen ei ole onnistunut tavoitellulla luotettavuustasolla menetelmän vaatiman vakionnin puuttumisen takia sille ajankohdalle, kun

reagenssit olivat olleet avattuina seitsemän päivää. Mittausmenetelmän vakiointi vastaa mittauksen validiteetista, mitä varmistetaan kontrollinäytteiden analysoinnilla. Vakioinnin tarvitsemat ehdot eivät ole kuitenkaan toteutuneet koko mittauksen ajalta, minkä vuoksi validiteettikaan ei ole luotettava. Tästä syystä suoritettu mittausmenetelmän testaus ei luotettavasti kuvasta Cobas e411-analysaattorin kokonais-B12-vitamiinin mittausmenetelmän toistettavuutta.

Cobas e411-analysaattorin mittaustuloksien toistettavuudet eivät ole pysyneet valmistajan ilmoittamalla tulostasolla. Koska toistettavuus ei ole toteutunut, sille asetetuin luottamusehdoin ei tutkimuksen tuloksilla ole reliabiliteettia. Testauksessa ollutta mittausmenetelmää ei ole myöskään verifioitu, minkä vuoksi analysaattorilla kokonais-B12-vitamiinin mittaustulosten luotettavuutta ei ole vielä todennettu antavan objektiivisesti totuudenmukaisia tuloksia.

Opinnäytetyötä tehtiin rehellisesti ja työskentelyä dokumentointiin koko suorittamisen ajan päiväkohtaisesti. Dokumentoinnin ansiosta selvisi myös syy toistettavuuden mittaamiseen vaikuttaneeseen virheeseen. Työskentelyä tehtiin suunnitelmallisesti, tarkkaan ja huolellisesti, mutta laajempi kokemus Cobas e411-analysaattorin käytöstä olisi merkittävästi parantanut testauksen luotettavuutta. Virheen tunnistaminen ja siitä oppiminen kuitenkin mahdollistaa luotettavamman toteutuksen, kun B12-vitamiinin analysointia Cobas e411-analysaattorilla verifioidaan Hymy-kylää varten.

Tietoperustan koostamisessa käytettiin mahdollisimman ajankohtaista tietoa, jolloin useimpien valittujen artikkeleiden julkaisuajankohdat sijoittuivat vuosiin 2018–2024. Valinnoissa haettiin kattavia ja näkökulmiltaan hieman erilaisia aineistoja kokonaisvaltaisen ja yksityiskohtaisen näkemyksen saamiseksi B12-vitamiinista ja sen funktioista. Englanninkielisen aineiston paremman ymmärtämisen tueksi käytettiin lähteenä myös suomenkielisiä oppikirjoja aiheesta. Lähteiden valitsemisessa on käytetty alkuperäislähdeperiaatetta.

### 8.3 Johtopäätökset

Toisen vakioinnin puutteen takia tulokset eivät ole valideja, minkä vuoksi tulokset eivät vastaa Cobas e411-analysaattorin B12-vitamiinin mittausmenetelmän toistettavuutta todennukaisesti. Tästä syystä, ja todennäköisesti systemaattisesta virheestä, toistettavuuksien mittauksen tulokset näyttävät, että B12-vitamiinin mittaus ei ole luotettavaa Cobas e411-analysaattorilla.

Mittaustuloksiin vaikuttanee myös: seisottamisajan vaihtelut, saman näytteen jakaminen näyteannostelukippoihin, mikä aiheuttaa pitoisuuseroavaisuuksia, kontrollinäytteiden liuotuspäivien aiheuttamat erot, työvälaineistä johtuvat syyt (esim. pipetti), tekijän kokemus, ja saman analysaattorin opetuskäyttö bioanalytiikan opiskelijoiden laboraatiotunneilla samoina päivinä, vaikkakin eri ajankohtina.

Toistettavuuksien mittaukset tarvitsisivat suorittaa uudestaan korjatuilla toimenpiteillä, jotta saataisiin mitattua luotettavasti kokonais-B12-vitamiinin mittausmenetelmän toistettavuutta. Tällöin mittaustuloksissa näkyisi luotettavasti mittausmenetelmän toistettavuus, mitä voitaisiin arvioida.

### 8.4 Eettisyys

Opinnäytetyön toteuttamisessa sitouduttiin noudattamaan tutkimuseettisen neuvottelukunnan hyvän tieteellisen käytännön ohjeita (HTK-ohjeet). Opinnäytetyön aikana ei tehty vilppiä, joka voidaan jakaa kolmeen alaluokkaan: sepittäminen (engl. fabrication), vääristely (falsification, misrepresentation) ja plagiointi (plagiarism). Opinnäytetyötä ei myöskään tehty piittaamattomasti, mikä lukeutuu myös hyvän tieteellisen käytännön ohjeistuksiin. (Keiski ym. 2023: 16–18.) Sepittämistä määritellään HTK-ohjeissa tutkimustulosten tekaisemisena. Vääristely olisi tulosten valikointia ja/tai muuntelua perusteettomasti, olennaisten tulosten kertomatta jättämistä tai tietoperustan huolimattontaa käsittelyä, mikä voisi johtaa vääränlaisen tiedon kertomiseen. (Keiski ym. 2023: 16–17.) Opinnäytetyö tarkistettiin Metropolian ammattikorkeakoulun käytössä olevalla sähköisellä plagiaatintunnistusohjelmalla, Turnit, plagioinnin estämisen varmistamiseksi (Keiski ym. 2023: 3; Kettunen & Kärki & Näreaho & Päällysaho 2019: 3). Opinnäytetyössä käytettyihin kuviin, taulukoihin ja tutkimustuloksiin on merkitty tekijätiedot ja lähdet. Lähdetiedot ovat asianmukaisesti ja tekijäkohtaisesti merkitty heidän työnsä kunnioittamiseksi. Opinnäytetyön aikana ei käsitelty henkilötietoja eikä käytetty erillisesti

kerättäviä näytteitä, mikä vaatisi tutkimusluvan. Sopimus opinnäytetyöstä tehtiin Metropolian ammattikorkeakoulun kanssa.

## 8.5 Kehittämisehdotukset

Jos Hymy-kylän tarjontaan aiotaan ottaa B12-vitamiinin mittaaminen, suositellaan käyttöön paremmin soveltuvaa transkobalamiini-II:n sitoutuneen B12-vitamiinin mittausta. Transkobalamiini-II:ssa sitoutunut B12-vitamiini kertoo elimistön aktiivisessa muodossa olevan B12-vitamiinin pitoisuudesta, minkä pitoisuuden ollessa alle 20 pmol/l viittaa vahvasti B12-vitamiinin puutteeseen. Joissakin tapauksissa B12-vitamiinin puutetta voi ilmetä jo vähemmän matalissa pitoisuuksissa (20–70 pmol/l). Tällöin olisi hyvä tehdä lisätutkimuksia kuten homokysteiinin tai metyyylimalonaatin mittaukset. Aktiivisen B12-vitamiinin pitoisuus kokonais-B12-vitamiinin pitoisuudesta vaihtelee 10–30 %, minkä vuoksi kokonais-B12-vitamiinin mittaustulokset eivät viitevälissä ole yksilöön yhtä hyvin vertailtavissa kuin transkobalamiini-II:ssa sitoutuneen B12-vitamiinin kohdalla. (Färkkilä 2018.)

Mittausmenetelmän testaamisen suorittamisesta jäi ilmaan kysymys: miten reagenssien säilytyslämpötilat vaikuttavat reagenssien vanhenemiseen ja, miten se voidaan havaita kontrolliliuoksilla. Olisi mielenkiintoista nähdä vertailua eri menetelmien välillä, joissa on käytössä erilaiset reagenssit, mitkä myös reagoivat säilytykseen eri tavalla.

Ennen laboratoriopalvelujen tarjoamista Hymy-kylässä olisi merkittävää laatia toiminnalle selkeät toimintaa ohjaavat säännöt preanalytiikasta lähtien, koska kyseisellä osa-alueella tapahtuu eniten virheitä diagnostiikassa, mitkä heijastuvat muihinkin diagnostiikan portaille (Grönroos & Koskinen 2014). Tässä opinnäytetyössä virhe tapahtui preanalytiikan sijaan analytiikassa.

Olisi hyödyllistä myös laatia ohjaava verifiointien tarkistuslista ennen toteuttamista, mistä voisi olla apua opiskelijoiden itseohjautumisessa verifiointiin. Kokemukseen perustuen siihen voisi sisällyttää esimerkiksi mittausmenetelmän vaatimat vakiointisäännöt, reagenssimateriaalin riittävyden arvioinnin, ennen aloittamista pohdittua suunnitelmaa ns. hätätilanteisiin verifiointin onnistumiseksi ja aiemman julkaistun tutkimustiedon parempaa kartoitusta aiheesta, jolloin voisi vertailla verifiointin onnistumista toi-

saalla tehtyihin verifiointeihin. Tarkistuslistan avulla voisi ilmetä myös helpommin epäkohdat, joihin laitteen valmistajalta voisi tiedustella vastauksia ennen verifiointin aloittamista.

## 8.6 Ammatillinen kasvu

Etenkin ensimmäisenä opinnäytetyönä tämä työ on opettanut paljon koko opinnäytetyöprosessista ja vaiheista, joista se koostuu. Omakohtaisesti opinnäytetyön aiheen vaihdos tapahtui aika myöhään, mikä osaltaan vaikutti haasteisiin työstämisen aikana. Opinnäytetyövaiheiden suorittaminen osittain samanaikaisesti aiheutti sen, että alkuperäinen ajatus B12-vitamiinin verifiointista ei päässyt toteutumaan. Ainoastaan toistettavuuksien mittaamisen toteutuessa, päätettiin työn otsikko muuttaa. Aikaisemmalla osallistumisella suunnitelmaseminaariin, olisi voinut tulla aiemmin ilmi muutokset, joita opinnäytetyö olisi kaivannut verifiointin toteuttamiseen, kuten vaihtaminen kokonais-B12-vitamiinin verifiointista transkobalamiini II:ssa sitoutuneeseen B12-vitamiiniin. Kuitenkaan budjetti ei välttämättä näihin muutoksiin olisi riittänyt.

Kaiken kaikkiaan opinnäytetyön suorittaminen on ollut omalaatuinen kokemus huolimatta haasteista, joita todennäköisesti kohtaa työelämässäänkin. Kasvua on tullut ratkaisujen selvittämisestä ja pohdinnoista, kuinka edetä lopulliseen tulokseen. Opinnäytetyötä tehdessä sai työskennellä pitkäjänteisesti ja itsenäisesti aiheen kanssa, joka ennestään tuttu oli vain terminä. Tiedonkeräämisen aikana kehittyi runsaasti tieteellisten julkaisujen lukutaito ja orientoituminen tiedonhakuun luotettavista lähteistä parantui aiemmasta osaamisesta. Opinnäytetyön työskentelystä saamasta kokemuksesta näkee selkeästi polun, jolla tapahtuu virheistä oppimista, mikä kantaa tiedon ja kehittymisen tielle. Opinnäytetyön aiheissa pääsi laaja-alaisesti paneutumaan bioanalyytikon ammattitaidon kehittämiseen, jossa tutkimustieto, tietotaidot, viralliset säännökset ja käytäntö ohjaavat tekemistä. Erityisen työstä teki monivivahteinen aihe, B12-vitamiini, mikä saatiin esitellä yhtä lailla yksityiskohtaisesti kuin myös ymmärrettävästi. Monella tapaa verifiointin toteuttaminen ja sen vaiheet ovat tulleet tutuimmiksi ja helpommin lähestyttävämmiksi, vaikkei verifiointia tehtykään opinnäytetyönä. Luotettavuuden käsitteeseen tutustuminen ja syvemmän ymmärryksen muodostuminen työskentelyn aikana on vahvistanut merkittävästi osaamista myös potilasturvallisuuden ylläpitämisessä analytiikan näkökulmasta.

## Lähteet

Azazello 2005. Vitamin B12. Kuva. Creative Commons Attribution- Share Alike 3.0 Unported. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vitamin\\_B12.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vitamin_B12.png)>. Viitattu 21.1.2023.

Cobas 2023. Elecsys vitamin B12 II. Menetelmäohje. 1–3.

Cobas. Value sheet.

Fimlab 2023. B12-vitamiini. Päivitetty 24.1.2023. <<https://fimlab.fi/tutkimus/5929>>. Viitattu 27.3.2024.

Freese, Riitta & Voutilainen, Eeva & Mutanen, Marja 2021. B12-vitamiini eli kobalamiini. Teoksessa Mutanen, Marja & Niinikoski, Harri & Schwab, Ursula & Uusitupa, Matti (toim.). Ravitsemustiede. E-kirja. Duodecim.

Färkkilä, Martti 2018. B12-vitamiinin imeytymishäiriöt. Teoksessa Färkkilä, Martti & Iso-niemi, Helena & Heikkinen, Markku & Puolakkainen, Pauli (toim.). Gastroenterologia ja hepatologia. E-kirja. Duodecim.

Grönroos, Paula & Koskinen, Pertti 2014. Kliinisten laboratoriotutkimusten luotettavuus. Teoksessa Aaltonen, Leena-Maija & Rosenberg, Per (toim.). Potilasturvallisuuden perusteet. E-kirja. Duodecim.

Halczuk, Krzysztof & Kaźmierczak-Barańska, Julia & Karwowski, Bolesław T. & Karmańska, Aleksandra & Cieślak, Marcin 2023. Vitamin B12- Multifaceted In Vivo Functions and In Vitro Applications. *Nutrients* 15 (12). <<https://www.mdpi.com/2072-6643/15/12/2734>>. Viitattu 19.1.2023.

Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Publishing Oy. 12–15, 186–187.

HUSLAB 2024. B12-vitamiini, seerumista. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 3.4.2024. <[https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=1137&terms=s-b12-vit](https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1137&terms=s-b12-vit)>. Viitattu 3.4.2024.

HyMy-Kylä – hyvinvointia Myllypurosta. Mikä on HyMy-kylä? <<https://www.metropolia.fi/fi/asiakastyot-ja-palvelut/hyvinvointi-ja-terveyskyla>>. Viitattu 26.2.2024.

Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <<https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Viitattu 3.4.2024.

Jakubowski, Hieronim 2018. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiological Reviews* 99 (1). 555–604. Viitattu 19.1.2023.

Keiski, Riitta & Hämäläinen, Kari & Karhunen, Matti & Löfström, Erika & Näreaho, Susanna & Varantola, Krista & Spoo, Sanna-Kaisa & Tarkiainen, Terhi & Kaila, Eero &

Aittasalo, Minna (toim.). Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja. HTK-ohje. Helsinki: Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 3-4, 15–18. <[https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje\\_2023.pdf](https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf)>. Viitattu 23.2.2024.

Kettunen, Jyrki & Kärki, Anne & Näreaho, Susanna & Päällysaho, Seliina 2019. Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Arene Oy. Saatavilla: <[https://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%20C3%84YTET%20C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?\\_t=1578480382](https://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%20C3%84YTET%20C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?_t=1578480382)>. Viitattu 23.2.2024.

LabCe. Mean and Standard Deviation. <[https://www.labce.com/spg113775\\_mean\\_and\\_standard\\_deviation.aspx](https://www.labce.com/spg113775_mean_and_standard_deviation.aspx)>. Viitattu 19.4.2024.

Loikas, Saira 2015. B12-vitamiini. Teoksessa Porkka, Kimmo & Lassila, Riitta & Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). Veritaudit. E-kirja. Duodecim.

McCorvie, Thomas J. & Ferreira, Douglas & Yue, Wyatt W. & Froese, D. Sean 2023. The complex machinery of human cobalamin metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 46 (3). 406–420. Viitattu 19.1.2023.

Nummenmaa, Lauri & Holopainen, Martti & Pulkkinen, Pekka 2014. Tutkimusaineiston kuvaaminen numeerisesti. Teoksessa Hanste, Suvi & Uschanov, Tomi (toim.). Tilastolisten menetelmien perusteet. Helsinki: Sanomapro Oy. 74–75, 82–84.

Metropolian verifiointisuunnitelma. Sisäinen dokumentti.

SFS 15189. 2022. Lääketieteelliset laboratoriot. Laatu ja pätevyyttä koskevat vaatimukset. Suomen standardisoimisliitto SFS.

Siitonen, Timo & Koistinen, Pirjo 2015. Punasolujen tuotanto. Teoksessa Porkka, Kimmo & Lassila, Riitta & Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.). Veritaudit. E-kirja. Duodecim.

Synlab 2021. B12-vitamiinia tarvitaan punasolujen tuotannossa ja hermoston toiminnassa (S-B12-Vit). Päivitetty 27.7.2021. <<https://www.synlab.fi/tietopankki/b12-vitamiini/>>. Viitattu 3.4.2024.

Virdi, Sapna & McKee, Abbey M. & Nuthi, Manogna & Jadavji, Nafisa M. 2023. The Role of One-Carbon Metabolism in Healthy Brain Aging. *Nutrients* 15 (18). <<https://www.mdpi.com/2072-6643/15/18/3891>>. Viitattu 19.1.2023.

Zhang, Yu & Zhang, Rui & Yang, Xiaolin & Qi, Honglan & Zhang, Chengxiao 2018. Recent advances in electrogenerated chemiluminescence biosensing methods for pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 9 (1). 9–19. Viitattu 19.1.2024.