



**LH:N JA FSH:N NÄYTEMATERIAALIN
VERIFIOINTI ETELÄ-POHJANMAAN
SAIRAANHOITOPIIRIN KLIINISEN
KEMIAN YKSIKÖSSÄ**

Tuovi Ahola

Riitta Latva-Nevala

Opinnäytetyö
Tammikuu 2015
Bioanalytiikan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Seinäjoen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
12KABIOSJ

AHOLA, TUOVI & LATVA-NEVALA, RIITTA

LH:n ja FSH:n näytemateriaalin verifiointi Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksikössä

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 7 sivua
Tammikuu 2015

Luteinisoiva hormoni (LH) ja follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) ovat aivolisäkkeen etulohkon tuottamia hormoneja. Niitä tarvitaan sukupuolihormonien tuotantoon sekä naisilla että miehillä. Naisilla LH ja FSH säätelevät munasarjoissa estrogeenin ja progesteronin tuotantoa. Miehillä LH ja FSH säätelevät kiveksissä androgeenien synteesiä ja eritystä.

Opinnäytetyön aiheena on LH:n ja FSH:n näytemateriaalin muutoksen verifiointi. Aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksiköltä, jossa oli tullut ajankohtaiseksi vaihtaa LH:n ja FSH:n osalta näytemateriaali seerumista plasmaan. Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa tietoa Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksikölle LH:n ja FSH:n pitoisuuksista seerumi- ja plasmanäytteissä. Tutkimuksen tarkoituksena oli verifiointiin eli todentamisen avulla selvittää LH:n ja FSH:n pitoisuuksien eroja seerumi- ja plasmanäytteissä. Tutkimuksella selvitettiin, voidaanko LH:n ja FSH:n kohdalla toteuttaa näytemateriaalin muutos seerumista plasmaan.

Seeruminäytteitä ja vertailuun käytettäviä rinnakkaisia plasmanäytteitä kerättiin potilasnäytteinä LH:sta 81 ja FSH:sta 122 näytettä. Määritykset suoritettiin Cobas® 8000 e602 – analyyttorilla, elektrokemiluminometrisella immunoanalyysillä. Testauksen toistettavuus selvitettiin laskemalla sarjojen välinen ja sarjan sisäinen hajonta. Sarjojen välisessä hajonnassa käytettiin 20 LH:n ja FSH:n kontrollitulosta sekä matalalta että korkealta tasolta, joiden perusteella tulokset laskettiin. Sarjan sisäisessä hajonnassa tuloksien laskemiseen tarvittiin kaksi eri plasmanäytettä kummastakin hormonista ja näytteet määritettiin kukin kymmenen kertaa peräkkäin.

Tulokset käsiteltiin ja laskettiin Microsoft Excel – taulukkolaskentaohjelmalla, jonka avulla luotiin hajontakuviot. Tulosten perusteella saatiin selville, että LH:n ja FSH:n seerumi- ja plasmanäytteiden tulostasot ovat yhteneväiset, lukuun ottamatta joitakin normaaleja satunnaispoikkeamia. Korrelaatiokerroin LH:lla on 0,9983 ja FSH:lla 0,9995. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että plasma soveltuu näytemateriaaliksi määrittettäessä LH- ja FSH -pitoisuuksia ja muutos näytemateriaalissa seerumista plasmaan on mahdollinen Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksikössä.

Asiasanat: verifiointi, luteinisoiva hormoni, follikkeliä stimuloiva hormoni, seerumi, plasma

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Seinäjoen ammattikorkeakoulu
Seinäjoki University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science
12KABIOSJ

AHOLA, TUOVI & LATVA-NEVALA, RIITTA
Verification of LH and FSH Sample Material in the Clinical Chemistry Unit of the
Hospital District of South Ostrobothnia

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 7 pages
January 2015

Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) are hormones produced by the anterior pituitary gland. They are needed both by females and males to produce sex hormones. In females LH and FSH regulate the production of estrogen and progesterone in ovaries. In males LH and FSH regulate the synthesis and secretion of androgens in testicles.

The topic of the thesis is the verification of the change in the LH and FSH sample material. The topic was received from the Clinical Chemistry Unit of the Hospital District of South Ostrobothnia where it had become topical to change the LH and FSH sample material from serum to plasma. The aim of the study was to produce information about the concentration of LH and FSH in serum and plasma samples to the Clinical Chemistry Unit of the Hospital District of South Ostrobothnia. The purpose of the study was by means of verification to find out the differences in the concentration of LH and FSH in serum and plasma samples. The study examined whether it is possible to use plasma instead of serum as sample material when testing LH and FSH.

Serum samples and parallel plasma samples for comparison were collected from patients as follows: 81 LH samples and 122 FSH samples. The determinations were made by Cobas® 8000 e602 –analyzer i.e. electro-chemiluminescence immunoassay. To examine the repeatability of the testing, both the between-run standard deviation and the internal dispersion were counted. To count the between-run standard deviation, 20 control results of both low and high level of LH and FSH were tested. To count the internal dispersion, two separate plasma samples were needed from both hormones and the samples were determined successively ten times each.

The results were treated and counted by Microsoft Excel –spreadsheet application. It was also used to create the dispersion patterns. The results revealed that the levels of LH and FSH in both serum and plasma samples are compatible apart from some regular random deviations. Correlation coefficient for LH is 0,9983 and for FSH it is 0,9995. Based on the results can be stated that plasma is suitable as sample material when determining the content of LH and FSH. Therefore it is possible to use plasma instead of serum as sample material in the Clinical Chemistry Unit of the Hospital District of South Ostrobothnia.

Key words: verification, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, serum, plasma

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	HORMONIERITYS	7
2.1	Hormonit ja umpieritysjärjestelmä	7
2.2	Hypotalamus ja aivolisäke	8
2.3	Gonadotropiinit	9
2.4	LH:n ja FSH:n vaikutukset	11
3	VERI TUTKIMUSMATERIAALINA	13
3.1	Näyttemateriaalit.....	13
3.2	Käytössä olevia antikoagulantteja.....	13
4	VERIFIOINTI	15
5	AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA	17
6	TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT	20
7	TUTKIMUSMENETELMÄ	21
8	TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN	23
8.1	Tutkimusaineiston kerääminen ja analysointi.....	23
8.2	Tulosten tilastollinen käsittely	26
8.2.1	Tulostason poikkeama, korrelaatiokerroin ja regressioanalyysi	26
8.2.2	Keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin.....	27
9	TULOKSET	28
9.1	Tulosten vertailu	28
9.2	Testauksen toistettavuus	32
9.2.1	Sarjojen välinen hajonta.....	32
9.2.2	Sarjan sisäinen hajonta.....	33
10	JOHTOPÄÄTÖKSET	34
11	POHDINTA.....	35
	LÄHTEET.....	38
	LIITTEET	41
	Liite 1. LH:n pitoisuudet seerumissa ja plasmassa.....	41
	Liite 2. FSH:n pitoisuudet seerumissa ja plasmassa.....	43
	Liite 3. Sarjojen väliseen vertailuun otetut kontrollitulokset	46
	Liite 4. Sarjojen sisäinen toistettavuus LH:n ja FSH:n osalta	47

1 JOHDANTO

Hormonit ovat kemiallisia yhdisteitä, joita tuotetaan umpieritysjärjestelmän soluissa. Nämä solut sijaitsevat endokriinisissa rauhasissa eli umpirauhasissa. Näistä hormonit vapautuvat suoraan verenkiertoon ja leviävät verenkierron välityksellä spesifisiin kohdesoluihin. Hormonit saavat aikaiseksi fysiologisia vaikutuksia solunsisäisen viestijärjestelmän avulla. Kohdesolut muodostavat kohdekudoksen, johon vaikuttaa jo pienet määrät hormonia. Elintoiminnoille on tärkeää, että hormonipitoisuus veressä on tarkoin määritetyissä rajoissa. Luteinisoiva hormoni (LH) ja follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) ovat aivolisäkkeen etulohkon tuottamia hormoneja. Ne säätelevät sukupuolirauhasten, naisilla munasarjojen ja miehillä kivesten, toimintaa. (Leppäluoto ym. 2013, 307–315, 322.)

Opinnäytetyön toimeksiantaja on Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin Kliinisen kemian yksikkö, jonka päätoimipaikka on Seinäjoen keskussairaalassa. Työn aihe saatiin tammikuussa 2014 kliinisen kemian laboratoriosta. Opinnäytetyössä tutkitaan, onko LH:n ja FSH:n tulostaso seeruminäytteessä ja plasmanäytteessä yhdenmukainen. Saatujen tulosten perusteella tehdään johtopäätökset, voidaanko näytemateriaali muuttaa seeruminäytteestä plasmanäytteeksi. Opinnäytetyön tarvittavat määritykset tehtiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa.

Aihe valikoitui, koska kliinisen kemian laboratoriossa laitekanta oli uudistumassa. Sen myötä oli noussut esille kysymys, voitaisiinko joidenkin analyyttien kohdalla vaihtaa näytemateriaaliksi plasma. Näytemateriaalin muutos seerumista plasmaan nopeuttaa LH:n ja FSH:n vastausten saamista, koska plasmanäytettä ei tarvitse seisottaa 30 min, kuten täytyy tehdä seeruminäytteelle. Lisäksi muutos vähentää myös näytteenottoon kuluvaa aikaa, koska otettavien näyteputkien määrä vähenee. Myös potilaat hyötyvät vähentyneestä näytteen tarpeesta, mikäli heistä otetaan samalla kertaa plasmanäyte muihin määrityksiin. Näytemateriaalin vaihdolla on myös taloudellista hyötyä, koska käytettävien näyteputkien määrä vähenee ja sitä myöten myös jätteen määrä pienenee.

Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorio on akkreditoitu laboratorio ja sen toiminta on kuvattu toimintakäsikirjassa. Toimintakäsikirjaan perustuen laboratorion tulee verifioida uusi menetelmä tai näytemateriaali ennen sen käyttöönottoa. Opin-

näytetyö käsittelee näytemateriaalin verifiointia eli todentamista. Verifiointi suoritetaan vertaamalla tulostasojen poikkeamia seerumi- ja plasmanäytteiden välillä. Osana verifiointia on testauksen toistettavuuden selvittäminen sarjojen välisen hajonnan ja sarjan sisäisen hajonnan avulla. (Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2012.)

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Ongelman asettelua lähestytään vertailemalla eri näytemateriaalien tuloksia keskenään, jolloin saadaan esille niiden mahdollinen tulostasojen yhteneväisyys. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa ilmiöitä kuvataan määrin, paljouksin ja numeroin. Vertailua suoritettaessa valitaan mitattavissa olevat ja samanlaatuiset kohteet. (Anttila 2006, 233–234.) Saadut muuttujat muokataan taulukkomuotoon ja aineisto käsitellään tilastollisesti. Tiedoista luodaan graafiset esitykset, joiden perusteella saadaan hyvä yleiskuva aineistosta.

Opinnäytetyön alussa käsitellään umpieritysjärjestelmää ja tarkastellaan lähemmin LH:n ja FSH:n vaikutusta ihmisen elimistöön. Tämän jälkeen kerrotaan yleisesti verestä näytemateriaalina ja käytössä olevista antikoagulanteista. Opinnäytetyössä kerrotaan, kuinka tutkimusnäytteet kerättiin ja käsiteltiin sekä miten päädyttiin saatuihin tuloksiin. Saatujen tulosten perusteella tehtiin tutkimukseen liittyvät johtopäätökset.

2 HORMONIERITYYS

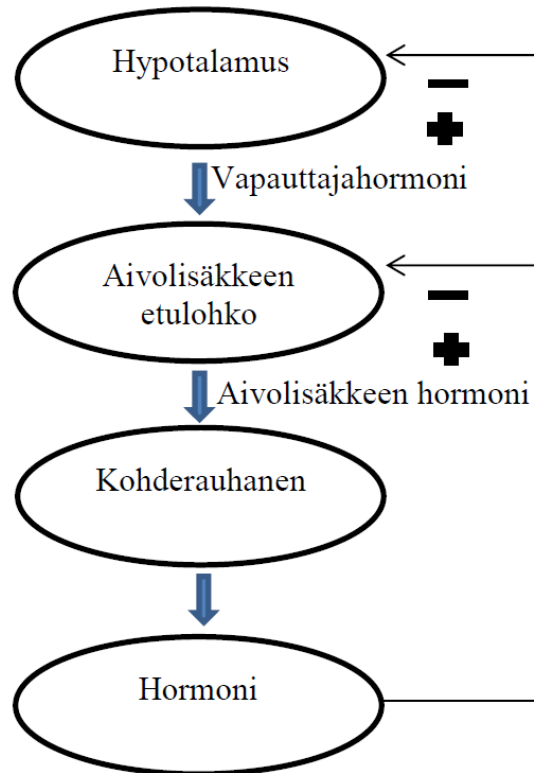
2.1 Hormonit ja umpieritysjärjestelmä

Hormonit ovat kemiallisia yhdisteitä, jotka voivat olla rakenteeltaan yksittäisiä aminohappojohdoksia, aminohapoista muodostuneita ketjuja eli polypeptidejä tai steroideja. Peptidihormonit ovat vesiliukoisia ja steroidit ovat rasvaliukoisia. Hormonia tuotetaan umpieritysjärjestelmän soluissa. Nämä solut sijaitsevat endokriinisissa rauhasissa eli umpirauhasissa. Umpirauhasia ovat mm. aivolisäke, kilpirauhanen ja lisäkilpirauhanen sekä munasarjat ja kivekset. Umpirauhasista hormonit vapautuvat suoraan verenkiertoon vapaina tai kuljettajamolekyyleihin sitoutuneena ja leviävät verenkierron välityksellä spesifisiin kohdesoluihin. Kohdesoluihin hormonit sitoutuvat reseptoreiden avulla ja aktivoivat solun toiminnan. (Leppäluoto ym. 2013, 307, 315.)

Umpirauhasen pääasiallinen tehtävä on tuottaa hormoneja elimistön käyttöön. Tämän lisäksi monet muutkin elimet tai soluryhmät tuottavat hormoneja muiden varsinaisten tehtäviensä ohella. Esimerkkinä voi mainita sydänlihaksen, joka oman toimintansa lisäksi erittää natriureettisia peptidihormoneja, joiden tehtävänä on lisätä natriumin eritystä virtsaan. (Leppäluoto ym. 2013, 310–311.)

Hormonit saavat aikaiseksi fysiologisia vaikutuksia solunsisäisen viestijärjestelmän avulla. Kohdesolut muodostavat kohdekudoksen, jonka toimintaan vaikuttaa jo pieni määrä hormonia. Elintoiminnoille on tärkeää, että hormonipitoisuus veressä on tarkoin määritetyissä rajoissa. Hypotalamus koordinoi umpieritysjärjestelmän toimintaa vaikuttamalla aivolisäkkeen hormonituotantoon. Hormonien eritykseen vaikuttaa palautejärjestelmät. Hormonien negatiivisessa palautejärjestelmässä verenkiertoon erittynyt hormoni vaikuttaa niihin tekijöihin, jotka pystyvät säätelemään hormonin synteesiä ja erittymistä verenkiertoon. Jos umpirauhasen erittämää hormonia on verenkierrossa liian paljon, se estää hypotalamuksen ja aivolisäkkeen hormonieritystä. Tämän seurauksena hypotalamuksen ja aivolisäkkeen kiihdyttävä toiminta vaimenee ja umpirauhasen hormonituotanto pienenee. Mikäli veren hormonipitoisuus on pieni kyseisen hormonin kohdalta, hypotalamuksen ja aivolisäkkeen hormonituotanto kiihtyy (kuva 1). Palautejärjestelmän tavoitteena on hakeutua tasapainotilaan pitkällä aikavälillä. Tasapainon säilyminen negatiivisella palautteella tapahtuu värähdellen eli oskilloiden. Esimerkkinä

tästä voidaan mainita kuukautiskierto. (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist 2009, 371; Leppäluoto ym. 2013, 310, 314.)



KUVA 1. Hormonien negatiivinen palautejärjestelmä (Leppäluoto ym. 2013, muokattu)

2.2 Hypotalamus ja aivolisäke

Hypotalamus on aivojen pohjassa sijaitseva muutaman kuutiosenttimetrin kokoinen väliaivojen alue, joka on yhteydessä aivolisäkkeeseen aivolisäkkeen varren välityksellä. Kyseisen elimen toimintaa säätelevät hermoärsykkeet, jotka tulevat keskus- ja ääreis-hermostosta. Hypotalamus on osallisena autonomisen hermoston toiminnan, kehon lämpötilan, nestetasapainon, ruokahalun ja aivolisäkkeen hormonitoiminnan säätelyssä. (Sane 2009, 64; Leppäluoto ym. 2013, 323.)

Hypotalamus toimii myös hormoneja tuottavana elimenä. Se erittää vapauttaja- ja estäjähormoneja, jotka säätelevät aivolisäkkeen etulohkon hormonitoimintaa. Hypotalamus ja aivolisäkkeen etuosa ovat yhteydessä toisiinsa verenkierron välityksellä. Vapauttaja-hormoneja ovat tyreotropiinia vapauttava TRH, gonadotropiinia vapauttava GnRH, ACTH:ta vapauttava CRH ja kasvuhormonia vapauttava GRH. Edellä mainitut hormo-

nit lisäävät kohdehormoninsa eritystä. Estäjähormoneja ovat somatostatiini, joka vaikuttaa kasvuhormonin eritykseen ja dopamiini, joka vaikuttaa estävästi prolaktiinin eritykseen. (Leppäluoto ym. 2013, 323–324.)

Aivolisäke eli hypofyyysi sijaitsee aivojen alla, kitaluun syvennyksessä. Se painaa keskimäärin 0,5 grammaa, on noin yhden senttimetrin mittainen ja on yläpinnan muodoltaan kupera. Aivolisäkkeessä on kaksi erillistä osaa; etulohko eli adenohypofyyysi ja takalohko eli neurohypofyyysi. Etu- ja takalohko ovat anatomialtaan ja toiminnaltaan erilaisia. (Sane 2009, 77, 79.)

Aivolisäkkeen varren ja etulohkon verisuonituksen tehtävänä on kuljettaa hypotalamuksesta neurohormoneja aivolisäkkeen etulohkon endokriinisiin soluihin, missä ne saavat aikaiseksi aivolisäkehormonien erittymisen. Etulohkon hormonit ovat peptidihormoneja, jotka säätelevät kasvua ja kehitystä sekä kilpirauhasen, lisämunuaisen kuorikerroksen, rintarauhasen ja sukupuolirauhasten toimintaa. Näitä hormoneja ovat somatotropiini (GH, kasvuhormoni), tyreotropiini (TSH), kortikotropiini (ACTH), prolaktiini (PRL), lutropiini (LH, luteinisoiva hormoni) ja follitropiini (FSH, follikkeliä stimuloiva hormoni). Jokaista eri etulohkon hormonia tuottaa oma solutyypinsä, lukuun ottamatta LH:ta ja FSH:ta. Nämä kaksi hormonia muodostuvat saman solutyypin soluissa. (Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie 2012, 188–191.)

Takalohko eli neurohypofyyysi muodostuu hypotalamuksen hermosyistä, hermotukisolusta ja verisuonista. Takalohko ei itse tuota hormoneja, koska sillä ei ole hormoneja tuottavia soluja. Se varastoi ja vapauttaa hypotalamuksessa muodostuvia neurohormoneja, joita ovat antidiureettinen hormoni ja oksitosiini. (Sand ym. 2012, 188–189.)

2.3 Gonadotropiinit

Hypotalamus tuottaa gonadotropiinia vapauttavaa hormonia eli GnRH:ta, joka stimuloi aivolisäkkeen etulohkon tuottamia sukupuolirauhasten toimintaa sääteleviä hormoneja eli gonadotropiineja. Gonadotropiineja ovat LH, FSH ja hCG eli koriongonadotropiini. LH:ta ja FSH:ta tarvitaan sukupuolirauhasten normaaliin toimintaan eli sukupuolihormonien tuotantoon sekä naisilla että miehillä. LH ja FSH säätelevät munasarjoissa estrogeenin ja progesteronin sekä kiveksissä androgeenien synteesiä ja eritystä. HCG on

istukkakudoksen tuottama gonadotropiini. HCG stimuloi estrogeenin ja progesteronin tuotantoa keltarauhasessa ja on tärkeä tekijä raskauden jatkumiselle. (Koriongonadotropiini 2011; Leppäluoto ym. 2013, 313, 322; Perheentupa 2013, 743–744.)

Aivolisäkehormonit erittyvät pulsseina ja pitoisuudet vaihtelevat vuorokauden ja kuukautiskierron ajan kohdan mukaan. Taulukoissa 1 ja 2 esitetään LH:n ja FSH:n viitearvot Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian laboratorion mukaan. Useimpien aivolisäkehormonien pitoisuudet ovat suurimmillaan aamuyön tunteina. Naisilla LH:n ja FSH:n pulsseja esiintyy kuukautiskierron follikulaarivaiheessa 90 minuutin ja luteaalivaiheessa 100–200 minuutin välein. Erilaiset elimistön stressitilat, kuten esimerkiksi fyysinen stressi voivat vaikuttaa hypotalamuksen toimintahäiriöiden kautta LH:n ja FSH:n erityksen vähenemiseen. Tästä aiheutuu kuukautishäiriöitä tai kuukautisten poisjäämistä. (Stenman & Hämäläinen 2009, 44; Tiitinen 2009, 670, 676; Sand ym. 2012, 495.)

TAULUKKO 1. LH:n viitearvot (Luteinisoiva hormoni 2011)

S-LH		Pitoisuus	Yksikkö
Naiset	Preovulaatiovaihe	1,6–9,3	IU/l
	Ovulaatiohuippu	13,8–71,8	IU/l
	Luteaalivaihe	0,5–12,8	IU/l
	Postmenopaussi	15,0–64,0	IU/l
Miehet		0,7–6,7	IU/l
Lapset	alle 2v	alle 2,0	IU/l
	2-8v	alle 0,2	IU/l

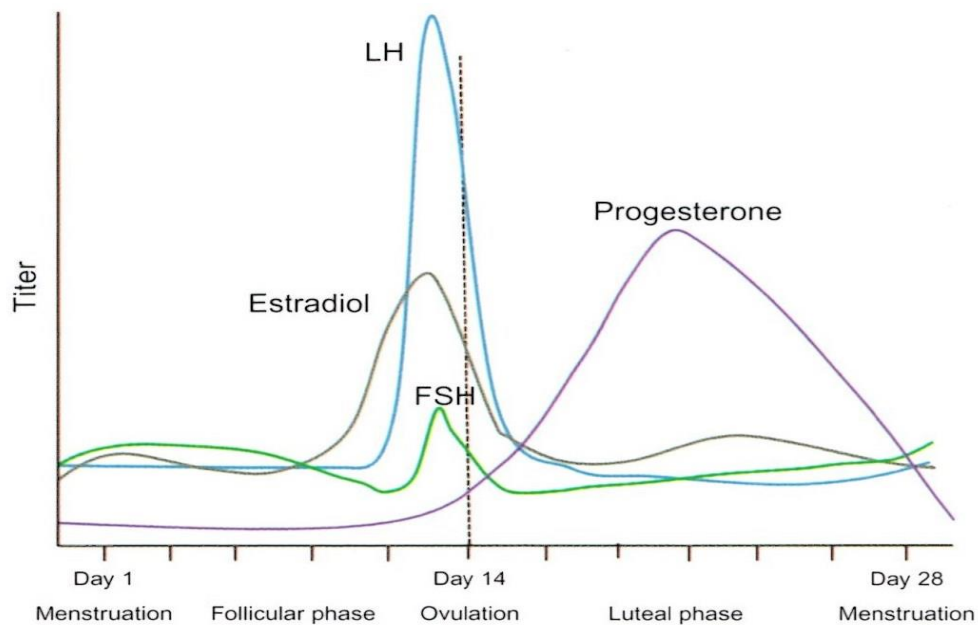
TAULUKKO 2. FSH:n viitearvot (Follikkelia stimuloiva hormoni 2011)

S-FSH		Pitoisuus	Yksikkö
Naiset	Follikulaarivaihe	3,5–12,5	IU/l
	Ovulaatiovaihe	4,7–21,5	IU/l
	Luteaalivaihe	1,7–7,7	IU/l
	Postmenopaussi	26,0–135,0	IU/l
Miehet		1,5–12,4	IU/l
Lapset	alle 9v	0,1–3,0	IU/l
	10-15v	1,0–7,0	IU/l

LH:n ja FSH:n erityis vaihtelee eri ikävaiheissa. Pitoisuudet nousevat puberteettikehityksen alkaessa, mutta eivät vielä yllä aikuisten arvoihin. Murrosiän alkaessa hypotalamuksen toiminta muuttuu. Se alkaa erittää enemmän GnRH:ta. Tämä puolestaan stimuloi aivolisäkkeen etulohkoa. Tällöin LH:n ja FSH:n erityis lisääntyy. Näiden hormonien lisääntyminen sukupuolirauhasissa stimuloi sukupuolihormonien tuotantoa. Sukukypsässä iässä olevilla naisilla pitoisuudet vaihtelevat kierron eri vaiheiden mukaan. Naisilla hormonipitoisuudet nousevat postmenopausin aikana selvästi. Miehillä hormonituotanto on suhteellisen vakaata koko aikuisiän. (Follikkelia stimuloiva hormoni 2011; Luteinisoiva hormoni 2011; Sand ym. 2012, 495, 515.)

2.4 LH:n ja FSH:n vaikutukset

LH ja FSH ovat munasarjojen toiminnan kannalta tärkeimmät säätelijät. FSH:ta tarvitaan munarakkulan eli follikkelin kasvuun. Se kiihdyttää munarakkuloiden kasvua ja kehitystä kuukautiskierron alussa, jolloin pitoisuus nousee. Munarakkulan kypsyessä estradiolin, joka on tärkein estrogeeneista, määrä kasvaa. Estrogeeneilla tarkoitetaan naishormoneita, joita ovat estradioli, estroni ja estrioli. Estradiolin negatiivisen palautemekanismin vaikutuksesta FSH:n erityis pienenee. LH:n pitoisuus pysyy melko tasaisena lähes koko kuukautiskierron ajan. Pitoisuus kuitenkin lisääntyy voimakkaasti 10 – 15 tuntia ennen ovulaatiota, estradiolin pitoisuuden huomattavan lisääntyminen vuoksi. Estradiolin lisääntynyt määrä saa aikaan positiivisen palautteen ansiosta hetkellisesti LH:n ja FSH:n pitoisuudet korkeammalle tasolle. LH saa aikaan munarakkulan repeämisen ja munasolun irtoamisen. LH stimuloi keltarauhasen eli luteaalisolun kehitystä ja ylläpitää sen progesteronituotantoa seuraaviin kuukautisiin asti (kuva 2). (Sand ym. 2012, 501–503; Leppäluoto ym. 2013, 366.)



KUVA 2. Keskeisempien sukupuolihormonien vaihtelut naisilla kuukautiskierron mukaan (Dasgupta & Wahed 2014, 147.)

Miehillä LH ja FSH säätelevät kivesten siittiö- ja hormonituotantoa. LH:ta ja FSH:ta tarvitaan normaaliin testosteronituotantoon ja hedelmöittämiskykyisten siittiöiden tuotantoon. Kiveksissä on Leydigin soluja ja Sertolin soluja. Leydigin solut tuottavat androgeeneja eli mieshormoneja. Androgeeneista tärkein on testosteroni. LH vaikuttaa suoraan Leydigin soluihin ja lisää niiden testosteronituotantoa. LH on välttämätöntä siittiöidentuotannossa, koska ilman testosteronia kivekset eivät voi tuottaa siittiöitä. FSH stimuloi Sertolin solujen toimintaa. Sertolin solut ympäröivät siittiöiden esiasteita. Solujen tehtävänä on säädellä esiasteiden kypsymisestä ja vastata niiden ravinnon saannista. (Sand ym. 2012, 491–495.)

3 VERI TUTKIMUSMATERIAALINA

3.1 Näyttemateriaalit

Ihmisessä on noin viisi litraa verta. Veri muodostuu puna- ja valkosoluista, verihiuta-leista ja plasmasta. Plasma ja seerumi ovat veren nestemäisiä osia, joita käytetään yleisesti veren eri partikkeleiden tutkimiseen. Plasma sekä seerumi sisältävät esimerkiksi hormoneja, ravintoaineita, vasta-aineita, antigeenejä ja elektrolyyttejä. Suurin ero plasman ja seerumin välillä on se, että plasma sisältää fibrinogeeniä, mutta seerumi ei. (Sand ym. 2012, 316; Hayat 2012.)

Verinäytteitä voidaan ottaa laskimosta, valtimosta tai ihopistosnäytteenä sormenpästä tai vastasyntyneeltä kantapästä. Yhdestä verinäytteestä voidaan tehdä useita eri analyyseja. Näyttemateriaalina voidaan käyttää kokoverta, plasmaa tai seerumia. Tutkittaessa kokoverta tai plasmaa, näytteen hyytyminen estetään ottamalla näyte antikoagulanttia eli hyytymisenestoainetta sisältäviin putkiin. Hyytymisenestoaineen valintaan vaikuttaa analysoitava laboratoriotutkimus. Näyte voidaan sentrifugoida välittömästi. Kun näyte sentrifugoidaan, erottuvat plasma ja irralliset verisolut omiksi kerroksiksi. Kun analyysi tehdään seerumista, näyte voidaan ottaa lisäaineettomaan putkeen tai putkeen, johon on lisätty hyytymistä nopeuttava hyytymisaktivaattori. Näytteenoton jälkeen näytteen täytyy seisoa puolituntia, jonka aikana veri hyytyy. Tämän jälkeen näyte sentrifugoidaan. Pinnalle erottuu seerumi ja pohjalle jää hyytymä, joka sisältää veren solut ja fibriniin. (Matikainen, Miettinen & Wasström 2010, 56–79; Hayat 2012.)

3.2 Käytössä olevia antikoagulantteja

Yleisimmin käytettyjä hyytymisenestoaineita ovat hepariini, natriumsitraatti ja EDTA. Hepariini estää fibrinogeenin muodostumista fibriiniksi ja siten myös veren hyytymisen. Hepariini ei hemolysoi punasoluja ja sitä esiintyy myös luonnostaan elimistössä. Plasmanäytteistä, joissa käytetään hepariinia hyytymisen estämiseksi, voidaan analysoida mm. proteiinipitoisuutta. (Matikainen ym. 2010, 76.) Litiumhepariinia käytetään yleisesti kemian määrityksissä natriumhepariinin sijasta. Litiumhepariini ei kuitenkaan sovi käytettäväksi, kun määritetään litiumpitoisuutta verestä. (Dasgupta & Wahed 2014, 41.)

Natriumsitraatin hyytymistä estävä vaikutus perustuu sen kykyyn sitoutua veren kalsiumiin. Näytteessä on tärkeää, että veren ja natriumsitraatin suhde on oikea. Sitä käytetään lasko- ja hyytymisaikatutkimuksissa. EDTA eli etyleenidiamiinotetraetikkahappo sitoo verestä kalsiumin estäen näin ollen veren hyytymisen. EDTA säilyttää verisolujen koon ja muodon parhaiten. EDTA verta käytetään perusveren kuvan, hemoglobiinin ja valkosolujen määrän määrittämiseen. (Matikainen ym. 2010, 76.)

4 VERIFIOINTI

Yhä useammat kliiniset laboratoriot on akkreditoitu tai sertifioitu, jolloin niiden toiminta perustuu esimerkiksi standardeihin ISO 17025 ja ISO 15189. Laboratorioiden laadun osoituksena tulee uusi menetelmä validoida tai verifioida ennen käyttöönottoa. Näiden tarkoituksena on osoittaa laboratoriolle, sen palveluiden käyttäjille, viranomaisille ja markkinoille, että kyseinen menetelmä on luotettava ja tarkoitukseen sopiva. (Theodorsson 2012, 305–307.) Validointia ja verifiointia voidaan suorittaa myös esimerkiksi lääkekäyttöön tarkoitettuihin laitteille ja ohjelmistoille (Sippola 2014).

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla osoitetaan menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validointi on tärkeä toimenpide kemiallisissa analyyseissä, koska sen avulla pystytään osoittamaan tulosten luotattavuus ja tieteellinen pätevyys olosuhteissa, joissa sitä käytetään. (Ehder 2005, 25.) Verifiointissa eli todentamisessa varmistetaan, että määritellyt vaatimukset on täytetty objektiiviseen näyttöön perustuen. Varmistuminen voidaan suorittaa tekemällä vaihtoehtoisia laskelmia, vertaamalla uuden ja jo osoitetun sovelluksen spesifikaatioita keskenään, koekäyttöä ja testejä suorittamalla ja asiakirjojen katselmoinnilla ennen julkaisua. (SFS-EN ISO 15189 2013, 16.)

Ennen uuden tutkimusmenetelmän käyttöönottoa laboratorion tulee verifioida aikaisemmin validoitu tutkimusmenetelmä. Kun laboratorio vahvistaa menetelmän suorituskykyominaisuuksia, tulee sen saada tarvitsemiaan tietoja valmistajalta tai menetelmän kehittäjältä. Laboratorion tekemällä erillisellä verifiointilla, joka perustuu objektiiviseen näyttöön, varmistetaan suorituskyvyn vastaavan tutkimusmenetelmälle ilmoitettua suorituskykyä. Tutkimusmenetelmän suorituskyvyn, joka on varmistettu verifiointilla, on vastattava tutkimustulosten käyttötarkoitusta. Verifiointissa käytetty menettely on dokumentoitava ja saadut tulokset on tallennettava. Verifiointin tulokset on katseltava valtuutetun henkilökunnan toimesta ja katselmuksen tiedot on tallennettava. (SFS-EN ISO 15189 2013, 60.)

Menetelmien verifiointissa selvitetään näyttemateriaalin soveltuvuus tarkoitettuun käyttöön. Verifiointia toteutetaan vertailemalla edellisiä analyysimenetelmän tuloksia saatuihin uusiin tuloksiin. Verifiointi toteutetaan mahdollisimman yhtäjaksoisesti ja vakaisissa olosuhteissa. Näin varmistetaan tulosten oikeellisuus. (Åkerman 2013.)

Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa menetelmien verifiointiin kuuluu tulosten vertailu, testauksen toistettavuus ja vakioinnin toistettavuus. Tulosten vertailussa tuloksia verrataan aikaisempiin tuloksiin, jotka on saatu edellisellä käytössä olleella analyysimenetelmällä. Vertailunäytteitä tulee olla vähintään 20. Testauksen toistettavuudessa selvitetään sarjan sisäinen ja sarjojen välinen hajonta. Kummassakin testauksessa tulee käyttää kahta eri tasoa, mutta tasoja ei verrata keskenään. Sarjan sisäisessä hajonnassa testataan kaksi näytettä, joista kummastakin ajetaan kymmenen peräkkäistä määrittystä ja verrataan saatuja tuloksia. Sarjojen välisessä hajonnassa verrataan kymmenen näytteen tuloksia keskenään. (Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2012.)

Vakioinnin toistettavuuden tarkoituksena on osoittaa, että menetelmä antaa saman tulostason samalla reagenssi- ja vakioerällä. Vakioinnin toistettavuudessa suoritetaan kaksi vakiointia. Ensimmäisen vakioinnin jälkeen ajetaan kontrollit sekä kymmenen potilasnäytettä. Tämän jälkeen suoritetaan uusi vakiointi ja ajetaan uudelleen samat kontrollit ja potilasnäytteet kuin ensimmäisen vakioinnin jälkeen. Koko vakioinnin toistettavuus tulee suorittaa mahdollisimman lyhyellä aikavälillä, jotta mahdolliset tasovirhettä aiheuttavat tekijät eivät ehdi vaikuttaa tuloksiin, kuten esimerkiksi potilasnäytteiden säilytysajan pituus. (Anttila 2015.) Tässä työssä vakioinnin toistettavuutta ei voitu suorittaa, sillä siihen tarvittavien määrittysten toteuttaminen laboratorion rutiinijohden yhteydessä oli poissuljettu laboratorion aikataulujen vuoksi.

5 AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA

Aikaisempia Suomessa tehtyjä tutkimuksia LH:n ja FSH:n osalta, joissa verrataan seerumin ja plasman soveltuvuutta näytemateriaaliksi, ei ole juurikaan julkaistu. Muiden kliinisen kemian analyyttien osalta seerumi- ja plasmanäytteiden vertailuja on tehty enemmän. Kansainvälisiä tutkimuksia näytemateriaalien vertailuista löytyy runsaasti. Useissa tutkimuksissa on yhdistetty näytemateriaalien säilyvyys, analyyttien pitoisuuksien vertailu eri näytemateriaaleissa tai eri analysaattoreiden tulostason vertailu.

2000 julkaistiin Kari Åkermanin ja Aimo Harmoisen artikkeli, johon oli koottu kokeuksia plasmanäytteiden käytettävyydestä yleisimmissä kliinisen kemian analyyseissä. Artikkelissa käydään läpi 22 analyytin pitoisuuden määrittäminen seerumi- ja plasmanäytteistä. Tutkimuksen osa-alueina olivat entsyymi- ja proteiinitutkimukset sekä ionija rasvapitoisuusmääritykset. Seerumi- ja plasmanäytteitä analysoitiin sekä Kuopion yliopistollisessa sairaalassa (Kys) että Tampereen yliopistollisessa sairaalassa (Tays). Yhteensä analysoituja näytteitä oli 99, joista 22 analysoitiin Kys:sa ja Tays:ssa 77. Kys:ssa kemian analyytit määriteltiin Hitachi 717 analysaattorilla ja ionimääritykset EFOX 5053 emissioliekkifotometrillä. Tays:ssa määritykset tehtiin Hitachi 704 kliinisen kemian analysaattorilla tai VITROS 950 analysaattorilla. Jokaisen potilaan seerumi- ja plasmanäytteet otettiin samalla näytteenottokerralla. Näyteputkia seisotettiin 30 minuuttia huoneenlämmössä, sentrifugoitiin (10 min, 1850 g) ja pitoisuudet määritettiin analysaattoreilla. Hemolyytiset tai näytekäsittelyn aikana poikkeavasti käyttäytyneet näytteet poistettiin. (Åkerman & Harmoinen 2000.)

Yhteenvedona artikkelissa todettiin, että useimpien analyyttien kohdalla seerumi- ja plasmanäytteiden tulostasoissa ei ole merkittävää eroa. Plasmanäytteen käyttö ei kuitenkaan ole aivan ongelmaton. Esimerkkinä voidaan mainita suuri fibrinogeenimolekyylä, joka proteiinielektroforeesissa voi vaikeuttaa määrittystä. Seeruminäytteen etuna on se, että se sopii plasmaa paremmin pakastettavaksi. (Åkerman & Harmoinen 2000.)

Vuonna 2004 julkaistiin Milesin, Robertsin, Putnamin ja Robertsin artikkeli tutkimuksesta, missä verrattiin seerumi- ja plasmanäytteen pitoisuuksia 45:n eri kemian tutkimuksen välillä. Näytteiden pitoisuudet määritettiin Roche Modular R analysaattorilla ja Vitro 950 analysaattorilla. Tutkimukseen osallistui 20 vapaaehtoista. Seerumi- ja plas-

manäytteet sentrifugoitiin alle tunnin sisällä keräyksestä ja solut eroteltiin pois. Näytteet jäädytettiin ja säilöttiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:een kahdeksaksi kuukaudeksi. Sulatuksen jälkeen näytteet analysoitiin neljän tunnin kuluessa. Tulosten vertailussa huomattiin analyysilaitte- ja testikohtaisia eroja seerumi- ja plasmanäytteen pitoisuuksissa. Tutkijoiden mukaan useimmissa testeissä seerumi- ja plasmanäytteiden tulokset olivat samansuuntaisia. Joissakin testeissä ainoastaan seeruminäytteiden tulokset olivat hyväksyttäviä tai vaihtoehtoisesti plasmanäytteisiin tarvittiin omat viitearvot. (Miles, Roberts, Putnam, & Roberts 2004.)

Vuonna 2010 ISLAB:ssa, Kuopiossa tehtiin immunokemian analyyttien, LH:n ja FSH:n säilyvyystutkimus. Samassa tutkimuksessa tarkasteltiin myös LH:n ja FSH:n pitoisuusmääryksiä seerumista ja litiumhepariiniplasmasta. Tutkimuksessa oli mukana 14 henkilöä. Säilyvyystutkimuksessa ja pitoisuusmääryksissä näyttemateriaalivertailua varten näytteiden seisotus tapahtui huoneenlämmössä, putkitelineessä normaalilla työtasolla eikä näytteitä suojattu valolta. Määrykset tehtiin Roche Cobas e601 analysaattorilla. Säilyvyystutkimuksessa tehtiin kaksi erilaista vertailua. Ensimmäisessä vertailussa plasmanäytteitä seisotettiin kokoverenä 0 h, 6 h, 8 h ja 10 h, sentrifugoitiin juuri ennen analysointia ja tarkasteltiin analyyttien säilymistä. Toisessa plasmanäytteitä seisotettiin sentrifugoituna 0 h, 24 h ja 48 h, analysoitiin ja tarkasteltiin analyyttien säilymistä. Näyttemateriaalivertailussa litiumhepariiniplasma sentrifugoitiin heti näytteenoton jälkeen ja analysoitiin välittömästi. Seeruminäytteet seisotettiin 30 min, sentrifugoitiin ja analysoitiin. Näistä saatujen tulosten perusteella vertailtiin näyttemateriaalien sopivuutta LH:n ja FSH:n määryksiin. (Olkku 2014.)

Päätelmiksi tutkimuksen tuloksista tehtiin, että mitatuissa aikapisteissä litiumhepariiniplasman todettiin säilyvän hyvin kyseisten analyyttien kohdalla. Lisäksi todettiin, että LH:n ja FSH:n määryksiin voidaan käyttää litiumhepariiniplasmaa, koska tulokset ovat yhteneväiset seerumista saatuihin tuloksiin verrattuna kyseisten analyyttien kohdalta. (Olkku 2014.)

Zolotarjov, Amsel, Garcia, Moran, Wasson ja Pierson-Perry julkaisivat vuonna 2010 artikkelin, jossa verrattiin kahden eri analysaattorin Siemensin Dimension Vista Systemin ja Rochen Elecsys®:n tulostasojia LH, FSH ja prolaktiinin osalta. Tutkimuksessa selvitettiin myös litiumhepariini-, natriumhepariini- ja EDTA-plasmanäytteiden soveltuvuutta LH, FSH ja prolaktiinin näyttemateriaaliksi. (Zolotarjova ym. 2010.)

Tutkimuksessa mukana olleiden Siemensin ja Rochen analysaattoreiden tulosvertailussa todettiin, että analysaattoreilta saadut tulokset olivat LH:n, FSH:n ja prolaktiinin kohdalla samankaltaiset. Näyttemateriaalivertailussa seerumi- ja plasmanäytteet analysoitiin Siemensin Dimension Vista System analysaattorilla. Tulosten perusteella todettiin, että eri plasmanäytteiden tulostasot olivat yhteneväiset määriteltävien analyyttien kohdalla. Lisäksi todettiin seerumin ja plasman soveltuvan näyttemateriaaleiksi määriteltäessä kyseisiä analyyttejä. (Zolotarjova ym. 2010.)

6 TUTKIMUKSEN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT

Opinnäytetyömme tavoitteena on tuottaa tietoa toimeksiantajallemme Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin Kliinisen kemian yksikölle, onko mahdollista siirtyä LH:n ja FSH:n kohdalla seeruminäytteestä plasmanäytteeseen. Aikaisempien tutkimusten perusteella voidaan osoittaa, että useimpien analyyttien kohdalla seerumi- ja plasmanäytteiden tulostaso on yhteneväinen.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää LH:n ja FSH:n pitoisuuksien eroja seerumi- ja plasmanäytteissä. Selvitys tapahtuu vertailemalla seerumista ja plasmasta saatuja tuloksia keskenään. Tutkimuksen avulla saamme selville, voidaanko LH:n ja FSH:n kohdalla toteuttaa näytemateriaalin muutos seerumista plasmassa.

Tutkimusongelmat:

1. Onko LH:n ja FSH:n tulostaso seerumista ja plasmasta yhdenmukainen?
2. Jos poikkeamaa pitoisuuksissa löytyy, onko poikkeama merkitsevä?

7 TUTKIMUSMENETELMÄ

Opinnäytetyömme on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Ongelman asettelua lähestytään kokeellisesti, vertailemalla eri näytemateriaalin tuloksia keskenään. Kvantitatiivinen tutkimus voidaan nähdä prosessina, jossa edetään vaihe vaiheelta. Lähtökohdiana on tutkimusongelma, johon halutaan ratkaisu tai vastaus. Ensimmäiseksi täytyy selvittää, millaista tietoa ongelman ratkaisemiseksi tarvitaan. Tämän jälkeen selvitetään, mistä tarvittava tieto hankitaan ja miten se kerätään. Jokainen prosessin osa-alue vaikuttaa seuraavaan vaiheeseen. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa halutaan kuvata ilmiötä määrin, paljousin ja numeroin. Tutkimustuloksilla saadaan tietoa, kuinka paljon vertailtavassa tai mitattavassa kohteessa on tiettyä ominaisuutta. Mikäli suoritetaan vertailua, on valittava mitattavissa olevat ja samanlaatuiset kohteet. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa pois suljetaan tutkijan tai muiden häiritsevien tekijöiden vaikutus tutkittaviin kohteisiin. (Anttila 2006, 233–234; Kananen 2008, 11.) Vertailevassa tutkimuksessa tarkastellaan aineistoa kahden tai useamman tutkimuskohteen eroavaisuuksia ja tuodaan näitä eroja esille (Vilka 2007, 21).

Opinnäytetyössä päädyttiin kokeelliseen tutkimukseen, koska kokeellinen tutkimus eli eksperimentaalinen tutkimus testaa tietyn oletuksen paikkansapitävyyttä. Koetilanne suoritetaan laboratorio-olosuhteissa tai todellisessa tilanteessa. Tutkimukselle on oleellista, että siinä pyritään selvittämään ainoastaan tutkitun muuttujan vaikutusta vakioimalla kaikki muut tekijät ja aineisto pystytään saattamaan tilastollisesti käsiteltävään muotoon. (Heikkilä 2008, 16, 21.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeisiä asioita ovat aiemmat teoriat ja johtopäätökset tutkimuksista. Näiden avulla voidaan selvittää, mitkä ovat tämänhetkisten tietojen mukaan keskeiset, mitattavissa tai verrattavissa olevat vaikuttavat tekijät. On tärkeää suunnitella koejärjestelyt tai aineiston kerääminen siten, että saatu materiaali soveltuu määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen. Tutkimukseen valitaan perusjoukko, joka on osa sitä ihmisjoukkoa, jossa tutkittavan ilmiön oletetaan esiintyvän. Muuttujat käsitellään taulukkomuotoon, jolloin aineistoa voidaan käsitellä tilastollisesti ja johtopäätökset tehdään havaintoaineistosta tilastolliseen analyysiin perustuen. Saadut tulokset voidaan ilmoittaa lukumääräisesti, prosentuaalisesti tai esittämällä se kaavion avulla eli graafisesti. Graafisella esityksellä välitetään tietoa visuaalisesti näköhavaintoon perustuen. Jo

yhdellä silmäyksellä saa hyvän yleiskuvan aineistosta ja sen perusteella saa yksityiskoh-
taisempaa tietoa. Tarkoituksena on myös helpottaa vertailua, antaa tietoa tiivistetysti
ja osallistua tulosten esittämiseen sekä herättää lukijan mielenkiintoa. Kaavion tehtävä-
nä on kuitenkin käyttötarkoituksesta riippumatta antaa oikea mielikuva aineistosta, josta
se on luotu. (Anttila 2006, 233–234; Karjalainen 2010, 38, 58.)

8 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

8.1 Tutkimusaineiston kerääminen ja analysointi

Tutkimukseen tarvittavia näytteitä alettiin kerätä Seinäjoen keskussairaalan Kliinisen Kemian laboratoriossa heinäkuussa 2014. LH:a ja FSH:a tulee analysoitavaksi tavallisesti vain muutamia päivittäin. Koska tarvittava näytemäärä oli suuri, oli tarkoituksenmukaista kerätä näytteitä pitkällä aikavälillä. LH:n ja FSH:n seerumi- ja plasmanäytteitä kerättiin noin kahden kuukauden ajan. Laboratorion henkilökunta otti näytteet potilailta normaalin näytteenottotilanteen yhteydessä, lääkärin tekemien tutkimuspyyntöjen mukaan. LH:n ja FSH:n tämän hetkinen näytemateriaali on seerumi. Effica-laboratoriojärjestelmään oli luotu rinnakkaisputkipyyntö plasmanäytteelle LH:n ja FSH:n osalta. Tutkimukseen hyväksytyjä LH- näytteitä kerättiin 81 (n=81) ja FSH-näytteitä kerättiin 122 (n=122) potilasnäytettä. Potilailta ei tarvinnut kysyä suostumusta tähän tutkimukseen käytettävistä näytteistä, sillä lain ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (30.11.2012/689) mukaan näytteitä voidaan luovuttaa ja käyttää esimerkiksi menetelmäkehitykseen ja laadunhallintaan terveydenhuollon toimintayksikön luvalla, jonka toimintaan näyte on tarkoitettu.

Kliinisen kemian laboratorion henkilökunta analysoi näytteet Cobas® 8000 e602 – analyysijärjestelmällä rutiiniajojen yhteydessä ja tulokset tallennettiin analysaattorin tietojärjestelmään. Alkuperäisen suunnitelman mukaan plasmanäytteet olisi pakastettu ja me olisimme itse analysoineet kaikista plasmanäytteistä LH:n ja FSH:n yhdellä kertaa. Tästä suunnitelmasta kuitenkin luovuttiin, koska ei voitu olla varmoja, miten pakastus ja sulatus vaikuttavat plasmiaan. Lisäksi pakastusaika olisi vaihdellut eri näytteiden välillä.

Roche Diagnostics käyttää immunomääritysanalysointoreissaan elektrokemiluminesenssi immunomääritystä eli ECLIAa (Dasgupta & Wahed 2014, 24). Immunokemiallisissa menetelmissä joko antigeeni tai vasta-aine leimataan menetelmälle ominaisella mitattavissa olevalla merkkiaineella. Yksi näistä käytetyistä menetelmistä on kemiluminesenssi menetelmä, jossa molekyylien virittyminen saadaan aikaiseksi kemiallisella reaktiolla. (Savolainen & Parviainen 2010, 65.) Luminesenssissa valo tai säteily vapautuu palautuessaan korkeammalta energiatasolta matalammalle tasolle (Åkerman & Jokela 2010,

57). Elektrokemiluminesenssissa kemiluminesenssi saadaan aikaiseksi sähköisellä virityksellä sähkökemiallisten reaktioiden avulla (Pesce 2010, 61).

Ensimmäisessä vaiheessa näytteeseen inkuboidaan biotinyloitu monoklonaalinen LH tai FSH spesifisistä vasta-ainetta sekä rutetium-leimattu vasta-aine, jotka muodostavat yhdessä ns. sandwich- kompleksin. Seuraavassa vaiheessa streptavidiinipinnoitettuja mikropartikkeleita lisätään reaktioseokseen, jotka kiinnittyvät vasta-aineiden vapaisiin paikkoihin biotiini-streptavididisidoksella. Lopuksi reaktioseos siirretään mittauskammiin, jossa magneettiset mikropartikkelit tarttuvat elektrodin pintaan. Partikkeleihin sitoutumattomat ainesosat pestään pois. Elektrodiin kytketään jännite, jonka seurauksena kemiluminesenssiemissio muodostuu ja jonka intensiteetti on verrannollinen näytteen analyytti-pitoisuuteen. Kemiluminesenssi mitataan detektorin avulla ja pitoisuus näytteessä lasketaan kalibrointikäyrän perusteella. (Hirvonen 2014.)

Seinäjoen keskussairaalan Kliinisen Kemian laboratoriossa oli tutkimusta tehdessä seerumin näytteenottoputkena Vacuetten® 4ml seerumigeeliputki, jonka sisäpinta on käsitelty hyytymisen aktivoimiseksi mikroskooppisilla silikaoksidipartikkeleilla (SiO_2). Plasmanäyte otettiin Vacuetten® 3ml:n plasmageeliputkeen, jonka sisäpintaan on suihkutettu 18 IU Li-hepariinia/1 ml verta. Litium-hepariini on antikoagulantti, joka aktivoi hyytymistä estävät antitrombiinit. (Vacuette® preanalytiikka 2013.)

Lokakuun alussa saimme tulokset analysaattorin tietojärjestelmästä, jonne ne oli tallennettu tutkimusta varten. Koodasimme tulokset uudelleen, jolloin poistimme näytteistä kaikki potilaan tunnistetiedot. Koodatuista tuloksista loimme oman tiedoston. Seerumi- ja plasmanäytteiden tutkimusnumerot olivat peräkkäiset ja näiden mukaan pystyimme yhdistämään samasta potilaasta saadut tulokset vertailtavaksi. Kaikista potilaista ei ollut otettu molempia näytteitä. Tällaisia näytteitä ei voitu hyväksyä mukaan tähän tutkimukseen, joten poistimme tiedot tarpeettomina.

Tutkimukseen hyväksytyt tulokset syötimme ja laskimme Microsoft Excel- taulukkolaskentaohjelmaan. Käytimme tätä ohjelmaa, koska se on käytössä Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa. Taulukoimme LH:sta ja FSH:sta saadut tulokset, jotka ovat liitteissä 1 ja 2. Laskimme niistä plasman ja seerumin välisen tulostason poikkeaman (Bias). Teimme saaduista tuloksista hajontadiagrammit ja laskimme tulosten perusteella korrelaatiokertoimen (r) ja regressiosuoran Microsoft Excel- taulukko-

laskentaohjelmalla. Marraskuussa tulostimme LH:n ja FSH:n sarjojen väliseen toistettavuuteen liittyvät tulokset laboratorion laatu järjestelmästä QM-Efficasta. Sarjojen välisessä hajonnassa vertasimme 20 peräkkäistä kontrollitulosta. Vertailtavana meillä oli tulokset matalalta ja korkealta tasolta. Tulokset näkyvät liitteessä 3. Sarjojen sisäisen hajonnan vertailuun valikoimme sattumanvaraisesti viisi saman päivän plasmanäytettä, joista pyydetyt määritykset oli jo tehty aikaisemmin. Näytteistä ajoimme sekä LH:n että FSH:n. Tulosten perusteella sairaalakemisti valikoi meille kaksi näytettä, joiden pitoisuudet olivat eritasoisia. Näytteistä eroteltiin plasma, joka jaettiin viiteen mikroputkeen. Tarkoitus oli nopeuttaa määritysten tekoa jakamalla näyte useampaan erään. Valitettavasti kuitenkin analysaattorissa käytettävät LH:n ja FSH:n reagenssit loppuivat kesken ajojen. Tutkimus aloitettiin uudelleen reagenssien lisäämisen jälkeen. Samoista näytteistä oli ajettu kuitenkin jo useamman kerran LH:n ja FSH:n määritykset ja plasman määrä ei enää riittänyt kymmeneen peräkkäiseen määritykseen. Tämän takia kaikki saadut tulokset hylättiin.

Aloitimme seuraavana aamuna tutkimukset uudestaan alusta. Valikoimme tällä kertaa yhteensä kymmenen plasmanäytettä, joista oli jo tehty tarvittavat määritykset. Ajoimme näistä viisi LH- määritystä ja viisi FSH- määritystä. Sairaalakemisti valikoi meidän tulosten perusteella kummankin hormonin määrityksiin kaksi näytettä, joiden pitoisuudet olivat eritasoisia. Valitsemalla molemmille hormonille omat näytteet, varmistimme, että plasmamäärä riittäisi kymmeneen peräkkäiseen ajoon. Seuraavaksi koodasimme näytteet omilla tunnisteillamme jatkokäsittelyä varten. LH1 näyte sai tunnisteekseen järjestysnumerot 1–10 ja LH2 näyte sai tunnisteekseen järjestysnumerot 11–20. Samoin teimme myös FSH:n kohdalla. Teimme käsin analysaattorille valmiiksi pyynnöt koodauksen mukaan. Jokaiselle näytteelle varasimme kaksi telinettä, joilla syötimme näytteet analysaattorille. Pyyntöjen teon yhteydessä nimesimme jokaiselle näytteelle omat telineet ja näistä telineistä jokaiselle määritykselle oman paikan järjestysnumeron mukaan. Näin ollen jokaisen pitoisuuden määrityksen jälkeen siirsimme näyteputken telineen seuraavaan paikkaan. Syötimme näytteen uudelleen, kun aikaisempi tulos oli valmistunut ja näyte oli palannut takaisin analysaattorilta. Näin saimme kummastakin hormonista ajettua kaksi näytettä, joista tehtiin kymmenen peräkkäistä määritystä. Ajojen tulokset ovat liitteessä 4. Sarjojen välisestä ja sarjojen sisäisestä hajonnasta laskimme keskiarvon, keskihajonnan ja variaatiokertoimen.

8.2 Tulosten tilastollinen käsittely

8.2.1 Tulostason poikkeama, korrelaatiokerroin ja regressioanalyysi

Tulostason poikkeama kertoo analyysitulosten systemaattisesta poikkeamasta todellisesta arvosta (Sorto, Törmä & Kaihola 1996, 8–9). Tulostason poikkeama laskettiin Åkermanin (2014) mukaan kaavalla:

$$x = (a - b) / b \times 100$$

jossa a = plasmapitoisuus

b = seerumipitoisuus

Korrelaatiokerroin on mittari, jota käytetään ilmaisemaan kahden muuttujan välistä riippuvuutta eli korrelaatiota. Näitä tutkitaan tavallisesti pareittain kahden muuttujan välillä. Tarkastelu on hyvä aloittaa hajontakaavion avulla, josta ilmenee muuttujien välinen riippuvuus. Pearsonin korrelaatiokerroin on yleisimmin käytetty korrelaatiokerroin. Tämä mittaa kuitenkin ainoastaan lineaarista yhteyttä. Korrelaatiokerroin on reaalityyppinen luku, joka on aina -1 ja +1 välillä. Kun kaikki havaintopisteet ovat samalla nousevalla suoralla, saadaan korrelaatiokertoimen arvoksi +1. Samalla laskevalla suoralla sijaitsevat pisteet antavat arvoksi -1. Muuttujien välinen lineaarinen yhteys on sitä voimakkaampaa, mitä lähempänä lukua 1 korrelaatiokertoimen itseisarvo on. Korrelaatiokerroin on luku 0, kun muuttujat ovat riippumattomia toisistaan. Korrelaatiokertoimen arvo pysyy samana, vaikka X:n ja Y:n arvojen paikkaa vaihdetaan. Selitysaste ilmoittaa selittävän muuttujan (X) ja selitettävän muuttujan (Y) vaihtelun suuruuden. Selitysaste (r^2) lasketaan korottamalla korrelaation arvo toiseen potenssiin. Korrelaatiokerroin lasketaan tavallisimmin tilasto- tai taulukkolaskentaohjelman avulla. (Heikkilä 2008, 90–92, 203; Holopainen & Pulkkinen 2008, 234–235.)

Regressioanalyysin tehtävänä on löytää mahdollinen vallitseva yhteys muuttujien välillä. Yhteyttä kuvataan matemaattisen mallin avulla. Muuttujia ollessa kaksi, toista muuttujaa nimitetään selittäväksi ja toista selitettäväksi. Selittävää muuttujaa merkitään x :llä ja selitettävää muuttujaa y :llä. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 261.) Kahden muuttujan riippuvuuden ollessa lineaarista, kuvaaja muodostuu koordinaatistossa suoraksi ja toisen muuttujan käyttäytymistä voidaan selittää toisen muuttujan avulla. Riippuvuus voidaan kuvata regressiosuoran avulla, joka piirretään samaan kuvioon hajontadiagrammin

kanssa. Suora saa yhtälön $y = a + bx$, jossa a on vakio ja b on kulmakerroin. (Heikkilä 2008, 92–93; Karjalainen 2010, 136.) Jos arvot antavat täysin samanlaiset tulokset, suoran kulmakerroin on 1 ja y -akselin leikkauspiste on 0 (Ylitalo 2012, 46).

8.2.2 Keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin

Karjalaisen (2010, 87–88) mukaan keskiarvo (Mean) lasketaan aina alkuperäisestä aineistosta ja se on jakauma keskiluvuista. Keskiarvo saadaan, kun jaetaan havaintoarvojen summa (Σ) niiden lukumäärällä n . Kaavassa muuttujan arvo merkitään x :llä.

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$$

Keskihajonta (Standard Deviation, SD) on tärkein ja käytetyin hajonnan mitta ja tuo esille parhaiten yksittäisen muuttujan jakautumista. Keskihajonnassa otetaan huomioon kaikki havaintoarvot, joita aineistossa on käytetty. Keskihajonta kuvaa, miten havainnot ovat ryhmittyneet keskiarvon ympärille. Keskihajonta on sitä pienempi, mitä vähemmän havaintoarvot poikkeavat lasketusta keskiarvosta. Keskihajonta saadaan kaavalla

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

jossa s (SD) on keskihajonta, x_i on havaintoarvo, \bar{x} on keskiarvo, n on havaintojen lukumäärä ja Σ on havaintoarvojen summa. (Heikkilä 2008, 86; Karjalainen 2010, 97.)

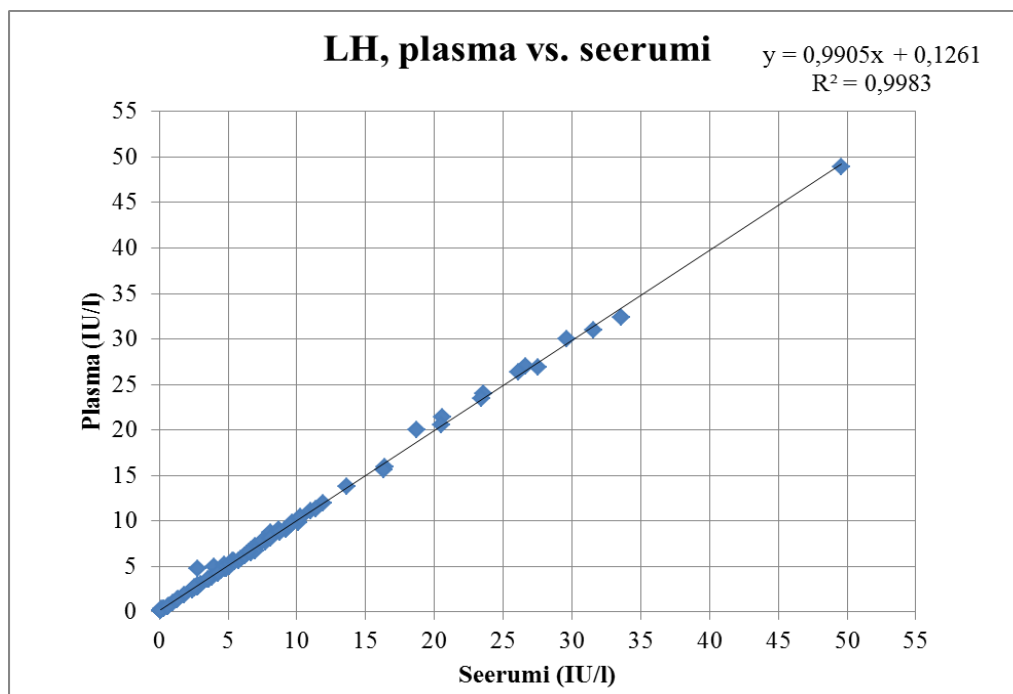
Variaatiokerroin (Coefficient of variation, CV) saadaan laskemalla keskihajonnan ja keskiarvon suhde. Tulos ilmoitetaan prosentteina. Variaatiokertoimen avulla saadaan muuttujien arvojen hajonnat vertailukelpoiseksi. Alla olevan kaavan mukaisesti variaatiokerroin saadaan jakamalla keskihajonta keskiarvolla ja lasketaan, kuinka monta prosenttia keskihajonta on keskiarvosta. (Vilka 2007, 125.)

$$CV \% = (SD / \bar{X}) * 100$$

9 TULOKSET

9.1 Tulosten vertailu

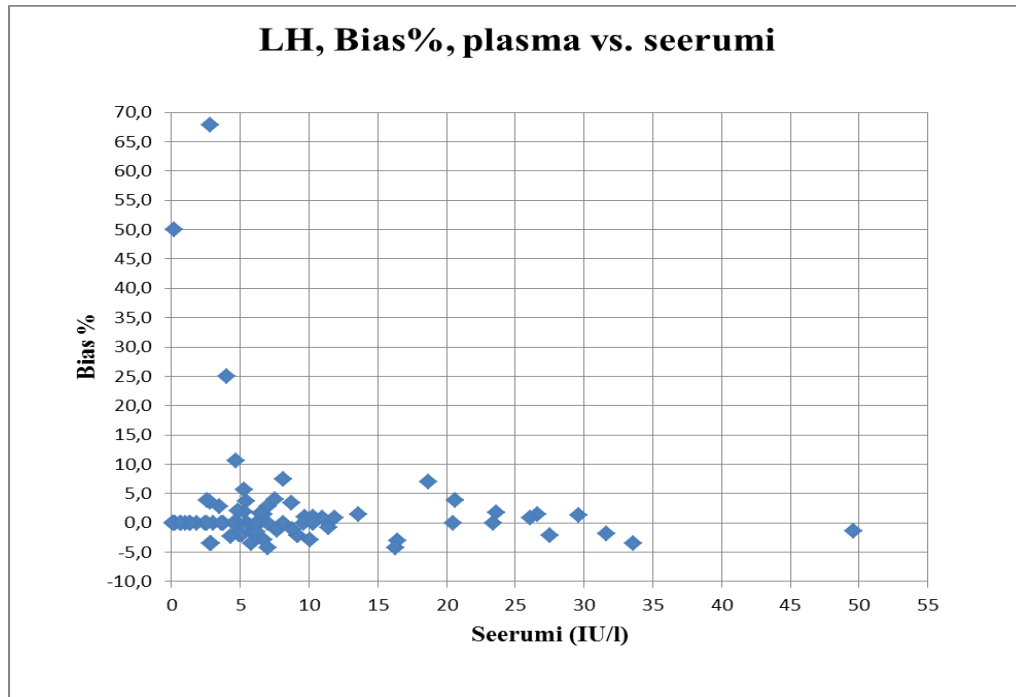
LH:sta saatuja seerumin ja vertailunäyttemateriaalin plasman pitoisuseroja verrattiin toisiinsa. Yleisen tarkastelun perusteella poikkeamat pitoisuuksissa olivat pieniä. Kuviossa 1 voi tarkemman havainnoinnin perusteella todeta, että tulokset ovat varsin yhteneväiset molempien näyttemateriaalien kesken. Korrelaatiokertoimen selitysaste on $r^2 = 0,9983$. Kun kerroin on lähellä arvoa +1, se kuvaa muuttujien välillä olevaa voimakasta positiivista korrelaatiota (Heikkilä 2008, 90–91). Seerumi ja plasma korreloivat erittäin voimakkaasti toisiaan. Kuviossa 1 vertailunäyttemateriaalin pitoisuudet ovat x-akselilla ja verifioitavan näyttemateriaalin y-akselilla. Tulosten perusteella regressiosuoran yhtälöksi saadaan $y = 0,9905x + 0,1261$.



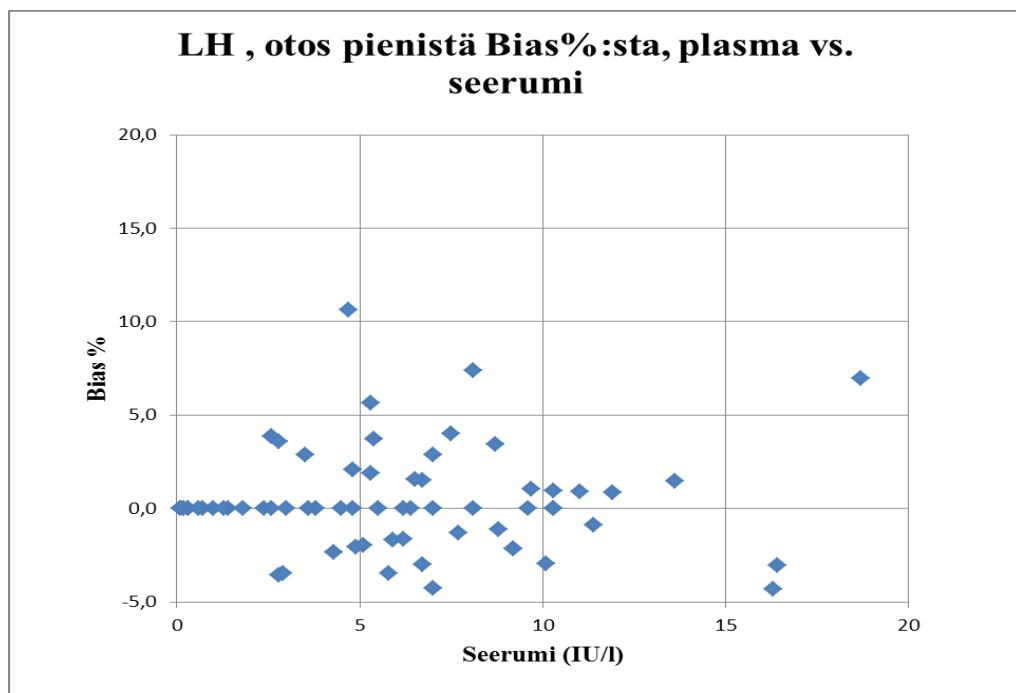
KUVIO 1. LH:sta otettujen seerumin ja plasman välinen yhteys. Seerumi on kuviossa x-akselilla ja plasma y-akselilla.

Kuviosta 2 ilmenee, että LH:n osalta seerumin ja plasman arvojen biasprosentit ovat pieniä, lukuun ottamatta muutamia satunnaispoikkeamia. Kuviosta 3 on poistettu satunnaispoikkeamat. Kuviosta nähdään tarkemmin, kuinka pienet prosentuaaliset erot jakau-

tuvat ja tulokset ovat ryhmittyneet lähelle nollatulosta. Kun tulos on nolla, poikkeamaa seerumin ja plasman välillä ei ole lainkaan.

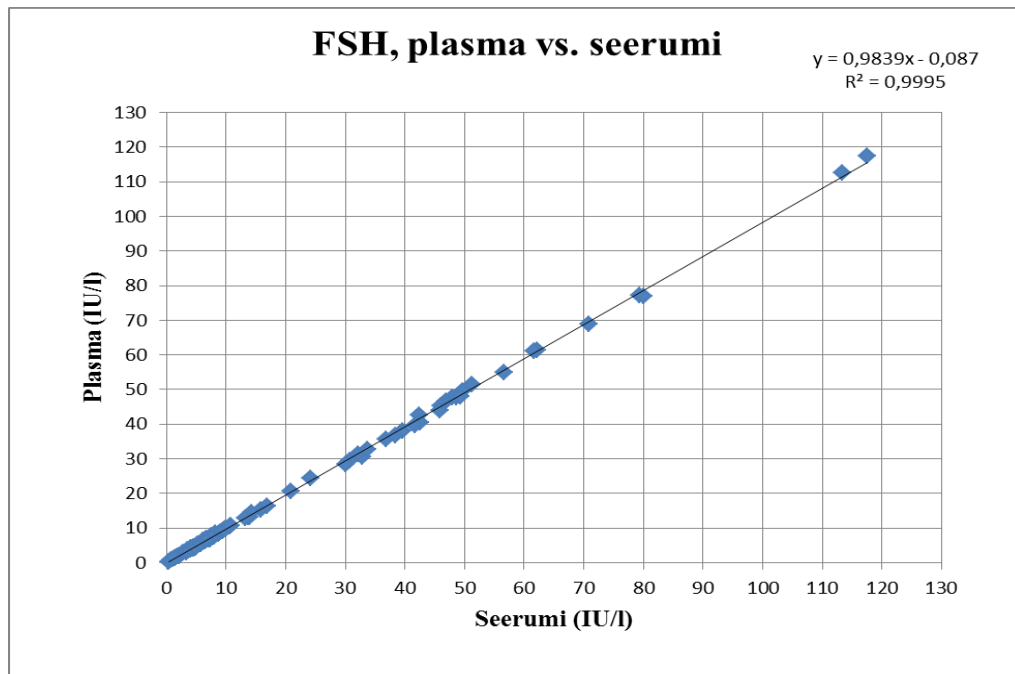


KUVIO 2. Kaikkien LH:sta mitattujen tulosten biasprosentti



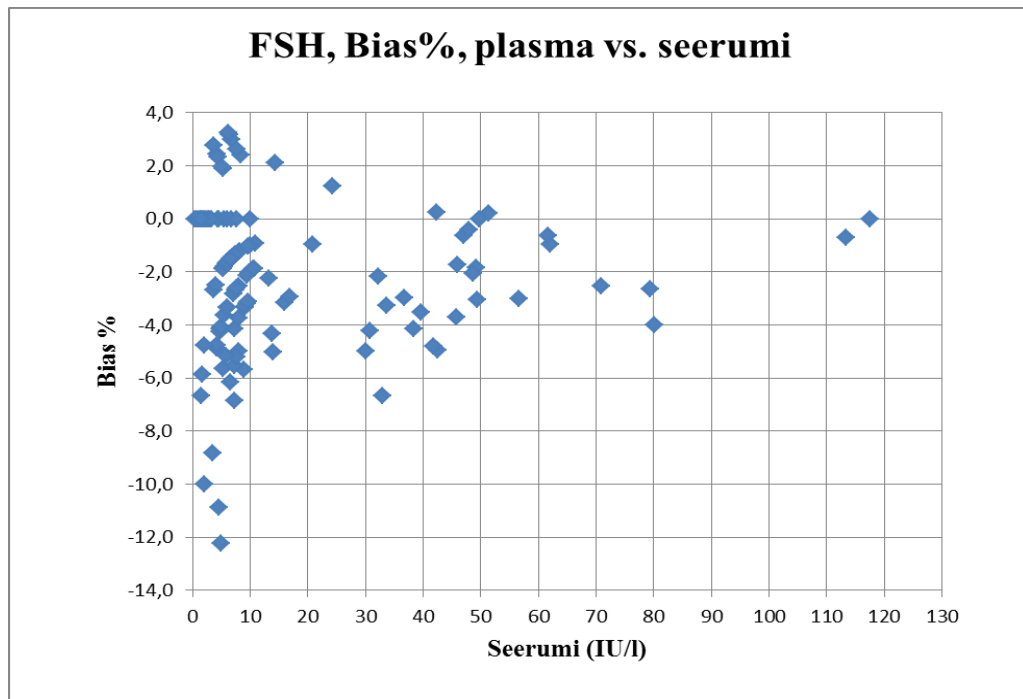
KUVIO 3. LH:n pienten poikkeamien keskittymä

FSH:sta saatuja seerumin ja plasman pitoisuuksia verrattiin toisiinsa. Samoin kuin LH:n myös FSH:n poikkeamat pitoisuuksissa olivat pieniä. Kuviosta 4. voidaan todeta, että tulokset ovat hyvin yhteneväiset molempien näyttemateriaalien kesken. Korrelaatiokertoimen selitysaste on $r^2 = 0,9995$. Seerumi ja plasma korreloivat myös tässä erittäin voimakkaasti toisiaan. Vertailunäyttemateriaalin pitoisuudet ovat x-akselilla ja veri-
fioitavan näyttemateriaalin y-akselilla. Saatujen tulosten perusteella regressiosuoran yhtälöksi muodostuu $y = 0,9839x - 0,087$.

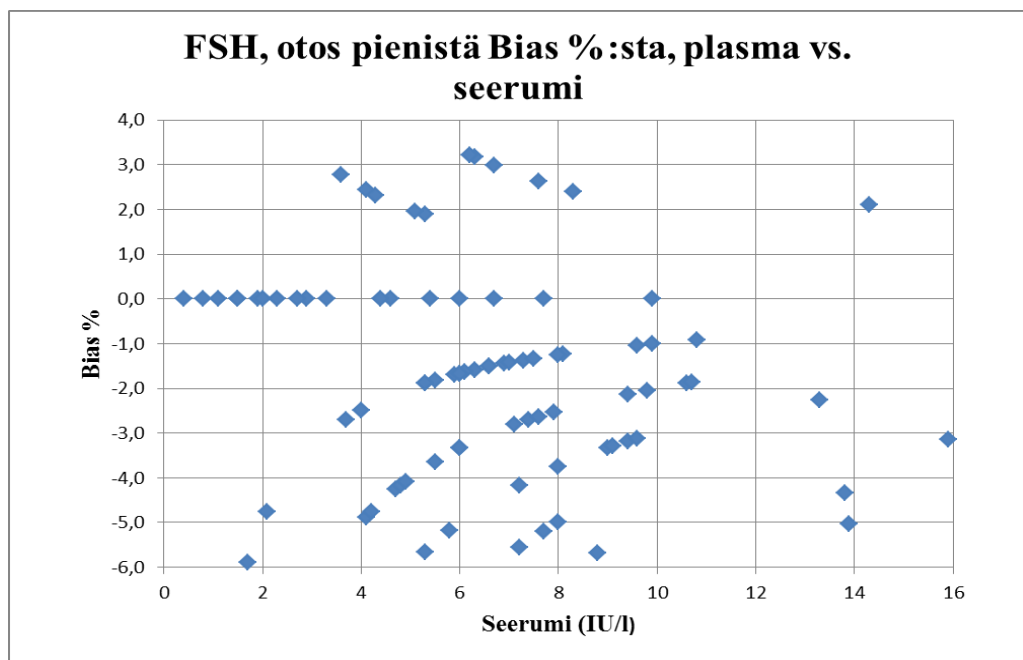


KUVIO 4. FSH:sta otettujen seerumin ja plasman välinen yhteys. Seerumi on kuviossa x-akselilla ja plasma y-akselilla.

Kuviosta 5 ilmenee, että FSH:n seerumin ja plasman arvojen biasprosentit ovat pieniä. Huomattavia satunnaispoikkeamia ei FSH:n osalta ilmene. Kuviota 6 tarkemmin tarkastellessa ilmenee, kuinka pienet prosentuaaliset erot jakautuvat ja tulokset ryhmittyvät lähelle nollassa.



KUVIO 5. Kaikkien FSH:sta mitattujen tulosten biasprosentti



KUVIO 6. FSH:n pienten poikkeamien hajonta

9.2 Testauksen toistettavuus

9.2.1 Sarjojen välinen hajonta

Taulukossa 3 esitetään LH:n ja FSH:n kontrollimateriaalilla saatujen sarjojen väliset hajonnat. Kussakin sarjassa on 20 arvoa, joista tulokset on laskettu. LH:n ensimmäisessä tasossa tulosten keskiarvo on 6,1044 ja toisessa tasossa 54,6071. Ensimmäisen tason tulosten keskihajonnan ollessa 0,10, havaintoarvot ovat hyvin lähellä keskiarvon ympärillä. Toisen tason keskihajonta on 1,03, jolloin havaintoarvot ovat hieman kauempana keskiarvosta kuin ensimmäisellä tasolla. Variaatiokertoimien ollessa 1,64 ja 1,88 kummassakin tasossa muuttujien hajonnat eroavat prosentuaalisesti vähän toisistaan.

FSH:n ensimmäisessä tasossa tulosten keskiarvo on 6,3244 ja toisessa tasossa 45,6115. Ensimmäisen tason tulosten keskihajonnan ollessa 0,14, keskihajonnan poikkeama keskiarvosta on hyvin pieni. Toisen tason keskihajonta on 1,14, jolloin havaintoarvot ovat hieman kauempana keskiarvosta kuin ensimmäisellä tasolla, mutta keskihajonta on edelleen hyvin pieni. Tasojen variaatiokertoimet ovat 2,29 ja 2,51.

TAULUKKO 3. Sarjojen välinen hajonta

	LH Taso 1	LH Taso 2	FSH Taso 1	FSH Taso 2
Keskiarvo	6,1044	54,6071	6,3244	45,6115
SD	0,10	1,03	0,14	1,14
CV %	1,64	1,88	2,29	2,51

9.2.2 Sarjan sisäinen hajonta

LH:n ja FSH:n plasmanäytteiden sarjojen sisäiset hajonnat esitetään taulukossa 4. Jokaisesta valitusta potilasnäytteestä määritettiin kymmenen peräkkäistä tulosta, joiden perusteella arvot on laskettu. LH:n ensimmäisessä näytteessä tulosten keskiarvo on 2,27 ja toisessa näytteessä 18,64. Ensimmäisen ja toisen näytteen keskihajonnan ollessa 0,03 ja 0,15 havaintoarvot ovat erittäin lähellä keskiarvon ympärillä. Variaatiokertoimien ollessa 1,12 ja 0,81 muuttujien prosentuaaliset erot ovat pieniä. FSH:n näytteiden keskiarvot ovat 11,58 ja 25,00. Keskihajonnat ovat 0,11 ja 0,20, jolloin hajonta keskiarvoon nähden on pieni. Variaatiokertoimet ovat 0,91 ja 0,80.

TAULUKKO 4. Sarjan sisäinen hajonta

Plasma	LH 1	LH 2	FSH 1	FSH 2
Keskiarvo	2,27	18,64	11,58	25,00
SD	0,03	0,15	0,11	0,20
CV %	1,12	0,81	0,91	0,80

10 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tähän tutkimukseen kerättiin ja määritettiin LH pitoisuus 81:stä ja FSH pitoisuus 122:sta seerumi- ja plasmanäytteestä. Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi näytteiden suuri lukumäärä kummassakin hormonissa. Tutkimustulosten perusteella havaittiin, että LH:n ja FSH:n pitoisuudet seerumi- ja plasmanäytteissä olivat hyvin samankaltaiset. Molempien hormonien korrelaatiot olivat erinomaiset. LH:n korrelaatiokertoimen selitysaste seerumi- ja plasmanäytteiden välillä oli $r^2 = 0,9983$. FSH:n vastaava tulos oli $r^2 = 0,9995$. LH:ssa lähes kaikki biasprosentin arvot sijaitsivat lähellä nollassa, ainoastaan muutama tulos poikkesi huomattavasti muista. FSH:n kohdalla satunnaispoikkeamia ei ollut, mutta biasprosentteissa oli hieman enemmän hajontaa.

Sarjojen välisen hajonnan laskemiseen käytettiin 20 kontrollitulosta LH:sta ja FSH:sta, joissa huomioitiin matalat ja korkeat tasot. Laskettujen keskihajontojen ja variaatiokertoimien perusteella voitiin sanoa, että määrittelyssä oli erittäin vähän poikkeamia. FSH:n osalta poikkeamat olivat hieman suurempia kuin LH:n tulokset.

Sarjan sisäisen hajonnan laskemiseen määritettiin kymmenen peräkkäistä tulosta kahdesta plasmanäytteestä kummastakin hormonista erikseen. Näytteiden keskihajonnat ja variaatiokertoimet olivat hyvin pieniä molemmilla hormoneilla, kummallakin pitoisuusalueella. Toistettavuutta selvitettiin sarjojen välisellä ja sarjan sisäisellä hajonnalla. Sarjojen välisen hajonnan CV % oli $\leq 2,51$. Sarjan sisäisen hajonnan CV % oli $\leq 1,12$. Näiden perusteella voitiin todeta, että toistettavuus oli kokonaisuudessaan hyvä.

Tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella näytemateriaali voitaneen vaihtaa seerumista plasmaan sen jälkeen, kun vakioinnin toistettavuus on suoritettu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa.

11 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa, onko mahdollista siirtyä LH:n ja FSH:n kohdalla seeruminäytteestä plasmanäytteeseen. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää LH:n ja FSH:n pitoisuuksien eroja seerumi- ja plasmanäytteissä. Pitoisuuserot selvitimme vertailemalla saatuja tuloksia keskenään. Tutkimuksen perusteella saimme selville, että LH:n ja FSH:n tulostaso seerumi- ja plasmanäytteiden välillä on hyvin yhdenmukainen, eikä merkittäviä poikkeamia löytynyt. Saatujen tulosten perusteella tulimme siihen johtopäätökseen, että näytemateriaali voidaan vaihtaa seerumista plasmaan, kun vakioinnin toistettavuus on ensin suoritettu. Meillä ei ollut mahdollisuutta aikataullisesti suorittaa tätä toistettavuutta rutiiniajajen lomassa.

Tämä aihe valikoitui opinnäytetyön aiheeksi, koska aihe vaikutti meidän mielestämme kiinnostavalta ja haasteelliselta. Halusimme tutustua tarkemmin endokrinologiaan ja syventää tietämystämme verifiointista, joka on merkittävä laadunvarmistusmenetelmä kliinisen kemian laboratoriossa. Koimme tehtävän hyödyllisenä ja tarpeellisenä, koska sen perusteella Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksikkö saa tarvitsemaansa tietoa.

Opinnäytetyön suunnitelman saimme valmiiksi kevään aikana ja sopimus opinnäytetyön tekemisestä Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian yksikölle allekirjoitimme toukokuun alussa ylikemisti Kari Åkermanin kanssa. Kevään aika etsimme työhömme teoriatietoa ja työstimme löytämäämme tietoa kesän aikana. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorio keräsi tutkimukseen tarkoitettuja näytteitä heinäkuun lopusta jatkuen syyskuun loppuun. Lokakuun alussa saimme tulokset seerumi- ja plasmanäytteiden pitoisuuksista. Koodasimme näytteet, jolloin poistimme niistä kaikki tunnistetiedot. LH:n kohdalla näytemäärä oli 81 ja FSH:n 122. Tämän jälkeen aloitimme varsinaisen vertailun näytemateriaalien välillä. Vertailun suoritimme laskemalla biasprosentit hormoneista ja käyttäen apuna korrelaatiokerrointa ja regressioanalyysiä. Vertailun jälkeen suoritimme marraskuussa Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa testauksen toistettavuuden, joka sisältää sarjojen välisen hajonnan ja sarjan sisäisen hajonnan. Näistä laskimme keskiarvon, keskihajonnan ja variaatiokertoimen. Näillä tilastotieteen keinoilla saimme osoitettua vertailun tulosten oikeellisuuden.

Kesän aikana etsimme tähän aiheeseen liittyviä aikaisemmin julkaistuja tutkimuksia. Huomasimme, että kotimaisia julkaisuja on saatavilla vain vähän, vaikka tutkimuksia aiheesta on varmasti tehty. Ulkomaisia tutkimuksia lähes samasta aiheesta löytyi runsaasti. Kuitenkaan tutkimuksia juuri LH:n ja FSH:n tulostasojen vertailuista seerumin ja plasman välillä emme löytäneet. Myös sen vuoksi meidän mielestämme aiheesta oli syytä tehdä tutkimus ja kirjallinen raportti. Tämä osaltaan lisäsi meidän mielenkiintoa kokonaisuudessaan tehtävää kohtaan. Aikaisemmin julkaistujen tutkimusten perusteella meille oli muodostunut käsitys, että LH:n ja FSH:n pitoisuudet olisivat yhteneväiset seerumissa ja plasmassa. Tämä tutkimus osoitti, että tulokset ovat niin yhteneväiset, että on mahdollista vaihtaa näyttemateriaali seerumista plasmaan viitearvojen säilyessä samoina.

Tutkimukselle ei tarvinnut hakea erikseen eettisen toimikunnan lupaa, sillä tutkimus täyttää lain ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä pykälän 20 toisen momentin säännöksen (Åkerman 2015). Tutkimus on eettisesti hyväksyttävä, koska sen tulosten avulla pyritään kehittämään laboratoriotulosten analysointia ja nopeuttamaan tulosten vastaamista. Nämä seikat vaikuttavat myös lääkäreiden tekemiin hoitopäätöksiin ja vaikuttavat potilaan oikeuteen saada hyvää hoitoa. Työ täytti eettisen työskentelyn tavat, koska työssä käytettyjä näytteitä ei voida jäljittää alkuperäisiin potilasnäytteisiin. Tutkimuksen yhteydessä käsitelimme näytteitä niille luodun tunnisteiden avulla. Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi näytteiden suuri määrä. Sarjan sisäisen hajonnan määritykset ajoimme lyhyellä aikavälillä, jolloin laboratorion ja näytteiden olosuhteet pysyivät samoina. Tutkimustietoja käsitelimme huolellisesti ja rehellisesti, mitään muuttamatta. Tietojen perusteella saadut tutkimustulokset ja johtopäätökset ovat näin ollen luotettavia.

Opinnäytetyön tekeminen kehitti tiedonhankintataitoja ja työn edetessä opimme hyödyntämään erilaisia lähteitä. Kehityimme myös suhtautumaan kriittisesti tiedon luotettavuuteen ja tieteellisyyteen. Verifiointi oli merkittävä osa työtä. Oman haasteensa työlle asetti se, että verifiointista ei löytynyt riittävän yksityiskohtaista ja kattavaa tietoa, joka olisi soveltunut juuri tähän työhön. Kuitenkin opimme ymmärtämään verifiointin merkityksen ja tärkeyden kliinisen kemian laboratorion toiminnan kehittymisen kannalta.

Opinnäytetyön tekemisen kannalta pysyimme suunnitellussa aikataulussa. Saavutimme asettamamme oppimistavoitteet ja opimme myös paljon uutta, jota emme työn alussa osanneet ennakoida. Jouduimme tätä opinnäytetyötä varten opiskelemaan ja syventymään meille vieraaseen tilastotieteeseen saadaksemme pohjan, jonka perusteella tätä työtä teimme.

LÄHTEET

Anttila, P. sairaalakemisti. 2015. Vakioinnin toistettavuus. Sähköpostiviesti. petra.anttila@epshp.fi. Luettu 2.1.2015.

Anttila, P. 2006. Tutkiva toiminta ja ilmaisu, teos, tekeminen. 2. painos. Hamina: AKATIIMI Oy.

Dasgupta, A. & Wahed, A. 2014. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. Oxford: Elsevier Inc.

Ehder, T. 2005. Kemia metrologian opas. Luettu 26.11.2014 http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_netin.pdf

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. 2012. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorion laitteiston verifiointi. Kliinisen kemian Toimintakäsikirja. Liite nro 4. Julkaisematon.

Follikkelia stimuloiva hormoni. 2011. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Laboratorio-ohjekirja 2012. Kliininen kemia. Päivitetty 14.4.2011. Luettu 2.1.2015. <http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/1422.htm>.

Hayat, K. 2012. Difference Between Plasma And Serum. MediMoon. Trusted Medical Site. Luettu 13.10.2014. <http://medimoon.com/2012/07/difference-between-plasma-and-serum/>

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

Hirvonen, K. tuotepäällikkö. Menetelmä. Sähköpostiviesti. kaisu.hirvonen@roche.com. Luettu 8.10.2014.

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

Kananen, J. 2008. Kvantti: kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

Karjalainen, L. 2010. Tilastotieteen perusteet. Ensimmäinen painos. Ristiina: Pii-Kirjat Ky.

Koriongonadotropiini. 2011. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Laboratorio-ohjekirja 2012. Kliininen kemia. Päivitetty 1.11.2010. Luettu 23.8.2014. <http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/2122.htm>.

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 30.11.2012/689.

Leppäluoto, J., Kettunen, R., Rintamäki, H., Vakkuri, O., Vierimaa, H. & Lätti, S. 2013. Anatomia ja fysiologia. Rakeenteesta toimintaan. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

- Luteinisoiva hormoni. 2011. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Laboratorio-ohjekirja 2012. Kliininen kemia. Päivitetty 14.4.2011. Luettu 23.8.2014.
<http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/2265.htm>.
- Matikainen, A-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. Näytteenottajan käsikirja. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Miles, R., Roberts, R., Putnam, A. & Roberts, W. 2004. Comparison of Serum and Heparinized Plasma Samples for Measurement of Chemistry Analytes. *Clinical Chemistry* 50, No. 9, 2004. 1704–1705. Tulostettu 14.10.2014.
<http://www.clinchem.org/content/50/9/1704.full.pdf+html>
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. & Björkqvist, S-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18. uudistettu painos. Helsinki: WSOY.
- Olkku, A. sairaalakemisti. 2014. LH ja FSH, seerumi vs plasma. Sähköpostiviesti. Anu.Olkku@islab.fi. Tulostettu 21.7.2014.
- Pesce, A. J. 2010. Spectral Techniques. Teoksessa *Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. Kaplan, L & Pecse, A. J (Edited by) 5.painos. Oxford: Elsevier Inc. 42–67.
- Perheentupa, A. 2013. Gonadotropiinit ja sukupuolihormonit ja niiden vastavaikuttajat. Teoksessa Kolu, M. & Mervaala, E. (toim.) 9. uudistettu painos. *Farmakologia ja toksikologia*. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö Medicina. 743–771.
- Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E. & Bjälje, J. 2012. Ihminen: Fysiologia ja anatomia. Suom. Hekkanen, R. 8.-9. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Sane, T. 2009. Hypotalamus, aivolisäkkeen etulohko ja käpylisäke. Teoksessa Välimäki, M., Sane, T & Dunkel, L. (toim) 2009. 2. painos. *Endokrinologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim . 64–142.
- Savolainen, K. & Parviainen, M. 2010. Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia*. 3. painos. Helsinki: Kanditaattikustannus Oy. 65–66.
- SFS-EN ISO 15189. 2013. Lääketieteelliset laboratoriot. Laatu ja pätevyyttä koskevat vaatimukset. *Medical laboratories. Requirements for quality and competence*. 3. painos. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.
- Sippola, T. 2014 Verifiointi. Sähköpostiviesti. tuomas.sippola@clinius.fi. Luettu 10.12.2014.
- Sorto, A., Törmä, A. & Kaihola, H-L. 1996. Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriossa. Sisäisen laadunohjauksen periaatteet. *Moodin erillisjulkaisu* 5/1996. 3–23.
- Stenman, U-H. & Hämäläinen, E. 2009. Hormonien määrittäminen. Teoksessa Välimäki, M., Sane, T & Dunkel, L. (toim) 2009. 2. painos. *Endokrinologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim .31– 62.

Theodorsson, E. 2012. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2012, 4(3), 305- 320. Luettu 10.10.2014. <http://www.future-science.com/doi/pdf/10.4155/bio.11.311>

Tiitinen, A. 2009. Gynekologinen endokrinologia. Teoksessa Välimäki, M., Sane, T. & Dunkel, L. (toim) 2009. 2. painos. *Endokrinologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 665–712.

Vacurette® Preanalytiikka. 2013. Mekalasi Oy. Myyntiesite.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Ylitalo, A. 2012. CRP-Määrittämenetelmän validointi. Laboratorioalan koulutusohjelma. Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Zolotariova, N., Amsel, L., Garcia, E., Moran, C., Wasson, M. & Pierson-Perry, J. 2010. Performance of LOCI® Assays for FSH*, LH*, and Prolactin* on the Dimension Vista® System. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tulostettu 7.10.2014. http://www.healthcare.siemens.com/siemens_hwem-hwem_sxxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@global/@clinicalspec/documents/download/mdaw/mtqz/~edisp/vista_loci_lh_fsh_and_prolactin_methods_-_development_and_performance_-_2010_aacc_poster-00027472.pdf

Åkerman, K. 2013. Kliinisen kemian toimintakäsikirja. Opetusversio. Luentomateriaali 2013. Seinäjoki: Tampereen ammattikorkeakoulu, bioanalytiikan koulutusohjelma.

Åkerman, K. Ylikemisti. 2014. Haastattelu 10.10.2014. Haastattelija Latva-Nevala, R. Seinäjoki.

Åkerman, K. ylikemisti. 2015. LH:n ja FSH:n opinnäytetyö. Sähköpostiviesti. kari.akerman@epshp.fi. Luettu 5.1.2015.

Åkerman, K. & Harmoinen, A. 2000. Plasma- ja seeruminäytteiden tulosten vertailtavuus kliinisen kemian analyyseissä. *Kliin lab*. 17. vuosikerta. 1/2000. 4–9. Tulostettu 29.9.2014. http://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/klab_001.pdf

Åkerman, K. & Jokela, H. 2010. Fotometria. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia*. 3. painos. Helsinki: Kanditaattikustannus Oy. 54–58.

LIITTEET

Liite 1. LH:n pitoisuudet seerumissa ja plasmassa

1 (2)

KPL	S-LH	P-LH	Bias yksikkö	Bias %
1	5,8	5,6	-0,2	-3,4
2	6,7	6,8	0,1	1,5
3	10,3	10,3	0	0
4	1,4	1,4	0	0
5	2,4	2,4	0	0
6	4,9	4,8	-0,1	-2,0
7	4	5	1	25,0
8	26,6	27	0,4	1,5
9	16,4	15,9	-0,5	-3,0
10	11,9	12	0,1	0,8
11	0,1	0,1	0	0
12	8,1	8,7	0,6	7,4
13	20,6	21,4	0,8	3,9
14	11	11,1	0,1	0,9
15	6,4	6,4	0	0
16	0,3	0,3	0	0
17	0,2	0,2	0	0
18	9,2	9	-0,2	-2,2
19	5,3	5,6	0,3	5,7
20	10,1	9,8	-0,3	-3,0
21	8,7	9	0,3	3,4
22	3	3	0	0
23	9,2	9	-0,2	-2,2
24	3,8	3,8	0	0
25	7,7	7,6	-0,1	-1,3
26	29,6	30	0,4	1,4
27	1,8	1,8	0	0
28	31,6	31	-0,6	-1,9
29	4,7	5,2	0,5	10,6
30	16,3	15,6	-0,7	-4,3
31	0,1	0,1	0	0
32	7	7,2	0,2	2,9
33	5,3	5,4	0,1	1,9
34	2,8	2,7	-0,1	-3,6
35	26,1	26,3	0,2	0,8
36	0,2	0,3	0,1	50,0
37	5,4	5,6	0,2	3,7
38	7	7	0	0
39	5,5	5,5	0	0
40	2,6	2,6	0	0

(jatkuu)

KPL	S-LH	P-LH	Bias yksikkö	Bias %
41	2,9	2,8	-0,1	-3,4
42	0,1	0,1	0	0
43	9,7	9,8	0,1	1,0
44	1	1	0	0
45	7,5	7,8	0,3	4,0
46	11,4	11,3	-0,1	-0,9
47	33,6	32,4	-1,2	-3,6
48	5,1	5	-0,1	-2,0
49	10,3	10,4	0,1	1,0
50	9,6	9,6	0	0
51	3,6	3,6	0	0
52	3,5	3,6	0,1	2,9
53	4,8	4,9	0,1	2,1
54	5,9	5,8	-0,1	-1,7
55	1,3	1,3	0	0
56	4,8	4,8	0	0
57	49,6	48,9	-0,7	-1,4
58	8,1	8,1	0	0
59	20,5	20,5	0	0
60	13,6	13,8	0,2	1,5
61	6,2	6,1	-0,1	-1,6
62	4,5	4,5	0	0
63	10,3	10,3	0	0
64	6,7	6,5	-0,2	-3,0
65	0,3	0,3	0	0
66	0,1	0,1	0	0
67	18,7	20	1,3	7,0
68	4,3	4,2	-0,1	-2,3
69	23,6	24	0,4	1,7
70	8,8	8,7	-0,1	-1,1
71	23,4	23,4	0	0
72	0,1	0,1	0	0
73	6,2	6,2	0	0
74	2,8	2,9	0,1	3,6
75	2,6	2,7	0,1	3,8
76	0,7	0,7	0	0
77	27,5	26,9	-0,6	-2,2
78	2,8	4,7	1,9	67,9
79	0,6	0,6	0	0
80	7	6,7	-0,3	-4,3
81	6,5	6,6	0,1	1,5

Liite 2. FSH:n pitoisuudet seerumissa ja plasmassa

1 (3)

KPL	S-FSH	P-FSH	Bias yksikkö	Bias %
1	4,6	4,6	0	0,0
2	8,3	8,5	0,2	2,4
3	13,9	13,2	-0,7	-5,0
4	2,9	2,9	0	0,0
5	5,5	5,3	-0,2	-3,6
6	24,2	24,5	0,3	1,2
7	4,1	4,2	0,1	2,4
8	2,3	2,3	0	0,0
9	42,4	42,5	0,1	0,2
10	7,1	6,9	-0,2	-2,8
11	5,3	5,2	-0,1	-1,9
12	36,8	35,7	-1,1	-3,0
13	6,7	6,9	0,2	3,0
14	47	46,7	-0,3	-0,6
15	6,3	6,5	0,2	3,2
16	117,5	117,5	0	0,0
17	10,6	10,4	-0,2	-1,9
18	4,6	4,1	-0,5	-10,9
19	1,7	1,6	-0,1	-5,9
20	13,8	13,2	-0,6	-4,3
21	6,3	6,2	-0,1	-1,6
22	49,2	48,3	-0,9	-1,8
23	4,1	3,9	-0,2	-4,9
24	1,5	1,5	0	0,0
25	8	7,6	-0,4	-5,0
26	6	5,9	-0,1	-1,7
27	15,9	15,4	-0,5	-3,1
28	79,3	77,2	-2,1	-2,6
29	5,5	5,4	-0,1	-1,8
30	14,3	14,6	0,3	2,1
31	5,3	5,2	-0,1	-1,9
32	8,1	8	-0,1	-1,2
33	7,2	6,9	-0,3	-4,2
34	8,8	8,3	-0,5	-5,7
35	7,9	7,7	-0,2	-2,5
36	5,4	5,4	0	0,0
37	113,3	112,5	-0,8	-0,7
38	9	8,7	-0,3	-3,3
39	1,9	1,9	0	0,0
40	4,4	4,4	0	0,0

(jatkuu)

KPL	S-FSH	P-FSH	Bias yksikkö	Bias %
41	3,6	3,7	0,1	2,8
42	6	6	0	0,0
43	9,4	9,1	-0,3	-3,2
44	6,6	6,5	-0,1	-1,5
45	1,1	1,1	0	0,0
46	42,5	40,4	-2,1	-4,9
47	80,1	76,9	-3,2	-4,0
48	51,3	51,4	0,1	0,2
49	8	7,9	-0,1	-1,3
50	62,1	61,5	-0,6	-1,0
51	8	7,7	-0,3	-3,8
52	10,8	10,7	-0,1	-0,9
53	6,7	6,7	0	0,0
54	9,1	8,8	-0,3	-3,3
55	4,7	4,5	-0,2	-4,3
56	4,8	4,6	-0,2	-4,2
57	46	45,2	-0,8	-1,7
58	2	1,8	-0,2	-10,0
59	5,9	5,8	-0,1	-1,7
60	3,7	3,6	-0,1	-2,7
61	9,9	9,9	0	0,0
62	7,3	6,8	-0,5	-6,8
63	38,4	36,8	-1,6	-4,2
64	32,9	30,7	-2,2	-6,7
65	4,3	4,4	0,1	2,3
66	45,8	44,1	-1,7	-3,7
67	30,8	29,5	-1,3	-4,2
68	2	2	0	0,0
69	20,8	20,6	-0,2	-1,0
70	2,7	2,7	0	0,0
71	0,4	0,4	0	0,0
72	70,8	69	-1,8	-2,5
73	49,7	49,7	0	0,0
74	4,9	4,7	-0,2	-4,1
75	4,2	4	-0,2	-4,8
76	39,6	38,2	-1,4	-3,5
77	5,3	5	-0,3	-5,7
78	6,9	6,8	-0,1	-1,4
79	7,3	7,2	-0,1	-1,4
80	41,7	39,7	-2	-4,8
81	7,7	7,7	0	0,0
82	7,4	7,2	-0,2	-2,7

KPL	S-FSH	P-FSH	Bias yksikkö	Bias %
83	7	6,9	-0,1	-1,4
84	9,9	9,8	-0,1	-1,0
85	6,2	6,4	0,2	3,2
86	6,5	6,1	-0,4	-6,2
87	6	5,8	-0,2	-3,3
88	2,1	2	-0,1	-4,8
89	9,6	9,3	-0,3	-3,1
90	9,8	9,6	-0,2	-2,0
91	47,9	47,7	-0,2	-0,4
92	56,6	54,9	-1,7	-3,0
93	16,9	16,4	-0,5	-3,0
94	7,5	7,4	-0,1	-1,3
95	32,2	31,5	-0,7	-2,2
96	61,6	61,2	-0,4	-0,6
97	6	5,8	-0,2	-3,3
98	7,6	7,4	-0,2	-2,6
99	3,4	3,1	-0,3	-8,8
100	9,4	9,2	-0,2	-2,1
101	48,6	47,6	-1	-2,1
102	3,3	3,3	0	0,0
103	1,5	1,4	-0,1	-6,7
104	13,3	13	-0,3	-2,3
105	30	28,5	-1,5	-5,0
106	7,6	7,8	0,2	2,6
107	7,2	6,8	-0,4	-5,6
108	5,3	5,4	0,1	1,9
109	9,6	9,5	-0,1	-1,0
110	6,1	6	-0,1	-1,6
111	0,8	0,8	0	0,0
112	10,7	10,5	-0,2	-1,9
113	4	3,9	-0,1	-2,5
114	5,1	5,2	0,1	2,0
115	49,4	47,9	-1,5	-3,0
116	7,7	7,3	-0,4	-5,2
117	33,7	32,6	-1,1	-3,3
118	1,5	1,5	0	0,0
119	4,9	4,3	-0,6	-12,2
120	6	5,9	-0,1	-1,7
121	5,8	5,5	-0,3	-5,2
122	6,6	6,5	-0,1	-1,5

Liite 3. Sarjojen väliseen vertailuun otetut kontrollitulokset

	LH Taso 1	LH Taso 2	FSH Taso 1	FSH Taso 2
1	6,1599	55,919	6,3299	46,139
2	5,9699	53,5990	6,2600	44,8890
3	5,9800	53,6300	6,2399	44,5200
4	6,0999	54,2700	6,3200	45,7000
5	5,9899	53,5990	6,2399	45,3190
6	6,1500	55,3100	5,9000	43,2290
7	6,1700	54,2700	6,2199	46,1890
8	6,2699	57,1890	6,1799	44,4000
9	6,2800	55,6190	6,5000	48,1590
10	6,1300	55,3300	6,5599	46,3600
11	6,2600	55,3600	6,3000	45,4300
12	6,2199	55,4090	6,4299	46,8100
13	6,0900	53,6500	6,4600	45,9500
14	6,0199	53,8890	6,2600	44,0090
15	5,9699	53,0200	6,3899	45,3600
16	6,0999	54,6590	6,2399	44,3190
17	6,0900	55,2000	6,4099	46,5490
18	6,0599	54,0400	6,3800	46,2990
19	6,0599	53,9900	6,4600	46,4000
20	6,0199	54,1890	6,4099	46,2000

Liite 4. Sarjojen sisäinen toistettavuus LH:n ja FSH:n osalta

Plasma	LH 1	LH 2	FSH 1	FSH 2
1	2,24	18,50	11,49	24,82
2	2,27	18,61	11,45	24,82
3	2,24	18,45	11,56	25,04
4	2,26	18,50	11,53	25,01
5	2,26	18,58	11,53	24,88
6	2,24	18,77	11,63	25,16
7	2,31	18,79	11,70	25,32
8	2,27	18,52	11,48	24,85
9	2,30	18,86	11,78	25,29
10	2,29	18,79	11,63	24,80