

Hemoglobiini Tacoma eri HbA1c-menetelmillä

Moona Kangastie

Anni Mäenpää

OPINNÄYTETYÖ
Elokuu 2024

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

KANGASTIE, MOONA & MÄENPÄÄ, ANNI:
Hemoglobiini Tacoma eri HbA1c-menetelmillä

Opinnäytetyö 75 sivua, joista liitteitä 7 sivua
Elokuu 2024

Glykoituneesta hemoglobiinista (HbA1c) puhutaan, kun glukoosi kiinnittyy hemoglobiinin beetaketjun N-terminaalisen päään valiiniaminohappoon. HbA1c-tutkimus on kliinisessä käytössä muun muassa diabeteksen hoitotasapainon seurannassa. Hemoglobiinista on olemassa erilaisia variantteja, jotka muuttavat hemoglobiinin rakennetta. Hemoglobiini Tacoma on hemoglobiinin beetaketjun variantti ja se todetaan usein sattumalöydöksenä. On viitteitä, että se voi vaikuttaa HbA1c-analyysimenetelmiin. Varianttia esiintyy Suomessa ja suomalaistaustaisella väestöllä. Etelä-Pohjanmaalla hemoglobiini Tacoman esiintyvyyttä on 2 %.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa hemoglobiini Tacoman tulostasosta sekä toistettavuudesta eri HbA1c-analyysimenetelmillä. Tarkoituksena oli verrata kuuden vieritestilaitteen (Abbott Afinion 2, Aidian QuikRead go, Roche Cobas b 101, SD Biosensor Standard F, Siemens Healthineers DCA Atellica ja Hemocue HbA1c 501) ja Sebian Capillarys 3 -analysointilaitteen HbA1c-tutkimuksen tuloksia Roche Tina-quant Gen 3 -menetelmän tuloksiin. Tutkimuksen aineisto koostui 22 normaalista ja 22 hemoglobiini Tacoma -näytteestä. Lisäksi selvitettiin kaikkien analysoitavien menetelmien toistettavuutta hemoglobiini Tacoma -näytteillä kahdella eri näytetasolla ja niitä vastaavilla normaaleilla näytteillä. Toistettavuudet tehtiin viisi kertaa. Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen klinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksikön kanssa.

Opinnäytetyön tutkimusmenetelmänä käytettiin kvantitatiivista tutkimusta. Laitteiden antamat tulokset käsiteltiin Excel-tilukkolaskentaohjelmalla. Tuloksia havainnollistamaan käytettiin hajontalukuja, systemaattista virhettä sekä kuvaajia ja taulukoita.

Johtopäätöksenä voidaan sanoa, että Standard F -vieritestilaitteet poikkeavat systemaattisesti tulostasomittauksissa hemoglobiini Tacoma -näytteillä. Tulosten poikkeavuus referenssimenetelmästä on keskimäärin 17 mmol/mol. Tulosten perusteella Standard F -vieritestilaitteet eivät välttämättä sovellu hemoglobiini Tacoma -näytteiden tutkimiseen. Tutkimuksen tulokset korostavat hemoglobiinipoikkeavuuksien tutkimisen ja huomioimisen merkitystä. Tämän vuoksi hemoglobiini Tacoman mahdollisia terveysvaikutuksia olisi jatkossa tärkeää tutkia.

Asiasanat: hemoglobiini Tacoma, hemoglobiini A1c, kvantitatiivinen tutkimus

ABSTRACT

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

KANGASTIE, MOONA & MÄENPÄÄ, ANNI:
Hemoglobin Tacoma by different HbA1c methods

Bachelor's thesis 75 pages, appendices 7 pages
August 2024

When glucose is attached to the N-terminus of the hemoglobin's beta chain's valine amino acid, it forms a unit called glycated hemoglobin, also known as HbA1c. HbA1c is an important marker for evaluating glycemic control in diabetes. There are multiple variants of hemoglobin, where the structure is altered by mutations. Hemoglobin Tacoma is a beta chain variant, and it is often discovered as an incidental finding. Hemoglobin Tacoma is especially prevalent in Finland and in individuals with Finnish background. In Southern Ostrobothnia, the variant appears in 2 % of the population.

The objective of this thesis was to acquire information about hemoglobin Tacoma results and repeatability with different HbA1c analysis methods. The purpose was to compare the results of six different point-of-care analyzers (Abbott Afinion 2, Aidian QuikRead go, Roche Cobas b 101, SD Biosensor Standard F, Siemens Healthineers DCA Atellica, and Hemocue HbA1c 501) and Sebia Capillarys 3 Tera analyzer to the Roche Tina-quant Gen 3 method results. The research material consisted of 22 normal samples and 22 hemoglobin Tacoma samples. Additionally, repeatability of analyzed methods was tested with hemoglobin Tacoma samples and normal samples corresponding with them at two different levels. Repeatability was tested five times. The thesis was produced in co-operation with the Clinical Chemistry and Microbiology Unit of the South Ostrobothnia Wellbeing Services County

The thesis used a quantitative research method. The results were analyzed with Microsoft Excel. They were exemplified by standard deviation, bias, graphs, and tables.

In conclusion, the results of the study showed that the Standard F point-of-care analyzer systematically deviates in the result comparison with hemoglobin Tacoma samples. The average deviation from the reference method was 17 mmol/mol. According to the results, the Standard F point-of-care analyzer may not be suitable for the analysis of hemoglobin Tacoma samples. The results of the study highlight the importance of studying and recognizing hemoglobinopathies. Further research of the health effects of hemoglobin Tacoma could be beneficial.

Key words: hemoglobin Tacoma, hemoglobin A1c, quantitative research

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	HEMOGLOBIINI JA SEN OMINAISUUDET	7
	2.1 Glykoitunut hemoglobiini eli HbA1c.....	9
	2.2 Hemoglobiinipoikkeavuudet	10
3	HEMOGLOBIINI TACOMA	12
	3.1 Hemoglobiini Tacoman tunnistaminen kapillaarielektrofooresilla .	13
	3.2 Aiemmat tutkimukset.....	15
4	LAITTEET JA MENETELMÄT	17
	4.1 Roche Tina-quant Gen 3.....	17
	4.2 Abbott Afinion 2.....	18
	4.3 Aidian QuikRead go	20
	4.4 Roche Cobas b 101	21
	4.5 SD Biosensor Standard F	23
	4.6 Siemens Healthineers DCA Atellica	25
	4.7 Hemocue HbA1c 501	27
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	30
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT.....	31
7	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS.....	32
	7.1 Aineiston keruu	32
	7.2 Näytteiden analysointi	33
	7.3 Aineiston analysointi	34
8	TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA	36
	8.1 Laitteiden tulostaso	36
	8.2 Laitteiden toistettavuus	48
9	TUTKIMUKSEN EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS.....	57
10	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA.....	60
	LÄHTEET.....	64
	LIITTEET	69
	Liite 1. Laittevalmistajien ohjeita	69
	Liite 2. Vieritestilaitteiden kontrollituloksia.....	70
	Liite 3. Normaali näytteiden bias %.....	72
	Liite 4. Tacoma-näytteiden bias %.....	73
	Liite 5. Yhteenveto laitteiden tulostasosta.....	74
	Liite 6. Näytteiden näyteenotto- sekä analysointipäivät	75

1 JOHDANTO

Punasoluissa sijaitsevalla hemoglobiinilla on elimistön kannalta monia tärkeitä tehtäviä mm. hapen ja hiilidioksidin kuljetus, mutta se liittyy myös muihin tärkeisiin ilmiöihin. Punasolun kiertäessä elimistössä keskimäärin 120 vuorokautta, sen hemoglobiiniosaan liittyy glukoosia koko tänä aikana. (Leppäluoto ym. 2019, 118–119; Ilanne-Parikka 2019.) Tällöin syntyy glykoitunutta hemoglobiinia eli HbA1c:tä, joka on tärkeä tutkimus mm. diabeteksen diagnostiikassa ja sen hoitotasapainon seurannassa (Ilanne-Parikka 2019).

Hemoglobiinista on olemassa erilaisia variantteja, jotka muuttavat hemoglobiinin rakennetta tai määrää (Bain 2006, 20). Hemoglobiinivariantit voivat virheellisesti nostaa tai laskea HbA1c tulosta, mikäli ne häiritsevät diagnostisesti käytettävää analyysimenetelmää. Lisäksi variantit voivat aiheuttaa virheellisiä tuloksia, mikäli variantti vaikuttaa esimerkiksi punasolun oletettuun 120 vuorokauden elinikään. (Strickland ym. 2017, 1901; Ilanne-Parikka 2019.) Potilaan oikeanlainen hoito edellyttää hemoglobiinivariantin tunnistamista. Mikäli potilaalla todetaan hemoglobiinivariantti, klinikon tulisi pohtia voiko tuloksia verrata viitearvoihin vai vain potilaan aiempiin tuloksiin. (Little & Roberts 2009, 451; Dasauni ym. 2022; Kangastupa ym. 2023, 56.)

Tähän mennessä erilaisia hemoglobiinivariantteja on löydetty jo yli 1400, joista tässä opinnäytetyössä keskitytään yhteen: hemoglobiini Tacomaan (Giardine ym. 2023). Opinnäytetyön aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksikön sairaalakemisti Päivikki Kangastuvalta, joka on tutkinut kyseistä varianttia. Hän tutki hemoglobiini Tacoman yleisyyttä Suomessa käyttäen menetelmänä kapillaarielektroforeesia. Tutkimuksessaan Kangastupa ym. (2023) kertoo kyseistä varianttia löytyvän Etelä-Pohjanmaalta eniten (2,0 %) muihin tutkimuksessa oleviin sairaanhoitopiireihin verrattuna. On kuitenkin huomioitava, että kapillaarielektroforeesi HbA1c menetelmää ei ole suunniteltu varianttien tunnistamiseen, mutta sillä voidaan havaita ja joskus myös tunnistaa variantteja niiden ominaisen elektroferogrammin perusteella. On lisäksi viitteitä, että hemoglobiini Tacoman tulokset voivat erota eri menetelmien välillä. (Kangastupa ym. 2023, 52, 55–56; Kangastupa 2023a.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa hemoglobiini Tacoman tulos-
tasosta sekä toistettavuudesta eri HbA1c-menetelmillä. Tarkoituksena on verrata
kuuden vieritestilaitteen (Abbott Afinion 2, Aidian QuikRead go, Roche Cobas b
101, SD Biosensor F, Siemens Healthineers DCA Atellica ja Hemocue HbA1c
501) ja Sebian Capillarys 3 -analysointilaitteen HbA1c-tutkimuksen tuloksia Roche
Tina-quant Gen 3 -menetelmän tuloksiin. Lisäksi selvitetään kaikkien analysoita-
vien menetelmien toistettavuutta hemoglobiini Tacoma-näytteillä kahdella eri
näytetasolla ja niitä vastaavilla normaaleilla näytteillä.

2 HEMOGLOBIINI JA SEN OMINAISUUDET

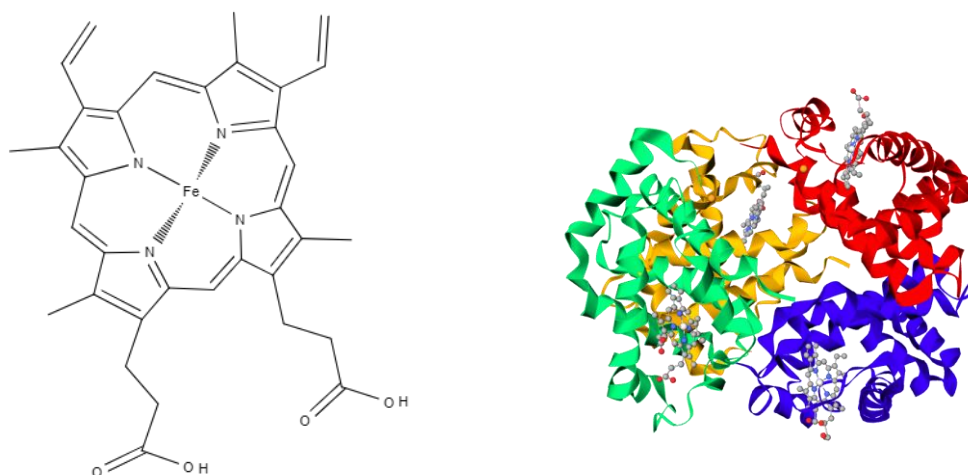
Veren punainen väri johtuu verenkierrossa kiertävien punasolujen hemoglobiinista, joka on rautaa sisältävä proteiini. Punasolujen hemoglobiinin rauta-atomeihin sitoutuu sisäänhengityksestä tullutta happea, jota kuljetetaan elimistön solujen käytettäväksi. Punasolujen rakenteen vuoksi hapen kuljettaminen elimistössä on tehokasta. Tämän lisäksi punasolujen aineenvaihdunta on anaerobista eli ne eivät kuluta itse kuljettamaansa happea. (Hoffbrand & Moss 2016, 88, 92–93; Leppäluoto ym. 2019, 118–119.) Happea tarvitaan elimistössä soluhengitykseen. Soluhengityksen lopputuotteena syntyy hiilidioksidia, jota hemoglobiini kuljettaa keuhkoihin ja sitä kautta elimistön ulkopuolelle. (Leppäluoto ym. 2019, 162, 174–178.)

Hemoglobiinin proteiinirakenne mahdollistaa sen monet eri tehtävät ja ominaisuudet elimistössä. Hemoglobiini koostuu aminohapoista, jotka muodostavat polypeptidiketjuja. Polypeptidiketjujen toisessa päässä on aminoryhmä ja toisessa karboksyyliiryhmä. Hemoglobiini koostuu yhteensä neljästä polypeptidiketjusta eli globiiniketjusta. Aikuisella nämä globiiniketjut ovat yleensä kaksi alfaketjua ja kaksi beetaketjua. (Heino & Vuento 2020, 42–45, 51–52, 57.) Alfaketjua koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 16 ja ketju on 141 aminohappoa pitkä. Beetaketjua koodaava geeni on kromosomissa 11 ja ketju on pituudeltaan 146 aminohappoa. (Burtis & Bruns 2015, 501; Heino & Vuento 2020, 57.)

Globiiniketjujen laskostuttua ne ryhmittyvät neljäksi alayksiköksi eli tetrameeri rakenteeksi. Laskostumisen aikana kuhunkin alayksikköön muodostuu hydrofobinen tasku, jossa sijaitsee rautaa (Fe^{2+}) sisältävä hemiryhmä. (Bain 2006, 4–5, 215; Heino & Vuento 2020, 47–49, 51–52.) Punasolujen kuljettama happi sitoutuu juuri tähän hemoglobiinin hemiryhmään. Tetrameeri rakenteessa globiiniketjut ovat vuorovaikutuksessa keskenään ja muodostavat näin yhden kokonaisen molekyylin (kuva 1). (Bain 2006, 4–6; Heino & Vuento 2020, 51–52.)

Hemoglobiinista on olemassa erilaisia muotoja riippuen niiden alayksiköistä. Aikuisilla esiintyy eniten **hemoglobiini A:ta (HbA)**, joka koostuu kahdesta alfa- ja kahdesta beetaketjusta. Hemoglobiini A:ta on elimistön kaikista hemoglobiinista

noin 96–98 %. Hemoglobiinista on kuitenkin myös muita muotoja, joissa kahden alfaketjun kanssa on liittyneenä gamma- tai deltaketjuja. Kun kaksi alfaketjua on liittyneenä kahden gammaketjun kanssa, puhutaan **fetaalihemoglobiinista (HbF)**. Tämä on vallitseva hemoglobiini muoto sikiökaudella, mutta aikuisella sitä on noin 0,5–0,8 %. (Mehta & Hoffbrand 2014, 15; Hoffbrand & Moss 2016, 88.) Sikiöt tarvitsevat fetaalihemoglobiinia hapen kuljettamiseen istukan läpi, koska HbA:n happiaffiniteetti on pienempi kuin HbF:llä (Mehta & Hoffbrand 2014, 50). HbF korvautuu HbA:lla yleensä kuuden kuukauden ikään mennessä. Mikäli kaksi alfaketjua on liittyneenä kahden deltaketjun kanssa, muodostuu **hemoglobiini A2 (HbA2)**. Hemoglobiini A2:ta on elimistössä noin 1,5–3,2 %. (Mehta & Hoffbrand 2014, 15; Hoffbrand & Moss 2016, 88.)



KUVA 1. Hemoglobiinin viivakaava sekä hemoglobiinin tetrameeri rakenne (Kuva: Anni Mäenpää).

Normaalisti aikuisen naisen hemoglobiiniarvo on 117–155 g/l ja miehen 134–167 g/l. Hemoglobiiniarvo laskee, mikäli elimistössä hajoaa punasoluja tai niitä ei tuoteta riittävästi. Syitä voivat olla esimerkiksi talassemiat sekä erilaiset anemiat esim. raudanpuuteanemia. (Tunturi 2022.) Joissain tilanteissa punasoluja voi olla ylimäärin, joka havaitaan hemoglobiiniarvon kohoamisena. Syitä voivat olla esim. elimistön reaktio pitkäaikaiseen liian vähäiseen hapensaantiin tai erilaiset geeni-mutaatiot esim. polysytemia vera eli punasolujen ylimäärä. (Lehto 2022.)

2.1 Glykoitunut hemoglobiini eli HbA1c

Verenkierrossa kiertävien punasolujen oletettu elinikä on keskimäärin 120 vuorokautta, jonka aikana veressä olevaa glukoosia sitoutuu ei-entsymaattisesti hemoglobiiniin (Penttilä, Halonen, Moilanen & Tiikkainen 2009, 25; Ilanne-Parikka 2019). Sitoutuminen tapahtuu kahdessa osassa. Ensimmäisessä vaiheessa glukoosin aldehydryhmä reagoi hemoglobiinin kanssa ja toisessa vaiheessa syntynyt molekyyli stabiloituu. Näiden vaiheiden jälkeen puhutaan glykoituneesta hemoglobiinista. (Penttilä ym. 2009, 25; Heino & Vuento 2020, 28.)

Diabeteksen diagnostiikassa ja seurannassa hyödynnetään hemoglobiini A1c:tä (HbA1c). HbA1c:tä muodostuu, kun glukoosi liittyy hemoglobiini A:n beetaketjun N-terminaalisen valiiniaminohapon kanssa. Hemoglobiini A1c edustaa elimistön glukoositasapainoa noin kahden kuukauden ajalta. (Penttilä ym. 2009, 25; Ilanne-Parikka 2019.) Glukoosin sitoutumista hemoglobiiniin tapahtuu sitä enemmän mitä suurempi veren glukoosipitoisuus on (Ilanne-Parikka 2019). Glukoosin liian suuri pitoisuus elimistössä vaikuttaa myös diabeteksen komplikaatioihin (Penttilä ym. 2009, 25; Ilanne-Parikka 2019).

Normaali HbA1c viitearvo on 20–42 mmol/mol ja diabeteksen diagnostinen raja on 48 mmol/mol. Aikaisemmin HbA1c-arvon on täytynyt olla toistuvasti 48 mmol/mol tai yli, mutta uuden Käypä hoito -suosituksen mukaan jo yksi 48 mmol/mol ylitys oikeuttaa diagnoosiin. (Insuliinipuutosdiabetes: Käypä hoito -suositus 2022; Tyypin 2 diabetes: Käypä hoito -suositus 2024.) Diabeteksen hoitotasapainossa ideaalina pidetään HbA1c-tulosta, joka on alle 53 mmol/mol. Kohdallaisen sokeritasapainon viiteväli on 53–75 mmol/mol ja huono sokeritasapaino on yli 75 mmol/mol. (Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialue 2022.) Poikkeavia tuloksia voi aiheuttaa punasolujen poikkeuksellinen elinikä, analyysimenetelmä sekä hemoglobiinipoikkeavuudet eli hemoglobiinopatit (Penttilä ym. 2009, 25, 27; Ilanne-Parikka 2019).

2.2 Hemoglobiinipoikkeavuudet

Hemoglobinopatiat tarkoittavat perinnöllisiä hemoglobiinimolekyylin poikkeavuuksia. Tällainen mutaatiosta johtuva poikkeavuus voi olla esimerkiksi määrällinen tai rakenteellinen. Hemoglobiinin määrällisiä poikkeavuuksia kutsutaan talassemioiksi. Talassemioissa hemoglobiinimolekyylin **globiiniketjun synteesiä säätelevällä alueella** on tapahtunut mutaatio, joka johtaa hemoglobiinin synteesin vähenemiseen. (Bain 2006, 20, 63.) Synteesin väheneminen aiheuttaa lisäksi epätasapainon globiiniketjujen määrässä, joka johtaa edelleen hemoglobiinin rakenteen epävakauteen (Wartiovaara-Kautto 2023). Kliinisesti merkittäviä talassemioita ovat alfa- ja beetatalassemiat, riippuen siitä kumpaan globiiniketjuun mutaatio vaikuttaa. Talassemiat aiheuttavat mm. hemolyyttistä anemiamia. (Bain 2006, 63; Wartiovaara-Kautto 2023.)

Hemoglobiinivariantit ovat hemoglobiinimolekyylin rakenteellisia poikkeavuuksia, jotka johtuvat **globiiniketjua koodaavalla alueella** tapahtuvista mutaatiosta, kuten esim. pistemutaatiosta, deleetiosta tai insertiosta. Hemoglobiinivariantit voidaan jakaa sen perusteella, missä globiiniketjussa (alfa, beeta, gamma, delta) mutaatio on tapahtunut. Mutatoitunut globiiniketju vaikuttaa myös mutaation seurauksiin. Mikäli mutaatio tapahtuu alfaketjussa se vaikuttaa hemoglobiineihin F, A ja A2. Mutaatio beetaketjussa vaikuttaa hemoglobiini A:han. Gammaketjussa tapahtuvat mutaatiot vaikuttavat hemoglobiiniin F ja deltaketjun mutaatiot vaikuttavat hemoglobiiniin A2. (Bain 2006, 20, 190; Burtis & Bruns 2015, 505–506.)

Tähän mennessä erilaisia hemoglobiini variantteja on löydetty ympäri maailmaa jo 1429 kappaletta (Giardine ym. 2023). Eri varianttien nimeämiseen käytetään esimerkiksi kirjaimia, variantin löytymispaikkaa sekä perheen sukunimeä, jolta variantti on löydetty. Nykyään käytetään myös systemaattista nimeämistä, jossa otetaan huomioon mutatoitunut ketju, mutaation sijainti ketjussa sekä aminohapon muutos. (Burtis & Bruns 2015, 505–506.) Yleisin hemoglobiinivariantti on HbS, joka perittäessä molemmilta vanhemmilta aiheuttaa sairauden nimeltä sirpisoluanemia (Bain 2006, 141; Hoffbrand & Moss 2016, 215). Nimensä mukaisesti sairaudessa punasolut ovat sirpin mallisia. Tällöin hemoglobiinin beetaketjussa on tapahtunut pistemutaatio nukleotidissa 20 ja sen seurauksena kuudes

aminohappo glutamiini on vaihtunut valiiniksi. (Bain 2006, 139; Giardine ym. 2000.)

3 HEMOGLOBIINI TACOMA

Hemoglobiini Tacoma on hemoglobiinivariantti, jossa mutaatio on tapahtunut beetaketjussa. Hemoglobiini Tacoma jaetaan kahteen eri tyyppiin pistemutaation perusteella: Tacoma ja Tacoma II. Tacomaa esiintyy Amerikassa sekä Pohjois-Euroopassa, kun taas Tacoma II:sta esiintyy Lähi-Idässä. (Giardine ym. 2015; Giardine ym. 2021.) Tässä opinnäytetyössä keskitytään Tacomaan.

Tacomassa beetaketjussa kohdassa 93 typpiemäs guaniini muuttuu tymiiniksi ja Tacoma II:ssa samassa beetaketjun kohdassa guaniini muuttuu sytosiiniksi. Nämä molemmat pistemutaatiot aiheuttavat muutoksen aminohapossa 30, joka muuttuu arginiinista seriiniksi. (Giardine ym. 2015; Giardine ym. 2021.) Koska Tacoma on beetavariantti se vaikuttaa niihin hemoglobiinimuotoihin, joissa esiintyy beetaketju esim. HbA (Bain 2006, 190). Hemoglobiini Tacoma mielletään usein epävakaaksi hemoglobiinivariantiksi (Kangastupa ym. 2023, 55). Tämä aiheutuu mutaation aiheuttamasta konformaatiomuutoksesta hemoglobiini Tacoman rakenteessa (Tucker & Perutz 1977, 415, 417).

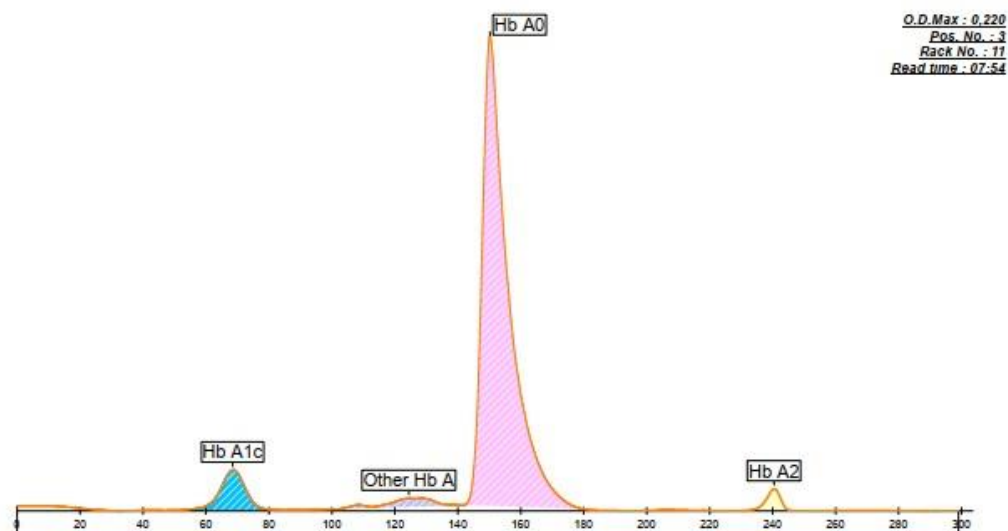
Hemoglobiini Tacomasta on löydetty hetero- ja homotsygoottisia muotoja (Brimhall, Jones, Baur & Motulsky 1969, 2125; Kangastupa ym. 2023, 52). Heterotsygoottisuus tarkoittaa, että samasta geenistä ilmenee kaksi erilaista muotoa eli alleelia (variantin periytyminen vain toiselta vanhemmalta). Yleisesti hemoglobiinivarianteilla heterotsygoottisuus ei yleensä aiheuta klinisiä oireita. Kun samasta geenistä ilmenee kaksi samanlaista alleelia (variantin periytyminen molemmilta vanhemmilta), puhutaan homotsygoottisuudesta. Homotsygoottisuus aiheuttaa yleensä suurempia terveyshaittoja. (Mehta & Hoffbrand 2014, 28–29.) Hemoglobiini Tacoman esiintyvyys on Etelä-Pohjanmaan alueella 2 % ja sen terveysvaikutuksia ei vielä tiedetä tarkasti. On kuitenkin viitteitä, että se vaikuttaa analyysimenetelmiin ja saatuihin tuloksiin. (Kangastupa ym. 2023, 51–52, 54.)

3.1 Hemoglobiini Tacoman tunnistaminen kapillaarielektroforeesilla

Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattori käyttää kapillaarielektroforeesimenetelmää (CE), jolla on mahdollista erottaa hemoglobiinivariantteja (Sebia 2022b). Kyseistä menetelmää käytetään kliinisissä laboratorioissa ja sille on ominaista nopea ja tarkka mittaaminen. Käyttökohde kliinisissä laboratorioissa on proteiinipoikkeavuuksien testaaminen sekä kroonisten sairauksien diagnostiikka ja seuranta. Laitteisto koostuu elektrodista, kapillaareista, puskuriliuoksesta, detektorista sekä virtalähteestä. (Weston & Brown 1997, 154; Sebia 2022a.)

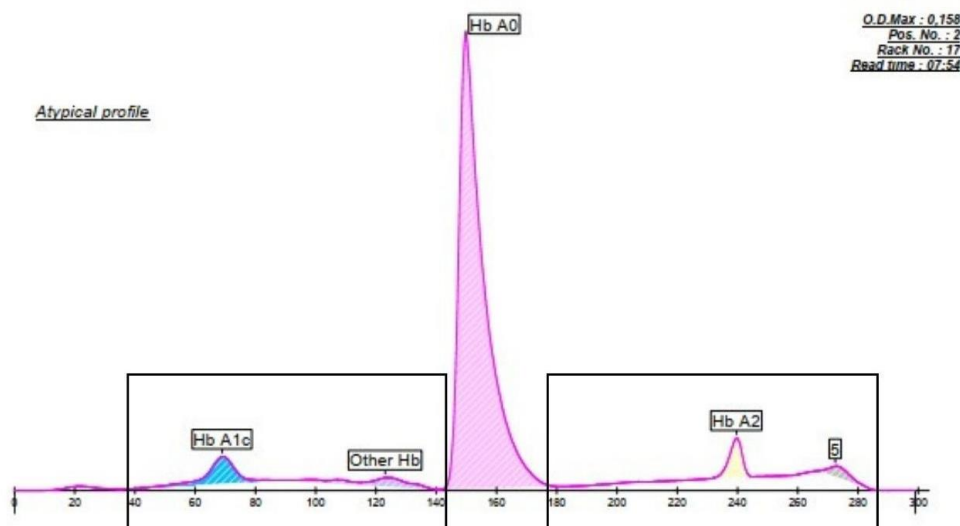
Menetelmä perustuu ionimuodossa olevien komponenttien liikkumiseen sähkökentässä eri nopeuksilla (Jaarinen & Niiranen 2008, 178). Eri komponentit erotetaan toisistaan kunkin elektroforeettisen liikkuvuuden ja pH:n avulla sähköosmoottista virtausta käyttäen. Kun kapillaariin muodostuu jännite, sinne injektoitu elektrolyyttiliuos liikkuu katodia eli negatiivista varausta kohti koko matkan tasaisella nopeudella. Tämän aikana detektori havaitsee elektrolyyttiliuoksen komponentit ja piirtää niistä elektroferogrammin. Detektorille saapuu ensimmäisenä kationit eli positiivisesti varautuneet ionit, sillä ne liikkuvat nopeammin kohti vastakkaisen varauksen omaavaa katodia. Tasaisen virtausnopeuden ansiosta kapillaarielektroforeesimenetelmällä saadaan aikaan hyvä erotuskyky, jonka ansiosta elektroferogrammissa on tarkat ja kapeat piikit. (Jaarinen & Niiranen 2008, 178–180; Sebia 2022a.)

Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorin HbA1c-menetelmää ei ole tarkoitettu hemoglobiinivarianttien tunnistamiseen, mutta osa varianteista voidaan kuitenkin havaita sen avulla (Sebia 2022c; Kangastupa ym. 2023, 52, 56). Kun HbA1c-näytteitä analysoidaan kapillaarielektroforeesimenetelmällä, tetrameerinen hemoglobiini hajoaa kahdeksi dimeeriksi. Hajoamisessa muodostuvat dimeerit ovat hererodimeerejä eli molemmat dimeerit sisältävät alfaketjun lisäksi beeta-, gamma- tai deltaketjun. (Kangastupa 2023b.) Glykoitunut hemoglobiini sekä eri hemoglobiinin muodot erottuvat elektroferogrammissa omina piikkeinään niiden koon ja varauksen perusteella (kuva 2). Lisäksi osa hemoglobiinivarianteista muuttaa molekyylin varausta, joten myös ne voivat erottua kapillaarielektroforeesissa, osa jopa omina piikkeinään. (Kangastupa ym. 2023, 52–53, 56; Kangastupa 2023b.)



KUVA 2. Normaalin HbA1c-näytteen elektroferogrammi (Kuva: Moona Kangastie).

Hemoglobiini Tacoma ja sen hetero- tai homotsygoottisuudesta riippuen elektroferogrammi piirtyy eri tavalla. Heterotsygoottinen hemoglobiini Tacoma näkyy yleensä elektroferogrammissa pohjaviivasta erottuvana litteänä piikkinä sekä elektroferogrammin loppuun muodostuvana piikkinä, joka muodostuu hajonneesta hemoglobiinista (kuva 3). Muita merkkejä Tacomasta on HbA2 prosentuaalinen nousu. Homotsygoottinen hemoglobiini Tacoma on haasteellisempi tunnistaa, sillä sen elektroferogrammi vaihtelee eri potilaiden ja eri analysointi kertojen välillä. Yhteistä kaikille homotsygooteille Tacoma-näytteille on, että menetelmä tunnistaa hemoglobiini Tacoman virheellisesti HbA0-piikiksi. Tämän seurauksena koko elektroferogrammi siirtyy oikealle. (Kangastupa ym. 2023, 52–55; Kangastupa 2023b.)



KUVA 3. Heterotsygootin hemoglobiini Tacoman elektroferogrammi, jossa elektroferogrammi nousee pohjaviivasta alueilla 40–140 ja 180–280 (Kuva: Moona Kangastie).

3.2 Aiemmat tutkimukset

Opinnäytetyön aiheesta on tehty kaksi aiempaa tutkimusta, jossa yhdessä verrattiin Afinionin vieritestilaitteen tuloksia Tosoh G8 -menetelmän tuloksiin tutkittaessa HbA1c-näytteitä. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voiko Afinionin vieritestilaitetta käyttää vaihtoehtoisena menetelmänä Tosoh G8 -menetelmälle HbA1c:n mittaamisessa Tacoma-potilaille. Idea syntyi siitä, että Afinionin vierestilaite käyttää boronaattiaffiniteetti määrittystä, jonka oletettiin olevan häiriötöntä. Menetelmään aiheutuu häiriötä, mikäli HbF:n pitoisuus on yli 15 %. Tutkimuksessa tutkittiin myös Rochen Tina-quant Gen 2 -menetelmän soveltuvuutta Tosoh G8 -menetelmän vaihtoehtoiseksi menetelmäksi. (Lenters-Westra, Strunk, Campbell & Slingerland 2017, 2–3, 5.)

Lenters-Westran ym. (2017) tekemässä tutkimuksessa näytteet kerättiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiristä, jossa ne analysoitiin Afinionin vieritestilaitteella ja lähetettiin tutkittavaksi Euroopan glykohemoglobiinin referenssilaboratorioon (ERL). Siellä näytteet tutkittiin kolmella eri menetelmällä: Tina-quant Gen 2 (Roche Diagnostics), Premier Hb9210 (Trinity Biotech) ja Tosoh G8 (Tosoh Bios-

cience). Premier Hb9210 käytettiin referenssimenetelmänä. Näytteet varmistettiin hemoglobiini Tacoma -varianteiksi DNA sekvensoinnin avulla. Suhteellinen ero verrattuna Premier Hb9210 -menetelmään oli Afionilla 16,8 %, Tosoh G8:lla 31,8 % sekä Tina-quant Gen 2 -menetelmällä 21,5 %. (Lenters-Westra ym. 2017, 3.)

Toinen aiheeseen olennaisesti liittyvä tutkimus on yhteistyötahon sairaalakemisti Päivikki Kangastuvan tutkimus. Tutkimuksessa haluttiin selvittää heterotsygoottisen hemoglobiini Tacoman ja muiden mahdollisten varianttien ilmenemistä Suomessa. Aiemmissä tutkimuksissa hemoglobiini Tacomaa on löytynyt suomalaisilta maahanmuuttajilta Ruotsista sekä Pohjois-Amerikasta. Tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 5059 HbA1c-näytettä Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorilla, joka käyttää kapillaarielektroforeesimenetelmää. Näytteitä kerättiin yhdestätoista sairaanhoitopiiristä, joista jokaisesta saatiin noin 500 näytettä. Osa hemoglobiini Tacoma -näytteistä varmistettiin geneettisellä testillä. (Kangastupa ym. 2023, 52.)

Koko 5059 näytteen määrästä hemoglobiini Tacoman heterotsygoottimuotoa löydettiin 38 näytteestä. Tutkimuksessa löydettiin Etelä-Pohjanmaalta myös hemoglobiini Tacoman homotsygoottinen muoto ja tutkimus on ensimmäinen, joka on osoittanut sen olemassaolon. (Kangastupa ym. 2023, 52.)

Tutkimuksessa kerrotaan, että hemoglobiini Tacoma on ensimmäistä kertaa kuvattu vuonna 1965. Hemoglobiini Tacomaa käsitteleviä tutkimuksia löytyy tähän päivään mennessä vain alle kaksikymmentä. Aiheesta tarvittaisiin lisää tutkimuksia, sillä variantin kliinisistä vaikutuksista on vain vähän tietoa. (Kangastupa ym. 2023, 54, 56.)

4 LAITTEET JA MENETELMÄT

Opinnäytetyössä käytetään suuria laboratoriotiloissa käytettäviä analysaattoreita, joita ovat Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattori sekä Rochen automaattiorata, jossa on Tina-quant Gen 3 -menetelmä. Seinäjoen keskussairaalassa Tina-quant Gen 3 -menetelmä on Rochen Cobas 8000 -laittekokonaisuuden c502-moduulilla. Hemoglobiini Tacoman tunnistamiseen käytetystä Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorin menetelmäperiaatteesta kerrotaan kappaleessa 3.1.

Näiden laitteiden lisäksi käytetään vieritestaukseen käytettäviä pienlaitteita. Vieritestausta ja vierianalytiikkaa käytetään silloin, kun laboratoriotulosta tarvitaan välittömästi potilaan hoitoon tai laboratorion palveluita ei ole saatavilla. Vieritestaus eli point-of-care testing (POC) on saanut nimensä siitä, että analytiikkaa tehdään potilaan lähellä esimerkiksi kotihoidossa. (Labquality 2021, 1, 1.1.) Opinnäytetyössä käytettäviä vieritestilaitteita ovat Afinion 2 (Abbott), QuikRead go (Aidian), Cobas b 101 (Roche), Standard F200 (SD Biosensor), DCA Atellica (Siemens Healthineers) sekä HbA1c 501 (Hemocue). Liitteessä 1 on esitetty mm. laitevalmistajien ilmoittamat näytteiden säilyvyysajat sekä tarvittavat näytemäärät. Tiedot liitteeseen on koottu laitevalmistajien menetelmäinserteistä. (Roche 2019, 6, 9, 11; Abbott 2020, 26–27, 29; HemoCue 2020; Roche 2022, 2–3, 5; Aidian 2023; SD Biosensor 2023; Siemens Healthineers 2023; Kangastupa 2024b.)

4.1 Roche Tina-quant Gen 3

Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmä käyttää turbidimetrista inhibiatioimmunomääritystä (TINIA). Menetelmässä HbA1c-näyte kilpailee polyhapteenin kanssa vapaana olevista HbA1c-spesifisistä vasta-aineista. Nämä vasta-aineet on suunnattu beetaketjun N-terminaalisen pään valiiniryhmää vastaan. Vasta-aine tunnistaa N-terminaalista päästä glykoituneen valiinin lisäksi kolme seuraava aminohappoa. Testi tunnistaa kaikki hemoglobiinivariantit, jotka ovat glykoituneet

beetaketjun N-terminaalista päästä sekä omaavat identtiset vasta-aineen tunnistavat alueet HbA1c:n kanssa. (Roche Diagnostics 2019, 10–11; Roche 2022,1.)

Menetelmässä näytteen HbA1c reagoi anti-HbA1c-vasta-aineen kanssa ja muodostaa antigeeni-vasta-aine-komplekseja. Kun lisätään puskuria sekä polyhapteeneja, polyhapteenit reagoivat ylimääräisen anti-HbA1c-vasta-aineiden kanssa. Tästä muodostuu liukenemattomia vasta-aine-polyhapteenikomplekseja, jotka voidaan määrittää turbidimetrisesti. Vapautunut hemoglobiini tunnustetaan sen tunnusomaisen absorptiospektrin perusteella jo esi-inkubaatiovaiheen aikana. (Roche Diagnostics 2019, 10–11; Roche 2022, 1.)

Tavallisimpien varianttien HbS, HbE, HbC ja HbD ei valmistajan mukaan pitäisi vaikuttaa HbA1c-tulokseen menetelmään valittujen vasta-aineiden vuoksi (Roche Diagnostics 2019, 10; Roche 2022, 1). Tämä perustuu siihen, että tavallisimmissa varianteissa mutaatio ei sijaitse N-terminaalisen pään neljässä ensimmäisessä aminohapossa. Menetelmän tunnistaman alueen aminohapposekvenssi ei siis muutu tavallisimmilla varianteilla. Tällä hetkellä tunnistetuista yli 1400:sta hemoglobiinivariantista vain 17:ssä epätavallisessa hemoglobiinivariantissa mutaatio on tapahtunut N-terminaalisen pään neljässä ensimmäisessä aminohapossa. (Roche Diagnostics 2019, 10–11; Giardine ym. 2023.)

4.2 Abbott Afinion 2

Afinion 2 on Abbottin vieritestilaitte, joka on suunniteltu mittaamaan esim. pitkäaikaisokkeria eli HbA1c:tä (kuva 4). Testikasetti sisältää reaktiosäiliöissä kaikki mittaukseen vaadittavat reagenssit kuten boorihappokonjugaatin sekä hemolysovan liuoksen (kuva 5). Menetelmänä laite käyttää boronaattiaffiniteettimäärittystä. Ensimmäisenä näyte laimennetaan nesteeseen, jossa hemoglobiinia vapautuu punasoluista. Tämän jälkeen vapautunut hemoglobiini saostuu. Saostunut seos siirtyy testikasetissa säiliöön, jossa on sininen boorihappokonjugaatti. Säiliössä boorihappokonjugaatti sitoutuu vain glykoituneen hemoglobiinin cis-dioli rakenne-teen kanssa. Reaktioseos jatkaa tämän jälkeen matkaansa testikasetin kalvoputkeen, jossa sijaitsee suodatinkalvo. Koko seos liuotetaan suodatinkalvon läpi ja

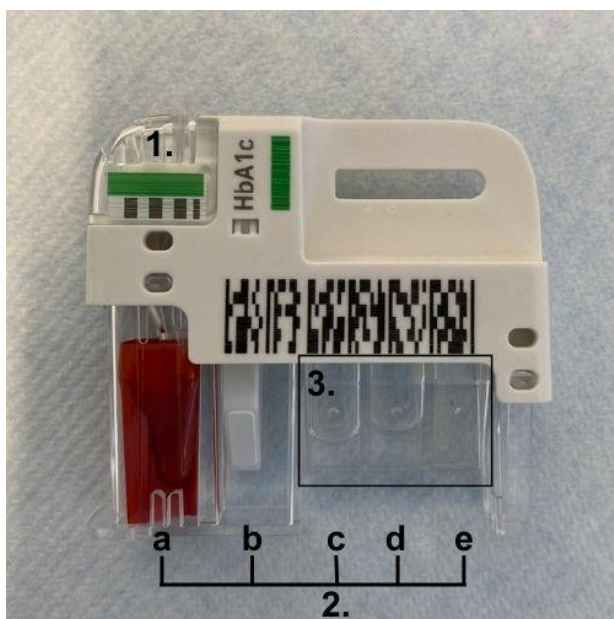
kaikki saostunut, niin konjugoitunut kuin konjugoimaton, hemoglobiini jää kalvolle. Ylimääräinen konjugaatti pestään testikasetin seuraavassa reaktiosäiliössä. (Abbott 2020, 25–26.)

Analysaattori antaa numeerisen tuloksen kalvolla olevan saostuman perusteella. Mittaaminen tapahtuu laskemalla valon voimakkuutta. Voimakkuus lasketaan glykoituneesta hemoglobiinista syntyvästä sinisen valon heijastuksesta ja kokomais-hemoglobiinista syntyvästä punaisen valon heijastuksesta. Näiden valojen voimakkuuden välinen suhde on suoraan verrannollinen näytteen HbA1c prosenttiosuuteen, jonka laite antaa yksikössä mmol/mol. (Abbott 2020, 25,29.)

Analysaattorilla on muutamia häiritseviä tekijöitä sekä rajoituksia, mutta merkittäviä häiriöitä ei ole havaittu näytteistä, joiden hemoglobiinin varianttien pitoisuudet olivat alle 7 %. Yhdeksi häiritseväksi tekijäksi mainittiin glukoosi, kun sen pitoisuus on yli 10 g/L. Testin rajoituksena on näytteet, joissa punasolujen elinkaari on jostain syystä lyhentynyt. Tällöin punasolujen altistuminen glukoosille vähenee, joka aiheuttaa virheellisesti liian matalia HbA1c-arvoja. Testaukseen ei voida myöskään käyttää hyytynyttä näytettä. (Abbott 2020, 30–31.)



KUVA 4. Afinion 2 -vieritestilaite (Kuva: Anni Mäenpää).



KUVA 5. Afinion 2 -vieritestilaitteen testikasetti. 1. Näytteenotin 2a. Konjugaatti 2b. Kalvoputki 2c. Pesuliuos 2d) Hemolysoiva liuos 2e. Tyhjä 3. Optisesti luettava alue (Kuva: Anni Mäenpää).

4.3 Aidian QuikRead go

QuikRead go on Aidianin valmistama vieritestilaite, jolla pystytään määrittämään mm. HbA1c:tä (kuva 6). Mittausmenetelmä on immunoturbidimetrinen ja HbA1c-tulos saadaan saostumisreaktion avulla. Näytettä otetaan näytteenottimella, asetetaan kyvetiin ja lisätään reagenssikorkki päälle. Reaktio tapahtuu kyvetissä, jossa on hemolysoivassa liuoksessa lateksipartikkeleita. Hemolysoituneista punasoluista vapautunut hemoglobiini ja HbA1c sitoutuu passiivisesti lateksipartikkeleihin siinä suhteessa kuin niitä veressä esiintyy. Kyvetistä vapautuu HbA1c-vasta-aineita ja ne sitoutuvat lateksipartikkelien HbA1c:en ja aiheuttaa saostumisreaktion. Saostumisreaktion samentuma mitataan fotometrisesti ja sen määrä on verrannollinen HbA1c:n määrään. (Aidian 2023.)

Analysaattorin antamia tuloksia täytyy arvioida kriittisesti, mikäli potilaalla on tila, joka aiheuttaa lyhentynyttä punasolujen elinikää. Tällaisia tiloja ovat mm. raskaus, kohonnut fetaalinen hemoglobiiniarvo tai sirppisoluanemia. (Aidian 2023.)



KUVA 6. QuikRead go -vieritestilaite sekä testin suorittamiseen käytettävät välineet (Kuva: Moona Kangastie).

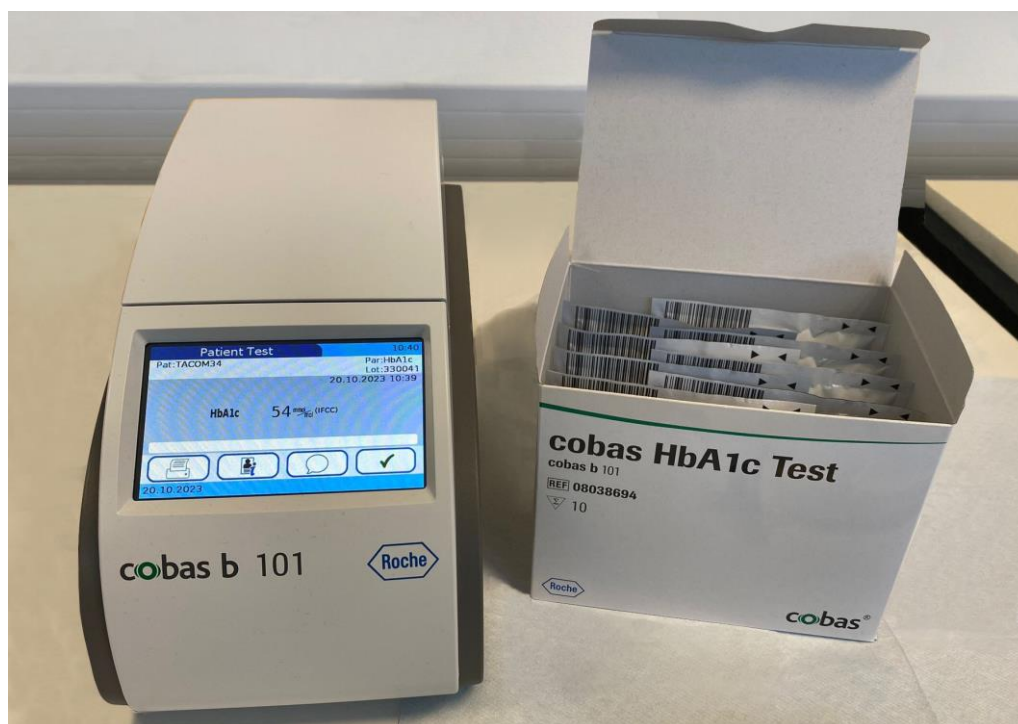
4.4 Roche Cobas b 101

Cobas b 101 -vieritestilaite on suunniteltu mm. glykoituneen hemoglobiinin eli HbA1c:n kvantitatiiviseen mittaamiseen (kuva 7). Testikasetti imee verinäytteen automaattisesti sisäänsä ja tällöin testikasetti on asetettava analysaattoriin alle minuutissa. Testikasetti sisältää kaikki tarvittavat reagenssit sekä agglutinaatioon vaadittavat lateksipartikkelit (kuva 8 ja 9). Laitteen mittausmenetelmä perustuu immunokompleksien syntymiseen ja niiden detektioon. (Roche 2019, 4–7.)

Reaktio tapahtuu kyvetissä kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa näyte laimentuu ja sekoittuu TRIS-puskuriin, jonka tehtävänä on vapauttaa punasoluista mitattava hemoglobiini. Puolet näytteestä siirtyy reaktiokammioon ja sekoittuu natriumlauryylisulfaatin kanssa (SLS). Tämä hapettaa hemoglobiinin, jolloin muodostuu SLS:n ja värillisen kromoforin yhdiste. Tästä reaktiosta syntyvän värin määrä mitataan 525 nm:n aallonpituudella. Näytteestä läpi pääsyn valon määrä on verrannollinen kokonaishemoglobiinipitoisuuteen. (Roche 2019, 5.)

Toisessa vaiheessa HbA1c denaturoidaan kaliumferrisyaniidilla ja sakkaroosilauraatilla. Denaturoitu HbA1c sitoutuu lateksipartikkelissa olevaan HbA1c-vasta-aineeseen. Agglutinaattori reagoi ylimääräisten anti-HbA1c-vasta-aineiden kanssa ja muodostuu immunokompleksi, joka mitataan 625 nm:n aallonpituudella. HbA1c pitoisuus korreloi käänteisesti agglutinaation määrään. Tulos ilmoitetaan mitatun kokonaishemoglobiinipitoisuuden ja HbA1c-tuloksen suhteena. (Roche 2019, 5.)

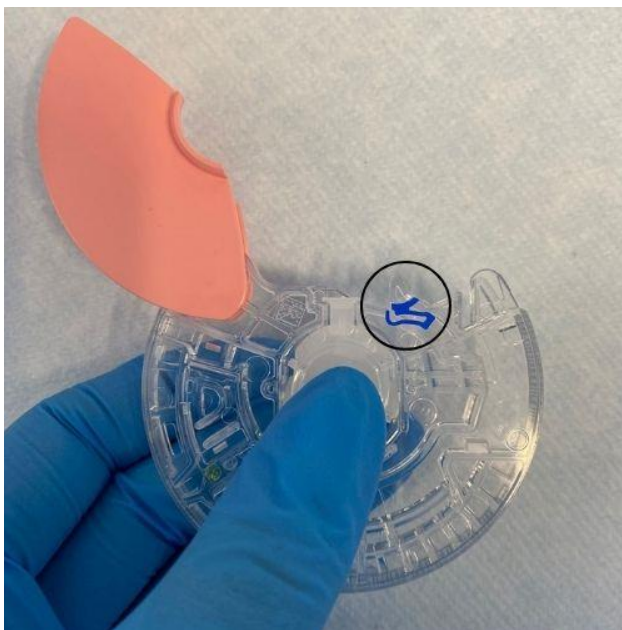
Analysaattoria käytettäessä on huomioitava hemoglobiinivarianttien vaikutus, sillä ne voivat vaikuttaa punasolujen elinikään sekä hemoglobiinin glykoitumiseen. Tämän seurauksena kaikki punasolujen elinikää lyhentävät tekijät aiheuttavat virheellisen matalia tuloksia. Testi on spesifinen hemoglobiineille, jotka ovat glykoituneet beetaketjun N-terminaalaisesta päästä, joten yleisimmät hemoglobiнопатiat kuten HbAS eivät häiritse mittausta. Analysaattorin antama tulos tulee aina suhteuttaa potilaan kliiniseen kuvaan. (Roche 2019, 9–11.)



KUVA 7. Cobas b 101 -vieritestilaite (Kuva: Anni Mäenpää).



KUVA 8. Cobas b 101 -vieritestilaitteen mittauskyvetti (etupuoli) (Kuva: Anni Mäenpää).



KUVA 9. Mittauskyvetin näytteenotto-osa (takapuoli) (Kuva: Anni Mäenpää).

4.5 SD Biosensor Standard F

SD Biosensor Standard F on fluoresenssi-immunomääritystä käyttävä vierestilaite, jolla voidaan määrittää HbA1c-tulos kvantitatiivisesti (kuva 10). Laitteen toimintaperiaate perustuu immunomääritykseen ja reflektometriaan. Testin suorittamiseen tarvitaan testilaite, lateksitabletti sekä puskuriliuosta sisältävä putki (kuva

11). Verinäyte imeytyy testikitin mukana tulleeeseen pipettiin automaattisesti. Tämän jälkeen pipetti asetetaan puskuria sisältävään putkeen ja sekoitetaan välttämättä ilmakehien muodostumista. Puskurin tehtävä on lyysata eli hajottaa punasolut sekä vapauttaa glykoitunut hemoglobiini eli HbA1c. Testissä käytettävä lateksitabletti sisältää siniseksi värjättyjä lateksimikropartikkeleita, jotka on konjugoitu spesifisiin vasta-aineisiin. (SD Biosensor 2023.)

Menetelmässä mitataan glykoitunutta hemoglobiinia sekä kokonaishemoglobiinia, joiden suhteena saadaan lopullinen tulos. Näyteseoksen siirtyessä testikalvolla lateksipartikkeliin sitoutunut HbA1c immobilisoituu anti-HbA1c-vasta-aineen päällystämään viivaan. Nämä anti-HbA1c-vasta-aineet sitoutuvat beetaketjun N-terminaalisen pääntä muutamien ensimmäisten aminohappojen. (SD Biosensor 2023.) Glykoituneen hemoglobiinin detektio perustuu siis sandwich-tyyppiseen menetelmään, jossa käytetään kahta vasta-ainetta (SD Biosensor 2023; Kangastupa 2024a). Testikasettiin muodostuu tämän seurauksena sininen viiva lateksimikropartikkeleissa olevista vasta-aineista, joiden määrä kuvastaa HbA1c:n pitoisuutta näytteessä. Kokonaishemoglobiini mitataan sille määritetyn vyöhykkeen värin intensiteettinä. Kemiallinen- ja immunologinen reaktio, jolla viivat ovat syntyneet testilaitteeseen, mitataan reaktioiden jälkeen optisella järjestelmällä. (SD Biosensor 2023.)

Analysaattori voi antaa epäluotettavia tuloksia potilaille, joilla on hemolyyttinen anemia tai mikrobi-infektio. Myös hematokriitin poikkeamat voivat vaikuttaa testitulokseen. (SD Biosensor 2023.)



KUVA 10. SD Biosensor F -vieritestilaite (Kuva: Anni Mäenpää).



KUVA 11. SD Biosensor F HbA1c-testiin tarvittavat välineet 1. Puskuriliuos 2. Testilaite 3. Pipetti (spoit) (Kuva: Anni Mäenpää).

4.6 Siemens Healthineers DCA Atellica

Siemensin Atellica DCA HbA1cDx -määrityksellä analysoidaan glykoitunutta hemoglobiinia kvantitatiivisesti (kuva 12). Verinäyte imetään kapillaaripidikkeeseen

ja asetetaan testikasettiin. Tämän jälkeen koko testikasetti asetetaan analysaattoriin (kuva 13). Kun testikasetti on analysaattorissa, folioliuska repäistään irti testikasetista, jolloin testikasettiin vapautuu analyysissä tarvittava puskuri. Analysaattori käyttää määrittämenetelmänä lateksiagglutinaatiomäärityksen inhibitiota. (Siemens Healthineers 2023.)

HbA1c-tuloksen saamiseksi näytteestä täytyy määrittää kokonaishemoglobiini sekä glykoitunut hemoglobiini. Kokonaishemoglobiini mitataan käyttämällä kaliumferrisyaniidia, joka hapettaa näytteen hemoglobiinin methemoglobiiniksi. Muodostunut methemoglobiini muodostaa reagenssikasetissa olevan tiosyanaatin kanssa kompleksin. Tästä syntyy värillistä tiosyaanimethemoglobiinia ja sen värin kehittymisen voimakkuus on verrannollinen kokonaishemoglobiinipitoisuuteen, kun mittausaallonpituus on 531 nm. (Siemens Healthineers 2023.)

Varsinaisen HbA1c:n mittaamiseen hyödynnetään lateksiagglutinaatiomäärityksen inhibitiota. Reaktioon tarvitaan agglutinaattoriksi synteettinen polymeeri, jossa on HbA1c:n immunoreaktiivisia osia. Tämän lisäksi tarvitaan HbA1c-spesifinen hiiren monoklonaalinen vasta-aine, joka sijaitsee lateksihiukkasissa. Näiden reagoidessa keskenään tapahtuu agglutinaatio, joka lisää valon sirontaa ja absorbanssia. Lisääntynyt absorbanssi havaitaan aallonpituudella 531 nm. Koverinäytteessä oleva HbA1c kilpailee rajallisista lateksihiukkasten vasta-aineiden sitoutumiskohdista. Tämän vuoksi agglutinaatio estyy ja valon sironta vähenee. Tämä havaitaan absorbanssin vähenemisenä mitattaessa aallonpituudella 531 nm. Vertaamalla absorbanssia HbA1c:n kalibrintikäyrään, saadaan määritettyä HbA1c-pitoisuus. Tulos saadaan HbA1c:n pitoisuuden ja kokonaishemoglobiinin pitoisuuden suhteena. (Siemens Healthineers 2023.)

Lääkärin tulee aina suhteuttaa analysaattorin antamat tulokset potilaan kliiniseen tilaan, sillä testillä on tiettyjä rajoituksia. Mikäli potilaalla on vaikea anemia tai polysytemia, täytyy analysointiin käyttää toista määrittäystapaa. Tilat, jotka vaikuttavat punasolujen eliniän lyhenemiseen aiheuttavat normaalia matalampia tuloksia. Virheellisen korkeita tuloksia esiintyy mm. lyijymyrkytyksissä sekä pernan puutumisessa. On tutkittu, että hemoglobiinivariantit HbAC, HbAD, HbAE sekä HbAS eivät vaikuta testitulokseen. (Siemens Healthineers 2023.)



KUVA 12. Atellica DCA -vieritestilaite ja testin suorittamiseen tarvittavat välineet (Kuva: Moona Kangastie).



KUVA 13. Atellica DCA:n testikasetti (Kuva: Anni Mäenpää).

4.7 Hemocue HbA1c 501

HemoCue HbA1c 501 on vieritestilaite, jolla voidaan analysoida HbA1c 501 -järjestelmällä pitkäaikaisokeria (kuva 14). Laite käyttää määrittämissä boronaat-

tiaffiniteetti menetelmää, joka erottaa glykoituneen ja ei-glykoituneen hemoglobiinin toisistaan. Testi aloitetaan asettamalla reagenssipakkauksen näytteenotto-osa näytteeseen, jolloin se imee näytteen automaattisesti. Tämän jälkeen kasettiosa asetetaan laitteeseen ja reagenssipakkaus painetaan kasetin sisälle (kuva 15). Tällöin reagenssipakkausten aineet vapautuvat ja analysointi alkaa. Testikasetti on käytettävä avaamisen jälkeen enintään kahden minuutin kuluessa. (HemoCue 2020.)

Reagenssipakkaus sisältää punasoluja hemolysoivia aineita, hemoglobiinia spesifisesti sitovia aineita sekä boronaattihartsia, joka sitoutuu glykoituneeseen hemoglobiiniin cis-dioli-rakenteeseen. Hemoglobiinin kokonaismäärä mitataan fotometrisesti optisen anturin hajaheijastuksella. Huuhteluliuksella huuhdellaan glykoitumaton hemoglobiini pois. Tämä mahdollistaa fotometrisen mittauksen. Lopussa näiden suhde lasketaan. (HemoCue 2020.)

Menetelmällä on muutamia rajoituksia, jotka liittyvät epänormaaleihin hemoglobiinipitoisuuksiin. Tällaisia ovat vakava anemia sekä polysytemiat. On kuitenkin tutkittu, että tavallisimmat hemoglobiinivariantit C, D, E ja S eivät aiheuta häiriötä analyysimenetelmään. Kuitenkin HbF arvot, jotka ovat yli 20 %, voivat aiheuttaa häiriötä. (HemoCue 2020.)



KUVA 14. HbA1c 501 -vieritestilaitte (Kuva: Moona Kangastie).



KUVA 15. Vieritestilaitteen testikasetti (Kuva: Anni Mäenpää).

5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa hemoglobiini Tacoman tulostasosta ja toistettavuudesta eri HbA1c-analyysimenetelmillä. Opinnäytetyön aihe on hyödyllinen kliinisen laboratorioalan kannalta, sillä siitä on erittäin vähän aiempaa tutkimustietoa. Työn tulosten pohjalta saadaan lisää tietoa siitä, kuinka variantti vaikuttaa analyysimenetelmien tuloksiin ja miten sen mahdollinen vaikutus näkyy tuloksissa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on verrata kuuden vieritestilaitteen (Abbott Afinion 2, Aidian QuikRead go, Roche Cobas b 101, SD Biosensor Standard F, Siemens Healthineers DCA Atellica ja Hemocue HbA1c 501) ja Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorin HbA1c-tutkimuksen tuloksia Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmän tuloksiin. Lisäksi selvitetään kaikkien analysoitavien menetelmien toistettavuutta hemoglobiini Tacoma -näytteillä kahdella eri näytetasolla ja niitä vastaavilla normaaleilla näytteillä.

Opinnäytetyön tarkoituksen pohjalta muodostuu kaksi tutkimuskysymystä:

1. Miten eri vieritestilaitteiden ja Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorin tulostaso on verrattavissa Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmän tulostasoan hemoglobiini Tacoma -näytteillä?
2. Miten hemoglobiini Tacoma vaikuttaa toistettavuuteen?

6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyössä käytetään kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusta. Kvantitatiivinen tutkimusprosessi etenee vaiheittain aloittaen tutkimusongelmasta tai tutkimuskysymyksistä ja päätyen tulosten analysointiin ja raportointiin. (Kananen 2015, 197, 203.) Määrällisellä tutkimusmenetelmällä pyritään vastaamaan kysymyksiin; kuinka paljon ja kuinka usein. Tutkimusmenetelmällä pyritään myös ymmärtämään miksi asiat ilmenevät tutkimuksen osoittamalla tavalla. (Vilka 2021, 23.)

Menetelmä perustuu numeerisiin arvoihin, prosentiosuuksiin, taulukoihin ja näiden kautta halutun ilmiön selittämiseen. Tutkimuksen muuttujat halutaan yleensä numeeriseen muotoon, jotta dataa voidaan käsitellä erilaisilla tilastollisilla ohjelmissa. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 140; Heikkilä 2014, 15–16.) Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla pyritään yleistämään tutkittava asia tilastollisen päätelyn avulla. Sen avulla pystytään yleensä hahmottamaan tilannetta, mutta asioiden varsinaisia syitä ei pystytä selvittämään kokonaisuudessaan. (Heikkilä 2014, 15.) Tutkimuksessa käytettävän otoksen tulee olla riittävän laaja ja edustava, jotta tutkimus olisi tarpeeksi luotettava. Lisäksi kvantitatiivisessa tutkimuksessa on tärkeää tutustua aiempaan teoriaan, tehdä johtopäätöksiä aiemmista tutkimuksista sekä määritellä tutkimuksessa käytettävät käsitteet. Lopuksi tutkimuksen tekijä tulkitsee numeeriset arvot sanalliseen muotoon ja kuvailee niiden merkitystä tutkimuksen kannalta. (Hirsjärvi ym. 2009, 140; Heikkilä 2014, 15–16.)

Kvantitatiivinen tutkimus sopii opinnäytetyön menetelmäksi, sillä saadut tulokset halutaan esittää numeerisessa muodossa. Tällöin opinnäytetyön tulokset ovat helppoiten tulkittavissa sekä havainnollistettavissa erilaisten taulukoiden ja kuvajien muodossa

7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyön aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksiköltä. Prosessin suunnittelu aloitettiin keväällä 2023. Opinnäytetyön suunnitelma valmistui elokuussa 2023, jonka jälkeen allekirjoitettiin opinnäytetyösopimus. Kesän ja syksyn 2023 aikana tutustuttiin lisää aiheeseen liittyvään teoriaan ja kirjoitettiin opinnäytetyön teoriaosuutta. Syyskuussa 2023 laitevalmistajien edustajat perehdyttivät vieritestilaitteiden toimintaperiaatteisiin sekä käyttöön. Näytteiden analysointi suoritettiin syys-lokakuussa 2023 Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksikön laboratoriotiloissa. Aineiston analysointia suoritettiin syksyllä 2023 ja sitä jatkettiin keväällä 2024.

7.1 Aineiston keruu

Aineisto kerättiin Seinäjoen keskussairaalassa vuoden 2023 syys-lokakuussa ja koostui Seinäjoen keskussairaalaan tulleista HbA1c-potilasnäytteistä. Näytteet olivat ylijäämänäytteitä, joten opinnäytetyön vuoksi potilailta ei tarvinnut ottaa ylimääräisiä näytteitä. Kaikki opinnäytetyössä käytettävät näytteet olivat K2 EDTA laskimoverta ja säilytettiin BD Vacutainerin 5 ml:n putkissa. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa 2–8 °C:ssa.

Näytteiden valinnassa hyödynnettiin Sebian Capillarys 3 Tera-analysaattoria, jonka muodostaman elektroferogrammin perusteella voidaan tunnistaa hemoglobiini Tacoma sekä normaali hemoglobiini. Laboratorion työntekijöitä ohjeistettiin säilyttämään kaikki saapuneet Tacoma-näytteet ja ottamaan niille vastaavaa tulostasoa oleva normaali näyte vastinpariksi. Sairaalakemisti Päivikki Kangastupa valitsi opinnäytetyöhön tulostasoltaan sopivat näytteet sekä identifioi ne viivakoodillisilla tarroilla potilastietojen suojaamiseksi. Näytteiden kerääminen aloitettiin viikolla 38 ja keräämisen aikana Tacoma-näytteitä kertyi noin 35 kappaletta, joista opinnäytetyöhön valikoitui 22 näytettä.

7.2 Näytteiden analysointi

Näytteet analysoitiin viikoilla 38–42. Näytteet analysoitiin viikoittain ja vähintään yhtenä päivänä viikossa. Analysointipäivät valikoituivat sitä mukaan, kun näytteitä kertyi. Näytteet analysoitiin Capillarys 3 Tera -analysaattorilla, Tina-quant Gen 3 -menetelmällä sekä jokaisella vieritestilaitteella. Analysoinnin Capillarys 3 Tera -analysaattorilla ja referenssimenetelmällä eli Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmällä suoritti laboratorion henkilökunta. Vieritestilaitteilla analysoinnin suorittivat opinnäytetyön tekijät.

Kaikille laitteille suoritettiin päivittäin laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti kontrollit ja mahdolliset kalibraatiot. Kontrolleista saadut tulokset kirjattiin ylös erillisille lomakkeille (liite 2). Kontrolli- ja reagenssierät pysyivät samoina kaikilla laitteilla koko prosessin ajan. Kaikki kontroleista saadut tulokset menivät kunkin valmistajan ilmoittamiin tavoitearvoihin. Ennen analysointia näytteet otettiin huoneenlämpöön ja niiden annettiin lämmetä. Jokaisen näytteen laatu tarkistettiin manuaalisesti ja näytteet sekoitettiin rauhallisesti ennen niiden käyttöä.

Opinnäytetyön tulostaso mittauksiin valikoitui yhteensä 44 näytettä eli 22 hemoglobiini Tacoma -näytettä sekä 22 normaalia näytettä. Aineistosta kaksi paria hylättiin, koska tulokset eivät pysyneet laitteiden mittausalueella. Kaikki näytteet analysoitiin yhden kerran jokaisella analysaattorilla. Mahdollisten poikkeavien tulosten tai virhekoodien kohdalla mittaus suoritettiin uudelleen.

Toistettavuus mittauksiin valittiin kahdeksan näytettä, jotka analysoitiin jokaisella laitteella. Mittaukset suoritettiin viisi kertaa matalalla ja korkealla tasolla. Ensimmäisenä mittaukset suoritettiin Cobas b101-, QuikRead go- ja Hemocue-vieritestilaitteilla sekä Capillarys 3 -analysaattorilla ja Tina-quant Gen 3 -menetelmällä. Lopuilla vieritestilaitteilla mittaukset suoritettiin eri päivänä ja eri näytteillä reagenssien saatavuusongelmien vuoksi. Näytteen säilyvyyttä testattiin muutamilla näytteillä kolmen päivän kuluttua analysoimalla ne uudelleen vieritestilaitteilla.

Jokaiselle laitteelle oli luotu tuloksien seurantaan lomake, johon kaikki saadut tulokset kirjattiin ylös. Mittausten ja kontrollien tulokset siirrettiin päivittäin sähköiseen muotoon Excel-taulukkolaskentaohjelmaan.

7.3 Aineiston analysointi

Työn tulokset analysoitiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla. Tunnusluikuna käytettiin sekä sijainti- että hajontalukuja. Sijaintiluvuista käytettiin keskiarvoa (\bar{x}), jota hyödynnettiin toistettavuuden mittaamisessa. Myös hajontalukuja käytettiin toistettavuuden mittaamisessa. Hajontalukuna käytettiin keskihajontaa (SD), joka kuvaa mitattujen arvojen sijoittumista keskiarvon ympärille (Heikkilä 2014, 86). Keskihajonta lasketaan kaavan (1) mukaisesti (Microsoft n.d.)

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (1)$$

Hajontaluvuista käytettiin lisäksi variaatiokerrointa eli suhteellista keskihajontaa (CV%). Tämä on keskihajonnan ja keskiarvon välinen suhde. Variaatiokertoimen avulla vertaillaan kahden otoksen keskihajontaa toisiinsa ja saadaan näin esille kahden eri muuttujan suhteellinen hajonta. (Heikkilä 2014, 87; Vilka 2021, 143–144.) Suhteellisen keskihajonnan laskeminen tapahtuu kaavan (2) esittämällä tavalla.

$$\text{CV\%} = \text{keskihajonta (SD)} / \text{keskiarvo} \times 100 \% \quad (2)$$

Analysoinnissa käytettiin lisäksi systemaattista virhettä (bias). Systemaattinen virhe laskettiin yksikköinä sekä prosentteina (bias%). Kaavoissa (3 ja 4) on esitetty systemaattisen virheen laskentatavat. Tämän perusteella saadaan tietoa tulostaseroista. Systemaattisen virheen vaikutus pysyy samana otoskoosta riippumatta (Heikkilä 2014, 177). Suhteellisen keskihajonnan ja systemaattisen virheen laskemiseen on käytetty kaavoja, jotka ovat käytössä Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen klinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksikössä.

$$\text{BIAS} = (\text{uusi/oma tulos} - \text{referenssitulos}) \quad (3)$$

$$\text{BIAS\%} = (\text{uusi/oma tulos} - \text{referenssitulos}) / \text{referenssitulos} \times 100 \% \quad (4)$$

Tuloksia analysoitiin myös Pearsonin korrelaatiokerroimen (r) avulla. Se kertoo muuttujien välisestä lineaarisesta riippuvuudesta, sen voimakkuudesta sekä suunnasta. Korrelaatiokerroin vaihtelee välillä $-1 \dots +1$ ja mikäli arvo on nolla, ei muuttujien välillä ole lineaarista riippuvuutta. Pearsonin korrelaatiokerroin perustuu oletukseen, että muuttujien välinen riippuvuus on lineaarinen. (Heikkilä 2014, 192–193; Kestilä-Kekkonen 2023.) Tuloksia tulkittaessa on myös muistettava, että otoskoon ollessa pieni voi yksittäinen poikkeavuus vaikuttaa korrelaatiokerroimeen huomattavasti. Selitysaste (R^2) kertoo kuinka paljon selittävä muuttuja selittää selitettävän muuttujan varianssista. Selitysaste saadaan laskettu suoraan Excel-tilukkolaskentaohjelman avulla, jolloin korrelaatiokerroimen arvo korotetaan toiseen potenssiin. (Heikkilä 2014, 76, 91, 178.) Opinnäytetyöhön valikoitiin tasaisesti eri tulostasoa olevia näytteitä, jonka vuoksi aineisto on symmetrinen. Tämän vuoksi aineistoin analysointi Pearsonin korrelaatiokerroimen avulla on perusteltua.

8 TULOKSET JA TULOSTEN TULKINTA

Opinnäytetyön tuloksia käsitellään alempana tulostason ja toistettavuuden osalta. Tulostason osalta tulokset koostuvat 40 potilaan tuloksista, joista jokainen analysoitiin yhden kerran jokaisella vieritestilaitteella, Sebian Capillarys 3 Tera -analysaattorilla sekä Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmällä. Koko 40 potilasnäytteen joukosta 20 on hemoglobiini Tacoma -näytteitä ja 20 normaaleja näytteitä. Toistettavuus mittaukset koostuivat kahdeksasta potilasnäytteestä. Tästä joukosta yhtä variantti ja yhtä normaalinäytettä käytettiin vain toistettavuusmittauksissa.

8.1 Laitteiden tulostaso

Tulostasoa kuvaamaan käytetään tunnuslukuina keskiarvoa sekä systemaattista virhettä yksikköinä (bias). Lisäksi tulostasomittauksia havainnollistamaan käytetään kuvaajia. Primaaritulokset sekä bias on esitetty taulukoissa 1–4. Opinnäytetyön vieritestilaitteiden sekä Capillarys 3 Tera -analysaattorin tuloksia ja niistä laskettuja bias eroja tarkastellaan vertaamalla niitä referenssimenetelmään eli Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmään. Suurimmaksi sallituksi poikkeavuudeksi laitteiden ja referenssimenetelmän välillä määriteltiin +/- 5 mmol/mol. Tällöin +/- 5 mmol/mol ja sitä suuremmat eroavaisuudet eivät ole hyväksyttäviä tuloksia. Tämä perustuu klinikoiden käyttämään sääntöön, jossa 5 mmol/mol eroa peräkkäisten HbA1c-näytteiden välillä pidetään merkittävänä muutoksena potilaan glykeemisen kontrollin kannalta (Sherwani ym. 2016, 102). Valintaa tukee myös IFCC:n laaduntarkkailukierroksen kriteerit HbA1c-analyytillille, jossa ≥ 5 mmol/mol poikkeamia ei voida pitää hyväksyttynä tuloksena. Kriteerien mukaan 3–3,9 mmol/mol poikkeamat ovat hyväksyttäviä, mutta 4–4,9 mmol/mol poikkeavuudet ovat jo huonoja tuloksia. (Weykamp 2023.)

Opinnäytetyön laitteiden antamat tulokset esitetään taulukoituna, joissa normaalinäytteet sekä hemoglobiini Tacoma -näytteet on esitetty eri taulukoissa. Kunkin laitteen systemaattinen virhe laskettiin yksikköinä ja ne on esitetty taulukoissa 2 ja 4. Lisäksi liitteissä 3 ja 4 esitetään systemaattinen virhe myös prosentteina (bias

%). Poikkeama on laskettu Tina-quantin Gen 3 -menetelmän ja jokaisen vierilaitteen välillä sekä vertailussa on mukana myös Capillarys 3 Tera -analysaattori. Muutamasta näytteestä suoritettiin uusintamittauksia, mutta uusintatuloksissa ei kuitenkaan havaittu merkittävää eroa alkuperäisiin tuloksiin.

Taulukossa 1 nähdään kaikkien näytteiden tulokset kaikilla laitteilla vierekkäin. Normaaleilla näytteillä kaikkien laitteiden antama tulostaso oli hyvin lähellä referenssimenetelmän eli Tina-quant Gen 3 -menetelmän tulostasoa, yksittäisiä poikkeuksia lukuun ottamatta.

TAULUKKO 1. Normaalien näytteiden tulokset

Normaali (mmol/mol)	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
	Normaali 1	69	69	66	69	60	61	65
Normaali 2	38	39	40	40	38	37	38	41
Normaali 3	67	67	62	66	67	62	65	64
Normaali 4	44	44	45	45	40	40	45	44
Normaali 5	54	56	54	56	57	53	61	55
Normaali 6	47	47	48	49	45	45	45	49
Normaali 7	51	50	51	53	50	44	49	52
Normaali 8	66	69	63	67	67	56	68	67
Normaali 9	25	29	31	29	27	30	29	29
Normaali 10	36	36	36	36	34	36	36	37
Normaali 11	37	38	37	39	35	38	37	38
Normaali 12	83	78	74	77	71	75	75	77
Normaali 13	41	43	42	43	40	43	42	43
Normaali 14	36	39	38	40	38	40	37	41
Normaali 15	41	42	42	44	41	42	40	42
Normaali 16	45	45	44	46	45	40	44	45
Normaali 17	49	50	48	52	48	48	49	49
Normaali 18	52	54	50	54	54	50	51	51
Normaali 19	36	35	37	38	34	37	36	36
Normaali 20	44	45	46	45	43	41	44	47

Taulukosta 2 nähdään eri laitteiden lasketut bias yksiköt verrattuna referenssimenetelmään. Suurin osa laitteiden tuloksista eroaa siitä maksimissaan +/- 5 yksikköä, mutta muutamissa näytteissä ero on suurempi. Ensimmäisen näytteen kohdalla (normaali 1) QuikRead go -sekä Standard F -vieritestilaitteet eroavat

huomattavasti enemmän muiden laitteiden tuloksista. Toinen merkittävä ero on näytteen 8 kohdalla, jossa Standard F -vieritestilaitteen antama tulos poikkeaa Tina-quant Gen 3 -menetelmän tuloksesta -10 yksikköä, kun muut poikkeavat korkeintaan +/- 3 yksikköä. Näyte 12 antoi kaikilla laitteilla matalampaa tulosta kuin referenssimenetelmä. Taulukosta voidaan havaita, että myös muilla laitteilla yksittäiset näytteet eroavat referenssimenetelmästä yli +/- 5 yksikköä.

TAULUKKO 2. Normaali näytteiden bias. Referenssimenetelmän tulokset lihavoitu ja +/- 5 mmol/mol erot merkitty vaalealla ja sitä suuremmat tummemmalla.

BIAS								
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
Normaali 1	69	0	-3	0	-9	-8	-4	1
Normaali 2	38	1	2	2	0	-1	0	3
Normaali 3	67	0	-5	-1	0	-5	-2	-3
Normaali 4	44	0	1	1	-4	-4	1	0
Normaali 5	54	2	0	2	3	-1	7	1
Normaali 6	47	0	1	2	-2	-2	-2	2
Normaali 7	51	-1	0	2	-1	-7	-2	1
Normaali 8	66	3	-3	1	1	-10	2	1
Normaali 9	25	4	6	4	2	5	4	4
Normaali 10	36	0	0	0	-2	0	0	1
Normaali 11	37	1	0	2	-2	1	0	1
Normaali 12	83	-5	-9	-6	-12	-8	-8	-6
Normaali 13	41	2	1	2	-1	2	1	2
Normaali 14	36	3	2	4	2	4	1	5
Normaali 15	41	1	1	3	0	1	-1	1
Normaali 16	45	0	-1	1	0	-5	-1	0
Normaali 17	49	1	-1	3	-1	-1	0	0
Normaali 18	52	2	-2	2	2	-2	-1	-1
Normaali 19	36	-1	1	2	-2	1	0	0
Normaali 20	44	1	2	1	-1	-3	0	3
ka	48,1	0,7	-0,4	1,4	-1,5	-2	-0,3	0,8

Tacoma-näytteiden tulokset on esitetty taulukossa 3. Tuloksista voidaan havaita, että Standard F -vieritestilaitte antaa kaikilla näytteillä korkeampaa tulostasoa verrattuna referenssimenetelmään sekä muihin vieritestilaitteisiin. Capillarys 3 Tera-analysointilaitteen tuloksissa on selkeää hajontaa. Osa tuloksista on hyvin samaa tasoa referenssimenetelmän kanssa, mutta osassa tuloksista on merkittävä ero.

TAULUKKO 3. Tacoma-näytteiden tulokset

Tacoma (mmmol/mol)								
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
Tacoma 1	74	72	68	73	69	92	70	78
Tacoma 2	33	34	37	37	32	48	31	41
Tacoma 3	63	63	64	64	54	84	58	85
Tacoma 4	37	37	41	39	36	54	36	39
Tacoma 5	45	55	50	56	42	62	54	57
Tacoma 6	51	49	53	51	45	66	46	59
Tacoma 7	55	54	53	55	56	71	50	60
Tacoma 8	76	74	75	74	66	97	73	98
Tacoma 9	30	32	32	31	29	49	30	52
Tacoma 10	36	34	33	36	30	50	31	34
Tacoma 11	34	35	36	36	32	50	34	48
Tacoma 12	77	79	76	75	74	99	75	97
Tacoma 13	38	40	41	40	38	53	39	54
Tacoma 14	41	40	40	42	36	55	38	58
Tacoma 15	40	38	41	41	37	56	38	50
Tacoma 16	43	40	43	44	40	61	41	70
Tacoma 17	45	45	46	47	44	60	41	59
Tacoma 18	52	56	54	54	52	67	50	63
Tacoma 19	35	38	37	38	35	53	31	41
Tacoma 20	49	51	50	50	48	71	45	62

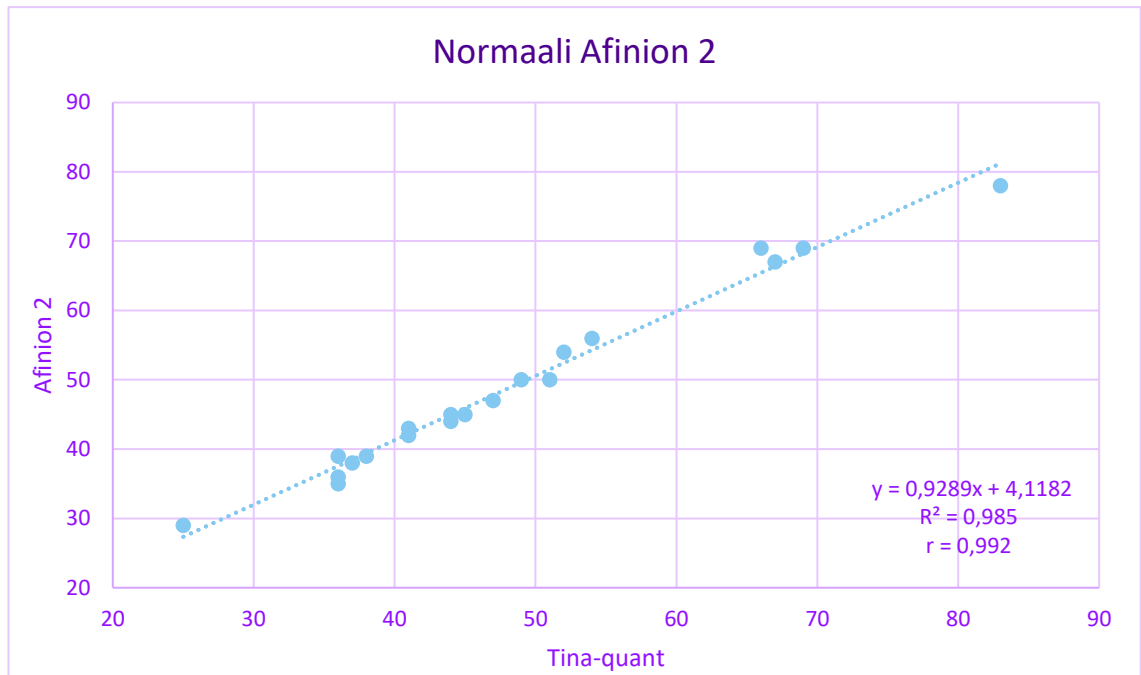
Taulukosta 4 voidaan havaita, että Standard F -vieritestilaitteen ero referenssimenetelmään on pienimmillään 14 yksikköä ja suurimmillaan 22 yksikköä. Capillarys 3 Tera -analysointilaitteella saadaan suurimman eron referenssimenetelmään nähden, joka on suurimmillaan 27 yksikköä, mutta pienimmillään kuitenkin vain +/- 2 yksikköä. Tacoma 5 -näytteen tulokset eroavat kaikilla vieritestilaitteilla suhteellisen paljon referenssimenetelmään nähden. Vieritestilaitteet, jotka muilla näytteillä antavat lähes samaa tulosta, eroavat tällä näytteellä selkeästi referenssimenetelmän tuloksesta. Afinion 2 -vierestilaite eroaa 5 näytteen kohdalla 10 yksikköä ja Cobas b 101 -vierestilaite 11 yksikköä. Näistä molemmat laitteet ovat muiden näytteiden kohdalla antaneet hyvää tasoa referenssimenetelmään nähden. Näytteen 5 kohdalla QuikRead go -vierestilaitteen antama tulos on lähimpänä referenssilaitteen tulosta, vaikka siltä saadut tulokset ovat muilla näytteillä vaihdelleet hieman referenssimenetelmään verrattuna.

TAULUKKO 4. Tacoma-näytteiden bias. Referenssimenetelmän tulokset liha-voitu ja +/- 5 mmol/mol erot merkitty vaalealla ja sitä suuremmat tummemmalla.

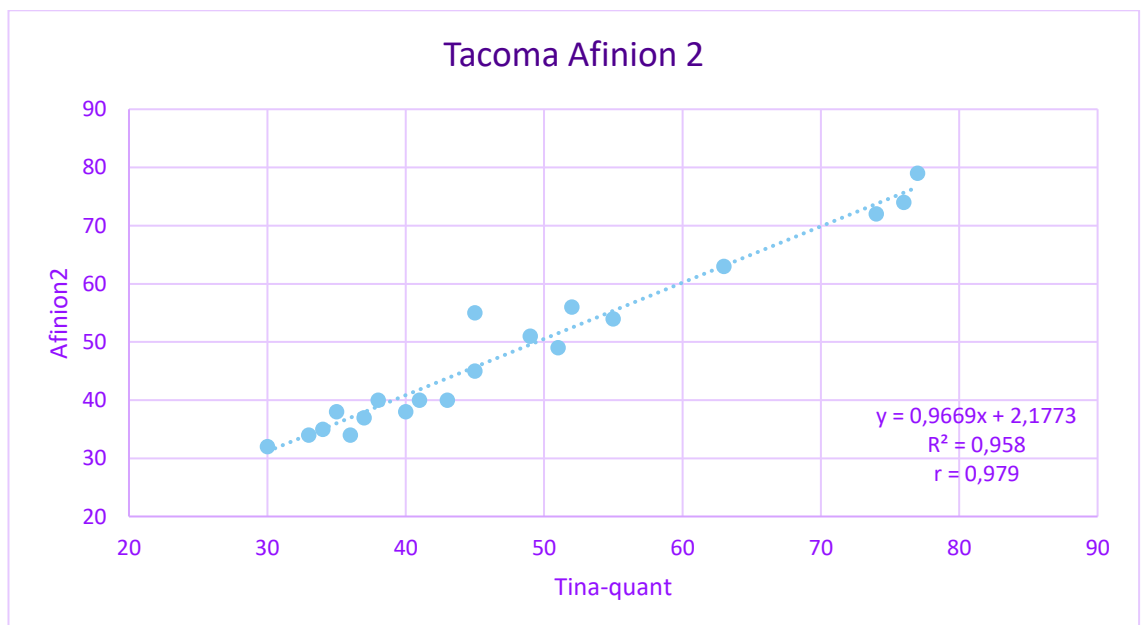
BIAS								
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillars
Tacoma 1	74	-2	-6	-1	-5	18	-4	4
Tacoma 2	33	1	4	4	-1	15	-2	8
Tacoma 3	63	0	1	1	-9	21	-5	22
Tacoma 4	37	0	4	2	-1	17	-1	2
Tacoma 5	45	10	5	11	-3	17	9	12
Tacoma 6	51	-2	2	0	-6	15	-5	8
Tacoma 7	55	-1	-2	0	1	16	-5	5
Tacoma 8	76	-2	-1	-2	-10	21	-3	22
Tacoma 9	30	2	2	1	-1	19	0	22
Tacoma 10	36	-2	-3	0	-6	14	-5	-2
Tacoma 11	34	1	2	2	-2	16	0	14
Tacoma 12	77	2	-1	-2	-3	22	-2	20
Tacoma 13	38	2	3	2	0	15	1	16
Tacoma 14	41	-1	-1	1	-5	14	-3	17
Tacoma 15	40	-2	1	1	-3	16	-2	10
Tacoma 16	43	-3	0	1	-3	18	-2	27
Tacoma 17	45	0	1	2	-1	15	-4	14
Tacoma 18	52	4	2	2	0	15	-2	11
Tacoma 19	35	3	2	3	0	18	-4	6
Tacoma 20	49	2	1	1	-1	22	-4	13
ka	47,7	0,6	0,8	1,5	-3	17	-2,2	12,6

Kuvioissa 1–14 vertaillaan kunkin vieritestilaitteen ja referenssimenetelmän korrelaatiota (r) niin normaaleilla näytteillä kuin Tacoma-näytteillä. Kuvioissa y-akselilla on vierestilaite ja x-akselilla Tina-quant Gen 3 -menetelmä. Tästä on saatu kuvaajalle trendiviiva sekä tätä kautta laskettua selitysaste ja korrelaatiokerroin. Korrelaatiokerrointa käytetään tulkinnessa, mutta myös selitysaste on ilmoitettu. Korrelaatio on merkittävä kaikkien vieritestilaitteiden ja referenssimenetelmän välillä. Kuitenkin korrelaatioissa on eroja, kun verrataan normaali näytteitä ja Tacoma-näytteitä.

Afinion 2 -vieritestilaitteen korrelaatio on erittäin hyvä normaaleilla näytteillä (kuvio 1). Tacoma-näytteillä korrelaatioissa on havaittavissa enemmän hajontaa (kuvio 2).

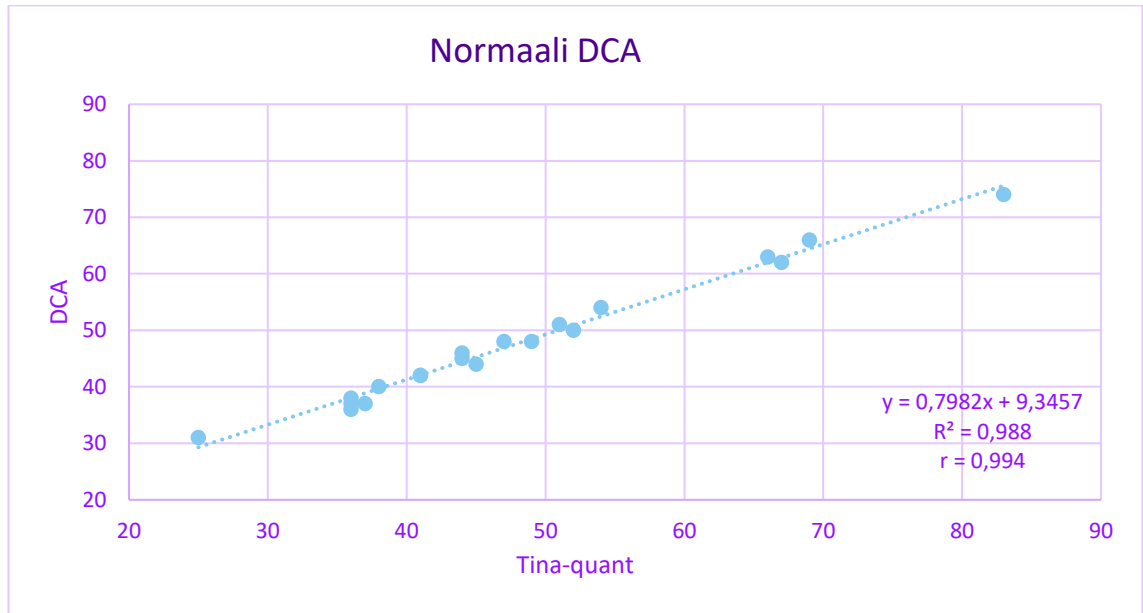


KUVIO 1. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä Afinion 2 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

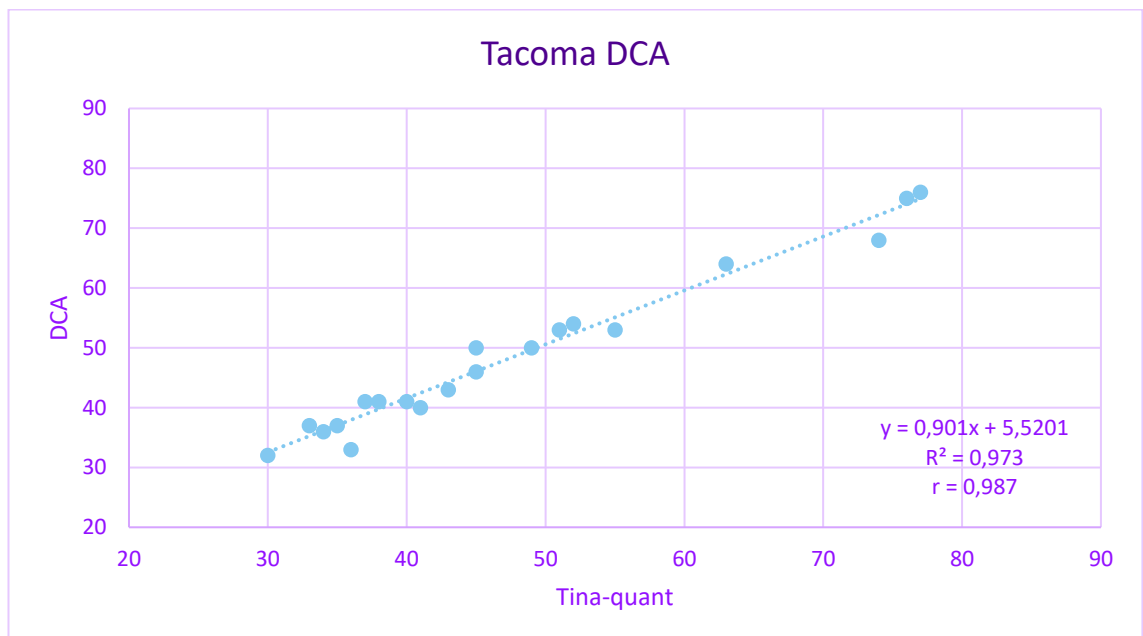


KUVIO 2. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Afinion 2 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

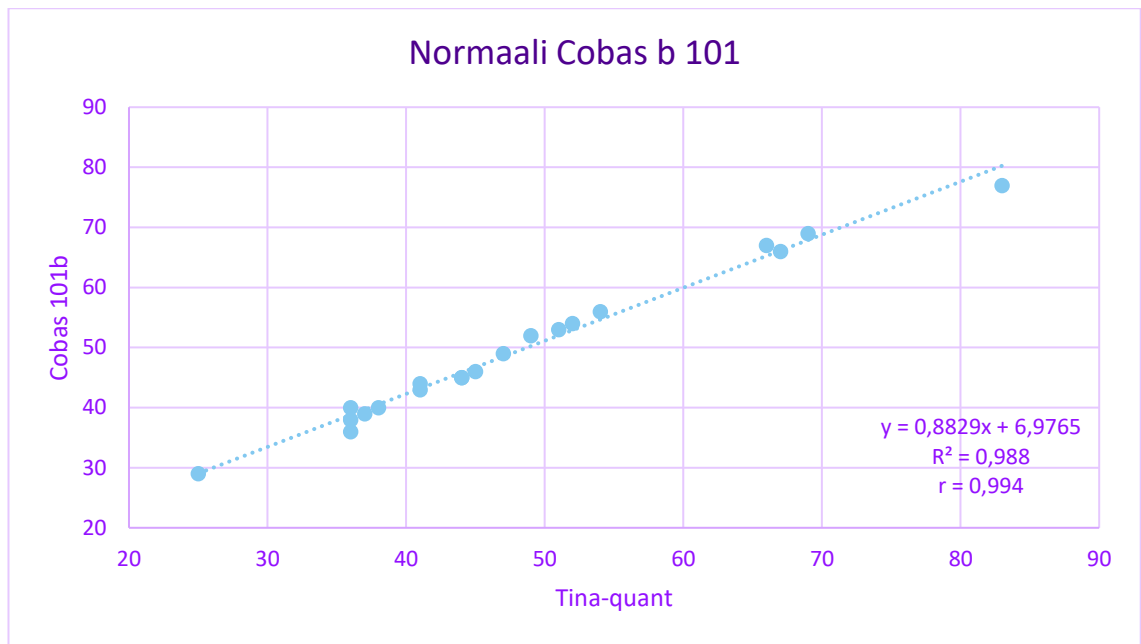
Atellica DCA -vieritestilaite käyttäytyy samalla tavalla kuin Afionion 2. Korrelaatio on parempi normaalilla näytteellä verrattuna Tacoma-näytteeseen (kuviot 3 ja 4). Myös Cobas b 101 -vieritestilaitteella korrelaatio on parempi normaalilla näytteellä kuin Tacoma-näytteellä. (kuviot 5 ja 6).



KUVIO 3. Tulosten vertailu normaalilla näytteillä Atellica DCA -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä



KUVIO 4. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Atellica DCA -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

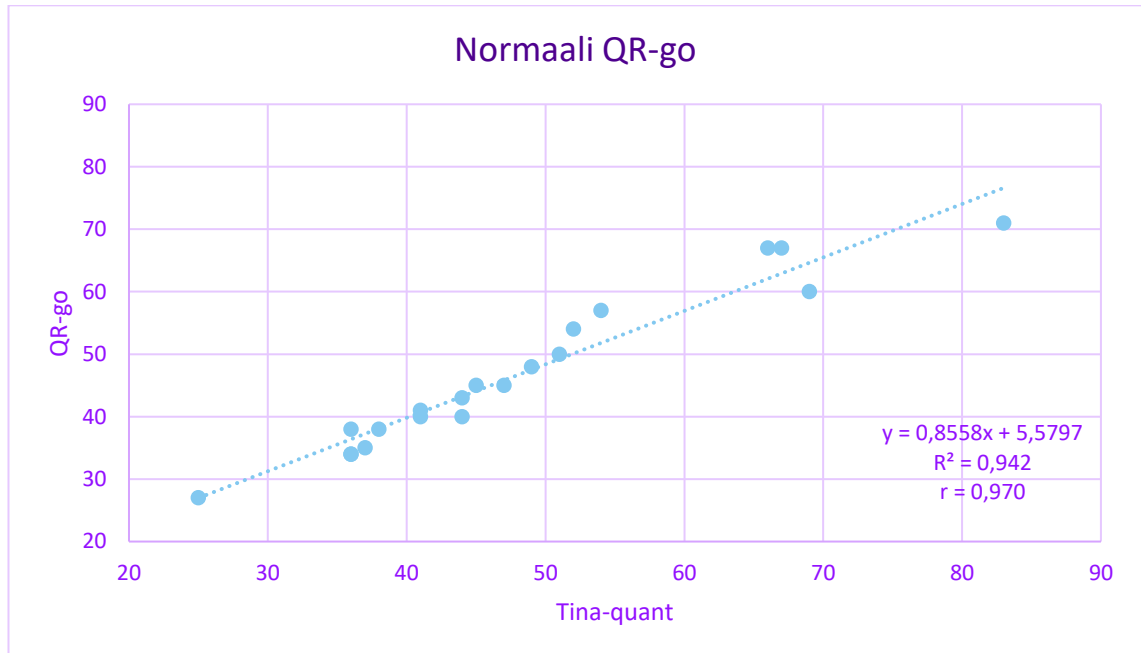


KUVIO 5. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä Cobas b 101 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

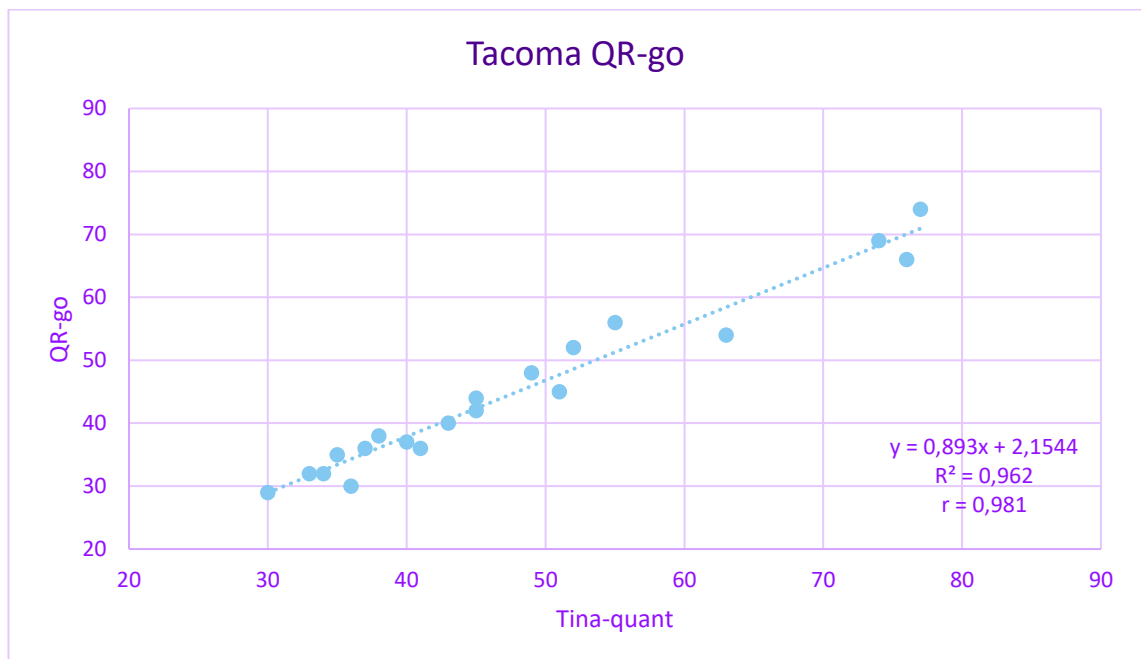


KUVIO 6. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Cobas b 101 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

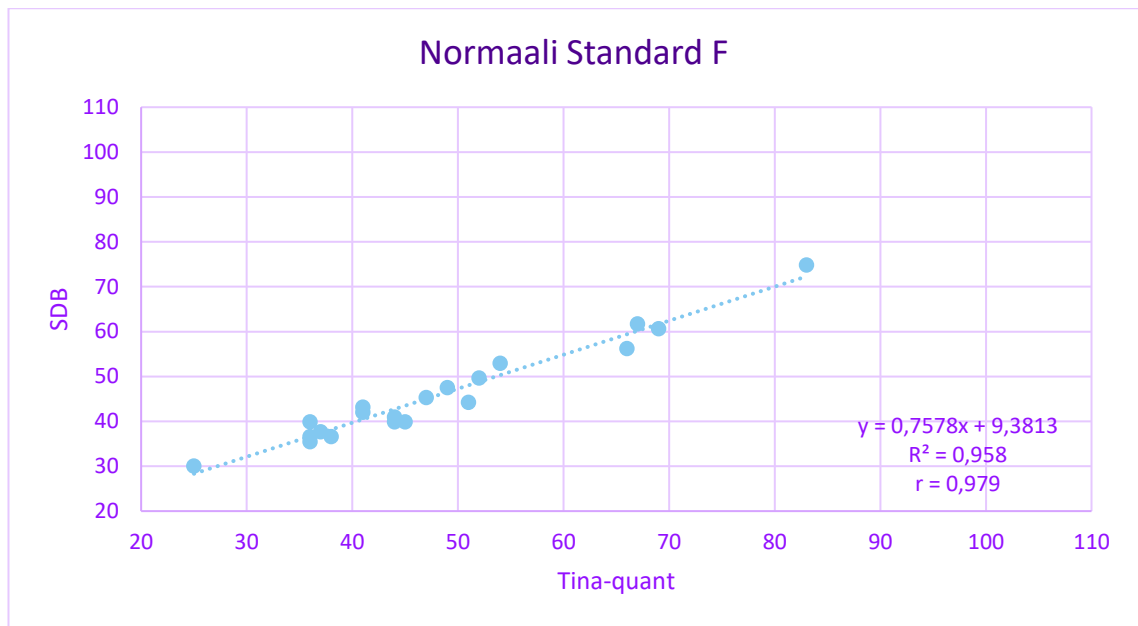
Mielenkiintoista on, että kuvioissa 7–10 QuikRead go -sekä Standard F -vieritestilaitteet antavat paremman korrelaatiotuloksen Tacoma-näytteillä kuin normaaleilla näytteillä. QuikRead go -vieritestilaitteen kuvioissa on havaittavissa enemmän hajontaa verrattuna aikaisempiin laitteisiin.



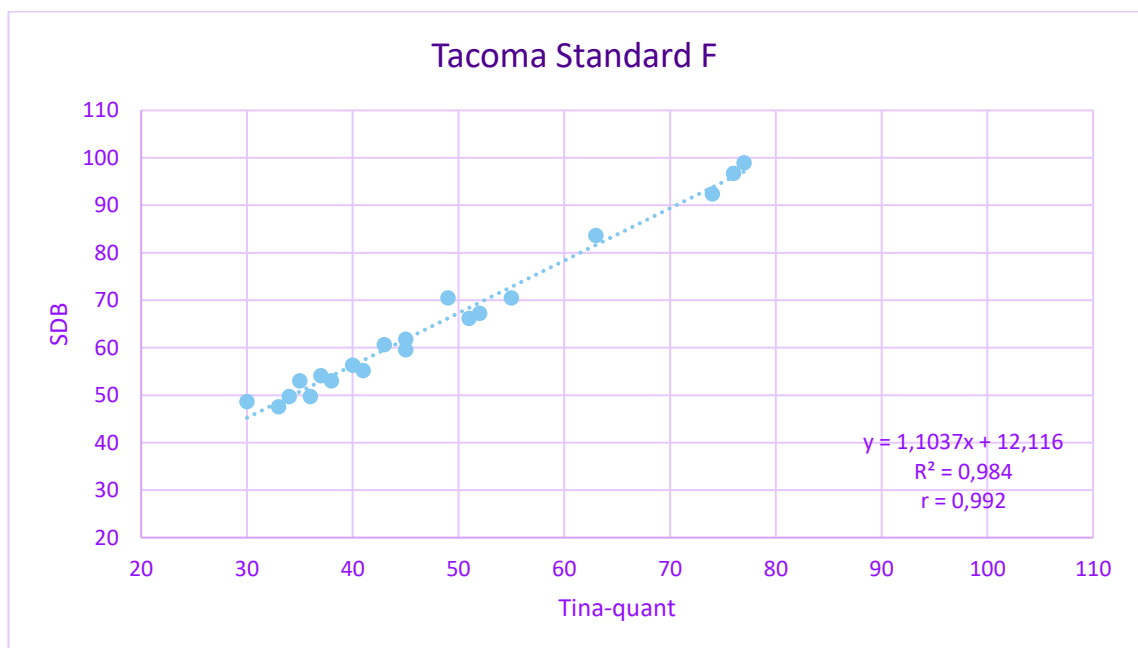
KUVIO 7. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä QuikRead go -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä



KUVIO 8. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä QuikRead go -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

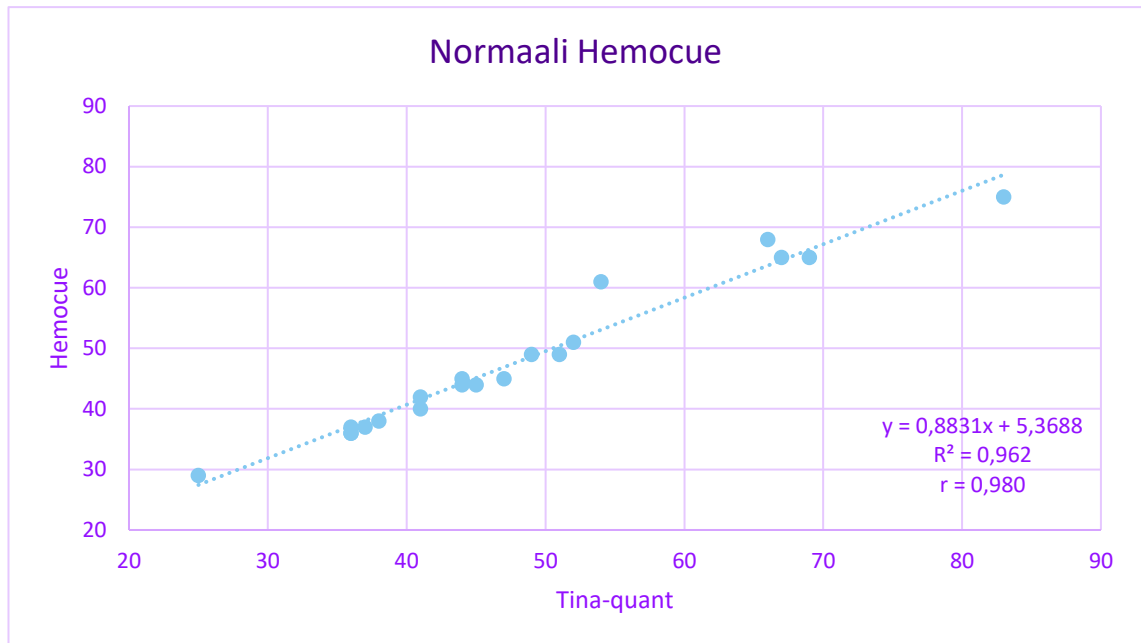


KUVIO 9. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä Standard F -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

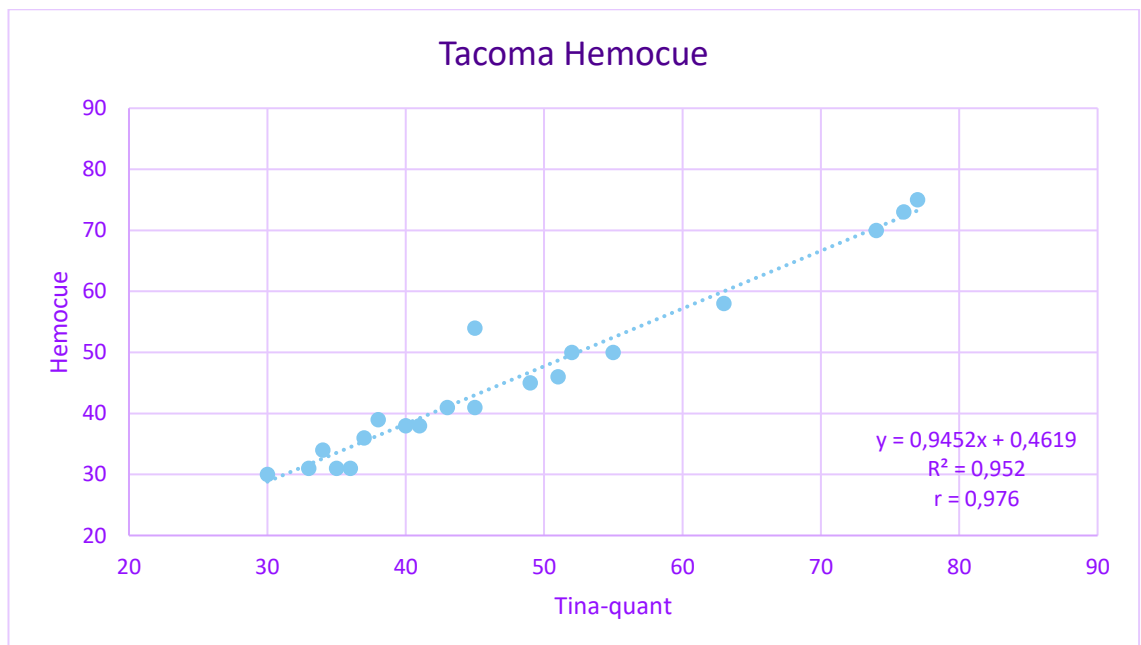


KUVIO 10. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Standard F -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

Kuvioissa 11 ja 12 on esitetty Hemocue HbA1c 501 -vieritestilaitteen korrelaatiot. Vieritestilaite antaa hieman paremman korrelaation normaalilla näytteellä, kuin Tacoma-näytteille.

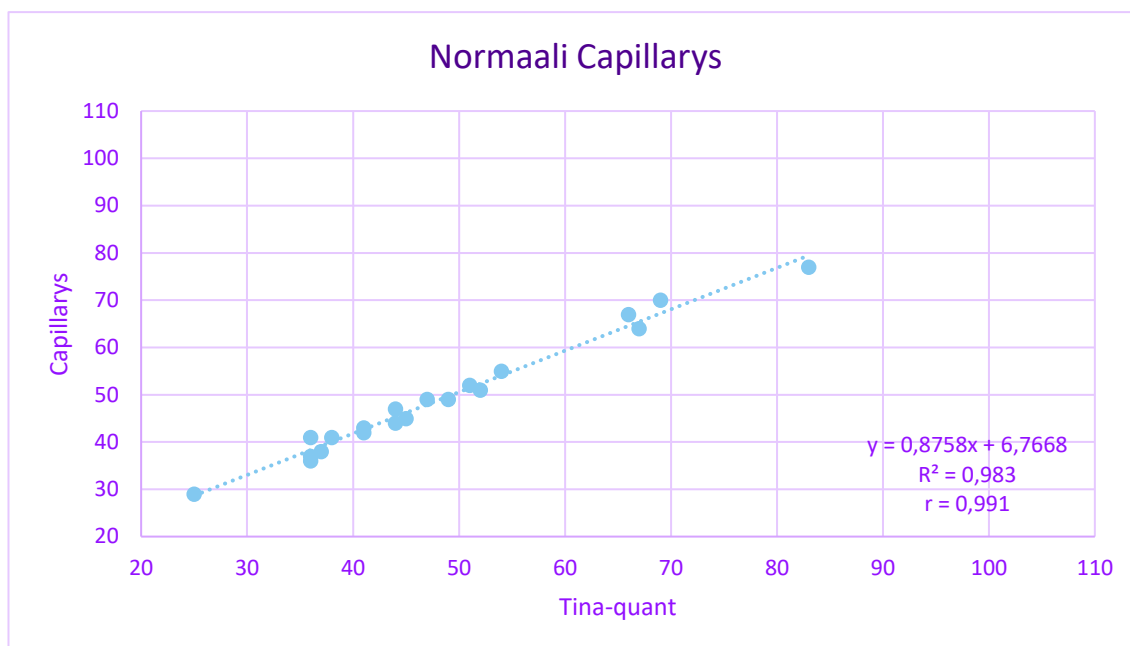


KUVIO 11. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä Hemocue HbA1c 501 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

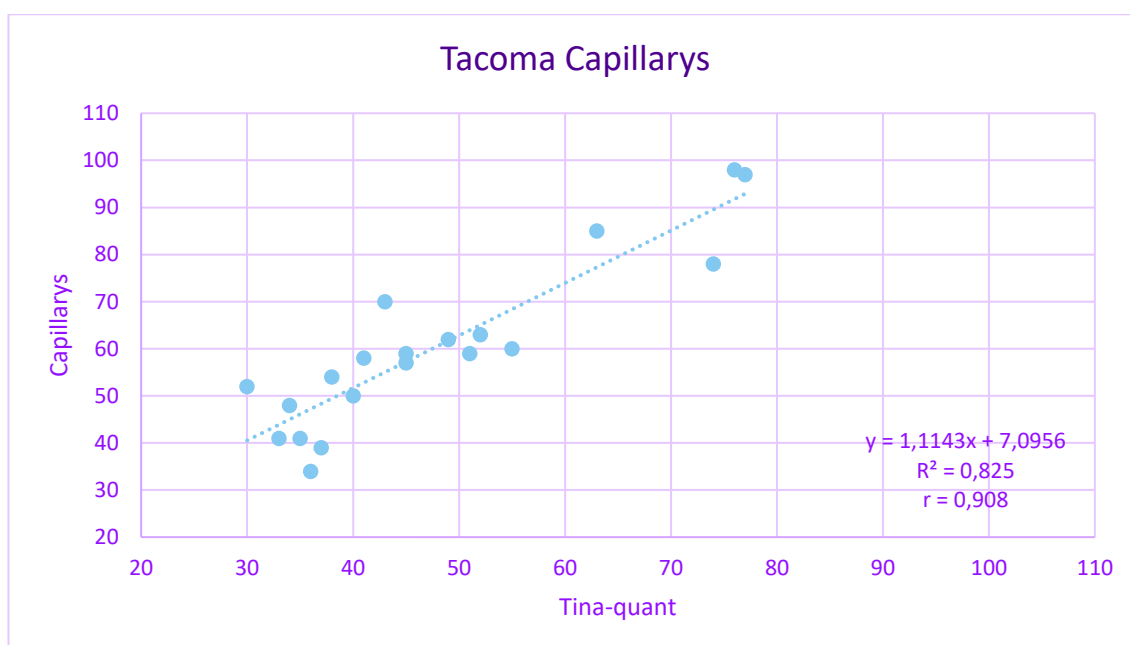


KUVIO 12. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Hemocue HbA1c 501 -vieritestilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

Kuvioissa 13 ja 14 verrataan Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen sekä referenssimenetelmän välistä korrelaatiota. Capillarys 3 Tera -analysointilaitteella annetaan huomattavasti korkeampi korrelaatio Tacoma-näytteille. Normaali näytteillä korrelaatio on hyvä.



KUVIO 13. Tulosten vertailu normaaleilla näytteillä Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä



KUVIO 14. Tulosten vertailu Tacoma-näytteillä Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmän välillä

Suurimmalla osalla laitteista korrelaatiot ovat hyviä ja ovat yli 0,96 sekä Tacoma-näytteillä että normaali näytteillä (kuviot 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11 ja 12). Poikkeuksen muodostaa Capillarys 3 Tera -analysointilaitte Tacoma-näytteillä ($r=0,91$) (kuvio 14). Erittäin hyvän korrelaation eli yli 0,99 korrelaation tuloksen antavat normaaleilla näytteillä vieritestilaitteet Afinion 2, DCA Atellica, Cobas b 101 sekä Capillary 3 Tera -analysointilaitte (kuviot 1, 3, 5 ja 13). Tacoma-näytteistä yli 0,99 korrelaatioon ylittää Standard F -vieritestilaitte (kuvio 10). Liitteessä 5 on esitetty kootusti kaikkien laitteiden vertailu referenssimenetelmään. Kuvaajia ja tuloksia tulkittaessa täytyy kuitenkin muistaa, että näytemäärä oli vähäinen. Tämä tarkoittaa sitä, että yksikin poikkeava tulos vaikuttaa olennaisesti korrelaatiotulokseen.

8.2 Laitteiden toistettavuus

Opinnäytetyössä selvitettiin laitteiden toistettavuutta niin normaaleilla näytteillä kuin myös Tacoma-näytteillä. Toistettavuudet tehtiin viisi kertaa kahdella näytemäärällä jokaisella laitteella. Tästä poikkeuksena Capillarys 3 Tera -analysointilaitte, joka automaattisesti analysoi näytteet kaksitoistakertaa. Laitteiden toistettavuuksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta (CV%) eli variatiokerroin. Laitteille laskettuja CV% tarkastellaan ja vertaillaan Roche Tina-quant Gen 3 -menetelmään. Laitteiden CV% tavoitearvoksi asetettiin $\leq 1,6$ %. Tavoitearvo pohjautuu Roche Tina-quant Gen 3 -menetelmän tietoihin. (Roche 2022, 7.) Kyseinen menetelmä on IFCC:n hyväksymä referenssimenetelmä (Lenters-Westra & English 2017, 1433). Toistettavuusnäyte oli suurimmalla osalla laitteista sama, mutta kolmella laitteella toistettavuus täytyi tehdä eri näytteellä reagenssien saatavuusongelmien takia. Tämän vuoksi korkeamman tason näytteet olivat keskenään eri tasoa.

Taulukoissa 5–8 esitetään tulokset laitteiden toistettavuuksista. Kussakin taulukossa on esitetty referenssimenetelmä Tina-quant Gen 3 -menetelmän sekä kaikkien vieritestilaitteiden toistettavuudet. Lisäksi taulukoissa on nähtävillä tuloksista lasketut muuttujat sekä suurimman ja pienimmän tuloksen välinen erotus. Tavoitearvoon ylittäneet CV% on merkitty taulukoissa vaaleansinisellä. Erotuksista on merkitty violetilla yli 5 mmol/mol eroavat tulokset. Sebian Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen toistettavuudet esitetään taulukoissa 9 ja 10.

Taulukossa 5 on esitetty toistettavuus mittauksissa saadut tulokset matalan tason normaalinäytteillä. Vieritestilaitteet Cobas b 101 ja Afinion 2 sekä Tina-quant Gen 3 -menetelmä pääsevät tavoitearvoon CV% $\leq 1,6$.

TAULUKKO 5. Normaali näytteiden toistettavuudet matalan tason näytteillä

Normaali Matala (mmol/mol)							
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue
NormaaliM1	46			46	47		49
	44			46	46		43
	45			45	48		44
	45			46	44		48
	45			46	43		43
NormaaliM2		46	45			44	
		47	44			43	
		47	44			42	
		47	46			43	
		46	45			44	
ka	45	46,6	44,8	45,8	45,6	43,2	45,4
SD	0,71	0,55	0,84	0,45	2,07	0,84	2,88
CV%	1,6	1,2	1,9	1,0	4,5	1,9	6,3
Erotus	2	1	2	1	5	2	6

Taulukossa 6 esitetään korkean tason normaalinäytteistä saadut toistettavuudet. Korkean tason näytteistä vieritestilaitteet Cobas b 101 ja Afinion 2 pääsevät tavoitetasoon.

TAULUKKO 6. Korkean tason normaali näytteiden toistettavuus

Normaali Korkea (mmol/mol)							
Korkea	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue
NormaaliK1	100			101	113		122
	99			102	109		123
	103			101	107		121
	107			103	113		120
	106			102	111		117
NormaaliK2		76	77			74	
		79	78			77	
		78	73			73	
		77	76			75	
		78	75			75	
ka	103	77,6	75,8	101,8	110,6	74,8	121
SD	3,54	1,14	1,92	0,84	2,61	1,48	2,30
CV%	3,4	1,5	2,5	0,8	2,4	2,0	1,9
Erotus	8	3	5	2	6	4	6

Referenssimenetelmä Tina-quant Gen 3 -menetelmän sekä kaikkien vieritestilaitteiden toistettavuudet matalan tason Tacoma-näytteillä esitetään taulukossa 7. Vieritestilaitteet Cobas b 101 ja Afinion 2 pääsevät tavoitearvoon.

TAULUKKO 7. Matalan tason Tacoma-näytteiden toistettavuus

Tacoma Matala (mmol/mol)							
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue
TacomaM1	41			46	43		41
	42			45	41		44
	45			45	40		42
	44			46	42		42
	44			46	40		41
TacomaM2		42	41			55	
		41	42			56	
		41	42			55	
		41	39			54	
		42	42			57	
ka	43,2	41,4	41,2	45,6	41,2	55,4	42,0
SD	1,64	0,55	1,30	0,55	1,30	1,14	1,22
CV%	3,8	1,3	3,2	1,2	3,2	2,1	2,9
Erotus	4	1	3	1	3	3	3

Taulukossa 8 esitetään korkean tason Tacoma-näytteiden toistettavuudet. Cobas b 101 -vieritestilaite on ainoa, jonka toistettavuus tulos on tavoitetasolla.

TAULUKKO 8. Tacoma-näytteiden toistettavuus korkean tason näytteillä

Tacoma Korkea (mmol/mol)							
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue
TacomaK1	99			95	97		109
	98			96	102		108
	104			97	94		108
	102			96	101		110
	96			96	95		113
TacomaK2		75	77			99	
		75	75			100	
		77	76			99	
		77	72			92	
		78	76			97	
ka	99,8	76,4	75,2	96	97,8	97,4	110
SD	3,19	1,34	1,92	0,71	3,56	3,21	2,07
CV%	3,2	1,8	2,6	0,7	3,6	3,3	1,9
Erotus	8	3	5	2	8	8	4

Taulukossa 9 on esitetty Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen normaali näytteiden toistettavuudet. Tavoitearvoon päästää korkean tason näytteellä.

TAULUKKO 9. Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen toistettavuus normaali näytteillä

Normaali (mmol/mol)			
	Matala		Korkea
NormaaliM	48	NormaaliK	114
	46		112
	46		112
	47		112
	47		112
	48		112
	46		113
	46		111
	46		111
	45		111
	46		112
	47		113
ka	46,5		112,1
SD	0,90		0,90
CV%	1,9		0,8
Erotus	3		3

Taulukossa 10 esitetään Sebian Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen toistettavuus Tacoma-näytteillä. Matalan tason näytteillä on nähtävissä isoa hajontaa toistettavuusmittauksissa. Matalalla tasolla Tacoma-näytteiden CV% ylittää reilusti hyväksyttävän arvon. Korkean tason näytteillä päästään tavoitearvoon.

TAULUKKO 10. Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen toistettavuus Tacoma-näytteillä

Tacoma (mmol/mol)			
	Matala		Korkea
TacomaM	56	TacomaK	102
	48		102
	62		104
	42		99
	58		103
	55		103
	58		103
	63		103
	50		103
	46		101
	67		105
	47		102
ka	54,3		102,5
SD	7,7		1,51
CV%	14,2		1,5
Erotus	25		6

Kaikkien laitteiden toistettavuuksien variaatiokertoimet molemmilla näytetyypeillä sekä näytetasoilla on esitetty taulukossa 11. Tina-quant Gen 3 -menetelmällä matalan tason näytteissä toistettavuus on parempi normaaleilla näytteillä verrattuna Tacoma-näytteisiin. Korkean tason näytteillä ei ole havaittavissa suurta eroa normaali ja Tacoma-näytteiden välillä. Taulukkoja tulkittaessa täytyy huomioida, että toistomäärä oli normaalia pienempi. Yleensä toistettavuuksia toteutetaan vähintään kymmenellä näytteellä tasoa kohden.

TAULUKKO 11. Yhteenveto laitteiden toistettavuuksista

Toistettavuus CV%								
	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
Normaali Matala	1,6	1,2	1,9	1	4,5	1,9	6,3	1,9
Tacoma Matala	3,8	1,3	3,2	1,2	3,2	2,1	2,9	14,2
Normaali Korkea	3,4	1,5	2,5	0,8	2,4	2	1,9	0,8
Tacoma Korkea	3,2	1,8	2,6	0,7	3,6	3,3	1,9	1,5

Afinion 2 -vieritestilaitte antaa hyvin toistettavia tuloksia molemmilla tasoilla niin normaaleilla näytteillä kuin Tacoma-näytteillä. Tacoma-näytteiden toistettavuus on aavistuksen huonompi molemmilla tasoilla verrattuna normaaleihin näytteisiin.

Atellica DCA -vieritestilaitteella Tacoma-näytteiden toistettavuus on aavistuksen huonompi verrattuna normaali näytteeseen. Toistettavuuksien eron normaalin ja Tacoma-näytteen välillä näkee parhaiten matalan tason näytteissä. Korkean tason näytteissä ei ole havaittavissa eroa normaali ja Tacoma-näytteiden välillä.

Cobas b 101 -vieritestilaitteen toistettavuus on erittäin hyvä normaaleilla ja Tacoma-näytteillä sekä matalalla että korkealla tasolla. Matalalla tasolla normaali näyte on toistettavampi kuin Tacoma-näyte, mutta korkealla tasolla toistettavuus menee toisinpäin.

QuikRead go -vieritestilaitteella on matalan tason toistettavuuksissa enemmän hajontaa normaalilla näytteellä verrattuna Tacoma-näytteeseen. Korkealla tasolla normaalin näytteen toistettavuus oli parempi kuin Tacoma-näytteellä.

Standard F -vieritestilaitteen toistettavuudet ovat suhteellisen samaa tasoa kaikilla näytteillä. Laitteen toistettavuuden kannalta näytteen tasolla tai sillä onko kyseessä normaali näyte vai variantti näyte, ei ole suurta merkitystä. Normaaleilla näytteillä CV% ovat hieman parempia kuin Tacoma-näytteillä. Heikoin toistettavuus on korkean tason Tacoma-näytteellä.

Hemocue HbA1c 501 -vierestilaite antaa melko huonon toistettavuuden matalalla tasolla normaalille näytteelle. Matalan tason Tacoma-näytteellä laitteen toistettavuus on parempi verrattuna normaaliin näytteeseen. Korkealla tasolla normaalin ja Tacoma-näytteen välillä on hyvin vähän eroa.

Capillarys 3 Tera -analysaattorilla matalalla tasolla Tacoma-näytteiden CV% on selkeästi suurempi verrattuna normaaliin matalan tason näytteeseen. Korkean tason näytteissä toistettavuus on aavistuksen parempaa normaaleilla näytteillä verrattuna Tacoma-näytteisiin.

9 TUTKIMUKSEN EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS

Tutkimuseettinen neuvottelukunta (2023) on määritellyt hyvät tieteelliset käytännöt neljään peruseriaatteeseen: luotettavuus, rehellisyys, arvostus sekä vastuunkanto. Luotettavuudesta tulee huolehtia jokaisessa työn vaiheessa suunnittelusta työn loppuun asti, jotta työstä tulee laadukas ja virheet minimoitaisiin. Rehellisyydestä huolehditaan raportoimalla kaikki työn vaiheet tarkasti ja myös mahdolliset virheet tulee kirjata opinnäytetyöhön. Kaikki lähteet tulee merkitä asianmukaisella tavalla, jotta vältetään plagioinnilta sekä osoitetaan arvostusta muiden tekemiä tuotoksia kohtaan. Opinnäytetyön tekijöiden tulee kantaa vastuu tuotetusta opinnäytetyöstä työn jokaisessa vaiheessa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 11–12.)

Luotettavuutta kuvataan sanoilla validiteetti sekä reliabiliteetti. Validiteetti tarkoittaa tutkimuksen pätevyyttä ja sillä halutaan varmistaa, että mitataan juuri sitä mitä on tarkoitus. Opinnäytetyön validiteettia edesauttaa tarkka suunnittelu sekä tiedonhaku. Reliabiliteetti eli luotettavuus tarkoittaa sitä, että tutkimus antaa tarkkoja ja toistettavia tuloksia. Riittävän suurella ja edustavalla otoksella on myös merkitystä tutkimuksen luotettavuuteen. (Heikkilä 2014, 27–28, 177–178.) Koska tässä työssä opinnäytetyöntekijöitä on kaksi, kaikki tulokset ja kirjaukset tarkistetaan kahden henkilön toimesta. Näin myös virheiden todennäköisyys pienenee, mikä parantaa opinnäytetyön luotettavuutta.

Opinnäytetyö toteutettiin noudattamalla hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Lupa opinnäytetyön toteutukseen saatiin Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksikön ylikemisti Kari Åkermanilta. Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksiköllä on jatkuvan toiminnan kehittämisen lupa, joka pohjautuu lakiin Ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (101/2001) pykälään 20. Opinnäytetyössä hyödynnettiin ylijäämänäytteitä, minkä ansiosta potilaita ei tarvinnut ottaa ylimääräisiä näytteitä prosessia varten. Tämän vuoksi potilailta ei tarvittu erillistä lupaa tutkimukseen osallistumisesta. Palveluyksikössä ylijäämänäytteitä voidaan siis käyttää oman toiminnan kehittämiseen.

Opinnäytetyön eettisyys huomioitiin minimoimalla potilastietojen kanssa työskentely. Näyteputket identifioitiin viivakoodillisilla tarroilla analysoitaviksi varten. Tämän ansiosta yksittäisten tulosten yhdistäminen henkilötietoihin on mahdotonta. Näytteitä säilytettiin tutkimuksen ajan, jonka jälkeen ne hävitettiin asianmukaisesti muiden laboratorioon tulleiden näytteiden kanssa.

Opinnäytetyöprosessin vaiheet suunniteltiin tarkasti sekä kaikki työn vaiheet raportoitiin totuudenmukaisesti. Jokainen opinnäytetyössä saatu mittaustulos varmistettiin molempien opinnäytetyön tekijöiden toimesta. Laitteiden omille tuloslomakkeille kirjatut tulokset on tarkastettu vielä jokaisen mittauspäivän päätteeksi vieritestilaitteiden muistista. Jokainen tulos on siirretty sähköiseen muotoon Excel-taulukkolaskentaohjelmaan samana päivänä. Selkeästi poikkeavien tulosten kohdalla suoritettiin uusinta mittauksia. Uusimmat suoritettiin Normaali 12 -näytteelle (Taulukko 2) sekä Tacoma 5 -näytteelle (Taulukko 4), joiden tulostaso erosi huomattavasti muita näytteitä enemmän referenssimenetelmästä. Uusinta mittauksissa ei kuitenkaan havaittu eroa alkuperäiseen tulokseen, joten opinnäytetyössä päädyttiin käyttämään alkuperäisiä tuloksia.

Opinnäytetyössä saaduissa tuloksissa tulee huomioida, että työ toteutettiin pienellä otoskoolla. Etenkin toistettavuuksia ja korrelaatiokuvaajia tulkittaessa täytyy olla kriittinen, sillä otoskoon ollessa suppea, pienikin poikkeama tuloksissa vaikuttaa olennaisesti saatuihin tuloksiin. Kuitenkin voidaan havaita, että tulostason kuviot tukevat toistettavuuksissa saatuja tuloksia. Lisäksi, vaikka poikkeamia ei keski-arvoisesti havaita, ovat yksittäiset poikkeamat mahdollisia.

Tiedonhankintaa toteutettiin pitkään ja suunnitelmallisesti. Opinnäytetyössä hyödynnettiin monipuolisesti sekä kotimaisia että kansainvälisiä lähteitä. Kaikkiin käytettyihin lähteisiin on viitattu asianmukaisesti alkuperäistä tekijää kunnioittaen. Osa käytetyistä lähteistä on vanhoja, koska aiheesta on löydettävissä hyvin vähän tietoa. Lisäksi osa uudemmissa julkaisuista ei ollut tekijöiden saatavilla. Vanhempien lähteiden käyttöä voidaan kuitenkin perustella sillä, että suurin osa uusista lähteistä viittaa näihin vanhempiin lähteisiin. Kaiken kaikkiaan lähteitä löytyi riittävästi kokonaisuuden hahmottamisen kannalta.

Ennen opinnäytetyön analysointivaihetta laitevalmistajat saapuivat keskussairaalalle kertomaan laitteen toimintaperiaatteesta sekä perehdyttivät laitteen käytön. Tämän ansiosta vieritestilaitteiden käyttö oli varsinaisen analysointivaiheen aikana tuttua, mikä vähentää osaltaan virheiden mahdollisuutta. Tutkimuksissa analysoituja näytteitä ei kerätty itse, joten niiden analysointikelpoisuus perustuu oletukseen, että näytteenotto on toteutettu yleisiä näytteenottokäytäntöjä noudattaen. Näytteitä analysoitiin viikoittain, jolloin pystyttiin varmistamaan, että näytteet olivat mittaushetkellä mahdollisimman tuoreita. Liitteessä 6 on esitetty näytteenotto- ja analysointipäivämäärät.

Opinnäytetyön näytteiden analysointivaiheessa käytännönsyistä täytyi poiketa laitevalmistajien antamista näytteiden säilyvyysajoista. Näytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa, mikäli niitä ei pystytty analysoimaan samana päivänä. Opinnäytetyön ohessa yritettiin testata näytteiden säilyvyyttä, mutta opinnäytetyön laajuuden vuoksi sekä reagenssien riittävyden takia aiheeseen ei pystytty paneutumaan tarkemmin. Opinnäytetyön lopullisten tulosten kannalta tuloksissa ei kuitenkaan havaittu poikkeavaa eroa aikaisempiin tuloksiin verrattuna. Kaikki saadut tulokset erosivat enintään +/- 4mmol/mol verrattuna aiempaan tulokseen. On mielenkiintoista, että laitevalmistajat lupaavat hyvin erilaisia näytteiden säilyvyysaikoja, vaikka suurin osa laitteista perustuu immunologiseen menetelmään ja laitteet käyttävät samaa näytemateriaalia (K2 EDTA kokoveri).

10 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa hemoglobiini Tacoman tulostasosta ja toistettavuudesta eri HbA1c-analyysimenetelmillä. Tarkoituksena oli verrata kuuden vieritestilaitteen (Abbott Afinion 2, Aidian QuikRead go, Roche Cobas b 101, SD Biosensor F, Siemens Healthineers DCA Atellica ja Hemocue HbA1c 501) ja Sebian Capillarys 3 Tera -analysointilaitteen HbA1c-tutkimuksen tuloksia Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmän tuloksiin. Lisäksi selvitettiin kaikkien analysoitavien menetelmien toistettavuutta hemoglobiini Tacoma -näytteillä kahdella eri näytetasolla ja niitä vastaavilla normaaleilla näytteillä. Tämän opinnäytetyön avulla pyrittiin saamaan vastaus kahteen tutkimuskysymykseen liittyen hemoglobiini Tacomaan. Pyrkimyksenä oli selvittää vaikuttaako hemoglobiini Tacoma -näytteiden tulostasoon sekä toistettavuuteen. Opinnäytetyön tulosten perusteella saatiin vastaus tutkimuskysymyksiin ja päästiin asetettuun tavoitteeseen.

Opinnäytetyön tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, että suurimmalla osalla laitteista tulostaso on hyvin verrattavissa referenssimenetelmä Tina-quant Gen 3 -menetelmän kanssa. Tätä tukee myös klinikoiden käyttämään +/- 5 mmol/mol raja peräkkäisten tulosten välillä (Sherwani ym. 2016, 102). Saadut tulokset pitävät paikkaansa niin normaaleilla näytteillä kuin Tacoma-näytteillä. Tarkemmin tarkasteltaessa normaalien näytteiden bias-tilukkoa, havaitaan yksittäisiä poikkeamia useammalla vieritestilaitteella.

Selkeimpänä löydöksenä voidaan pitää Standard F -vieritestilaitteen tulostason tuloksia Tacoma-näytteiden kohdalla. Vieritestilaitte poikkeaa Tacoma-näytteiden kohdalla keskimäärin 17 mmol/mol referenssimenetelmästä (vaihteluväli 14–22 mmol/mol), joka on selkeästi yli määritellyn sallitun poikkeaman (+/- 5 mmol/mol). Kun pohdintaan otetaan mukaan HbA1c-tutkimuksen viitearvot, havaitaan poikkeamien olevan huomattavan suuria. Kun tuloksia ajatellaan potilaan hoidon kannalta, voivat ne johtaa harhaan potilaan tilaa koskien. Normaali viitearvo on 20–42 mmol/mol ja diabeteksen diagnoosiin viittaava raja on 48 mmol/mol. Viitearvoihin suhteutettuna sekä 14 mmol/mol että 22 mmol/mol (taulukko 4) on erittäin iso poikkeama. Muiden laitteiden antaessa tulosta normaalilta viiteväliä Standard F -vieritestilaitte antaa tuloksen, joka viittaa vahvasti diabetekseen.

Samanlaisia poikkeamia tuloksissa on havaittavissa muutamissa Tacoma-näytteissä Capillarys 3 Tera -analysaattorilla. Verrattaessa näitä tuloksia määriteltyyn sallittuun poikkeamaan (± 5 mmol/mol) voidaan todeta poikkeaman olevan merkittävä. Capillarys 3 Tera -analysaattorin kohdalla analysaattori ei kykene erottamaan hemoglobiini Tacomaa, joka ilmenee elektroferogrammissa laakeana pohjavaiivan kohoamisena ja häiritsee näin hemoglobiinifraktioiden erottamista.

Standard F -vieritestilaitteen tulosten eroavaisuuden syynä muihin laitteisiin verrattuna saattaa olla sen käyttämä menetelmä. Standard F -vieritestilaitte on ainoa opinnäytetyössä käytettävä laite, joka käyttää sandwich-tyylistä menetelmää. Tällöin glykoituneen hemoglobiinin tunnistamiseen käytetään kahta vasta-ainetta. (SD Biosensor 2023; Kangastupa 2024a.) Lisäksi hemoglobiini Tacoma mielletään epävakaksi variantiksi rakenteen konformaatiomuutoksista johtuen (Tucker & Perutz 1977, 415, 417). Saattaa olla mahdollista, että vasta-aine tunnistaa hemoglobiini Tacoman virheellisesti konformaatiomuutoksen vuoksi. Opinäytetyössä saatujen tulosten perusteella vaikuttaa siltä, ettei Standard F -vieritestilaitte välttämättä sovellu käytettäväksi Tacoma-näytteille. Laite ei ole markkinoilla Suomessa, mutta valmistajan mukaan se on laajasti kansainvälisesti käytössä (Raitasuo 2024). Kuitenkin tulee huomioida, että on mahdotonta sanoa, mitkä laitteista antavat oikeita tuloksia. Tämä voitaisiin varmistaa vain vertaamalla saatuja tuloksia potilaan kliiniseen tilaan. Kuitenkin kahdeksasta laitteesta kuusi laitetta antaa samaa tulostasoa, joten sen perusteella voidaan arvella niiden tulostason olevan lähellä oikeaa.

Tarkasteltaessa näytteiden toistettavuutta havaitaan, että laitteet pysyvät melko vaihtelevasti asetetussa CV% rajassa (1,6 %). Toistettavuudessa ei havaita selkeää eroa normaalien näytteiden ja Tacoma-näytteiden välillä matalan eikä korkean tason näytteillä. Myöskään laitteiden välillä ei havaittu merkittäviä eroja. Kuitenkin kysymyksiä herättää miksi Capillarys 3 Tera -analysaattorin toistettavuus on matalalla tasolla erittäin epävakaa, mutta mielenkiintoisesti korkealla tasolla kuitenkin hyvä.

Opinnäytetyössä saadut tulokset ovat samansuuntaisia verrattuna aiempaan tutkimukseen. Lenters-Westra ym. (2017) tutkimuksessa tutkittiin hemoglobiini Tacoma-näytteitä tutkimalla HbA1c-näytteitä useammalla laitteella. Kyseisessä tutkimuksessa todettiin hemoglobiini Tacoman aiheuttavan merkittävää häiriötä tuloksissa verrattuna normaaliin ei-variantti näytteisiin. Opinnäytetyössä käytetään Lenters-Westra ym. (2017) tutkimuksessa esiteltyjen menetelmien uudempia versioita. Opinnäytetyössä yhdeksi vieritestilaitteeksi on valittu Afinion 2, jonka ero edeltäjään on hyvin vähäinen (Kangastupa 2024a). Opinnäytetyön referenssimenetelmänä käytetään Rochen Tina-quant Gen 3 -menetelmää, joka on uudempi versio Lenters-Westra ym. (2017) tutkimuksessa olevasta Tina-quant Gen 2 -menetelmästä. Rochen tuotepäälliköiden mukaan generaatiovaihdoksen yhteydessä muuttui vain standardisaatio sekä kalibraattorin arvojen määrittystapa (Fagerlund 2023). Lisäksi sekä Lenters-Westra ym. (2017) tutkimuksessa sekä tässä opinnäytetyössä Tina-quant Gen -menetelmät sekä Afinion-laitteet antavat yhteisiä tuloksia.

Opinnäytetyön aineiston kooksi asetettiin alussa 22 Tacoma-näytettä ja 22 normaalia näytettä, joista kaksi paria täytyi hylätä tulostason takia sekä reagenssien rajallisuuden vuoksi. Loppujen lopuksi tulokset koostuivat 20 näyteparista. Toistettavuudet toteutettiin viisi kertaa tasoa kohden.

Opinnäytetyön aiheita saatiin Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen kliinisen kemian ja mikrobiologian palveluyksiköltä. Aihe valikoitui kummankin tekijän mielenkiinnon mukaan sekä aiheen merkittävyyden vuoksi. Opinnäytetyön aiheeseen perehtymisellä sekä tarkalla suunnittelulla oli erittäin tärkeä merkitys työn onnistumisen sekä etenemisen kannalta. Opinnäytetyön analysointivaiheelle varattiin paljon aikaa ja kyseinen vaihe saatiin tehtyä suunniteltua aikaisemmin. Tämä vapautti aikaa tutkimusten tulosten analysoinnille sekä pohdinnalle. Työtä tehtiin tiiviisti yhdessä yhteistyötahon kanssa, joka antoi tukea työn etenemisen kannalta ja mahdollisti aiheen syvällisemmän pohdinnan. Lisäksi laboratorion henkilökunta mahdollisti opinnäytetyön tekemisen analysoimalla näytteet Tina-quant Gen 3 -menetelmällä sekä Capillarys 3 Tera -analysaattorilla.

Näytteitä kertyi hyvin analysointivaiheessa ja tarvittava näytemäärä saatiin koon nopeasti noin neljän viikon aikana. Analysointivaiheessa hemoglobiini Tacoman prevalenssi Etelä-Pohjanmaan alueella konkretisoitui, joka motivoi opinnäytetyön tekemistä entisestään. Tällä hetkellä Suomessa Seinäjoen keskussairaala on yksi harvoista laboratorista, joka käyttää HbA1c-menetelmää, jolla on mahdollista havaita hemoglobiinivariantteja (Kangastupa 2023b). Tacoma-näytteiden lopullinen vastaus annetaan DCA Atellica -vieritestilaitteen perusteella. Opinnäytetyön edetessä hemoglobiini varianttien havaitsemisen merkittävyys hahmottui, koska ne saattavat vaikuttaa tuloksiin ratkaisevasti. Tämä korostui varsinkin Standard F -vieritestilaitteen tulostasoa ja Capillarys 3 Tera -analysaattorin matalan tason toistettavuuksia katsottaessa. Opinnäytetyön tuloksen merkittävyyden takia, aiheesta kirjoitettiin myös kansainvälinen artikkeli. Tämän lisäksi aihetta esiteltiin Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialueen ensimmäisessä Tiedon Tori -tapahtumassa, joka järjestettiin Seinäjoen keskussairaalassa. Tiedon Tori -tapahtuman esitysmateriaalien työstäminen auttoi myös opinnäytetyönraportin kirjoituksessa sekä seminaariesityksen laatimisessa.

Yleisesti ottaen voidaan todeta, että tutkimuksen otoskoko on pieni osoittamaan täysin varmoja tuloksia. Kuitenkin Standard F -vieritestilaitteen poikkeama on havaittavissa jokaisesta suoritetusta mittauksessa, joten löydöstä voidaan pitää merkittävänä otoskoosta huolimatta. Opinnäytetyö antaa kuitenkin uutta tietoa ja voi innoittaa uusia jatkotutkimuksia. Jatkotutkimusaiheina voisi olla varianttinäytteiden tutkiminen useammilla laboriokäyttöön tarkoitetuilla analysaattoreilla. Muita jatkotutkimusaiheita voisi olla tulostason testaaminen suuremmalla otoskoolla sekä näytteiden säilyvyyden tutkiminen. Lisäksi tässä tutkimuksessa mukana olleet Tacoma-näytteet olivat kaikki heterotsygoottisia, joten olisi mielenkiintoista tehdä vertailua myös homotsygoottisilla näytteillä. Hemoglobiini Tacomalla näyttäisi olevan vaikutusta tuloksiin riippuen käytettävästä analyysimenetelmästä. Tämän vuoksi hemoglobiini Tacoman mahdollisia terveysvaikutuksia olisi tärkeää tutkia. Tutkimuksen tulokset korostavat hemoglobiinipoikkeavuuksien tutkimisen ja huomioimisen merkitystä.

LÄHTEET

Abbott. 2020. Afinion HbA1c. Menetelmäinsertti.

Aidian. 2023. QuikRead go HbA1c. Menetelmäinsertti.

Bain, B. 2006. Haemoglobinopathy Diagnosis. E-kirja. 2. painos. Malden: Blackwell Publishing. Viitattu 12.4.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/detail.action?docID=351173>

Brimhall, B., Jones, T., Baur, E. & Motulsky, A. 1969. Structural characterization of hemoglobin Tacoma. Biochemistry 8 (5), 2125–2129. Viitattu 17.5.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00833a051>

Burtis, C. & Bruns, D. 2015. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. E-kirja. 7. painos. St. Louis: Elsevier /Saunders. Viitattu 8.5.2024. Vaatii käyttöoikeuden. http://libproxy.tuni.fi/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=cookie.ip.uid&db=nlebk&AN=1167481&site=ehost-live&scope=site&ebv=EB&ppid=pp_Cover

Dasauni, P., Singh, N., Chhabra, V., Mahapatra, M., Saxena, R. & Kundu, S. 2022. Optimization and Identification of Single Mutation in Hemoglobin Variants with 2,2,2 Trifluoroethanol Modified Digestion Method and Nano-LC Coupled MALDI MS/MS. Molecules 27 (19), 6357. Viitattu 15.5.2024. <https://doi.org/10.3390/molecules27196357>

Etelä-Pohjanmaan hyvinvointialue. 2022. Hemoglobiini-A1c. Verkkosivu. Viitattu 14.4.2024. <http://81.209.127.193/labraohje/labraohje.asp?tutkimus=6128>

Fagerlund, P. Field Product Manager SWA Roche. 2023. Roche Tina-quant HbA1c Gen. 3. Sähköpostiviesti 20.11.2023.

Giardine, B., Borg, J., Viennas, E., Pavlidis, C., Moradkhani, K., Joly, P., Bartsakoulia, M., Riemer, C., Miller, W., Tzimas, G., Wajcman, H., Hardison, RC. & Patrinos, GP. 2000. Hb S. Verkkosivu. Viitattu 1.6.2024. https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display format=page&i=226

Giardine, B., Borg, J., Viennas, E., Pavlidis, C., Moradkhani, K., Joly, P., Bartsakoulia, M., Riemer, C., Miller, W., Tzimas, G., Wajcman, H., Hardison, RC. & Patrinos, GP. 2015. Hb Tacoma. Verkkosivu. Viitattu 1.6.2024. https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display format=page&i=289

Giardine, B., Borg, J., Viennas, E., Pavlidis, C., Moradkhani, K., Joly, P., Bartsakoulia, M., Riemer, C., Miller, W., Tzimas, G., Wajcman, H., Hardison, RC. & Patrinos, GP. 2021. Hb Tacoma II. Verkkosivu. Viitattu 1.6.2024 https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display format=page&i=833

Giardine, B., Borg, J., Viennas, E., Pavlidis, C., Moradkhani, K., Joly, P., Bartsakoulia, M., Riemer, C., Miller, W., Tzimas, G., Wajcman, H., Hardison, RC. & Patrinos, GP. 2023. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia mutations. Verkkosivu. Viitattu 4.8.2024. <https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. E-kirja. 9. uud. painos. Helsinki: Edita. Viitattu 5.2.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.ellibslibrary.com/book/978-951-37-6495-1>

Heino, J. & Vuento, M. 2020. Biokemia ja solubiologia. 1.-2. painos. Helsinki: Sanoma Pro.

HemoCue. 2020. HemoCue HbA1c 501. Menetelmäinsertti.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15 uud. painos. Helsinki. Tammi.

Hoffbrand, A. & Moss, P. 2016. Hoffbrand's Essential Haematology. E-kirja. 7. painos. Chichester: Wiley Blackwell. Viitattu 15.7.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/tampere/reader.action?docID=4435977>

Ilanne-Parikka, P. 2019. Glukohemoglobiini, HbA1c. Teoksessa Ilanne-Parikka, P., Niskanen, L., Rönnemaa, T. & Saha, M.-T. (toim.) Diabetes. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 12.10.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.oppi-portti.fi/op/opk04626>

Insuliinipuutosdiabetes: Käypä hoito -suositus. 2022. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Sisätautilääkärin yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkärineuvoston asettama työryhmä. Artikkelin tunnus: hoi50116 Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 10.3.2024. <http://www.kaypahoito.fi>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. E-Kirja. 5–6. painos. Helsinki: Edita. Viitattu. 19.9.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.ellibslibrary.com/book/978-951-37-4445-0>

Kananen, J. 2015. Opinnäytetyön kirjoittajan opas. Näin kirjoitan opinnäytetyön tai pro gradun alusta loppuun. Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 202. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

Kangastupa, P. Sairaalakemisti. 2023a. Opinnäytetyö. Sähköpostiviesti 28.7.2023.

Kangastupa, P. Sairaalakemisti. 2023b. Haastattelu. 14.8.2023. Seinäjoen keskussairaala.

Kangastupa, P. Sairaalakemisti. 2024a. Haastattelu. 19.4.2024. Seinäjoen keskussairaala.

Kangastupa, P. Sairaalakemisti. 2024b. Tietoja. Sähköpostiviesti 22.5.2024.

Kangastupa, P., Åkerman, K., Risku, S., Väisänen, M., Kuusela, R., Romppanen, J., Kouki, A., Sneck, M., Itkonen, O. & Niemelä, O. 2023. The prevalence of hemoglobin Tacoma in Finland detected by HbA1c capillary electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 83 (1), 51-57. Viitattu 18.10.2023.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365513.2022.2164739>

Kestilä-Kekkonen, E. 2023. Kovarianssi ja korrelaatio. Teoksessa *Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja*. Tampere: Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. Verkkosivu. Viitattu 4.1.2024. <https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvanti/korrelaatio/korrelaatio/>

Labquality. 2021. Vieritestisuositus. Verkkosivu. Viitattu 18.10.2023.

<https://www.labquality.com/fi/vieritestisuositus>

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 2.2.2001/101. Viitattu 20.10.2023. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010101>

Lehto, M. 2022. Erytroosytoosi ja polysytemia (punasolujen runsaus). *Duodecim Terveyskirjasto*. Verkkosivu. Viitattu 13.12.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00013>

Lenters-Westra, E. & English, E. 2017. Evaluating new HbA1c methods for adoption by the IFCC and NGSP reference networks using international quality targets. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 55 (9), 1426-1434. Viitattu 14.8.2024. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0109>

Lenters-Westra, E., Strunk, A., Campbell, P. & Slingerland, R. 2017. Can the Afinion HbA1c Point-of-Care instrument be an alternative method for the Tosoh G8 in the case of Hb-Tacoma?. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 77 (1), 2–7. Viitattu 26.5.2024. Vaatii käyttöoikeuden. <https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1183261>

Leppäluoto, J., Rintamäki, H., Vakkuri, O., Vierimaa, H. & Lauri, T. 2019. *Anatomia ja fysiologia. Rakenteesta toimintaan*. E-kirja. 9. uud. painos. Helsinki: Sanoma Pro. Viitattu 12.7.2023. Vaatii käyttöoikeuden. <https://www.elibrary.com/book/978-952-63-5311-1>

Little, R. & Roberts, W. 2009. A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *Journal of Diabetes Science and Technology* 3 (3), 446–451. Viitattu 27.1.2024. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/193229680900300307>

Mehta, A. & Hoffbrand, A. 2014. *Haematology at a Glance*. 4. painos. Chichester: Wiley-Blackwell.

Microsoft. n.d. KESKIHAJONTA.S (KESKIHAJONTA.S-funktio). Verkkosivu. Viitattu 1.3.2024. <https://support.microsoft.com/fi-fi/office/keskihajonta-s-keskihajonta-s-funktio-7d69cf97-0c1f-4acf-be27-f3e83904cc23>

Penttilä, I., Halonen, T., Moilanen, L. & Tiikkainen, U. 2009. Glykoituneen hemoglobiinin (HbA1c) yksikön muutos kansainvälisen suosituksen mukaiseksi. *Kliinlab* 26 (2), 25-31. Viitattu 15.9.2023. https://www.skky.fi/wp-content/uploads/2022/05/092_0.pdf

Raitasuo, S. Business Manager, Partner Sales Finland & Baltics Aidian Oy. 2024. Tacoma. Sähköpostiviesti. 20.3.2024

Roche Diagnostics. 2019. HbA1c and interference due to hemoglobin disorders. Scientific discussion paper. PDF-dokumentti. Viitattu 15.8.2023. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/tina-quant-hba1c-gen-3.html>

Roche. 2019. Cobas HbA1c Test. Menetelmäinsertti.

Roche. 2022. Cobas A1C-3. Menetelmäinsertti.

SD Biosensor. 2023. Standard F HbA1c. Menetelmäinsertti.

Sebia. 2022a. Capillary Electrophoresis. Verkkosivu. Viitattu 19.10.2023. <https://www.sebia.com/technologies/capillary-electrophoresis/>

Sebia. 2022b. Capillarys 3 Tera. Verkkosivu. Viitattu. 20.10.2023. <https://www.sebia.com/instruments/capillarys-3-tera/>

Sebia. 2022c. HbA1c. Verkkosivu. Viitattu 20.10.2023. <https://www.sebia.com/tests/hba1c/>

Siemens Healthineers. 2023. HbA1c Dx. Menetelmäinsertti.

Strickland, S., Campbell, S., Little, R., Bruns, D & Bazydlo, L. 2017. Prevalence of Rare Hemoglobin Variants Identified During Measurements of Hb A1c by Capillary Electrophoresis. *Clinical Chemistry* 63 (12), 1901-1902. Viitattu 15.5.2024. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.276857>

Tucker, P. & Perutz, M. 1977. Mechanism of Charge Compensation and Impairment of Co-operative Functions in Haemoglobin Tacoma (Arg B12(30) β \rightarrow Ser). *Journal of Molecular Biology* 114 (3), 415-420. Viitattu 17.4.2024. Vaatii käyttöoikeuden. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90258-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90258-3)

Tunturi, S. 2022. Hemoglobiini (B-Hb). Duodecim Terveyskirjasto. Verkkosivu. Viitattu 12.10.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/snk03031>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. PDF-dokumentti. Viitattu 27.4.2024. https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf

Tyypin 2 diabetes: Käypä hoito -suositus. 2024. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Sisätautilääkäreiden yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkäri-neuvoston asettama työryhmä. Artikkelin tunnus: hoi50056 Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 28.7.2024. <http://www.kaypahoito.fi>

Vilka, H. 2021. Näin onnistut opinnäytetyössä. Ratkaisut tutkimuksen umpikujiin. Jyväskylä: PS-kustannus.

Wartiovaara-Kautto, U. 2023. Talassemiat. Duodecim Terveyskirjasto. Verkkosivu. Viitattu 17.10.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01178/talassemiot>

Weston, A. & Brown, P. 1997. HPLC and CE. Principles and Practice. E-kirja. San Diego: Academic Press. Viitattu 28.11.2023. https://docs.google.com/file/d/0Bx-8YQWYX4EKTIBIcHpGek5DNkE/view?resourcekey=0-H_MYBfZjnrVDYka2638IKg

Weykamp, C. 2023. Additional Information Annual Report HbA1c Lyophilised 2023. PDF-dokumentti.

LIITTEET

Liite 1. Laittevalmistajien ohjeita

	Tina-quant	Afinion 2	DCA	Cobas b 101	QR-go	SDB F200	Hemocue	Capillarys
Säilyvyys	15–25°C 3 vrk 2–8°C 7 vrk	2–8 °C 10 vrk	-70°C... + 5°C 2 vko + 25°C 5 vrk	Näytteenotosta 2 h -20 °C 60 vrk	2–8 °C 3 vrk	2–8 °C 24 h	-8 °C 7 vrk, jos sinetti on ehjä	15– 30°C 72 h 2–8 °C 7 vrk
Näytemäärä	5 µl Analysointi putkesta (min. 250–500 µl)	1,5 µl	1 µl	2 µl	1 µl	5 µl	4 µl	min. 100 µl – 1 ml
Mittausaika	≈ 10 min	3,5 min	≈ 5 min	< 6 min	< 6 min	≈ 3 min	≈ 5 min	≈ 12 min
Mittausalue (mmol/mol)	n. 23– 196	20–140	20–130	20–130	20– 140	20–140	20–130	20–140

Liite 2. Vieritestilaitteiden kontrollituloksia

1(2)

Vierestilaite	PVM	Matala taso	Korkea taso
Abbott Afinion 2		39–52 mmol/mol	60–77 mmol/mol
	3.10	45	73
	6.10	44	68
	9.10	43	68
	13.10	42	68
	19.10	43	66
	20.10	43	66
Atelica DCA		29–40 mmol/mol	69–89 mmol/mol
	3.10	36	74
	6.10	34	76
	9.10	34	73
	13.10	36	74
	19.10	36	72
	20.10	34	75
Roche Cobas b 101		21–45 mmol/mol	57–101 mmol/mol
	21.9	31	70
	22.9	32	76
	3.10	30	73
	6.10	31	76
	9.10	32	74
	13.10	30	73
	20.10	29	75

(jatkuu)

Vieritestilaite	PVM	Matala taso	Korkea taso
Aidian QuikRead go		44–57 mmol/mol	71–97 mmol/mol
	21.9	46	82
	22.9	49	82
	3.10	48	85
	6.10	48	81
	9.10	46	82
	13.10	48	83
	20.10	46	85
SDBiosensor F200		24–50 mmol/mol	59–102 mmol/mol
	3.10	37	76
	6.10	36	71
	9.10	36	78
	13.10	33	76
	19.10	36	74
	20.10	33	71
Hemocue HbA1c 501			53–65 mmol/mol
	21.9		62
	22.9		60
	3.10		61
	6.10		60
	9.10		63
	13.10		64
	20.10		63

Liite 3. Normaali näytteiden bias %

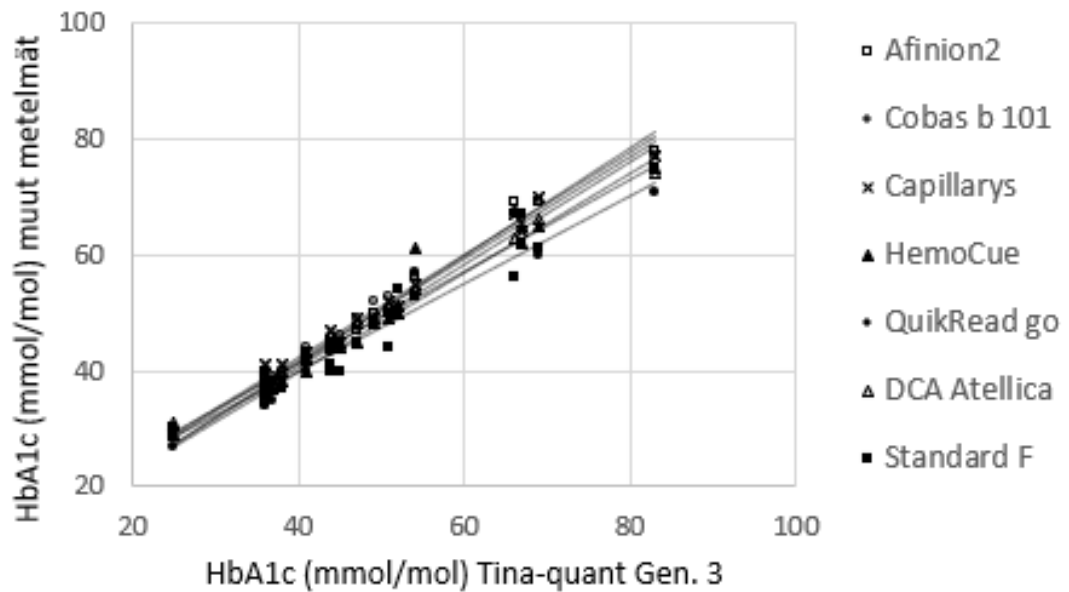
BIAS %								
	Tina-quant	Afinion2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
Normaali 1	69	0	-4	0	-13	-12	-6	1
Normaali 2	38	3	5	5	0	-4	0	8
Normaali 3	67	0	-7	-1	0	-8	-3	-4
Normaali 4	44	0	2	2	-9	-9	2	0
Normaali 5	54	4	0	4	6	-2	13	2
Normaali 6	47	0	2	4	-4	-3	-4	4
Normaali 7	51	-2	0	4	-2	-13	-4	2
Normaali 8	66	5	-5	2	2	-15	3	2
Normaali 9	25	16	24	16	8	20	16	16
Normaali 10	36	0	0	0	-6	-1	0	3
Normaali 11	37	3	0	5	-5	2	0	3
Normaali 12	83	-6	-11	-7	-14	-10	-10	-7
Normaali 13	41	5	2	5	-2	5	2	5
Normaali 14	36	8	6	11	6	11	3	14
Normaali 15	41	2	2	7	0	3	-2	2
Normaali 16	45	0	-2	2	0	-11	-2	0
Normaali 17	49	2	-2	6	-2	-3	0	0
Normaali 18	52	4	-4	4	4	-4	-2	-2
Normaali 19	36	-3	3	6	-6	2	0	0
Normaali 20	44	2	5	2	-2	-7	0	7
ka	48	2	1	4	-2	-3	0	3

Liite 4. Tacoma-näytteiden bias %

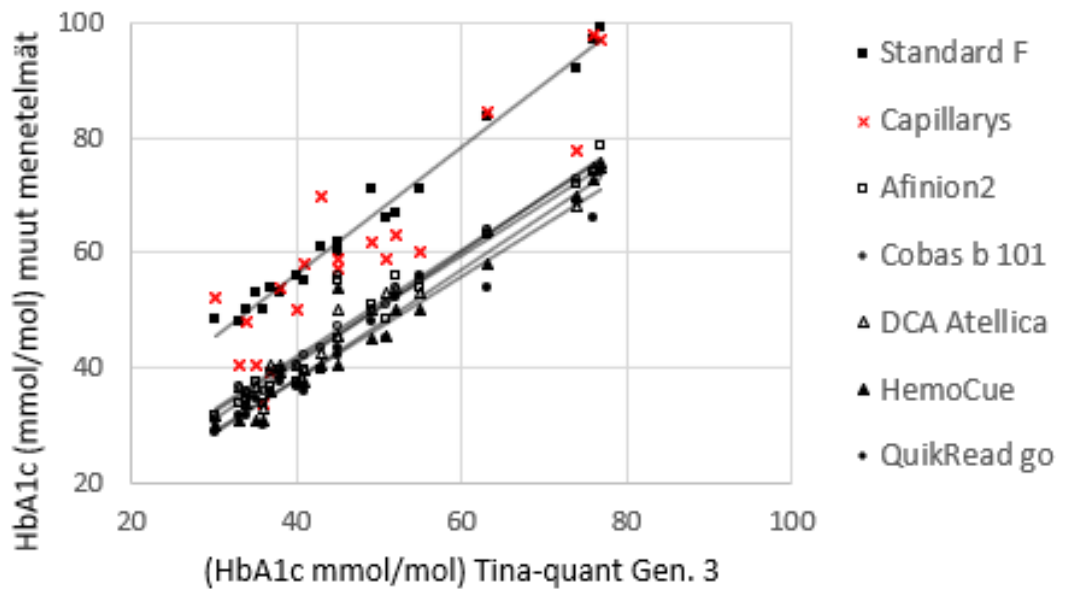
BIAS %								
	Tina-quant	Afinion2	DCA	Cobas b 101	QR-go	Standard F	Hemocue	Capillarys
Tacoma 1	74	-3	-8	-1	-7	25	-5	5
Tacoma 2	33	3	12	12	-3	44	-6	24
Tacoma 3	63	0	2	2	-14	33	-8	35
Tacoma 4	37	0	11	5	-3	46	-3	5
Tacoma 5	45	22	11	24	-7	37	20	27
Tacoma 6	51	-4	4	0	-12	30	-10	16
Tacoma 7	55	-2	-4	0	2	28	-9	9
Tacoma 8	76	-3	-1	-3	-13	27	-4	29
Tacoma 9	30	7	7	3	-3	62	0	73
Tacoma 10	36	-6	-8	0	-17	38	-14	-6
Tacoma 11	34	3	6	6	-6	46	0	41
Tacoma 12	77	3	-1	-3	-4	28	-3	26
Tacoma 13	38	5	8	5	0	40	3	42
Tacoma 14	41	-2	-2	2	-12	35	-7	41
Tacoma 15	40	-5	3	3	-8	41	-5	25
Tacoma 16	43	-7	0	2	-7	41	-5	63
Tacoma 17	45	0	2	4	-2	32	-9	31
Tacoma 18	52	8	4	4	0	29	-4	21
Tacoma 19	35	9	6	9	0	51	-11	17
Tacoma 20	49	4	2	2	-2	44	-8	27
ka	48	2	3	4	-6	38	-4	28

Liite 5. Yhteenveto laitteiden tulostasosta

Ei variantti näytteet



Hb Tacoma -näytteet



Liite 6. Näytteiden näytteenotto- sekä analysointipäivät

Näyte (normaali ja Tacoma)	Näyte otettu	Näyte analysoitu
Näyte 1	3.10	6.10
Näyte 2	3.10	6.10
Näyte 3	3.10	6.10
Näyte 4	3.10	6.10
Näyte 5	5.10	6.10
Näyte 6	5.10	6.10
Näyte 7	5.10	6.10
Näyte 8	6.10	6.10
Näyte 9	6.10	9.10
Näyte 10	11.10	13.10
Näyte 11	11.10	13.10
Näyte 12	11.10	13.10
Näyte 13	12.10	13.10
Näyte 14	12.10	13.10
Näyte 15	12.10	13.10
Näyte 16	12.10	13.10
Näyte 17	12.10	13.10
Näyte 18	19.10	20.10
Näyte 19	18.10	20.10
Näyte 20	20.10	20.10