

Asta Eklund

Hemostaasinäytteiden säilytysvertailu

Plasman pakastuslämpötilamuutoksen ja geelijää-
kuljetuksen yhteys laboratoriotutkimustuloksiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Sosiaali- ja terveysala

Opinnäytetyö

09.01.2014

Tekijä Otsikko	Asta Eklund Hemostaasinäytteiden säilytysvertailu - Plasman pakastus- lämpötilamuutoksen ja geelijääkuljetuksen yhteys laboratorio- tutkimustuloksiin
Sivumäärä Aika	38 sivua + 5 liitettä 09.01.2014
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Sairaalakemisti Kaija Javela Lehtori Irma Niittymäki
<p>Työssä tehtiin labiilien hemostaasinäytteiden säilytysvertailu. Tarkoituksena oli selvittää, miten plasman pakastuslämpötilamuutos (-40 °C:sta -20 °C:een) näkyy laboratoriotutkimustuloksissa. Näytteet olivat pakkasessa korkeintaan kaksi viikkoa. Lisäksi selvitettiin geelijääkuljetuksen sopivuus -20°C:ssa pakastetuilla näytteillä. Työ toteutettiin Suomen Punaisen Ristin Veripalveluun ja se oli ajankohtainen tulossa olevan näytteiden kuljetuskäytännön muutoksen vuoksi.</p> <p>Työ toteutettiin kvantitatiivisena tutkimuksena. Näytemateriaalina käytettiin Veripalvelun potilasnäytteitä sekä henkilökunnalta kerättyjä näytteitä. Näytteitä oli yhteensä 17, joista tutkittavat analyytit analysoitiin. Tutkittavina analyytteina olivat hyytymistekijä VII (F VII, n=6), hyytymistekijä VIII (F VIII, n=7), proteiini S (n=9) ja lupusantikoagulantittekijä (n=9). Näytemateriaalissa oli viiterajoissa sekä viiterajojen ulkopuolella olevia näytteitä.</p> <p>Tutkimusasetelmana jokainen näyte jaettiin kolmeen putkeen, joista yhtä säilytettiin -40 °C:ssa (nykyinen pakastustapa) ja kahta säilytettiin -20 °C:ssa. Toinen -20 °C:ssa säilytetyistä putkista siirrettiin geelijäihin vuorokaudeksi ennen näytteiden analysointia. Tällä simuloitiin näytteiden kuljetusta asiakkaalta Veripalveluun. Saman näytteen kolme putkea analysoitiin samassa sarjassa samoilla reagensseilla. -20 °C:ssa säilytetyn putken ja -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytetyn putken tuloksia verrattiin -40 °C:ssa säilytetyn putken tulokseen.</p> <p>Tulokset osoittivat, että F VIII oli labiilein. F VIII:n aktiivisuus laski systemaattisesti -20 °C:n säilytyksessä, sekä yhdistäessä -20 °C:n säilytyksen geelijääkuljetukseen. F VIII:n tulos oli kuitenkin odotettu, koska se on yleisesti tunnettu labiili tekijä. Muut analyytit pysyivät stabiileina sekä -20 °C:ssa, että yhdistäessä sen geelijääkuljetukseen.</p> <p>Johtopäätöksenä todettiin, että pakastuslämpötilan muutos vaikutti vain F VIII: tuloksiin. Prosentuaaliset muutokset pysyivät kuitenkin analyytin kokonaisuutensa epävarmuuden rajoissa. Jatkotoimenpiteenä mietitään vielä F VIII aktiivisuuden laskun merkitystä potilaan diagnoosin kannalta. Geelijääkuljetuksen lisääminen ei huonontanut tuloksia.</p>	
Avainsanat	Hemostaasinäyte, pakastuslämpötilamuutos, säilytysvertailu, geelijääkuljetus

Author Title	Asta Eklund Storage comparison to the hemostasis samples - Effects of laboratory results by changing the plasma freezing temperature and transport it in gel ice to the laboratory
Number of Pages Date	38 pages + 5 appendices 9 January 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Kaija Javela, Clinical Biochemist Irma Niittymäki, Senior Lecturer
<p>This study was made storage comparison to the labile hemostasis samples. In this study coagulation tests freezing temperature changed from -40 °C to -20 °C. Samples were in a freezer not more than two weeks. Goal was to figure out how hemostasis plasma samples behave in different freezing temperature and how the temperature effects on the laboratory test results. Purpose was also to find out that if it is possible to freeze samples at -20 °C and transport those in gel ice to the investigative laboratory. This thesis was carried out for Finnish Red Cross Blood Service and it was timed due the upcoming changes of transportation of the samples.</p> <p>The work was carried out a quantitative study. The sample material was collected from Blood Service patient material as well as from the staff. The total number of samples was 17. Coagulation factor VII (F VII, n=6), factor VIII (F VIII, n7), S protein (n=9) and lupus anticoagulant (n=9) were measured from the samples. The results of samples were within as well as outside the limits of the reference range.</p> <p>Each sample were divided into three tubes. One tube was stored at -40 °C (current freezing method) and two tubes where stored at -20 °C. Another in -20 °C stored tube was transferred to gel ice a day before analysis of the samples. This was simulated a situation when samples are transported from customer to the Blood Service. Three tubes of the same sample were analyzed in the same series using the same reagents. The results stored at -20 °C and in -20 °C whit gel ice were compared with the results stored at -40 °C.</p> <p>The results showed that F VIII was most labile. F VIII activity dropped at -20 °C and at -20 °C whit gel ice. This was expected since it is commonly known as a labile factor. Other analytes were stable and results of samples stored at -20 °C and at -20 °C whit gel ice were comparable with samples stored at -40 °C.</p> <p>It was concluded that temperature change affected only on the F VIII results. However, the results stayed within the total measurement uncertainty. It will be discussed about the loss of F VIII activity and how that effects on making diagnose to the patient. Gel ice transportation did not worse the results.</p>	
Keywords	Hemostasis sample, temperature change, storage comparison, gel ice

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Hemostaasinäytteiden pakastus ja kuljetus	2
3	Opinnäytteen hemostaasianalyytit ja analysointimenetelmät	4
3.1	Tutkittavat analyytit hemostaasijärjestelmän osana	5
3.2	Analysointimenetelmät	8
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset	10
5	Hemostaasinäytteiden säilytystutkimuksia	11
6	Hemostaasinäytteiden säilytysvertailun toteutus	14
6.1	Esitutkimus ja tutkimusasetelma	15
6.2	Opinnäytteen tutkimusaineisto	15
6.3	Opinnäytteen käytännöntyön vaiheistus ja eettisyys	17
6.4	Tulosten käsittely	19
7	Tulokset	21
7.1	Näytteiden pakastus -20 °C:ssa	21
7.2	Näytteiden pakastus -20 °C:ssa ja säilytys geelijäissä	24
7.3	Tulosten tulkinta ja johtopäätökset	27
8	Tulosten luotettavuus	29
9	Pohdinta	30
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1. Aikaisemmat tutkimukset	
	Liite 2. Esitutkimuksen tulokset	
	Liite 3. Geelijääpakkauksen lämpötila	
	Liite 4. Opinnäytteen näytekohtaiset tulokset	
	Liite 5. Wilcoxonin testin tulokset	

1 Johdanto

Tässä opinnäytetyössä selvitetään hemostaasinäytteiden säilytysvertailun avulla pakastuslämpötilamuutoksen, sekä siihen liitettävän geelijääkuljetuksen yhteyttä laboratoriotutkimustuloksiin. Työ toteutetaan Suomen Punaisen Ristin Veripalveluun, Helsingin Kivihakaan. SPR Veripalvelun hemostaasilaboratorio toimii kansallisena referenssilaboratoriona (Vuoto- ja tukostaipumustutkimukset 2013). Siellä analysoidaan noin puolet koko maan hemostaasitutkimuksiin liittyvästä erikoisanalytiikasta. (Hemostaasinäytteiden preanalytiikasta 2011.)

Veripalvelu on voittoa tavoittelematon ja toiminnallisesti erillinen osa Suomen Punaista Ristiä. Koko maan veripalvelutoiminta on keskitetty Veripalveluun. Veripalvelun tehtävänä on hoitaa verenluovutusten järjestäminen, veren keräys, käsittely ja jakelu sairaaloihin. Lisäksi Veripalvelu tarjoaa asiakkaille erilaisia laboratoriopalveluita, kuten hemostaasinäytteiden analytiikkaan liittyviä laboratoriotutkimuksia. Hemostaasinäytteiden analyytit ovat labiileja ja niiden säilyvyyden kannalta on keskeistä noudattaa tutkivan laboratorion antamia näytteiden pakastus- ja kuljetusohjeita. (Siloaho 2000: 187; Mikä on Veripalvelu? 2013.)

Veripalvelulla on asiakkaita ympäri maan. Tämän vuoksi hemostaasinäytteiden pakastus- ja kuljetusolot ovat keskeisessä roolissa näytteiden laadun kannalta. Asiakas voi lähettää näytteet Veripalveluun kokoverenä tai esikäsiteltynä pakastettuna plasmana. Näytteiden tasalaatuisuuden takaamiseksi parasta olisi, että kaikki asiakkaat pystyisivät itse esikäsittelemään näytteet ja lähettämään plasmat pakastettuina. Nykyisen käytännön mukaan plasman pakastaminen vaatii vähintään -40 °C :n pakkasen, joita ei kaikilla asiakkailla ole. Kansainväliset suositukset kuitenkin viittaavat, että plasman lyhytaikainen pakastus -20 °C :n olisi riittävä takaamaan hemostaasinäytteiden analyyttien laadun. (Hemostaasinäytteiden preanalytiikasta 2011; Javela 2013a; NCCLS 2003: 6.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on Veripalvelun omana tutkimuksena selvittää, minkälainen yhteys plasman pakastusastemuutoksella (-40 °C :sta -20 °C :n pakastukseen) on tutkittavien hemostaasianalyyttien laboratoriotutkimustuloksiin, sekä sopiiko geelijääkuljetus -20 °C :ssa säilytettyjen näytteiden kuljetukseen asiakkaalta Veripalveluun. Opinnäytteen tavoitteena on todentaa, että pakastusmuutos on riittävä takaamaan he-

mostaasinäytteiden laadun. Tavoitteena on, että kaikilla Veripalvelun asiakkaila olisi mahdollisuus esikäsitellä näytteet itse.

2 Hemostaasinäytteiden pakastus ja kuljetus

Veripalveluun saapuu näytteitä ympäri Suomen. NCCLS:n (The National Committee for Clinical Laboratory Standards; nykyinen CLIS, Clinical and Laboratory Standards Institute) mukaan hemostaasinäytteet tulisi analysoida neljän tunnin kuluessa näytteenotosta (NCCLS 2003: 11). Kuljetusmatkojen vuoksi tämä on usein mahdotonta toteuttaa. Veripalvelussa näytteiden analysoinnille on asetettu kahdeksan tunnin aikaraja. Aikarajojen ylittävien näytteiden osalta on tehty kattavat tutkimukset ja Veripalvelu on määrittänyt omat viitevälit hemostaasinäytteiden tutkimuksille. (Javela 2013a; Vuoto- ja tukostaipumustutkimukset 2013.)

Asiakas voi lähettää verinäytteet Veripalveluun esikäsittelemättömänä kokoverenä tai esikäsiteltyinä plasmana. Kokoverenä lähetettävät hemostaasinäytteet saapuvat Veripalvelun validoimassa kuljetuspakkauksessa, joka pitää lämpötilan +8 ja +12 °C: n välillä kahdeksan tunnin ajan. Kokoverenä saapuvat näytteet esikäsitellään eli plasma erotellaan ja pakastetaan Veripalvelussa. Jos asiakas esikäsittelee itse näytteen, tulee asiakkaan pakastaa plasma vähintään -40 °C:n ja lähettää se Veripalveluun hiilihappotai geelijäissä. Veripalvelussa Veripalvelun tai asiakkaan esikäsittelemä näyte pakastetaan välittömästi -40 °C:n, jossa sitä voidaan säilyttää kuukausi ennen analysointia. Riippuen hemostaasitutkimuksesta luvatut vastausajat ovat kuitenkin 1–2 viikkoa. Pidempiaikainen säilytys tapahtuu -70 °C:ssa. (Hemostaasinäytteiden preanalytiikasta 2011: Javela 2013a.)

Yksi Veripalvelun suurimmista asiakkaista esikäsittelee itse näytteet ja pakastaa plasman -70 °C:n. Asiakas lähettää plasmanäytteet Veripalveluun TempFlex Lab® 24h -kylmävaraajilla pakatuissa styroksi -laatikossa. Kylmävaraaja ja näytteiden pakkaus on esitetty kuviossa 1. Kylmävaraajat on valmistettu biohajoavasta ja myrkyttömästä geelistä. Valmistajan mukaan TempFlex Lab® 24h -kylmävaraajat pystyvät ylläpitämään noin -20 °C:n kuljetuslämpötilan ja ne on tarkoitettu yön yli kestäville kuljetuksille (TempFlex® -kylmävaraajat 2013). Geelijääkuljetuksen toimivuus vähintään -40 °C:n pakastetuilla näytteillä on todettu toimivaksi Veripalvelussa vuonna 2013 tehdyssä tutkimuksessa. Tutkimuksessa geelijäät pakastettiin -20 °C:n, josta ne siirrettiin kulje-

tuslaatikkoon. Kylmävaraajapakkauksen lämpötilaa seurattiin mukana olleella lämpötila-anturalla. Lämpötilan todettiin pysyvän 24 tunnin aikana -12 ja -20 °C:n välillä. (Javela 2013b: TempFlex® -kylmävaraajat 2013.)



Kuvio 1. TempFlexLab® 24h -kylmävaraajageeli ja näytteiden pakkaus. Yksi geelijää asetetaan laatikon pohjalle, jonka päälle näytteet ja mahdollinen lämpötila-antura asetetaan. Kolme kylmägeeliä asetetaan näytteiden päällä olevan korokkeen päälle.

Laboratoriotulosten tasalaatuisuus halutaan varmistaa jokaisen näytteen kohdalla. Näytteiden kuljetusmatkat ja -ajat vaihtelevat maantieteellisten välimatkojen sekä kuljetuspalveluiden mukaan. Laboratoriotulosten tasalaatuisuuden varmistamiseksi parasta olisi, että kaikki Veripalvelun asiakkaat erottelisivat itse verinäytteet ja lähettäisivät ne pakastettuina. Koska kaikilla Veripalvelun asiakkailla ei ole käytössään vähintään -40 °C:n pakastimia, eivät kaikki pysty tätä toteuttamaan. (Javela 2013a.)

Kansainvälisten suositusten mukaan hemostaasinäytteiden plasman voi pakastaa -20 °C:n korkeintaan kahdeksi viikoksi ja -70 °C:n korkeintaan kuudeksi kuukaudeksi (NCCLS 2003: 5–6). NCCLS esittää vain konservatiivisia suosituksia, jotka perustuvat muutamiin asiantuntijamielipiteisiin tai julkaisuihin. Laboratorioiden tulee kuitenkin tehdä omat validoidut tutkimuksensa (NCCLS 2003: 11).

Veripalvelu pyrkii toimimaan kansainvälisten suositusten mukaan. Opinnäytetyön avulla selvitetään, onko plasman pakastaminen -20 °C:n riittävä näytteiden laadun takaamiseksi, sekä voiko pakastuksen yhdistää -40 °C:n pakastuksella toimivaksi todettuun geelijääkuljetukseen. Tällöin kaikki asiakkaat voisivat esikäsitellä itse näytteensä ja lähettää ne jatkossa geeli- tai hiilihappojäissä Veripalveluun. Veripalvelun nykyinen ja opinnäytetyön tavoitteena oleva hemostaasinäytteiden pakastus- ja kuljetuskäytäntö on esitettyinä taulukossa 1.

Taulukko 1. Hemostaasinäytteiden nykyinen (a ja b) ja tavoitteena oleva pakastus- ja kuljetuskäytäntö Veripalvelussa.

Pakastus- ja kuljetuskäytäntö	Näytemuoto	Näytteen esikäsittely asiakkaalla	Kuljetus Veripalveluun	Näytteen esikäsittely Veripalvelussa	Plasma-näytteen pakastus Veripalvelussa
Nykyinen käytäntö a)	Kokoverinäyte	-	SPR: n validoimassa kuljetuspakkauksessa.	Plasman erottelu ja jako viiteen putkeen.	-40°C
Nykyinen käytäntö b)	Plasma	Plasman jako viiteen putkeen ja pakastus vähintään -40 °C.	Hiilihappo- tai geelijäissä.	-	-40°C
Tavoite käytäntö	Plasma	Plasman jako viiteen putkeen ja pakastus vähintään -20 °C.	Hiilihappo- tai geelijäissä.	-	-40°C

3 Opinnäytteen hemostaasianalyytit ja analysointimenetelmät

Vuoto- ja tukosnäytetermeillä viitataan verenvuoto- tai tukostaipumustutkimuksiin, joiden yhteisnimityksenä käytetään hemostaasitutkimuksia. Hemostaasitutkimuksia tarvitaan esimerkiksi vuototaipumusten ja laskimotukostaipumusten selvittelyssä tai hyytymishäiriöiden diagnostiikassa ja hoidon laboratorioseurannassa (Joutsu-Korhonen – Koski 2010a: 275). Sillä myös suljetaan hyytymishäiriöiden mahdollisuutta ennen leikkausta (Mahlamäki 2004: 315). Tässä opinnäytetyössä käsitellään vuotonäytetutkimuksiin kuuluvia hyytymistekijöitä VII (F VII) ja VIII (F VIII) sekä tukosnäytetutkimuksiin kuuluvia proteiini S ja lupusantikoagulantti. F VIII valittiin innovaatioprojektina (Eklund –

Suuronen 2013) toteutetun esitutkimuksen tulosten pohjalta, jossa se todettiin labiilimaksi. F VII valittiin sen yleisesti tunnetun labiiliuden vuoksi. Proteiini S ja lupusantikoagulantti valittiin niiden analysointimenetelmän herkkyuden perusteella. (Javela 2013a.) Tutkittavat analyytit ja niihin liittyvien tekstissä esiintyvien tekijöiden osuus hemostaasijärjestelmässä on esitetty kuvioissa 2 ja 3.

3.1 Tutkittavat analyytit hemostaasijärjestelmän osana

Hemostaasijärjestelmällä viitataan verisuonen seinämän, trombosyyttien ja hyytymisjärjestelmän hyytymistekijöiden muodostamaan monimutkaiseen vuorovaikutusketjuun, jonka tarkoituksena on pysäyttää verenvuoto paikallisella hyytymällä eli trombilla, ja myöhemmin liuottaa se. Hemostaasi jaetaan kolmeen vaiheeseen, jossa primaarihemostaasi, hyytymisjärjestelmä ja fibrinolyysi toimivat samanaikaisesti. Hemostaasin aktivoituminen on luonnollinen seuraus verisuoneen kohdistuvassa vauriossa ja tällöin trombin muodostuminen on tärkeää. Trombin muodostuminen voi alkaa myös hemostaasin kannalta tarpeettomissa tilanteissa, kuten hyytymisjärjestelmän aktivoituessa tulehdussolujen tuottamien proteaasien ja kudostekijän vaikutuksesta. Luonnolliset antikoagulantit (antitrombiini III, proteiinit S ja C) ovat osa hemostaasia ja niiden tehtävänä on estää liiallista hyytymistä inaktivoimalla hyytymistekijöitä. (Koski 2010b: 159–160; Joutsu-Korhonen – Koski 2010a: 275; Kallio 2007: 595, 599. Lassila 2002: 7.)

Erilaiset perinnölliset tai hankinnaiset häiriöt vaikuttavat hemostaasijärjestelmän tekijöihin, jotka voivat johtaa verenvuoto- tai tukostaipumuksiin. Perinnöllisiä verenvuototai-pumuksen syitä ovat mm. von Willerandin tauti ja hemofiliat ja tukostaipumuksen syitä mm. luonnollisten antikoagulanttien vajaumus ja hyytymistekijä V: n (F V Leiden) mutaatio, jonka seurauksena proteiini C ei pysty inaktivoimaan sitä. Hankinnaisia vuotosyitä on mm. K-vitamiinin puutos ja maksasairaus ja tukossyitä raskaus, leikkaukset sekä fosfolipidivasta-aineet. (Koski 2010ab: 162, 165–166, 169, 173, 176.)

Maksan syntetisoima **F VII** käynnistää hyytymisjärjestelmän ulkoisen reitin kudostromboplastiinin (F III eli kudostekijä) vaikutuksesta. Ulkoisessa reitissä mitataan F II:n, F VII:n ja F X:n yhteisvaikutusta (tromboplastiiniaika, TT). Aktivoituneen F VII:n seurauksena F X aktivoituu. F VII tarvitsee toimiakseen K -vitamiinia. K -vitamiini vaikuttaa F VII:n karboksylaasiin, jossa tekijän aminopään glutaminaatit muutetaan Ca^{2+} :a ja fosfolipidejä sitoviksi gammakarboksylglutamaateiksi. Maksassa tapahtuva muuntuminen on välttämätön veren hyytymiselle ja tekijän kykyyn pilkkoa muita hyytymistekijöitä. Veren

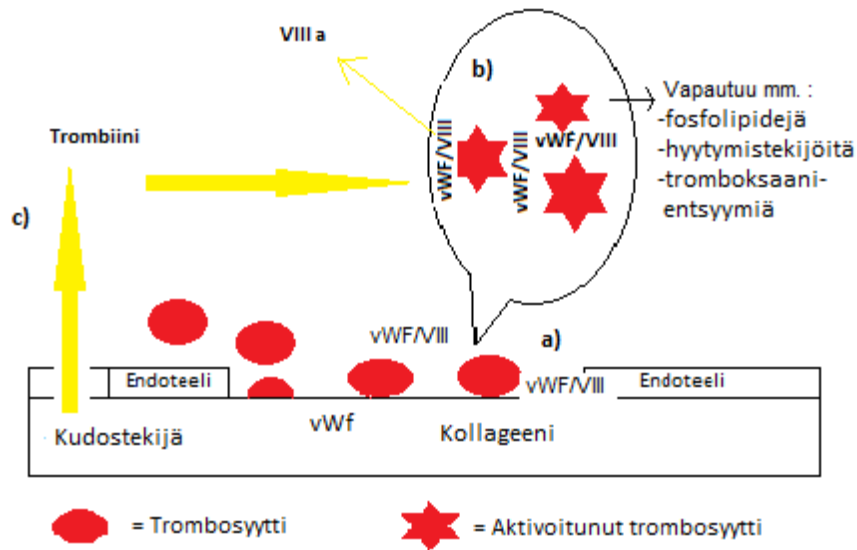
F VII:n aktiivisuuden laskulla osoitetaan mahdollinen maksavika tai K -vitamiinipuutos. (Kallio 2007: 597–598; Koski 2010b: 160; Joutsu-Korhonen – Koski 2010a: 279; Mäkipernaa 2013).

F VIII kuuluu hyytymisjärjestelmän sisäisen reitin tutkimukseen. Sisäistä reittiä mitataan seulontatutkimuksella (aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika APTT) F II:n, F V:n, F VIII:n, F IX:n, F X:n, F XI:n ja F XII:n osalta. F VIII toimii yhteistyössä Von Willebrand -tekijän (vWF) kanssa ja sitä tarvitaan verihitaleiden normaalissa toiminnassa. Endoteelisolujen ja megakaryosyyttien tuottamaa vWF esiintyy plasmassa, trombosyyteissä ja verisuonten pinnoissa (Castman – Toso – Rodeghiero 2005: 51–52). Primaarihemostaasissa trombosyytit ja verenkierron vWF kiinnittyvät verisuonivauriossa endoteelin alta paljastuvaan kollageenin ja takertuvat toisiinsa vWF:n avulla muodostaen hyytymän. Verenkierrossa vWF toimii F VIII:n kantajaproteiinina ja suojana. vWF:n kiinnittynyt F VIII vahvistaa muodostunutta hyytymää. Hyytymiskaskadin välituote, trombiini, aktivoi F VIII:n, jolloin sen side vWF:n katkeaa. Aktivoitunut F VIII toimii aktivoituneen F IX:n kofaktorina. F VIII:n vajaus tai puute viittaa hemofilia A:n ja von Willebrandin verenvuototauteihin. F VIII:n kohonnut aktiivisuustaso puolestaan lisää laskimotukostaipumuksen riskiä. (Laffan - Bradshaw 1995: 301–302; Lassila 2006: 6; Mäkipernaa 2006: 17, 19; Joutsu-Korhonen – Koski 2010ab: 277, 280, 286–287; Kallio 2007: 599.)

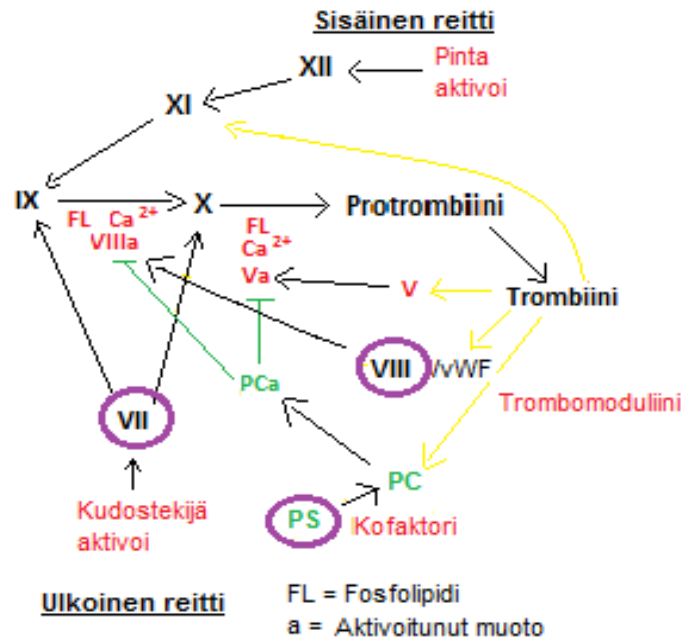
Proteiini S on K -vitamiinista riippuvainen maksan syntetisoima proteiini, joka toimii toisen luonnollisen antikoagulantin, proteiini C:n kofaktorina. Proteiini C:n aktivaatioon tarvitaan trombomoduliini-trombiini kompleksi. Trombomoduliini on endoteelisolujen pinnalla ilmenevä proteiini, joka muokkaa trombiinia (Sadler 1997). Aktivoitunut proteiini C estää hyytymistä hajottamalla aktivoituneita hyytymistekijöitä V ja VIII. (Koski 2010a: 176; Mäkipernaa 2013.)

Lupusanatikoagulantti on fosfolipidivasta-aine, joka on yksi keskeisemmistä tukostaipumuksen eli trombofilian hankinnaisista syistä. Fosfolipidivasta-aineiden vaikutusta ei täysin tunneta, mutta niiden tiedetään lisäävän tromboksaanientsyymiä, joka estää proteiini C:n ja S:n toimintaa. Tromboksaanientsyymi on verihitaleiden tuottama entsyymi, joka edistää kokkaroitumista (Pelkonen 2009: 2436). Laskimo- ja valtimotukosten lisäksi lupusanatikoagulantti esiintyy autoimmuunisairauksien (esimerkiksi LED:n eli DLE eli ihon punahukka) ja toistuvien keskenmenojen yhteydessä. Keskenmenonriski kasvaa, kun tromboositaipumus yhdessä hyytymisjärjestelmän aktivaation kanssa lisää

varhaisraskauden mikrotromboositaipumusta. (Hannuksela 2012; HE-3210: 1; Rasi 2013; Ulander – Kaaja – Tulppala 2002: 169.)



Kuvio 2. Verisuonivaurion myötä tapahtuva hemostaasijärjestelmän aktivoituminen käynnistyy, kun (kohta a) verisuonivauriossa endoteelin alta paljastuu kudostekijää (FIII), vWF ja kollageeniä. Primaarihemostaasissa vWF pysäyttää verivirran trombosyytit, jotka kiinnittyvät kollageeniin. Myös veren vWF/VIII kiinnittyy kollageeniin. Verisuonivauriokohdassa (kohta b) trombosyytit aktivoituvat kollageenin välittämän aktivaation myötä. vWF/ F VIII avulla trombosyytit kiinnittyvät toisiinsa. Verenkierron vWF:n mukana kulkenut F VIII tukee muodostuvaa hyytymää. Aktivoituneesta trombosyytistä vapautuu mm. fosfolipidejä, hyytymistekijöitä ja tromboksinaasientsyymiä. Samanaikaisesti primaarihemostaasin kanssa käynnistyy hyytymisjärjestelmä, kun kudostekijä paljastuu (kohta c). Väli tuotteena syntyy trombiini, jolloin sen sitos vWF:n katkeaa. (Mukaillen Joutsu-Korhonen – Koski 2010: 276; Koski 2010b: 160).



Kuvio 3. Hyytymisjärjestelmän aktivaatio trombiinin tuotantoon saakka. Opinnäytetyössä tutkittavat analyytit on rengastettuna. Pinta ja kudostekijä aktivoivat sisäisen ja ulkoisen hyytymisreitit. Aktivoituneena hyytymistekijät aktivoivat järjestelmän seuraavan tekijän. Punaisella merkityt ovat tekijöitä, joiden läsnä ollessa seuraava tekijä voi aktivoitua. Trombiini aktivoi keltaisella nuolella osoitetut tekijät. Vihreällä merkityt proteiini S ja C estävät liiallista hyytymistä ja osoittavat tekijät, joihin vaikutus koskee. (Mukaillen Koski 2010b: 162; Laffan – Bradshaw 1995: 300.)

3.2 Analysointimenetelmät

Opinnäytetyön näytteet analysoitiin STA Compact® ja Behring coagulation system® (BCS) -analysointilaitteilla. Analysointilaitteet tekevät hyytymisaikaan perustuvia, kromogeenisiä ja immunologisia mittauksia (HE-43134: 2; HE-43146: 1). Opinnäytetyössä tutkittujen analytyttien analysointilaitteet ja analysointimenetelmien periaatteet on tiivistettyinä taulukossa 2.

Yksittäisiä hyytymistekijöitä voidaan tutkia puutosplasman avulla tehtävillä spesifisillä hyytymistekijän aktiivisuuden mittauksilla. F VII ja F VIII analysoitiin hyytymisaikaan perustuvalla one stage -menetelmällä. One stage -menetelmä on yleisesti käytetty hyytymistekijöiden mittausmenetelmä. Menetelmässä käytetään spesifistä puutosplasmaa, jossa tutkittavan hyytymistekijän pitoisuus ei saa ylittää 1 U/ 100 ml ja muiden hyytymistekijöiden tasojen tulee olla normaaleja. Tutkittavan näytteen hyytymisaikaa verrataan vakiokuvaajaan, jolta saatu tulos ilmaistaan prosenttilukuna (HE-3219: 1; HE-3275: 4). Veripalvelussa F VIII:n vakiokuvaaja muodostetaan käyttämällä kaupallista

plasmaa, joka on vakioitu Maailman terveysjärjestö (World Health Organisation) WHO:n kansainvälistä referenssiä käyttäen (HE-3219: 1). Faktori VII vakiokuvaajassa käytetään kaupallista valmistetta (HE-3275: 3). (Mahlamäki 2004: 315, 318; Kitchen – Makris 2005: 14.)

Proteiini S:n analysoinnissa käytettiin hyytymisaikaan perustuvaa herkkää menetelmää, jossa mitataan sen kofaktoriaktiivisuutta. Näytteessä oleva proteiini S lisää reagenssina olevan aktivoitun proteiini C:n ja aktivoitun F V:n antikoagulanttivaikutusta, jolloin hyytymisaika pitenee. Proteiini S:n aktiivisuusprosentti määritetään vakiokuvaajalta. Veripalvelussa vakioinnissa käytetään kaupallista valmistetta. (HE-3289: 1, 3.)

Lupusantikoagulantin toteamisessa on suositeltavaa käyttää kahteen eri periaatteen perustuvaa mittausmenetelmää. Veripalvelussa käytettävistä lupusantikoagulantin mittausmenetelmistä opinnäytetyössä käytettiin APTT -menetelmää. Näytteen lupusantikoagulantin pitoisuuden mittaaminen perustuu koeputkessa tapahtuvaan reaktioon, jossa näytteen lupusantikoagulantti pidentää hyytymisaikaa vaikuttamalla fosfolipideistä riippuvaisten hyytymistekijöiden toimintaan. APTT -menetelmässä tutkittavan näytteen ja normaaliplasman seosta verrataan normaaliplasman tulokseen, joiden suhde lasketaan. Jos asetettu raja-arvo (cut off 1,15) ylittyy, on näytteen tulos positiivinen. (HE-3210: 1; Watson 2005: 134.)

F VII:n, proteiini S:n ja lupusantikoagulantin määrittäminen tehtiin STA-pact -analysaattorilla. STA Compact:n hyytymisaikaan perustuva mittaus pohjautuu plasman viskositeetin lisäykseen. Analysaattori pipetoi näytteen kyvetiin. Kyvetissä oleva kuula liikkuu tasaisella nopeudella sähkömagneettisen kentän vaikutuksesta. Kun kyvetiin lisätään hyytymisen käynnistävää reagenssia, plasman viskositeetti lisääntyy ja kuulan liike hidastuu. Näytteen hyytymisaika, ns. end-point hetki, määritetään kuulan värähtelytaajuuden vähenemisen muutoksesta, jonka tulosta verrataan vakiokuvaajaan. (HE-43146: 1; Diagnostica STAGO principle of clot detection 2007: Laffan – Bradshaw 1995: 306.)

F VIII määrittäminen tehtiin BCS -analysaattorilla. BCS -analysaattorin mittausyksikkö koostuu kyvetit sisältävästä roottorista sekä fotometrisestä osasta. Analysaattori pipetoi näytteet ja reagenssit kyvetiin, jossa ne sekoittuvat ja inkuboituvat. Hyytymisaika mitataan fotometrisesti sameuden lisäämisenä. Hyytymisaikaa verrataan vakiokuvaajaan. (HE-43134: 3.)

Taulukko 2. Analyytti, analysaattori ja menetelmä.

Tutkimus	Analysaattori	Menetelmä
FVII	STA Compact®	One-stage -menetelmä. Näytteen hyytymisaikaa verrataan määritettyyn vakiokuvaajaan. (HE-3275:4.)
FVIII	BCS®	One-stage -menetelmä. Näytteen hyytymisaikaa verrataan määritettyyn vakiokuvaajaan. (HE-3219: 1.)
Proteiini S	STA Compact®	Hyytymisaikaan perustuva menetelmä. Perustuu proteiini S:n kofaktoriaktiivisuuteen, joka pidentää mitattavaa hyytymisaikaa. (HE-3289: 1,3.)
Lupusantikoa-gulantti	STA Compact®	APTT -menetelmä. Verrataan näytteen ja normaaliplasma seoksen hyytymisaikaa normaaliplasman hyytymisaikaan. Reagenssi on herkkä fosfolipidivasta-aineiden vaikutukselle. (HE-3210: 1.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyössä tehdään säilytysvertailu hemostaasinäytteille. Tarkoituksena on selvittää minkälainen yhteys plasman pakastuslämpötilamuutoksella ja siihen yhdistettävällä geelijääkuljetuksella on hemostaasinäytteiden analyyttien laboratoriotutkimustuloksiin. Opinnäytetyössä arvioidaan näytteiden -20 °C:n pakastusta, sekä sen sopivuutta geelijääkuljetukseen, verrattuna nykyiseen -40 °C:n pakastukseen. Vertailtavat tekijät on esitetty taulukossa 3.

Työn tavoitteena on validoida käyttöön plasman -20 °C:n pakastus nykyisen -40 °C:n pakastuksen rinnalle. Tällöin kaikilla Veripalvelun asiakkailla on mahdollisuus esikäsittää itse näytteet, pakastaa plasmat -20 °C:n ja lähettää ne Veripalveluun hiilihappo-, tai geelijääkuljetuksella. Näin kokoverenä lähetettävien näytteiden maantieteelliset mit-

tasuhteiden asettamat haasteet saataisiin poistettua. Työssä hyödynsaajana ovat Veri-palvelu, heidän asiakkaansa sekä potilas.

Opinnäytetyön tehtävänä on vastata tutkimuskysymyksiin:

- Mitä muutoksia plasman korkeintaan kahden viikon pakastus -20 °C : ssa aiheuttaa tutkittavien hemostaasinäytteiden analyyttien tuloksiin, kun sitä verrataan nykyiseen pakastuskäytäntöön (pakastus -40 °C)?
- Mitä muutoksia (verrattaessa nykyiseen käytäntöön) tapahtuu, kun hemostaasinäytteiden plasman -20 °C :n pakastaminen yhdistetään geelijääkuljetukseen?

Taulukko 3. Opinnäytetyössä vertailtavat tekijät.

Mitä verrataan?	Mihin verrataan?	Mitä analyyttejä tutkitaan?
-20 °C : n pakastus	-40 °C :n pakastukseen.	F VII, F VIII, proteiini S ja lupusantikoagulantti.
-20 °C : n pakastus yhdistettynä geelijääkuljetukseen.	-40 °C :n pakastukseen.	F VII, F VIII, proteiini S ja lupusantikoagulantti.

5 Hemostaasinäytteiden säilytystutkimuksia

Tähän kappaleeseen on koottu muutamia opinnäytetyön tutkimukseen liittyviä aikaisempia tutkimuksia aiheesta. Tutkimukset sekä niiden keskeisimmät tulokset on tiivistettyä liitteessä 1.

Aikaisemmat tutkimukset antavat viitteitä, mutta niitä ei voida täysin soveltaa tähän opinnäytetyöhön, sillä muissa tutkimuksissa on käytetty viiterajoissa olevia näytteitä, eikä aikaisemmista tutkimuksista ole huomioitu tutkimusmenetelmiä ja -asetelmia eikä näytteiden preanalyyttisiä tekijöitä. Lähtökohta opinnäytetyön toteutukselle on peräisin kansainvälisistä suosituksista (NCCLS), joka ohjeistaa, että hemostaasinäytteitä voi säilyttää -20 °C :ssa kahden viikon ajan (NCCLS 2003: 5–6). NCCLS:n tutkimusmateriaalia ei ole saatavilla.

Vuonna 1993 Plumhoff tutkimusryhmineen tutki erilaisten käsittely- ja säilytysolosuhteiden vaikutusta hemostaasinäytteisiin. Tutkimuksessa plasmanäytteitä säilytettiin huoneenlämmössä, +4 °C:ssa, -20 °C:ssa ja -70 °C:ssa. -20 °C:ssa ja -70 °C:ssa säilytetyt F II, F V, F VII, F VIII ja F X tutkittiin seitsemän ja 14 päivän säilytyksen jälkeen pakastuksesta. Lisäksi tutkittiin aktivoitu partiaallinen trombiiniaika (APTT) ja protrombiiniaika (PT) eli kotimaiselta nimitykseltä trompoblastiiniaika TT (Halinen – Lassila 2000: 160). Plasmanäytteiden -20 °C:n ja -70 °C:n pakastuksen osalta Plumhoff ym. totesivat, että 14 päivän pakastus ei vaikuttanut F II:n, F VII:n ja F X:n aktiivisuuksiin. Seitsemän päivän säilytyksen jälkeen F V:n aktiivisuus laski noin 20 % -20 °C:n pakastuksessa, ja -70 °C:ssa noin 10 %. Kaikkein labiilein oli F VIII, jonka aktiivisuus kolmen päivän säilytyksen jälkeen laski -20 °C:n pakastuksessa noin 40 % ja -70 °C:ssa noin 20 %. PT: n ja APTT: n osalta tutkimus osoitti, että -20 °C:n pakastus säilyi lähtötasolla 10 päivän ajan, jonka jälkeen hyytymisaika alkoi pidentyä. -70 °C:n pakastuksessa PT ja APTT pysyivät stabiileina. (Plumhoff – Thompson – Fisher – Bowie – Nichols 1993: 866.)

Vuonna 2000 Woodhams tutkimusryhmänsä kanssa tutki veren hyytymismekanismiin vaikuttavia proteiineja eri pakastusolosuhteissa. He tutkivat muun muassa F II, F V, F VI, F VIII, F IX, F X, F XI, F XII, proteiini C, proteiini S, antitrombiini III ja von Willebrand -faktoria. Näytteenä käytettiin kuuden terveen henkilön sitraattiplasmaa, jota jokaiselta kerättiin noin 600 ml. Tutkimuksessa plasma jaettiin 1,5 ml:n mikroputkiin (1ml näytettä) ja 5 ml:n putkiin (3 ml näytettä). Mikroputkia säilöttiin -74 °C:n ja -24 °C:n pakasteessa. Osa näytteistä pikajäädettiin -75 celsiusasteessa ja säilytettiin -24 °C:ssa. 5 ml:n putket säilöttiin -74 °C:n ja -24 °C:n pakasteeseen. Jokaisessa säilytysolosuhteessa oli noin 100 putkea plasmaa. Tutkittavat analyytit analysoitiin nollahetkellä, kahden viikon ja kuukauden pakastuksen jälkeen sekä kerran kuukaudessa 24 kuukautta kestäneen tutkimuksen ajan. Tulosten tulkinnassa vertailuna käytettiin nollahetkellä (tuorenäyte) saatuja analyyttien tuloksia. Tuloksissa huomioitiin mikroputkien ja 5 ml putkien vaikutus. (Woodhams – Girardot – Blanco – Colesse – Gourmelin 2000: 229–235.)

Woodhams ym. saivat korkeintaan 5 %:n ja korkeintaan 10 %:n muutoksia nollanäytteestä saatuihin arvoihin nähden. Tutkimuksissa todettiin, että kaikki tutkimuksen kohteena olleet analyytit säilyivät stabiileina vähintään kolmen kuukauden ajan jokaisessa pakastusolosuhteessa ja säilytysmateriaalissa. -74 °C:n pakastuksessa mikroputken ja 5 ml:n putken välillä ei havaittu eroja ja analyyteistä herkimät, F VIII ja F XI, säilyivät

stabiileina vähintään kuusi kuukautta (korkeintaan 5 %:n muutos nollassoon). -24 °C:n pakastuksessa herkimvät olivat trompoblastiiniaika (TT) ja F VIII, jotka pysyivät stabiileina kolme kuukautta ja luonnollisista antikoagulanteista proteiini S, joka pysyi stabiilina kuusi kuukautta (korkeintaan 5 %:n muutos nollassoon). -24 °C:n pakastuksessa havaittiin myös, että mikroputkissa analyytit säilyivät stabiileina kauemmin kuin 5 ml:n putkissa. Kahden viikon pakastuksen jälkeen todettiin, että -24 °C:n pakastuksessa APTT -aika pitenee ja tämä oli yksi labiilein parametri tutkimuksessa. Pikajäädytyksen -75 °C:ssa ja säilytyksen -24 °C:ssa ei todettu vaikuttavan tuloksiin. Pohdinnassa tutkijat totesivat, että tutkimus voi toimia vain ohjeena hyytymisjärjestelmän analyyttien säilymisessä. Tutkimuksen luonne ei vastannut normaalia potilasnäytteiden keräystä ja näytteet olivat peräisin terveiltä henkilöiltä. (Woodhams ym. 2000: 229–235.)

Das Gupta ja Sharma tekivät Intiassa vuonna 2011 tutkimuksen, jossa he tutkivat 50 terveen Intialaisen plasman proteiini S, proteiini C ja antitrombiini III -tasot ennen (nollanäyte) ja jälkeen pakastuksen -25 °C:ssa kahden ja neljän viikon jälkeen. Eliminoidakseen pakastuksen ja sulatuksen vaikutuksen he tutkivat lisänäytteinä 20 terveen aikuisen plasmanäytteet ennen -25 °C:n pakastusta sekä yhden päivän pakastuksen jälkeen. 20 terveen aikuisen näytteistä tehtiin rinnakkaiset pakastukset. Sulatuksen vaikutusta arvioitiin sulattamalla rinnakkaisista näytteistä toinen viisi minuuttia ja toinen näyte 15 minuuttia +37 °C:n vesihauteessa. Tutkimuksen tuloksissa verrattiin nollanäytettä ja kahden viikon pakastusta, nollanäytettä ja neljän viikon pakastusta sekä kahden viikon ja neljän viikon pakastusta. Tutkimus osoitti, että kaikkien antikoagulanttien tasot laskivat pakastusjaksojen aikana. Herkin oli proteiini S, jonka näytteiden keskiarvon taso laski kahden viikon pakastuksen jälkeen 11,4 % ja neljän viikon jälkeen 20,5 % verrattaessa nollanäytteiden keskiarvoon. Huomioitavaa oli myös, että 4 % proteiini S:n (n = 48) määrytyksistä laski alle viiterajan kahden viikon pakastuksen jälkeen. Tutkiesaan yhden vuorokauden pakastuksen ja sulatuksen vaikutusta tulostaso todettiin hyväksi. Vain proteiini S:n osalta havaittiin pieni tulostason lasku, mutta yhdenkään näytteen tulos ei laskenut alle viiterajojen. (Das Gupta – Sharma 2011: 51–54.)

Javela tutki geelijään sopivuuden Veripalvelussa keväällä 2013. Tutkimuksessa potilasnäytteiden plasma jaettiin kahteen putkeen ja näytteitä säilytettiin -40 °C:n pakastuksessa. Rinnakkaisnäytteistä toinen siirrettiin -20 celsiusasteessa jäädytettuihin geelijäihin, joissa näytteet olivat korkeintaan 24 tuntia. Geelijäiden kuljetuslaatikon lämpötilaa seurattiin lämpöanturalla. Lämpötilaseurannassa geelijäiden todettiin pitävän kuljetuslaatikko -12 ja -20 °C:n välillä. Näytteet analysoitiin ja tuloksia verrattiin keskenään.

Näytteiden tuloksissa ei havaittu merkitseviä muutoksia ja geelijääkuljetus todettiin sopivaksi menetelmäksi. (Javela 2013b.)

Yhteenvetona aikaisemmista tutkimuksista, kansainväliset suositukset (2003) ja Woodhams ym. (2000) puoltavat kaikkien tekijöiden pysymistä stabiileina. Woodhams ym. (2000) tutkimuksessa F VIII, F V ja proteiini S todettiin labiilimmiksi analyyteiksi. Heidän tutkimuksessa APTT -aika piteni kahden viikon pakastuksen kohdalla $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastuksessa. Das Gupta ja Sharma (2011) toteavat proteiini S:n labiileimmaksi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastuksessa. Plumhoff ym (1993) tutkimuksessa APTT -aika piteni 10 vuorokauden kohdalla $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastuksessa. Kansainvälisistä suosituksista ei ole saatavilla tutkimusmateriaalia. Woodhams ym. (2000) tutkimuksessa näytteet kerättiin kuudelta terveeltä henkilöltä eikä tutkimuksen luonne vastaa normaalia potilasnäytteiden analysointia. Plumhoff ym. (1993) tutkimuksesta ei ole tiedossa näytemääriä. Das Guptan ja Sharman (2011) tutkimuksessa oli mukana 50 terveen henkilön näytteet, joista 48:sta tutkittiin proteiini S. Kaikissa tutkimuksissa, eri-ikäisten näytteiden määritykset tehtiin omina sarjoina ja mittausepävarmuutta ei huomioitu.

Aiheeseen liittyvät aikaisemmat tutkimukset antavat viitteitä opinnäytteen tulosten odotuksista. Odotuksena on, että $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastuksessa analyyteistä labiilein on F VIII. Lupusantikoagulantin määrittämisessä käytetyn APTT -ajan odotetaan hiukan pitenevän, joskin lupusantikoagulanttitutkimuksessa käytettävä aPTT -reagenssi (herkkä fosfolipidille) on eri kuin julkaisuissa käytetty (Javela 2013a). Kaikkien analytytien oletetaan kuitenkin pysyvän hyväksyttävissä tasoissa. Geelijään osalta odotuksena on, että tulokset ovat samansuuntaisia kuin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n pakastettujen näytteiden tulokset.

6 Hemostaasinäytteiden säilytysvertailun toteutus

Opinnäytetyö toteutettiin SPR Veripalvelulle Helsinkiin. Veripalvelun työnhajaajana toimi sairaalakemisti Kaija Javela ja Metropolian ohjaajana lehtori Irma Niittymäki. Opinnäytetyön toteutusta varten haettiin tutkimuslupa opinnäytetyön suunnitelmalla. Opinnäytetyö toteutettiin syyskuu 2013 - tammikuu 2014 aikana, josta käytännöntyö ajoitui loka-marraskuulle.

Opinnäytetyössä pyrittiin käyttämään potilasnäytteitä, joilla oli kliinisesti merkitseviä viiterajojen ulkopuolisia tuloksia. Lisäksi työ pyrittiin toteuttamaan ääriolosuhteissa, eli

1) näytteiden pakastusaika oli lähellä 14 vuorokautta ja 2) siirretyt näytteet olivat geelijäissä vähintään 20 tuntia ennen analysointia. 14 vuorokauden pakastuksella viitataan kansainvälisiin suosituksiin ja geelijäissä säilytettävällä ajalla luotiin asetelma, jossa näytteen saapuminen Veripalveluun kestää yön yli. Käytännössä kuitenkin kyseisiä vaatimuksia ei pystytty täysin toteuttamaan. Tähän vaikuttivat mm. näytteiden saapumispäivät, reagenssimäärät, käytössä olleet analysointipäivät, analysaattoreiden vapautuminen ja henkilökunnan työt.

6.1 Esitutkimus ja tutkimusasetelma

Opinnäytetyön esitutkimus toteutettiin Metropolian Ammattikorkeakoulun bioanalytiikko-opiskelijoiden (Eklund – Suuronen) innovaatioprojektin muodossa kevät–syksy 2013 aikana. Innovaatioprojekti toteutettiin SPR Veripalvelulle Helsinkiin. Projektissa tutkittiin vuotonäytteiden F II, F V, F VII, F VIII sekä ristosetiinikofaktori eli von Willebrand-tekijä (vWFRCo). Esitutkimuksen F VII:n ja F VIII:n tulokset on esitetty liitteessä 2.

Esitutkimuksessa oli mukana 16 kokoverenä Veripalveluun saapunutta potilasnäytettä. Tutkimusasetelmana potilasnäytteiden plasmat jaettiin kolmeen ylimääräiseen eppendorf -putkeen. Näistä kaksi putkea pakastettiin -20 °C:n ja yksi putki -40 °C:n pakkaaseen. Valituista näytteistä toinen -20 °C:n pakastettu näyteputki siirrettiin TembFlex Lab® 24h -geelijäihin korkeintaan 24 tuntia ennen näytteiden analysointia. -20 °C:ssa pakastetut neljä kylmägeeliä asetettiin styroksilaatikkoon, joiden alimpien geelien väliin näytteet asetettiin. Esitutkimuksessa näytteet valittiin potilastulosten perusteella niin, että mukana oli viitearvojen ulkopuolella olevia näytteitä, joita F II:lla oli viidessä näytteessä, F V:lla kuudessa näytteessä, F VII:lla kuudessa näytteessä, F VIII:lla neljässä näytteessä, F X:lla kahdessa näytteessä ja ristosetiinikofaktorilla neljässä näytteessä. (Eklund – Suuronen 2013: 11–12.)

Esitutkimuksen tutkimusasetelma todettiin toimivaksi ja sitä käytettiin opinnäytteessä.

6.2 Opinnäytteen tutkimusaineisto

Opinnäytettä varten kerättiin yhteensä 18 potilasnäytettä ja kolme henkilökunnan näytettä. Näytteet kerättiin loka-marraskuun 2013 aikana. Kerätyistä näytteistä opinnäytetyöhön valittiin 11 potilasnäytettä ja kolme henkilökunnan näytettä. Henkilökunnan

näytteistä tehtiin kaksi eri sarjaa eli näytteet jaettiin kuuteen putkeen. Näistä kolme pakastettiin välittömästi esikäsittelyn jälkeen ja kolmea seisotettiin huoneenlämmössä aktiivisuuden laskun aikaansaamiseksi. Kaikkiaan analysoitujen näytteiden määrä oli siis 17. Kaikista näytteistä ei analysoitu kaikkia tutkittavia analyyttejä, vaan ne valikoitiin siten, että ensisijaisesti mukana oli normaalitason ulkopuolella olevia näytteitä.

Opinnäytteen analyttikohtaiset aineistomäärät ja niiden jakautuminen viiterajoihin ja viiterajojen ulkopuolelle on esitetty taulukossa 4. Taulukkoon on koottu myös näytteiden pakastus- ja geelijäissä säilytysajat.

Taulukko 4. Tutkimusaineiston jakauma.

Analyytti	Viiterajat	Näytemäärät			Pakastusaika pv (ka)	Aika geelijäissä h (ka)
		Yht.	Viiterajoissa	Viiterajojen ulkopuolella		
F VII	78 % - 155 %. (HE-3275: 5.)	6	4	2	9	22
F VIII	59 % - 131 % (HE-3219: 7.)	7	6	1	9	22
Proteiini S	Naiset 57 % - 103 %. Miehet 72 % - 139 %. (HE-3289: 5.)	9	6	3	11	24
Lupusanti-koagulantti	Negatiivinen \leq 1,15 Positiivinen $>$ 1,15 (reagenssieräkohtainen). (HE-3210: 4.)	9	9	0	12	24

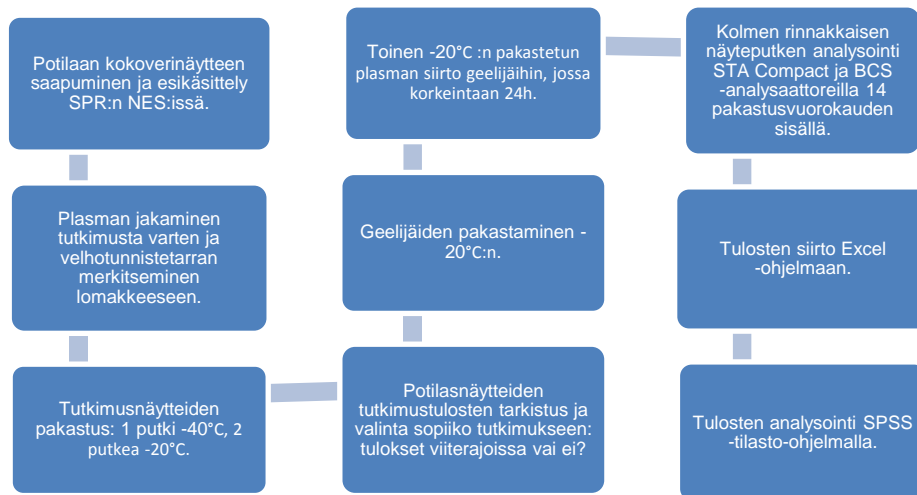
6.3 Opinnäytteen käytännöntyön vaiheistus ja eettisyys

Opinnäytetyön käytännöntyön osuus suoritettiin viikkojen 45–49 aikana (2013). Työssä tutkittiin kokoverenä saapuneita potilasnäytteitä sekä henkilökunnalta kerättyjä näytteitä.

Potilasnäytteillä toteutettu käytännöntyön toteutus on kuvattu kuviossa 4. Työ aloitettiin keräämällä potilasnäytteitä, joiden tutkimuspyyntönä oli jokin opinnäytetyössä tutkittavista analyyteistä. Potilasnäytteet kerättiin opinnäytetyön suunnitelmaan laaditun ohjeen mukaisesti näytteiden esikäsittelyosaston (NES) toimesta. Plasmanäytteet jaettiin kolmeen ylimääräiseen 1,5 ml eppendorf -putkeen, joissa oli vähintään 400 µl näytettä. Esitutkimuksen tavoin yksi putki pakastettiin -40 °C:n ja kaksi putkea -20 °C:n, joista toinen siirrettiin geelijäihin ennen analysointia. Esitutkimuksesta poiketen, yhden analysointikerran yhteydessä geelijäihin asetettiin lämpöantura. Anturalla varmistettiin geelijääpakkauksen lämpötila, joka 22,5 tunnin säilytyksen ajan pysyi -11 ja -20 °C:n välillä (ks. liite 3).

Analysointipäivänä näytteet sulatettiin normaalikäytännön mukaisesti viiden minuutin ajan +37 °C:n vesihauteessa ja analysoitiin välittömästi STA Compact® ja BCS® -analysaattorilla. Jokaisen näytteen kolme putkea analysoitiin samassa sarjassa samoilla reagensseilla.

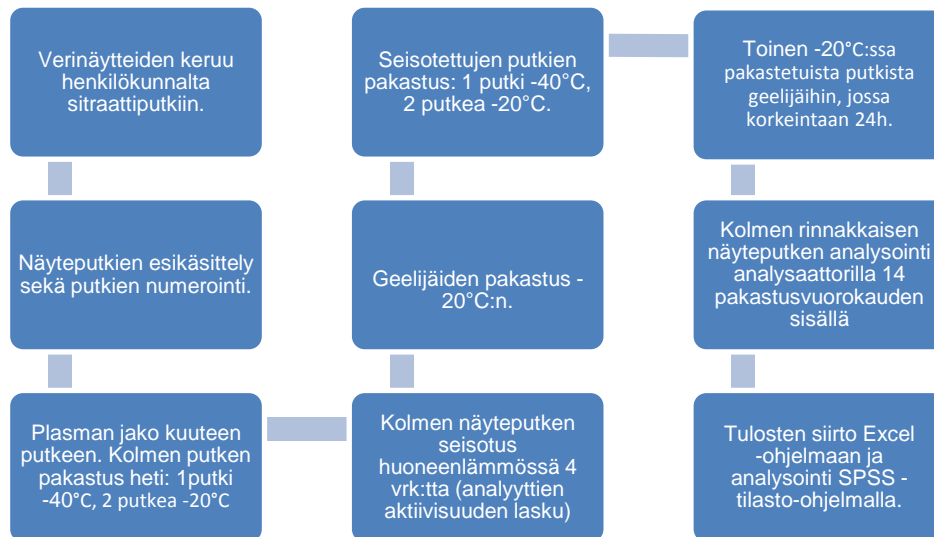
Työ toteutettiin Suomen Bioanalytikkoliitto ry:n eettisten ohjeiden mukaisesti. Niiden mukaan ensisijaista on potilaan hyvinvointi ja hänen oikeuksiensa kunnioittaminen laboratoriotutkimusprosessin kaikissa vaiheissa (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006). Tässä työssä Veripalvelussa käytettäviä potilaskohtaisia velhotunnistenumeroita käytettiin näytteiden keruussa. Niiden avulla tarkastettiin tutkimusta koskevien analyyttien analysointitulokset, joiden perusteella näytteet valikoitiin. Tämä oli välttämätöntä työn kannalta. Muissa vaiheissa potilasnäytteitä ja niistä analysoituja tuloksia käsiteltiin juoksevan numeroinnin mukaisesti.



Kuvio 4. Käytännöityn vaiheistus potilasnäytteen analysoinnissa.

Koska potilasnäytteitä keräämällä ei saatu tarpeeksi viiterajojen ulkopuolisia näytteitä, päätettiin viiterajat alittavia näytteitä valmistaa itse. Tätä varten näytteet kerättiin henkilökunnalta (n=3) opinnäytteen tekijän toimesta. Henkilökunnan näytteen käytännöityn vaiheistus on esitetty kuviossa 5. Näytteet valmistettiin seisottamalla plasmanäytteitä huoneenlämmössä neljä vuorokautta. Seisotusaika perustui Javelan ja Vahteran (1997) Veripalvelussa tekemään tutkimukseen, jossa hyytymistekijöiden aktiivisuuden tasoja seurattiin 12 tunnin ajan. Tutkimuksessa näytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa. (Javela – Vahtera 1997.) Tulosten perusteella aktiivisuuden muutos suhteutettiin huoneenlämmössä säilytykseen ja arvioitiin opinnäytteeseen sopiva seisotusaika.

Tulosten tarkastelua varten näytteen plasma jaettiin näytteenoton jälkeen kuuteen putkeen. Kolme putkea pakastettiin välittömästi haluttuihin pakastuslämpötiloihin. Kolme putkea seisotettiin huoneenlämmössä. Kaikki kuusi putkea analysoitiin samanaikaisesti, jolloin pystyttiin selvittämään aktiivisuuden prosentuaalinen lasku -40 asteen pakastuksessa. Tämä selvitettiin myöhemmin kerättäviä näytteitä varten. Toimenpiteellä F VII:n (n=2) aktiivisuus laski keskimäärin 10 %:a ja F VIII:n (n=2) keskimäärin 35 %:a. Proteiini S:n (n=1) aktiivisuus laski 63 %:a. Kaikkien analyttien aktiivisuudet laskivat, mutta vain proteiini S:n taso laski viiterajojen alapuolelle. Näytteen preanalyttisen yhteneväisyyden, aikarajan ja kustannusten vuoksi päätettiin, ettei henkilökunnan näytteitä kerätä enempää.



Kuvio 5. Käytännöntyön vaiheistus henkilökunnalta kerättyjen näytteiden analysoinnissa.

6.4 Tulosten käsittely

Tulokset käsiteltiin analyttikohtaisesti. Tutkittavien analyttien analysointitulokset kerättiin Microsoft Excel 2010 taulukkolaskentaohjelmaan. Tulokset analysoitiin kvantitatiivisesti SPSS (IBM SPSS Statistics 18) -tilasto-ohjelmalla. Tulosten käsittelystä sovitettiin yhdessä työelämäneustajan kanssa. Apuna käytettiin myös Metropolia Ammattikorkeakoulun tilasto-opettajaa sekä opetuksessa järjestettyjä tilaston työpajoja.

Tulosten käsittely pohjautui tutkimuskysymyksiin. Tutkimuskysymyksillä haluttiin selvittää, mitä muutoksia tapahtuu, kun näyteputket pakastetaan -20 °C :ssa ja, kun -20 °C :n pakastuksen yhdistää geelijääkuljetukseen. Tuloksia verrattiin -40 °C :ssa pakastettujen näyteputkien tuloksiin. Näitä selvitettiin kahden vertailun avulla, joista ensimmäisessä vertailtiin -20 °C :n pakastuksen tuloksia -40 °C :n pakastuksen tuloksiin ja toisessa vertailtiin -20 °C :n pakastuksen ja geelijäissä säilytettyjen näytteiden tuloksia -40 °C :n pakastuksen tuloksiin.

Jokaisesta tutkittavasta analyttistä laskettiin kolmen eri säilytysoloissa (-40 °C , -20 °C sekä -20 °C yhdistettynä geelijääsäilytykseen) olleiden sarjojen tunnusluvut, haluttujen vertailtavien sarjojen väliset näytekohdaiset eroprosentit sekä p-arvot. Tunnuslukuista tarkasteltiin keskiarvo, mediaani, keskihajonta, variaatiokerroin ja vaihteluväli (minimiarvo–maksimiarvo). Eroprosentit esitettiin analyttikohtaisissa eroprosenttikaavioissa, sekä yhteenvetona taulukossa. Eroprosenttien avulla selvitettiin, tapahtuuko näyt-

teiden analyysillä vertailtavissa säilytysoloissa systemaattista tulosten laskua tai nousua. Eroprosenttikaavioiden x-akselille merkittyjen -40 °C :ssa pakastettujen näyteputkien tuloksien perusteella pystyi myös tarkastelemaan viiterajoissa ja viiterajojen ulkopuolella olevien näytteiden käyttäytymistä vertailtavissa säilytysoloissa. Tutkimusten viiterajat on Veripalvelun määrittämiä (Vuoto- ja tukostaipumustutkimukset 2013).

Eroprosenttikaavioista huomioitiin myös Veripalvelun määrittämät analyttikohtaiset kokonaismittausepävarmuudet (HE-YO-001: 1–3). Kokonaismittausepävarmuudessa huomioidaan osatekijät, jotka aiheuttavat mittausten välistä hajontaa. Osatekijöinä on huomioitu potilaasta johtuva biologinen variaatio (mm. rasitus, ravinto, rotu, raskaus), näytteen preanalyttinen variaatio (mm. kuljetus, säilytys, näytteenottotekniikka) ja määrittämisen analyttinen variaatio (mm. työtavat, analyysilaitte, reagenssiera, vakio). Tässä työssä epävarmuuksilla arvioitiin mittaustulosten sallittua hajontaa. (Kouri ym. 2002: 139, 142.)

Sarjojen välistä tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin p-arvojen (exact sig.) avulla. P-arvo eli nollahypoteesin hylkäämisvirheen todennäköisyys laskettiin SPSS:llä vertailtujen sarjojen näytekohtaisista analysointi tuloksista. Laskennassa käytettiin Wilcoxonin järjestystestiä (Wilcoxon signed rank test). Wilcoxon valittiin, koska kyseessä oli kahden riippuvan otoksen eli saman henkilön kahden mittauksen välisen eron merkitsevyyden testaus ilman normaalijakaumaoletusta (Leskinen 2013: 4). Opinnäytetyössä H_0 -hypoteesi tarkoitti, että -20 °C :n pakastus tai -20 °C :n pakastus yhdessä geelijään kanssa ei vaikuta merkitsevästi analyttien tuloksiin ja vastahypoteesi H_1 , että -20 °C :n pakastus tai -20 °C :n pakastus yhdessä geelijään kanssa vaikutti merkitsevästi analyttien tulokseen. Hylkäämisvirheen rajaksi valittiin yleisesti käytetty 5 % merkitsevyytaso eli, jos p-arvo oli $\leq 0,05$ katsottiin eron olevan tilastollisesti merkitsevä ja H_0 -hypoteesi voitaisiin hylätä. Päätöksessä hylätä H_0 -hypoteesi ja ottaa käyttöön H_1 -hypoteesi, p-arvo kertoi päätökseen liittyvän erehtymisriskin todennäköisyyden. Yleisesti käytettyinä merkitsevyytasojen raja-arvoina käytetään:

1. Ero on tilastollisesti erittäin merkitsevä, jos p-arvo on $\leq 0,001$.
2. Ero on tilastollisesti merkitsevä, jos p-arvo on $> 0,001$ – $\leq 0,01$.
3. Ero on tilastollisesti melkein merkitsevä, jos p-arvo on $> 0,01$ – $\leq 0,05$.

(Holopainen – Pulkkinen 2002: 176–177.)

7 Tulokset

Tuloksista tarkasteltiin -20 °C:ssa ja -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien tuloksia verrattuna -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tuloksiin. Tuloksista tarkasteltiin analyyttien vertailtavien säilytysolojen välisiä tunnuslukuja, näytekohtaisia eroprosentteja ja p-arvoja. Tulokset laskettiin eri säilytystapojen näytekohtaisten tulosten perusteella (ks. liite 4). Eroprosenttikaavioissa (ks. taulukot 6–13) x-akselilla on näytteiden -40 °C:ssa säilytettyjen putkien tulokset. Kaavioissa on näytteiden vertailtavissa säilytysoloissa säilytettyjen putkien tulosten prosentuaaliset erot -40 °C:ssa pakastettuihin putkiin verrattuna. P-arvojen raja-arvona käytettiin yleistä 0,05 rajaa. 0,05 ylittyessä opinnäytteen H_0 -hypoteesi voidaan hylätä. H_0 -hypoteesin mukaan tutkittavien säilytystapojen tulokset eivät tilastollisesti eroa -40 °C:ssa säilytetyjen näyteputkien tuloksista. P-arvojen laskennat Wilcoxonin testillä on esitetty liitteessä 5.

7.1 Näytteiden pakastus -20 °C:ssa

Analyyttien -20 °C:ssa ja -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tunnusluvut on esitetty taulukossa 5. Tunnusluvuista näkee, että F VIII on ainut analyytti, jonka kaikki tunnusluvut laskevat -20 °C:n pakastuksessa. F VII:n, proteiini S:n ja lupusantikoagulantin -20 °C:n ja -40 °C:n pakastettujen putkien tulosten tunnusluvut ovat yhtä suuret tai lähellä toisiaan. Niiden tulokset eivät ole toista säilytysastetta systemaattisesti matalammat tai korkeammat

Taulukko 5. Analyyttien -20 °C:ssa ja -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten tunnusluvut.

Analyytti	Pakastusaste	Ka	Md	s	CV %	Min	Maks
F VII	-40 °C	112	109,50	40,50	36,16	47	157
	-20 °C	112	106,50	40,09	35,80	52	170
F VIII	-40 °C	88,14	85,00	35,78	40,60	40	147
	-20 °C	83,86	76,00	31,54	37,61	39	134
Proteiini S	-40 °C	90,67	98,00	44,29	48,85	18	168
	-20 °C	90,22	102,00	43,04	47,71	16	161
Lupusantikoagulantti	-40 °C	1,05	1,05	0,076	7,24	0,95	1,13
	-20 °C	1,06	1,05	0,063	5,94	0,96	1,13

Ka = Keskiarvo

Md = Mediaani

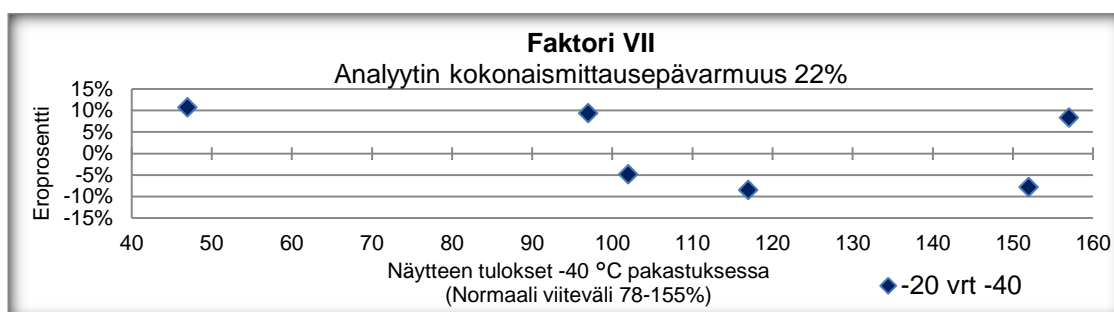
s = Keskihajonta

CV = Variaatiokerroin

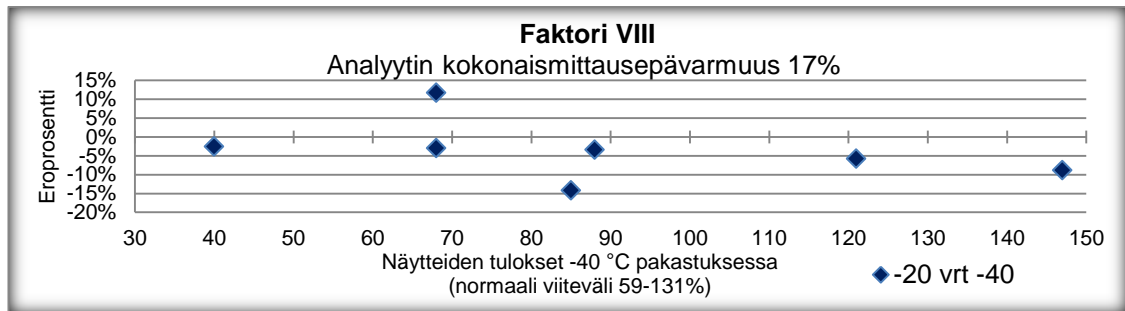
Min = Minimiarvo

Max = Maksimiarvo

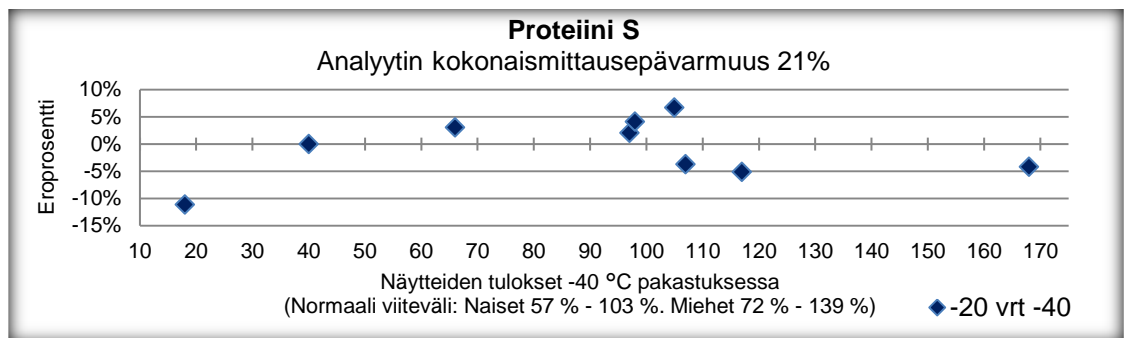
Analyyttien näytekohtaiset eroprocentikaaviot on esitetty kuvioissa 6–9. Eroprosenttikaavioista näkee, että yhtä näytettä lukuun ottamatta F VIII:n (ks. kuvio 7) näytteiden tulokset -20 °C:n pakastuksessa laskevat systemaattisesti. Lupusantikoagulantin (ks. kuvio 9) määrittämisessä, yhtä näytettä lukuun ottamatta, näytteiden tulokset systemaattisesti nousevat -20 °C:n pakastuksessa. F VII:lla (ks. kuvio 6) ja proteiini S:llä (ks. kuvio 8) -20 °C:n pakastus ei systemaattisesti nosta tai laske tuloksia. Kaikilla analyyteillä näytekohtaiset eroprocentit -20 °C:ssa ja -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten välillä pysyvät analyyttien kokonaismittausepävarmuuksien rajoissa.



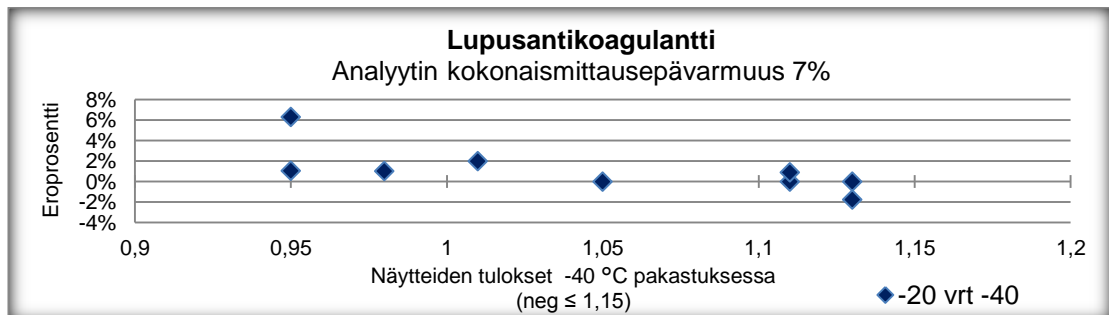
Kuvio 6. F VII:n -20 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tulosten eroprocentit -40 °C:ssa pakastettuihin näyteputkien tuloksiin verrattuna.



Kuvio 7. F VIII:n -20 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tulosten ero prosentit -40 °C:ssa pakastettuihin näyteputkien tuloksiin verrattuna.



Kuvio 8. Proteiini S:n -20 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tulosten ero prosentit -40 °C:ssa pakastettuihin näyteputkien tuloksiin verrattuna.



Kuvio 9. Lupusantikoagulantin -20 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tulosten ero prosentit -40 °C:ssa pakastettuihin näyteputkien tuloksiin verrattuna.

-20 °C:ssa ja -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten välinen tilastollinen merkittävyys (p-arvo) on esitetty taulukossa 6. Jokaisen analyytin kohdalla 5 %:n eli 0,05 vaatimus ylittyy eli p-arvon H_0 -hypoteesia ei hylätä. P-arvojen mukaan millään analyytillä ei ole -20 °C:n ja -40 °C:n pakastettujen putkien tulosten välillä tilastollisesti merkittävää eroa.

Taulukko 6. Analyyttien vertailtavien sarjojen p-arvot.

Analyytti	-20 °C verrattuna -40 °C
F VII	1,000
F VIII	0,156
Proteiini S	0,844
Lupusantikoagulantti	0,281

7.2 Näytteiden pakastus -20 °C:ssa ja säilytys geelijäissä

Analyyttien -20 °C:ssa pakastettujen ja geelijäissä säilytettyjen sekä -40 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tulosten tunnusluvut on esitetty taulukossa 7. F VIII on ainut analyytti, jonka kaikki tunnusluvut laskevat, kun geelijäissä säilytyksen yhdistää -20 °C:n säilytykseen. Keskiahajontaa ja CV % lukuun ottamatta lupusantikoagulantin tunnuslukujen arvot nousevat säilytettäessä näyteputkia -20 °C:ssa ja geelijäissä. F VII:lla ja proteiini S:llä vertailtavien säilytysolojen näyteputkien tulosten tunnusluvut ovat lähellä toisiaan. Niiden tulokset eivät ole toista säilytysastetta systemaattisesti matalammat tai korkeammat.

Taulukko 7. Analyyttien -20 °C:ssa ja geelijäissä sekä -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten tunnusluvut.

Analyytti	Pakastus	Ka	Md	s	CV %	Min	Maks
F VII	-40 °C	112	109,50	40,50	36,16	47	157
	-20 °C geeli	109,67	105,00	40,19	36,65	49	163
F VIII	-40 °C	88,14	85,00	35,78	40,60	40	147
	-20 °C geeli	82,71	76,00	32,02	38,71	37	134
Proteiini S	-40 °C	90,67	98,00	44,29	48,85	18	168
	-20 °C geeli	90,89	103,00	45,96	50,56	15	172
Lupusanti- koagulantti	-40 °C	1,05	1,05	0,076	7,24	0,95	1,13
	-20 °C geeli	1,07	1,06	0,073	6,82	0,98	1,16

Ka = Keskiarvo

Md = Mediaani

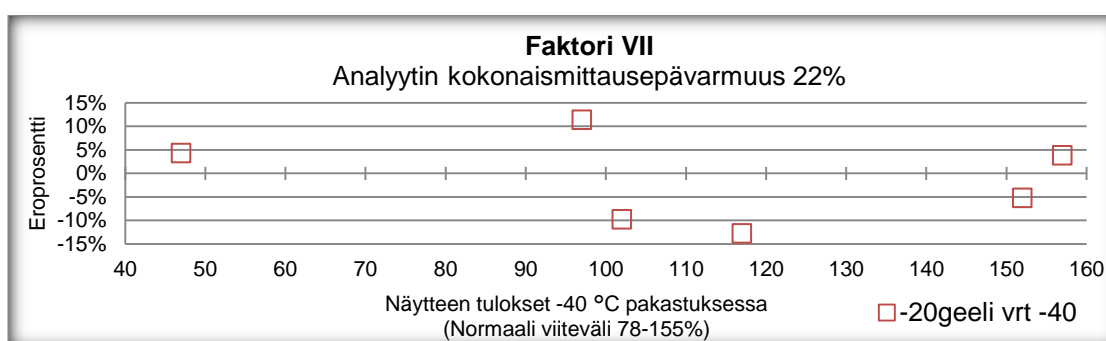
s = Keskihajonta

CV = Variaatiokerroin

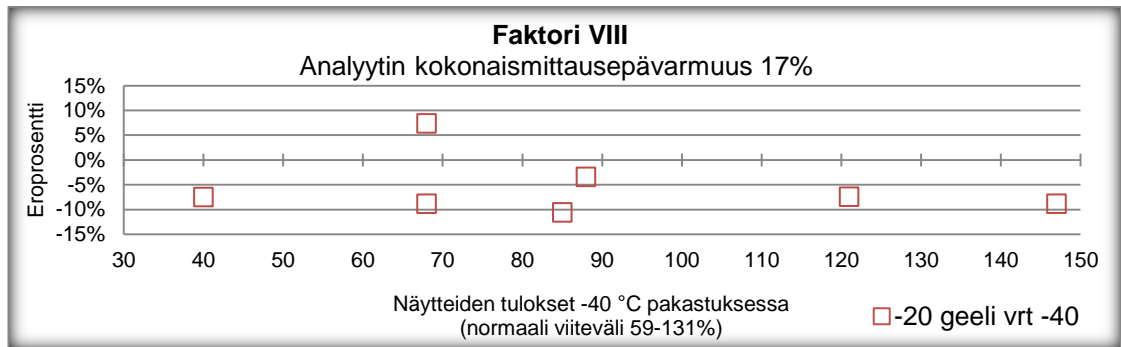
Min = Minimiarvo

Max = Maksimiarvo

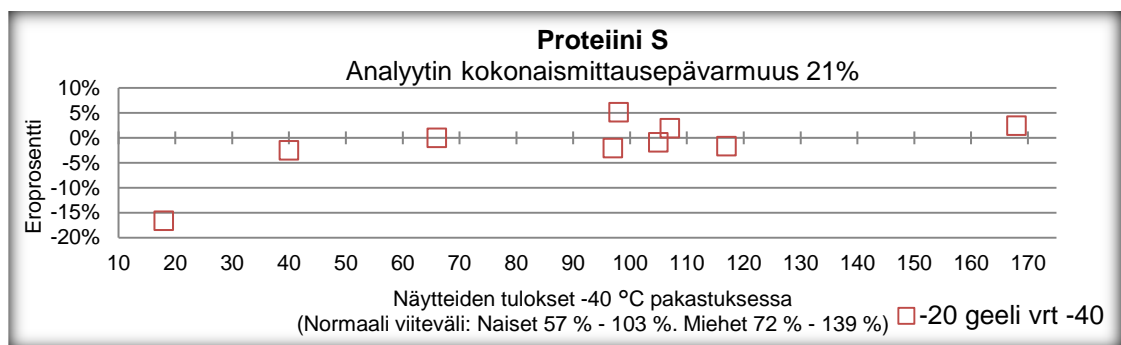
-20 °C:ssa pakastettujen ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien eroprosentit verrattuna -40 °C:ssa pakastettuihin putkiin on esitettyinä kuvioissa 10–13. Yhtä näytettä lukuun ottamatta F VIII:n (ks. kuvio 11) tulokset systemaattisesti laskevat geelijäissäilytyksessä. Lupusantikoagulantilla (ks. kuvio 13) geelijäissäilytys, yhtä näytettä lukuun ottamatta, vähän nostaa tuloksia. F VII:n (ks. kuvio 10) ja proteiini S:n (ks. kuvio 12) -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näytteiden tulosten prosentuaaliset erot -40 °C:n tuloksiin nähden eivät systemaattisesti laske tai nouse.



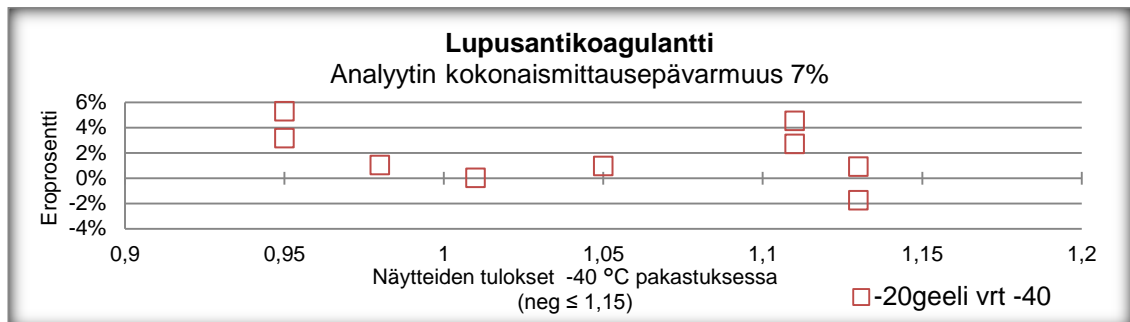
Kuvio 10. F VII:n -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien eroprosentit verrattuna -40 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tuloksiin.



Kuvio 11. F VIII:n -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien ero prosentit verrattuna -40 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tuloksiin.



Kuvio 12. Proteiini S:n -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien ero prosentit verrattuna -40 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tuloksiin.



Kuvio 13. Lupusantikoagulantin -20 °C:ssa ja geelijäissä säilytettyjen näyteputkien ero prosentit verrattuna -40 °C:ssa pakastettujen näyteputkien tuloksiin.

-20 °C:ssa ja geelijäissä sekä -40 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten välinen tilastollinen merkitsevyys (p-arvo) on esitetty taulukossa 8. Taulukosta näkee, että lupusantikoagulantti ja F VIII:n ovat labiileimmat. Jokaisen analyytin kohdalla raja-arvo 0,05 ylittyy eli p-arvolle asetettua H_0 -hypoteesia ei hylätä. P-arvojen mukaan analyyttien näyteputkien tulokset -20 °C:n pakastuksella yhdessä geelijäissäilytyksen kanssa ei tilastollisesti eroa -40 °C:n pakastettujen näyteputkien tuloksista.

Taulukko 8. Analyyttien vertailtavien sarjojen p-arvot.

Analyytti	-20 °C geelijää verrattuna -40 °C
F VII	0,688
F VIII	0,078
Proteiini S	0,922
Lupusantikoagulantti	0,063

7.3 Tulosten tulkinta ja johtopäätökset

Analyyttien näytekohtaiset eroprosentit ovat keskeisessä osassa työn tulosten tarkastelussa ja ne on kokonaisuudessaan koottu taulukkoon 9. Taulukosta näkee säilytysvertailun molempien säilytystapojen näytekohtaiset prosentuaaliset vaihtelut -40 °C:n pakastukseen nähden. Taulukon tulosten perusteella -20 °C:n pakastus laskee F VIII:n aktiivisuutta. Tulokset pysyvät kuitenkin kokonaisuutensa epävarmuuden rajoissa. Aiemmin kuvatuissa tunnusluvuissa, F VIII:n tulokset laskevat -20 °C:n pakastuksessa verrattaessa -40 °C:n pakastukseen (ks. taulukko 5). Tämä tukee eroprosenteilla saatua tulosta, että F VIII:n aktiivisuus vähenee -20 °C:n pakastuksessa. F VIII:n p-arvo on yli 0,05 raja-arvon (ks. taulukko 6). P-arvon tulkinnassa on syytä kiinnittää huomiota pieneen näytemäärään ja on muistettava, että tilastollinen merkitsevyys ei välttämättä tarkoita sitä, että sillä olisi käytännön merkitystä (Holopainen – Pulkkinen 2002: 177).

Lupusantikoagulantin kohdalla -20 °C:n pakastus näyttäisi pidentävän hyytymisaikaa eli -20 ja -40 °C:n pakastuksen vertailussa eroprosentit kasvavat, mutta ne pysyvät kokonaisuutensa epävarmuuden rajoissa (ks. taulukko 9). Lupusantikoagulantin tunnusluvut sekä p-arvo eivät tue eroprosenteilla saatua kasvua (ks. taulukot 5 ja 6). Muilla tutkitavilla analyyteillä näytteiden tulokset -20 °C:n ja -40 °C:n pakastuksessa ovat samansuuntaisia, eli ei näyttäisi tapahtuvan merkitseviä muutoksia.

Yhdistäessä näytteiden -20 °C:n pakastuksen geelijääsäilytykseen, voidaan todeta F VIII ja lupusantikoagulantti labiileimmiksi. F VIII:n aktiivisuuden lasku on nähtävissä eroprosenteissa sekä tunnusluvuissa (ks. taulukot 9 ja 7). Lupusantikoagulantilla ero-

prosentteissa ja tunnusluvuissa on nähtävissä tulostason nousua verrattaessa -40 °C:n pakastuksen tuloksiin (ks. taulukko 9 ja 7). Molemmat analyytit kuitenkin pysyvät kokonaismittausepävarmuuden rajoissa. F VIII:n ja lupusantikoagulantin p-arvot ovat yli, mutta lähellä 0,05 raja-arvoa (ks. taulukko 8). F VII:llä ja proteiini S:llä ei tapahdu merkitseviä muutoksia yhdistäessä näytteiden -20 °C:n pakastuksen geelijääsäilytykseen.

Taulukko 9. Näytekohtaiset eroprosentit. Vertailussa -20 °C:n pakastettujen (-20 °C) ja -20 °C:n pakastettujen ja geelijäässä säilytettyjen (-20 °C g) näyteputkien tuloksia -40 °C:ssa pakastettujen putkien tuloksiin. Suluissa analyyttien kokonaismittausepävarmuudet.

F VII (22 %)		F VIII (17 %)		Proteiini S (21 %)		Lupusantikoagulantti (7 %)	
20 °C vrt -40 °C	-20 °C g vrt -40°C	20 °C vrt -40 °C	-20 °C g vrt -40°C	20 °C vrt -40 °C	-20 °C g vrt -40°C	20 °C vrt -40 °C	-20 °C g vrt -40°C
+11 %	+4 %	+12 %	+7 %	+2 %	-2 %	0 %	+5 %
-5 %	-10 %	-3 %	-9 %	-4 %	+2 %	+6 %	+3 %
+8 %	+4 %	-9 %	-9 %	+7 %	-1 %	±0 %	+1 %
-8 %	-5 %	-3 %	-3 %	+3 %	±0 %	+1 %	+1 %
-9 %	-13 %	-6 %	-7 %	-5 %	-2 %	+1 %	+3 %
+9 %	+11 %	-14 %	-11 %	+4 %	+5 %	-2 %	-2 %
		-3 %	-8 %	-4 %	+2 %	±0 %	+1 %
				±0 %	-3 %	+1 %	+5 %
				-11 %	-17 %	+2 %	±0 %

Johtopäätöksenä opinnäytetyön tuloksista labiileimmaksi analyytiksi todetaan F VIII. Sekä -20 °C:ssa, että yhdistäessä -20 °C:n säilytyksen geelijääkuljetukseen, korkeintaan kahden viikon pakastus laskee systemaattisesti F VIII:n aktiivisuutta. F VIII on tunnetusti labiili analyytti, joten sen aktiivisuuden lasku oli odotettu. Todennäköisesti -20 °C:ssa tapahtuva näytteen jäätyminen ei tapahdu riittävän nopeasti, jolloin labiili F VIII ennättää kulua. F VIII:n kokonaismittausepävarmuus ei kuitenkaan ylity yhdenkään näytteen kohdalla. Tulosten perusteella F VIII todetaan labiiliksi, mutta mittausepävarmuuden rajoissa pysyväksi analyytiksi.

Opinnäytteen tulokset osoittavat, että lupusantikoagulantin tulokset kasvavat vertailtavissa säilytystavoissa eli hyytymisaika pitenee. Hyytymisajan pidentyminen on kuitenkin vähäistä, eikä sitä pidetä merkityksellisenä. Tulos lasketaan suhdelukuna, joten yhdenkin sadasosandesimaalin muutos vaikuttaa. F VII:n ja proteiini S:n osalta vertailtavat säilytystavat eivät aiheuta systemaattisia muutoksia laboratoriotuloksissa.

Kaikkien analyyttien eroprosenttien tulosten perusteella voidaan todeta, että säilytysvertailun molempien tapojen näytekohtaiset prosentuaaliset muutokset ovat samansuuntaisia (ks. taulukko 9). Tulosten perusteella voidaan todeta, että yhdistäessä geelijääsäilytys näytteiden -20 °C:n pakastukseen, näytteiden laatu pysyy samana, kuin -20 °C:n pakastus ilman geelijääsäilytystä.

Eroprosenttikaavioista (ks. taulukot 6–13) voi tarkastella viiterajoissa ja viiterajojen ulkopuolella olevien näytteiden tuloksia. Viiterajojen ulkopuolisia näytteitä on vähän, joten pelkästään niiden käyttäytymisistä ei tässä työssä voi tehdä johtopäätöksiä. Ne ovat kuitenkin huomioituna kaikkien näytteiden kokonaisuudessa.

8 Tulosten luotettavuus

Työn luotettavuuden arvioinnissa arvioitiin työn reliabiliteetti ja validius. Reliabiliteetilla tarkoitetaan mittaustulosten toistettavuutta ja sen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia (Hirsijärvi – Remes – Sajavaara 2005: 216). Validius tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä on tarkoituskin mitata (Hirsijärvi ym. 2005: 216). Opinnäytteen luotettavuuden kannalta oli keskeistä toteuttaa työvaiheet toistettavasti. Työ toteutettiin noudattaen Veripalvelun työohjeita ja käytänteitä. Preanalyttiset ja analyttiset tekijät olivat validoituja. Potilasnäytteet saapuivat Veripalveluun niille validoidun kuljetuskäytännön mukaisesti. Näytteet esikäsiteltiin ohjeiden mukaisesti ja pakastettiin opinnäytteelle asetetun tarkoituspäätteen mukaisesti. Henkilökunnalta kerätyt näytteet esikäsiteltiin ja pakastettiin opinnäytteen tarpeen mukaisesti.

Hemostaasitutkimusten analyytit ovat labiileja ja niiden tutkimuksia on vaikea määrittää toistettavasti sarjasta toiseen (Javela 2013a). Lupusantikoagulantin analysointia lukuun ottamatta analysoija vaihteli. Opinnäytteessä näytteiden kolme rinnakkaista putkea analysoitiin aina samassa sarjassa, samoilla reagensseilla, jolla hallittiin reagenssien valmistelijan käsialan, sekä reagenssien vaihtumisen aiheuttamaa vaikutusta tuloksiin.

Näytteiden eri tavoin säilytettyjen putkien väliset tulokset olivat vertailukelpoisia keskenään. Eri henkilöiden analysoimien näytteiden tuloksista saatiin yhteneviä, joka lisää työn reliabiliteettiä. Työssä käytetyt reagenssit valmistettiin ohjeiden mukaisesti kalibroituilla pipeteilla ja valmistuksesta vastasi näytteiden analyysoija.

Vertailtavien säilytystapojen tuloksia verrattiin nykyiseen säilytystapaan (-40 °C). Jokaisen näytteen kohdalla näyteputket analysoitiin vain kerran, jolloin tulosten virhelähteenä saattoi olla esimerkiksi analysaattorin aiheuttamat pipetointivirheet. Jos analysointivaiheessa näyteputkien ajoja olisi uusittu, olisivat tulokset saattaneet muuttua. Toisaalta, näytteet analysoitiin validilla menetelmällä, joten analysointivirhe oli huomioitu jo mittausepävarmuudessa.

Työn luotettavuuteen vaikutti näytteiden vähäinen määrä. Pienestä näytemäärästä huolimatta analyttien tuloksissa oli osoitettavissa säilytystapojen välinen yhteys tuloksiin. Esimerkiksi F VIII:n ja lupusantikoagulantin näytteiden tulokset systemaattiset muuttuivat vertailtavissa säilytysoloissa. Lisäksi F VIII:n ja F VII:n opinnäytteet tulokset vastasivat esitutkimuksen tuloksia. Esitutkimus ja opinnäyte toteutettiin samoin menetelmin, joten ne ovat täysin vertailukelpoisia keskenään. Opinnäytteen tuloksista saatiin vastaus tutkimuskysymyksiin. Tulokset myös vastasivat aikaisempien tutkimusten perusteella tehtyjä odotuksia. Kokonaisuudessaan tulosten käsittelyä ja niistä tehtyjä johtopäätöksiä voidaan pitää luotettavina ja näin ollen opinnäytteen tuloksia valideina.

9 Pohdinta

Opinnäytetyössä tehtiin hemostaasinäytteiden säilytysvertailu. Tarkoituksena oli selvittää mitä muutoksia tapahtuu, kun hemostaasinäytteiden plasman pakastuslämpötila muutetaan -20 °C:n (verrattuna -40 °C:n pakastukseen) ja, kun se yhdistetään geelijääkuljetukseen. Näytteiden pakastusaika oli korkeintaan kaksi viikkoa. Mukana oli viiterajoissa ja viiterajojen ulkopuolella olevia potilasnäytteitä ja henkilökunnalta kerättyjä näytteitä. Tutkimustulokseksi saatiin, että F VIII on labiilein, ja sen aktiivisuus laski molemmilla tutkimusolosuhteissa säilytysoloissa. Muut analyytit pysyivät stabiileina. F VIII:n tulokset eivät kuitenkaan ylittäneet mittausepävarmuutta. Geelijääkuljetuksen tulosten todettiin olevan samansuuntaisia kuin -20 °C:ssa säilytettyjen näyteputkien tulosten. Geelijääsäilytyksen tuloksiin todennäköisesti eniten vaikutti se, kuinka nopeasti näytteet pakastuivat. Opinnäytteen tavoitteena oli, että työn tulosten avulla mahdollistettaisiin

näytteiden -20 °C:n pakastus ja sen yhdistäminen geelijääkuljetukseen. Silloin kaikilla asiakkailta olisi mahdollisuus itse esikäsitellä näytteet.

F VIII:n tulos oli odotettu. Aikaisempien tutkimusten, Woodhams ym. (2000) ja Plumhoff ym. (1993), pohjalta oletuksena oli, että se olisi labiilein. Kyseiset tutkimukset viittasivat myös APTT -ajan pitenemiseen. Opinnäytteessä lupusantikoagulantin määrittämisessä ei käytetty samaa APTT -aikaan perustuvaa menetelmää kuin julkaisuissa. Opinnäytteen tuloksissa oli nähtävillä hyytymisajan pitenemistä verrattuna -40 °C:n tuloksiin. Tulosten kasvu oli kuitenkin pientä ja pysyi mittausepävarmuuden rajoissa. Lupusantikoagulantin määrittämisen osalta tulosten kasvua ei pidetty merkitsevänä ja näytekohtaiset prosentuaaliset erot selittyvät mittausepävarmuudella. Woodhams ym. (2000) ja Das Gupta ja Sharman (2011) tutkimukset viittasivat myös proteiini S:n labiilisuuteen. Opinnäytteessä proteiini S:n kohdalla vertailtavien säilytystapojen tulokset olivat lähes samoja kuin -40 °C:n tulokset. Das Gupta ja Sharman (2011) käyttivät määrittämisessä ELISA menetelmää (antigeeni-vasta-ainereaktio) ja opinnäytteessä käytettiin hyytymisaikaan perustuvaa menetelmää.

Aikaisemmat tutkimusten suoritukset eroavat toisistaan ja ne antavat osittain ristiriitaisia tuloksia. NCCLS (2003) ja Woodhams ym. (2000) puoltavat analyttien säilymistä -20 °C:ssa kahden viikon pakastuksen ajan. Plumhoff ym. (1993) ja Das Gupta ja Sharman (2011) mukaan osassa analyteista aktiivisuus laskee huomattavasti. Mm. Plumhoff ym. (1997) ja Woodhams ym. (2000) tutkimusten ongelmana oli, että näytteet analysoitiin omilla sarjoillaan. Tutkimusten mittausepävarmuudet ovat myös melko suuria, jolloin tutkimusten tulokset voivat osittain selittyä sillä. Opinnäytteessä sekä esitutkimuksessa vertailtavat putket analysoitiin samassa sarjassa, joten tulokset ovat vertailukelpoisia keskenään.

Jatkotoimenpiteenä selvitetään vielä F VIII:n aktiivisuuden laskun merkitystä potilaan diagnoosin kannalta. Aikaisemmissa tutkimuksissa (Woodhams ym. 2000) ilmeni myös, että hyytymisnäytteet säilyivät stabiilimpina pienemmällä volyyymilla mikroputkessa kuin suuremmalla 5 ml putkessa. Koska F VIII on erittäin labiili, sen aktiivisuuden laskuun -20 °C:n pakkasessa todennäköisesti vaikuttaa myös hidas pakastuminen, jolloin se ennättää kulua. Opinnäytetyössä plasmanäytteet pakastettiin eppendorf -putkiin, joissa näytettä oli 400–1000 µl väliltä. Woodhams ym. (2000) tutkimukseen pohjautuen on ehkä syytä pohtia F VIII:n käyttäytymistä myös, kun asiakas pakastaa potilaan plasman mikroputkeen mahtuvaa määrää suuremmalla volyyymillä.

Käytännöntyö toteutettiin aikataulun mukaisesti. Työn vaiheistus suunniteltiin pääpiirteittäin etukäteen. Vasta näytteiden keruun käynnistyttyä pystyi tarkemmin suunnittelemaan työn yksityiskohtia. Tarkoituksena oli, että näytteet olisivat olleet pakastuksessa ja geelijäissä lähelle maksimiaikoja, jotta voitaisiin paremmin ottaa kantaa kahden viikon pakastusaikaan sekä näytteiden säilymiseen geelijäissä, jos kuljetusmatka Veripalveluun vie tunteja. Opinnäytetyössä pyrittiin myös käyttämään potilasnäytteitä, joilla oli kliinisesti merkitseviä viiterajojen ulkopuolisia tuloksia. Käytännössä vaatimuksia ei pystytty täysin toteuttamaan.

Näytteiden keräysajankohtana viiterajojen ulkopuolisia potilasnäytteitä ei tullut montaa, joten työhön otettiin viiterajoissa olevia näytteitä. Pakastusaikaan vaikuttivat käytettävät reagenssimäärät ja näytteiden saapumispäivät. Näytteiden ajot suunniteltiin siten, että koko reagenssipullo hyödynnettiin, mutta kuitenkin niin, että näytteiden kolme rinnakaista putkea ajettiin samalla reagenssilla. Pakastusaikaan vaikutti myös viikonloput, sillä geelijäihin siirron vuoksi näytteitä ei voinut ajaa maanantaisin. Tämän vuoksi ajoihin otettiin näytteitä, joiden pakastusaika ei ollut kahta viikkoa. Näytteiden pakastusajat vaihtelivat viiden ja 14 vuorokauden välillä. Jos työ olisi toteutettu niin, että analyyttien pakastusajat olisivat olleet yhtä pitkiä, olisi pakastusajan pituuden vaikutusta pystytty tarkemmin arvioimaan. Nyt työssä pystyttiin katsomaan näytteiden keskimääräisen pakastusajan vaikutusta tuloksin. Tarkoituksena oli kuitenkin selvittää korkeintaan kahden viikon pakastuksen vaikutusta, johon myös saatiin vastaus. Asiakkaan kannalta katsottuna toteutettua pakastusaikaa kuitenkin pidettiin riittävänä, sillä he lähettävät näytteet tutkivaan laboratorioon mahdollisimman nopeasti. Muita käytännöntyön totuudessa huomioitavia tekijöitä oli geelijäiden riittävä pakastusaika ennen niiden ja näytteiden siirtoa styroksipakkaukseen, henkilökunnan työt ja analysaattorien vapautuminen. Näytteiden riittävä geelijäissä säilyttämisaika ei ollut ongelmallista. Sen sijaan se, etteivät näytteet olleet geelijäissä liian pitkään, oli haasteellista juuri henkilökunnan töiden ja analysaattorien vapautumisen vuoksi.

Käytännöntyön toteutuksen aikana ei kuitenkaan saapunut toivottua määrää viiterajojen ulkopuolisia potilasnäytteitä. Tämän vuoksi työn toteutuksen aikana kaavailtiin, että työtä varten valmistettaisiin viiterajojen alapuolella olevia näytteitä henkilökunnalta kerätyistä näytteistä. Tämä toteutettiin kolmen henkilön kohdalla. Kyseiset näytteet jaettiin kuuteen putkeen, joista kolme pakastettiin heti ja kolmea seisotettiin ennen pakastusta. Näin huoneenlämmössä seisotuksen vaikutusta analyyttien aktiivisuuteen pystyttiin

arvioimaan ja näytteet hyväksyttiin osaksi opinnäytteen toteutusta. Koska näytteitä oli jo analysoitu sovittu määrä, ei matalan tulostason näytteitä valmistettu enempää aikarajan ja kustannusten vuoksi. Se ei olisi myöskään vastannut potilasnäytteiden käsittelyssä tapahtuvaa normaalia preanalytiikasta johtuvaa eroavaisuutta.

Työn kannalta oli keskeistä toteuttaa jokaisen näytteen valmistelut samalla tavalla. Näytteiden käsittelyssä toimittiin noudattaen Veripalvelun ohjeita. Preanalytiikka ja analytiikka olivat validit. Lisäksi seurattiin teknisiä ominaisuuksia. Pakastimien lämpötiloja seurattiin satunnaisesti. -40 °C :n pakastimen lämpötila vaihteli -39 ja -42 °C :n välillä ja -20 °C :n pakastimen lämpötila -19 ja -22 °C :n välillä. Geelijäitä säilytettiin -20 °C :n pakastimessa. Jokaisella analysointikerralla näyteputket ja geelijäät siirrettiin viipymättä geelijääpakkaukseen. Geelijääpakkauksen lämpötilaa seurattiin yhden analysointikeran yhteydessä. Ennen analysointia geelijääpakkauksen avattiin kerran, jonka jälkeen näyteputket sulatettiin välittömästi yhdessä niiden rinnakkaisten putkien kanssa.

Toteutin opinnäytetyön sille varatun ajan puitteissa. Käytännöntyö ajoittui sovittuun ajankohtaan ja työssä analysoitiin sovitut näytemäärät. Toteutukseen liittyi valmisteluja, jotka vaativat lyhyitä käyntejä paikan päällä. Siksi työn toteutuksen kannalta oli hyvä, että toteutin sen ollessani Veripalvelussa työharjoittelussa. Työn rajoittavimmaksi tekijäksi koin ajan. Jos työ olisi toteutettu Veripalvelun henkilökunnan toimesta, olisi näytteiden keruu ja analysointi voitu toteuttaa pidemmän aikavälin puitteissa, jolloin työhön olisi mahdollisesti saatu enemmän viiterajojen ulkopuolisia näytteitä. Myös analytiikka-kohtaiset pakastusajat olisi voitu tällöin suunnitella tarkemmiksi ja yhteneväisiksi. Opinnäytteenä toteutettuna näytemateriaalia ja näytteiden pakastusaikaa ei ollut mahdollista valikoida ja suunnitella yhtä tarkasti.

Kokonaisuudessaan työ oli mielekäs toteuttaa. Työ oli ajankohtainen Veripalveluun tulossa oleva kuljetuskäytännön muutoksen vuoksi. Hemostaasijärjestelmän monimuotoisuus, hemostaasianalyttien labiilius ja analysointimenetelmien herkkyys tekivät aiheesta varsin haastavan kokonaisuuden. Näiden vuoksi hyytymistutkimusten toistettavuus on hankalaa. Jotta työn toteutuksesta ja tulosten tulkinnasta saatiin mahdollisimman luotettavia, tuli aihe ymmärtää kokonaisuudessaan. Alussa luulinkin ymmärtäväni tämän melko hyvin. Pian kuitenkin totesin sen olevan huomattavasti haastavampi kokonaisuus. Aiheen monimuotoisuuden kannalta pyrin rajaamaan työn viitekehysten niin, että tutkittavat analyytit osoitettiin osaksi hemostaasijärjestelmän kokonaisuutta, mutta kuitenkin niin, että huomio painottui käsiteltäviin analyytteihin.

Työssä käytetty STA Compact -analysointilaite oli entuudestaan tuttu, sillä olen työskennellyt Veripalvelun hemostaasiosastolla kesälomasijaisena tehden tukostutkimuksia kyseisellä analysointilaitella. BCS -analysointilaitteen käytön opettelin opinnäytettä, ja tätä edeltänyttä, innovaatioprojektina toteutettua esitutkimusta varten. Esitutkimuksesta ja työskentelystä Veripalvelussa oli etua opinnäytettä tehdessäni. Veripalvelun toimintatavat olivat tuttuja, sekä esitutkimuksen ansiosta osasin suunnitella opinnäytetyön joutuvammaksi ja huomioida työn kannalta keskeiset tekijät. Yhteistyö opinnäytetyön ohjaajien kanssa sujui hyvin. Veripalvelun ohjaajasta, asiantuntija Kaija Javelasta, oli suuri apu käytännöntyön ja asian oikeellisuuden tarkistamisessa. Metropolian ohjaajasta, Irma Niittymäestä, oli apua opinnäytetyön raportin kirjoittamisen kannalta.

Lähteet

Castaman, Giancarlo – Tosetto, Alberto – Rodeghiero, Francesco 2005. Von Willebrand disease. Teoksessa O'Shaughnessy, Denise – Makris, Michael – Lillicrap, David (toim.): Practical hemostasis and thrombosis. 51–61.

Das Gupta, Amar – Sharma, Anup 2012. Impact of reduced levels of protein C, free protein S and antithrombin in normal frozen plasma on the interpretation of patients' results. Blood Coagul Fibrinolysis 23 (1). 51–5. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa

<http://journals.lww.com/bloodcoagulation/Fulltext/2012/01000/Impact_of_reduced_levels_of_protein_C,_free.8.aspx>.

Diagnostica STAGO principle of clot detection 2007. Medical Bayer, Medical equipment & devices. Verkkodokumentti.

<http://www.medicalbuyer.co.in/index.php?option=com_content&task=view&id=2620>. Luettu 22.11.2013.

Eklund, Asta – Suuronen, Anna-Leena 2013. Pakastuslämpötilamuutoksen ja siihen yhdistetyn geelijääkuljetuksen vaikutus hemostaasinäytteiden säilyvyyteen. Innovaatio-
projekti. Helsinki: Metropolia Ammattikorkeakoulu. 1–24.

Halinen, Matti – Lassila, Riitta 2000. Tekoläppäpotilaan antikoagulanttihoito. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 116 (2). 157–165. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo91295.pdf>>.

Hannuksela, Matti 2012. Ihon punahukka (DLE). Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=dlk00647>. Luettu 5.1.2014.

HE-YO-001. Hemostaasitutkimukset: kontrollien tavoite-RSD ja kokonaismittausepävarmuus. Yleisohje. Laatija; Huoponen, Outi. 11. painos. Voimaantulopäivä 17.9.2012. Helsinki: Punainen Risti, Veripalvelu. 1–3.

HE-3210. 2009. Lupusantikoagulantin tutkiminen APTT -menetelmällä. Tutkimusmenetelmä. Laatija: Javela, Kaija. 12. painos. Voimaantulopäivä 30.3.2009. Helsinki: Punainen Risti, Veripalvelu. 1–5.

HE-3219. 2011. Hyytymistekijä VIII aktiivisuuden määrittäminen plasmanäytteestä one stage -menetelmällä. Tutkimusmenetelmä. Laatija; Huoponen, Outi. 15. painos. Voimaantulopäivä 21.4.2011. Helsinki: Punainen Risti, Veripalvelu. 1–10.

HE-3275. 2008. Hyytymistekijä VII (FVII) aktiivisuuden määrittäminen plasmanäytteistä one stage -menetelmällä. Tutkimusmenetelmä. Laatija: Pusa, Elina – Javela, Kaija. 7. painos. Voimaantulopäivä 18.3.2008. Helsinki: Punainen Risti Veripalvelu. 1–5.

HE-3289. 2010. Proteiini S:n funktionaalisen aktiivisuuden määrittäminen hyytymisaikaan perustuvalla menetelmällä. Tutkimusmenetelmä. 10. painos. Voimaantulopäivä 1.10.2010. Helsinki: Punainen Risti, Veripalvelu. 1–6.

HE-43134. 2008. Behring coagulation system, BCS -hyytymisanalysointilaitteisto. Laiteohje. Laatija: Huovinen, Minna – Lindstend, Leena. 3. painos. Voimaantulopäivä 1.2.2008. Helsinki: Punainen risti, Veripalvelu. 1–42.

HE-43146. 2006. STA Combact laiteohje. Laiteohje. Laatiija: Kotasov, Kirsi – Huoponen, Outi. 1. painos. Voimaantulopäivä 1.3.2006. Helsinki: Punainen risti, Veripalvelu. 1–13.

Hemostaasinäytteen preanalytiikasta 2011. Uutiskirjeet 1/2011. Punainen Risti. Veripalvelu. Verkkodokumentti. <<http://www.veripalvelu.fi/www/2917>>. Luettu 2.9.2013.

Hirsijärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2005. Tutki ja kirjoita. 11. painos. Jyväskylä: Gummerus.

Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2008. Tilastolliset menetelmät. 5. –6. painos. Helsinki: WSOY.

Javela, Kaija 2013a. Sairaalakemisti. Suomen Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki. Suullinen tiedonanto 7.6.2013, 31.7.2013 ja 31.10.2013.

Javela, Kaija 2013b. Sairaalakemisti. Geelijäänsopivuuden testaaminen näytteiden kuljetuksessa. Suomen Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki. Suullinen tiedonanto 3.10.2013.

Javela, Kaija – Vahtera, Elina 1997. Analyyttien säilyminen. Tutkimusraportti. Suomen Punainen Risti. Helsinki.

Joutsu-Korhonen, Lotta – Koski, Tomi 2010a. Hemostaasin tutkimukset. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laobratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hemotologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 275–284.

Joutsu-Korhonen, Lotta – Koski, Tomi 2010b. Laskimotukostaipumus ja antitromboottisen hoidon laboratorioseuranta. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laobratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hemotologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 285–291.

Kallio, Jaana 2007. Veren hyytymiseen vaikuttavat lääkeaineet. Teoksessa Koulu, Tuomisto (toim.): Farmakologia ja toksikologia. 7. painos. Kustannus Medicina Oy. 595–618. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.medicina.fi/fato/37.pdf>>.

Kitchen, Steve – Makris, Michael 2005. Laboratory tests of hemostasis. Teoksessa O'Shaughnessy, Denise – Makris, Michael – Lillcrap, David (toim.): Practical hemostasis and thrombosis. 8–17.

Koski, Tomi 2010a. Laskimotukostaipumus. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.): Ilmari Palvan veritaudit. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy. 172–183.

Koski, Tomi 2010b. Veren hyytyminen ja verenvuototaipumus. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.): Ilmari Palvan veritaudit. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy. 159–170.

Kouri, Timo, Koskinen, Pentti – Leppänen, Esa – Malminiemi, Outi – Pohja-Nylander, Paula – Pohjavaara, Simo – Puukka, Raija – Siloaho, Maritta 2002. Preanalyttisen mittausepävarmuuden laskeminen. Moodi 4 (26). 139–148.

Laffan, M.A. – Bradshaw, A.E. 1995. Investigation of haemostasis. Teoksessa Dacie, sir John V. – Lewis, S.M. (toim.): Practical Haematology. 8. painos. Hong Kong: Longman Group Limited. 297–315.

- Lassila, Riitta 2002. Uudet vai vanhat lääkkeet tromboosin ehkäisyyn? TABU (3). 7–9.
- Lassila, Riitta 2006. Verenvuodon tyrehtyminen. Teoksessa Rasi, Vesa (toim.): Verenvuototaudit, tietopaketti potilaalle. Helsinki: Suomen hemofiliayhdistys r.y. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. 6–9.
- Leskinen, Päivi 2013. Testit. Opetusmateriaali. Helsinki: Metropolia Ammattikorkeakoulu. 1–6.
- Mahlamäki, Eija 2004. Hemostaasi. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WS Bookwell Oy. 310–321.
- Mikä on Veripalvelu? 2013. Punainen Risti. Veripalvelu. Verkkodokumentti. <<http://www.veripalvelu.fi/www/21>>. Luettu 17.12.2013.
- Mäkipernaa, Anne 2013. Hankinnaiset hemostaasin häiriöt. Teoksessa Mäyränpää, Mikko (toim.): Therapia Finnica.fi. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. Verkkodokumentti. <http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Hankinnaiset_hemostaasin_h%C3%A4iri%C3%B6t>. Luettu 29.10.2013.
- Mäkipernaa, Anne 2006. Von Willebrandin tauti. Teoksessa Rasi, Vesa (toim.): Verenvuototaudit, tietopaketti potilaalle. Helsinki: Suomen hemofiliayhdistys r.y. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. 17–21.
- NCCLS 2003. Arkin, Charles – Adcock, Dorothy – Ernst, Dennis – Marlar, Richard – Parish, Gary – Szamosi, Diane – Warunek, David. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays. Approved guideline – fourth edition. Guideline 23 (35).
- Pelkonen, Olavi 2009. Miksi asetyylisalisyylihapolla on niin monia vaikutuksia ja käyttökohteita? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 125 (22). 2433–2439. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98430.pdf>>.
- Plumhoff, Elizabeth A. – Thompson, Cynthia K. – Fisher, Pamela K. – Bowie, Walter E.J. – Nichols, William L. 1993. Effects of specimen storage and handling on coagulation testing. Thrombosis and Haemostasis 69. 866. Abstrakti.
- Rasi, Vesa 2013. Tukostaipumus. Teoksessa Mäyränpää, Mikko (toim.): Therapia Fennica. Kandidaattikustannus Oy. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Tukostaipumus>>.
- Sadler, JE 1997. Thrombomodulin structure and function. Thrombosis and Haemostasis 78 (1). Abstrakti.
- Siloaho, M. 2000. Miten saada näyte säilymään analysointiin saakka? Moodi 24 (6). 185–189.
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2006. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Hyväksytty Suomen Bioanalytikkoliiton liittohallituskokouksessa 1.9.2006 ja liittokokouksessa 18.11.2006.

TempFlex® -kylmävaraajat 2013. Cool id delivering possibilities. Verkkodokumentti. <<http://www.coolid.fi/tuotteet/kylmavaraajat.php>>. Luettu 15.9.2013.

Ulander, Veli-Matti – Kaaja, Risto – Tulppala, Maija 2002. Toistuva keskenmeno. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 118 (2). 165–171. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo92733.pdf>>.

Vuoto- ja tukostaipumustutkimukset 2013. Punainen Risti. Veripalvelu. Verkkodokumentti. <<http://www.veripalvelu.fi/www/1089>>. Luettu 29.12.2013.

Watson, Henry 2005. Antiphospholipid syndrome. Teoksessa O’Shaughnessy, Denise – Makris, Michael – Lillicrap, David (toim.): Practical hemostasis and thrombosis. 130–136.

Woodhams, B. – Girardot, O. – Blanco, MJ. – Colesse, G. – Gourmelin, Y. 2000. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation & fibrinolysis 2001 12 (4). 229–236.

Aikaisemmat tutkimukset

Tutkimusjoukko	Artikkelin nimi	Tulokset plasman pakastuksen osalta	Huomioitavaa
NCCLS 2003.	Guideline 2003.	-20°C 2 viikkoa stabiili -70°C 6 kuukautta stabiili	Tutkimusmateriaali ei käytössä.
Plumhoff-Thompson-Fisher-Bowie-Nichols 1993.	Effects of specimen storage and handling on coagulation testing.	-20°C -70 °C vrk II stabiili stabiili 14vrk V 20% ↓ 10 % ↓ 7 vrk → VII stabiili stabiili 14 vrk VIII 40%↓ 20% ↓ 3 vrk → X stabiili stabiili 14 vrk PT pidentyy stabiili 10 vrk APTT pidentyy stabiili 10 vrk	Käytössä abstrakti. Tutkimuksen näyttemäärästä ei tietoa.
Woodhams – Girardot – Blanco – Colesse – Gourmelin 2000.	Stability of coagulation proteins in frozen plasma.	-24°C ja -74°C Kaikki analyytit (II, V, VI, VIII, IX, X, XI, XII, proteiini C, proteiini S, antitrombiini III, vWRCof) stabiileja vähintään kolmen kuukauden säilytyksen ajan (korkeintaan 5% muutos nollanäytteen tasoon). -24°C APTT aika kasvaa kahden viikon kohdalla (ei mainittu prosentuaalista muutosta).	Ei mainita, montako putkea analysoitiin jokaisessa tutkimusajankohdassa (mikro/5ml putket). Näytteet oli kerätty kuudelta terveeltä henkilöltä.
Das Gupta - Sharma 2011.	Impact of reduced levels of protein C, free protein S and antithrombin in normal frozen plasma on the interpretation of patients' results.	-25°C -näytteiden aktiivisuuden keskiarvotulosten lasku verrattaessa nollanäytteeseen: 2 vko 4 vko proteiini S 11,4%↓ 20,5%↓ proteiini C 6,4%↓ 10,6%↓ antirombiini III 7%↓ 7,9%↓ Yhden vuorokauden tutkimuksessa ei merkitseviä muutoksia.	50 tervettä potilasta. Yhden vuorokauden tutkimuksessa 20 tervettä potilasta.

Javela Kaija 2013.	Geelijään sopi- vuuden testaa- minen näyttei- den kuljetukses- sa.	-40°C verrattuna -40°C+geelijää Rinnakkaisnäytteiden tuloksissa ei merkitseviä muutoksia.	
-----------------------	--	---	--

Esitutkimuksen tulokset

Esitutkimuksen F VII:n (n=16) ja F VIII:n (n=16), tunnusluvut, ero prosenttikaaviot, näytekohtaiset analysoinnin tulokset ja vertailtavien sarjojen väliset erot prosentit ja tilastolliset merkitsevyydet, kun putket olivat pakastettuina -40 °C, -20 °C ja -20 °C geelissä.

Analyytti	Pakastusaste	Ka	Md	s	CV %	min	maks
F VII	-40 °C	102,38	108,5	23,45	22,9	50	144
	-20 °C	102,31	108	24,35	23,8	50	148
	-20 °C geeli	102,44	107	23,45	22,89	48	144
F VIII	-40 °C	95,75	96,5	28,56	29,82	28	134
	-20 °C	91,56	96	27,66	30,21	27	130
	-20 °C geeli	92,38	93,5	27,2	29,45	25	128

Ka = keskiarvo

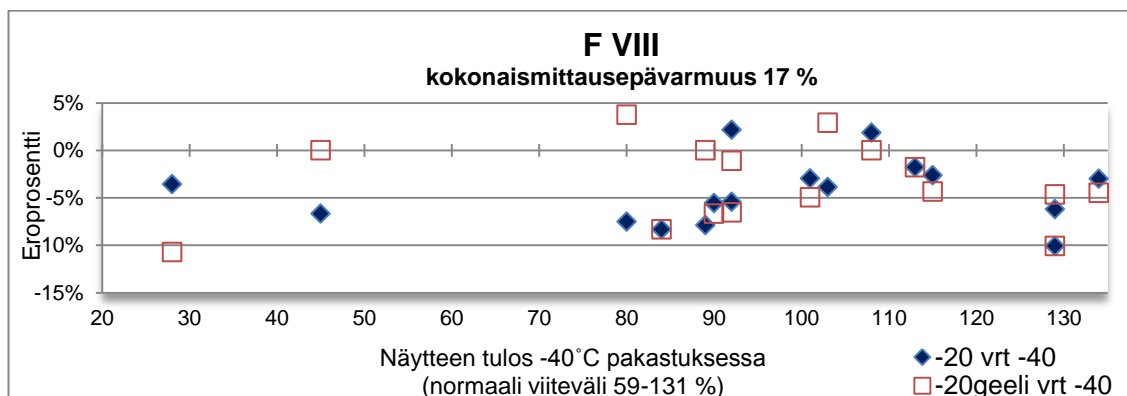
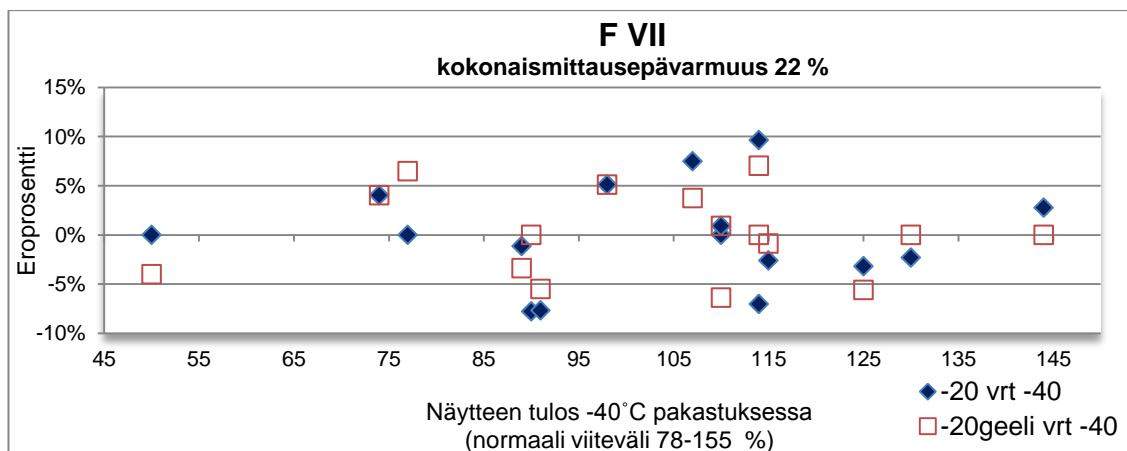
Md = Mediaani

s = Keskihajonta

CV = Variaatiokerroin

Min = Minimiarvo

Maks = Maksimiarvo



Faktori	p-arvo - 20 vs. - 40	p-arvo - 20g vs. - 40
VII	0,958	0,954
VIII	0,000	0,006

VII (22 %) Viiteväli 78–155%					VIII (17 %) Viiteväli 59–131%				
tulos - 40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40	tulos -40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40
110	110	103	0,0 %	-6,4 %	129	121	123	6,6 %	7,7 %
90	83	90	-7,8 %	0,0 %	103	99	106	-7,8 %	-2,9 %
110	111	111	0,9 %	0,9 %	92	94	91	6,6 %	2,6 %
77	77	82	0,0 %	6,5 %	129	116	116	2,2 %	5,4 %
74	77	77	4,1 %	4,1 %	90	85	84	-6,4 %	-10,6 %
115	112	114	-2,6 %	-0,9 %	113	111	111	-12,5 %	-3,4 %
114	125	122	9,6 %	7,0 %	101	98	96	-0,9 %	-6,9 %
98	103	103	5,1 %	5,1 %	92	87	86	2,6 %	-3,9 %
144	148	144	2,8 %	0,0 %	84	77	77	-1,8 %	-5,5 %
107	115	111	7,5 %	3,7 %	89	82	89	9,0 %	10,0 %
114	106	114	-7,0 %	0,0 %	108	110	108	-1,8 %	-9,1 %
125	121	118	-3,2 %	-5,6 %	115	112	110	-2,2 %	-2,2 %
91	84	86	-7,7 %	-5,5 %	80	74	83	-5,1 %	-8,2 %
89	88	86	-1,1 %	-3,4 %	45	42	45	-2,0 %	1,0 %
130	127	130	-2,3 %	0,0 %	134	130	128	0,9 %	-1,7 %
50	50	48	0,0 %	-4,0 %	28	27	25	-8,0 %	0,0 %

Geelijääpakkauksen lämpötila

S/N	Time	Temperature
Type		133939
Description		Tinytalk -40/85°C
Property		VLS-43213-CT
		Temperature
1	21.11.2013 14:24	23,0 °C
2	21.11.2013 14:36	23,0 °C
3	21.11.2013 14:48	23,0 °C
4	21.11.2013 15:00	23,0 °C
5	21.11.2013 15:12	22,7 °C
6	21.11.2013 15:24	1,5 °C
7	21.11.2013 15:36	-12,3 °C
8	21.11.2013 15:48	-17,6 °C
9	21.11.2013 16:00	-19,6 °C
10	21.11.2013 16:12	-21,0 °C
11	21.11.2013 16:24	-21,7 °C
12	21.11.2013 16:36	-21,7 °C
13	21.11.2013 16:48	-21,7 °C
14	21.11.2013 17:00	-21,7 °C
15	21.11.2013 17:12	-21,0 °C
16	21.11.2013 17:24	-21,0 °C
17	21.11.2013 17:36	-21,0 °C
18	21.11.2013 17:48	-21,0 °C
19	21.11.2013 18:00	-21,0 °C
20	21.11.2013 18:12	-20,3 °C
21	21.11.2013 18:24	-20,3 °C
22	21.11.2013 18:36	-20,3 °C
23	21.11.2013 18:48	-20,3 °C
24	21.11.2013 19:00	-19,6 °C
25	21.11.2013 19:12	-19,6 °C
26	21.11.2013 19:24	-19,6 °C
27	21.11.2013 19:36	-19,6 °C
28	21.11.2013 19:48	-19,6 °C
29	21.11.2013 20:00	-19,6 °C
30	21.11.2013 20:12	-18,9 °C
31	21.11.2013 20:24	-18,9 °C
32	21.11.2013 20:36	-18,9 °C
33	21.11.2013 20:48	-18,9 °C
34	21.11.2013 21:00	-18,3 °C
35	21.11.2013 21:12	-18,3 °C
36	21.11.2013 21:24	-18,3 °C
37	21.11.2013 21:36	-18,3 °C
38	21.11.2013 21:48	-18,3 °C
39	21.11.2013 22:00	-17,6 °C
40	21.11.2013 22:12	-17,6 °C
41	21.11.2013 22:24	-17,6 °C
42	21.11.2013 22:36	-17,6 °C

43	21.11.2013 22:48	-17,0 °C
44	21.11.2013 23:00	-17,0 °C
45	21.11.2013 23:12	-17,0 °C
46	21.11.2013 23:24	-17,0 °C
47	21.11.2013 23:36	-17,0 °C
48	21.11.2013 23:48	-16,4 °C
49	22.11.2013 00:00	-16,4 °C
50	22.11.2013 00:12	-16,4 °C
51	22.11.2013 00:24	-16,4 °C
52	22.11.2013 00:36	-16,4 °C
53	22.11.2013 00:48	-15,8 °C
54	22.11.2013 01:00	-15,8 °C
55	22.11.2013 01:12	-15,8 °C
56	22.11.2013 01:24	-15,8 °C
57	22.11.2013 01:36	-15,8 °C
58	22.11.2013 01:48	-15,8 °C
59	22.11.2013 02:00	-15,2 °C
60	22.11.2013 02:12	-15,2 °C
61	22.11.2013 02:24	-15,2 °C
62	22.11.2013 02:36	-15,2 °C
63	22.11.2013 02:48	-15,2 °C
64	22.11.2013 03:00	-14,6 °C
65	22.11.2013 03:12	-14,6 °C
66	22.11.2013 03:24	-14,6 °C
67	22.11.2013 03:36	-14,6 °C
68	22.11.2013 03:48	-14,6 °C
69	22.11.2013 04:00	-14,6 °C
70	22.11.2013 04:12	-14,6 °C
71	22.11.2013 04:24	-14,0 °C
72	22.11.2013 04:36	-14,0 °C
73	22.11.2013 04:48	-14,0 °C
74	22.11.2013 05:00	-14,0 °C
75	22.11.2013 05:12	-14,0 °C
76	22.11.2013 05:24	-14,0 °C
77	22.11.2013 05:36	-13,4 °C
78	22.11.2013 05:48	-13,4 °C
79	22.11.2013 06:00	-13,4 °C
80	22.11.2013 06:12	-13,4 °C
81	22.11.2013 06:24	-13,4 °C
82	22.11.2013 06:36	-13,4 °C
83	22.11.2013 06:48	-13,4 °C
84	22.11.2013 07:00	-12,9 °C
85	22.11.2013 07:12	-12,9 °C
86	22.11.2013 07:24	-12,9 °C
87	22.11.2013 07:36	-12,9 °C
88	22.11.2013 07:48	-12,9 °C
89	22.11.2013 08:00	-12,9 °C
90	22.11.2013 08:12	-12,9 °C
91	22.11.2013 08:24	-12,3 °C
92	22.11.2013 08:36	-12,3 °C
93	22.11.2013 08:48	-12,3 °C
94	22.11.2013 09:00	-12,3 °C

95	22.11.2013 09:12	-12,3 °C
96	22.11.2013 09:24	-12,3 °C
97	22.11.2013 09:36	-12,3 °C
98	22.11.2013 09:48	-12,3 °C
99	22.11.2013 10:00	-10,7 °C
100	22.11.2013 10:12	-11,2 °C
101	22.11.2013 10:24	-11,2 °C
102	22.11.2013 10:36	-11,2 °C
103	22.11.2013 10:48	-11,2 °C
104	22.11.2013 11:00	-11,2 °C
105	22.11.2013 11:12	-11,2 °C
106	22.11.2013 11:24	-11,2 °C
107	22.11.2013 11:36	-10,7 °C
108	22.11.2013 11:48	-10,7 °C
109	22.11.2013 12:00	-10,7 °C
110	22.11.2013 12:12	-10,7 °C
111	22.11.2013 12:24	-10,7 °C
112	22.11.2013 12:36	-10,7 °C
113	22.11.2013 12:48	-10,7 °C
114	22.11.2013 13:00	-10,7 °C

Opinnäytteen näytekohtaiset tulokset

F VII:n (n=6), F VIII:n (n=7), proteiini S:n (n=9) ja lupusantikoagulantin (n=9) näytekohtaisten analysointien tulokset ja vertailtavien sarjojen väliset ero prosentit, kun putket olivat pakastettuina -40 °C, -20 °C ja -20 °C geelissä.

VII (22 %) Viiteväli 78–155%					VIII (17 %) Viiteväli 59–131%				
tulos -40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40	tulos -40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40
47	52	49	11 %	4 %	68	76	73	12 %	7 %
102	97	92	-5 %	-10 %	68	66	62	-3 %	-9 %
157	170	163	8 %	4 %	147	134	134	-9 %	-9 %
152	140	144	-8 %	-5 %	88	85	85	-3 %	-3 %
117	107	102	-9 %	-13 %	121	114	112	-6 %	-7 %
97	106	108	9 %	11 %	85	73	76	-14 %	-11 %
					40	39	37	-3 %	-8 %

Proteiini S (21 %) Viiteväli naiset 57 % - 103 % miehet 72 % - 139 %					Lupusantikoagulantti (7 %) Viiteväli neg≤1,15 pos >1,15				
tulos -40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40	tulos -40	tulos -20	tulos -20g	ero20_40	ero20g_40
97	99	95	2 %	-2 %	1,11	1,11	1,16	0 %	5 %
168	161	172	-4 %	2 %	0,95	1,01	0,98	6 %	3 %
105	112	104	7 %	-1 %	1,05	1,05	1,06	0 %	1 %
66	68	66	3 %	0 %	0,98	0,99	0,99	1 %	1 %
117	111	115	-5 %	-2 %	1,11	1,12	1,14	1 %	3 %
98	102	103	4 %	5 %	1,13	1,11	1,11	-2 %	-2 %
107	103	109	-4 %	2 %	1,13	1,13	1,14	0 %	1 %
40	40	39	0 %	-3 %	0,95	0,96	1,00	1 %	5 %
18	16	15	-11 %	-17 %	1,01	1,03	1,01	2 %	0 %

Wilcoxonin testin tulokset

Wilcoxon Signed Ranks Test, F VII:n ja F VIII:n tulokset

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
faktori740 - faktori720	Negative Ranks	3 ^a	3,50	10,50
	Positive Ranks	3 ^b	3,50	10,50
	Ties	0 ^c		
	Total	6		
faktori740 - faktori7_20geeli	Negative Ranks	3 ^d	2,67	8,00
	Positive Ranks	3 ^e	4,33	13,00
	Ties	0 ^f		
	Total	6		
f840 - f820	Negative Ranks	1 ^g	5,00	5,00
	Positive Ranks	6 ^h	3,83	23,00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	7		
f840 - f8_20geeli	Negative Ranks	1 ^j	3,00	3,00
	Positive Ranks	6 ^k	4,17	25,00
	Ties	0 ^l		
	Total	7		

a. faktori740 < faktori720

b. faktori740 > faktori720

c. faktori740 = faktori720

d. faktori740 < faktori7_20geeli

e. faktori740 > faktori7_20geeli

f. faktori740 = faktori7_20geeli

g. f840 < f820

h. f840 > f820

i. f840 = f820

j. f840 < f8_20geeli

k. f840 > f8_20geeli

l. f840 = f8_20geeli

Test Statistics^a

	faktori740 - faktori720	faktori740 - fakto- ri7_20geeli	f840 - f820	f840 - f8_20geeli
Z	,000 ^b	-,524 ^c	-1,521 ^c	-1,866 ^c
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,600	,128	,062
Exact Sig. (2-tailed)	1,000	,688	,156	,078
Exact Sig. (1-tailed)	,531	,344	,078	,039
Point Probability	,063	,063	,023	,016

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

c. Based on negative ranks.

Wilcoxon Signed Ranks Test, proteiini S:n ja lupusantikoagulantin tulokset.

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
ProtS40 - ProtS20	Negative Ranks	4 ^a	4,00	16,00
	Positive Ranks	4 ^b	5,00	20,00
	Ties	1 ^c		
	Total	9		
ProtS40 - ProtS_20geeli	Negative Ranks	3 ^d	6,33	19,00
	Positive Ranks	5 ^e	3,40	17,00
	Ties	1 ^f		
	Total	9		
lupu_40ratio - lupu_20ratio	Negative Ranks	5 ^g	3,30	16,50
	Positive Ranks	1 ^h	4,50	4,50
	Ties	3 ⁱ		
	Total	9		
lupu_40ratio - lupu_20geeliratio	Negative Ranks	7 ^j	4,57	32,00
	Positive Ranks	1 ^k	4,00	4,00
	Ties	1 ^l		
	Total	9		

a. ProtS40 < ProtS20

b. ProtS40 > ProtS20

c. ProtS40 = ProtS20

d. ProtS40 < ProtS_20geeli

e. ProtS40 > ProtS_20geeli

f. ProtS40 = ProtS_20geeli

g. lupu_40ratio < lupu_20ratio

h. lupu_40ratio > lupu_20ratio

i. lupu_40ratio = lupu_20ratio

j. lupu_40ratio < lupu_20geeliratio

k. lupu_40ratio > lupu_20geeliratio

l. lupu_40ratio = lupu_20geeliratio

Test Statistics^a

	ProtS40 - ProtS20	ProtS40 - ProtS_20geeli	lupu_40ratio - lupu_20ratio	lupu_40ratio - lu- pu_20geeliratio
Z	-,282 ^b	-,141 ^c	-1,276 ^c	-1,975 ^c
Asymp. Sig. (2-tailed)	,778	,888	,202	,048
Exact Sig. (2-tailed)	,844	,922	,281	,063
Exact Sig. (1-tailed)	,422	,461	,141	,031
Point Probability	,047	,027	,031	,016

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.