



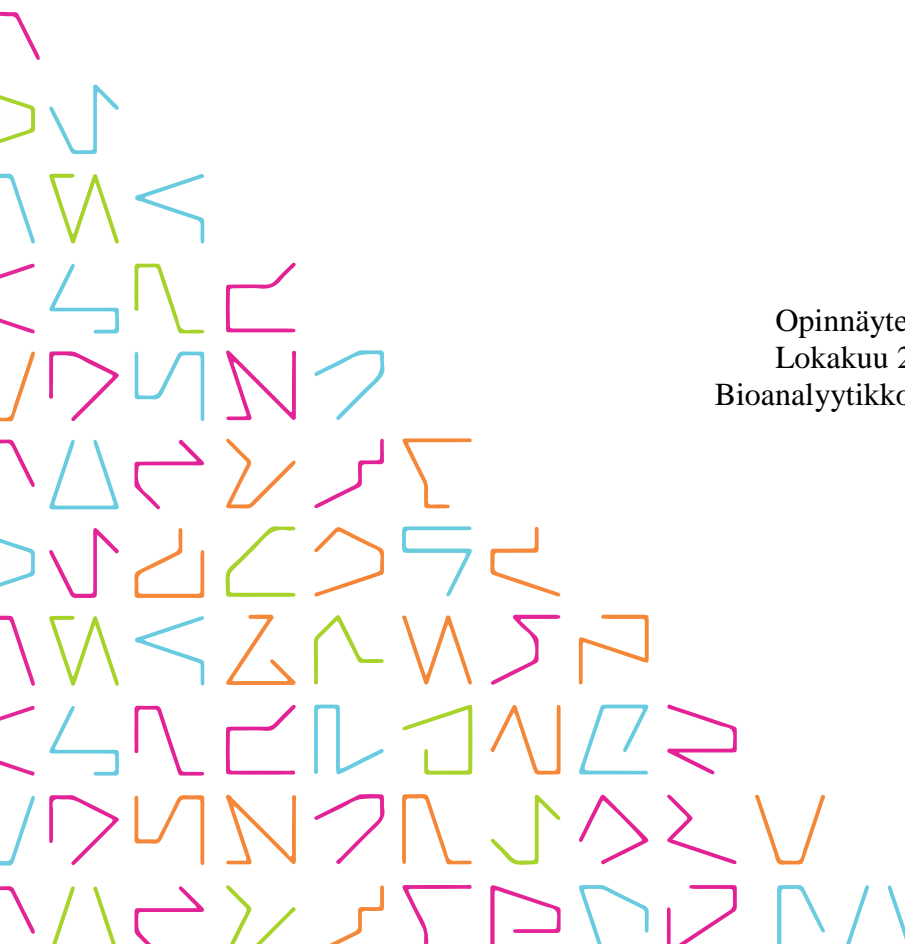
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

PAKASTETUN P-APTT-NÄYTTEEN SÄILYVYYS AJAN FUNKTIONA

Terhi Anttila

Outi Halttu

Opinnäytetyö
Lokakuu 2015
Bioanalyttikko-koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalyttikko-koulutus
12BIO

ANTTILA, TERHI & HALTTU, OUTI:
Pakastetun P-APTT-näytteen säilyvyys ajan funktiona

Opinnäytetyö 52 sivua, josta liitteitä 4 sivua
Lokakuu 2015

Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen (P-APTT-tutkimus) mittaa sisäistä hyytymisjärjestelmää johon vaikuttavat hyytymistekijät II, V, VIII, IX, X, XI, XII ja fibrinogeeni. Sen avulla pystytään myös löytämään suhteellisen herkästi hyytymistapahtuman hitaaseen aktivoitumiseen vaikuttavat hyytymistekijävajaukset. Tutkimusta käytetään hyytymisjärjestelmän seulontakokeena, tromboositaipumuksen selvittelyssä sekä hepariinihoidon ja korvaushoidon seurannassa. Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjekirjan mukaan P-APTT-näyte säilyy 8 tuntia huoneenlämmössä kokoverenä tai plasmana. Näytteen säilyttäminen jääkaapissa on kielletty, mutta plasman pakastaminen lähettämistä varten on sallittua.

Opinnäytetyö oli kvantitatiivinen, kokeellinen ja vertaileva tutkimus. Teoreettisessa viitekehyksessä on käsitelty hyytymisjärjestelmää, P-APTT-tutkimusta, näytteenottoa ja näytteen säilyvyyttä sekä kuljetusta. Lisäksi on käsitelty Stagon STA-R Evolution[®] -hyytymisanalysointilaitteen toiminta ja mittauseräilykset. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää säilyvätkö P-APTT -näytteet tutkimuskelpoisina jos ne pakastetaan -20°C:een. Työssä vertailtiin primaarituloksia pakastamisen jälkeisiin tuloksiin ja selvitettiin onko tulostason muutos kliinisesti merkittävä. Tutkittiin myös vaikuttaako pakastusajan pituus saatuihin tuloksiin. Otoskoko oli 60 kpl tulostasoltaan erilaista näytteitä. Näytteet olivat Tampereen Yliopistollisen Sairaalan vuodeosastoilla otettuja. Pakastusajoiksi valittiin 1-4 vuorokautta (30 näytettä) ja 7-14 vuorokautta (30 näytettä). Tavoitteena oli tuottaa tietoa P-APTT -näytteiden säilyvyydestä ja näin varmistaa mahdollisimman luotettavat potilastulokset. Opinnäytetyön aiheen antoi Fimlab Laboratoriot Oy.

Tulosten perusteella pakastaminen saattaa vaikuttaa näytteen tulostasoon, mutta muutos ei ole yhdenmukaista eikä lineaarista. Tulostaso saattaa nousta, laskea tai pysyä samana. Myöskään näytteen laadulla ei havaittu yhdenmukaista vaikutusta tulostasoihin. Kahden viikon pakastusajan ei havaittu muuttavan tulostasoa lineaarisesti sen enempää kuin yhden päivän pakastusajankaan. Vaikka pakastusaika saattaa vaikuttaa tulokseen, ei sen aiheuttama tulostason muutos suurimmalta osin ollut kliinisesti merkittävä, eli se ei aiheuttaisi jatkotoimenpiteitä. Mitään kriittisiä muutoksia näytteiden tulostasojen välillä ei esiintynyt. Koska opinnäytetyössä tutkittavat näytteet eivät joutuneet alltiiksi kuljetukselle, olisi jatkotutkimuksena hyvä selvittää miten se vaikuttaa P-APTT-näytteen säilyvyyteen.

Asiasanat: aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika (APTT), hyytymisnäytteiden säilyvyys, hyytymistutkimus, veren hyytyminen

ABSTRACT

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

ANTTILA, TERHI & HALTTU, OUTI:
Stability of Frozen P-APTT-sample as a Function of Time

Bachelor's thesis 52 pages, appendices 4 pages
October 2015

The purpose of this study was to examine, if P-APTT –samples are still measurable after freezing in -20°C. The APTT is a test that measures the part of blood clotting pathway. This study concentrates on gathering information about storing coagulation samples.

The study was quantitative with an experimental part. The data were collected by comparing the primary test results to the results after freezing. The sample included 60 blood samples which were collected from the patients in Tampere University Hospital.

The findings reveal that freezing in -20°C may slightly change the results, but the change is not significant. The P-APTT result may rise, decrease or stay the same after freezing, but the changes are insignificant for the most part. The change in results due to freezing time was not linear nor uniform.

Overall, the study found that P-APTT –samples are still measurable after freezing in -20°C up to two weeks. For the further studies, it would be important to figure out if a possible thawing in the middle of transportation affects the samples and whether it is acceptable to store P-APTT –samples in a -20°C freezer for over two weeks.

Keywords: activated partial thromboplastin time (APTT), stability of coagulation samples, coagulation test, coagulation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	VEREN HYYTYMINEN JA FIBRINOLYYSI	7
2.1	Trombosyytit.....	8
2.1.1	Adheesio ja aktivaatio	8
2.1.2	Aggregaatio	9
2.2	Hyytymisjärjestelmä	9
2.2.1	Hyytymistekijöiden ominaisuudet	10
2.2.2	Hyytymisen säätely	11
2.3	Fibrinolyysi ja sen säätely.....	12
2.4	Veren hyytymisen mittaaminen	13
3	TROMBOPLASTIINIAIKA, AKTIVOITU, PARTIAALINEN (APTT)....	15
4	HYYTYMISNÄYTTEIDEN SÄILYTYS JA KULJETUS.....	17
4.1	Hyytymisnäytteiden näytteenotto	19
4.2	Hyytymisnäytteiden säilytys.....	21
4.3	Aikaisemmat tutkimukset	22
5	STAGO STA-R EVOLUTION® -HYYTYMISANALYSAATTORI.....	24
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	27
7	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT JA TUTKIMUSASETELMA...	29
8	PAKASTETTUJEN P-APTT -NÄYTTEIDEN SÄILYVYYSVERTAILU ..	31
9	TULOKSET JA NIIDEN ANALYSOINTI.....	34
10	LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS	40
11	POHDINTA.....	42
	LÄHTEET.....	45
	LIITTEET	49

1 JOHDANTO

Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen (P-APTT-tutkimus) mittaa sisäistä hyytymisjärjestelmää ja se toimii sisäisen hyytymisjärjestelmän seulontakokeena. Sen avulla voidaan myös löytää suhteellisen herkästi hyytymistapahtuman hitaaseen aktivoitumiseen vaikuttavat hyytymistekijävajaukset. (Fimlab 2014b.) Tutkimusta käytetään hyytymisjärjestelmän seulonnassa, hyytymistekijävajauksen ja tromboositaipumuksen selvittelyssä sekä hepariinihoidon ja korvaushoidon seurannassa. (Joutsu-Korhonen 2015; Fimlab 2014b.) Tutkimus toteutetaan yhä useammin alihankintana, josta johtuen näytteitä joudutaan kuljettamaan enemmän. Jotta näyte säilyisi viikonlopun yli analysointikelpoisena, plasma on pakastettava. Siksi on äärimmäisen tärkeää, että myös pakastettujen näytteiden tulokset ovat luotettavia.

Opinnäytetyön aiheen antoi Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy ja toimeksiantajina toimivat laboratoriotyön esimies Marja-Leena Torkki ja ylikemisti Riikka Rontu. Fimlab Laboratoriot Oy on Suomen suurin laboratorioalan yritys ja se toimii Pirkanmaan, Kanta-Hämeen ja Keski-Suomen alueilla. Sen asiakkaita ovat mm. erilaiset sairaalat, terveyskeskukset ja työterveyshuolto. Lisäksi se tarjoaa palveluita myös yksityisen sektorin puolelle. (Fimlab 2015.) Koska Fimlab Laboratoriot Oy tarjoavat palveluitansa monelle taholle, näytemäärät kasvavat suuriksi.

Tampereen toimipisteen Stago STA-R Evolution[®] -hyytymisanalysaattoreille tulee yhteensä näytteitä n. 30000 kpl/kk, joista P-APTT -näytteitä on n. 1000 kpl. Arkisin P-APTT -näytteitä tulee päivässä n. 40 kpl, mutta viikonloppuisin näytemäärät ovat vähäisempiä. Näytteet tulevat pääasiassa Tampereen yliopistollisen sairaalan (TAYS) sisältä, mutta myös muista Pirkanmaan alueen toimipisteistä joissa ei tehdä analytiikkaa. Myös Yhtyneet Medix on alihankkinut hyytymistutkimukset Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:ltä. Näytteitä joudutaan kuljettamaan ja ne voivat viipyä matkalla niin kauan, että näytteet on pakastettava. (Rontu 2015a.) Tästä syystä haluttiin selvittää, onko pakastuksella vaikutusta P-APTT-näytteen tulostasoon.

Opinnäytetyön tarkoitus on tutkia -20°C :ssa pakastetun P-APTT-näytteen säilyvyyttä. Työhön kuuluu kokeellinen osuus, jossa vertailemme primaarituloksia pakastamisen jälkeisiin tuloksiin. Tarkoitus on selvittää ovatko mahdolliset tulostason muutokset kliinisesti merkittäviä. Tässä työssä kliinisesti merkittävä määritellään seuraavasti: aiheuttaako muutos viitearvorajojen puolelta toiselle siirtymisen, eli vaikuttaako muutos hoitoon tai voidaanko sen perusteella mahdollisesti tehdä diagnoosi. Pakastusajoiksi valittiin näytteitä jotka ovat olleet pakastettuna 1–4 vrk ja näytteitä jotka ovat olleet pakastettuna 7–14 vrk. Pakastusajat on valittu niin, että huomioidaan näytteet, jotka joutuvat olemaan viikonlopun yli pakastettuna (1–4 vrk). Muun muassa Islabin (2015) ohjekirjan mukaan P-APTT-näyte säilyy -20°C :ssa pakastettuna kaksi viikkoa, joten työssä tutkitaan myös säilyminen kahteen viikkoon asti (7–14 vrk).

Opinnäytetyön kirjallisuuskatsauksessa käsitellään veren hyytymisjärjestelmän toimintaa ja P-APTT-tutkimuksen periaatteet. Työssä kerrotaan hyytymisnäytteiden ottamisesta, säilytyksestä ja kuljetuksesta. Lisäksi käsitellään Diagnostica Stagon STA-R Evolution[®]-hyytymisanalysaattorin käyttö ja mittausperiaatteet. Työstä on rajattu pois hepariinihoitopotilaat ja hepariinihoidon seuranta, sillä hepariinihoitopotilaiden näytteitä ei saa pakastaa.

2 VEREN HYYTYMINEN JA FIBRINOLYYSI

Ihmisen hyytymisjärjestelmä perustuu veren hyytymiseen, tämän estämiseen ja hyytymän hajottamiseen. Näillä kaikilla tapahtumilla on omat niitä säätelevät tekijänsä. (Vilpo 2010, 159.) Veren hyytymisjärjestelmä aikaansaa tarkoin säädellyn reaktion, jonka seurauksena verenvuoto tyrehtyy ja suonivaurio parantuu (Lassila 2015, 31). Suonivaurion sattuessa verisuoni supistuu ja trombosyytit hakeutuvat vauriokohtaan (Hoffbrand & Moss 2012, 324; Lassila 2015, 31). Trombosyytit kiinnittyvät vauriokohdan alta paljastuneisiin rakenteisiin, joita ovat muun muassa kollageeni ja von Willebrand-tekijä. Von Willebrand-tekijä saa aikaan sen, että ohikiitävät trombosyytit alkavat pyörimään suonivaurion alueella. Kollageeni liimaa ja aktivoi tarttuneita verihituleita muuttamalla niiden solukalvon hyytymistä kiihdyttäväksi. (Lassila 2015, 31.) Kun trombosyytti aktivoituu se muuttaa muotoaan ja alkaa vapauttaa verisuonia supistavia tekijöitä, hyytymistekijöitä sekä tekijöitä, jotka lisäävät trombosyyttien kykyä sitoutua toisiinsa. Trombosyyttien muodonmuutoksen yhteydessä niiden solukalvon pinnan reseptorien määrä lisääntyy ja fosfolipidien määrä kasvaa. (Vilpo 2010, 159.) Veren hyytymisen ketjureaktioon osallistuvat solupintoihin, etenkin verihituleisiin sitoutuvat proteaasientsyymit, hyytymistekijät ja niiden kofaktorit. Nämä aktivoituvat tuottamaan hyytymisen keskeisintä entsyymiä, trombiinia. Trombiini muuttaa liukoisen fibrinogeenin liukenemattomaksi fibriniksi, joka edesauttaa hyytymän syntymistä. Lisäksi se aktivoi voimakkaasti verihituleita ja säätelee hyytymää luottavaa järjestelmää. Tästä syystä trombiini onkin monien uusien antikoagulanttien suora kohde. Tällaisia antikoagulantteja ovat muun muassa argatrobaani, divalirudiini ja dabigatraani. (Lassila 2015, 31.)

Tarkoin säädelty veren hyytyminen perustuu hyytymistekijöihin sitoutuviin inaktivaattoreihin, joiden tehtävä on keskeyttää trombiinin muodostus ja inaktivoida jo muodostunut vapaa trombiini. Trombiini kykenee säätelemään omaa tuotantoaan ja muita hyytymistekijöitä aktivoimalla endoteelisoluja. Tämän avulla hyytymä voidaan rajata vain suonivaurion alueelle. Trombiinista aktivoituneet endoteelisolut erittävät välittäjäaineita joiden tehtävä on jarruttaa verihituleiden toimintaa ja aiheuttaa vasodilaatio. Aina hyytymisen käynnistyttyä käynnistyy sen vasteena myös fibrinolyysi, jonka tehtävä on liuottaa hyytymä ja edistää haavan soluvälitteistä paranemista. (Lassila 2015, 31.)

2.1 Trombosyytit

Trombosyyteillä on keskeinen tehtävä veren hyytymisen alkuvaiheessa ja siksi niiden riittävä muodostuminen luuytimessä on tärkeää. Megakaryopoiesissa keskeisin kasvutekijä on trombopoietiini. Trombosyyttien linjaspesifisiä kantasoluja ovat BFU-Meg ja CFU-Meg, ja niiden määrä luuytimessä on 0,1 %. Näiden esiasteiden kypsyessä ja erilaistuuessa megakaryoblasteiksi niiden mitoottinen solun jakautuminen loppuu, mutta solun DNA lisääntyy jolloin sen kromosomisto jopa 128-kertaistuu. Samaan aikaan solujen sytoplasman määrä lisääntyy. Tätä ilmiötä kutsutaan endomitoosiksi. Megakaryoblasti on halkaisijaltaan 10–20 µm ja se voidaan havaita valomikroskoopissa. Tästä solu kypsyy edelleen megakaryosyytiksi, joka ilmenee solun koon kasvaessa (60 µm). Lisäksi sytoplasman basofiilisuus vähenee, granuloituu ja tuma alkaa lohkottumaan. Solun edelleen kypsyessä sen pinnalle alkaa muodostumaan ulokkeisia pseudopodeja, jotka fragmentoituvat protrombosyyteiksi ja vapautuvat verenkiertoon tumattomina trombosyytteinä. Jokainen megakaryosyytti kykenee tuottamaan noin 1000–5000 trombosyyttiä. Trombosyyttien kypsyminen kestää noin 5–10 vuorokautta. Kypsän trombosyytin halkaisija on 2–4 µm, ja niiden pääsääntöinen tehtävä on korjata verisuonivaurioita muodostamalla hemostaattinen tulppa, sekä käynnistää sen pinnalla trombiinin tuotanto. Trombosyytit elävät verenkierrossa 8–10 vuorokautta, ja niistä 20–30 % on varastoituneena pernaan. Vanhat trombosyytit hävitetään pernan, maksan ja luuytimen retikuloendoteeliaalijärjestelmässä. (Siitonen & Koistinen 2015, 26–27.)

2.1.1 Adheesio ja aktivaatio

Trombosyyttien tärkein tehtävä on kuljettaa hyytymisjärjestelmä suonivaurion alueelle. Trombosyyttien pinnalla on adheesioreseptoreita (tartumisreseptoreita), jotka edesauttavat niiden kiinnittymistä suonen seinämään ja osallistuvat lisäksi niiden aktivaatioon. Adheesioreseptoreista tärkeimmät ovat glykoproteiini (GP) Ib/IX/V –ja GP Ia/IIa- kompleksi. Näistä Ib/IX/V tunnistaa von Willebrand–tekijää ja Ia/IIa tunnistaa kollageenia. Von Willebrand tekijää on plasmassa ja lisäksi sitä erittävät myös endoteelisolut reagoissaan trombiiniin, fibriiniin, histamiiniin ja adrenaliiniin. Von Willebrand–tekijä tarttuu nopeasti suonesta paljastuneeseen kollageeniin jolloin trombosyytti tunnistaa sen oman spesifisen GPIb:n ja GPIIb/IIIa:n avulla. (Lassila 2015, 32–33.)

Trombosyyttien adheesio, eli tarttuminen suonen seinämään aiheuttaa niiden aktivaation. Tämä aikaansaa sen, että niiden varastorakkuloista vapautuu verenkiertoon monia veritulpan syntyä ja haavan paranemista edistäviä välittäjäaineita. Välittäjäaineista muu muassa serotoniini ja tromboksaani aktivoivat trombosyyttejä ja supistavat verisuonia. Tämä aikaansaa valtimoissa ja mikrosirkulaatiossa virtausvoiman kasvun, joka tehostaa trombosyyttien tarttumista ja veren hyytymistä niiden pintaan. Lisäksi trombosyyteistä vapautuu myös polyfosfaatteja, jotka aktivoivat hyytymistekijät V, XI ja XII ja estävät fibrinolyysiä. (Lassila 2015, 33–34.)

2.1.2 Aggregaatio

Lepäävän trombosyytin pinnalla on yli 50 000 reseptoria, ja näiden määrä lähes kaksinkertaistuu sen aktivoituttua. Trombosyyttiaggregaatio välittyy spesifisen GPIIb/IIIa-reseptorin kautta. Se aikaansaa sen, että trombosyytit kiinnittyvät toisiinsa. Tämä edesauttaa sitä, että vauriokohtaan kerääntyneet trombosyytit kykenevät tehokkaasti peittämään vuotokohtaan. Yhdessä fibrinogeenin kanssa GPIIb/IIIa liimaavat trombosyyttejä toisiinsa. Verihiutalepinossa muodostuva trombiini muuntaa fibrinogeenin fibriniiksi, jolloin vuotokohtaan muodostuu liukenematon tulppa. (Lassila 2015, 32–34; Fritsma & Fritsma 2012, 629.)

2.2 Hyytymisjärjestelmä

Hyytymisjärjestelmä voidaan jakaa ulkoiseen ja sisäiseen hyytymisjärjestelmään. Ulkoisen järjestelmän käynnistää kudოსvaurion yhteydessä syntyvä kudostromboplastiini, ja sisäinen järjestelmä aktivoituu negatiivisesti varautuneiden pintojen vaikutuksesta. Näistä kahdesta in vivo (elävän organismin sisällä) ulkoinen tie on tärkeämmässä roolissa. (Lassila 2015, 31; Vilpo 2010, 160.) Nämä molemmat järjestelmät lopulta yhtyvät, jonka seurauksena protrombiinista muodostuu trombiinia ja fibrinogeeni muuttuu fibriniiksi. Trombiini on avainasemassa oleva entsyymi hyytymisessä. Trombiinin ansiosta myös hyytymistekijä XIII aktivoituu, joka puolestaan stabiloi fibriniä. (Lassila 2015, 31; Fritsma & Fritsma 2012, 627.) Hyytymistekijöiden IX, VIII, X ja V muodostaman komp-

leksi vaatii toimiakseen trombosyyttien pinnalla olevia profosfaatteja. Syntyy ketjureaktio, jossa edellinen hyytymistekijäjärjestelmän vaihe aktivoi seuraavan vaiheen. Tätä reaktiota kutsutaan hyytymiskaskadiksi. Trombiini aktivoi myös hyytymisjärjestelmän aikaisempia vaihteita, ja näin kiihdyttää koko hyytymisreaktiota. (Lassila 2015, 34–35; Vilpo 2010, 160.)

Veressä olevat hyytymistekijöiden inhibiittorit puolestaan estävät hallitsemattoman hyytymisen. Näitä inhibiittoreita ovat muun muassa proteiini C ja antitrombiini III sekä hyytymistekijä VII:ta inhiboiva TPFI (tissue factor pathway inhibitor). Nämä inhibiittorit aktivoituvat samalla kun hyytyminen aktivoituu. Niiden tehtävä on rajata hyytymisprosessi suonivaurion alueelle. (Lassila 2015, 36–38; Vilpo 2010, 160.)

Lopuksi fibrinolyttinen järjestelmä liottaa hyytymän. Kudosvauriossa plasminogeeni muuttuu aktiiviseksi plasmiiniksi. Tätä edesauttavat erilaiset aktivaattorit, joita ovat esimerkiksi plasminogeenin kudosaktivaattori, urokinaasi ja streptokinaasi. Plasmiinin tehtävä on hajottaa fibriiniä, jonka seurauksena hyytymä hajoaa. Hallitsemattoman vuototai-pumuksen estämiseksi fibrinolyttiselle järjestelmälle on olemassa omat inhibiittorit. Esimerkiksi plasminogeenille on PAI-I (plasminogeenin kudosaktivaattorin inhibiittori) ja α_2 -antiplasmiini. (Lassila 2015, 40–41; Vilpo 2010, 162.)

2.2.1 Hyytymistekijöiden ominaisuudet

Hyytymistekijöistä useat ovat seriiniproteaaseja ja näiden aktivaatiossa tarvitaan solukalvojen fosfolipidipintoja ja kalsiumia. Osa hyytymistekijöistä ovat K-vitamiinista riippuvaisia. Tällaisia hyytymistekijöitä ovat mm. protrombiini sekä hyytymistekijät VII, IX ja X. Nämä hyytymistekijät sisältävät gammakarboksyloituneita glutamyyliähteitä, jotka sitoutuvat solukalvojen pinnalla oleviin fosfolipideihin. Esimerkiksi varfariinihoidon teho perustuu nimenomaan gammakarboksyylaation estoon. Hyytymistekijöihin kuuluu myös kofaktoreita, jotka ovat proteiineja tai glykoproteiineja. Tällaisia ovat muun muassa plasmaperäiset hyytymistekijät V ja VIII sekä suomen seinämässä olevat trombomoduliini ja kudostekijä. Plasmassa olevat hyytymistekijät kulkeutuvat verenkierrrossa inaktiivisina ja aktivoituvat tarttuessaan vauriokohdan solukalvopintoihin. Tämän ansiosta hyytymisreaktio paikallistuu, tehostuu ja suojautuu sen estäjiltä. Elimistössä on aina tarjolla

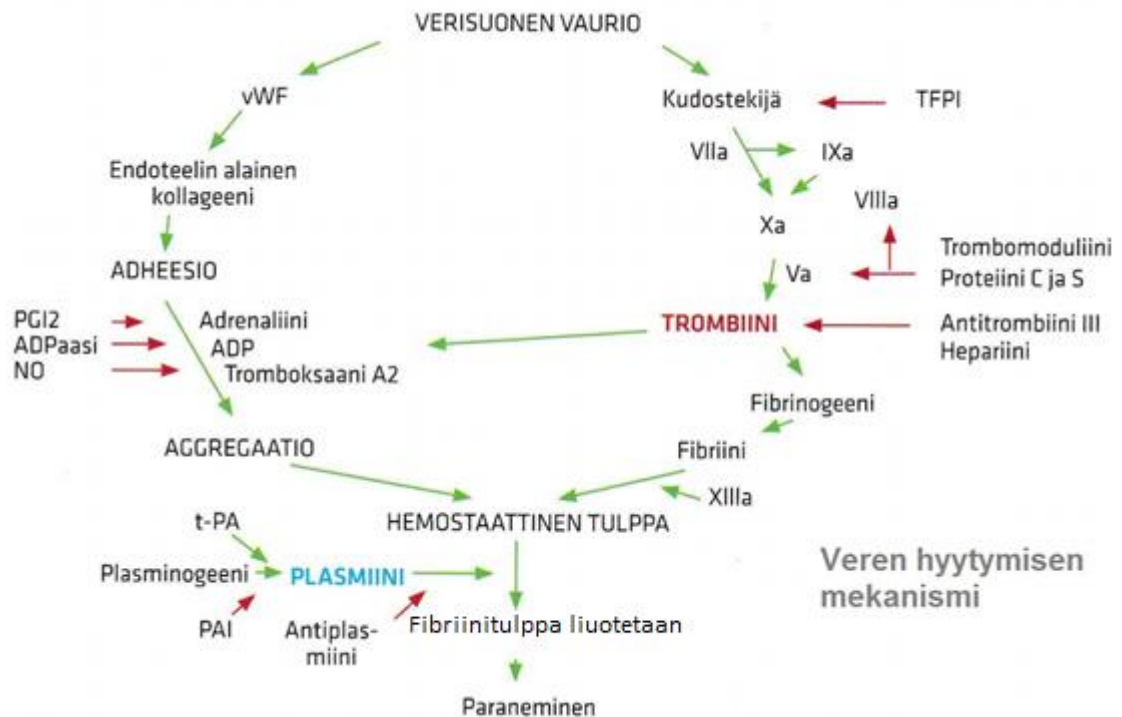
pieniä määriä trombiinia, joka mahdollistaa hyytymisjärjestelmän nopean käynnistymisen suonivauriopinnassa. (Lassila 2015, 36.)

Plasmassa olevien hyytymistekijöiden kofaktoreiden (tekijöiden V ja VIII) lisäksi tunnetaan kaksi ulkoista kofaktoria. Nämä ovat kudostekijä ja trombomoduliini, joista kudostekijä kiihdyttää hyytymistä ja trombomoduliini puolestaan jarruttaa sitä. Ne toimivat solukalvoihin ankkuroituneina joista kudostekijää on erityisen paljon adventitiassa (verisuonen uloin kerros) ja sileälihasoluissa. Myös makrofageilla on kyky syntetisoida sitä. (Lassila 2015, 37.)

Hyytymistapahtuman lopputuotteena syntyvä hyytymä muodostuu, kun trombiini pilkkoo fibrinogeenista kaksi peptidiä, fibrinopeptidi A:n ja B:n (FPA ja FPB), jolloin muodostuu liukoista fibriinimonomeereja. Tämän jälkeen fibriinimonomeerit polymerisoituvat jolloin muodostuu liukenematonta fibriiniä. Hyytymä syntyy kun fibriini haaroittuu ja trombiinin aktivoiva hyytymistekijä XIII stabiloi säikeet kovalenttien sidosten avulla. (Lassila 2015, 37.)

2.2.2 Hyytymisen säätely

Endoteeli ja plasmaproteiinit ovat tehokkaita veren hyytymisen säätelijöitä. Endoteelin tehtäviä on mm. rajata veren hyytyminen vauriokohtaan. Lisäksi se vaikuttaa verihiutaleiden aktivoitumiseen ja tarttumiseen säätelemällä niiden toimintaa. Endoteelin avulla myös trombiini kykenee säätelemään omaa muodostumistaan. Trombiini tarttuu endoteelisolukalvolla olevaan trombomoduliiniin ja tämä yhdistelmä aktivoi plasmassa olevan proteiini C:n, joka puolestaan hidastaa uuden trombiinin muodostumista inaktivoimalla hyytymistekijät V ja VIII. Tämän lisäksi trombiinilla stimuloitunut endoteeli erittää myös kudostekijän käynnistämisen hyytymisen estäjää eli TFPI:tä (tissue factor pathway inhibitor), joka estää kudostekijän ja hyytymistekijän VIIa:n muodostaman kompleksin ja hyytymistekijä Xa:n toimintaa. (Lassila 2015, 37–38; Hoffbrand & Moss, 2012, 324–325.) Myös fibrinolyysin yhteydessä muodostuva plasmiini hidastaa trombiinin muodostumista. Veren hyytymistä säätelee myös plasmassa oleva antitrombiini, joka estää trombiinin ja hyytymistekijöiden IX, X, XI ja XII vaikutusta hyytymisprosessissa. (Lassila 2015, 37–38.) Veren hyytymisen mekanismi on kuvattu vaiheittain kuvassa 1.

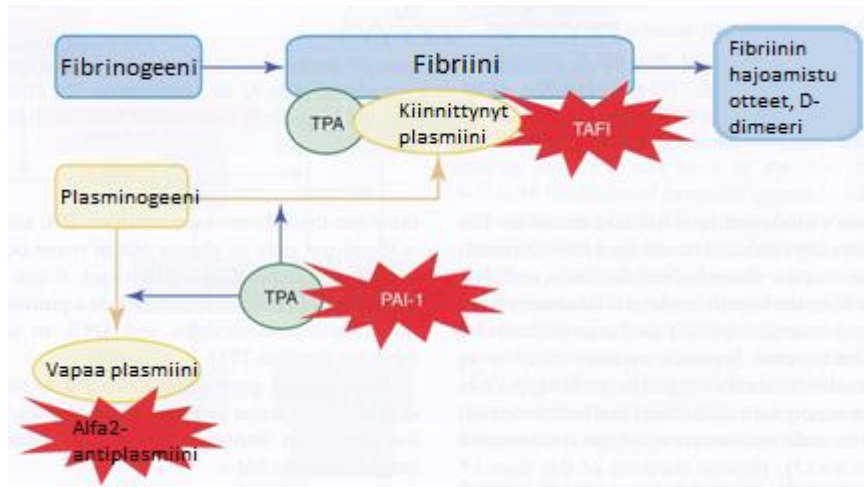


KUVA 1. Veren hyytymisen mekanismi vaiheittain. Vihreät nuolet aktivoivat ja punaiset nuolet inhiboivat toimintaa. PAI= plasminogeenin aktivaattorin inhibiittori, t-PA= plasminogeenin kudosaaktivaattori, vWF= von Willebrandin tekijä, ADP= adeniini difosfaatti, ADPaasi= ADT:tä pilkkova entsyymi, PG12= prostasykliini, NO= typpioksidi. (Muokattu. Javela 2015, 23.)

2.3 Fibrinolyysi ja sen säätely

Hyytymisen käynnistyttyä, käynnistyy samanaikaisesti myös fibrinolyysi. Tämän tehtävä on liuottaa hyytymä vaurion parantuessa ja myös rajata se suonivaurion alueelle. (Lassila 2015, 37–38; Fritsma & Fritsma 2012, 628; Hatton, Hughes-Jones, Hay & Keeling 2013, 122.) Fibrinolyysin käynnistää plasminogeeni, jonka aktivoitumiseen vaikuttaa plasminogeenin kudosaaktivaattori tPA (tissue-type plasminogen activator). Plasminogeenin kudosaaktivaattoria tuottavat fibriinin ja trombiinin aktivoimat endoteelisolut. Plasminogeeni aktivoituu tarttumalla tPA:n kanssa fibriiniin. (Hoffbrand & Moss 2012, 326; Lassila 2015, 37–38.) Tämän takia tPA:ta käytetään muun muassa lääkkeenä erilaisissa liuotushoidoissa. Myös hyytymistekijä XII, prekallikreniini ja suurimolekyylinen kininogeeni edistävät plasminogeenin aktivoitumista. (Lassila 2015, 37–38.)

Kiinnittyessään fibriiniin plasmiini pysyy suojattuna alfa2-antiplasmiinilta, jonka tehtävä on inaktivoida vapaa plasmiini ja näin myös kontrolloida sen toimintaa hyytymän ulkopuolella. Alfa2-antiplasmiinia on trombosyyteissä sekä plasmassa. Plasmiinin fibriinin pilkkomiskyky on kiinni myös trombosyyteissä olevasta hyytymistekijä XIIIa:sta. Mitä vähemmän tekijä XIIIa on ehtinyt ristisidoksin fibriiniä vahvistamaan, sitä tehokkaammin plasmiini kykenee sitä pilkkomaan. Näin ollen myös hyytymistekijä XIIIa säätelee fibrinolyysiä. Tämän lisäksi verihiutaleet erittävät PAI-1:ta (plasminogeenin aktivaattorin inhibiittori) minkä tehtävä on estää tPA:n toiminta. (Lassila 2015, 40.) Plasmiini siis pilkkoo hitaasti ja systemaattisesti fibriiniä, jolloin saadaan pieniä kappaleita joita kutsutaan ”fibriinin hajoamistuotteiksi”. Esimerkiksi D-dimeeri on tuote, jota syntyy fibrinolyysissä. (Fritsma & Fritsma 2012, 628.) Trombosyytit kiinnittyvät hyytymään valesolukojensa ja solurankansa avulla, ja näin ollen kiinteyttävät sitä ja samalla myös vaikeuttaen fibrinolyysiä. Plasmasta on myös löydetty trombiinista riippuva fibrinolyysin säätelyjärjestelmä, TAFI (thrombinactivatable fibrinolysis inhibitor), jonka tehtävä on estää plasminogeenin tarttumista fibriiniin. (Lassila 2015, 40.) Fibrinolyysin toiminta on havainnollistettu kuvassa 2.



KUVA 2. Fibrinolyysin kulkureitti ja inhibiittorit. TPA= plasminogeenin kudosaaktivaattori, PAI-1= plasminogeenin aktivaattorin inhibiittori, TAFI= trombiinilla aktivoituva fibrinolyysin inhibiittori. (Muokattu. Fritsma & Fritsma 2012, 642.)

2.4 Veren hyytymisen mittaaminen

Monissa hyytymistutkimuksissa mitataan trombosyyttien määrää. Tämä tutkimus onkin tärkeä myeloproliferatiivisissa tiloissa, vuototaipumuksissa sekä silloin kun halutaan

tarkkailla pitkään kestänyttä antitromboottista hoitoa. On kuitenkin muistettava, että niiden määrä ei aina korreloi niiden laatua. Esimerkiksi von Willebrandin taudin tai muiden perinnöllisten trombosyyttien toiminnan häiriöiden selvittäminen edellyttää tarkempia tutkimuksia. Aikaisemmin taudin selvittämiseen käytettiin vuotoaika tutkimusta, mutta nykyisin tuon tutkimuksen on korvannut PFA (platelet function analysis). (Lassila 2015, 40–41.) Tässä tutkimuksessa veri pistetään virtaamaan kapillaarin läpi, jossa se joutuu kosketuksiin kollageenin /adrenaliinin- tai kollageeni/ADP- laukaisuaineiden kanssa. Tämän tarkoituksen on käynnistää trombosyyttien adheesio ja aggregaatio, jonka seurauksena vähitellen virtaus kapillaarissa pysähtyy. Laite mittaa virtauksen pysähtymiseen kuluksen ajan eli ns. tukosajan. (Huslab 2015; Hatton ym. 2013, 116.) Tämä tutkimus soveltuu hyvin trombosyyttien erilaisten hankinnallisten ja perinnöllisten toimintahäiriöiden selvittelyyn, sekä von Willebrandin taudin seulontaan. (Lassila 2015, 41).

Kaikki hyytymistutkimukset kuvastavat vajavaisesti veren hyytymistä, sillä elimistössä hyytymistekijöiden kanssa vuorovaikuttavat suonen seinämä, trombosyytit sekä suonen virtausolosuhteet. Kliinisesti tärkeitä mittausmenetelmiä jotka perustuvat hyytymisaikaan ovat tromboplastiiniaika (TT, prothrombin time) ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika (APTT). Tromboplastiiniajasta (TT) saadaan kansainvälisten standardien avulla INR-arvo (international normalized ratio), jota käytetään yleisesti antikoagulaatiohoidon seurannassa. Aktivoitua partiaalista tromboplastiiniaikaa (APTT) käytetään apuna fraktioimattoman hepariinin annostelussa. Tromboplastiiniaika (TT) mittaa ulkoisen aktivaatioreitin ja K-vitamiinista riippuvaisten hyytymistekijöiden toimintaa ja APTT mittaa kaoliinilla käynnistettyä plasman hyytymisaikaa eli sisäisen hyytymisjärjestelmän toimintaa. Saatu hyytymisaika riippuu pääasiassa hyytymistekijöiden V, VIII, IX, X, XI ja XII pitoisuudesta. Kun hyytymistekijöiden VIII, IX ja XI pitoisuuksien pienentyessä merkittävästi APTT-tulos pienenee joka viittaa hyytymishäiriöön. Mikäli APTT-arvo on pidentynyt, tulee syy aina selvittää. Kyseessä voi olla vaikea hyytymistekijävaje, hepariini- tai muu antikoagulanttivaikutus tai lupusantikoagulantti. Myös trombosyyttien määrän seuranta on tärkeää, sillä hepariinihoito voi aiheuttaa trombosytopeniaa. Tutkimus on tärkeä myös paradoksaalisen eli selittämättömän tromboositaipumuksen tunnistamisessa. Myös yksittäisten hyytymistekijöiden analyysit perustuvat joko plasman hyytymis- tai entsyymiaktiivisuuden määrittämiseen. Näistä tärkeimpiä vuotohäiriöiden diagnostikassa ovat von Willebrandin tekijä, sekä hyytymistekijöiden V, VIII, IX, VII, XI ja XIII määritykset. (Lassila 2015, 41.)

3 TROMBOPLASTIINIAIKA, AKTIVOITU, PARTIAALINEN (APTT)

Plasman tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen (P-APTT) mittaa sisäistä hyytymisjärjestelmää. Sisäiseen hyytymisjärjestelmään vaikuttavat fibrinogeenin ja aktivoituneiden hyytymistekijöiden II, V, VIII, IX, X, XI ja XII toiminta (Joutsu-Korhonen, 2015; Stago 2011.) Menetelmä toimii hyvin sisäisen hyytymisjärjestelmän seulontakokeena, mutta sen herkkyys ei ole tarpeeksi tarkka osoittamaan lieviä puutoksia (Fimlab 2014b). Tutkimusta käytetään myös tromboositaipumuksen ja hyytymistekijävajauksen selvittelyssä ja hepariinihoidon seurannassa. Tutkimukseen eivät vaikuta hyytymistekijöiden VII ja XIII aktiivisuudet, ja lisäksi se ei ole tarpeeksi herkkä osoittamaan fibrinogeenin tai protrombiinin puutosta (Joutsu-Korhonen, 2015).

Plasman tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen pitenee hyytymistekijöiden XII, XI, IX, VIII, X tai V ollessa alle 20 % normaalista, siksi tutkimuksen avulla voidaan suhteellisen herkästi löytää hyytymistapahtuman hitaaseen alkuvaiheeseen vaikuttavat vajaukset. (TAULUKKO 1.) Nopean loppuvaiheen muutokset näkyvät pienentyneenä P-APTT:nä silloin jos protrombiininmäärä on alle 10 % normaalista, tai fibrinogeenin määrä on 0.5–1.0 g/l. (Fimlab 2014b.) Lisäksi P-APTT aikaa pidentävät hepariinin ja trombiinin estäjä lupusantikoagulantti ja fibriinin tai fibrinogeenin hajoamistuotteet (Joutsu-Korhonen, 2015). P-APTT voi pidentyä mm. hemofilioissa, Von Willebrandin taudissa ja disseminoituneessa intravaskulaarisessa hyytymisessä (DIK) (Howard & Hamilton 2013, 72-76). Myös tilat, kuten maksasairaudet erilaiset lääkitykset (trombiini-inhibiittorihoito) voivat aiheuttaa pidentyneitä P-APTT tuloksia (Stago 2011).

TAULUKKO 1. Yleisimmät P-APTT arvoihin vaikuttavat tekijät. (Muokattu. Vilpo 2010, 164.)

P-APTT			
Normaali		Pidentynyt	
Tromboplastiiniaika (TT %) tai INR-yksikkönä		Tromboplastiiniaika (TT %) tai INR-yksikkönä	
Normaali	TT % laskenut = INR noussut	Normaali	TT % laskenut = INR noussut
Trombosyyttien Funktiotutkimus		FVII vajoaus	
Normaali	Patologinen	<ul style="list-style-type: none"> - Vajaus: FXII, FXI, FIX, FVIII - Lupus –antikoagulantti - Hepariini - Spesifinen hyytymisteki-jävajaus 	<ul style="list-style-type: none"> - Lupus –antikoagulantti - Vajaus: FV, protrombiini, fibrinogeeni - K- vitamiinin puute - Maksasairaus - DIC - Hepariini: suuri pitoisuus
Vajaus: FXIII	Von Willebrandin tauti Trombosyyttitoimintahäiriö		

Tutkimuksen mittausalue Stago STA-R Evolution[®] -hyytymisanalysointilaitteella on 20–180 sekuntia ja viiteväli 23–35 sekuntia. Hoitoalue on kaksin- tai kolminkertainen potilaan normaalista lähtöarvosta. (Fimlab 2014a.) Tutkimus kontrolloidaan ennen potilasnäytteiden tutkimista normaalitason ja patologisen tason kontrolleilla.

Näyte tulee ottaa natrium-sitraattia sisältävään putkeen (3,2 %, 0,109 M Na-Sitraatti) (Fimlab 2014a). Antikoagulanttina toimiva natriumsitraatti kelatoi kalsiumia näytteestä, jolloin näyte ei hyödy (BD Vacutainer[®] 2003a). Näyte sentrifugoidaan ennen analysointia 10 minuuttia teholla 2000 x g. Hepariinihoitoa saavien potilaiden näytteet ovat aina päyväystutkimuksia, ja ne tulee sentrifugoida ja analysoida mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Suositus on että näytteet analysoidaisiin kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Hepariinihoitoa monitoroitaessa on tärkeää että analysointi tapahtuu kahden tunnin kuluessa näytteenotosta, muuten tulos voi olla virheellinen. (Fimlab 2014a.)

Hyytymisaika määritetään siten, että näyteplasmaan lisätään kefaliinia ja hyytymistekijä XII – aktivaattoria joka on polyfenolinen yhdiste. (Valanne 2011.) Näyteplasma ja kefaliinia ja aktivaattoria sisältävä reagenssi sekoitetaan ja inkuboidaan +37°C:seen, jolloin kalsiumkloridi lisätään. Tästä hetkestä mitataan näytteen hyytymiseen kuluva aika. (Stago 2011.)

4 HYYTYMISNÄYTTEIDEN SÄILYTYS JA KULJETUS

Hyytymisnäytteen käsittely, kuljetus ja lähettäminen ovat osa erittäin tärkeää preanalytiikkaa. Vuonna 2001 (Wiwanitkit) tehdyn tutkimuksen mukaan jopa 85 % virheellisistä laboratoriotuloksista johtuu preanalyttisistä virheistä. Kyseisen tutkimuksen mukaan huomattavia virhelähteitä olivat mm. näytteen laatu sekä määrä. Molemmat ovat myös tärkeitä virhelähteitä nimenomaan hyytymistutkimusten kannalta. Uusimman tiedon (Javela 2015, 22) mukaan nimenomaan hemostaasitutkimuksissa preanalyttisiä virheitä on 60–80% virheistä. Javelan (2015) mukaan jopa 5,5 %:ssa kaikista hyytymisnäytteistä esiintyy preanalyttisiä virheitä.

Kaikki näytteet ovat biologista materiaalia, joten aineenvaihdunnan reaktiot ovat myös läsnä näytteessä. Näytteen koostumus saattaa siis muuttua näytteenoton jälkeen. Koska laboratoriotulokset halutaan siitä tilanteesta joka näytteessä on näytteenottohetkellä, on näytteen reaktiot pysäytettävä tai minimoitava. (Tapola 2004, 29.) Jos näytettä käsitellään, kuljetetaan tai säilytetään väärin, voi näyte mennä pilalle. Eri näytteiden vaatimat käsittelyohjeet on aina hyvä tarkastaa ennen näytteenottoa. (Tuokko 2010, 32.)

Säilytyksen aikana näytteessä tapahtuu sekä fysikaalisia että kemiallisia ilmiöitä. Mikrobiologiset muutokset, kuten bakteerikontaminaatio, ovat myös mahdollisia. Solujen aineenvaihdunta toimii näytteenoton jälkeenkin ja ainesosia saattaa siirtyä soluista plasmaan. Tällä on merkitystä silloin, kun solunsisäisen analyysin määrä poikkeaa merkittävästi plasman tai seerumin pitoisuudesta. Ilmiötä voidaan ehkäistä näytteen sentrifugoisella ja plasman erottelulla. Plasman proteiinit saattavat hajota entsyymien vaikutuksesta, joka voi vaikuttaa hyytymistutkimuksiin, sillä hyytymistekijät hajoavat. Näytteestä voi myös tapahtua haihtumista, mikäli näytettä säilytetään avonaisessa putkessa. Ultravioletin mahdollinen vaikutus ja kaasujen vaihtuminen on myös hyvä huomioida näytteen säilytyksessä. (Tuokko, Rautajoki, Lehto 2009, 114–115.) Näyte saattaa myös kontaminoitua ulkopuolelta tulleilla aineilla mm. silloin jos näytettä säilytetään avonaisena. Näytteen hyytyminen estetään antikoagulantin avulla. (Tapola 2004, 29–30.) Hyytymisnäytteissä antikoagulanttina näytetään natriumsitraattia, joka sitoo näytteestä kalsiumin.

Jotta näyte säilyisi mahdollisimman hyvin, vaatii se mm. oikeanlaisen näyteastian materiaalin sekä oikean lämpötilan (Tapola 2004, 30). Näytekohtaiset suosituslämpötilat löytyvät laboratorioden ohjekirjoista. Jotkut tutkimukset vaativat näytteen jäädyttämisen ja toiset näytteet voivat säilyä huoneenlämmössä jopa päiviä. (Tuokko 2010, 32.) Tavallisinta on säilyttää näytteitä huoneenlämmössä. Jos näytteitä säilytetään pitkään, suositellaan plasman pakastamista. (Tapola 2004, 30.) Hyytymisnäytteille jääkaappisäilytys ei kuitenkaan sovi.

Laboratoriotointoja on keskitetty paljon, joten näytteitä kuljetetaan nykyään entistä enemmän. Lähetys vaatii hyvän suunnittelun ja kuljetukseen osallistuvien tahojen ohjeistus on tärkeää. (Tuokko ym. 2009, 114). Nopea kuljetus varmistaa tulosten luotettavuutta. Lähetettäessä kuljetuslämpötila ei saa muuttua merkittävästi ja näytteet on oltava hyvin pakattuina. Näytteet on lähetettävä särkymättömissä astioissa ja tartuntavaaralliset näytteet on merkittävä asianmukaisesti. (Tapola 2004, 30–31.) Jotkut näytteet vaativat kylmäkuljetuksen tai kuljetuksen pakastettuna. Tällöin on käytettävä kylmälaukkuja tai eristelaatikkoo, jossa on tarpeeksi paksut seinämät. Pakastettavat näytteet lähetetään hiilihappojäässä. Hiilihappojäässä olevia näytteitä ei saa pakata umpinaiseen astiaan räjähdysvaaran vuoksi. (Tuokko ym. 2009, 115–116.) P-APTT -näytteet ohjeistetaan pakastamaan kuljetusta varten. Lämpötilaseuranta kuljetuksen aikana lisää tulosten luotettavuutta ja voidaan varmistua siitä, ettei näytteessä ole tapahtunut suuria lämpötilamuutoksia. (Vanharanta 2014.) Kaikkia näytteitä ei ole mahdollista lähettää ollenkaan, jolloin potilaan on mentävä suoraan kyseistä tutkimusta tekevään laboratorioon (Tapola 2004, 30).

Kun näyte saapuu laboratorioon, täytyy analyysikelpoisuus tarkastaa. Tiedot, kuten näytteenottoaika, säilytys- ja kuljetusolosuhteet ja saapumisaika on oltava jäljitettävissä myöhemmin. Näyteputkissa on oltava tarvittavat tiedot sekä näytteen kunnan on oltava moitteeton. Plasma- ja seeruminäytteet on usein sentrifugoitava viimeistään 2 tunnin sisällä näytteenotosta, joten näytteenottoajan tarkkailu on tärkeää. (Tuokko 2010, 32.)

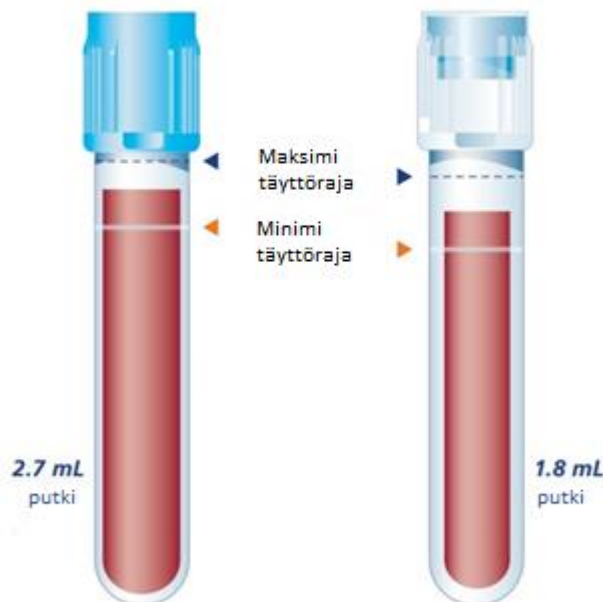
4.1 Hyytymisnäytteiden näytteenotto

Hyvä preanalytiikka on äärimmäisen tärkeää hyytymisnäytteille. Näytteenotossa sekä käsittelyssä yritetään estää kudostekijän joutuminen näytteen kanssa tekemisiin. Jos kudostenestettä pääsee näytteeseen, hyytymisjärjestelmä aktivoituu. Tällöin hyytymistekijät kuluvat ja tuloksesta tulee virheellinen. (Vanharanta 2014.) Jos potilas käyttää hemostaasiin vaikuttavia lääkkeitä, on raskaana, tai hänellä on esimerkiksi akuutti vuoto, olisi näiden tietojen oltava tulosta tulkitsevilla taholla jotta asiat voidaan ottaa huomioon tulostulokissa. (Joutsu-Korhonen & Koski 2010, 276.)

Hyvin otetulla hyytymisnäytteellä turvataan mahdollisimman laadukkaat tulokset. Hyytymisnäytteitä otettaessa toimitaan yleisten esivalmisteluohjeiden mukaisesti ja usein näyte olisi hyvä ottaa aamulla vain kevyen aterian jälkeen. Näytteet otetaan 3,2 % Näsitraattia sisältävään putkeen. Useimmiten käytetään n. 3ml:n näyteputkia, mutta esim. lapsilla voi käyttää myös n. 1 ml:n näyteputkia. Eri laboratorioissa on kuitenkin eri käytäntöjä näytemäärän suhteen. Fimlabissa näytemäärä on 5/3,5 ml. Näytteenotossa pitäisi käyttää 19-23G kokoista neulaa. Puristussiteen käyttöä ei suositella, sillä liika puristus kohottaa laskimon hydrostaattista painetta ja voi aiheuttaa hyytymisen aktivaation. Se voi johtaa hyytymistulosten merkittävään nousuun. Jos puristussidettä kuitenkin on käytettävä, sen käyttö on pidettävä mahdollisimman lyhyenä (alle minuutti). Jos näyte otetaan vakuumi- tai avotekniikalla, P-INR, P-APTT, P-TT tutkimuksissa hukkaputkea ei tarvita (Vanharanta 2014; Huslab 2013; Adcock 2009; Javela 2015, 22) Mikäli näytteenotossa käytetään siipineulaa, tulee hukkaputki ottaa ennen varsinaisen näytteen ottamista. Siipineulan letkun vuoksi näytteeseen tulee ilmaa, jos hukkaputkea ei oteta. Hukkaputkeksi soveltuu säilöntäaineeton putki tai Na-sitraattia sisältävä putki.

Laskimopiston on onnistuttava hyvin ja näyteputken on täytyttävä ongelmitta ja vuolaasti. Suonta ei siis saa etsiä, vaan piston on onnistuttava kerralla. Näytteen määrä on tärkeä, sillä antikoagulantin ja veren suhde on oltava oikea (1 osa sitraattia/ 9 osaa verta). Jos putki on alitäytetty, saadaan näytteestä pidentyneitä hyytymisaikoja. Jos putki on ylitäytetty, hyytymiä syntyy putkeen helpommin. (Javela 2015, 22.) Putkien minimi ja maksimi täyttymisrajat BD Vacutainer putkissa on kuvattu kuvassa 3. Putken täytyttyä, täytyy putkea käännellä 4–7 kertaa, jotta antikoagulantti ja veri sekoittuvat ja hyytymiä ei synny.

Jos näytteenoton ja näytteen sekoittamisen välillä on viivettä, täytyy näyte hylätä (Kitchen & Makris 2004, 8; Javela 2015, 22). Jos antikoagulanttia ei sekoita heti, hyytymisjärjestelmä voi aktivoitua. Näytettä ei kuitenkaan saa ravistaa, jotta ei syntyisi hemolyysiä tai trombosyytit eivät aktivoituisi (Adcock 2009, 37). Heparinisoidusta kanyylista ei saa ottaa hyytymisnäytettä. (Joutsu-Korhonen 2015, 152-153; Koski 2010, 276; Huslab 2013.) Jos näyte on kuitenkin otettava, on kanyylyä huuhdeltava tarpeeksi, jottei näyte kontaminoidu hepariinilla (Kitchen & Makris 2004, 8). Myös hemolyysi, hyytymät ja näytteen laimeneminen ovat ongelmia jos näyte otetaan kanyylista. Tieto siitä, että näyte on otettu kanyylin kautta, on aina kirjattava tietojärjestelmään. (Vanharanta 2014.)



KUVA 3. BD Vacutainerin[®] -sitraattiputkien täyttörajat. (Muokattu. BD Vacutainer[®] 2003b.)

Jotta varmistettaisiin mahdollisimman luotettavat potilastulokset, on hyytymistutkimusten virhelähteisiin kiinnitettävä huomiota (TAULUKKO 2.). Vähäinenkin hyytymien muodostuminen näytteessä kuluttaa hyytymistekijöitä, ja näin ollen aiheuttaa pidentyneitä tuloksia. Hyytymät voivat olla niin pieniä, että niitä on mahdoton nähdä paljain silmin (Joutsu-Korhonen, 2015; Javela 2015, 22.)

TAULUKKO 2. Hyytymistutkimuksen virhelähteet. (Adcock 2009, 40.)

Yleiset virhelähteet hyytymistutkimuksissa
<ul style="list-style-type: none"> • Muu antikoagulantti kuin natriumsitraatti • Putken vajaa täyttö • Putken vajavainen sekoittaminen • Näytteen säilytys jääkaappilämpötilassa

4.2 Hyytymisnäytteiden säilytys

Eri laboratorioden ohjekirjat ohjeistavat P-APTT- näytteiden säilytystä eri tavoin, mutta päälinjaus on niissä usein sama. Tarkasteltavat laboratoriot ovat Fimlab, Huslab, Tykslab, Nordlab, Islab, VITA kliininen keskuslaboratorio, Yhtyneet Medix Laboratoriot sekä Karolinska Universitetslaboratoriet. Fimlab (2014), Huslab (2015) ja Islab (2015) lupaavat näytteen säilyvän n.8 tuntia huoneenlämmössä, eli työpäivän ajan (LIITE 1). Nordlab (2014) ja Tykslab (2014) taas vaativat että näyte analysoidaan 3–4 tunnin sisällä. Lähetys kaikkien tarkasteltujen sairaanhoitopiirien laboratorioden mukaan tapahtuu huoneenlämmössä, mikäli näyte ehtii laboratorioon vaaditussa ajassa. Jos aika ylittyy, laboratoriot ohjeistavat lähettämään näytteen eroteltuna ja pakastettuna. Fimlab ei ohjekirjassaan suoraan neuvo lähettämään näytettä pakastettuna ajan ylittyessä, mutta plasman pakastus on kuitenkin sallittua.

Jokainen tarkasteltu laboratorio sallii plasman pakastamisen, mutta Islab ja Nordlab ovat ainoita jotka ottavat kantaa pakastuksen sallittuun kestoon. Nordlabin ohjekirjan mukaan plasma säilyy pakastettuna 1kk. Islabin mukaan taas plasma säilyy -20°C:ssa 2 viikkoa ja -70°C:ssa 2 kuukautta. Näin ollen Islab on ainoa laboratorio joka ottaa kantaa pakastuslämpötilaan. Fimlab on ainoa, joka mainitsee jääkaappisäilytyksen olevan kiellettyä. Muiden laboratorioden ohjekirjat eivät ota asiaan kantaa. Jääkaappisäilytys voi aiheuttaa hyytymistekijä VIII:n aktivoitumisen ja von Willebrand-tekijän vähenemisen näytteessä (Javela, 2015, 23). Hepariinihoitopotilaiden näytteet useimmiten ohjeistetaan analysoidaan 2h sisällä, mutta Islabin mukaan riittää, että eroteltu näyte analysoidaan 4h kuluessa. Islab on myös ainut tarkasteltu laboratorio, joka ohjeistaa pakastamaan hepariinihoitopotilaiden näytteet, jos ne on lähetettävä.

Kolmen muun laboratorion (VITA Kliininen keskuslaboratorio 2013, Yhtyneet Medix Laboratoriot 2015 ja Karolinska Laboratoriet 2014) ohjeet ovat samankaltaisia, mutta Yhtyneet Medix Laboratoriot ohjeistaa säilyttämään näytteen pakastettuna (LIITE 2). Syynä on analyysin tekotiheys, joka on 3–4 kertaa viikossa. P-APTT -näytteitä ei siis analysoida joka päivä, joten näytteet pakastetaan. Näistä laboratorioista yksikään ei ota kantaa pakastuksen kestoon eikä lämpötilaan.

Kitchen & Makris (2004) ja Adcock (2009) kirjoittavat että P-APTT -näytteet tulisi kuljettaa huoneenlämpöisenä, jos plasma analysoidaan 4 tunnin sisällä näytteenotosta. Jos analysointi 4 tunnin kuluessa ei onnistu, plasma pakastetaan. Jääkaappisäilytys on molempien lähteiden mukaan kielletty. Se voi aiheuttaa mm. trombosyyttien aktivaation sekä hyytymistekijä VIII:n vähenemisen (Adcock 2009, 39). Sulattamisen on tapahduttava nopeasti $+37^{\circ}\text{C}$, jotta vältettäisiin jäädyttämisen aiheuttamat saostumat. (Kitchen & Makris 2004, 9; Adcock 2009, 39.)

4.3 Aikaisemmat tutkimukset

Hyytymisnäytteiden säilymistä on tutkittu paljon aiemminkin. Aiheesta on tehty opinnäytetöitä ja asiaa on tutkittu myös ulkomailla monissa erilaisissa olosuhteissa. Adcock ym. (2012) ovat todenneet erityisesti F VIII:n olevan epävakaana analyyytti, ja sitä voi hävitä kylmäsäilytetyistä näytteistä. Useimmat muut hyytymistekijät kuitenkin sietävät paremmin kylmää. Heidän mukaansa säilytystä vaativat näytteet voidaan pakastaa, jos saatavilla on kunnollinen pakastin. Jos -70°C pakastinta ei ole käytettävissä, käy myös -20°C pakastin jossa ei ole automaattista sulatus-pakastussykliä. Tarkka ja säännöllinen lämpötilan seuranta on myös tärkeää. Jos näytteet tullaan analysoimaan kahden viikon sisällä, voidaan niitä säilyttää -20°C :ssa. Jos säilytysaika ylittää kaksi viikkoa, näytteet tulisi säilyttää -70°C :ssa tai jopa vielä kylmemmässä lämpötilassa. Pakastettujen näytteiden sulatus tulisi tapahtua nopeasti $+37^{\circ}\text{C}$ asteisessa vedessä. Jos näyte ei sulaa kokonaan tai jos näytettä lämmitetään liian kauan, se voi vaikuttaa näytteeseen. On ehdottoman tärkeää sekoittaa sulatetut näytteet hyvin ennen analysointia. Myös hyytymisnäytteen analysoinnin tulee tapahtua välittömästi sulatuksen jälkeen. (Adcock ym. 2012, 578–583.)

Eklundin (2014) opinnäytetyössä huomattiin myös, että F VIII:n aktiivisuus laski -20°C säilytettäessä. Wangin ym. (2014) mukaan F VIII laskee myös $+1-6^{\circ}\text{C}$ lämpötiloissa. Heidän tutkimuksessaan hyytymisaikojen pidentyminen oli jopa 40 %. Myös vuonna 2009 Alesci ym. olivat tutkineet, että -70°C :ssa säilytetyissä näytteissä on vähemmän muutoksia kuin -20°C :ssa säilytetyissä. Muissakin vastaavanlaisissa tutkimuksissa on havaittu, että P-APTT-näytteen hyytymisaika pitenee, jos näyte on pakastettu -20°C (Rizzo ym. 2008; Rao ym. 2000).

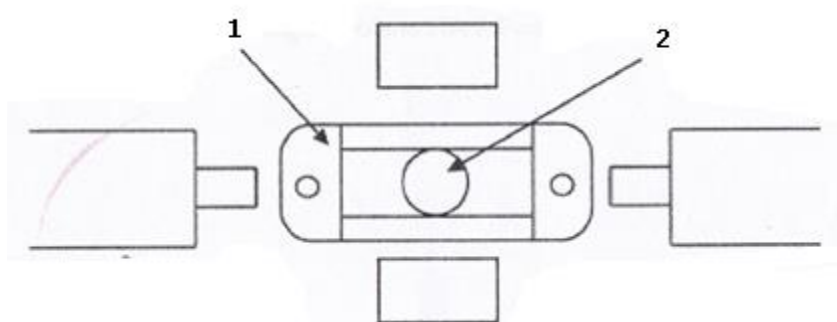
5 STAGO STA-R EVOLUTION® -HYTYMISANALYSAATTORI

Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa käytetään näytteiden analysointiin Fimlab Laboratoriot Oy:n Stago STA-R Evolution® -hytyymisanalyysaattoria. Stago STA-R Evolution® on erilaisiin automaatiolinjastoihin kytkettävissä oleva automaattinen hytyymisanalyysaattori. Laitteella voidaan toteuttaa niin sanottua random-access-periaatetta, eli voidaan tehdä hytyymisaika-, immunologisia ja kromogeenisia määrytyksiä samanaikaisesti. Analyysaattori käsittelee näytteet itse ja käyttää analysoidessa korkinlävistysnäytteenotto tekniikkaa, joka mahdollistaa suuren mittauskapasiteetin ja päivystysnäytteiden nopean analysoinnin. Analyysaattoriin mahtuu yhdellä kertaa enintään 43 viiden putken näytetelinettä eli yhteensä 215 näytettä (Stago 2014.) Analyysaattoria hallinnoidaan tietokoneelta Windows XP-käyttöjärjestelmällä. Käyttöjärjestelmään voidaan asentaa 200 erilaista määrytystä. Lisäksi se sisältää monipuolisen laaduntarkkailun ja kaksisuuntaisen liitettävyyden, jonka ansiosta se voidaan liittää laboratoriotietojärjestelmiin. (Valanne 2011.) Kuvassa 4 kuvattuna yksi Tampereen Stago STA-R Evolution® -hytyymisanalyysaattoreista.



KUVA 4. Stago STA-R Evolution®-hytyymisanalyysaattori, Tampereen Fimlab laboratoriot Oy (Kuva: Terhi Anttila 2015.)

Stago STA-R Evolution[®]-hyytymisanalysointilaitteisto mittaa hyytymisaikaa näytteen viskositeettimuutoksen perusteella (Fimlab 2014a). Plasmaa inkuboidaan pinta-aktivaattorin ja hyytymistekijä XII:n (polyfenoli) kanssa saaden aikaan sisäisen hyytymisjärjestelmän tekijöiden aktivoitumisen. Tämän jälkeen lisätään joukkoon kalsiumkloridi, joka käynnistää hyytymistapahtuman. Mittauskyvetissä on kuula, joka liikkuu elektromagneettisen kentän avulla. Hyytymisen yhteydessä tapahtuvan näytteen viskositeetin sekä kuulan amplitudin muutos rekisteröidään, jolloin saadaan tietoon hyytymiseen kulunut aika sekunteina. (Fimlab 2014a.)



KUVA 5. Kaavakuva kyvetistä. 1=Kyvetti, 2= Kuula. (Muokattu. Stago 2006.)

Stago STA-R Evolution[®]-hyytymisanalysointilaitteelle tulevat näytteet sentrifugoidaan joko manuaalisesti +20 °C, 2000 x g, 10 minuuttia, tai MPA-C (Modular[®]Pre-analytics-C) laitteella, joka toimii esikäsittelylinjana. Esikäsittelylinjastolta näytteet kulkeutuvat suoraan analysointilaitteille (kolme kappaletta). Reagensseina toimii STA-Cephascreen 4 ja STA-CaCl₂0.025 M. (Fimlab 2014a.) Kalibrointia APTT-tutkimukselle ei tarvitse, sillä vastaus on suoraan näytteen hyytymisaika sekunteina. Laadunvarmistus tapahtuu kaksitasokontrolleilla, joita ovat STA[®]-ScandiNorm ja STA[®]-ScandiPath. Kontrollit määritetään ennen potilasnäytteiden analysointia, jotta voidaan seurata tulostasoa ja varmistetaan oikeat tulokset. Laite pipetoi analysoitavaksi 50 µl laimentamatonta näytettä. Mittausalue on 20–180 s, ja vastaus annetaan hyytymisaika / sekunteina. (Valanne 2011.) Mittausalueen ylittänyt tulos vastataan yli 180s.

Sentrifugoidut näytteet syötetään koneeseen tarjottimella näytetelineessä ilman korkkia tai vaihtoehtoisesti esikäsittelylinjan (MPA) kautta korkin kanssa tai ilman. Pienet näytemäärät (1 ml) siirretään mikroputkeen ja analysoidaan siitä. Tässä tapauksessa laitteelle

tulee erikseen ilmoittaa että kyseessä on ”µTainerputki” eli mikroputki, jotta se osaa pipetoida näytteen oikein. Laite saa näytettä koskevat pyynnöt näytteiden ja tuloksien hallintajärjestelmästä (Process System Manager eli PSM), jonne myös valmiit vastaukset lähetetään. Sieltä tuloksen siirtyvät laboratorion käyttämään tietojärjestelmään. Vastaukset ovat nähtävissä laitteen tulosnäytössä silloin, kun näyteputket ovat koneessa. Tulokset ovat myös myöhemmin nähtävissä koneen tulosarkistosta. Vastaukset P-APTT -näytteille annetaan sekunteina. (Fimlab 2014a.) Jos analysaattori ei anna näytteestä tulosta tai tulos vaikuttaa poikkeavalta, syytä haetaan tarkastelemalla näytteen laatua silmämääräisesti. Jos näyte on hyytynyt tai muusta syystä analysointikelvoton, pyydetään uusi näyte. Jos tulos poikkeaa huomattavasti normaalista, kontrolloidaan se uusinta-ajolla. Päivystysnäytteet pyritään analysoimaan mahdollisimman nopeasti, joten ne menevät analysaattorille muun näytemassan ohi.

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla P-APTT-näytteen primaarituloksia pakastamisen jälkeisiin tuloksiin ja selvittää, ovatko P-APTT-näytteen mahdolliset pakastuksesta johtuvat tulostason muutokset kliinisesti merkittäviä.

Työssä analysoidaan P-APTT -näytteet päivittäisanalytiikassa, jonka jälkeen näyteplasma pakastetaan -20°C:een. Työstä on rajattu pois hepariinihoitopotilaiden näytteet. Valitut pakastusajat ovat 1–4 vuorokautta ja 7–14 vuorokautta. Näin pystytään vertailemaan pakastusajan vaikutusta tulostasoihin. Otokseksi on suunniteltu 40–50 näytettä, joista puolet säilytetään -20°C:ssa 1–4 vrk ja puolet 7–14 vrk (TAULUKKO 3). 1–4 vuorokautta on valittu tutkittavaksi pakastusajaksi, koska viikonlopun yli säilytettävien, maanantaina analysoitaviksi lähetettävien näytteiden pakastusaika on noin 1–4 vuorokautta.. Lähettäminen onkin yksi merkittävä hyytymistutkimusten pakastamisen syy. 7–14 vuorokautta on valittu pakastusajaksi siksi, koska osa laboratorio-ohjekirjoista lupaa P-APTT-näytteen säilyvän kaksi viikkoa -20°C:een pakastettuna. Pakastamisen jälkeen näytteet sulatetaan ja analysoidaan uudelleen. Näytteiksi kerätään tulostasoltaan normaaleja näytteitä ja patologisia näytteitä.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa P-APTT -näytteiden säilyttämisestä Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:n kliinisen kemian laboratoriolle, jolloin laboratorio voi varmistaa mahdollisimman luotettavat potilastulokset. Tutkimuksesta saatavat tulokset voivat hyödyttää potilaita ja kliinisen kemian laboratorioita ja maanlaajuisesti.

Tutkimusongelmat ovat seuraavanlaiset:

- Säilyykö plasmasta tehdyn APTT-näytteen tulostaso samana, jos se pakastetaan -20°C ja sulatetaan uusinta-analysointia varten?
- Vaikuttaako pakastusajan pituus -20°C:ssa saatuihin tuloksiin?
- Onko mahdollinen pakastuksen vaikutus kliinisesti merkittävä?

TAULUKKO 3. Opinnäytetyön näyteotoksen suunnitelma

	1–4 vrk näytteet	7–14 vrk näytteet
Määrä	n. 25 kpl	n. 25 kpl
Valitsemisen syy	Lähettämisen takia pakastaminen → pakastusaika ei ko- hoa pitkäksi	Osa laboratorio-ohjekir- joista lupaa säilymisen - 20°C:ssa kaksi viikkoa → näytteet valittu niin että vanhimmat ovat olleet kaksi viikkoa pakastettuna

7 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT JA TUTKIMUSASETELMA

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen, kokeellinen ja vertaileva tutkimus. Kvantitatiivisessa eli määrällisessä tutkimuksessa keskeisiä asioita ovat mm. johtopäätökset aiemmista tutkimuksista, koejärjestelyjen ja aineiston keruun suunnitelmat, koehenkilömäärittelyt ja otantasuunnitelmat, muuttujien muodostaminen taulukkomuotoon ja lopuksi päätelmien teko aineistoon perustuen. Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan. (Hirsjärvi, Remes, Sajavaara 2009, 134–140.) Opinnäytetyön muuttujina toimivat näytteensäilytyslämpötila, pakastusaika sekä tulostasoltaan erilaiset näytteet.

Kvantitatiiviseen tutkimukseen lähdetään tutkimusongelmasta, johon tutkimuksen avulla haetaan ratkaisua. Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla voidaan yleistää. Siksi tutkimus edellyttää paljon tutkimusmateriaalia eli havaintoyksilöitä. Riittävällä määrällä materiaalia ja edustavalla otoksella on mahdollista saada tuloksia, jotka voidaan yleistää koskemaan koko perusjoukkoa. (Kananen 2008, 10–13.)

Otos on tutkimuksen kohderyhmän osa, jolla voidaan saada edustava kokonaiskuva koko ryhmästä. Sitä käytetään tutkimuksissa silloin kun perusjoukko on ominaisuuksiltaan hajanainen ja halutaan että kaikki ryhmät saavat edustavuuden otoksessa. Perusjoukolla tarkoitetaan tutkimuksen kohdejoukkoa. (Vilka 2007, 51–54.) Opinnäytetyössä näytteet kerätään ositettua otantaa käyttäen. Työssä perusjoukko on jakautunut ryhmiin, jotka ovat tulostasoltaan patologiset ja terveet. Molemmista ryhmistä kerätään näytteitä tutkimukseen. Ositetulla otannalla varmistetaan, että työssä ei käytetä ainoastaan terveiden ihmisten näytteitä tai ainoastaan sairaiden ihmisten näytteitä. Eri tulostasoiset näytteet voivat käyttäytyä eri tavalla tutkimuksessa, joten näin saadaan mahdollisimman edustavat tulokset. Opinnäytetyössä otoskoko on 40–50 näytettä, joista puolet on säilytetty pakastimessa 1–4 vuorokautta ja puolet 7–14 vuorokautta.

Kokeellisessa tutkimuksessa asiaa analysoidaan koejärjestelyjen valossa olosuhteita muunnellen. Tarkoitus on siis mitata muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan käytännössä. Saadut muutokset mitataan ja sen jälkeen voi aloittaa tulosten käsittelyn. (Hirsjärvi, Remes, Sajavaara. 2009, 134.) Tutkimuksen tulokset voidaan esittää esimerkiksi

taulukko- tai kuviomuodoin. Numeeriset tulokset eivät riitä kertomaan tutkimuksen tuloksia, vaan taulukoita ja kuvaajia tarvitaan havainnollistamaan ja selittämään saatuja tuloksia. (Vilka, 2007, 135.) Opinnäytetyöhön kuuluu kokeellinen osuus, jossa vertailemme käytännössä P-APTT -näytteen primaarituloksia pakastuksen jälkeisiin tuloksiin.

Työn tarkoituksena on vertailla tuloksia P-APTT-näytteistä pakastettuna ja pakastamattomana. Tutkimusnäytteet tullaan keräämään rutiininäytteenottona Fimlab Laboratoriot Oy:n asiakkailta. Näytteenottoa ei kuitenkaan voi vakioida täysin, sillä näytteenottajat eivät ole tietoisia tutkimuksesta.

Tutkimuksesta saadut tulokset taulukoidaan Microsoft® Excel-tietojenkäsittelyohjelmalla ja sen avulla tuloksista lasketaan muutosprosentit. Taulukoiduista tuloksista tuotetaan myös tuloksia havainnollistavia kaavioita ja diagrammeja. Aineiston keruun, taulukoinnin ja tulosten tulkitsemisen jälkeen pystytään tekemään päätelmiä näytteen pakastamisen mahdollisista vaikutuksista tulostasoon. Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:n klinisen kemian laboratorion hyytymistyöpistettä tiedotetaan opinnäytetyöstä, jolloin he tietävät kerätä P-APTT -näytteet talteen n. kahden viikon ajalta. Ensimmäisen analysoinnin suorittaa laboratorion henkilökunta. Sen jälkeen näyteplasmata erotellaan ja pakastetaan -20°C:een. Pakastamisen jälkeisen analysoinnin suorittavat opinnäytetyön tekijät. Sulatuksen jälkeen näytteet sekoitetaan hyvin ennen uusinta-analysointia ja näytteen laatu tarkastetaan silmämääräisesti.

Analysointiin käytetään Stago STA-R Evolution® -hyytymislaitetta, jossa P-APTT-näytteen mittausperiaatteet perustuvat viskositeettimuutoksen mittaamiseen. Plasmaa inkuboidaan reagenssin kanssa ja mitataan hyytymiseen kulunut aika. (Fimlab 2014.)

8 PAKASTETTUIJEN P-APTT -NÄYTTEIDEN SÄILYVYYSVERTAILU

Opinnäytetyöprosessin aloitimme syyskuussa 2014 opinnäytetyöaiheen valitsemisella. Jo alussa olimme kiinnostuneita työstä, mihin kuuluisi kokeellinen osuus. Huomasimme aiheen P-APTT-näytteen säilymisestä, ja kiinnostuimme aiheesta heti. Lisäksi olimme ammattikorkeakoulussa hyytymistutkimuksia tehdessämme huomanneet, että P-APTT-näytteen tulostaso saattaa muuttua pakastamisen seurauksena, ja se lisäsi aiheen mielenkiintoisuutta. Aihe tuli Fimlab Laboratoriot Oy:lta Tampereen kliinisen kemian laboratorion kautta.

Syyskuun lopussa tapasimme työelämän yhdyshenkilöt ja keskustelimme opinnäytetyöstä. Tutkimusongelma ja kokeellinen osuus selkiytyivät ja saimme tarvitsemaamme tietoa opinnäytetyösuunnitelmaa varten. Aloimme työstämään suunnitelmaa ja mietimme mitä opinnäytetyön kirjallisuuskatsaukseen kuuluisi.

Suunnitelmaseminaarissa lokakuussa esitimme lähes valmiin opinnäytetyösuunnitelman. Suunnitelmaa tehdessä meille oli herännyt vielä uusia kysymyksiä, joten niiden selvittely vaati hieman lisää aikaa. Marraskuussa lähetimme suunnitelman opettajille ja työelämän edustajille. Kaikki osapuolet allekirjoittivat 7.11.2014 opinnäytetyösopimukset. Joulukuun alussa aloitimme teoreettisen viitekehysten rakentamisella opinnäytetyötä varten. Keräsimme lähdemateriaalia ja teimme kirjoitustyötä.

Suoritimme 9–10.3.2015 opinnäytetyön kokeellisen osuuden Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen automaatiokemian tiloissa. Päätimme kasvattaa otoskokoa näyttemateriaalin kattavuuden ja tutkimustulosten luotettavuuden parantamiseksi. Alkuperäisessä suunnitelmassa otoskokomme oli ollut 40–50 näytettä, mutta päädyimme lopulta 60 näytteeseen. Luvan kysyimme ylikemistiltä.

Olimme etukäteen sopineet, että laboratoriohoitajat keräävät P-APTT -näytteitä kahden viikon ajalta. Näytteenotto oli tapahtunut osastonäytteenottona Tampereen yliopistollisen keskussairaalan (TAYS) eri osastoilta, mistä johtuen pitkiä kuljetusaikoja tai näytteiden lähettämistä ei ole tapahtunut. Näytteet kulkivat MPA-C-esikäsittelylinjaston läpi, jossa

ne myös sentrifugoitiin. Tulosten saamisen jälkeen näyteplasma eroteltiin erilliseen putkeen ja pakastettiin -20°C :n. Putkien kylkeen kirjoitettiin alkuperäinen P-APTT-tulos. Näytteitä oli kerätty runsaasti, joten meillä oli valinnanvaraa näytteitä valittaessa. Pyrimme valitsemaan otokseksi näytteitä, joissa tulostaso oli normaali, viitealueen rajalla ja merkittävästi koholla. Näytteiden pakastusajoiksi valikoituivat 1–4 vuorokautta sekä 7–14 vuorokautta. Kumpaakin aikaväliä kohden valikoimme 30 näytettä eli yhteensä 60 näytettä.

Sulatimme näytteet ylikemisti Riikka Ronnun (2015b) ohjeistuksen mukaisesti ja käytimme lämpökaappia sulatukseen. Sulatusaika vaihteli puolesta tunnista tuntiin riippuen näytteen pakastusajasta ja näytteen sijainnista näytetelineessä. Keskellä olevat näytteet sulivat hitaammin kuin reunoilla olevat näytteet ja yhden päivän pakastimessa olleet näytteet sulivat nopeammin kuin useampia päiviä pakastimessa olleet näytteet. Sulatuksen jälkeen sekoitimme näytteet huolellisesti. Ennen analysointia varmistimme, että näytteet ovat kädenlämpöisiä. Ohjeistus sulatukselle on, että näyte sulatetaan heti saapumisen jälkeen vesihauteessa tai lämpökaapissa, jonka lämpötila on $+35 - +37^{\circ}\text{C}$. Sulatuksen jälkeen näyte tulee sekoittaa hyvin, mutta sitä ei saa sentrifugoida. Jos näytteessä esiintyy sulatuksen jälkeen fibrinirihmaa, tulee vastauksen yhteyteen lisätä siitä maininta.

Tutkimme jokaisen näytteen silmämääräisesti tarkastellen näytteen laadukkuutta ja ottaen huomioon mm. fibrinirihmat. Siirsimme plasman mikroputkiin, koska näytemäärä oli vähäinen. Samalla vältimme mahdollisten fibrinirihmojen joutumista analysaattoriin. Numeroimme näytteet juoksevalla numerosarjalla (1–60). Viivakoodien ja läheteiden puuttumisen takia syötimme näytteet manuaalisesti analysaattorille ja ohjelmoimme laitteen analysoimaan näytteestä P-APTT-tutkimuksen. Saadut tulokset tulostimme suoraan analysaattorilta ja kirjasimme ylös käsintehtyyn taulukkoon. Tuloksen ollessa kahdessa paikassa kirjattuna, kirjausvirheen mahdollisuus pieneni. Koska osa alkuperäisistä tuloksista oli pyöristetty, päätimme pyöristää myös pakastamisen jälkeiset tulokset kokonaisluvuiksi.

Saamamme tulokset taulukoimme Microsoft® Excel-tietojenkäsittelyohjelmassa ja lasimme tuloksien muutosprosentin (KAAVA 1 ja LIITE 1 & 2).

$$\left(\frac{\beta - \alpha}{\alpha}\right) \times 100$$

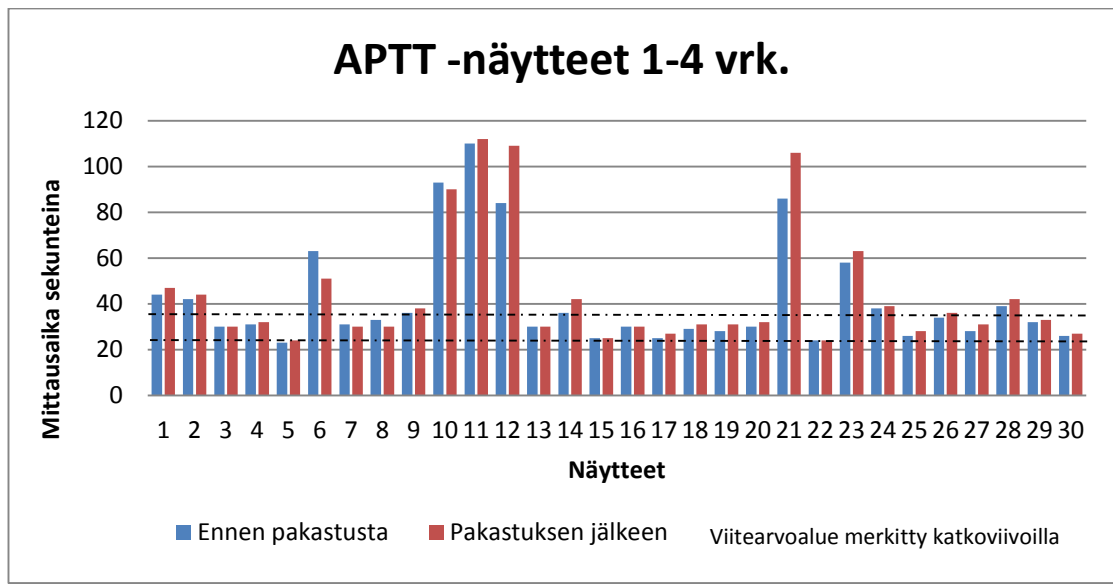
KAAVA 1. Muutosprosentin laskukaava. α = Primääritulos, β = Pakastuksen jälkeisen analyysin tulos. (Muokattu. Tilastokeskus 2001.)

9 TULOKSET JA NIIDEN ANALYSOINTI

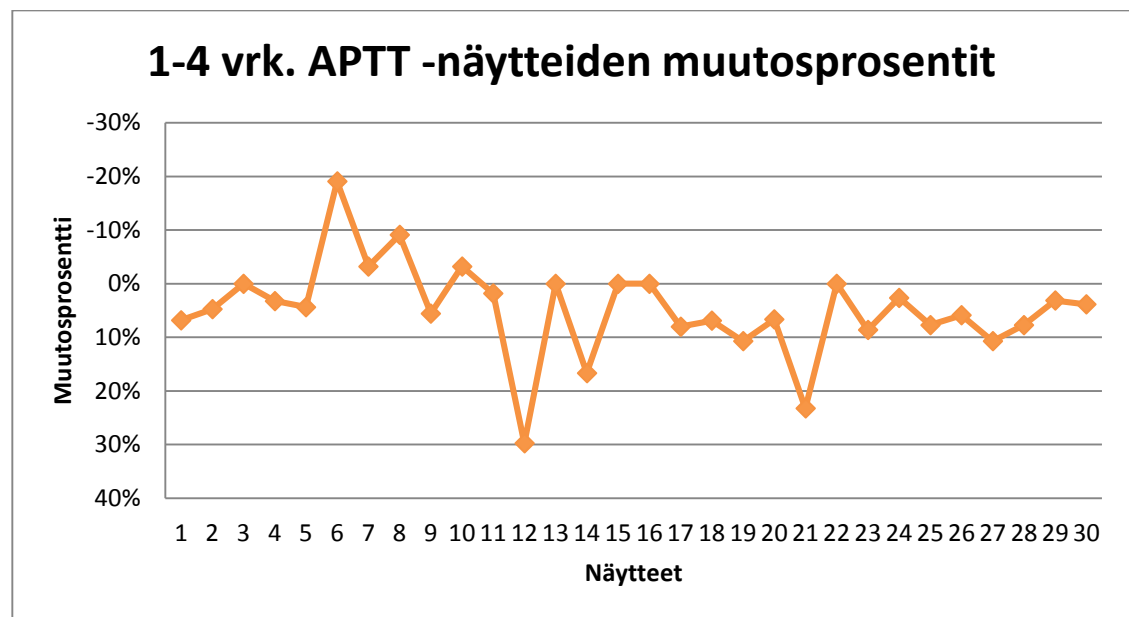
Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa analysoitiin P-APTT -näytteitä pakastamisen jälkeen, ja vertasimme tuloksia alkuperäisiin tuloksiin. Alkuperäiset tulokset oli saatu rutii-nianalyysin kautta ja pakastuksen jälkeisen analysoinnin suorittivat opinnäytetyön tekijät. Työhön valittiin näytteitä, joiden pakastusaika -20°C:ssa oli 1–4 vuorokautta ja 7–14 vuorokautta. Saamamme tulokset taulukoimme 1–4 vuorokauden näytteisiin (LIITE 1.) ja 7–14 vuorokauden näytteisiin (LIITE 2.). Taulukoissa vertaillaan näytteiden ennen ja jälkeen tuloksia ja tulostasomuutoksille on laskettu muutosprosentti. Tarkoituksena on tuoda mahdollisimman selkeästi esille se, onko havaittu muutos kliinisesti merkittävä. Taulukkoon on kirjattuna myös näytteen laatuun vaikuttavat tekijät. Esimerkiksi fibriinirihman muodostuminen hyytymisnäytteessä kuluttaa hyytymistekijöitä ja aiheuttaa virheellisen tuloksen (Javela 2015, 22). Viitearvoina on käytetty Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjekirjasta löytyviä arvoja 23–35 sekuntia. Tässä työssä kliinisesti merkittävä määritellään seuraavasti: aiheuttaako muutos viitearvojen puolelta toiselle siirtymisen, eli vaikuttaako muutos hoitoon tai voidaanko sen perusteella tehdä diagnoosi.

Näytteiden, joiden pakastusaika oli 1–4 vuorokautta, muutosprosentti vaihteli -19 % – +30 % välillä. Osa uusinta-analysoinnissa saaduista tuloksista madaltui alkuperäisestä. Viisi näytettä 30:stä näytteestä (17%) pysyi tulostasoltaan täysin samana. Vain yhdessä näytteessä tulostason muutos on kliinisesti merkittävä, sillä hyytymisaika muuttui normaalista hieman kohonneeseen. Jo valmiiksi kohonneissa arvoissa tavataan suurempia muutosprosentteja kuin normaaleissa arvoissa. Suurimmaksi osaksi saatu tulos pysyi alkuperäisen tuloksen kanssa viitealueen samalla puolella.

TAULUKKO 4. P-APTT -näytteiden tulostasoyerot, pakastettuna -20°C:ssa 1–4 vuorokautta (N=30 kpl)

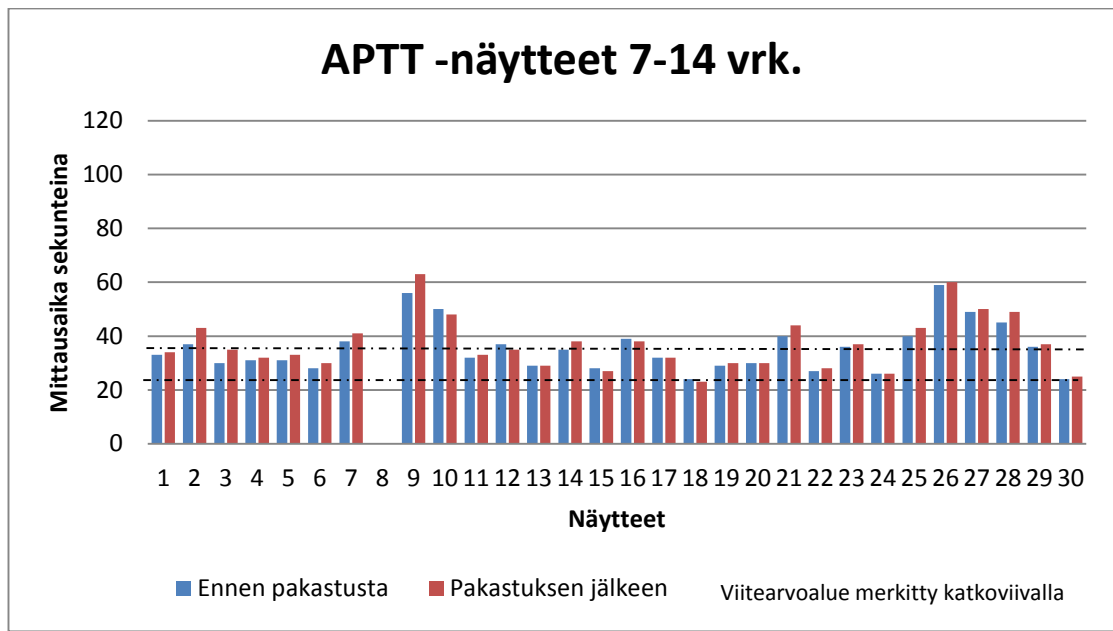


TAULUKKO 5. P-APTT -näytteiden muutosprosentit, 1–4 vuorokautta (N=30 kpl)

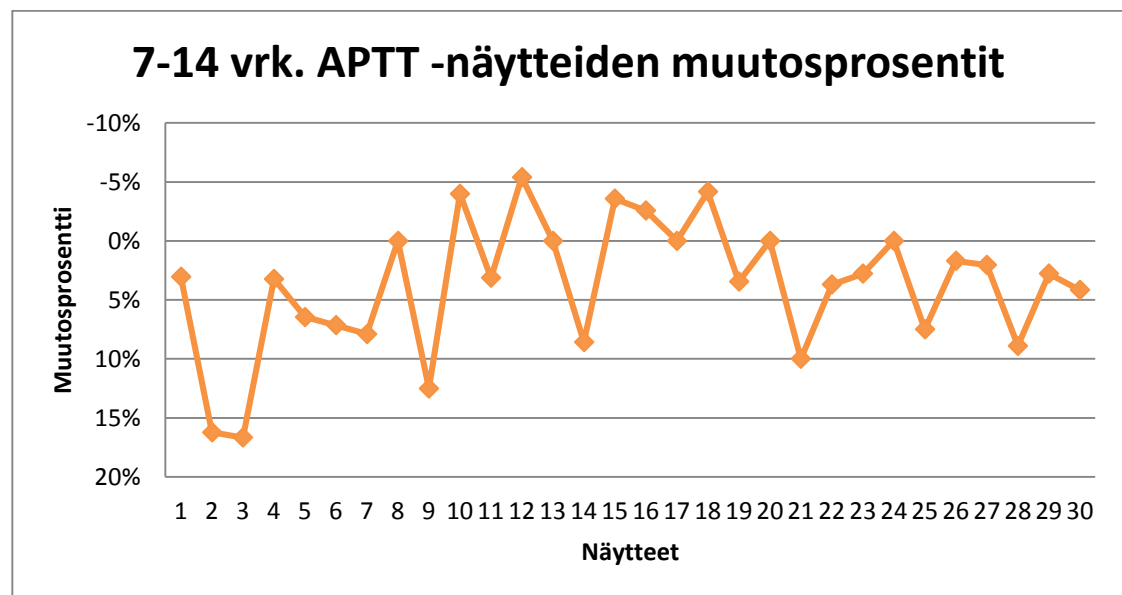


Näytteiden joiden pakastusaika oli 7-14 vuorokautta, muutosprosentti vaihteli -5 % – +17 % välillä. Neljä näytettä 30:stä näytteestä (13%) pysyi tulostasoltaan täysin samana. Kaksi näytettä muuttui tulostasoltaan kliinisesti merkittävästi, jälleen normaalista hieman kohonneeseen sekä hieman kohonneesta normaaliin. Näyte nro. 8:n alkuperäinen sekä pakastuksen jälkeinen tulos oli yli laitteen mittausalueen, joten näytettä ei ole kuvattuna kaavioissa.

TAULUKKO 6. P-APTT -näytteiden tulostasoorot, pakastettuna -20°C:ssa 7–14 vuorokautta (N=29 kpl)

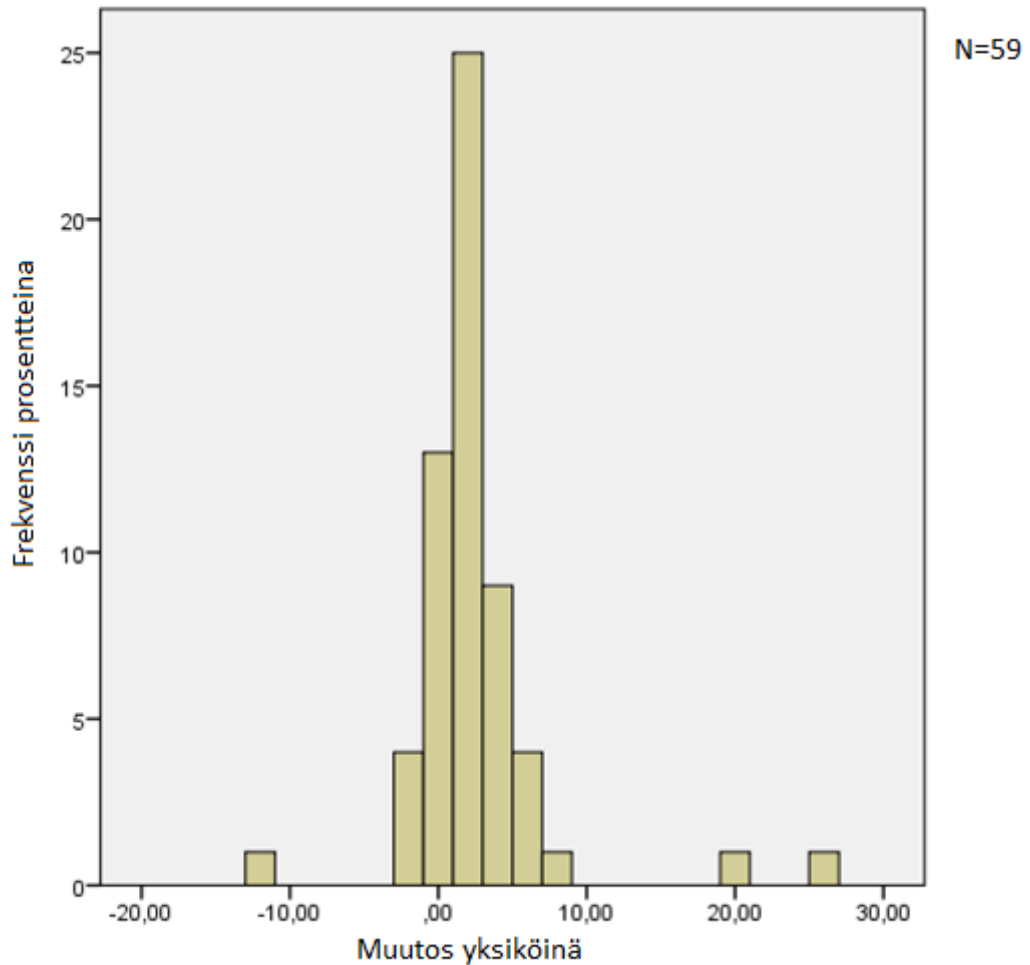


TAULUKKO 7. P-APTT -näytteiden muutosprosentit, 7–14 vuorokautta (N=29 kpl)



Taulukosta 8 huomaa, että suurin osa näytteistä jakautuu pääasiassa nollan (ei muutosta) välittömään läheisyyteen. Suurin osa näytteistä on siis tulostasoltaan vain vähän kohon-
neita.

TAULUKKO 8. Näytteiden analyysitulosten muutos yksikkönä ja niiden prosentuaalinen jakautuminen



Saaduista tuloksista voidaan nähdä onko muutos merkittävä viitearvoihin nähden. Tulostasoa vaihteli laskevasta nousevaan. Yhteensä kolme näytettä muuttui tulostasoltaan yli viiterajojen, mutta muutosprosenttiltaan ne muuttuivat maksimissaan 9 %. Muissa kohonneissa tai laskeneissa tuloksissa tulos pysyi viitearvojen samalla puolella, vaikka muutosprosentti oli korkea. Korkeammat muutosprosentit tuloksissa eivät olleet kliinisesti merkittäviä, koska tulostasoa oli jo lähtökohtaisesti korkea ja näin ollen sen kliininen merkitys suuri.

TAULUKKO 9. Näytteiden keskiarvot ennen ja jälkeen pakastuksen -20°C:ssa

Näytteen pakastusaika (vrk)		Ennen pakastusta	Pakastuksen jälkeen
1-4	Keskiarvo	41,467	43,800
	Näytemäärä (N)	30	30
7-14	Keskiarvo	35,552	37,000
	Näytemäärä (N)	29	29
Kaikki näytteet	Keskiarvo	38,559	40,458
	Näytemäärä (N)	59	59

Taulukoista 9 ja 10 näkee sen, että keskiarvoista laskettu muutos ei ole suuri kummassakaan näyteluokassa. Pääasiassa tulostason muutokset olivat siis nousevia, vaikka laskevia muutoksia oli myös mukana. Laskevia muutoksia oli yhteensä yhdeksän koko otoksessa, mutta suurin osa näistä tuloksista voi johtua normaalista määrittysten välisestä tason heittelestä.

TAULUKKO 10. Näytteiden keskiarvojen erotus

Näytteen pakastusaika (vrk)	Keskiarvon erotus	Näytemäärä (N)
1-4	2,3333	30
7-14	1,4483	29
Kaikki näytteet	1,8983	59

Tulosten perusteella pakastaminen saattaa vaikuttaa näytteen tulostasoon, mutta muutos ei ole yhdenmukaista eikä lineaarista. Tulostaso saattaa nousta, laskea tai pysyä samana.

Myöskään hemolyysin ja fibriinirihman vaikutus tulostasoon ei ole yhdenmukaista, joten ei voida sanoa kuinka paljon se vaikuttaa tuloksiin. Kahden viikon pakastusaika ei tuloksien perusteella muuta tulostasoa lineaarisesti sen enempää kuin yhden päivän pakastusaikakaan, joten kahden viikon pakastaminen P-APTT-näytteelle on sallittavissa tämän tutkimuksen perusteella. Näyte nro. 8:n alkuperäinen sekä pakastuksen jälkeinen tulos oli yli Stago S-TAR Evolution[®] hyytymiasanalysointilaitteen mittausalueen, josta johtuen tämän näytteen kohdalla vertailua ei voida tehdä. Kriittisiä muutoksia, esim. matalasta arvosta erittäin kohonneeseen tai erittäin kohonneesta normaaliksi, ei esiintynyt.

10 LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS

Määrällisessä tutkimuksessa on tärkeää arvioida tutkimuksen luotettavuutta. Kokonaisluotettavuus koostuu reliabiliteetistä ja validiudesta. Tutkimuksen reliabelius arvioi tutkimuksen toistettavuutta, eli toistetussa mittauksessa on saatava sama tulos. Tutkimuksen validius kertoo siitä, onko tutkimuksessa onnistuttu mittaamaan sitä mitä oli tarkoitus. Kokonaisluotettavuuteen vaikuttaa myös se, edustaako otos perusjoukkoa ja liittyykö tutkimukseen satunnaisvirheitä. (Vilka 2007, 149–152.)

Opinnäytetyössä on selkeästi määritelty tutkimusongelmat, joihin haetaan vastausta. Tutkimusongelmiin on työssä saatu vastaus, eli tutkimuksessa on mitattu oikeita asioita. Kokeellisen osuuden aikana hyytymisanalysointori toimi moitteettomasti ja saadut tulokset dokumentoitiin kahdella tavalla (kirjaaminen käsin ja tulosten tulostus laitteelta paperille). Koko kokeellisen osuuden kulku on kirjattu tarkasti ylös yksityiskohtiaan myöten. Jos tutkimus toistettaisiin samalla tavalla, joka on tässä opinnäytetyössä kuvattu, saataisiin oletettavasti samansuuntaisia tuloksia, joten tutkimuksen reliabelius on myös kunnossa.

Ositetulla otannalla on varmistettu, että otos edustaa perusjoukkoa. Valitsemalla tulostasoltaan erilaisia näytteitä, otos kattaa opinnäytetyön tarpeet. Näin pystyimme myös vertailemaan tulostasojen muutoksia eritasoisten näytteiden välillä. Viitealueen ulkopuolella olevia näytteitä oli yhteensä 26 kpl ja normaalitasoisia näytteitä 34 kpl. Otokokoa kasvattamalla työhön saatiin lisää luotettavuutta. Satunnaisvirheiden mahdollisuutta on pyritty pienentämään mahdollisimman pieneksi mm. huolellisella työskentelyllä. Kaikki kokeellisen osuuden työvaiheet on suoritettu työohjeiden mukaisesti. Näytteiden laatu on otettu huomioon analysoinnin jokaisessa vaiheessa ja kaikki poikkeamat on kirjattu ylös. Ennen analysointia on myös varmistettu näytteiden oikea lämpötila, eli näytteet olivat varmasti hyvin sulaneita. Analysointitulos olivat sallituissa rajoissa, joten saadut tulokset ovat luotettavia. Tulosten tulostaminen suoraan analysointilaitteelta pienentää inhimillisen virheen ja kirjausvirheen mahdollisuutta. Kaikki valitsemamme näytteet oli otettu Tampereen yliopistollisessa keskussairaalassa (TAYS), eli ne eivät joutuneet kulkemaan pitkiä välimatkoja ennen analysointia ja pakastamista. Näin ollen voimme olla varmoja että näytteisiin ei ole kohdistunut kuljetuksen aiheuttamia haittoja. Myös näytteiden toistuvalla pakastamisella on vältytty.

Opinnäytetyössä on myös kiinnitetty huomiota seikkoihin jotka voivat vaikuttaa luotettavuuteen laskevasti. Koska analysaattoreita oli laboratorioissa kolme kappaletta, ja sulatuksen jälkeisen analysoinnin teimme vain yhdellä hyytymisanalysaattorilla, emme voi olla varmoja mahdollisista analysaattoreiden välisistä tulostaseroista. Tutkimusasetelmamme ei anna vastausta siihen, onko kuljetuksella vaikutusta näytteen laatuun, sillä kuljetuksen aikana ilmeneviä virhelähteitä (esim. sulaminen ja lämpötilanvaihtelut) ei esiinny otoksessa. Otokseen olisi myös voinut valita enemmän viitearvojen rajoilla olevia näytteitä, jotta kliinisesti merkittävien muutosten määrää olisi mahdollisesti saatu kasvatettua. Yhtenä mahdollisena virhelähteenä on myös se, että näytteiden sulatusaika vaihteli ja ei ollut nopein mahdollinen. Vesihaude saattaisi olla lämpökaappia tehokkaampi sulattaja, sillä lämmön jakautuminen olisi tasaisempaa.

Näytteiden preanalytiikan laadusta ei työssä voida olla täysin varmoja, sillä opinnäytetyön tekijät eivät osallistuneet näytteiden keräämiseen. Näytteenottajat eivät tieneet tutkimuksesta, jolloin tulos mukailee rutiinivaihtelua paremmin. Kaikki näytteenottajat olivat todennäköisesti laboratoriohoitajia, jolloin heillä kuitenkin on ammattitaito ottaa näytteet laadukkaasti huomioiden virhelähteet.

Opinnäytetyön teoreettisen viitekehysten luotettavuutta on varmistettu keräämällä tietoa laajasti erilaisista lähteistä. Lähteinä on pyritty käyttämään mahdollisimman tuoreita julkaisuja, mutta mukana on myös vanhempaa tietoa. Eri lähteistä saatua tietoa on myös vertailtu keskenään, esimerkiksi eri laboratorioiden P-APTT-näytteen käsittelytapoja on vertailtu. Lähteinä on myös käytetty hyödyksi useita ulkomaisia tutkimuksia ja artikkeleita.

Tutkimuksen eettisyyteen on kiinnitetty huomiota jokaisessa työvaiheessa. Henkilötiedot eivät missään työn vaiheessa ole päässeet esille valmiiseen työhön. Näytteet numeroitiin itse juoksevalla numerosarjalla, jolloin näytenumeroa eikä nimeä tarvinnut käyttää näytteiden identifioinnissa. Potilaille ei ole aiheutunut tutkimuksesta mitään ylimääräistä haittaa tai työtä, sillä näytteet olivat potilaista, joilta oli pyydetty P-APTT-tutkimus. Potilaista ei siis tarvinnut ottaa ylimääräistä putkea. Alkuperäinen tulos päättyi potilaan hoitavaan yksikköön normaalisti, eikä tutkimus hidastanut potilaan hoitoa.

11 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:lle P-APTT-näytteen säilyttämisestä. Työn konkreettisena tarkoituksena oli vertailla P-APTT-näytteen primaarituloksia pakastamisen jälkeisiin tuloksiin ja ottaa selville, ovatko mahdolliset tulostason muutokset merkittäviä. Vertailun tavoitteena oli saada vastaukset tutkimusongelmiin. Säilyykö plasmasta tehdyn APTT-näytteen tulostaso samana, jos se pakastetaan -20°C ja sulatetaan uusinta-analysointia varten? Vaikuttaako pakastusajan pituus -20°C :ssa saatuihin tuloksiin? Onko mahdollinen pakastuksen vaikutus tulostasollisesti merkittävä?

Saatavilla olleen tiedon ja aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella odotimme P-APTT-näytteen tulostason nousua, jos se on pakastettu -20°C :een. Adcockin ym (2012) artikkelissa on kuitenkin mainittu, että pakastaminen -20°C :een olisi sallittavissa, mikäli pakastusaika ei ylitä kahta viikkoa. Kaikki opinnäytetyössä tarkastellut laboratoriot ohjeistavat, että P-APTT-näytteen pakastaminen on sallittua.

Opinnäytetyöprosessin aikana saimme tutkimusongelmiimme vastaukset. Plasmasta tehdyn APTT-tutkimuksen tulostaso ei pysy täysin samana, jos se pakastetaan -20°C ja sulatetaan uusinta-analysointia varten. Pakastusajan pituus ei kuitenkaan tulostemme varjossa vaikuta tulostason muutokseen, ainakaan tutkimamme kahden viikon aikajaksolla. Vaikka pakastaminen saattaa vaikuttaa tulokseen, muutos ei suurimmassa osassa tapauksia ole kliinisesti merkittävä, sillä tulostaso pysyy samalla puolella viitearvoja kuin alkuperäinen tulos. Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella emme odottaneet hyytymisaikojen lyhentymistä, mutta saimme koetuksessamme myös tulokseksi lyhentyneitä aikoja. Keskimäärin hyytymisaika kuitenkin piteni (keskiarvo n. 2 sekuntia), joten muilta osin opinnäytetyön tulokset olivat samansuuntaisia kuin aikaisemmat tutkimustulokset. Tämän tutkimuksen perusteella laboratorioilla ei ole tarpeen muuttaa ohjeistuksiaan, vaan voidaan olettaa että P-APTT-näyte säilyy analysointikelppoisena -20°C :ssa ainakin kahteen viikkoon saakka.

Jälkikäteen mietittynä koestukseen olisi voinut ottaa mukaan enemmän viitearvojen rajoilla olevia näytteitä, jolloin kliinisesti merkittäviä muutoksia olisi voinut tulla enemmän. Toisaalta, vaikka tulostaso muuttuisikin esimerkiksi normaalista hieman kohonneeksi, ei se välttämättä aiheuttaisi potilaalle minkäänlaisia toimenpiteitä, sillä jokainen potilastilanne katsotaan erikseen ja omana tapauksenaan. Lisäksi saman näytteen laitteella ajettut rinnakkaiset tulokset voivat normaalistikin hieman vaihdella. Koestuksessamme rajusti muuttuneita tuloksia viitearvoissa olevilla näytteillä ei ollut, joten emme usko että raja-arvonäytteiden lisääminen otokseen olisi asiaa muuttanut. Suurimmat muutokset tulostasossa olivat näytteillä, joilla tulostaso oli alun perin jo korkea. Alkuperäiseen korkeaan APTT-tulokseen olisi jo reagoitu joka tapauksessa, joten näissä tapauksissa tulostason huomattavampi kohoaminen ei ole niin merkityksellinen kuin se olisi normaalitasoisissa näytteissä.

Plasman APTT -näytteitä pakastetaan usein nimenomaan kuljetusta varten. Opinnäytetyömme koestus ei kuitenkaan ota huomioon mahdollisia kuljetuksessa tapahtuvia epäkohtia, kuten näytteen sulaminen matkalla tai lämpötilan vaihtelut. Työssä käytetyt näytteet olivat pakastettuna lämpötilaseuratussa pakastimessa, eikä niitä siirrelty kesken tutkimuksen. Vaikka kuljetuksessakin käytetään lämpötilaseurantaa, voi oikeassa kuljetuksessa kuitenkin sattua asioita mitkä voivat vaikuttaa näytteeseen. Jatkotutkimusaiheena voisikin olla selvitys, vaikuttaako esimerkiksi näytteen osittainen sulaminen kesken pakastusjakson näytteen tulostasoon. Useat laboratoriot eivät ota kantaa pakastusjakson pituuteen, joten jatkotutkimusaiheena voisi olla myös se, että onko yli kahden viikon pakastaminen -20°C :ssa sallittavissa. Myös otoskooltaan laajemmat tutkimukset samasta aiheesta voisivat antaa lisäinformaatiota.

Opinnäytetyötä oli mielenkiintoista tehdä ja varsinkin tulostasovertailun tulokset kiinnostivat jo etukäteen. Kiinnitimme myös huomiota työtä tehdessämme näytteisiin, joiden plasmasta löytyi fibriinirihmaa. Tämä tarkoitti sitä, että näytteenotto ei todennäköisesti ollut sujunut ongelmitta ja potilaalle lähtenyt primääritulos oli jo alun perin virheellinen.

Keskeinen työnjako sujui hyvin ja opinnäytetyön teko eteni suunnitellusti. Työnteko yhdessä oli helppoa ja pystyimme käyttämään toistemme vahvuuksia avuksi työn eri vaiheissa. Opimme molemmat paljon, niin opinnäytetyön aiheesta kuin tieteellisen tekstin

kirjoittamisestakin. Oli mukavaa tehdä opinnäytetyötä, jossa saimme konkreettisia tuloksia jotka voivat hyödyttää laboratorioita ja potilaita.

Haluamme kiittää ylikemisti Riikka Rontua ja laboratorioesimies Marja-Leena Torkkia opinnäytetyöaiheesta. Kiitämme myös yleisesti Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen kliinisen kemian laboratoriota mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyön käytännön osuutensa heidän tiloissaan.

LÄHTEET

Adcock, D.M. 2009. Sample integrity and preanalytical variables. Teoksessa Preston, E., Olson, J.D., Kitchen, S. (toim.) Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Wiley-Blackwell.

Adcock, D.M., Lippi, G., Favaloro, E. 2012. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Tromb Hemost* 38 (6), 576-585.

Alesci, S., Borggrefe, M., Dempfe, CE. 2009. Effect of freezing method and storage at -20 °C and -70 °C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Trombosis research* 124 (1), 121-126.

BD Vacutainer®. 2003a. LabNotes. Luettu 13.9.2015

https://www.bd.com/vacutainer/labnotes/2003summer/did_you_know.asp

BD Vacutainer®. 2003b. Coagulation Specimen Collection Guide. Luettu 13.9.2015

<http://www.mc.vanderbilt.edu/documents/vpls/files/Coagulation%20Specimen%20Collection%20Guide.pdf>

Eklund, A. 2014. Hemostaasinäytteiden säilytysvertailu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Metropolia ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2014a. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen. Työohje. Tulostettu 30.9.2014.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2014b. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen. Tutkimusohje. Tulostettu 30.9.2014

Fimlab Laboratoriot Oy. 2014c. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen. Ohjekirja. Luettu 19.10.2014. http://www.fimlab.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;se-tid=6658;id=12330

Fimlab Laboratoriot Oy. 2015. Yritys. Luettu 30.9.2015.

http://www.laboratorio.fi/sivu.tmpl?sivu_id=138

Fritsma, M., Fritsma, G. 2012. Normal Hemostasis and Coagulation. Teoksessa Rodak, B., Fritsma, G., Keohane, E. Hematology Clinical Principles and Applications. 4th Edition. China: Saunders, and imprint of Elsevier Inc.

Hatton, C., Hughes-Jones, N., Hay, D., Keeling, D. 2013. Haematology Lecture Notes. 9th Edition. Malaysia: Wiley- Blackwell.

Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri, Huslab. 2013. Näytteenotto hyytymistutkimuksia varten. Toimintaohje. Luettu 17.12.2014. http://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja

Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri, Huslab. 2014. Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen, plasmasta. Ohjekirja. Luettu. 19.10.2014. <http://huslab.fi/ohje-kirja/2783.html>

Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri, Huslab. 2015 Trombosyytit, funktiotutkimus PFA –laitteella, verestä. Ohjekirja. Luettu. 13.8.2015.

<http://huslab.fi/ohjekirja/8076.html>

Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2009. Tutki ja Kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Hoffbrand, A.V., Moss, P.A.H. 2012. Essential Haematology. 6th Edition. Singapore: Wiley-Blackwell.

Stago (Diagnostica Stago, Inc.) 2006. STA-R Evolution[®]. Reference manual.

Stago (Diagnostica Stago, Inc.) 2011. PTT Automate (APTT-tutkimuksen reagenssi). Reagenssiohje.

Howard, M., Hamilton, P. 2013. Hematology, and Illustrated Colour Text. 4th Edition. China: Churchill Livingstone Elsevier.

Itä-Suomen laboriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä, Islab. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen. Ohjekirja. Luettu 3.3.2015.

<https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=700>

Javela, K. 2011. Hemostaasitutkimusten preanalytiikka ja analytiikan ongelmat. SKKY:n ja Sairaalakemistit Ry:n koulutuspäivä 24.3.2011.

Javela, K. 2015. Hemostaasitutkimusten preanalytiikka. Moodi, 1/2015, 22-23.

Joutsu-Korhonen, L., Koski, T. 2010. Hemostaasin tutkimukset. Teoksessa Niemelä, O., Pulkki, K. (toim.) Laborioliäketiede Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Kananen, J. 2008. Kvantti: Kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylä: Jyväskylän yliopistopaino.

Karolinska Universitetslaboratoriet. 2015. Aktiverad partiell tromboplastintid. Provtagnings anvisningar. Luettu 12.3.2015

<http://www.karolinska.se/KUL/Alla-anvisningar/Anvisning/8975>

Kitchen, S & Makris, M. 2004. Laboratory tests of hemostasis. Teoksessa O'Shaughnessy, D., Makris, M., Lillicrap, D. (toim.) Practical Hemostasis and Thrombosis. Blackwell Publishing.

Pohjois-Suomen laboriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä, Nordlab. 2014. Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen, plasmasta. Ohjekirja. Luettu 3.3.2015.

<http://oyslab.fi/ohjekirja/2783.html>

Lassila, R. 2015. Veren hyytyminen ja fibrinolyysi. Teoksessa Porkka, K., Lassila, R., Remes, K & Savolainen, E-R. Veritaudit. 4. uudistettu painos. Helsinki: © Kustannus Oy Duodecim.

Rao, LV., Okorodudu AO., Petersen, JR., Elghetany, MT. 2000. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. ClinChimActa.

Rizzo, F., Papasouliotis, K., Crawford, E., Dodkin, S., Cue, S. 2008. Measurement of prothrombin time and activated partial thromboplastin time on canine citrated plasma samples following different storage conditions. Veterinary science, 85 (1), 166-170.

Rontu, R. 2015b. Pakastettuna saapuneen hyytymisnäytteen käsittely. Ohjeistus. Fimlab Laboratoriot Oy.

Rontu, R. Ylikemisti. 2015a. P-APTT opinnäytetyöstä. Sähköpostiviesti. riikka.rontu@fimlab.fi. Luettu 11.5.2015.

Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R., Porkka, K. (toim.) 2007. Veritaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Tapola, H. 2004. Näytteiden käsittely ja lähettäminen sekä kuljetus. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.

Tilastokeskus. 2001. Miten muutosprosentti lasketaan. Luettu 20.5.2015. http://www.stat.fi/tup/tietoaika/tilaajat/ta_10_01_melkas.html

Tuokko, S. 2010. Näytteiden esikäsittely ja säilytys. Teoksessa Niemelä, O., Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Tuokko, S., Rautajoki, A., Lehto, L. 2009. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteenottoa varten. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Valanne, A. Triolab Oy. 2011. Koulutusluentosarja. Fimlab Laboratoriot Oy.

Vanharanta, R. 2014. Hyytymis- ja vuototutkimusten preanalytiikka. Laboratoriolääketiedepäivienluentolyhenteet.

Varsinais-Suomen Sairaanhoidopiiri, Tykslab. 2014. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen. Ohjekirja. Luettu 3.3.2015. <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/2783.html>

Vilpo, J. 2010. Ilmari Palvan veritaudit. Kolmas uudistettu painos. Helsinki: MEDIVIL OY.

VITA Kliininen keskuslaboratorio. 2013. Tromboplastiiniaika, aktivoitu partiaalinen, plasmasta. Laboratoriokäsikirja. Luettu 12.3.2015 <http://vita.fi/laboratoriokasikirja/tutkimus/651>

Wang, Z., Du, X., Li, C., Ma, L., Sun, P., Cao, H., Lin, F., Ye, S., Xiao, X. 2014. Coagulation factors and inhibitors in thawed plasma stored at 1-6 °C for 5 days in China. Transfusion & Apheresis Science 50 (2), 274-280.

Wiwanitkit, J. 2001. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6 – month monitoring. *BMC Clinical Pathology* 1 (5).

Yhtyneet Medix laboratoriot. 2015. Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen. Laboratoriokäsikirja. Luettu 12.3.2015

http://www.medix.fi/tuotekuvaus_show.php?tuotenro=737

LIITTEET

LIITE 1. Vertailu P-APTT-näytteen säilytysohjeista sairaanhoitopiirien laboratorioden kesken. Koottu 13.3.2015.

	Fimlab	Huslab	Tykslab	Nordlab	Islab
Sentrifugointi	Säilyy koverenä tai plasmana n.8h	Säilyy koverenä tai plasmana 8h	4 tunnin sisällä	Tunnin sisällä	Säilyy koverenä 8h
Säilyy huoneenlämmössä	n.8h	8h	4h kokoverenä	4h plasmana	8h
Lähetys	Huoneenlämmössä	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 8h sisällä, muutoin eroteltuna ja pakastettuna	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 4h sisällä, muutoin eroteltuna ja pakastettuna	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 3h sisällä, muutoin pakastettuna	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 8h sisällä, muutoin eroteltuna ja pakastettuna
Pakastus	Voidaan pakastaa tarvittaessa	Näyte pakastetaan jos näytettä ei saada laboratorioon 8h kuluessa	Näyte pakastetaan jos näytettä ei saada laboratorioon 4h kuluessa	Plasma säilyy 1kk pakastettuna	Plasma säilyy -20°C:ssa 2 viikkoa ja -70°C:ssa 2 kuukautta
Jääkaappisäilytys	Ei suositella	Ei mainintaa	Ei mainintaa	Ei mainintaa	Ei mainintaa
Hepariinihoitopotilaan näyte	Analysointi 2h kuluessa	Ei mainintaa	Analysointi 2h kuluessa	Säilyy 2h huoneenlämmössä eroteltuna	Sentrifugoitava 1h sisällä ja analysoitava 4h sisällä

LIITE 2. Vertailu P-APTT-näytteen säilytysohjeista Yhtyneet Medix Laboratorion, VITA kliinisen keskuslaboratorion ja Karolinska Universitetslaboratorietin kesken. Koottu 13.3.2015.

	Yhtyneet Medix Laboratoriot	VITA kliininen keskuslaboratorio	Karolinska Universitetslaboratoriet
Sentrifugointi	Sentrifugointi sitten kun näyte saapuu	Säilyy kokoverenä 8h	30 min kuluessa näytteenotosta
Säilyy huoneenlämmössä	Ei mainintaa. Säilytys pakastettuna	8h	4h
Lähetys	Eroteltuna ja pakastettuna	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 8h sisällä, muutoin eroteltuna ja pakastettuna	Huoneenlämmössä jos analysointi suoritetaan 4h sisällä
Pakastus	Säilytys ja lähetys pakastettuna	Näyte pakastetaan jos näytettä ei saada laboratorioon 8h kuluessa	Jos säilytysaika ylittää 4h, plasma pakastetaan
Jääkaappisäilytys	Ei mainintaa	Ei mainintaa	Ei mainintaa
Hepariinihoitopotilaan näyte	Ei mainintaa	Ei mainintaa	Näyte oltava laboratoriossa 1h kuluessa

LIITE 3. P-APTT-näytteen säilyvyyden koestus, 1-4 vuorokautta -20°C:ssa

P-APTT- näytteet 1-4 vuorokautta

Näyte	Pakastusaika	Ennen	Jälkeen	Ero yksik.	Ero%	Huomiot	Muutos merkittävä viitearvoihin nähden
1	4 vrk	44	47	3	7 %		Ei
2	4 vrk	42	44	2	5 %	Fibriinirihmaa	Ei
3	4 vrk	30	30	0	0 %		Ei
4	4 vrk	31	32	1	3 %		Ei
5	4 vrk	23	24	1	4 %		Ei
6	4 vrk	63	51	-12	-19 %	Fibriinirihmaa	Ei
7	4 vrk	31	30	-1	-3 %		Ei
8	4 vrk	33	30	-3	-9 %		Ei
9	4 vrk	36	38	2	6 %	Fibriinirihmaa	Ei
10	3 vrk	93	90	-3	-3 %	Samea	Ei
11	3 vrk	110	112	2	2 %		Ei
12	2 vrk	84	109	25	30 %		Ei
13	1 vrk	30	30	0	0 %		Ei
14	1 vrk	36	42	6	17 %		Ei
15	1 vrk	25	25	0	0 %		Ei
16	1 vrk	30	30	0	0 %		Ei
17	1 vrk	25	27	2	8 %		Ei
18	1 vrk	29	31	2	7 %		Ei
19	1 vrk	28	31	3	11 %		Ei
20	1 vrk	30	32	2	7 %		Ei
21	1 vrk	86	106	20	23 %	Hemolyyttinen, samea	Ei
22	1 vrk	24	24	0	0 %	Hemolyyttinen	Ei
23	1 vrk	58	63	5	9 %		Ei
24	1 vrk	38	39	1	3 %		Ei
25	1 vrk	26	28	2	8 %		Ei
26	1 vrk	34	36	2	6 %		Kyllä
27	1 vrk	28	31	3	11 %	Fibriinirihmaa, hemolyyttinen	Ei
28	1 vrk	39	42	3	8 %		Ei
29	1 vrk	32	33	1	3 %		Ei
30	1 vrk	26	27	1	4 %		Ei

LIITE 4. P-APTT- näytteen säilyvyyden koestus, 7-14 vuorokautta -20°C:ssa

P-APTT- näytteet 7-14 vuorokautta

Näyte	Pakastusaika	Ennen	Jälkeen	Ero yksik.	Ero%	Huomiot	Muutos merkittävä viitearvoihin nähden
1	14 vrk	33	34	1	3 %		Ei
2	14 vrk	37	43	6	16 %		Ei
3	14 vrk	30	35	5	17 %	Fibriinirihmaa	Ei
4	14 vrk	31	32	1	3 %		Ei
5	14 vrk	31	33	2	6 %		Ei
6	14 vrk	28	30	2	7 %		Ei
7	14 vrk	38	41	3	8 %		Ei
8	14 vrk	yli 180	yli 180	#VALUE!	#VALUE!	Fibriinirihmaa	Ei
9	14 vrk	56	63	7	13 %		Ei
10	13 vrk	50	48	-2	-4 %	Hieman hemolyttinen	Ei
11	13 vrk	32	33	1	3 %		Ei
12	13 vrk	37	35	-2	-5 %		Kyllä
13	12 vrk	29	29	0	0 %		Ei
14	12 vrk	35	38	3	9 %		Kyllä
15	12 vrk	28	27	-1	-4 %		Ei
16	12 vrk	39	38	-1	-3 %		Ei
17	10 vrk	32	32	0	0 %		Ei
18	10 vrk	24	23	-1	-4 %	Sameahko, fibriinirihmaa	Ei
19	10 vrk	29	30	1	3 %		Ei
20	9 vrk	30	30	0	0 %		Ei
21	9 vrk	40	44	4	10 %		Ei
22	9 vrk	27	28	1	4 %		Ei
23	9 vrk	36	37	1	3 %	Fibriinirihmaa	Ei
24	9 vrk	26	26	0	0 %		Ei
25	8 vrk	40	43	3	8 %		Ei
26	8 vrk	59	60	1	2 %		Ei
27	7 vrk	49	50	1	2 %		Ei
28	7 vrk	45	49	4	9 %	Fibriinirihmaa	Ei
29	7 vrk	36	37	1	3 %	Samea, fibriinirihmaa	Ei
30	7 vrk	24	25	1	4 %		Ei