



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

HbA_{1c}-VIERITESTILAITTEIDEN TESTAUS JA VERTAILU REFERENSSILABORATO- RION MENETELMÄÄN

Matti Rajaniemi

Opinnäytetyö
Toukokuu 2017
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

RAJANIEMI MATTI:

HbA_{1c}-vieritestilaitteiden testaus ja vertailu referenssilaboratorion menetelmään

Opinnäytetyö 40 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Toukokuu 2017

Nykyaikaisessa lääketieteessä laboratoriotulosten tarkkuus ja luotettavuus korostuvat diagnosoinnissa. Aikataulujen kiristyessä ja laboratoriopalvelujen keskittyessä vierianalytiikan osuus päätöksenteossa kasvaa jatkuvasti, sillä sen etuna ovat nopeus ja liikkuvuus. Vierianalytiikalla tarkoitetaan laboratorion ulkopuolella ja potilaan välittömässä läheisyydessä tehtävää analytiikkaa.

Diabeteksen lisääntyessä sen seurannassa ja diagnosoinnissa käytetään verikokeita. Ns. ”pitkän sokerin” tai ”sokerihemoglobiinin” HbA_{1c}:n testaaminen lisääntyy diagnosoinnin apuna ja sen analysointia varten on kehitetty erilaisia vieritestilaitteita. HbA_{1c}-arvo kertoo verensokerin pitkäaikaisesta tasapainosta ja sen seuraaminen on osa diabeteksen hoitotasapainoa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä vertailu referenssimenetelmän ja kahden vieritestilaitteen välillä. Molemmat laitteet on kehitetty HbA_{1c}:n analysointiin verinäytteistä. Laitteet olivat Alere Afinion AS100 ja Roche cobas b101 POC system. Vertailu tehtiin aidoilla potilasnäytteillä Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen automaatiokemian laboratorion toimiessa referenssilaboratoriona. Tavoitteena oli saada todennettua molempien laitteiden oikea ja tarkka toiminta.

Opinnäytetyö oli kvantitatiivinen työ, jossa Pirkanmaan alueelta kerätyt HbA_{1c}-näytteet analysoitiin molemmilla vierilaitteilla ja tuloksille tehtiin matemaattinen ja tilastollinen vertailu referenssilaboratorion tuloksiin. Referenssilaitteena toimi Fimlab Laboratoriot Oy:n kemian automaatiolaboratorion COBAS INTEGRA-analysaattori. Verinäytteitä analysoitiin yhteensä 44 kpl.

Vertailussa saatujen tulosten ja niiden tilastollisten analyysien perusteella molemmat laitteet toimivat luotettavasti ja antavat oikeita tuloksia HbA_{1c}:lle koko laitteiden mittausalueilla. Tämän perusteella niitä voidaan käyttää Tampereen Ammattikorkeakoulun Taito-talossa osana moniammatillista koulutusta ja yhteistyötä. Selkeiden käyttöohjeiden teko tulevaisuudessa molemmille laitteille olisi erittäin tärkeää, sillä laitteet tulevat moniammatilliseen käyttöön.

Asiasanat: vieritestaus, testaus, diabetes, kvantitatiivinen, HbA_{1c}

ABSTRACT

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

RAJANIEMI MATTI:

Testing of Two HbA_{1c} Point-of-care Devices and Comparing Them to the Results of a Reference Laboratory

Bachelor's thesis 40 pages, appendices 3 pages
May 2017

The use of point-of-care testing in modern medicine has been increasing due to its ability to produce results fast. Several devices have been developed for the analysis of glycated haemoglobin aka HbA_{1c} which is used to diagnose and monitor diabetes mellitus.

This study was a quantitative and experimental test where 44 venous blood samples from all over Pirkanmaa were analysed for HbA_{1c} with two point-of-care devices and then compared mathematically and statistically to the results of a reference laboratory. The reference results were from Fimlab Laboratories in their clinical chemistry laboratory in Tampere.

Based on the statistical analyses of the results it can be said with confidence that both of these devices work properly and the results they produce are reliable and correct. Devices in question are safe to use in multi-vocational education.

Key words: diabetes mellitus, point-of-care, HbA_{1c}, verification, testing

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	7
3	DIABETES, HEMOGLOBIINI JA GLYKOITUNUT HEMOGLOBIINI	8
	3.1 Diabetes	8
	3.2 Hemoglobiini.....	9
	3.3 Glykoitunut hemoglobiini ja HbA _{1c}	9
4	VIERITESTAUS JA SEN LAATUVAATIMUKSET	11
	4.1 Vieritestaus	11
	4.2 Laatuvaatimukset vieritestauksessa	11
5	TESTATTAVAT LAITTEET JA NIIDEN TOIMINTAPERIAATTEET	13
	5.1. Alere Afinion AS100 Analyzer	13
	5.1.1 Laitteen toimintaperiaate.....	16
	5.2. Roche cobas b101 POC system	17
	5.2.1 Laitteen toimintaperiaate.....	20
	5.3. Referenssinäytteet ja -menetelmä	21
6	AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA LAITTEISTA	22
7	TUTKIMUSMENETELMÄT	24
8	OPINNÄYTETYÖN VAIHEET.....	27
9	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	29
	9.1 Tulokset	29
	9.2 Tulosten tarkastelu	31
10	TUTKIMUKSEN EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS.....	32
11	POHDINTA.....	34
	LÄHTEET.....	36
	LIITTEET	38
	Liite 1(1) Tulokset.....	38
	Liite 1(2). Tulokset.....	39
	Liite 2. Kontrollitulokset	40

1 JOHDANTO

Lääketiede ja erityisesti diagnostiikka kehittyvät koko ajan. Diagnosoinnin nopeus nousee entistä tärkeämpään osaan, sillä mitä nopeammin diagnoosi saadaan, sitä nopeammin voidaan oikea hoito aloittaa. Laboratoriotulosten luotettavuus ja niiden nopea saanti diagnosoinnin avuksi on entistä tärkeämpää. Potilaan välittömässä läheisyydessä tai laboratorion ulkopuolella tehtävän analytiikan eli vierianalytiikan käyttö lisääntyy jatkuvasti (Eskelinen 2017). Vierianalytiikan etuina ovat mm. nopeus ja liikuteltavuus (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 275). Laitteiden käytön lisääntyessä ja tarkkuuden parantuessa niiden luotettavuuden ja toistettavuuden testaus on erityisen tärkeää. Suomen standardisoimisliitto (2006) korostaa, että vierianalytiikassa käytettäviä laitteita koskevat samat laadulliset vaatimukset kuin isoja laboratoriolaitteita.

Diabetes on yksi nopeimmin lisääntyvistä sairauksista koko maailmassa ja erityisesti kehitysmaissa (Ilanne-Parikka, Rönnemaa, Saha & Sane 2015, 10.) II-tyypin diabeteksen esiintyvyys on noussut viime vuosikymmeninä hälyttävän paljon Suomessa ja myös maailmanlaajuisesti. Diabeteksen ilmaantuvuus on Suomessa maailman suurin. (Mustajoki 2017.) Diabeteksen diagnosoinnissa ja seurannassa käytetään sokeritasapainoa monitoroivia verikokeita. Yksi keskeisiä sokeritasapainon seurannassa käytettäviä verikokeita on HbA_{1c}. Glykoitunut hemoglobiini eli HbA_{1c} on yksi hemoglobiinin fraktio. Vakiintuneita ja yleiskielisiä nimityksiä tälle fraktiolle ovat ”pitkä sokeri” tai ”sokerihemoglobiini” (Ilanne-Parikka ym. 2015, 8.) HbA_{1c}:tä muodostuu pidemmän ajan kuluessa elimistössä, kun glukoosia kiinnittyy hemoglobiinimolekyylisiin tasaisella tahdilla. Kokove-restä tehtävä HbA_{1c}-määritys antaa kuvan verensokerin pitkäaikaisesta tasapainosta, näytteenottoa edeltäneeltä noin kolmen kuukauden ajanjaksolta. Tutkimus on erinomainen diabeteksen hoitotasapainon seurannan väline. (Mustajoki, 2017.)

Analyttisen laadun merkitys korostuu laboratoriodiagnostiikassa, kun hoidon seurannassa on siirrytty yhä enemmän vierianalyttisten menetelmien hyödyntämiseen. Vierilaitteen tuloksiin ja tulostasoon on pystyttävä luottamaan samalla lailla kuin kliinisessä laboratoriossa tehtyihin analyyseihin (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 275). Siksi vierianalyttiset laitteet on testattava eli niiden antamien tulosten oikeellisuus on kokeellisesti varmistettava verraten niitä referenssilaboratoriossa käytettävään tarkistettuun me-

netelmään (Suomen standardisoimisliitto 2006). Testaus on tärkeä osa nykyaikaista vierianalytiikkaa ja sen laatua. Sen avulla varmistetaan tulosten luotettavuus ja käyttökelpoisuus diagnostiikassa. (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 293). Testaus suoritetaan ai-doilla potilasnäytteillä ja tulokset käsitellään tilastomatematiikan avulla.

Opinnäytetyön aihe saatiin Tampereen Ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutukselta. Työn tarkoituksena oli verrata kaksi erillistä vieritestilaitetta, Alere Afinion AS100 Analyzer ja Roche cobas b101 POC system, HbA_{1c}:n osalta referenssilaboratorion tuloksiin. Kesällä 2016 avatussa Taito-talossa käytetään vieritestilaitteita osana moni-ammattillista yhteistyötä. Laitteet on etukäteen testattava, jotta niitä voidaan käyttää simulaatioissa diagnostiikan apuna. Työssä käytetään Fimlab Laboratoriot Oy:n virallista akkreditoitua menetelmää referenssimenetelmänä ja tarvittavat näytteet tulosten kera saadaan Fimlabin kliinisen kemian automaatiolaboratoriosta. Fimlab käyttää tätä menetelmää tehdessään HbA_{1c}:tä Rochen COBAS INTEGRA-laitteistolla. Tilastollinen tarkastelu tapahtuu vertaamalla vierilaitteiden antamia tuloksia tällä menetelmällä saatuihin tuloksiin.

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Tutkimuksen tarkoituksena on tehdä kahdelle vieritestilaitteelle tarvittavat käyttöönotto-testaukset. Tämä testausprosessi vastaa toimintaa, joka tehdään vieritestauksesta vastaavan laboratorion toimesta uusille laboratoriolaitteille ennen niiden käyttöönottoa. Tämän jälkeen nämä laitteet otetaan opetuskäyttöön kesällä 2016 avatussa Taito-talossa. Uusissa opetustiloissa tullaan tekemään moniammatillisia simulaatioita, joissa laitteita käyttävät niin bioanalytytikot kuin sairaanhoitajat.

Tutkimuksen tavoitteena on testauksen kautta todentaa, että molemmat vieritestilaitteet, Alere Afinion AS100 Analyzer ja Roche cobas b101 POC system, antavat luotettavia ja oikeita tuloksia. Testaus tapahtuu analysoimalla riittävä määrä aitoja potilasnäytteitä molemmilla laitteilla ja vertaamalla näitä tuloksia referenssilaboratorion tuloksiin. Laitteen luotettavuus ja tarkkuus ovat ensisijaisen tärkeitä potilastyöskentelyssä (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 275). Vieritestilaitteiden testauksia ja laadunvarmistusta ohjataan Suomen standardisoimisliitto SFS:n standardilla SFS-EN ISO 22870 vuodelta 2006.

Tutkimuksen ensimmäisenä tehtävänä on selvittää eri laitteiden toiminnot ja niiden käyttö. Tutustuminen laitteisiin ennen testejä on omiaan varmistamaan luotettavat tulokset. Toisena tehtävänä on analysoida testattavina olevilla laitteilla referenssinä toimivat aidot potilasnäytteet. Tehtävä suoritetaan analysoimalla sarja näytteitä (EDTA-kokoveri) molemmilla laitteilla samaan aikaan ja samoissa olosuhteissa sekä vertaamalla niitä matemaattisten ja tilastollisten menetelmien kautta Fimlab Laboratoriot Oy:ltä näytteiden mukana saatuihin referenssituloksiin. Referenssitulokset on saatu analysoimalla näytteet COBAS INTEGRA- laitteistolla automaatiokemian laboratoriossa. Testausta varten tarvitaan arviolta 40-50 potilasnäytettä, joiden HbA_{1c}-tulos on vaihteleva, jotta saadaan dataa myös lähellä määrittelyalueen rajaa olevista tuloksista. Kolmantena tehtävänä on suorittaa saatujen tulosten matemaattinen ja tilastollinen analyysi, joka antaa meille tiedon tutkittavien laitteiden tulosten luotettavuudesta ja käyttökelpoisuudesta.

3 DIABETES, HEMOGLOBIINI JA GLYKOITUNUT HEMOGLOBIINI

3.1 Diabetes

Diabetes on nimitys joukolle sairauksia, joiden yhteisenä piirteenä voidaan pitää veren glukoosipitoisuuden eli verensokerin liian suurta arvoa (Ilanne-Parikka ym. 2015,7). Tämä aineenvaihduntahäiriö johtuu joko insuliinihormonin puutteesta tai sen ajan myötä heikentyneestä toiminnasta tai molemmista (Ilanne-Parikka ym. 2015,9).

Nykykäsityksen mukaan diabetes jaetaan kahteen päätyyppiin. Tyypin I diabeteksessa haiman insuliinintuotanto loppuu kokonaan, kun taas tyypin II diabeteksessa insuliinin tuotanto on heikentynyt tai insuliiniresistenttiyden myötä insuliinin toiminta on heikentynyt. Diabeteksen harvinaisemmista alatyypeistä voidaan mainita mm. raskausajan diabetes. (Ilanne-Parikka ym. 2015,9.)

Suomessa on tällä hetkellä 350000 todettua diabeetikkoa. Heistä noin 50000 sairastaa tyypin I diabetesta ja loput pääasiassa tyypin II diabetesta. Lisäksi arvioidaan, että noin 150000 sairastaa diabetesta tietämättään. Suomessa on arviolta yhteensä noin 500000 diabeetikkoa. (Ilanne-Parikka ym. 2015, 10.) Diabeteksen ilmaantuvuus Suomessa on maailman suurin (Mustajoki 2017).

Diabeteksen toteamisessa ja hoitotasapainon seurannassa käytetään verikokeita. Jos henkilön kahdeksan tunnin paaston jälkeinen veren plasman glukoosipitoisuus on toistuvasti vähintään 7,0 mmol/l (terveen ihmisen viite-arvot ovat 4-6 mmol/l) tai HbA_{1c}-pitoisuus veressä on vähintään kahdessa mittauksessa yli 48 mmol/mol (terveen ihmisen viitearvot ovat 20-42 mmol/mol), niin hänellä katsotaan olevan diabetes. Diabeetikon HbA_{1c}-hoitotasapaino pyritään pitämään alle 53 mmol/mol:ssa. (Ilanne-Parikka ym. 2015, 13-14.)

3.2 Hemoglobiini

Hemoglobiini on ihmisen punasolun pääproteiini, jonka tehtävänä on kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin ja hiilidioksidia kudoksista keuhkoihin kaasujenvaihtoa varten. Hemoglobiinilla on useita eri fraktioita riippuen ihmisen iästä. Aikuisella ihmisellä suurin osa (n. 97%) on hemoglobiini A:ta (HbA) ja loput hemoglobiini A₂:tä (HbA₂) ja hemoglobiini F:ä (HbF). Vastasyntyneillä taas suurin osa hemoglobiinista on hemoglobiini-F:ä eli fetaali-hemoglobiinia, jonka määrä lähtee laskemaan heti syntymän jälkeen. (Bain, Wild, Stephens & Phelan 2013, 4.)

Kaikki hemoglobiinit koostuvat neljästä globiiniketjusta, jotka muodostavat kolmiulotteisen tetrameerirakenteen. Tetrameerirakenteessa on neljä paikkaa, ns. taskua, rautapi-toiselle hemi-molekyylille, johon happimolekyyli sitoutuu. Hemoglobiini A koostuu kahdesta alfaketjusta ja kahdesta beetaketjusta ja hemoglobiini F kahdesta alfaketjusta ja kahdesta gammaketjusta. (Bain ym. 2013, 5)

3.3 Glykoitunut hemoglobiini ja HbA_{1c}

Ajan kuluessa hemoglobiinimolekyylit alkavat glykoitumaan eli niihin liittyy kemiallisesti glukoosia. Reaktio ei vaadi entsyymejä (Gough, Manley & Stratton 2010, 2) vaan sitä tapahtuu tasaisesti koko ajan glukoosin liittyessä hemoglobiinin beetaketjun valiini-aminohappoon (Penttilä ym. 2016, 134). Ainoa asia, mikä vaikuttaa glykoitumisen vauhtiin ja tasoon on glukoosin määrä veressä. Eli mitä suurempi glukoosipitoisuus on, sitä suurempi on glykoituneen hemoglobiinin osuus veressä. Punasolujen eliniästä johtuen (noin 120 päivää) glykoituneen hemoglobiinin määrä kertoo menneen 2-3 kuukauden glukoositasapainosta ja tästä syystä se on erittäin hyvä mittari diabeteksen seurannassa ja diagnosoinnissa. (Ilanne-Parikka ym. 2015, 117.)

Aikuisen ihmisen hemoglobiinista suurin osa on hemoglobiini A:ta (Bain ym. 2013, 1). Trivellin (1971) tutkimuksen mukaan diabetekseen sairastuneen henkilön hemoglobiiniin tarttuu enemmän glukoosia kuin terveän ja juuri A_{1c}-fraktioon. Tämän takia HbA_{1c}:n mittaamisesta on tullut erittäin tärkeä osa diabeteksen diagnosoinnissa ja hoitotasapainon seuraamisessa (Ilanne-Parikka ym. 2015, 117-118). HbA_{1c}:n tason seuraaminen on tärkeää arvioitaessa riskiä saada diabeteksen liitännäistauteja, kuten esimerkiksi munuais-

ja silmävaivoja. Mitä suurempi HbA_{1c}-pitoisuus veressä on, sitä suurempi on todennäköisyys saada liitännäistauteja (Penttilä ym. 2016, 136).

HbA_{1c}:tä mitattaessa on syytä muistaa, että vieritestien menetelmät eivät pysty erottamaan muita glykoituneen hemoglobiinin fraktioita, kuten esimerkiksi HbF:tä (glykoitunut fetaalihemoglobiini). Muita mittaamista haittaavia fraktioita ovat mm. HbS, HbD ja HbE (Penttilä ym. 2016, 137.) Lisäksi erilaiset anemiat (mm. raudanpuuteanemia ja talassemia) ja punasolujen ikään vaikuttavat tilat saattavat vaikuttaa HbA_{1c}-tuloksiin (Penttilä ym. 2016, 137). Jos halutaan mitata glykoituneen hemoglobiinin eri fraktiot, on silloin syytä käyttää HPLC-menetelmää (korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa). HPLC-menetelmä perustuu fraktioiden erilaiseen sähkövaraukseen ja niiden jakautumiseen kolonnissa. (Penttilä ym. 2016, 137.)

4 VIERITESTAUS JA SEN LAATUVAATIMUKSET

4.1 Vieritestaus

Labqualityn mukaan vieritesti on lääketieteellisesti perusteltu tutkimus, jolla on välitön vaikutus potilaan hoitoon, hoitopäätöksiin, lääkitykseen tai muuhun hoitoon läheisesti liittyvään toimintaan (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 269).

Vieritestaukselle on olemassa monia eri nimiä. Siitä käytetään nimitystä POC-testaus, joka tulee englanninkielisestä termistä point-of-care-testing, joka suoraan käännettynä tarkoittaa hoitopaikalla tapahtuvaa testausta. Toinen termi near patient testing tarkoittaa vastaavasti potilaan lähellä tapahtuvaa testausta. Yhteistä kaikille nimittäjille on, että laboratoriotutkimus tapahtuu yleensä laboratorion ulkopuolella. Testaaminen tapahtuu kuitenkin laboratorion vastuulla ja johdolla. (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 276.)

Vieritestauksen käyttö diagnostiikassa lisääntyy koko ajan. Tähän vaikuttaa laboratorioiden keskittäminen entistä isompiin yksiköihin ja sitä myötä herännyt tarve analyyseille akuutissa tarpeessa laboratorion ollessa kauempana. Vieritestausta tehdään keskuslaboratorioiden suorassa alaisuudessa esim. terveysasemien näytteenottolaboratorioissa, pienten yksityislaboratorioiden toimipisteissä ja haja-asutusalueilla liikkuvissa näytteenotto-toimipisteissä sekä omatestauksessa. (Vieritestaus terveydenhuollossa. 2009, 276.)

4.2 Laatuvaatimukset vieritestauksessa

Lääketieteellisissä tutkimuksissa laatu korostuu, sillä tutkimusten tuloksilla on välitön vaikutus diagnostiikkaan ja sitä kautta potilaan hoitoon. Suomessa vieritutkimusten laatua valvotaan useiden eri asiantuntijasuositusten ja standardien kautta. Suomen standardisoimisliitto SFS:n standardissa SFS-EN ISO 15189 kerrotaan lääketieteellisten laboratorioden laatua ja pätevyyttä koskevat vaatimukset sekä standardissa SFS-EN ISO 22870 kerrotaan vieritestauksen laatu- ja pätevyysvaatimukset. Labquality Oy:n julkaisema asiantuntijasuositus vieritestauksesta terveydenhuollossa vuodelta 2009 sisältää suosituksia vieritestauksen eri osa-alueista. Lisäksi laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista vuodelta 2010 sisältää kohtia, joita vieritestauslaitteiden on noudatettava.

Vieritestauksella on oltava terveydenhuollossa selkeä lääketieteellinen peruste. Sitä tulee käyttää vain silloin, kun tulos tarvitaan nopeasti ja sillä hyödytetään potilaan hoitoa tai diagnosointia. Henkilöt, jotka ovat laboratorion ulkopuolella saavuttamattomissa tai kotihoitossa, hyötyvät vieritestauksesta. (Vieritestaus terveydenhuollossa. 2009, 301.)

Jotta vieritestauksen tulokset olisivat lääketieteellisesti päteviä ja käyttökelpoisia diagnostiikassa, on vieritestauslaitteet ja –menetelmät todettava toimiviksi. Laboratoriomenetelmällä kliinisessä laboratoriossa on oltava validointi, joka tarkoittaa sitä, että sen oikeellisuus ja tulostason tarkastus on suoritettu väestöä vastaavalla potilasryhmällä ennen käyttöönottoa. Validoinnilla varmistetaan menetelmän sopivuus ja suorituskyky käyttötarkoituksessaan. Itse vieritestin toimivuus on vielä tarkistettava erikseen eli verifioitava lopullisessa käyttöympäristössä. (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 291-292.)

SFS-EN ISO 22870-standardin (2006) mukaan reagenssit, reagenssikitit ja itse laitteet on verifioitava eli niiden toimivuus on todennettava omilla näytteillä ennen käyttöä vierianalytiikassa. Vieritestilaitteen verifiointi tapahtuu testauksessa, jossa vieritestilaitteella tehdään sarja testejä, joita verrataan referenssilaboratorion menetelmällä saatuihin tuloksiin. Paras tulos saavutetaan käyttämällä näytteenä aitoja potilasnäytteitä, joissa tulosten vaihtelevuus on suuri. Tällöin saadaan vastaukseksi mahdollisimman laaja kirjo erilaisia tuloksia ja täten verifioinnin luotettavuus on parempi. Verifioinnissa on oltava aina mukana referenssilaboratorio, johon saatuja tuloksia verrataan. (Vieritestaus terveydenhuollossa. 2009, 301.)

Vieritestausta suorittavien henkilöiden on oltava koulutettuja ja perehdytettyjä tehtäväänsä. Itse laitteessa on oltava tarpeelliset merkinnät ja käyttöohjeet käyttöä varten. Laitetta saa käyttää vain sen käyttötarkoituksen mukaisesti. Laite on sijoitettava turvallisesti ja se ei saa vaarantaa käyttäjän tai muiden henkilöiden terveyttä. (Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista, 2010.)

5 TESTATTAVAT LAITTEET JA NIIDEN TOIMINTAPERIAATTEET

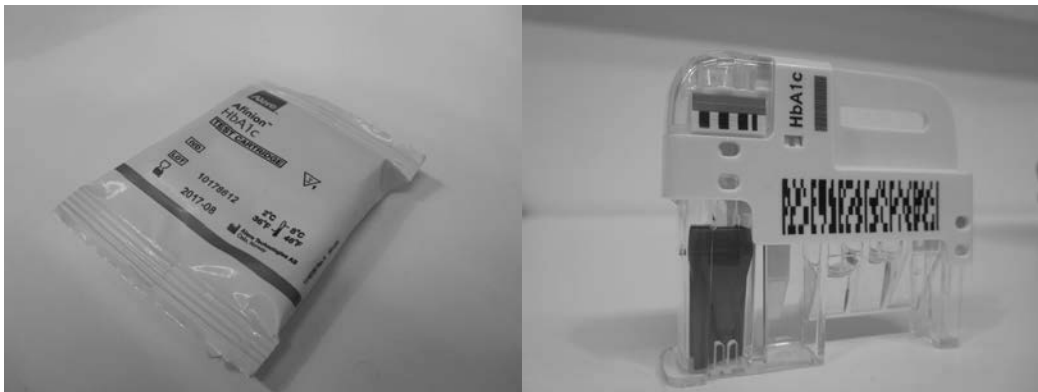
5.1. Alere Afinion AS100 Analyzer

Laite on ns. POC- eli point-of-care-laite eli vieritestilaite, jota on tarkoitus käyttää isojen laboratorioiden ulkopuolella esimerkiksi lääkäriasemilla, pienemmissä laboratorioissa ja sairaalan osastoilla. Laitetta ei ole tarkoitettu kotikäyttöön. Se on pienikokoinen ja painaa noin 5 kiloa (kuva 1). Laitevalmistaja käyttää laitteesta termiä multianalysaattori (multi-assay analyzer), koska samalla analysaattorilla voidaan määrittää kokoverinäytteestä myös lipiditutkimuspaneeli (kolesterolit ja triglyseridit) ja CRP (C-reaktiivinen proteiini) sekä virtsasta albumiinin ja kreatiniinin suhde. (Alere Oy 2015, 31.)



KUVA 1. Alere Afinion AS100 Analyzer. (Matti Rajaniemi 2017)

Laitteen valmistaja on Alere ja se on suunniteltu erittäin helppokäyttöiseksi ja soveltuu myös muun, käyttökoulutuksen saaneen hoitohenkilökunnan käyttöön. Jokaiselle tutkimukselle on omat yksittäispakatut kasettinsa (kuvat 2 ja 3). Reagenssikasetit säilytetään jääkaappilämpötilassa ja otetaan lämpiämään vähintään 20 minuuttia ennen käyttöä. Kasettipakkaus saa olla auki vain 20 minuuttia ennen määrittystä. Laite tunnistaa kasetin lämpötilan eikä analyysia suoriteta, mikäli lämpötila ei ole oikea. Kasetin voi laittaa koneeseen vain yhdessä asennossa (kuva 6), jolloin riski väärälle käytölle on matala. (Alere Oy 2015, 21.)



KUVAT 2 ja 3. Aleren HbA1c-kasetti kääreissä ja aukaistuna (Rajaniemi 2017)

Laitteessa on kosketusnäyttö, josta laitetta käytetään. Liikkuvia osia on ainoastaan kansi, joka aukeaa automaattisesti ja vain sulkeminen tapahtuu käsin. Tulokset voidaan siirtää analysaattorilta lisävarusteena saatavan Data Connectivity Converterin (ADCC) kautta. Tulokset ilmoitetaan kahdessa muodossa, mmol HbA_{1c}/mol hemoglobiinia ja prosenttiosuutena. (Alere Oy 2015, 31.)

Näytekasetti on pienehkö muovinen kasetti ja niitä on jokaiselle mitattavalle analytyille omansa, jotka erotellaan eri värillä ja viivakoodilla (kuvat 2 ja 3). Kasetista irrotetaan pieni muovikapillaari näytteen aspirointia varten (kuvat 4 ja 5). Näytteeksi käy joko sormenpäältä otettu veri tai kokoveri suoraan putkesta (EDTA-, hepariini-, sitraatti- tai natriumfluoridiveri). Näytemäärä, joka kapillaarisesti imeytyy kasetin mukana tulevaan kapillaariin, on 1,5µl. (Alere Oy 2015, 7.) Itse analyysi kestää kolme minuuttia ja 15 sekuntia. Mittausalueeksi valmistaja ilmoittaa 20-140 mmol/mol tai 4,0-15,0 %. (Alere Oy 2015, 31.)



KUVA 4. Näytteenotto sormenpästä kapillaariin. (Rajaniemi 2017)



KUVA 5. Kapillaarin asettaminen näytteenoton jälkeen (Rajaniemi 2017)



KUVA 6. Alere Afinion AS100 näytekasetti paikoillaan (Rajaniemi 2017)



KUVA 7. Tulokset valmiina analyysin jälkeen (Rajaniemi 2017)

5.1.1 Laitteen toimintaperiaate

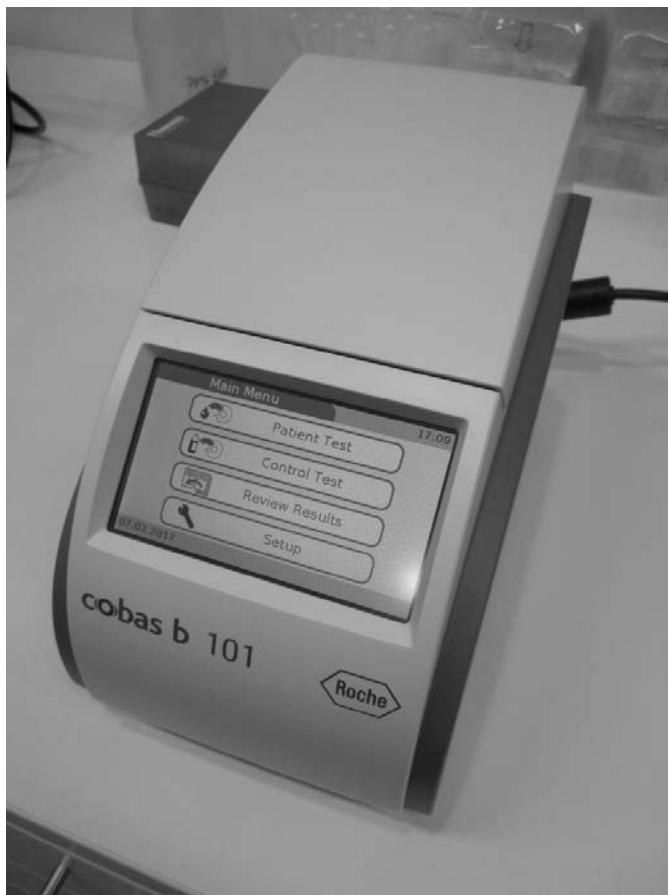
Näytteen aspiroinnin jälkeen näyte laimennetaan ja siihen sekoitetaan reagenssia, joka vapauttaa hemoglobiinin punasoluista. Reagenssin vaikutuksesta hemoglobiini saostuu. Näyteseos siirtyy koeastiassa siniseen boorihappo-konjugaattiin ja tämä konjugaatti sitoutuu glykoituneen hemoglobiinin cis-dioleihin. Näyteseos ajetaan suodatinkalvon (polyeetterisulfoni-kalvo) läpi ja kaikki saostunut hemoglobiini, konjugoitunut sekä konjugoimaton (glykoitunut ja ei-glykoitunut) jäävät kalvon päälle. Pesuliuoksella (morfoliini-puskuroitu natriumkloridi, joka sisältää pesu- ja säilöntäaineita) pestään ylimääräinen konjugaattiliuos pois. (Alere Oy 2015, 5.)

Mittaus perustuu kalvon päällä olevan saostuman reflektanssin mittaamiseen. Sinisen (glykoitunut hemoglobiini) ja punaisen (kokonaishemoglobiini) värin intensiteetti mitataan ja tuloksista muodostetaan verranto. Verranto kuvaa glykoituneen hemoglobiinin määrää verrattuna kokonaishemoglobiiniin ja se ilmoitetaan sekä mmol/mol- että %-muodossa. (Alere Oy 2015, 5.)

Virhelähteinä ohjekirja (2015) mainitsee hemolyyttisen anemian, runsaan verenvuodon, verensiirrot ja korkean fetaalihemoglobiinin määrän.

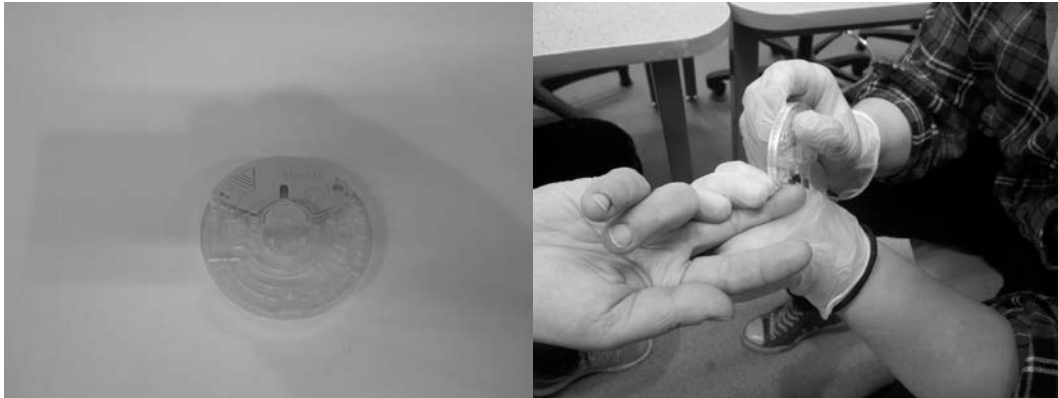
5.2. Roche cobas b101 POC system

Laite on Rochen valmistama ja se on tarkoitettu glykoituneen hemoglobiinin eli HbA_{1c}:n ja lipidipaneelin (kolesterolien ja triglyseridien) testaamiseen. Laite on suunniteltu erityyppin helppokäyttöiseksi ja soveltuu myös muun, käyttökoulutuksen saaneen hoitohenkilökunnan käyttöön. HbA_{1c}:tä voi määrittää kapillaariverestä ja EDTA-verestä, lisäksi lipidipaneelin voi tehdä myös hepariiniplasmasta. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 168.)



KUVA 8. Roche cobas b101 POC system (Rajaniemi 2017)

Laite on pienikokoinen, painaa noin kaksi kiloa ja siinä on kosketusnäyttö käyttöä varten (kuva 8). Valikot ovat englanninkielisiä ja ne on rakennettu loogisesti ja selvästi. Laitteen näytekasetit ovat yksittäispakattuja kiekkoja (kuva 9), joihin näyte aspiroidaan suoraan omaan kohtaansa (kuva 10) ja kiekko napsautetaan kiinni ja asetetaan laitteeseen (kuva 11). Kiekkoa ei voi laittaa väärinpäin eikä voi avata uudestaan. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 12.)



KUVAT 9 ja 10. Rochen näytekasetti ja näytteen aspirointi siihen. (Rajaniemi 2017)



KUVA 11. Kasetti paikoillaan ja laite analyysivalmiina (Rajaniemi 2017)

Kasetit säilytetään joko jääkaapissa tai huoneenlämmössä. Mikäli säilytys tapahtuu jääkaapissa, on niiden lämmittävä vähintään 15 minuuttia ennen mittausta. Avattu pakkaus

on käytettävä 10 minuutin kuluessa avaamisesta. Tulokset ilmoitetaan kahdessa muodossa, mmol HbA_{1c}/mol hemoglobiinia ja prosenttiosuutena. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 166.)

Aspiroitava näytemäärä on 2 µl ja itse analyysi kestää noin kuusi minuuttia. Mittausalueeksi valmistaja ilmoittaa 20-130 mmol/mol tai 4,0-14,0 %. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 168.)



KUVA 12. Tulos valmiina analyysin jälkeen (Rajaniemi 2017)

5.2.1 Laitteen toimintaperiaate

Laitteen toiminta perustuu mikrofluidikkaan. Mikrofluidiikka on mahdollistanut erittäin pienten näytemäärien käytön analytiikassa ja sen käyttö vierianalytiikassa on perusteltua. Näytemäärät saattavat vaihdella mikrolitroista jopa nano- ja pikolitroiin ja menetelmässä käytetään hyväksi mm. kapillaarivoimia nesteiden liikuttamisessa. (Strohmeier ym. 2015). Näyte saadaan kulkemaan ja reagoimaan näytekaseteissa monella eri tavalla. Sentrifuugauksen nopeus ja suunnanvaihdot, erilaiset venttiilit, liuotus, laimennokset, sekoitus ja jopa detektointi voidaan suorittaa pienessä mittakaavassa kertakäyttöisissä kaseteissa. (Strohmeier ym. 2015.) Tällä saavutetaan analysointilaitteiden mahdollisimman pieni koko ja reagenssien vähäinen määrä, mitkä ovat vierianalytiikassa erittäin tärkeitä. Testikasetin rakenne on suunniteltu etukäteen analysointimenetelmälle ja näytteelle luodaan tietty reitti, mitä pitkin kulkea analyysin eri vaiheissa.

Laitteen toimintaperiaatteina ovat muodostuvien analyyttien absorbanssin mittaaminen reaktion kahdessa eri vaiheessa ja immunokemiallinen reaktio. Näytteen aspiroinnin jälkeen kiekko asetetaan laitteeseen ja laite pyörittää kiekkoa, jolloin näyte etenee kiekossa ennalta suunniteltua reittiä ja seuraavat reaktiot tapahtuvat. Ensimmäisessä vaiheessa TRIS-puskuri (tris(hydroksimetyyli)aminometaani-puskuriliuos) vapauttaa hemoglobiinin punasoluista ja näyte jaetaan kahteen osaan. Ensimmäisen osa sekoitetaan natriumlauriylisulfaatin (sodium lauryl sulphate, SLS) kera ja muodostuva SLS-Hb-kompleksin absorbanssi mitataan 525nm aallonpituudella. Tästä saadaan tietää hemoglobiinin kokonaismäärä. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 12-13.)

Toisessa vaiheessa HbA_{1c} denaturoidaan kaliumferrisyaniidilla ja sukroosilauraatilla. Denaturoitu HbA_{1c} muodostaa sidoksen latex-partikkeleissa olevan HbA_{1c}:n vasta-aineen kanssa ja latex-agglutinaation inhibitioreaktion absorbanssi mitataan ja siitä saadaan HbA_{1c}:n konsentraatio. Tulos ilmoitetaan muodossa mmol/mol tai prosentteina. (Roche Diagnostics GmbH 2012, 12-13.)

Virhelähteinä ohjekirja (2012) mainitsee hemolyyttisen tai sirppisoluanemian, verensiirrot, vastikään tapahtuneet verenhukat ja fetaalihemoglobiinin suuren määrän.

5.3. Referenssinäytteet ja -menetelmä

Kaikki testaukseen saadut referenssiverinäytteet tulivat Fimlab Laboratoriot Oy:ltä, jossa ne oli analysoitu COBAS INTEGRA-laitteistolla automaatiokemian laboratoriossa Tampereella. Referenssinäytteet oli numeroitu ja niiden tulokset oli kirjattu erilliseen taulukkoon, ja ne tarkistettiin ja kirjattiin laskentaohjelmaan vasta, kun kaikki analyysipäivän näytteet olivat analysoitu molemmilla vierilaitteilla. Näytteet olivat tuoreita, samana päivänä otettuja ja analysoituja ja ne analysoitiin vierilaitteilla tuoreena samana päivänä kuin ne haettiin. Fimlabin referenssimenetelmän mukaan (Holm 2014) EDTA-putkissa näyte säilyy huoneenlämmössä 3 vuorokautta HbA_{1c}:n tulostason muuttumatta.

Automaatiokemian laite COBAS INTEGRA hemolysoi automaattisesti kokoveren (EDTA- tai Li-hepariiniveri) vapauttaen hemoglobiinin hemolysointireagenssilla (Hemolyzing Reagent Gen. 2, laitevalmistajan koodi). Näytteen glykohemoglobiiniin sitoutuu R1-reagenssin sisältämä spesifinen vasta-aine ja R2-reagenssin sisältämä polyhapteeni muodostaa sitoutumattoman vasta-aineen kanssa komplekseja. Muutos turbidimetriassa (sameudessa) mitataan aallonpituudella 340nm ja se on kääntäen verrannollinen glykohemoglobiinin pitoisuuteen. Vapautunut reagoimatta jäänyt hemoglobiini muuttuu yhdisteeksi, jonka absorbtiospektri mitataan aallonpituudella 378nm edellä mainitun immunologisen reaktion aikana. Erillistä hemoglobiinireagenssia ei siis tarvita. (Holm 2014).

Virhelähteinä menetelmäohje mainitsee korkean fetaalihemoglobiinin määrän, hemolyyttisen anemian, runsaan verenvuodon ja verensiirrot (Holm 2014).

6 AIKAISEMPIA TUTKIMUKSIA LAITTEISTA

Australiassa vuonna 2015 julkaistiin tutkimus Analytical evaluation of the Roche cobas b101 analyser for HbA_{1c}. Tutkimuksessa verrattiin Rochen vieritestilaitteen tuloksia Siemensin DCA Vantage- vieritestilaitteeseen ja Bioradin D10-analyysilaitteeseen. Tutkimuksessa käytettiin 38:a EDTA-laskimoverinäytettä. Tutkimuksessa myös selvitettiin fetaalihemoglobiinin ja hemolyysin määrän vaikutusta itse analyysin tuloksiin. Tulosten matemaattisen ja tilastollisen analyysin mukaan Roche cobas-laitteen tulokset ovat vertailukelpoisia laboratoriossa käytettyihin menetelmiin. Tutkimuksessa päädyttiin samaan lopputulokseen suuren fetaalihemoglobiinin määrän vaikutuksesta lopputuloksiin kuten molempien valmistajien kanssa. (Dimeski, Bassett, Johnston & Brown 2015.)

Vuonna 2013 tehtiin Yhdysvalloissa tutkimus Roche Cobas b101 HbA_{1c} and lipids evaluation, jossa laitetta verrattiin kolmeen eri laboratoriossa käytettävään laitteeseen sekä HbA_{1c}:n ja lipidien osalta. Laitteet olivat COBAS INTEGRA, Cobas 502 ja BioRad Variant II. Tutkimuksen lopputulos oli se, että Rochen vieritestilaitte toimii hyvin verrattuna BioRad Varint II:seen mutta verrattuna muihin laitteisiin tulosten heittäily oli suurempi HbA_{1c}:n osalta. Tutkimuksessa päädyttiin kuitenkin siihen tulokseen, että kyseistä laitetta voidaan käyttää kliinisen laboratorion ulkopuolella ja sen tulokset ovat luotettavia. (The integrated cardiovascular clinical network 2013.)

Vuonna 2011 Espanjassa tehty tutkimus Evaluation of two HbA_{1c} point-of-care analyzers vertasi kahta vierilaitetta (Siemens DCA Vantage ja Alere Afinion AS100) referenssimenetelmään. Referenssimenetelmänä toimi korkean paineen nestekromatografia ja referenssilaitte oli HA 8160 Menarini. Tutkimuksessa oli mukana 53 EDTA-laskimoverinäytettä diabeetikoilta ja niiden HbA_{1c}-pitoisuus oli vaihteleva (20-130 mmol/mol). Tulosten analyysin jälkeen molemmat laitteet todettiin luotettaviksi potilaskäytössä. (Sanchez-Mora ym. 2011.)

Point-of-care-lehdessä vuonna 2009 julkaistu artikkeli Evaluation of the Afinion AS100 Point-of-Care Analyzer for Hemoglobin A_{1c} käsitteli vieritestilaitteen testausta, jossa sen tuloksia verrattiin Variant II Turbo-laitteeseen. Tutkimuksessa analysoitiin 110 aitoa potilasnäytettä. Variantin toimintaperiaate on nestekromatografinen ja se kykenee erottamaan glykoituneen hemoglobiinin eri muodot (HbA_{1a}, HbA_{1b} ja HbA_{1c}). Kyseiseen laitteeseen verrattuna Alere vieritestilaitte toimi erittäin hyvin, sen tarkkuus oli verrattavissa referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin. (Arabadjief & Nichols 2009.)

7 TUTKIMUSMENETELMÄT

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus, jota voidaan nimittää myös tilastolliseksi tutkimukseksi (Heikkilä, 2008). Määrällisen tutkimuksen tarkoituksena on saada yleistettävissä olevaa tietoa. (Kvantitatiivisen analyysin perusteet 2007.) Tutkimuksessa saatuja numeerisia arvoja ja tuloksia arvioidaan sopivin tilastomatemattisin keinoin ja pyritään niiden avulla osoittamaan laitteiden luotettava toiminta. Valitut keinot käsittelevät tuloksia keski- ja hajontalukujen kautta.

Aritmeettinen keskiarvo eli **Mean** (ka. M) on Tilastokeskuksen mukaan (2016) tilastotieteen käytetyin keskiluku. Tavallisesti puhutaan vain keskiarvosta, mutta pidempi nimi erottaa käsitteen geometrisesta tai harmonisesta keskiarvosta. Aritmeettinen keskiarvo lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{(x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{n} \quad (1)$$

Kaikki saadut tulokset (kaavassa x) lasketaan yhteen ja jaetaan tulosten lukumäärällä (kaavassa n). (Tilastokeskus 2016.)

Keskihajonta eli **standard deviation** (SD) on Yhteiskuntatieteellisen tietoarkiston mukaan tärkein ns. hajontaluku eli luku, joka mittaa havaintoarvojen hajaantumista muuttujan jakauman keskikohdan molemmin puolin. Se kertoo, miten kaukana yksittäiset havainnot ovat keskimäärin keskiarvosta. Keskihajonta lasketaan seuraavalla kaavalla, kun tarkastelun alla on kaikki tulokset, kuten tässä tapauksessa. (Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2017.)

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

Kaavassa s on keskihajonta, n on lukumäärä, x_i on yksittäinen tulos ja \bar{x} on lukujen keskiarvo. Sigma-merkki (Σ) tarkoittaa sitä, että kaikki yksittäiset tulokset lasketaan yhteen ennen neliöjuuren ottamista. (Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2017.)

Variaatiokerrointa eli **coefficient of variation** (CV) käytetään, kun vertaillaan kahden eri otoksen keskihajontoja keskenään. Otosten keskihajonnat saattavat antaa virheellisen tulkinnan mahdollisuuden, sillä keskihajonnat vaihtelevat keskiarvon mukaan. Variaatiokerroin on hajontaluku, joka suhteuttaa keskihajonnan keskiarvoon ja se lasketaan seuraavan kaavan mukaan:

$$CV = s / \bar{x} \quad (3)$$

Kaavassa s on otoksen lukujen keskihajonta ja \bar{x} on lukujen keskiarvo. Kaavassa keskihajonta suhteutetaan siis aineiston keskiarvoon. (Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto 2017.)

Pearsonin korrelaatio on Yhteiskuntatieteellisen arkiston mukaan (2016) kaikista yleisin kaava kahden muuttujan välistä korrelaatiota mitattaessa. Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden muuttujan välistä, lineaarista yhteyttä toisistaan. Korrelaatiokerroin, tässä Pearsonin tulomomenttikorrelaatiokerroin, ilmoitetaan otoksen kohdalla pienellä r -kirjaimella (r) tai Pearsonin korrelaatiokertoimen neliönä tai r^2 tai R^2 (Metsämuuronen 2005,344).

Pearsonin korrelaatio saa arvot $-1:n$ ja $1:n$ väliltä. Jos lukema on 0 , korrelaatiota ei ole. Jos lukema on -1 , on tällöin numeroiden välillä täydellinen negatiivinen riippuvuus ja jos lukema on 1 , on riippuvuus täydellisen positiivinen. Mitä lähempänä numeerista arvo 1 ollaan, sitä suurempi on muuttujien keskinäinen riippuvuus. Jos arvo on tasan 1 , ovat kaikki pisteet täsmälleen samalla suoralla. (Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto 2016.)

Korrelaatio lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n s_x s_y}$$

missä

n on lukuparien x_i, y_i lukumäärä

s_x, s_y ovat muuttujien x ja y keskihajonnat ja

\bar{x}, \bar{y} ovat muuttujien x ja y keskiarvot.

(4)

Kahden eri menetelmän vertailuun on kehitetty erilaisia matemaattisia malleja ja niistä yleisimmin käytössä olevat ovat Altman-Bland-kuvaaja ja Passing-Bablok-regressioanalyysi. **Passing-Bablok-regressioanalyysi** soveltuu näistä kahdesta paremmin kliinisen kemian menetelmien vertailuun (Bilić-Zulle 2011).

Kun uutta laitetta otetaan käyttöön, sen menetelmää on verrattava johonkin hyväksi todettuun ja toimivaan referenssimenetelmään, tässä tapauksessa Fimlab Laboratoriot Oy:n akkreditoituun ja potilaskäytössä olevaan menetelmään (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 291-292). Vertailun tarkoituksena on osoittaa kahden eri menetelmän riippuvuus toisistaan matemaattisella mallilla. Passing-Bablok-analyysillä saadaan arvio siitä, kuinka voimakas tuo riippuvuus on. Jos ero on kliinisesti tarpeeksi pieni ja hyväksyttävä, on menetelmä käyttökelpoinen. (Bilić-Zulle 2011.)

Passing-Bablok-analyysi voidaan tehdä suoraan Microsoft Exceliin asennettavalla lisäosalla, joka on saatavilla koeversiona ilmaiseksi opiskelijakäyttöön internetistä. Lisäosa antaa suoraan tulokset ja piirtää kuvaajan. Kuvaaja on erittäin tärkeä visuaalisessa arvioinnissa ja lukuarvot taas matemaattisessa. Lisäosa laskee automaattisesti kuvaajan suoran yhtälön, R^2 -arvon ja lisäksi Lower 95%-CI-arvon. Mitä lähempänä R^2 -arvo on ykköstä, sen parempi on pisteiden ja suoran välinen riippuvuus. Kun R^2 -arvo on suurempi kuin 0,95 voidaan suoraa pitää luotettavana. Lower 95%-CI-arvon pitäisi olla mahdollisimman lähellä numeerista arvoa yksi. Tällöin kahdella verratulla menetelmällä ei ole mitään merkitsevää eroa. (Bilić-Zulle 2011.)

8 OPINNÄYTETYÖN VAIHEET

Helmikuussa 2016 opinnäytetyön aihe saatiin Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikkokoulutukselta ja opinnäytetyösuunnitelman suunnittelu ja teko aloitettiin. Maaliskuussa 2016 suunnitelma opinnäytetyöstä hyväksyttiin Tampereen Ammattikorkeakoulun toimesta ja tarvittavat luvat varsinaisen testaamisen aloittamiseen saatiin. Ennen aloitusta laitevalmistajiin oltiin yhteydessä, laitteiden käyttöohjeisiin tutustuttiin sekä etsittiin tietoa vastaavista aikaisemmista laitetestauksista.

Tämä opinnäytetyö oli alkuperäisen suunnitelman mukaan tarkoitus toteuttaa kolmen opiskelijan yhteisenä opinnäytetyönä. Näytteiden analysointivaiheessa ja tulosten tilastollisessa käsittelyssä koko ryhmä oli mukana. Kesän 2016 jälkeen kaksi opiskelijaa jättäytyi pois, joten työ on tehty yksilötyönä.

Vertailun testausosa tapahtui 2.- 4.5.2016. Fimlab Laboratoriot Oy:n sairaalakemistin/tuotantopäällikön Päivi Holmin kanssa sovittiin etukäteen sopivien näytteiden hausta. Jokaisen testipäivän aamuna noin kello 12:00 haettiin noin 15 kpl EDTA-kokoverinäytteitä. Näytteet oli otettu testipäivien aamuna eri puolilla Pirkanmaata. Näytteistä oli muodostettu sopivan kokoinen sarja, joka oli analysoitu COBAS INTEGRA-laitteistolla automaatiokemian linjastolla Fimlab Laboratoriot Oy:n tiloissa Tampereella. Analyysin jälkeen näytteet oli siirretty puhtaisiin muoviputkiin, jotka toimitettiin meille putkiteli-neessä. Putkissa ei ollut tunnistetietoja, joten tietosuoja pysyi hyvänä koko testauksen ajan. Näytteet oli valittu tulostensa perusteella eli tulokset olivat mahdollisimman laajalta alueelta ylettyen molempien analyysilaitteiden mittausalueiden koko alueille.

Kolmen päivän aikana analysoitiin yhteensä 44 näytettä, 15 kpl 2.5., 14 kpl 3.5. ja 15 kpl 4.5.2016. Näytteiden analysointivaiheessa työtehtävät eri päiville olivat selkeästi jaettu meidän, kolmen opiskelijan kesken. Yksi meistä käytti Alerea, toinen Rochea ja kolmas oli näytteenkäsittelijä sekä tulosten tallentaja. Tehtäviä kierrätettiin näiden kolmen päivän aikana, joten kaikki tekivät yhden päivän kutakin työpistettä. Tällä varmistimme, että systemaattisen virheen osuus oli mahdollisimman pieni.

Putket sekoitettiin huolellisesti ja näytteet otettiin muovisella Pasteur-pipetillä putkesta ja annosteltiin molempien laitteiden ohjeiden mukaisesti suoraan testikasettiin aina samassa järjestyksessä, ensin Alere ja sitten Roche. Molemmat analyysit aloitettiin aina samaan aikaan. Aleren laite oli nopeampi, joten ennen seuraavaa analyysia odotettiin Rochen laiteelta valmistuvia vastauksia.

Kaikki tulokset merkittiin suoraan Microsoft Excel-ohjelmaan taulukoituna. Molemmille POC-laitteille tehtiin laitetoimittajan omat kontrollitarkastukset ennen varsinaisia analyysijä, joilla todettiin molempien laitteiden luotettava toiminta. Käytössä oli sekä matalan että korkean pitoisuuden kontrollit ja tulokset ovat liitteessä 2. Tulokset olivat luotettavia, sillä kontrollit pysyivät kaikki sovituisissa rajoissa.

Kolmena päivänä analysoitujen ja Excel-tilukkolaskentaohjelmaan tallennettujen tuloksien perusteella laskettiin erilaisia matemaattisia parametreja heti 4.5.2016 testien jälkeen. Tuloksista määritettiin aritmeettinen keskiarvo, keskihajonta, variaatiokerroin, Pearsonin korrelaatio ja Passing-Bablok-regressioanalyysi. Numeeriset tulokset ovat liitteessä 1.

9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Testauksen päätyttyä saamillemme numeerisille arvoille suoritettiin tarkastelu tilastollisilla menetelmillä. Testauksen numeeriset tulokset ja niiden tarkastelu käydään läpi tässä luvussa.

9.1 Tulokset

Referenssitulosten (n=44) **aritmeettinen keskiarvo** oli 57,23 mmol/mol. Alerella saadut tulokset antoivat arvon 57,30 mmol/mol ja Rochen vastaava luku oli 56,48 mmol/mol. Aleren tulos poikkesi referenssituloksista vain 0,12% ja Rochen tulos 1,31%.

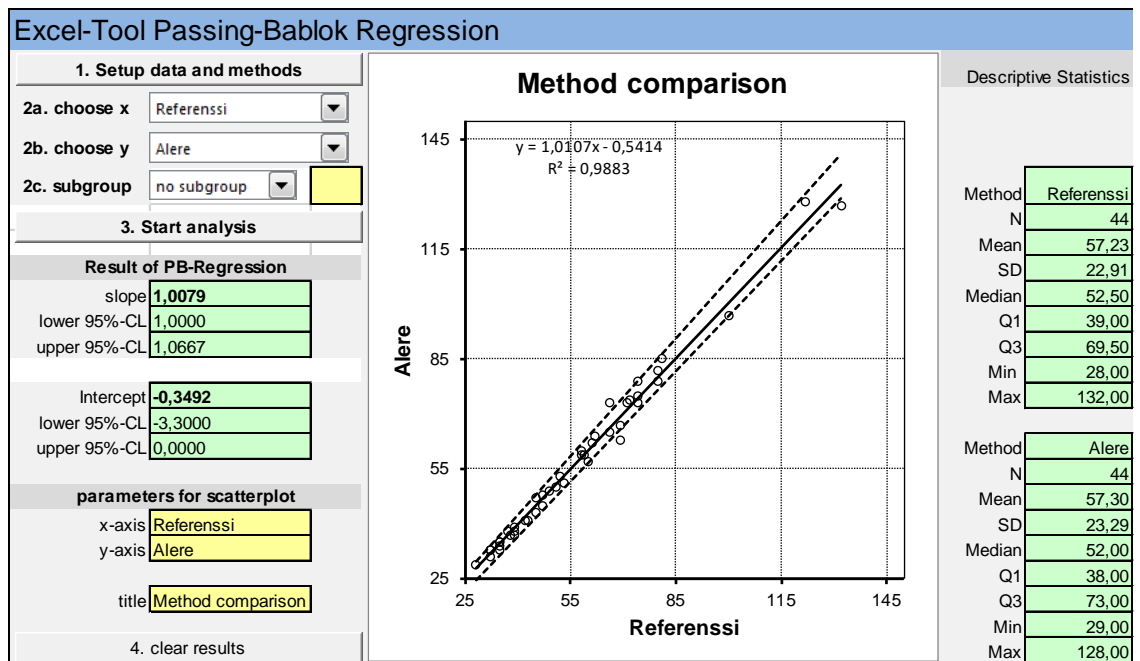
Referenssitulosten **keskihajonta** oli 22,91 mmol/mol. Aleren keskihajonta oli 23,29 mmol/mol ja prosentuaalinen poikkeama referenssistä oli 1,66%. Rochen keskihajonta oli 20,61 mmol/mol ja prosentuaalinen poikkeama referenssistä oli 10,03%.

Tässä koestuksessa aitojen potilasnäytteiden antamat tulokset olivat välillä 28-132 mmol/mol (referenssitulokset), joten keskihajonnat olivat lukuina suuria.

Variaatiokerroin laskettiin kaikille laitteille erikseen. Referenssilaitteelle variaatiokerroin (keskihajonta/keskiarvo*100) oli 40,02. Aleren laitteella vastaava arvo oli 40,64 (poikkeama referenssistä vain 1,54%) ja Rochen laitteella 36,49 (poikkeama referenssistä 8,83%).

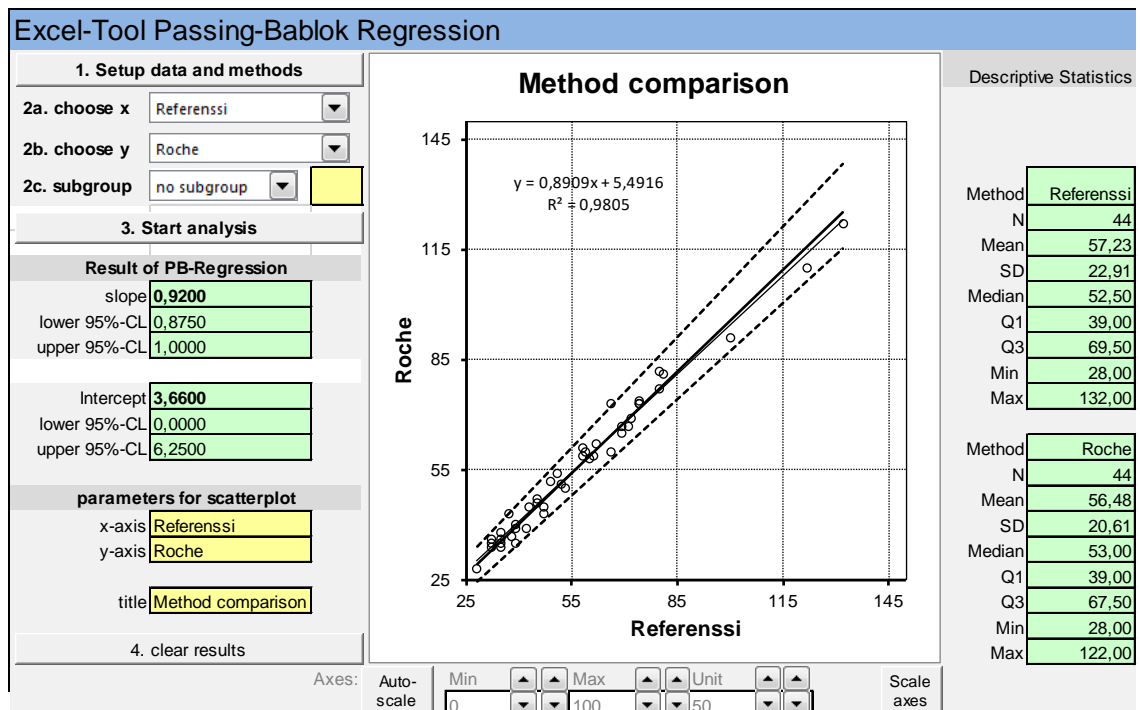
Pearsonin korrelaatio oli tutkimusaineiston perusteella Rochen laitteelle 0,990. Aleren laitteen tulosten ja referenssitulosten korrelaatio oli jopa vielä parempi. Sen arvo oli 0,994. Pearsonin korrelaation lähestyessä numeerista arvoa 1 on vertailtu menetelmä luotettava (Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto 2016).

Passing-Bablok-regressio-analyysin tuloksena saatiin Aleren laitteelle (kuva 13) kuvaajan suoran yhtälöksi $y=1,0107x-05414$ ja R^2 -arvoksi 0,9883. Slope-arvo oli 1,0079 ja lower 95%-CI-arvo oli tasan 1,000.



KUVA 13. Passing-Bablok-regressio Alere Afinion AS100 (Rajaniemi 2017)

Passing-Bablok-regressio-analyysin tuloksena saatiin Rochen laitteelle (kuva 14) kuvaajan suoran yhtälöksi $y=0,8909x+5,4916$ ja R^2 -arvoksi 0,9805. Slope-arvo oli 0,9200 ja lower 95%-CI-arvo oli 0,8750.



KUVA 14. Passing-Bablok-regressio Roche Cobas B101 (Rajaniemi 2017)

9.2 Tulosten tarkastelu

Aleren Afinion AS100-laitteen tulosten keskiarvo poikkesi referenssimenetelmästä vain 0,12%, keskihajonta 1,66% ja variaatiokerroin 1,54%. Vastaavat lukemat Roche cobas b101-laitteella olivat 1,31%, 10,03% ja 8,83%. Molempien laitteiden antamien tulosten taso on hyväksyttävä mutta Aleren laitteen antamat tulokset ovat tilastollisesti lähempänä referenssimenetelmää.

Pearsonin korrelaatio ja Passing-Bablok-analyysi todistivat, että molempien laitteiden menetelmät ovat toimivia, luotettavia ja tarkkoja. Pearsonin korrelaation tulokset olivat Alerella 0,994 ja Rochella 0,990, mikä kertoo molempien laitteiden toimivan erittäin luotettavasti, sillä Pearsonin korrelaation lähestyessä numeerista arvoa yksi, on menetelmä luotettava (Yhteiskuntatieteellinen tietokirja 2016). Aleren laitteen lower 95%-CI-arvo Passing-Bablok-regressioanalyysissä oli tasan 1,000, joka todistaa sen, että referenssimenetelmän ja Aleren menetelmän välillä ei ole matemaattista poikkeamaa vaan tulostaso on tilastollisesti sama. Rochen laitteen arvo oli 0,875, mikä on myös hyvällä tasolla. Molempien laitteiden R_2 -arvo Passing-Bablok-regressiossa oli yli 0,95:en, jota hyväksyttävän rajana menetelmien vertailuissa (Bilic-Zulle 2011).

Tehdyn testauksen tulokset ovat samanlaisia kuin aiemmat tehdyt tutkimukset samoilla laitteilla ympäri maailmaa. Tulokset vahvistavat muiden saamat päätelmät laitteiden oikeasta ja tarkasta toiminnasta.

Laskettujen matemaattisten suureiden ja niiden vertailulla referenssilaitteen vastaaviin sekä Passing-Bablok-regressioanalyysin perusteella voidaan luotettavasti todeta, että molemmat laitteet soveltuvat kliiniseen potilaskäyttöön HbA_{1c}:n mittauksessa. Aleren tulokset ovat tilastollisesti hieman parempia kuin Rochen.

10 TUTKIMUKSEN EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS

Kaiken tieteellisen tutkimuksen peruspilarina on eettisyys ja luotettavuus. Tutkimus voi olla luotettavaa ja sen tulokset uskottavia, jos hyvän tieteellisen käytännön periaatteita on noudatettu. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan mukaan (2013) hyvän tieteellisen käytännön lähtökohtia ovat mm. rehellisyys, yleinen huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä. Tutkimukseen on sovellettava kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. Tutkimuksen tuloksia julkaistaessa on noudatettava avoimuutta ja vastuullisuutta. Tekijöiden on otettava huomioon muiden tutkimusten ja tutkijoiden saavutukset ja heidän työhönsä on viitattava asianmukaisella tavalla. Tutkimus on suunniteltava huolella, siihen on oltava asianmukaiset luvat ja kaikki tieto on tallennettava alan vaatimusten mukaisesti. Myös tutkimuksen tekijän- ja käyttöoikeudet on sovittava kaikkien osapuolten kesken. Lisäksi kaikki sidonnaisuudet ja taloudelliset rahoituslähteet on ilmoitettava ja raportoitava. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2013.)

Opinnäytetyö on tehty mahdollisimman hyvin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjeiden mukaan. Lupa työhön haettiin Tampereen Ammattikorkeakoululta suunnitteluvaiheessa. Testaus suunniteltiin etukäteen siten, että analysoitavien näytteiden tuloksia ei tiedetty etukäteen. Suunnitelma päivittäisestä työskentelystä tehtiin huolellisesti etukäteen ja siinä pysyttiin koko testauksen ajan. Lupa referenssimenetelmän ja analysoitujen näytteiden käyttöön saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:n sairaalakemistiltä Päivi Holmilta.

Opinnäytetyössä on käytetty vain luotettavia lähteitä ja teoriatieto on varmistettu aina useammasta lähteestä. Kaikkiin lähteisiin ja muiden suorittamiin tutkimuksiin on viitattu asianmukaisesti.

Molemmat laitevalmistajat tukivat opinnäytetyötä ilmaisilla reagenssipaketeilla ja toinen laitevalmistaja vielä henkilökohtaisella koulutuksella laitteen käyttöön mutta tämän ei annettu vaikuttaa millään tavalla tulosten tasoon. Kaikki numeeriset tulokset kirjattiin sellaisinaan taulukoihin, niihin ei lisätty tai poistettu mitään. Matemaattiset laskelmat on tehty kaikilla arvoilla käyttäen alan normaaleja ja hyväksi koettuja analyysimetodeja.

Tutkimuksen eettisyys säilyi korkeana. Kaikki näytteet saatiin ilman mitään tunnistetietoja, joten meillä ei ollut eikä ole edelleenkään mitään tietoa näytteiden taustoista. Jokaisen näyte analysoitiin ja tulokset kirjattiin muistiin kaikista. Kaikki näytteet tuhottiin asianmukaisesti testauksen jälkeen. Opinnäytetyön eettisyys ja luotettavuus pysyivät koko ajan korkealla tasolla.

11 POHDINTA

Tässä opinnäytetyössä todennettiin testauksen kautta kahden eri vieritestilaitteen käyttökelpoisuus mitattaessa HbA_{1c}:tä. Tulosten matemaattinen ja tilastollinen analyysi todistivat, että testattavat laitteet, Alere Afinion AS100 Analyzer ja Roche cobas b101 POC system, toimivat aidossa ympäristössä siten, että niiden tulostasoon voi luottaa ja tulosten perusteella voidaan tehdä oikeat lääketieteelliset päätelmät. Tutkimuksen tavoitteet, tarkoitus ja tehtävät täyttyivät.

Näytteidenkäsittelyssä otettiin huomioon turvallisuusnäkökohdat ja tietosuoja. Kaikki analysoimamme näytteet olivat aitoja potilasnäytteitä ja niiden käsittelyssä noudatettiin normaaleja varotoimia. Näytteet säilytettiin ohjeiden mukaan huoneenlämmössä ennen analyysia. Kertakäyttökäsitteitä käytettiin koko analyysin ajan ja jätteiden oikeasta hävittämisestä huolehdittiin testien jälkeen. Työturvallisuus pysyi korkealla tasolla koko prosessin ajan. Tietosuoja pysyi erinomaisena, sillä näytteet saatiin puhtaissa muoviputkissa, joissa ei lukenut minkäänlaisia tunnistetietoja. Emme tiedäneet kenen näytteitä analysoimme eikä meillä ole mitään keinoja yhdistää tuloksia kehenkään ihmiseen.

Tilastollinen analyysi tehtiin kaikkien arvojen perusteella, poistamatta tai lisäämättä niihin mitään. Käytetyt suureet ovat kvantitatiiviselle tutkimukselle ominaisia ja niiden avulla saatiin luotettavaa tietoa laitteiden toiminnasta. Kliinisen kemian tutkimusten vertailuissa yleisesti käytettävät Pearsonin korrelaatio ja Passing-Bablok-regressioanalyysi osoittavat selkeän positiivisen riippuvuuden referenssimenetelmän ja testauksessa saatujen tulosten välillä. Tilastollinen ja matemaattinen analyysi tuloksista olivat tarpeeksi laajoja, joten niiden perusteella voidaan päätellä, että laitteet toimivat oikein. Näytteitä oli yhteensä 44, joiden perusteella tulokset laskettiin. Aitojen potilasnäytteiden tulosten hajonta oli suuri, tulokset vaihtelivat välillä 28-132 mmol/mol. Huolimatta suuresta vaihtelusta molemmat laitteet antoivat luotettavia ja vertailukelpoisia tuloksia.

Testauksessa saatuja tuloksia verrattiin aikaisempiin tutkimuksiin samoista laitteista. Tehdyssä testauksessa saadut tulokset ovat samanlaisia kuin muut, molemmat laitteet toimivat luotettavasti. Pientä eroa on havaittavissa Alerin eduksi kahta laitetta vertailtaessa. Lisäksi muissa tutkimuksissa on päädytty häiritsevien tekijöiden kohdalla samoihin päätelmiin kuin referenssimenetelmänä käytetyssä Fimlab Laboratoriot Oy:n menetelmässä.

Yhteenvetona voidaan sanoa, että molemmat laitteet toimivat erinomaisesti ja niiden käyttö tulevassa Taito-talossa on turvallista ja perusteltua. Molempien laitteiden oikea toiminta saatiin matemaattisesti ja tilastollisesti todistettua ja täten niiden antamia tuloksia voidaan käyttää kliinisessä päätöksenteossa.

Koko opinnäytetyöprosessi koostui useasta eri osasta. Testauksen osalta, joka tapahtui jo keväällä 2016, kaikki sujui erinomaisesti, meitä oli vielä siinä vaiheessa kolme mukana. Vaihtelimme rooleja suunnitellusti testausprosessin aikana ja noudatimme alkuperäistä suunnitelmaa. Koko testaus kesti vain kolme päivää, niin kuin olimme suunnitelleetkin.

Kirjoitusprosessista muodostui erittäin haastava, sillä ryhmän muiden jäsenten poisjättyminen toi epätietoisuutta koko projektiin ja tämän takia kirjoitusprosessi eteni hitaasti. Vaikein osa koko prosessissa oli epävarmuus siitä, kuka kirjoittaa ja mitä. Lopulta kaikkien muiden osuus kirjoitettiin uusiksi ja opinnäytetyö on tehty yksilötyönä. Kaikesta huolimatta sain kirjoitettua selkeän ja itseäni tyydyttävän opinnäytetyön ja uskon siitä olevan hyötyä tulevaisuudessa muiden vastaavien laitteiden koestuksessa.

Jatkotutkimusaiheena molempien laitteiden osalta voitaisiin nähdä muiden analyyttien testaus, sillä HbA_{1c}:n osalta toiminta on nyt tarkastettu. Kehitysehdotus jatkoa ajatellen olisi pikaohjeiden tekemisen HbA_{1c}:lle molemmille laitteille, sillä laitteita tullaan käyttämään moniammatillisessa yhteistyössä myös muiden kuin bioanalyttikko-opiskelijoiden toimesta. Kuvallisesta ohjeesta olisi varmasti hyötyä jokapäiväisessä käytössä ja sellaisia tehdään jo toisena opinnäytetyönä.

LÄHTEET

- Alere Oy. 2015. Alere Afinion AS100 Analyzer -ohjekirja. Luettu 28.3.2016
<https://ensur.invmed.com/ensur/broker/ensurbroker.aspx?code=2000330&cs=25808453>
- Arabadjief M. & Nichols J.H. 2009. Evaluation of the Afinion AS100 Point-of-Care Analyzer for Hemoglobin A_{1c}. Point-of-care 8(1), 11-15.
- Bain B., Wild B., Stephens A. & Phelan L. 2013. Variant haemoglobins. A guide to identification. Wiley Blackwell. Espanja. 4. Painos.
- Bilić-Zulle, L. 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. Biochemia Medica 21(1), 49-52.
- Dimeski, G., Bassett, K., Johnston, J. & Brown, N. 2015. Analytical evaluation of the Roche Cobas B101 Analyzer for HbA_{1c}. Health support, Queensland, Australia. Luettu 11.3.2017 <http://www.aacb.asn.au/documents/item/3798>
- Eskelinen, S. 2016. Vieritestit. Lääkärikirja Duodecim. Luettu 16.3.2017.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03204
- Gough S., Manley S. & Stratton I. 2010. HbA_{1c} in diabetes, case studies using IFCC units. John Wiley & sons. E-kirja.
- Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. Edita Prima Oy, Helsinki. 7.painos.
- Holm, P. 2014. Hemoglobiini-A_{1c}, glykoitunut (koko verestä). Menetelmä nro 6128. Automaatiokemian laboratorio. Fimlab Laboratoriot Oy. Tampere.
- Ilanne-Parikka P., Rönnemaa T., Saha M. & Sane T. 2015. Diabetes. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 8.painos.
- Kvantitatiivisen analyysin perusteet. 2007. Virtuaaliammattikorkeakoulu. Oppimateriaali. Luettu 15.4.2017
<http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/0709019/1193463890749/1193464131489/1194289328583/1194289824724.html>
- Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista 629/2010.
- Metsämuuronen J. 2005. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä. 3. Painos.
- Mustajoki, P. 2017. Diabetes. Lääkärikirja Duodecim. luettu 14.11.2016.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00011
- Penttilä I., Penttilä K., Holm P., Laitinen H., Ranta P., Törrönen J. & Rauramaa R. 2016. Methods, units and quality requirements for the analysis of haemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. World journal of methodology. 6(2), 133-180.

Roche Diagnostics GmbH. 2012. Cobas b101 System- ohjekirja. Luettu 28.3.2016.
http://www.rochecanada.com/content/dam/roche_canada/en_CA/documents/Operator%20Manuals/cb101_OM_1.0.0_ENCA_07735219018_01_print.pdf

Sanchez-Mora C., Rodriguez-Oliva M., Fernandez-Riejos P., Mateo J., Polo-Padillo J., Goberna R, Sanchez-Margalet V. 2011. Evaluation of two HbA_{1c} point-of-care analyzers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49(4). Walter de Gruyter. New York.

Strohmeier O., Keller M., Schwemmer F., Zehnle S., Mark D., von Stetten F., Zengerle R. & Paust N. 2015. Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications. *Chemical society reviews* 44(17). 6187-6229. Royal society of chemistry.

Suomen standardisoimisliitto. 2013. Lääketieteelliset laboratoriot. Laatu ja pätevyyttä koskevat vaatimukset. SFS EN-ISO 15189. Helsinki.

Suomen standardisoimisliitto. 2006. Vieritestaus. Laatu- ja pätevyysvaatimukset. SFS EN-ISO 22870. Helsinki.

Trivelli L, Ranney H. & Lai H. 1971. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *New England journal of medicine*. 284(7). 353-357.

The Integrated Cardiovascular Clinical Network. 2013. Roche Cobas b 101 HbA_{1c} and Lipids Evaluation. Internet-artikkeli. Luettu 2.4.2017.
<http://www.appn.net.au/Data/Sites/1/appn/05instrumentevaluations/02evaluationreports/aacbb101report.pdf>

Tilastokeskus. 2016. Aritmeettinen keskiarvo. Luettu 26.10.2016
http://www.stat.fi/meta/kas/aritmeet_ka.html

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2013. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. Internetartikkeli, luettu 6.4.2017.
http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. 2017. Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien oppimisympäristö. Keskihajonta. Luettu 4.10.2016 <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html>

Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. 2016. Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien oppimisympäristö. Pearsonin korrelaatio. Luettu 4.10.2016 <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>

Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. 2017. Kvantitatiivisten tutkimusmenetelmien oppimisympäristö. Variaatiokerroin. Luettu 13.3.2017. <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html>

Vieritestaus terveydenhuollossa. 2009. Labqualityn asiantuntijasuositus. *Moodi* (33)6, 269-312. Labquality Oy. Yliopistopaino, Helsinki.

LIITTEET

Liite 1(1) Tulokset

Näytenu- mero	Referenssitulos mmol/mol	Alere mmol/mol	Roche mmol/mol
1	39	39	40
2	51	50	54
3	71	73	67
4	37	38	43
5	69	63	67
6	60	57	58
7	43	41	45
8	62	64	62
9	32	33	36
10	58	60	61
11	49	49	52
12	81	85	81
13	45	43	46
14	35	34	38
15	80	82	82
16	32	31	35
17	35	35	36
18	39	37	39
19	45	47	47
20	52	53	51

Liite 1(2). Tulokset

Näytenu- mero	Referenssitulos mmol/mol	Alere mmol/mol	Roche mmol/mol
21	59	59	60
22	61	62	59
23	69	67	65
24	72	74	69
25	74	79	74
26	80	79	77
27	122	128	110
28	132	127	122
29	66	73	73
30	66	65	60
31	47	45	45
32	35	33	35
33	39	38	35
34	53	51	50
35	28	29	28
36	42	41	39
37	58	59	59
38	100	97	91
39	35	35	34
40	47	48	43
41	38	37	37
42	32	33	34
43	74	75	73
44	74	73	73

Liite 2. Kontrollitulokset

Roche Cobas B101		
Päivä	Tulos matala	Tulos korkea
Hyv. rajat (mmol/mol)	21-43	63-107
2.5.2016	26	78
3.5.2016	26	76
4.5.2016	26	74
Alere Afinion AS100		
Päivä	Tulos matala	Tulos korkea
Hyv. rajat (mmol/mol)	37-50	60-79
2.5.2016	43	61
3.5.2016	44	63
4.5.2016	43	69

