

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAK13

2016

Terttu Kankare & Hanna Toivonen

COBAS e 411 - ANALYSAATTORIN VALIDOINTI

– B12- ja D-vitamiinitutkimukset

Terttu Kankare & Hanna Toivonen

COBAS e 411 -ANALYSAATTORIN VALIDOINTI

– B12- ja D-vitamiinitutkimukset

B12-vitamiinia tarvitaan ihmisen elimistössä solujen nukleiinihappojen valmistamiseen. Elimistö ei itse pysty valmistamaan B12-vitamiinia, vaan sitä saadaan eläinperäisestä ruoasta. Kokonais-B12-vitamiinimääritys P-B12-Vit on yleisimmin käytetty veren B12-vitamiinipitoisuuden laboratoriotutkimus.

D-vitamiini on sekä ravinnosta saatava vitamiini että elimistön muodostama hormoni. D-vitamiinin kahdesta muodosta D2-vitamiinia saadaan ravinnosta tai lisäravinteista ja D3-vitamiinia muodostuu ihossa auringon ultraviolettivalon vaikutuksesta. D-vitamiinin pitoisuutta veressä mitataan laboratoriotutkimuksessa P-D-vitamiini-25-OH.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutukseen hankitun Cobas e 411 -analyyttorin validointi B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta. Työssä tarkasteltiin Cobas e 411 -analyyttorin toistettavuutta B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta ja Cobas e 411 -analyyttorin tulostasoa verrattiin referenssilaitteena toimineeseen Tykslabin Cobas e 602 -analyyttorin tulostasoon näissä tutkimuksissa. Tavoitteena oli saada Cobas e 411 -analyyttorin opetuskäyttöön B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta sekä mahdollistaa Tykslabin kanssa yhtenäisten viitearvojen käyttö näissä tutkimuksissa.

Tuloksia tarkasteltaessa havaittiin, että Cobas e 411 -analyyttorin ja Tykslabin Cobas e 602 -analyyttorin tulokset olivat keskenään korreloivia ja yhteneviä B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta. B12-vitamiinitutkimuksen tulokset olivat toistettavia Cobas e 411 -analyyttorilla. D-vitamiinitutkimuksen osalta Cobas e 411 -analyyttorin toistettavuudessa oli tilastollisia eroja. Kliininen merkitsevyys todettiin kuitenkin hyväksi molemmissa tutkimuksissa. Opinnäytetyön tuloksena B12- ja D-vitamiinitutkimukset voitiin ottaa opetuskäyttöön Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksessa. Näiden tutkimusten osalta voidaan käyttää Tykslabin kanssa yhtenäisiä viitearvoja.

ASIASANAT:

B12-vitamiini, D-vitamiini, Cobas e 411, validointi

Terttu Kankare & Hanna Toivonen

VALIDATION OF COBAS E 411 -ANALYZER

– Vitamin B12 and vitamin D assays

Vitamin B12 is needed in human body to produce cell DNA. Human body can't produce vitamin B12 by itself. Food of animal origin contains vitamin B12. Complete vitamin B12 assay is commonly used assay for measuring blood vitamin B12 levels.

Nutrient includes vitamin D. Human body is also capable to form vitamin D as a hormone. Vitamin D has two forms: vitamin D2 is related to food or dietary supplement and vitamin D3 is formed in the skin influenced by ultraviolet light from the sun. Blood vitamin D levels are measured in P-D-vitamin-25-OH assay.

The purpose of this thesis was to validate vitamin B12 and vitamin D assays for the new Cobas e 411 analyzer of Turku University of Applied Sciences. In this thesis Cobas e 411 analyzers repeatability in vitamin B12 and vitamin D assays was studied. The result levels between Cobas e 411 analyzer and Tykslabs Cobas e 602 reference analyzer were compared in these assays. This thesis's target was to get Cobas e 411 -analyzer in use in student labs and enable Turku University of Applied Sciences to use Tykslabs reference values of vitamin B12 and vitamin D assays.

When studying results it was discovered that the results between Cobas e 411 analyzer and Tykslabs Cobas e 602 analyzer correlated each other well and results were congruent in vitamin B12 and vitamin D assays. The results of vitamin B12 assay were repeatable with Cobas e 411 analyzer. However statistical differences were found in vitamin D assay with Cobas e 411 analyzer. Clinical significance was found good in both assays. As the result of the thesis Turku University of Applied Sciences can start to use vitamin B12 and vitamin D assays in student labs and Tykslabs reference values can be used in these assays.

KEYWORDS:

Vitamin B12, Vitamin D, Cobas e 411, validation

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	1
2 B12- JA D-VITAMIINITUTKIMUSTEN VALIDOINTI	3
2.1 B12-vitamiini	3
2.2 D-vitamiini	5
2.3 Cobas e 411 ja e 602 -analysointilaitteet	8
2.4 Kemiluminesenssi ja elektrokemiluminesenssi	9
2.5 Validointi	10
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	14
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	15
4.1 Tutkimuksen toteutus	15
4.2 Tilastollinen käsittely	17
4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	18
4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	19
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	21
5.1 Tunnusluvut	22
5.2 Tulosten korrelaatio	24
5.3 Tulosten yhtenevyys	27
5.4 Tulosten toistettavuus	27
5.5 Tulokset, erotukset ja ero prosentit	30
5.6 Tulosten sijoittuminen viiterajoihin ja vitamiinipitoisuuksien tulkintoihin	35
5.7 Kliininen merkitsevyys	38
6 POHDINTA	41
LÄHTEET	44

KUVAT

Kuva 1. Cobas e 411 -analysointilaitteisto.

8

KUVIOT

Kuvio 1. B12-vitamiini Cobas e 602 -analysointilaitteen tulokset vs. Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvot.	23
Kuvio 2. D-vitamiini Cobas 602 -analysointilaitteen tulokset vs. Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulokset.	24
Kuvio 3. D-vitamiini Cobas e 602 -analysointilaitteen tulokset vs. Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 2 tulokset.	25
Kuvio 4. B12-vitamiini Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulokset vs. ajo 2 tulokset.	27
Kuvio 5. D-vitamiini Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulokset vs. ajo 2 tulokset.	28
Kuvio 6. Cobas e 602 B12-vit. tulosten sijoittuminen viiterajoihin ja Cobas e 411 tulosten ka sijoittuminen viiterajoihin.	34
Kuvio 7. Cobas e 602 D-vit. tulosten tulkinta ja Cobas e 411 D-vit. ajo 1 tulosten tulkinta.	35
Kuvio 8. Cobas e 602 D-vit. tulosten tulkinta ja Cobas e 411 D-vit. ajo 2 tulosten tulkinta.	36

TAULUKOT

Taulukko 1. P-D-vitamiini-25-OH pitoisuuksien tulkinta (Käypä hoito 2014).	7
Taulukko 2. B12-vitamiinin tunnusluvut.	21
Taulukko 3. D-vitamiinin tunnusluvut.	22
Taulukko 4. B12-vitamiinin tulokset.	30
Taulukko 5. Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyt B12-vitamiinitulokset.	31
Taulukko 6. D-vitamiini Cobas e 602 ja Cobas e 411 ajo 1 tulokset.	32
Taulukko 7. D-vitamiini Cobas e 602 ja Cobas e 411 ajo 2 tulokset.	33

1 JOHDANTO

Yleensä riittävän monipuolinen ravinto tyydyttää elimistön vitamiinitarpeen (Lääkäriin käsikirja 2014). B12-vitamiinin puutetta on aiemmin pidetty harvinaisena. Se on kuitenkin osoittautunut yleiseksi sairaudeksi, jonka oireet ovat monimuotoisia ja epäspesifisiä. (Irrjala ym. 2005.) Myös D-vitamiinin liian vähäinen saanti on Suomessa yleistä (Lääkäriin käsikirja 2014).

Ihmisen elimistö tarvitsee B12-vitamiinia solujen nukleiinihappojen valmistamiseen. B12-vitamiinia saa tarpeeksi normaalista ruokavaliosta. B12-vitamiinin puutosta esiintyy pääasiassa ikääntyneillä. Noin 10 % yli 65-vuotiaista suomalaisista on todettu B12-vitamiinin puutos. Vanhemmalla väestöllä pääasiallinen syy vitamiinin puutokseen on sen imeytymishäiriö. Vitamiinin imeytymishäiriöstä kärsiville ja tiukkaa kasvisruokavaliota noudattaville suositellaan B12-vitamiinilisää. (Salonen 2015.) B12-vitamiinin puutos on kehittyvissä maissa paljon yleisempää kuin länsimaissa, jolloin vitamiinin riittämättömän saanti johtuu eläinperäisten ruokien vähäisestä määrästä ravinnossa. Puutos alkaa usein nuorena kestäen koko eliniän. (Allen 2008.)

D-vitamiini on tavoittanut niin tieteellisten ja lääketieteellisten yhteisöjen, ruokateollisuuden kuin yleisönkin huomion kuluneen 15 vuoden aikana. Tämän todistaa tieteellisen D-vitamiinia käsittelevän kirjallisuuden räjähdysmäinen lisääntyminen sekä lääkäreiden potilaille pyytämien D-vitamiinitutkimusten voimakas nousu. Ruokavaliosuosituksia on uudelleenarvioitu, D-vitamiinilisien myynti on noussut ja kaappoihin on tullut paljon D-vitaminoituja elintarvikkeita. (Cashman ym. 2016.)

D-vitamiinin terveyshyödyistä on saatu paljon uutta tietoa viime vuosien aikana. D-vitamiinin saannilla on yhteys muun muassa luunmurtumien ehkäisyyn ja sillä on todettu olevan verenpainetta kohottavan reniinin tuotantoa vähentävä vaikutus. D-vitamiinin saantisuosituksista nostettiin vuonna 2014. Yli kaksivuotiailla, nuorilla ja aikuisilla saantisuositus on 10 µg/vrk sekä yli 75-vuotiailla 20 µg/vrk. (Fogelholm ym. 2014.) D-vitamiinin korvausannoksesta talvikautena ei ole päästy yksimielisyyteen ja annokseksi on ehdotettu jopa 100 µg/vrk (Paakkari 2013).

Turun ammattikorkeakoulun Ruiskadun toimipisteen kliinisen biokemian opetukseen hankittiin keväällä 2015 uusi immunokemian analysaattori. Cobas e 411 -analysaattori on suunniteltu vastaamaan pienten laboratorioiden tarpeita immunokemiallisten määri-

tysten osalta (Roche 2009). Analyysaattori tulee validoida B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta, jotta tutkimukset voidaan ottaa käyttöön. Validoinnin tarkoituksena on osoittaa analyysimenetelmän sopivuus käyttötarkoitukseen ja se on tärkeä toimenpide tulosten luotettavuuden kannalta. (Matveinen ym. 2005).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on Cobas e 411 -analyysaattorin validointi B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta. Validoinnissa varmistetaan Cobas e 411 -analyysaattorin toistettavuus B12- ja D-vitamiinitutkimuksissa ja verrataan analyysaattorin tulostasoa Tykslabin Cobas e 602 -analyysaattorin tulostasoon näiden tutkimusten osalta. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on saada Cobas e 411 -analyysaattori opetuskäyttöön B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta sekä mahdollistaa Tykslabin kanssa yhtenäisten viitearvojen käyttö näissä tutkimuksissa.

2 B12- JA D-VITAMIINITUTKIMUSTEN VALIDOINTI

2.1 B12-vitamiini

B12-vitamiini eli kobalamiini toimii koentsyyminä useissa kemiallisissa reaktioissa. Vitamiini muodostuu kobolttiatomista ja korriinirenkaasta. (Hänninen 2004.) B12-vitamiinia tarvitaan solujen nukleiinihappojen valmistamiseen ja se on välttämätöntä nopeasti jakautuvien kudosten, kuten luuydinsolujen ja suolen seinämän solujen, jakautumiselle (Penttilä 2004a; Salonen 2015). Elimistö ei itse pysty valmistamaan B12-vitamiinia, vaan sitä saadaan eläinperäisestä ruoasta, kuten sisäelimistä, maitotuotteista, kanamunista, lihasta ja kalasta. Eläinperäisestä ravinnosta ihminen saa päivittäin noin 5–15 mg B12-vitamiinia, mikä ylittää selvästi minimitarpeen. B12-vitamiinin minimitarve on aikuisilla 3 µg vuorokaudessa. (Savolainen & Parviainen 2010.)

Vitamiinin imeytymiseen vaaditaan *intrinsic factoria*, jota mahan limakalvo erittää (Penttilä 2004a). *Intrinsic factor* on B12-vitamiinia sitova glykoproteiini. B12-vitamiini ja *intrinsic factor* muodostavat kompleksin, joka otetaan elimistön käyttöön suolen seinämän solujen kautta. (Penttilä 2004b.) Ohutsuolesta imeytynyt B12-vitamiini varastoituu maksaan (Penttilä 2004a).

B12-vitamiinin puutos voi syntyä hitaasti pitkän ajan, jopa vuosien, kuluessa (Penttilä 2004a). Vitamiinipuutoksen syynä on lähes poikkeuksetta vitamiinin puutteellinen imeytyminen elimistöön (Savolainen & Parviainen 2010). Tämän aiheuttaa yleensä vaurio mahalaukun limakalvossa, jolloin *intrinsic factoria* ei muodostu ja B12-vitamiini ei imeydy elimistöön (Penttilä 2004b). Muita B12-vitamiinin puutoksen aiheuttajia voivat olla Crohnin tauti, synnynnäinen B12-vitamiinin malabsorptio, puutteellinen ravinto tai laipamato (Punnonen 2010). Mikäli B12-vitamiinia ei kerry tarpeeksi tai se ei imeydy, seurauksena saattaa syntyä anemia tai hermoston oireita (Salonen 2015). B12-vitamiinin puute on Suomessa yleisin megaloblastisen anemian aiheuttaja (Punnonen 2010). Megaloblastisessa anemiassa DNA-synteesi on häiriintynyt, jonka seurauksena solujen jakaantuminen on hidastunut ja eräiden solutyyppeiden ja niiden tumien koko kasvanut (Savolainen & Parviainen 2010).

Wong, Ip, Leung, Leung, Cheng ja Siu (2015) tutkivat B12-vitamiinin puutoksen ja foliaatin puutoksen yleisyyttä yli 65-vuotiailla laitosasukkailla. Tutkimuksessa mitattiin seerumin B12-vitamiinipitoisuudet 2176 yli 65-vuotiaalta laitosasukkaalta vuosina

2011–2013. 80 asukkaalla oli jo valmiiksi B12-vitamiinilisä käytössä ja 100 asukasta oli letkuruokinnassa. Jäljellä olevista 1996 asukkaasta 858 (43 %) oli miehiä ja 1138 (57 %) oli naisia. Kaikilta oli mitattu seerumin B12-vitamiinipitoisuus aikaisemmin, mutta vain 1885 asukkaalta oli mitattu seerumin folaatti. Seerumin B12-vitamiinin keskiarvo oli 227 pmol/l ja folaatin 16,2 nmol/l. 34,9 prosentilla oli B12-vitamiinin puutos (seerumin B12-vitamiinipitoisuus alle 150 pmol/l) ja 11,8 prosentilla oli folaatin puutos (seerumin folaatti alle 6,8 nmol/l). B12-vitamiinin puutoksen yleisyydessä ei ollut eroa naisten ja miesten välillä, mutta miehillä oli naisia enemmän folaatin puutosta (16,2 % vs. 8,5 %). Asukkailla, joilla oli B12-vitamiinin puutos, B12-vitamiinin keskiarvopitoisuus oli 110 pmol/l ja folaatin puutosta sairastavilla folaatin keskiarvopitoisuus 5,4 nmol/l. Vain 4,9 prosentilla oli sekä B12-vitamiinin että folaatin puutos. B12-vitamiinin puutoksen yleisyys on 34,9 % yli 65-vuotiailla laitosasukkailla. Suurin osa (68 %) B12-vitamiinin puutoksista eivät olleet vakavia puutoksia. 24,2 prosentilla B12-vitamiinin puutosta sairastavilta asukkailla löydettiin makrosytoosi. Makrosyytoosin esiintymisessä huomattiin merkittävä nousu, kun seerumin B12-vitamiinipitoisuus laski alle 100 pmol/l.

Plasman tai seerumin immunokemiallinen kokonais-B12-vitamiinimääritys on yleisimmin käytetty veren B12-vitamiinipitoisuuden laboratoriotutkimus (Hänninen 2004). B12-vitamiinipitoisuus ei kuitenkaan suoraan kuvasta biologisesti aktiivisen B12-vitamiinin määrää, koska vain noin 10–20 % vitamiinista on biologisesti aktiivisena ja suurin osa varastoituneessa muodossa. Vaikka B12-vitamiinin kokonaispitoisuus olisikin viitealueella, B12-vitamiinin puutostila saattaa olla olemassa. (Irjala ym. 2005.) Tällöin suositellaan B12-vitamiinin biologisesti aktiivisen muodon mittaamista (Savolainen & Parvainen 2010). Suomen laboratorioista ainakin Huslab ja Nordlab suosittlevat B12-vitamiinin puutteen selvittelyssä ensisijaisena tutkimuksena aktiivisen B12-vitamiinin määrittystä S-B12-TC2 (Huslab 2013; Nordlab 2015).

Potilailla, joilla on riittävä B12-vitamiinipitoisuus, mutta epäillään B12-vitamiinin puutosta esimerkiksi makrosyyttisen anemian tai neurologisten oireiden takia tulisi tutkia lisäksi veren homokysteiniini ja metyyylimalonaatti (Wainwright ym. 2015). Metyyylimalonaattia ja homokysteiniinia kertyy elimistöön B12-vitamiinin puutteen seurauksena, ja niitä voidaan tutkia laboratoriotutkimuksilla P-Hcyst ja S-MetMal (Yhtyneet Medix Laboratoriot 2015a; Yhtyneet Medix Laboratoriot 2015b).

P-B12-Vit -tutkimuksen viitearvo on 145–570 pmol/l. Sentrifugoimaton näyte säilyy huoneenlämmössä kuusi tuntia. Eroteltuna näyte säilyy huoneenlämmössä yhden vuorokauden, jääkaapissa kaksi vuorokautta ja pidempiaikaiseen säilytykseen näyte pa-

kastetaan. (TYKSLAB 2014.) Näytteen hemolyysi ei aiheuta häiriötä B12-vitamiinimäärityksessä, kun näytteen hemoglobiinipitoisuus on alle 1,0 g/dl. Näytteen lipemia ei aiheuta häiriötä määrittämisessä, kun näytteen triglyseridipitoisuus on alle 1500 mg/dl. (Vitamin B12 2015.)

2.2 D-vitamiini

D-vitamiini on sekä ravinnosta saatava vitamiini että elimistön muodostama hormoni (Koskinen 2010). Tarkemmin D-vitamiini on rasvaliukoinen steroidi-hormonin esiaste. Kaksi D-vitamiinin tärkeintä muotoa ovat D3 eli kolekalsiferoli ja D2 eli ergokalsiferoli. Ihmisen elimistö ei pysty tuottamaan D2-vitamiinia, vaan se saadaan ravinnosta tai lisäravinteesta. (Vitamin D total 2015.) D3-vitamiinia muodostuu ihossa auringon ultraviolettivalon vaikutuksesta 7-dehydrokolesterolin muuttuessa D3-vitamiiniksi (Penttilä 2004a; Aro 2005; Koskinen 2010). Auringon ultraviolettivaloaltistus on ratkaiseva vitamiinin saannissa, sillä vain harvat ruoat sisältävät D-vitamiinia (Savolainen & Parviainen 2010). Ravinnosta vitamiinia saa kalaruoista sekä D-vitamiinilla täydennetyistä ravintorasvoista ja maitovalmisteista (Koskinen 2010). Kasvikuntaperäinen D2-vitamiini on merkitykseltään vähäinen sen heikon hyödynnettävyyden, muun muassa huonomman imeytymisen, takia (Savolainen & Parviainen 2010).

Kesällä muodostunut D-vitamiinivarasto loppuu noin 1–2 kuukaudessa. Tästä johtuen talvisin tarvitaan D-vitamiinilisää. (Paakkari 2013.) D-vitamiinilisäksi suositellaan ensisijaisesti vitamiinin D3-muotoa, sillä se on vitamiinin D2-muotoa tehokkaampi (Hermanson 2012). Vuonna 2014 D-vitamiinin saantisuosituksia nostettiin yli kaksivuotiailla, nuorilla ja aikuisilla 10 mikrogrammaan vuorokaudessa sekä yli 75-vuotiailla 20 mikrogrammaan vuorokaudessa. (Fogelholm ym. 2014).

D-vitamiini lisää kalsiumin ja fosfaatin imeytymistä suolistosta verenkiertoon ja ylläpitää luuston mineralisaatiota (Koskinen 2010). D-vitamiini vaikuttaa myös lihaksiston toimintaan muun muassa pienentämällä kaatumistapaturmien riskiä. (Aro 2005). Ilman D-vitamiinia kalsiumista imeytyy elimistöön vain 10–15 prosenttia (Holick ym. 2011). Vitamiinilla on myös immunologisia ja solujen lisääntymiseen ja uudistumiseen kohdistuvia vaikutuksia (Aro 2005).

D-vitamiini on biologisesti reaktiokyvytön ja se käy läpi kaksi peräkkäistä hydroksylaatiota maksassa ja munuaisissa. D-vitamiini on veressä sitoutuneena sitojaproteiiniin, joka siirtää sen maksaan. Maksassa D-vitamiini hydroksyloituu muodostaen 25-hydroksi-D-vitamiinia eli kalsidiolia, joka on aktiivisen D-vitamiinin esiaste. Toinen hydroksylaatio tapahtuu munuaisissa, jolloin muodostuu biologisesti aktiivista 1,25-dihydroksi-D-vitamiinia eli kalsitriolia. (Vitamin D total 2015.) Lisäkilpirauhasten tuottama parathormoni lisää munuaisissa aktiivisen D-vitamiinin tuotantoa (Koskinen 2010).

D-vitamiinin puutos aiheuttaa lihasheikkoutta, hypotoniaa ja luustomuutoksia. D-vitamiinin puutos on nykyään harvinainen suomalaisilla lapsilla tehokkaiden D-vitamiinin supplementaatiohoitojen ansiosta. Altistavia tekijöitä D-vitamiinin puutokselle ovat pitkä imetysaika ja ruoansulatuskanavan taudit. (Weber 2010.) Myös D-vitamiinin imeytymishäiriö voi johtaa D-vitamiinin puutukseen. Eräiden epilepsialääkkeiden pitkäaikainen käyttö voi vähentää D-vitamiinin muodostumista maksassa. (Penttilä 2004a.) D-vitamiinin synteesi ihosta on tummaihoisilla heikompi kuin vaaleaihoisilla (Weber 2010). Vitamiinin puutos voi johtaa osteomalasiaan aikuisilla ja riisitautiin lapsilla. D-vitamiinin puutetta esiintyy varsinkin vanhemmalla väestöllä. (Savolainen & Parviainen 2010).

D-vitamiinin alhainen taso on yhdistetty muun muassa 1 tyypin diabetekseen, eräisiin syöpiin ja sydän- ja verisuonitauteihin, autoimmuunisairauksiin ja synnynnäiseen vastustuskykyyn. D-vitamiinin on myös osoitettu vaikuttavan yli 200 geenin ilmentymiseen. (Vitamin D total 2015.) Todennäköisesti D-vitamiinin riittävällä saannilla on ihmisen terveydelle paljon laajempi merkitys kuin aikaisemmin on ajateltu (Koskinen 2010).

D-vitamiinin pitoisuutta veressä voidaan mitata laboratoriotutkimuksella P-D-vitamiini-25-OH (TYKSLAB 2014). Veren 25-hydroksi-D-vitamiinipitoisuuden on todettu kuvastavan sekä endogeenista että eksogeenista vitamiininsaantia (Aro 2005). 25-hydroksi-D-vitamiini määritetään, kun halutaan selvittää kokonais-D-vitamiinitilanne, koska se on D-vitamiinin varastomuoto. 25-hydroksi-D-vitamiinia on elimistössä noin tuhat kertaa enemmän kuin vitamiinin aktiivista 1,25-dihydroksi-muotoa. Suurin osa mitattavasta D-vitamiinista on D3-vitamiinia. (Vitamin D total 2015.) D-vitamiinin päivittäinen 15–20 mikrogramman lisäsaanti nostaa veren kalsidiolipitoisuuden keskimäärin tasolle 50 nmol/l ja 40–50 mikrogramman lisäsaanti tasolle 75 nmol/l (Paakkari 2013).

Rouillon, Dubourg, Gauvain, Baron, Glemarec, Cormier, Guillot ja Pascale (2012) arvioivat tutkimuksessaan D-vitamiinitason puutostilaan Ranskassa yleisimmin käytetyn protokollan tehokkuutta. Tutkimukseen osallistuvien potilaiden D-25-Vit -taso oli alle 30 ng/ml. Tutkimukseen osallistui 257 osteoporoosipotilasta, jotka saivat kahden viikon välein D3-vitamiiniannoksen, jonka suuruus riippui seerumin D25-pitoisuudesta. Tulokseksi saatiin, että D3-vitamiinin antaminen nosti seerumin D25-tasoa potilailla, joiden painoindeksi oli alle 25 mutta ei ylipainoisilla potilailla. Melkein puolella potilaista seerumin D25-taso oli kaksi kuukautta hoidon lopettamisen jälkeen alle 30 ng/ml, joten tutkijat suosittelivat näille osteoporoosipotilaille säännöllistä D3-vitamiinilisää jatkossakin.

D-vitamiinitutkimuksista vain 25-hydroksi- ja 1,25-dihydroksi-D-vitamiinimäärityksillä on kliinistä käyttöarvoa. 25-hydroksi-D-vitamiinimäärityksellä voidaan todeta sekä D-vitamiinin puutos että yliannostuksen aiheuttama toksinen pitoisuus. 1,25-dihydroksi-D-vitamiinimääritystä käytetään riisitaudin, hyperkalsemian ja munuaisvaurion aiheuttaman luutaudin selvittelyssä. (Risteli & Risteli 2010.) P-D-vitamiini-25-OH-tutkimuksen viitearvot ja tavoitetasot vaihtelevat lähteen ja määrittämenetelmän mukaan (HUSLAB 2015). P-D-vitamiini-25-OH-tutkimuksen tavoitearvo on kaikilla yli 50 nmol/l (TYKSLAB 2015). Tutkimuksen pitoisuuksien tulkinta on esitetty taulukossa (Taulukko 1).

Taulukko 1. P-D-vitamiini-25-OH pitoisuuksien tulkinta (Käypä hoito 2014).

Pitoisuus	Tulkinta
< 25 nmol/l	vakava puutos
< 50 nmol/l	puutos
50–75 nmol/l	yleensä riittäväksi katsottu pitoisuus
75–120 nmol/l	tavoite osteoporoosipotilailla
> 375 nmol/l	toksinen pitoisuus

P-D-vitamiini-25-OH -näyte tulee suojata suoralta auringon valolta. Huoneenlämmössä säilytetty näyte tulee analysoida vuorokauden kuluessa. Säilytettäessä näytettä yli vuorokauden säilytys tapahtuu jääkaapissa tai pakastimessa. Erotettu plasma säilyy 4 vrk jääkaappilämpötilassa ja tätä pidemmän ajan pakastettuna. (TYKSLAB 2014.) Näyt-

teet, joissa on silmin havaittavaa hemolyyasia, voivat antaa epäluotettavia tuloksia. Kun näytteen hemoglobiinipitoisuus ylittää 2 g/l, tuloksista saattaa tulla todellista korkeampia. Näytteen lipeemisyys ei aiheuta häiriötä D-vitamiinimäärityksessä, kun veren rasvapitoisuus on alle 400 mg/dl. (Vitamin D total 2015.)

2.3 Cobas e 411 ja e 602 -analysaattorit

Turun ammattikorkeakoulun Ruiskadun toimipisteeseen hankittu Cobas e 411 -analysaattori (Kuva 1) on täysin automatisoitu immunokemian analysaattori, jolla voidaan tehdä sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia määryksiä (Roche Diagnostics 2013). Analysaattori on suunniteltu pienille laboratorioille, joiden analysointitarve on 25 000–250 000 testiä vuodessa tai 50–250 näytettä päivässä (Roche 2015). Laitteen nykyaikainen elektrokemiluminesenssitekniikka (ECL) mahdollistaa erinomaisen analyttisen suorituskyvyn. Analysaattori tarjoaa laajan valikoiman immunokemian analyysejä. (Roche 2009.)



Kuva 1. Cobas e 411 -analysaattori.

Cobas e 411 -analysaattorilla voidaan analysoida jopa 86 testiä tunnissa. Näytemateriaalina voidaan käyttää muun muassa seerumia, plasmaa tai virtsaa, joita tarvitaan määrittämisestä riippuen 10–50 µl. Analysaattoria on sekä kiekkomallina että telinemallina. Kiekkomallissa on 30 ja telinemallissa 75 paikkaa näytteille, kalibraattoreille ja kontroleille. (Roche 2016a.) STAT (Short Turn Around Time) -paikalla voidaan analysoida kiireellisiä näytteitä, jolloin analyysiaika on lyhyempi (Roche Diagnostics 2013). Analysaattorilla on mahdollista määrittää lähes 100 tutkimusta. Analysaattorilla voidaan tehdä anemia-, luumerkkiaine-, sydänmerkkiaine-, diabetes-, hedelmällisyys-, hormoni-, peruskemia-, kasvuhormoni-, hepatiitti-, tartuntatauti-, reuma-, spesifinen proteiini-, lääkeaine-, kilpirauhas- ja kasvainmerkkiainemäärittäksiä. (Roche 2016a.)

Tykslabissa käytössä oleva Cobas e 602 -analysaattori on suurten laboratorioden tarpeisiin suunniteltu täysin automatisoitu immunokemian analysaattori. Analysaattori käyttää elektrokemiluminesenssitekniikkaa (ECL) tarjoten laajan valikoiman laboratoriomäärittäksiä. Cobas e 602 -analysaattorilla voidaan analysoida jopa 170 testiä tunnissa. Yhteen testiin tarvitaan näytemateriaalia määrittämisestä riippuen 1,5–35 µl. Analysaattorin tutkimusvalikoimaan kuuluvat samat tutkimukset kuin Cobas e 411 -analysaattorin tutkimusvalikoimaan. (Roche 2016b.)

2.4 Kemiluminesenssi ja elektrokemiluminesenssi

Kemiluminesenssissa viritysenergian aiheuttaa kemiallinen reaktio (Halonen 2004a). Kemiluminesenssissa hapetetaan orgaanista yhdistettä hapettimella. Hapetusreaktiot tapahtuvat katalyyttien, kuten entsyymien, metalli-ionien tai hemin läsnä ollessa. Hapettumalla virittyneet yhdisteet emittoivat valoa, josta saadaan mitattava kemiluminesenssi. (Halonen 2004a.) Menetelmän avulla vasta-aineeseen sitoutumaton ja sitoutunut substraatti voidaan erottaa täydellisesti toisistaan. Kemiluminesenssimäärittämisillä päästään toteuttamaan kvantitatiivista analytiikkaa hyvin pienilläkin pitoisuuksilla. Kemiluminesenssianalyysilaitteissa käytetään heterogeenisiä analyysitekniikoita, joissa erotteluvaihe tapahtuu paramagneettisten rautapartikkelien avulla. Rautapartikkelit erotetaan magneetikentässä. (Åkerman ym. 2010.) Kemiluminesenssia sovelletaan yleisesti vitamiinien, hormonien, proteiinien ja lääkeaineiden immunokemiallisissa määrittämisissä (Halonen 2004a).

Elektrokemiluminesenssissa, ECL, kemiluminesenssireaktio käynnistetään sähköisesti elektrodin pinnalla. Elektrokemiluminesenssia käytetään immunokemian määrittämisissä

sekä nukleiinihappomäärityksessä. (Halonen 2004a.) Elektrokemiluminesenssi-immunomääritystä, ECLIA, käytetään muun muassa kilpirauhas-, hormoni-, tuumori-markkeri- ja sydänmerkkiainemäärityksiin (Halonen 2004b). Elektrokemiluminesenssi-tekniikan etuja ovat hyvä herkkyys, lyhyet inkubaatioajat, soveltuvuus laajalle analyttivalikoimalle sekä laaja mittausalue, joka vähentää laimennosten tarvetta. Elektrokemiluminesenssitekniikan leima on myös erittäin stabiili ja ei-radioaktiivinen. Tämä mahdollistaa hyvin säilyvät käyttövalmiit reagenssit. (Roche Diagnostics 2011.)

Cobas e 411 -analysaattori käyttää kolmea elektrokemiluminesenssiin perustuvaa menetelmää. Nämä ovat kilpailu-, kaksoisvasta-aine- ja sidepalkkiperiaate. Kilpailuperiaatetta käytetään pienten ja kaksoisvasta-aineperiaatetta suurten analyttien määrittämiseen. Sidepalkkiperiaatetta käytetään vasta-aineiden määrittämiseen. (Roche Diagnostics 2011.)

Cobas e 411 ja e 602 -analysaattorit käyttävät B12- ja D-vitamiinimäärityksissä kilpailuperiaatetta (Vitamin B12 2015; Vitamin D total 2015). Kilpailuperiaatteen ensimmäisessä vaiheessa reaktiokuppiin pipetoidaan näytettä eli tutkittavaa antigeeniä ja spesifistä Rutenium-leimattua vasta-ainetta. Antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen. Seuraa toinen vaihe, jossa seokseen lisätään biotinyloitu antigeeni ja streptavidinimikropartikkelit. Biotinyloitu antigeeni sitoutuu vapaaksi jääneeseen Rutenium-leimattuun vasta-aineeseen, jolloin muodostuu vasta-ainehapteenikompleksi. Kompleksi sitoutuu edelleen mikropartikkeleihin. Toisen vaiheen jälkeen immunokomplekseja sisältävä reaktioseos imetään mittauskammioon, jossa immunokompleksit saadaan magneetin avulla elektrodin pinnalle. Loput reaktioseoksesta pestään pois ProCell-puskurin avulla. ProCell-puskurin mukana mittauskammioon tulee myös TPA:ta eli tripropylamiiniä. Elektrokemiluminesenssireaktio käynnistetään johtamalla elektrodille sähköinen jännite. (Roche Diagnostics 2011.) Syntynyt valoemissio mitataan valomonistinputkella (Halonen 2004b). Reaktiossa syntyneen valon määrä on kääntäen verrannollinen näytteessä olevaan antigeenimäärään (Roche Diagnostics 2011).

2.5 Validointi

Laboratoriomääritysten tulosten oikeellisuus voidaan todentaa osoittamalla, että mittausjärjestelmä tuottaa oikeita tuloksia kyseisestä näytetyypistä ja siinä olevien analysoitavien aineiden pitoisuuksista. Mittausjärjestelmään kuuluvat näyte, analyysimenetelmä, mittalaite ja mittaaja sekä mittausympäristö. Jotta analyysitulosten laatu voidaan

varmistaa, on kaikkia osatekijöitä seurattava riittävän tarkasti. Laatu saavutetaan huolellisesti suunnitelluilla, optimaalisesti kontrolloiduilla, tarkasti mitatuilla ja jatkuvasti kehitettävillä työvaiheilla (Westgard 2003). Analyysilaboratorioissa tärkeänä osana laatu toimintaa ovat sisäiset ja ulkoiset auditoinnit, joissa laboratorion laatujärjestelmän toimivuus tarkastetaan. Laatujärjestelmä perustuu laboratorion laatukäsikirjaan, jossa esitetään menetelmät ja menettelytavat, joilla laboratorio saavuttaa laatutavoitteensa ja osoittaa luotettavuutensa. Laadunvarmistuksen tavoitteena on, että analyysitulokset täyttää sille annetut vaatimukset ja että mittaukset ovat jäljitettäviä. (Lehtonen & Sihvonen 2006.)

Analyysipalveluita tuottavan laboratorion toiminnan on perustuttava validoitujen analyysimenetelmien käyttöön. Validoinnilla tarkoitetaan toimintaa tai prosessia, jolla todistetaan, että käytetty toimenpide, prosessi, laite tai menetelmä toimii odotetusti ja antaa oikeita ja tarkoituksenmukaisia tuloksia (Westgard 2003). Validoinnin tarkoituksena on osoittaa, että analyysimenetelmä on soveltuva aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin tuloksena saatava tieto ja jo olemassa oleva tieto sekä tausta-aineisto kerätään yhteen ja niiden perusteella voidaan todeta onko menetelmä luotettava. (Jaarinen & Niiranen 2005.)

Kemiallisen mittausten menetelmän validointi on tärkeää, jotta kemiallisesta analyysistä saadut tulokset olisivat luotettavia. Validoinnissa olennaista on arvioida mittausten menetelmän suorituskykyä. (Matveinen ym. 2005.) Kemiallisen mittausten menetelmän validointi on tarpeen kun halutaan todistaa, että mittausten menetelmän suorituskykyparametrit ovat riittävät tietyn analyttisen ongelman ratkaisuun. Validointi on tarpeellista muun muassa uutta menetelmää kehitettäessä, käytössä olevaa menetelmää uudistettaessa tai kun menetelmässä käytetään uutta mittalaitetta. Validoinnin laajuuteen vaikuttaa millaisia muutoksia mittausten menetelmään on tehty. Vaikka menetelmä olisi standardisoitu ja validoitu kansainvälisellä tasolla, tarvitaan käyttölaboratorion jonkinasteinen oma validointi tai oikeastaan menetelmän käyttökelpoisuuden tarkistus, jonka suorittaa oma henkilökunta laboratorion omissa olosuhteissa omille näytteille. Oma validointi voidaan suorittaa esimerkiksi sertifioidulla vertailumateriaalilla, jonka pitoisuus tunnetaan. (Matveinen ym. 2005.)

Abdel-Wareth, Haq, Turner, Khan, Salem, Mustafa, Hussein, Pallinalakam, Grundy, Patras ja Rajah (2013) vertasivat kahta eri analyysimenetelmää seerumin D2- ja D3-vitamiinin 25 -hydroksyloituneiden metaboliittien analysoinnissa. Toinen menetelmä oli Rochen elektrokemiluminometrinen menetelmä ja toinen Chromsystemin HPLC -

pohjainen menetelmä. Näytteinä toimivat 96 ylijäämäseerumia jotka analysoitiin molemmilla menetelmillä. Rochen ja Chromsystemin eri menetelmien tulosten yhtäpitävyysprosentiksi saatiin 84 %. Yhtäpitävyysprosentti oli 91 % näytteissä joissa D2-vitamiinipitoisuus oli vähemmän kuin 10 nmol/l ja 82 % näytteissä joissa pitoisuus ylitti 10 nmol/l. Tulosten kokonaiskorrelaatioarvoksi saatiin 0,77. Havaitulla poikkeamalla on vähän merkitystä kliiniseen päätöksentekoon, joten se on kliinisesti hyväksyttävä.

Laboratorion mittausmenetelmien tulee tuottaa jatkuvasti mahdollisimman tarkkaa ja luotettavaa tietoa mitattavasta muuttujasta (Lehtonen & Sihvonen 2006). Validoinnin suunnitteluun vaikuttavat oleellisesti näytteen ominaisuudet ja analyysitulosten validoinnilla on suora yhteys analyysitulosten laatuun (Jaarinen & Niiranen 2005). Analyysimenetelmän validoinnissa saaduilla tuloksilla osoitetaan, että validoitava menetelmä toimii hyväksyttävästi tehtävässään. Kriteerit validoinnin hyväksymiselle asettaa analyysilaboratorio, viranomainen tai asiakas. (Lehtonen & Sihvonen 2006.)

Laboratoriomenetelmien validoinnin osa-alueita ovat spesifisyys, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, mittausalue, stabiilius ja häiriönsietokyky. Menetelmän spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää analyytti riittävän tarkasti kaikkien mahdollisten näytteeseen liittyvien komponenttien joukosta. Lineaarisuuden kriteeriksi validoinnissa riittää yleensä se, että menetelmä on lineaarinen tietyllä mittausalueella. Analyysimenetelmän tarkkuus kuvaa sitä, miten lähellä toisiaan mitattu arvo ja oikea arvo ovat. Tarkkuutta voidaan arvioida vertaamalla omalla menetelmällä saatuja tuloksia toisen tarkaksi tunnetun menetelmän saamiin tuloksiin. Tarkkuuden kriteeriksi voidaan asettaa oikean ja mittauksessa saadun arvon sallittava erotus tai sen osuus prosentteina. (Lehtonen & Sihvonen 2006.) Toistettavuus liittyy testien väliseen vaihteluun, jossa arvioidaan toisistaan riippumattomien tunnetuissa olosuhteissa saatujen mittaus tulosten keskinäistä paikkansapitävyyttä (Jaarinen & Niiranen 2005). Analyysimenetelmän toistettavuus saadaan saman näytteen perättäisistä määrittämisistä tai rinnakkaismäärittämisistä. Toistettavuus voidaan määrittää suorittamalla useita rinnakkaismäärittämisistä erilaisista näytteistä eri pitoisuuksilla (Matveinen ym. 2005). Mittausalue muodostuu pitoisuusalueesta, jolla menetelmän lineaarisuuden, tarkkuuden ja toistotarkkuuden tasot ovat hyväksyttäviä. Analyysimenetelmän stabiilius voidaan selvittää toistamalla määrittäystä niin kauan, että vasteessa havaitaan selvä muutos. Toistokerroilla tulee käyttää samoja standardeja, liuoksia ja näytteitä. Häiriönsietokyvyllä tarkoitetaan menetelmän kykyä kestää pieniä muutoksia ympäristössä, esimerkiksi lämpötilan tai pH:n vaihtelua. (Lehtonen & Sihvonen 2006.)

Analyysilaitteen on tuotettava johdonmukaisesti riittävän tarkkoja tuloksia ja laitteen tulee olla sopiva siihen tarkoitukseen, johon sitä käytetään. Käytännössä aina ennen laitteen käyttöönottoa tulee osoittaa, että se on tarkoituksenmukainen vaadittavaan tehtävään. Ennen kuin laite otetaan käyttöön, se on kalibroitava ja validoitava. Pääta-voitteena validoinnissa ja kalibroinnissa on varmistaa ja osoittaa, että analyysilaitte täyttää laatujärjestelmään kirjatut tarpeellisuuden ja tarkoituksenmukaisuuden laatuksiteerit. Validointiprosessista tehdään kirjalliset dokumentit. Laboratoriolaitteiden validoinnin vaiheita ovat määritysten tarkastus, suunnittelun tarkastus, asennustarkastus, toiminnallinen tarkastus, suorituskyvyn tarkastus ja tietokoneistettujen laitteiden ja järjestelmien validointi. (Lehtonen & Sihvonen 2006.)

Validoinnista tehdään validointiraportti. Raportissa selvitetään miten menetelmä soveltuu aiottuun käyttötarkoitukseen ja miten menetelmän luotettavuuskriteerit täyttyvät. Validointiraporttiin kirjattavia tietoja ovat muun muassa menetelmän tavoite ja toteutus, mittausepävarmuuden arviointi ja laitteiden toimintakunto. Validoinnin yhteydessä muodostetaan myös laadunvarmistusmenettelyt uudelle menetelmälle sekä menetelmäohje. Noudatettaessa menetelmäohjetta validoinnilla saavutetut tuloksen luotettavuuden kriteerit toteutuvat. Mikäli menetelmää käytettäessä huomataan systemaattisia muutoksia laadunvarmistustulosten perusteella, validointi on uusittava. (Jaarinen & Niiranen 2005.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on Cobas e 411 -analysaattorin validointi B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta. Tutkimuksissa käytettävä menetelmä on validoitu laite-toimittaja Rochen toimesta. Koska B12- ja D-vitamiinitutkimukset otetaan Ruiskadulla käyttöön ensimmäistä kertaa, tarvitaan käyttölaboratorion oma validointi kyseisten tutkimusten osalta. Validoinnissa varmistetaan analysaattorin toistettavuus B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta ja selvitetään vastaako Cobas e 411 -analysaattorin tulostasoa Tykslabin Cobas e 602 -analysaattorin tulostasoa näissä tutkimuksissa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on saada Cobas e 411 -analysaattorin B12- ja D-vitamiinitutkimukset opetus- ja tutkimuskäyttöön sekä mahdollistaa Tykslabin kanssa yhtenäisten viitearvojen käyttö näiden tutkimusten osalta. B12- ja D-vitamiinitutkimukset ovat täysin uusia tutkimuksia Ruiskadun toimipisteessä ja niiden käyttöönotto tuo lisävalikoimaa opetuslaboratorion tutkimusvalikoimaan.

Tutkimusongelmat:

1. Ovatko Cobas e 411 -analysaattorin ja Tykslabin Cobas e 602 -analysaattorin tulokset keskenään korreloivia ja ovatko tulokset yhteneviä B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta?
2. Ovatko Cobas e 411 -analysaattorin tulokset B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta toistettavia?

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Tutkimuksen toteutus

Tässä opinnäytetyössä validoitiin Cobas e 411 -analysaattori B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta Turun ammattikorkeakoulun tilauksesta. Tutkimuspaikkana toimi Turun ammattikorkeakoulun Ruiskadun toimipisteen klinisen biokemian luokka 517. Opinnäytetyön tekeminen aloitettiin elokuussa 2015 osallistumalla laitetoimittajan järjestämään laitekoulutukseen. Opinnäytetyölle laadittiin tutkimussuunnitelma ja anottiin tutkimuslupa Turun ammattikorkeakoulun koulutusvastaavalta 9.12.2015. Tutkimuslupa saatiin 11.12.2015.

Tutkimusaineisto tilattiin Tykslabin osastolta 930. Aineistoksi pyydettiin mahdollisuuksien mukaan eritasoisia näytteitä. Tutkimusaineisto oli 20 kappaletta potilasnäytteitä tutkimusta kohden, eli B12- ja D-vitamiinitutkimuksille yhteensä 40 potilasnäytettä (n=40). Näytteet olivat pakastettua litiumhepariiniplasmaa. Tykslabin potilasnäytteiden hinta oli seitsemän euroa kappaleelta. Hinta kattoi näytteiden etsinnän ja käsittelyn kulut, yhteensä 280 euroa. Turun AMK vastasi näytteiden ja analysaattoritarvikkeiden kustannuksista. Kustannukset hyväksyttiin Ruiskadun koulutus- ja tutkimuspäälliköllä.

Opinnäytetyön käytännönosuus suoritettiin joulukuun aikana kahtena eri päivänä. Ensimmäisenä tutkimuspäivänä 21.12.2015 B12- ja D-vitamiinitutkimukset aktivoitiin analysaattorille ja suoritettiin kalibroinnit sekä ajettiin kontrollit. Ennen tutkimusten kalibrointia molempien tutkimusten kalibraattorit liuotettiin. Kalibrointiin käytettiin B12-vitamiinitutkimuksen osalta Vitamin B12 II CalSet -kalibraattoria, joka sisälsi kaksi tasoa, Cal 1 ja Cal 2. D-vitamiinitutkimuksen osalta kalibrointiin käytettiin Vitamin D total CalSet -kalibraattoria, joka sisälsi kaksi tasoa, Cal 1 ja Cal 2. Myös kontrollit liuotettiin. Kontrollina käytettiin PreciControl Varia -kontrollia, joka sisälsi kaksi tasoa, PC V1 ja PC V2. Ylijäänyt liuotettu kontrolli pakastettiin seuraavaa päivää varten. Kalibraattoreiden ja kontrollien ajoin käytetyt ProCell ja CleanCell -puskurit oli avattu 12.11.2015. Analysaattorille tehtiin myös tarvittavat puhdistus- ja huoltotoimenpiteet.

Näytteet haettiin Tykslabin osastolta 930 analysointipäivän aamuna 22.12.2015 ja kuljetettiin kylmälaukussa tutkimuspaikalle. Näytteiden annettiin sulaa hyvin huoneenlämmössä noin kaksi tuntia. Tämän jälkeen näytteet sekoitettiin käsin ja mikserillä sekä sentrifugoitiin.

Kontrollit otettiin -80 °C pakkasesta huoneenlämpöön sulamaan 25 minuuttia ennen analysaattoriin laittoa. Kontrollit ajettiin kaksi kertaa, koska ensimmäisellä kerralla analysaattori antoi virheilmoituksen. Kun kontrollit olivat menneet läpi, voitiin aloittaa näytteiden analysointi.

Näytteet numeroitiin ja Tykslabin tulokset kirjattiin ylös. Tarkasteltaessa näytteiden ulkonäköä, havaittiin yksi D-vitamiininäyte lievästi hemolyyttiseksi ja lipeemiseksi sekä ulkonäöltään puuromaiseksi. Muut 39 näytettä olivat ulkonäöltään laadukkaita. Tarvitavat reagenssit otettiin huoneenlämpöön puoli tuntia ennen kuin ne laitettiin analysaattoriin. B12-vitamiinitutkimuksen osalta käytettiin Vitamin B12 II -reagenssia ja D-vitamiinitutkimuksen osalta käytettiin Vitamin D total -reagenssia. Kontrolleihin ja näytteiden analysointiin käytetyt ProCell ja CleanCell -puskurit avattiin 22.12.2015.

Analysointipäivänä näytteet analysointiin ja kaikista näytteistä ajettiin myös rinnakkaiset määritykset. Kolmen näytteen kohdalla analysaattori antoi virheilmoituksen liian vähäisestä näytemäärästä, jolloin kyseiset näytteet siirrettiin näytekuppeihin ja analysoitiin uudelleen. Tämän jälkeen näytekuppeihin siirrettiin kaikki näytteet, jotka näyttivät silmä määrällisesti määrältään riittämättömiltä. Kahden D-vitamiininäytteen kohdalla tulos oli yli mittausalueen, joten nämä näytteet laimennettiin Diluent Universal -liuoksella ja analysoitiin uudelleen. Näytteiden analysointi kesti kokonaisuudessaan noin viisi tuntia. Samanaikaisesti B12- ja D-vitamiininäytteiden kanssa analysoitiin myös PSA-näytteitä toista opinnäytetyötä varten. Analysoinnin päätteeksi analysaattorille suoritettiin tarvittavat pesu- ja huoltotoimenpiteet sekä poistettiin analysointipäivänä tulostetut tulokset analysaattorin muistista.

Tulosten analysointi tapahtui Excel ja SPSS -tilasto-ohjelmien avulla. Tulokset analysoitiin keväällä 2016. Validoinnin tarkoituksesta, käytännön toteutuksesta, tuloksista ja tulosten tarkastelusta sekä johtopäätöksistä laadittiin laatuksikirjan liitteeksi validointiraportti. Validointiraportissa kuvattiin myös validoinnissa käytetyt reagenssit, kalibraattorit ja kontrollit. Koko opinnäytetyön käytännönosuuden ajan pidettiin laboratoriotyöpäiväkirjaa, johon kirjattiin kaikki työvaiheet ja tulokset sekä kalibraattoreiden, kontrollien ja muiden reagenssien eränumerot ja eräntymispäivät. Opinnäytetyötä ohjasi bioanalytikkokoulutuksen lehtori.

4.2 Tilastollinen käsittely

Cobas e 602- ja Cobas e 411 -analysaattoreiden antamien tulosten sekä Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten välistä riippuvuutta arvioitiin tilastollisen käsittelyn avulla. Tilastollista riippuvuutta tutkittiin Excel ja SPSS -ohjelmien avulla. Tilastollisella käsittelyllä tarkasteltiin tulosten korrelaatiota, yhtenevyyttä ja toistettavuutta. Referenssilaitteena käytettiin Tykslabin Cobas e 602 –analysaattoria, jonka antamat tulokset toimivat referenssiarvoina.

Ensimmäiseksi laskettiin korrelaatiokertoimet B12- ja D-vitamiinimääritysten tuloksille verrattaessa Cobas e 602 ja Cobas e 411 -analysaattoreiden välistä korrelaatiota. Korrelaatiokertoimia käytettiin myös Cobas e 411 -analysaattorin toistettavuutta tarkasteltaessa. Korrelaatiokertoimella, r , voidaan tarkastella muuttujien välisiä yhteyksiä. Korrelaatiokerroin kuvaa kahden muuttujan välistä voimakkuutta standardoidulla asteikolla $-1:n$ ja $1:n$ välillä. (Nummenmaa ym. 2014.) Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on arvoa $+1$, sitä voimakkaampi on muuttujien välinen positiivinen korrelaatio eli toinen muuttuja kasvaa toisen muuttujan kasvaessa. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on arvoa -1 , sitä voimakkaampi on muuttujien välinen negatiivinen korrelaatio eli kun toinen muuttuja kasvaa toisen muuttujan arvo pienenee. Kertoimen ollessa lähellä arvoa 0 , muuttujien välillä ei ole lineaarista riippuvuutta. (Heikkilä 2008.)

Analysaattoreiden välistä korrelaatiota tarkasteltaessa tuloksista muodostettiin sirontakuviot. Sirontakuviot muodostettiin myös tarkasteltaessa Cobas e 411 -analysaattorin toistettavuutta. Sirontakuviolla kuvataan graafisesti kahden numeerisen muuttujan välistä yhteyttä (Nummenmaa ym. 2014). Sirontakuviossa arvopareja kuvaavat pisteet sijoittuvat jollekin käyrälle. Jos kahden muuttujan välillä on lineaarinen riippuvuus ja toisen muuttujan käyttäytymistä voidaan selittää toisen muuttujan avulla, pystytään riippuvuutta kuvaamaan regressiosuoran avulla. (Heikkilä 2008.) Mitä selvemmin pisteet sijoittuvat regressiosuoralle, sitä voimakkaampi on muuttujien välinen yhteys (Nummenmaa ym. 2014). Sirontakuvioista saadaan selitysaste. Selitysaste kertoo, kuinka suuren osan selittävä muuttuja x selittää selitettävän muuttujan y vaihteluista. Selitysaste saadaan kun korrelaatiokertoimen arvo korotetaan toiseen potenssiin. Selitysaste ilmoitetaan usein prosentteina. (Heikkilä 2008.)

B12- ja D-vitamiinimääritysten tulosten yhtenevyyttä tarkasteltaessa suoritettiin one sample T-testi. B12- vitamiinimäärittelyn rinnakkaisajojen tulosten toistettavuutta tar-

kasteltaessa suoritettiin parierojen T-testi. T-testillä tarkistetaan, ettei tulos johdu sattumaisvaihtelusta vaan tuloksen voidaan olettaa esiintyvän myös perusjoukossa. Tämä osoittaa, että saatu tulos on oikeellinen. Testin tarkoituksena on tutkia, ovatko kahden ryhmän keskiarvot yhtä suuret. Muuttujien on oltava vähintään välimatkaasteikollisia ja noudatettava normaalijakaumaa, jotta T-testi voidaan suorittaa. (Valli 2015.)

D-vitamiinimäärityksen rinnakkaisajojen tulosten toistettavuutta tarkasteltaessa suoritettiin parierojen Wilcoxonin testi. Wilcoxonin testi on jakaumasta riippumaton epäparametrinen testi. Wilcoxonin testiä käytetään, jos tutkittavat muuttujat eivät noudata normaalijakaumaa eli T-testiä ei voida tehdä. (Nummenmaa ym. 2014.)

T-testissä, normaalijakaumatestauksessa ja Wilcoxonin testissä tarkasteltiin merkitsevyystasoa. Merkitsevyystaso kertoo, kuinka suurella riskillä saatu ero tai riippuvuus johtuu sattumasta. Merkitsevyystason lyhenne on p, joka tulee englanninkielen sanasta probability, ja siitä käytetään nimitystä P-arvo. P-arvolla mitataan tehdyn johtopäätöksen tilastollista luotettavuutta. Yleisimmin käytettyjä merkitsevyystasoja ovat 0,05 (5 %), 0,01 (1 %) ja 0,001 (0,1 %). Mitä pienempi merkitsevyystaso on, sitä merkittävämpi on tulos. (Valli 2015.)

4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa menetelmäsuuntauksessa tutkittavaa kohdetta kuvataan ja tulkitaan tilastojen ja numeroiden avulla (Jyväskylän yliopisto). Kvantitatiivisessa tutkimuksessa havaintoaineisto soveltuu määrälliseen mittaamiseen. Aineisto muokataan tilastollisesti käsiteltävään muotoon ja päätelmät tehdään havaintoaineiston tilastolliseen analyysiin perustuen. Kvalitatiivista eli laadullista ja kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusta on hankala erottaa tarkasti toisistaan, ja yleensä ne täydentävätkin toisiaan ja niitä käytetään rinnakkain osana tutkimusprosessia. Asioiden mittaaminen sisältää aina sekä kvalitatiivisen että kvantitatiivisen puolen. (Hirsjärvi ym. 2009.)

Kvantitatiivisen mittauksen luotettavuuden arviointiin liittyy tutkimuksen reliabiliteetti ja validuus. Reliabiliteetillä tarkoitetaan mittaustulosten toistettavuutta eli tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Validiteetilla eli pätevyydellä tarkoitetaan tutkimuksen kykyä mitata sitä, mitä kyseisessä tutkimuksessa on tarkoitus mitata. Kaikkien

tutkimusten luotettavuutta tai pätevyyttä tulee arvioida jollain tavoin. (Hirsjärvi ym. 2009.)

Tässä opinnäytetyössä validoitiin Cobas e 411 -analysaattori B12- ja D-vitamiinitutkimusten osalta. Tämä opinnäytetyö oli kvantitatiivinen opinnäytetyö, koska havaintoaineisto soveltui määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen ja käytännönsuudessa saadut tulokset voitiin taulukoida sekä käsitellä tilastollisesti. Päätelemät tuloksista tehtiin tilastolliseen analysointiin perustuen. Tässä opinnäytetyössä käsiteltiin teoriaa, määriteltiin keskeiset käsitteet, tarkasteltiin aiempia tutkimuksia sekä laadittiin tutkimussuunnitelma ja validointiraportti.

4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Ennen tämän opinnäytetyön aloittamista tutustuttiin toisiin saman aiheisiin opinnäytetöihin, jolloin saatiin käsitys opinnäytetyön rakenteesta ja opinnäytetyöprosessista kokonaisuutena. Lisäksi perehdyttiin tähän opinnäytetyöhön liittyviin käsitteisiin. Cobas e 411 -analysaattoriin ja sen toimintaan perehdyttiin huolellisesti laitetoimittaja Rochen järjestämänä koulutuspäivänä elokuussa 2015. Laitekoulutuksesta saatiin Cobas e 411 -koulutuskansio, josta oli apua opinnäytetyön toteutuksessa. Tälle opinnäytetyölle hankittiin tarvittavat ja asianmukaiset tutkimusluvut sekä tehtiin tarkka tutkimussuunnitelma.

Tässä opinnäytetyössä käytettävät näytteet olivat Tykslabissa jo analysoituja potilasnäytteitä, joten suostumusta potilailta ei tarvittu. Näytteitä käsiteltiin potilaiden yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen (Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006). Näytteistä oli poistettu henkilötiedot jo Tykslabissa, ja opinnäytetyön tekijät analysoivat anonyymit näyteputket. Analysoinnissa näytteiden tunnistamiseen käytettiin juoksevaa numerointia, eikä niitä voitu yhdistää potilaaseen tutkimuksen aikana tai sen jälkeen. Potilastietoja ei käsitelty opinnäytetyössä eikä validointiraportissa. Potilaille ei aiheutunut haittaa eikä vaivaa tutkimuksesta. Näytteitä säilytettiin oikeaoppisesti. Kun näytteet oli analysoitu, ne pakastettiin ja hävitettiin myöhemmin asianmukaisesti.

Tutkimusprosessin aikana noudatettiin rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta niin tulosten käsittelyssä ja esittämisessä kuin tutkimusten ja niiden tulosten arvioinnissa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012). Käytännönsuudesta pidettiin yksityiskohtaista laboratoriotyöpäiväkirjaa ja opinnäytetyöstä laadittiin validointiraportti. Opinnäy-

tetyössä käytettävät lähteet olivat laadukkaita ja ne esitettiin huolellisesti sekä tekstissä että lähdeluettelossa. Tutkimustuloksia ei poistettu tai muutettu ja opinnäytetyöntekijät saivat perehdytyksen tilasto-ohjelmien käyttöön. Tälle opinnäytetyölle oli tarve ja sen aihe oli tärkeä bioanalyytikko-opiskelijoille. Opinnäytetyön tuloksena B12- ja D-vitamiinitutkimukset saatiin opetuskäyttöön Turun ammattikorkeakoulun Cobas e 411 -analysointilaitteille ja tutkimuksissa voitiin käyttää Tykslabin kanssa yhtenäisiä viitearvoja.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Cobas e 411 -analysointilaitteita validoitiin B12-vitamiinitutkimuksen osalta 20 näytteellä ja D-vitamiinitutkimusten osalta 20 näytteellä. Näytteet oli analysoitu aikaisemmin Tykslabin osastolla 930 Cobas e 602 -analysointilaitteella, joka toimi validoinnin referenssilaitteena. Yhteensä 40 näytettä analysoitiin Cobas e 411 -analysointilaitteella, ja niistä tehtiin myös rinnakkaiset määritykset. Cobas e 411 -analysointilaitteen tuloksia verrattiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksiin, tarkoituksena selvittää, korreloivatko tulokset ja ovatko tulokset yhteneviä. Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuutta tutkittiin vertaamalla rinnakkaisten ajojen tuloksia toisiinsa.

B12-vitamiinitutkimuksen 20 analysoiduista näytteestä tilastollisesti tarkasteltiin 17 näytteen tuloksia, koska kolmen näytteen tuloksissa oli yli tai alle Cobas e 411 tai Cobas 602 -analysointilaitteen B12-vitamiinitutkimuksen mittausalueen meneviä tuloksia. Tulokset kirjattiin Excel-tilasto-ohjelmaan ja tuloksista muodostettiin tunnusluvut. Korrelaatiota ja yhtenevyyttä tarkasteltaessa laskettiin korrelaatiokerroin ja muodostettiin sirontakuviot sekä suoritettiin one sample T-testi. Toistettavuutta tarkasteltaessa laskettiin korrelaatiokerroin ja muodostettiin sirontakuviot sekä tehtiin normaalijakaumatestaus, jonka perusteella voitiin suorittaa parierojen T-testi. Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksista ja Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoista laskettiin erotukset ja eroprosentit. Tämän jälkeen Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksista ja Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoista muodostettiin kuviot, joissa tarkasteltiin tulosten sijoittumista Tykslabin kanssa yhteneviin viitearvoihin. Lisäksi tarkasteltiin tulosten kliinistä merkitsevyyttä.

D-vitamiinitutkimuksen 20 analysoiduista näytteestä tilastollisesti tarkasteltiin kaikkien tuloksia. Kaksi näytettä oli laimennettu Cobas e 602 -analysointilaitteella analysoitaessa, jotta tulokset saatiin D-vitamiinitutkimuksen mittausalueelle. Nämä näytteet laimennettiin myös analysoitaessa Cobas e 411 -analysointilaitteella. Tulokset kirjattiin Excel-tilasto-ohjelmaan ja tuloksista muodostettiin tunnusluvut. Korrelaatiota ja yhtenevyyttä tarkasteltaessa laskettiin korrelaatiokerroin ja muodostettiin sirontakuviot sekä suoritettiin one sample T-testi. Toistettavuutta tarkasteltaessa laskettiin korrelaatiokerroin ja muodostettiin sirontakuviot sekä tehtiin normaalijakaumatestaus, jonka perusteella voitiin suorittaa parierojen Wilcoxonin testi. Tuloksista laskettiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 ja ajon 2 tulosten erotukset ja eropro-

sentit. Tämän jälkeen Cobas e 602 -analysaattorin tuloksista ja Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 ja ajon 2 tuloksista muodostettiin kuviot, joissa tarkasteltiin tulosten sijoittumista Käypä hoito -suosituksen mukaisiin 25-OH-D-vitamiinin pitoisuuden tulkintoihin. Lisäksi tarkasteltiin tulosten kliinistä merkitsevyyttä.

5.1 Tunnusluvut

B12-vitamiinin tunnusluvut määritettiin Excel-tilasto-ohjelmalla (Taulukko 2). Cobas e 602 -analysaattorin tulosten keskiarvoksi saatiin 366. Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 tulosten keskiarvoksi saatiin 327 ja ajon 2 tulosten keskiarvoksi 329.

Taulukko 2. B12-vitamiinin tunnusluvut.

	B12-vit. Cobas e 602	B12-vit. Cobas e 411 ajo 1	B12-vit. Cobas e 411 ajo 2
Keskiarvo	366	327	329
Vaihteluväli	557	554	548
Minimi	150	122	130
Maksimi	706	676	679
Lukumäärä	17	17	17

Cobas e 602 -analysaattorin tulosten pienin arvo B12-vitamiinimäärityksissä oli 150 pmol/l ja suurin 706 pmol/l, jolloin vaihteluväliksi muodostui 557. Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 tulosten pienin arvo oli 122 ja suurin 676, jolloin vaihteluväliksi muodostui 554. Ajon 2 tulosten pienin arvo oli 130 ja suurin 679, jolloin vaihteluväliksi muodostui 548.

D-vitamiinin tunnusluvut määritettiin Excel-tilasto-ohjelmalla (Taulukko 3). Cobas e 602 -analysaattorin tulosten keskiarvoksi saatiin 95. Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 tulosten keskiarvoksi saatiin 100 ja ajon 2 tulosten keskiarvoksi 98.

Taulukko 3. D-vitamiinin tunnusluvut.

	D-vit. Cobas e 602	D-vit. Cobas e 411 ajo 1	D-vit. Cobas e 411 ajo 2
Keskiarvo	95	100	98
Vaihteluväli	272	261	257
Minimi	21	28	27
Maksimi	293	288	284
Vinous	1,8	1,7	1,8
Huipukkuus	3,4	3,1	3,3
Lukumäärä	20	20	20

Cobas e 602 -analysaattorin tulosten pienin arvo D-vitamiinimäärityksissä oli 21 ja suurin 293, jolloin vaihteluväliksi muodostui 272. Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 tulosten pienin arvo oli 28 ja suurin 288, jolloin vaihteluväliksi muodostui 261. Ajon 2 tulosten pienin arvo oli 27 ja suurin 284, jolloin vaihteluväliksi muodostui 257.

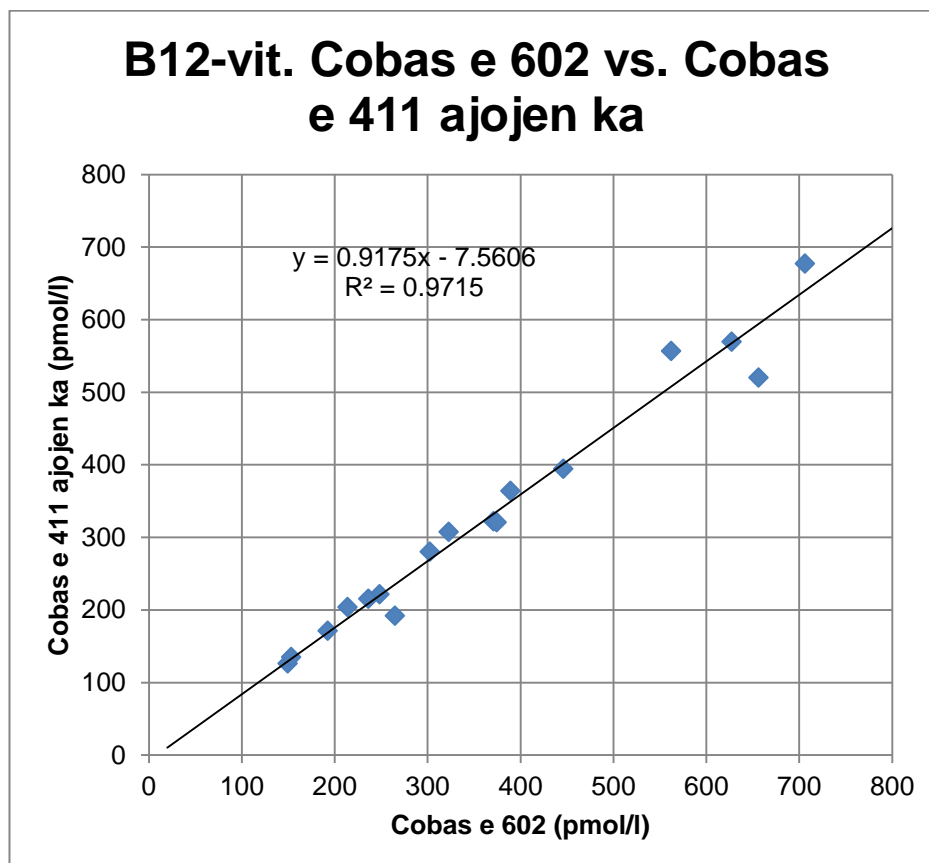
Cobas e 411 -analysaattorin antamien tulosten jakauman vinous D-vitamiinimäärityksissä oli ensimmäisessä ajossa 1,7 ja toisessa ajossa 1,8. Tämä tarkoittaa, että jakaumassa on poikkeuksellisen suuria havaintoarvoja (Holopainen ym. 2004). Molempien ajojen jakauman vinouden ja keskivirheen osamäärä oli noin 0,1. SPSS-ohjelman mukaan, jos otoksessa muuttujan jakauman vinous jaetaan sen keskivirheellä ja saatu tulos on $-2-2$, perusjoukon jakaumaa voidaan pitää symmetrisenä (Holopainen ym. 2004). Cobas e 411 -analysaattorin antamien tulosten jakauman huipukkuus oli ensimmäisessä ajossa 3,1 ja toisessa ajossa 3,3. Koska huipukkuus on positiivinen, havaintoarvot keskittyvät keskiarvon läheisyyteen (Holopainen ym. 2004).

B12-vitamiinitunnuslukuja tarkasteltaessa voitiin havaita, että Cobas e 411 -analysaattorin tulosten keskiarvot olivat pienempiä kuin Cobas e 602 -analysaattorin tulosten keskiarvo. Lisäksi havaittiin, että Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 ja ajon 2 tulosten keskiarvot olivat hyvin lähellä toisiaan. Vaikka molempien analysaattoreiden pienimmät ja suurimmat arvot poikkesivat jonkin verran toisistaan, vaihteluväli ei merkittävästi muuttunut. D-vitamiinitunnuslukuja tarkasteltaessa voitiin havaita, että Cobas e 411 -analysaattorin tulosten keskiarvot olivat suurempia kuin Cobas e 602 -analysaattorin tulosten keskiarvo. Lisäksi havaittiin, että Cobas e 602 -analysaattorin

tulosten keskiarvo ja Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 ja ajon 2 tulosten keskiarvot olivat kaikki hyvin lähellä toisiaan. Molempien analysaattoreiden pienimmät ja suurimmat arvot olivat lähellä toisiaan, eivätkä vaihteluvälin arvot poikenneet paljon toisistaan.

5.2 Tulosten korrelaatio

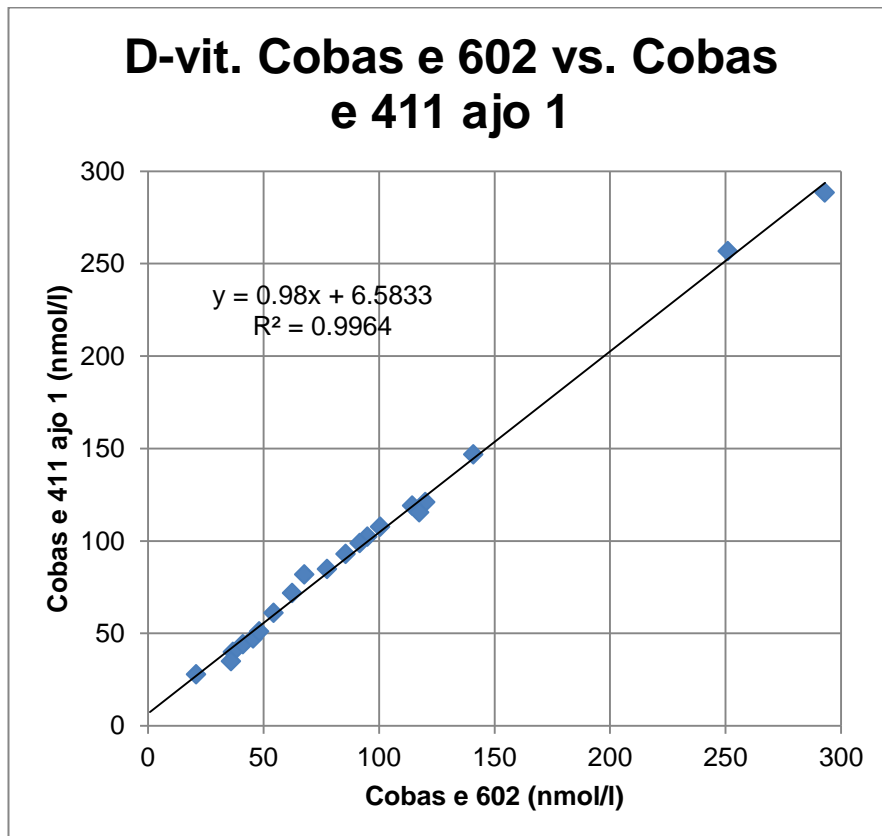
Cobas e 411 ja Cobas e 602 -analysaattoreiden tulosten korrelaatiota tarkasteltiin korrelaatiokertoimien ja sirontakuvioiden avulla. B12-vitamiinimäärityksissä verrattaessa Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoja Cobas e 602 -analysaattorin tuloksiin korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,986, joka oli erittäin voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaatiokertoimen perusteella analysaattoreiden tulokset korreloivat keskenään voimakkaasti. Sirontakuviassa (Kuvio 1) verrattiin Cobas e 602 -analysaattorin ja Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoja.



Kuvio 1. B12-vitamiini Cobas e 602 -analysaattorin tulokset vs. Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten keskiarvot.

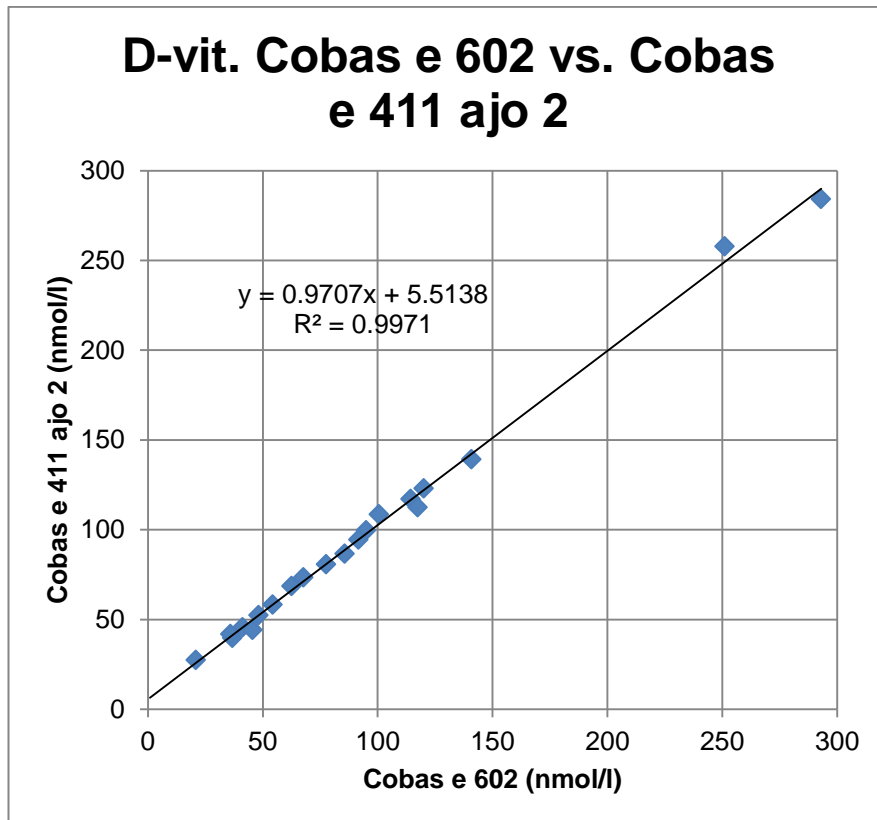
B12-vitamiinituloksista muodostetusta sirontakuviosta nähtiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvojen välinen yhteys. Tulokset sijoittuivat hyvin regressiosuoralle, joten ajojen välillä oli voimakas yhteys. Vain muutamat tulokset sijoittuvat regressiosuoran ulkopuolelle. Sirontakuvion selitysaste, R^2 , oli 0,972 eli Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvojen vaihteluista pystyttiin selittämään 97,2 % Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten avulla.

D-vitamiinimäärityksissä verrattaessa Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tuloksia Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksiin korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,998, joka oli erittäin voimakas positiivinen korrelaatio. Verrattaessa D-vitamiinimääritysten Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 2 tuloksia Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksiin korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,999, joka oli myös erittäin voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaatiokertoimien perusteella analysointilaitteiden tulokset korreloivat keskenään voimakkaasti. Sirontakuvioiden (Kuvio 2 ja Kuvio 3) verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 ja ajo 2 tuloksia Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksiin.



Kuvio 2. D-vitamiini Cobas 602 -analysointilaitteen tulokset vs. Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulokset.

D-vitamiinituloksista muodostetusta sirontakuviosta nähtiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulosten välinen yhteys. Tulokset sijoituivat todella hyvin regressiosuoralle, joten tulosten välillä oli voimakas yhteys. Kaksi tulosta olivat huomattavasti muita korkeammat, mutta nekin sijoittuivat hyvin regressiosuoralle. Sirontakuvioiden selityksaste, R^2 , oli 0,996 eli Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 tulosten vaihteluista pystyttiin selittämään 99,6 % Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten avulla.



Kuvio 3. D-vitamiini Cobas e 602 -analysointilaitteen tulokset vs. Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 2 tulokset.

D-vitamiinituloksista muodostetusta sirontakuviosta nähtiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 2 tulosten välinen yhteys. Tulokset sijoituivat todella hyvin regressiosuoralle, joten tulosten välillä oli voimakas yhteys. Kaksi tulosta olivat huomattavasti muita korkeammat, mutta nekin sijoittuivat hyvin regressiosuoralle. Sirontakuvioiden selityksaste, R^2 , oli 0,997 eli Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 2 tulosten vaihteluista pystyttiin selittämään 99,7 % Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten avulla.

Tuloksia tarkasteltaessa voitiin todeta, että verrattaessa Cobas e 411 ja Cobas e 602 -analysointilaitteiden tuloksia B12-vitamiinitutkimuksen ja D-vitamiinitutkimuksen osalta korrelaatiot olivat hyviä. Tämän perusteella analysointilaitteiden tulokset korreloivat keskenään eli niiden välillä oli yhteys.

5.3 Tulosten yhtenevyys

Työkalon Cobas e 602 -analysointilaitte, joka toimi tämän opinnäytetyön referenssianalysointilaitteena, oli käytössä ja se oli validoitu. Sen antamia tuloksia voitiin siis pitää oikeina ja valideina. Tämän vuoksi sen antamien tulosten keskiarvoon voitiin verrata Cobas e 411 -analysointilaitteen ajojen keskiarvoja.

Cobas e 411 ja Cobas e 602 -analysointilaitteiden tulosten yhtenevyyttä tarkasteltiin one-sample-T-testin avulla. B12-vitamiinimäärityksissä Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tuloksista ja ajon 2 tuloksista laskettiin keskiarvot, joita verrattiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten keskiarvoon one-sample T-testillä. T-testillä tutkittiin poikkeavatko Cobas e 411 -analysointilaitteen ajojen tulosten keskiarvot tilastollisesti merkittävästi Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten keskiarvosta. P-arvot olivat molemmissa vertailuissa yli 0,05. Tämän perusteella laitteiden tulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa.

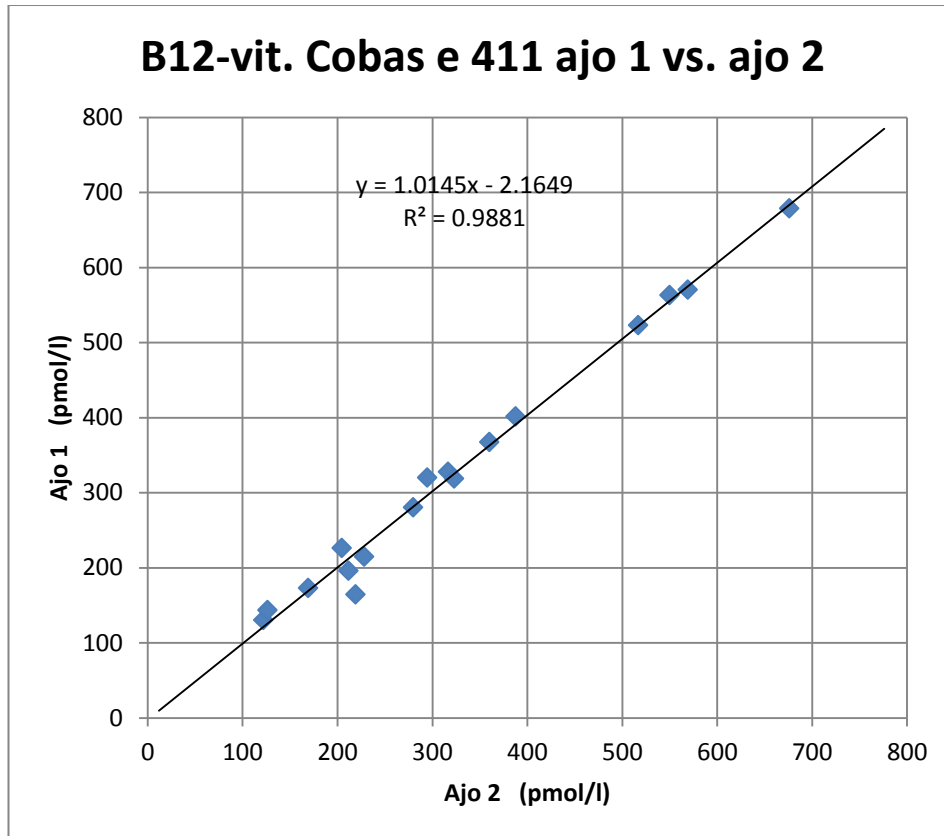
D-vitamiinimäärityksissä Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tuloksista ja ajon 2 tuloksista laskettiin keskiarvot, joita verrattiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten keskiarvoon one-sample T-testillä. P-arvot olivat molemmissa vertailuissa yli 0,05. Tämän perusteella laitteiden tulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa.

Testien tulosten perusteella Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset olivat yhteneviä Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten kanssa B12- ja D-vitamiinitutkimuksien osalta. Tämän perusteella voitiin todeta, että analysointilaitteet antoivat yhteneviä tuloksia näiden tutkimusten osalta.

5.4 Tulosten toistettavuus

Cobas e 411 -analysointilaitteen tulosten toistettavuutta tarkasteltiin korrelaatiokertoimien, sirontakuvioiden, normaalijakaumatestauksen, parierojen T-testin ja Wilcoxonin testin avulla. B12-vitamiinimäärityksissä Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajaja verrat-

taessa korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,994, joka oli erittäin voimakas positiivinen korrelaatio eli rinnakkaisajojen tuloksien välillä oli voimakas yhteys. Tuloksista muodostettiin sirontakuviot (Kuvio 4), jossa verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tuloksia.



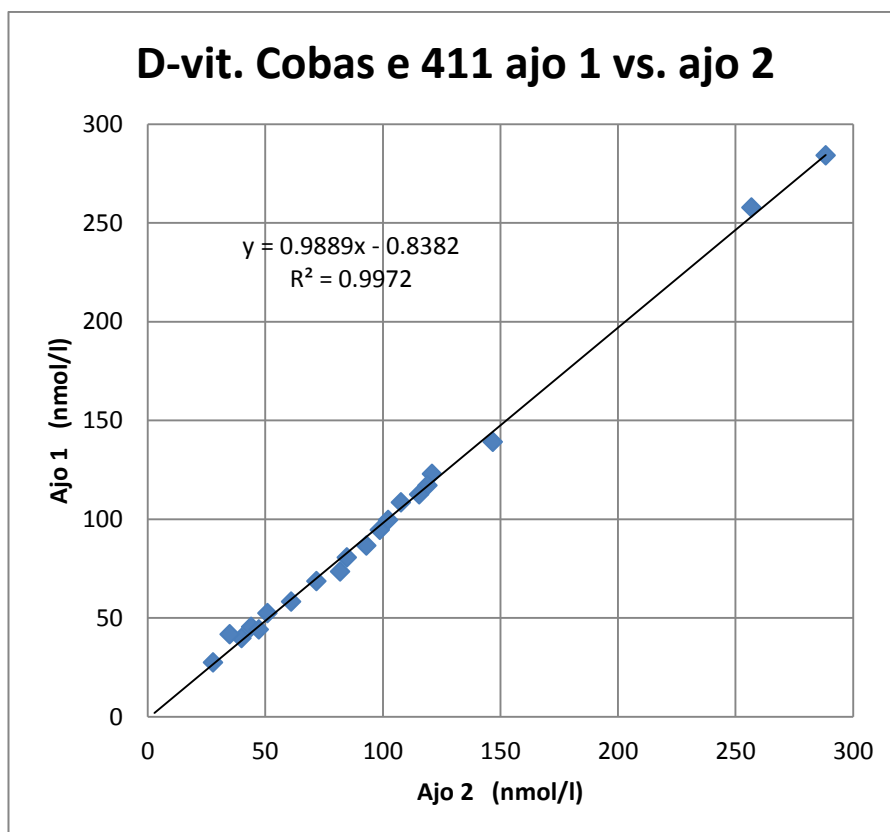
Kuvio 4. B12-vitamiini Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tulokset vs. ajon 2 tulokset.

B12-vitamiinituloksista muodostetusta sirontakuviosta nähtiin Cobas e 411 -analysointilaitteen ensimmäisen ja toisen ajon välinen yhteys. Tulokset sijoituivat hyvin regressiosuoralle. Vain muutamat tulokset sijoituivat regressiosuoran ulkopuolelle. Sirontakuviota selittävä, R^2 , oli 0,988 eli ensimmäisen ajon tulosten vaihteluista pystyttiin selittämään 98,8 % toisen ajon tulosten avulla.

B12-vitamiinimäärityksissä Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tuloksille tehtiin normaalijakaumatestausta. Testin tuloksena P-arvo oli yli 0,05, joten tulokset noudattivat normaalijakaumaa ja voitiin suorittaa parierojen testaus eli T-testi. T-testillä tutkittiin, poikkesivatko Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulokset toisistaan ti-

lastollisesti merkittävästi. Testin tuloksena P-arvo oli yli 0,05, joten rinnakkaisajojen tulokset eivät poikenneet toisistaan merkittävästi.

D-vitamiinimäärittämissä Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen verrattaessa korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,999, joka oli erittäin voimakas positiivinen korrelaatio eli rinnakkaisajojen tulosten välillä oli voimakas yhteys. Tuloksista muodostettiin sirontakuviokuva (Kuvio 5), jossa verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tuloksia.



Kuvio 5. D-vitamiini Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tulokset vs. ajon 2 tulokset.

D-vitamiinituloksista muodostetusta sirontakuviosta nähtiin Cobas e 411 -analysointilaitteen ensimmäisen ja toisen ajon välinen yhteys. Tulokset sijoituivat todella hyvin regressiosuoralle. Kaksi tulosta olivat huomattavasti muita korkeammat, mutta nekin sijoituivat hyvin regressiosuoralle. Sirontakuviokuva selitysaste, R^2 , oli 0,997 eli ensimmäisen ajon tulosten vaihteluista pystyttiin selittämään 99,7 % toisen ajon tulosten avulla.

D-vitamiinimäärittämissä Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tuloksille tehtiin normaalijakaumatestaus. Testin tuloksena P-arvo oli alle 0,05, joten tulokset eivät noudattaneet normaalijakaumaa eikä parierojen T-testiä voitu suorittaa. T-testin sijaan tehtiin jakaumasta riippumaton parierojen Wilcoxonin testi, jonka tuloksena P-arvo oli alle

0,05. Tämän perusteella Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tuloksien välillä oli tilastollisesti merkittäviä eroja.

B12-vitamiinitutkimuksen osalta Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuutta tarkasteltaessa havaittiin rinnakkaisajojen tulosten välillä voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaation ja sirontakuvion perusteella ajojen välillä oli voimakas yhteys. T-testin perusteella voitiin todeta, että Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuus oli hyvä B12-vitamiinitutkimuksen osalta. D-vitamiinitutkimuksen osalta Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuutta tarkasteltaessa havaittiin rinnakkaisajojen tulosten välillä voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaation ja sirontakuvion perusteella ajojen välillä oli voimakas yhteys. Wilcoxonin testin perusteella voitiin todeta, että Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset eivät olleet toistettavia D-vitamiinitutkimuksen osalta. Rinnakkaisajojen tulokset korreloivat keskenään, mutta tilastollisesti tarkasteltaessa ne eivät olleet toistettavia D-vitamiinitutkimuksen osalta.

5.5 Tulokset, erotukset ja ero prosentit

B12-vitamiinin kohdalla Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksia verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoihin laskemalla tulosten erotukset ja ero prosentit (Taulukko 4).

Taulukko 4. B12-vitamiinin tulokset.

B12-vit. Cobas e 602 pmol/l	B12-vit. Cobas e 411 ajo 1 pmol/l	B12-vit. Cobas e 411 ajo 2 pmol/l	B12-vit. Cobas e 411 ka pmol/l	Erotus (cobas e 602 – cobas e 411 ka) pmol/l	Eroprosentti %
150	122	130	126	24	16
153	126	144	135	18	12
193	169	173	171	21	11
214	212	196	204	10	5
236	205	226	215	21	9
248	228	215	221	27	11
265	219	164	192	73	28
303	280	281	280	22	7
323	295	320	307	16	5
371	317	328	322	49	13
374	323	319	321	54	14
389	360	367	364	26	7
446	388	401	394	52	12
562	550	563	557	6	1
627	569	570	570	58	9
656	517	523	520	136	21
706	676	679	677	29	4

B12-vitamiinituloksista nähtiin, että kaikkien 17 näyteajon tulokset olivat matalampia Cobas e 411 -analysaattorilla mitattaessa. Cobas e 602 -analysaattorin tulosten ja Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten keskiarvojen pienin erotus oli 6 pmol/l, suurin erotus 136 pmol/l ja erotusten keskiarvo oli 38 pmol/l. Cobas e 602 -analysaattorin tulosten ja Cobas e 411 -analysaattorin rinnakkaisajojen tulosten keskiarvojen ero prosentteista pienin oli 1 %, suurin 28 % ja ero prosenttien keskiarvo oli 11 %.

Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyt kolmen näytteen B12-vitamiinitulokset esitetään taulukossa (Taulukko 5).

Taulukko 5. Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyt B12-vitamiinitulokset.

B12-vit. Cobas e 602 pmol/l	B12-vit. Cobas e 411 ajo 1 pmol/l	B12-vit. Cobas e 411 ajo 2 pmol/l
Y 1480	Y 1476	Y 1476
Y 1480	1399	Y 1476
70	A 37	41

Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyistä näytteistä ensimmäisen näytteen tulokset olivat yli mittausalueiden kaikissa ajoissa. Toisen näytteen tuloksista kaksi oli yli mittausalueiden, mutta Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 antoi näytteelle mitattavan tuloksen. Mitattava tulos oli hyvin lähellä mittausalueiden ylärajoja. Kolmannen näytteen tuloksista kaksi oli mitattavia tuloksia, mutta Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tulos oli alle mittausalueen. Kolmannen näytteen mitattavat tulokset olivat hyvin matalia B12-vitamiiniarvoja.

D-vitamiinin kohdalla Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksia verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 1 tuloksiin laskemalla tulosten erotukset ja eroprosentit (Taulukko 6).

Taulukko 6. D-vitamiini Cobas e 602 ja Cobas e 411 ajo 1 tulokset.

D-vit. Cobas e 602 nmol/l	D-vit. Cobas e 411 ajo 1 nmol/l	Erotus nmol/l	Eroprosentti %
21	28	-7	-33
36	35	1	3
37	40	-3	-9
41	44	-3	-7
46	47	-2	-4
48	51	-3	-6
54	61	-7	-12
63	72	-9	-15
68	82	-14	-21
78	85	-7	-9
86	93	-7	-9
92	99	-7	-8
95	102	-7	-8
101	108	-7	-7
114	119	-5	-4
117	116	2	2
120	121	-1	-1
141	147	-6	-4
251	257	-6	-2
293	288	5	2

D-vitamiinituloksista nähtiin, että Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset olivat kolmea tulosta lukuun ottamatta korkeampia kuin Cobas e 602 -analysointilaitteen antamat tulokset. Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen tulosten pienin erotus oli 1 nmol/l, suurin erotus 14 nmol/l ja erotusten keskiarvo oli 5,5 nmol/l. Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen tulosten eroasteista pienin oli 1 %, suurin 33 % ja eroasteiden keskiarvo oli 8,3 %.

Cobas e 602 -analysointilaitteen D-vitamiinimäärittämisen tuloksia verrattiin Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 2 tuloksiin laskemalla tulosten erotukset ja ero prosentit (Taulukko 7).

Taulukko 7. D-vitamiini Cobas e 602 ja Cobas e 411 ajo 2 tulokset.

D-vit. Cobas e 602 nmol/l	D-vit. Cobas e 411 ajo 2 nmol/l	Erotus nmol/l	Eroprosentti %
21	27	-7	-32
36	42	-6	-16
37	40	-3	-8
41	46	-4	-11
46	44	1	3
48	52	-4	-9
54	58	-4	-7
63	69	-6	-10
68	73	-6	-8
78	81	-3	-4
86	87	-1	-1
92	95	-3	-3
95	100	-5	-5
101	109	-8	-8
114	117	-3	-2
117	113	5	4
120	123	-3	-2
141	139	2	1
251	258	-7	-3
293	284	9	3

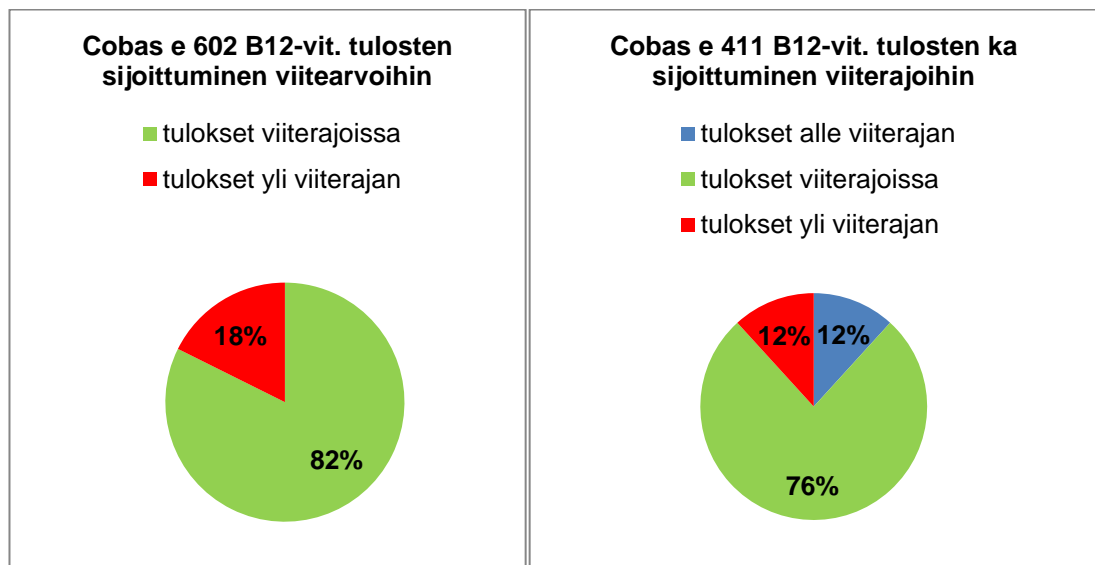
D-vitamiinituloksista nähtiin, että Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 2 tulokset olivat neljää tulosta lukuun ottamatta korkeampia kuin Cobas e 602 -analysointilaitteen antamat tulokset. Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen ajon 2 tulosten pienin erotus oli 1 nmol/l, suurin erotus 9 nmol/l ja erotusten keskiarvo oli 4,5

nmol/l. Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen kerran otetun näytteen tulosten eroosuuksista pienin oli 1 %, suurin 32 % ja eroosuuksien keskiarvo oli 7 %.

B12-vitamiinituloksia tarkasteltaessa voitiin havaita, että kaikki Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset olivat matalampia kuin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulokset. Tämän perusteella voidaan todeta, että Cobas e 411 -analysointilaitteellä saatiin matalampia tuloksia kuin Cobas e 602 -analysointilaitteellä. D-vitamiinituloksia tarkasteltaessa voitiin havaita, että suurin osa Cobas e 411 -analysointilaitteen kerran otetun näytteen tuloksista oli suurempia kuin Cobas e 602 -analysointilaitteen antamat tulokset. Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyt tulokset olisivat mahdollisesti parantaneet analysointilaitteiden välistä korrelaatiota ja yhtenevyyttä sekä Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuutta B12-vitamiinitulosten osalta.

5.6 Tulosten sijoittuminen viiterajoihin ja vitamiinipitoisuuksien tulkintoihin

B12-vitamiinimäärityksissä tarkasteltiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajon tulosten keskiarvojen sijoittumista Tykslabin viiterajoihin 145–570 pmol/l (Kuvio 6).

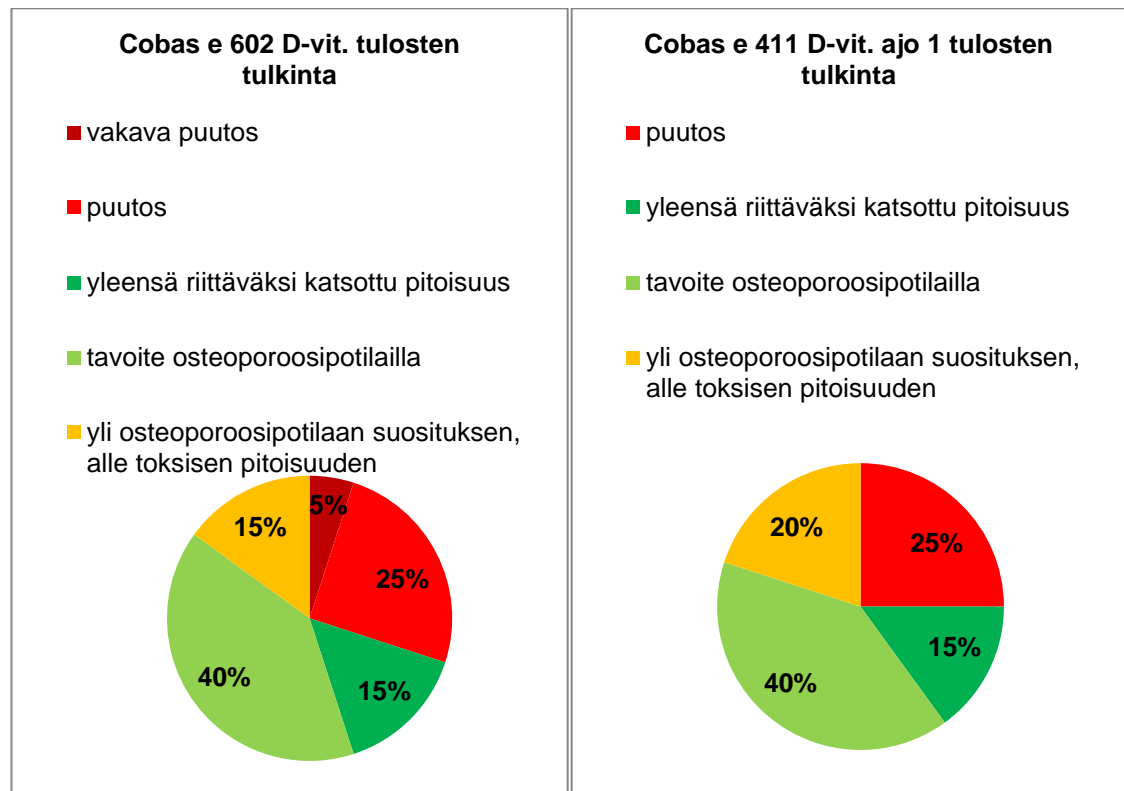


Kuvio 6. Cobas e 602 B12-vit. tulosten sijoittuminen viiterajoihin ja Cobas e 411 tulosten ka sijoittuminen viiterajoihin.

Tarkasteltaessa Cobas e 602 B12-vitamiinitulosten sijoittumista viiterajoihin nähtiin, että 82 prosenttia tuloksista oli viiterajoissa ja 18 prosenttia yli viiterajan. Cobas e 411

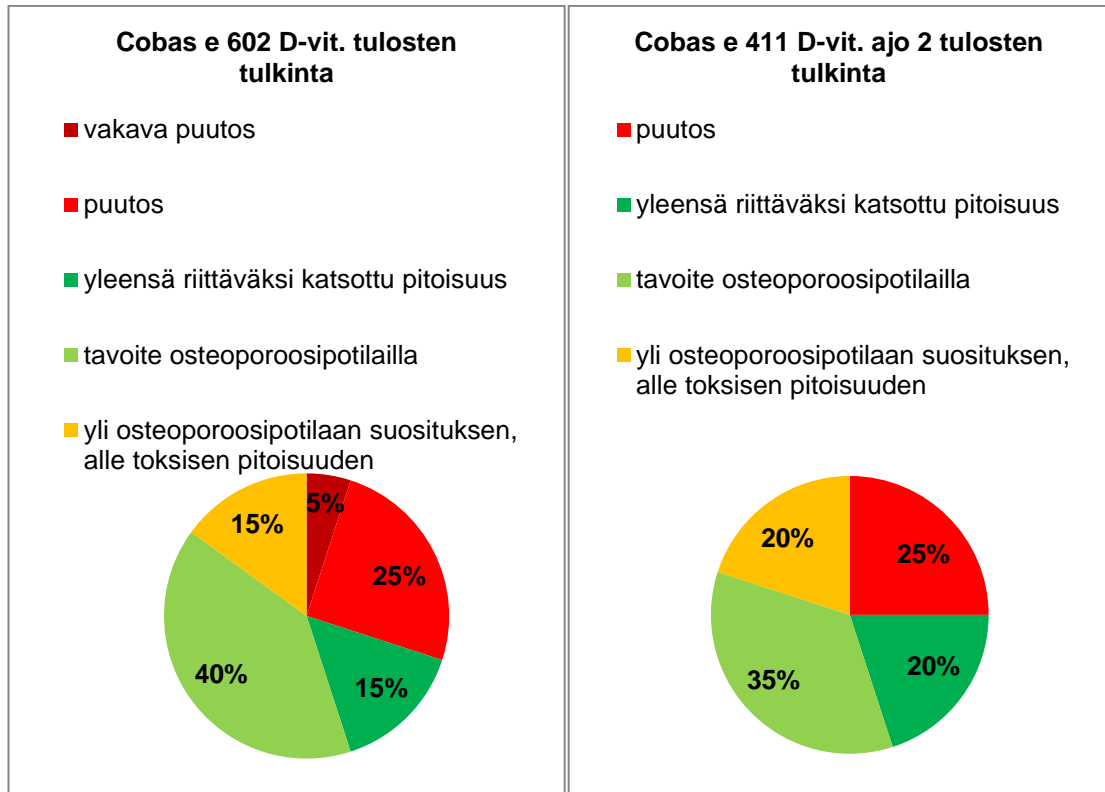
rinnakkaisajojen tulosten keskiarvoista 76 prosenttia oli viiterajoissa, 12 prosenttia alle ja 12 prosenttia yli viiterajan.

D-vitamiinimäärityksissä tarkasteltiin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten ja Cobas e 411 -analysointilaitteen ajo 1 ja ajo 2 tulosten sijoittumista Käypä hoito -suositusten mukaisesti 25-OH-D-vitamiinin pitoisuuden tulkintoihin (Kuvio 7 ja Kuvio 8).



Kuvio 7. Cobas e 602 D-vit. tulosten tulkinta ja Cobas e 411 D-vit. ajo 1 tulosten tulkinta.

Tarkasteltaessa Cobas e 602 D-vitamiinitulosten sijoittumista tulkintoihin nähtiin, että 5 prosenttia tuloksista tulkittiin vakavaksi puutokseksi, 25 prosenttia puutokseksi, 15 prosenttia yleensä riittäväksi pitoisuudeksi, 40 prosenttia osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi ja 15 tuloksista oli yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden. Cobas e 411 ajo 1 tulosten sijoittumisesta tulkintoihin nähtiin, että 25 prosenttia tuloksista tulkittiin puutokseksi, 15 prosenttia yleensä riittäväksi pitoisuudeksi, 40 prosenttia osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi ja 20 prosenttia tuloksista oli yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden.



Kuvio 8. Cobas e 602 D-vit. tulosten tulkinta ja Cobas e 411 D-vit. ajo 2 tulosten tulkinta.

Tarkasteltaessa Cobas e 602 D-vitamiinitulosten sijoittumista tulkintoihin nähtiin, että 5 prosenttia tuloksista tulkittiin vakavaksi puutokseksi, 25 prosenttia puutokseksi, 15 prosenttia yleensä riittäväksi pitoisuudeksi, 40 prosenttia osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi ja 15 tuloksista oli yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden. Cobas e 411 ajo 2 tulosten sijoittumisesta tulkintoihin nähtiin, että 25 prosenttia tuloksista tulkittiin puutokseksi, 20 prosenttia yleensä riittäväksi pitoisuudeksi, 35 prosenttia osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi ja 20 prosenttia tuloksista oli yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden.

B12-vitamiinimääritysten tulosten jakautumista tarkasteltaessa voitiin havaita, että Cobas e 411 -analysointilaitteen tuloksista useampi sijoittui viiterajojen ulkopuolelle kuin Cobas e 602 -analysointilaitteen tuloksista. Cobas e 411 -analysointilaitteeseen antoi myös viiterajan alapuolelle jääviä tuloksia toisin kuin Cobas e 602 -analysointilaitteeseen. Cobas e 602 -analysointilaitteen tulosten tulkinnan ja Cobas e 411 -analysointilaitteen rinnakkaisajojen tulosten keskiarvojen tulkinnan perusteella analysointilaitteiden tulokset jakautuivat samoihin tulkintoihin 88 prosenttisesti.

D-vitamiinimääritysten tulosten jakautumista tarkasteltaessa voitiin havaita, että Cobas e 411 -analyysointilaitteen ajo 1 ei antanut vakavaksi puutokseksi tulkittavia tuloksia toisin kuin Cobas e 602 -analyysointilaitteella. Cobas e 411 -analyysointilaitteen tuloksista suurempi osa oli yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden. Cobas e 602 -analyysointilaitteen tulosten tulkinnan ja Cobas e 411 -analyysointilaitteen ajon 1 tulosten tulkinnan perusteella analyysointilaitteiden tulokset jakautuivat samoihin tulkintoihin 95 prosenttisesti.

D-vitamiinimääritysten tulosten jakautumista tarkasteltaessa voitiin havaita, että Cobas e 411 -analyysointilaitteen ajo 2 ei antanut vakavaksi puutokseksi tulkittavia tuloksia toisin kuin Cobas e 602 -analyysointilaitteella. Cobas e 602 -analyysointilaitteen tulosten tulkinnan ja Cobas e 411 -analyysointilaitteen ajon 2 tulosten tulkinnan perusteella analyysointilaitteiden tulokset jakautuivat samoihin tulkintoihin 90 prosenttisesti.

Tykslabin D-vitamiinin tavoitearvo kaikille oli yli 50 nmol/l. Cobas e 602 -analyysointilaitteen tuloksista yli tavoitearvon oli 70 % tuloksista. Cobas e 411 -analyysointilaitteen ajon 1 tuloksista yli tavoitearvon oli 75 % ja ajon 2 tuloksista 75 %.

5.7 Kliininen merkitsevyys

Vaikka tutkimustuloksella on tilastollista merkitsevyyttä, sillä ei välttämättä ole käytännön merkitystä. Terveysteen liittyvissä tutkimuksissa halutaan olla varmoja terveyteen vaikuttavista päätelmistä ja niiden oikeellisuudesta, jonka vuoksi käytetään tiukkaa merkitsevyystasoa. Tutkimustuloksissa voi olla tilastollisesti merkittäviä eroja, mutta käytännön hoidon kannalta tällä ei ole välttämättä merkitystä. (Nummenmaa ym. 2014.) Kliinisesti B12- ja D-vitamiinitutkimusten tulosten merkityksen arviointi oli tässä työssä vaikeaa muun muassa siksi, että vitamiinien pitoisuuksia veressä arvioidaan eri tavoilla. B12-vitamiinissa oli viitearvot ja D-vitamiinissa taas tavoitearvo. D-vitamiinipitoisuuden tulkinnan rajat ovat osteoporoosin Käypä hoito -suosituksesta.

Tulosten kliiniseen merkitsevyyteen vaikuttaa, onko asiakkaan näytteen tuloksen tulkinta sama sekä Cobas e 411 että Cobas e 602 -analyysointilaitteilla. B12-vitamiinitutkimuksen tulokset kategorisoidaan Tykslabin viiterajojen perusteella kolmeen luokkaan: alle viiterajan, viiterajoissa ja yli viiterajan menevät tulokset. Sen sijaan D-vitamiinitutkimuksessa tulokset kategorisoidaan Käypä hoito -suosituksen mukaisesti.

tulkintoihin: vakava puutos, puutos, yleensä riittäväksi katsottu pitoisuus, tavoite osteoporoosipotilailla ja toksinen pitoisuus.

B12-vitamiinimäärityksissä 17 analysoidusta näytteestä 12 tulokset sijoituivat viiterajoihin molemmilla analysaattoreilla. Kahden näytteen kohdalla molempien analysaattoreiden antamat tulokset olivat viiterajan yläpuolella. Kahden näytteen kohdalla Cobas e 411 -analysaattorin tulokset olivat viiterajan alapuolella, kun taas Cobas e 602 -analysaattorin tulokset olivat viiterajoissa. Yhden näytteen kohdalla Cobas e 602 -analysaattorin tulos oli viiterajan yläpuolella, kun taas Cobas e 411 -analysaattorin tulos oli viiterajoissa. Tarkasteltaessa B12-vitamiinitulosten sijoittumista viiterajoihin havaittiin, että 14 näytettä 17 olivat samassa viiterajakategoriassa. Valtaosa näytteistä oli samassa kategoriassa molemmilla analysaattoreilla. Tämän perusteella tulosten eroilla ei ollut suurta merkitystä käytännön hoidon kannalta. Tilastollisesta tarkastelusta poisjätetyt tulokset olisivat parantaneet kliinistä merkitsevyyttä, koska tulokset olivat yhtenevästi hyvin korkeita tai hyvin matalia.

D-vitamiinimäärityksissä 20 analysoidusta näytteestä 16 näytteen kohdalla tuloksen tulkinta oli sama molempien analysaattoreiden antamissa tuloksissa. Yhden näytteen kohdalla Cobas e 602 -analysaattorin antama tulos tulkittiin vakavana puutoksena, kun taas Cobas e 411 -analysaattorin ajojen 1 ja 2 tulokset tulkittiin puutoksena. Yhdessä näytteistä Cobas e 602 -analysaattorin antama tulos tulkittiin puutoksena, kun taas Cobas e 411 -analysaattorin ajojen 1 ja 2 tulokset tulkittiin yleensä riittäväksi katsotuksi pitoisuudeksi. Yhden näytteen kohdalla Cobas e 602 -analysaattorin ja Cobas e 411 -analysaattorin ajon 2 antamat tulokset tulkittiin yleensä riittäväksi katsotuksi pitoisuudeksi, kun taas Cobas e 411 -analysaattorin ajon 1 tulos tulkittiin osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi. Yhden näytteen kohdalla Cobas e 602 -analysaattorin antama tulos tulkittiin osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuudeksi, kun taas Cobas e 411 -analysaattorin ajojen 1 ja 2 tulokset olivat yli osteoporoosipotilaan tavoitepitoisuuden, mutta alle toksisen pitoisuuden.

Tarkasteltaessa D-vitamiinimääritysten tulosten tulkintoja havaittiin, että 16 näytettä 20 näytteestä olivat samassa tulkintakategoriassa. Suurin osa näytteistä oli samassa kategoriassa molemmilla analysaattoreilla. Tämän perusteella tulosten eroilla ei ollut suurta merkitystä käytännön hoidon kannalta. Kun tarkasteltiin D-vitamiinitulosten sijoittumista tavoitearvon 50 nmol/l molemmin puolin, havaittiin, että vain yhden näytteen kohdalla tulkinta oli eri Cobas e 411 ja Cobas e 602 -analysaattoreilla. Tämän näytteen kohdalla Cobas e 602 -analysaattori antoi tavoitearvon alle sijoittuvan tuloksen kun

taas Cobas e 411 -analysointilaitteen antamat arvot olivat yli tavoitearvon. Tämän perusteella tulosten eroilla ei ollut suurta merkitystä käytännön hoidon kannalta, joten kliininen merkisyys voitiin todeta hyväksi.

Cobas e 411 -analysointilaitteen toistettavuutta tutkittaessa D-vitamiinin rinnakkaisajojen tulokset poikkesivat toisistaan tilastollisesti. Tarkasteltaessa rinnakkaisajojen tuloksia kliinisen merkisyuden kannalta huomattiin, että tilastollisesta erosta huolimatta kliininen merkisyys oli hyvä, koska rinnakkaisajot antoivat 20 D-vitamiininäytteestä 19 näytteen kohdalla saman tulkinnan. Tarkasteltaessa tulosten sijoittumista D-vitamiinin tavoitearvon molemmin puolin kaikkien näytteiden rinnakkaisajojen tulokset saivat saman kliinisen merkityksen.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tutkimusongelmiin saatiin vastaukset tulosten analysoinnin avulla. Johdopäätöksenä voitiin todeta, että Turun ammattikorkeakoulun Cobas e 411 -analysointilaitteen ja Tykslabin Cobas e 602 -analysointilaitteen tulokset olivat keskenään korreloivia ja yhteneviä B12- ja D-vitamiinimääritysten osalta. Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset olivat toistettavia B12-vitamiinitutkimuksen osalta. D-vitamiinitutkimuksen osalta Cobas e 411 -analysointilaitteen tulokset olivat toistettavia korrelaatiokertoimen ja siron-takuvion osalta, mutta tilastollisesti tarkasteltaessa tulokset eivät olleet toistettavia. Tutkimustuloksissa voi olla tilastollisesti merkittäviä eroja, mutta käytännön hoidon kannalta tällä ei ole välttämättä merkitystä (Nummenmaa ym. 2014). Tässä opinnäyte-työssä verrattiin potilaan tulosten tulkintoja molemmilla analysointilaitteilla, jolloin todet-tiin, ettei tilastollisella erolla ollut merkitystä käytännön hoidon kannalta ja kliininen merkitsevyys voitiin todeta hyväksi molempien tutkimusten osalta.

Opinnäytetyö aloitettiin keräämällä aineistoa ja osallistamalla Cobas e 411 -analysointilaitteen laitekoulutukseen, jolloin opinnäytetyön tekijät perehtyivät aiheeseen hyvissä ajoin. Opinnäytetyön viitekehys koottiin huolellisesti ja lähdekriittisesti laaduk-kaita lähteitä käyttäen. Työn keskeiset käsitteet määriteltiin ymmärrettävästi ja selkeäs-ti. Opinnäytetyölle laadittiin tarkka tutkimussuunnitelma, jota noudatettiin koko tutki-musprosessin ajan. Nämä tekijät lisäsivät opinnäytetyön luotettavuutta.

Opinnäytetyön käytännönsuudessa noudatettiin tarkasti ohjeita. Näytteiden kuljetus ja säilytys toteutettiin niin, että näytteet säilyivät analyysikelpoisina. Käytännönsuuden ajan pidettiin laboratoriotyöpäiväkirjaa, johon merkittiin työvaiheet ja tulokset myöhem-pää raportointia varten. Ennen tulosten analysointia opinnäytetyön tekijät saivat pereh-dytyksen Excel ja SPSS -tilasto-ohjelmien käyttöön. Työvaiheita kirjatessa ja tulosten tallentamis- ja analysointivaiheessa noudatettiin erityistä huolellisuutta. Tuloksista muodostetut taulukot, kuviot ja tunnusluvut kuvasivat todellisia tutkimustuloksia oikein ja havainnollisesti. Opinnäytetyön luotettavuutta lisäsi myös validoinnista tehty validoin-tiraportti, jolla osoitettiin, että B12- ja D-vitamiinitutkimusten luotettavuus on varmistettu otettaessa ne käyttöön Cobas e 411 -analysointilaitteille. Koko opinnäytetyö tehtiin rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta noudattaen.

Otoksen koko riippuu otantamenetelmästä ja tuloksen halutusta tarkkuudesta. Liian pieni otoskoko voi aiheuttaa otantavirheen. (Holopainen ym. 2004.) Opinnäytetyön luo-

tettavuutta saattoi heikentää pieni otoskoko. D-vitamiinimäärityksen osalta tilastolliseen tarkasteluun voitiin ottaa 20 näytettä (n=20) ja B12-vitamiinimäärityksen osalta vain 17 näytettä (n=17). Otoksesta kuitenkin pyrittiin tekemään mahdollisimman kattava pyytämällä validointiaineistoksi eritasoisia näytteitä.

Opinnäytetyön luotettavuutta saattoi heikentää myös se, että kalibrointeja ja ensimmäisiä kontrolleja tehtäessä ProCell- ja CleanCell -puskurit olivat olleet avattuina 39 vuorokautta, vaikka puskurit säilyvät avattuina käyttökelpoisina vain 30 vuorokautta. Kalibroinnit kuitenkin onnistuivat ja kontrollit olivat tavoitearvoissa. Kontrollit ajettiin toisen kerran analyysipäivänä, jolloin käytössä olivat uudet ProCell- ja CleanCell -puskurit. Kontrollit olivat tällöinkin tavoitearvoissa. Kalibraatiot onnistuivat ja molempien päivien kontrollitulokset olivat hyvin lähellä toisiaan ja kontrollitulokset olivat lähellä kohdearvoja, joten ProCell- ja CleanCell -puskurit olivat todennäköisesti käyttökelpoisia eikä pus-kureiden liian pitkä aukioloaika heikentänyt tutkimuksen luotettavuutta.

Yksi D-vitamiininäytteistä oli lievästi hemolyyttinen, lipeeminen ja ulkonäöltään puuromainen, mikä saattoi aiheuttaa virheellisesti korkeampia tuloksia. Näytteen tulokset olivat yli D-vitamiinipitoisuuden tavoitearvon 50 nmol/l, mutta ne eivät kuitenkaan olleet erityisen korkeita. Reagenssien annettiin lämmitä huoneenlämpöön puoli tuntia ennen analysaattoriin laittoa, vaikka reagenssien tulisi olla huoneenlämmössä vähintään tunti ennen niiden laittoa analysaattoriin. Kun näytteet olivat sulaneet, osa niistä oli melko kauan huoneenlämmössä ja osa jääkaapissa ennen analysointia. Nämä tekijät saattoivat heikentää tulosten luotettavuutta.

Tässä opinnäytetyössä B12-vitamiinin puutteen yleisyys Cobas e 602 -analysaattorilla oli 0 % ja Cobas e 411 -analysaattorilla 12 %. (vrt. Wong ym. 2015). Tässä opinnäytetyössä ei kuitenkaan ollut tiedossa näytteiden henkilötietoja, joten potilaiden ikää ei tiedetty.

Tämän opinnäytetyön tuloksena voitiin B12- ja D-vitamiinitutkimukset ottaa opetuskäyttöön Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksessa. Koska Cobas e 411 -analysaattorin ja Tykslabin Cobas e 602 -analysaattorin tulokset olivat keskenään korreloivia ja yhteneviä B12- ja D-vitamiinimääritysten osalta, voidaan Turun ammattikorkeakoulussa käyttää Tykslabin kanssa yhteneviä viitearvoja näissä tutkimuksissa. B12- ja D-vitamiinitutkimusten käyttöönotto lisäsi Ruiskadun opetuslaboratorion tutkimusvalikoimaa.

Jatkotutkimuksena suositellaan validoinnin uusimista suuremmalla otoskoolla, jolloin validoinnin luotettavuus kasvaa. Varsinkin D-vitamiinin osalta tämä olisi kannattavaa, koska D-vitamiinitutkimuksen toistettavuudessa Cobas e 411 -analysaattorilla oli tilastollisesti merkittäviä eroja. Toisena jatkotutkimuksena ehdotetaan aktiivisen B12-vitamiinimäärityksen validointia Cobas e 411 -analysaattorille. Mahdollisessa jatkotutkimuksessa pyydettäessä eritasoisia näytteitä validointia varten näytteiden tulee olla sellaisia, että niiden tulokset sijoittuvat mittausalueelle. Jos näyte on laimennettavissa, sen numeerinen tulos on oltava selvillä. ”Alle mittausalueen” tai ”yli mittausalueen” ilmoitettuja tuloksia ei voida käyttää tilastollisessa tarkastelussa.

LÄHTEET

Abdel-Wareth, L.; Haq, A.; Turner, A.; Khan, S.; Salem, A.; Mustafa, F.; Hussein, N.; Pallinalakam, F.; Grundy, L.; Patras, G. & Rajah, J. 2013. Total Vitamin D Assay Comparison of the Roche Diagnostics "Vitamin D Total" Electrochemiluminescence Protein Binding Assay with the Chromsystems HPLC Method in a Population with both D2 and D3 forms of Vitamin D. *Nutrients*. Vol. 5, No 3, 971-980.

Allen, L. 2008. How common is vitamin B-12 deficiency? *The American Journal Of Clinical Nutrition*. Vol. 89, No 2/2008, 693-696.

Aro, A. 2005. D-vitamiini – monivaikutteinen hormoni. *Duodecim* 121/2005, 1749-1754.

Cashman, K. ym. 2016. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *The American Journal Of Clinical Nutrition*. Vol. 103, No 2/2016.

Fogelholm, M.; Hakala, P.; Kara, R.; Kiuru, S.; Kurppa, S.; Kuusalo, H.; Laitinen, J.; Marniemi, A.; Misikangas, M.; Roos, E.; Sarlio-Lähteenkorva, S.; Schwab, U. & Virtanen, S. 2014. *Terveystä ruoasta – Suomalaiset ravintosuositukset 2014. 2. korjattu painos*. Tampere: Valtion ravitsemusneuvottelukunta.

Halonen, T. 2004a. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY.

Halonen, T. 2004b. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY.

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

Hermanson, E. 2012. D-vitamiinivalmisteen käyttö. *Duodecim – Terveyskirjasto*. Viitattu 11.4.2016 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=kot00405.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos*. Helsinki: Tammi.

Holick, M.; Binkley, N.; Bischoff-Ferrari, H.; Gordon, C.; Hanley, D.; Heaney, R.; Hassan Murad, M. & Weaver, C. 2011. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 96, No 7/2011

Holopainen, M.; Tenhunen, L. & Vuorinen, P. 2004. *Tutkimusaineiston analysointi ja SPSS*. Järvenpää: YRITYSSANOMA OY.

HUSLAB -ohjekirja 2015. D-vitamiini-25-OH, plasmasta. Viitattu 21.4.2016 <http://huslab.net/ohjekirja/1220.html>.

HUSLAB -ohjekirja 2013. Suositus B12-vitamiinin puutteen toteamiseksi. Viitattu 25.2.2016 http://huslab.fi/ohjekirjan_liitteet/tutkimustiedotteet/tutkimustiedotteet_2013/2013_18_suositus_b12_vitamiinin_puutteen_toteamiseksi.pdf.

Hänninen, A. 2004. Verisolujen yleisimmät sairaudet. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY.

Irjala, K.; Isoaho, R; Kivelä, S-L.; Koskinen, P.; Loikas, S.; Löppönen, M. & Pelliniemi, T-T. 2005. B12-vitamiinin puutteen toteaminen. *Suomen lääkärilehti* 11/2005, 1271-1276.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos*. Helsinki: Edita Prima Oy.

Jyväskylän yliopisto 2015. Määrällinen tutkimus. Viitattu 23.10.2015
<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/tutkimusstrategiat/maarallinen-tutkimus>.

Koskinen, P. 2010. Hormonitutkimukset. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Käypä hoito 2014. Osteoporoosi. Viitattu 18.10.2015
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituks/suositus?id=hoi24065#T5>.

Lehtonen, P. & Sihvonen, M-L. 2006. Laboratorioalan analyttinen kemia. Edita Prima Oy.

Lääkärin käsikirja 2014. Vitamiinien kliininen käyttö. Viitattu 11.4.2016
http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00605&p_haku=B12.

Matveinen, K.; Isotalo, H.; Kantanen, M-L.; Mäkinen, I.; Nuotio, K.; Pohjola, V.; Riutta, O.; Venäläinen, E-R.; Ehder, T.; Hirvi, T.; Komppa, V.; Linko, S.; Nieminen, J.; Vartiainen, T & Walden, J. 2005. Kemian metrologian opas. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta.

Nordlab 2015. B12-vitamiinin puutteen osoittamisessa suositellaan B12-TC2 mittausta. Menetelmä otetaan käyttöön NordLab Oulun aluelaboratoriossa. Viitattu 25.2.2016
http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/labtied_71_b12_vitamiini_b12_tc2.pdf.

Nummenmaa, L.; Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2014. Tilastollisten menetelmien perusteet. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Paakkari, I. 2013. D-vitamiini. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 23.10.2015
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01044.

Penttilä, I. 2004a. Aineenvaihdunnan häiriöt ja niiden tutkiminen. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Penttilä, I. 2004b. Ruoansulatuskanavan ja maksan häiriöt ja niiden tutkiminen. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Punnonen, K. 2010. Anemiat. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Risteli, J. & Risteli, L. 2010. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Roche 2009. Cobas e 411 analyzer. Viitattu 16.10.2015
http://www.roche.hu/content/dam/internet/corporate/roche/hu_HU/docs/cobas_e_411_EN.pdf.

Roche 2015. Cobas 4000 analyzer series. Viitattu 14.3.2016
<http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/cobas-4000-analyzer-series.html>.

Roche 2016a. Cobas 4000 analyzer series. Viitattu 14.3.2016
https://usdiagnostics.roche.com/en/core_laboratory/instrument/cobas-4000-analyzer-series.html.

Roche 2016b. Cobas 8000 analyzer series. Viitattu 14.3.2016.
https://usdiagnostics.roche.com/en/core_laboratory/instrument/cobas-8000-analyzer-series.html.

Roche Diagnostics 2011. Cobas e 411 – Compendium of Background Information. COBI-CD. Version 1.1.

Roche Diagnostics 2013. Overview of the cobas e 411 analyzer, A-23. Operator`s manual, Version 2.1.

Rouillon, V.; Dubourg, G.; Gauvain, J-B.; Baron, D.; Glemarec, J.; Cormier, G. & Guillot, P. 2012. Vitamin D insufficiency: Evaluation of an oral standardized supplementation using 100,000IU vials of cholecalciferol, depending on initial serum level of 25OH vitamin D. Joint Bone Spine. Vol. 79, Issue 4, 399-402.

Salonen, J. 2015. Lääkärikirja Duodecim 2015. Tietoa potilaalle: B12-vitamiinin tai foolihapon puutos. Viitattu 17.10.2015 <http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti>.

Savolainen, K. & Parviainen, M. 2010. Vitamiinit ja hivenaineet. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta..

Suomen bioanalytikkoliitto ry 2006. Bioanalytikon, laboratoriohitoajan eettiset ohjeet. Viitattu 23.2.2016 [http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+\(1\).pdf](http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+(1).pdf).

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 16.10.2015 <http://www.tenk.fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanto>.

TYKSLAB -ohjekirja 2014. P-B12-vitamiini. Viitattu 17.10.2015 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/4824.html>.

TYKSLAB -ohjekirja 2014. P-D-vitamiini-25-OH. Viitattu 17.10.2015 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/1220.html>.

Valli, R. 2015. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. 2., uudistettu painos. Jyväskylä: PS-kustannus.

Vitamin B12 2015. Cobas Roche diagnostics. Package Insert. V 13.0.

Vitamin D total 2015. Cobas Roche diagnostics. Viitattu 25.2.2016 [https://pim-eservic-ic-es.roche.com/eLD/\(S\(za3ytmpk2untigtjr2fqwqng\)\)/fi/en/Documents/GetDocument?documentId=cf74b477-89f8-e411-688f-00215a9b0ba8&referrer=Dialog](https://pim-eservic-ic-es.roche.com/eLD/(S(za3ytmpk2untigtjr2fqwqng))/fi/en/Documents/GetDocument?documentId=cf74b477-89f8-e411-688f-00215a9b0ba8&referrer=Dialog).

Wainwright, P.; Narayanan, S. & Cook, P. 2015. False-normal vitamin B12 results in a patient with pernicious anaemia. Clinical Biochemistry. Vol. 48, No 18/2015, 1366–1367.

Weber, T. 2010. Lasten ja nuorten erityispiirteet. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Westgard, J. 2003. Basic method validation. 2. painos. Madison, USA: Westgard QC, Inc.

Wong, C.; Ip, C.; Leung, C.P.; Leung, C.S.; Cheng, J & Siu, C. 2015. Vitamin B12 deficiency in the institutionalized elderly: A regional study. Experimental Gerontology. Vol. 69, September 2015, 221–225.

Yhtyneet Medix Laboratoriot 2015a. Homokysteiini. Viitattu 25.2.2016 http://www.yml.fi/tuotokuvaus_show.php?tuotenro=175.

Yhtyneet Medix Laboratoriot 2015b. Metyylimalonaatti. Viitattu 25.2.2016 http://www.yml.fi/tuotokuvaus_show.php?tuotenro=270.

Åkerman, K.; Savolainen, E-R.; Pelliniemi, T-T. & Koski, T. 2010. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

