



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

AKTIIVINEN-B12-MÄÄRITYSMENETELMÄN VERIFIOINTI

TEKIJÄ: Niko Paavola

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma/Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Niko Paavola	
Työn nimi Aktiivinen-B12-määritysmenetelmän verifiointi	
Päiväys	30.4.2018
Sivumäärä/Liitteet	36 / 1
Ohjaaja(t) Anssi Mähönen	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymä / Eevastiina Marjoniemi	
<p>Tiivistelmä</p> <p>B12-vitamiini on elimistölle välttämätön vesiliukoinen vitamiini, jota saadaan ainoastaan eläinperäisestä ravinnosta. Se osallistuu nukleiinihappojen (DNA:n) synteesiin ja on välttämätön punasolujen sekä hemoglobiinin muodostuksessa. B12-vitamiinin puute kehittyy hitaasti vuosien kuluessa ja maksan vitamiinivarastojen ehtyessä, se johtaa megaloblastisen anemian kehittymiseen. Länsimaissa B12-vitamiinin puute on yleinen etenkin iäkkäillä ihmisillä ja sen riski kasvaa iän myötä. Arviolta noin 10 prosenttia yli 65-vuotiaista kärsii sen puutteesta.</p> <p>B12-vitamiini on sitoutuneena seerumissa kahteen kantajaproteiiniin, haptokorriiniin ja transkobalamiiniin. Transkobalamiiniin sitoutunut B12-vitamiini eli holotranskobalamiini on vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto. Sen pitoisuuden määrittämistä suositellaan ensisijaisena tutkimuksena B12-vitamiinin puutteen selvittelyssä.</p> <p>Terveydenhuollon laitteen tulee täyttää sille asetetut olennaiset kriteerit. Sen tulee soveltua käyttötarkoitukseensa ja sen tulee oikein käytettynä saavuttaa sille suunniteltu suorituskyky ja toimivuus. Validoidun laitteen tai menetelmän toimivuus tulee kuitenkin tarkistaa vielä ennen käyttöönottoa, jotta voidaan varmistua siitä, että se vastaa laite- ja reagenssivalmistajan ilmoittamia arvoja.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli suorittaa aktiivisen B12-vitamiinin määritysmenetelmän verifiointi kahdella eri Abbott:n valmistamalla Architect ci4100-analysaattorilla. Verifiointilla eli todentamisella selvitettiin jo validoidun menetelmän toimivuus siinä ympäristössä, jossa sitä tullaan käyttämään. Menetelmän toistettavuus ja kyky antaa oikeita tuloksia varmistettiin potilas- ja kontrollinäytteistä koostuvan tutkimusaineiston avulla.</p> <p>Verifiointi suoritettiin Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa keväällä 2017. Näytevertailu tulosten perusteella on havaittavissa jonkin verran tulostaseroeroa referenssimenetelmään nähden, mutta se ei ole kliinisesti merkittävää. Tulostaseroerosta täytyy kuitenkin tiedottaa tutkimuksen tilaavia hoitoyksiköitä. Tutkimustulosten perusteella voidaan myös todeta, että laite- ja reagenssivalmistajan antamat kriteerit täyttyvät toistuvuusmitausten osalta riittävällä tarkkuudella ja menetelmä voidaan ottaa käyttöön.</p>	
Avainsanat Aktiivinen-B12, B12-vitamiini, verifiointi	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Niko Paavola			
Title of Thesis Active-B12 determination method verification			
Date	30.4.2018	Pages/Appendices	36 / 1
Supervisor(s) Anssi Mähönen			
Client Organisation /Partners Joint Municipal Authority of Wellbeing in Raahe District / Eevastiina Marjoniemi			
<p>Abstract</p> <p>Vitamin B12 is a water-soluble vitamin and essential to the body. It can only be obtained from animal products. It is involved in the synthesis of nucleid acids (DNA) and is vital to the synthesis of red blood cells and hemoglobin. Vitamin B12 deficiency developed slowly over years as the liver's vitamin stores are depletes, and leads to onset of megaloblastic anemia. In the western countries vitamin B12 deficiency is common especially in the elder population, and the risk for it increases with age. Approximately 10 % of people over 65 years old suffer from it.</p> <p>In the serum vitamin B12 exists bound to two different carrier proteins, haptocorrin and transcobalamin. The vitamin B12 molecules bound to transcobalamin, holotranscobalamin, is the biologically active form of the vitamin. Measurement of holotranscobalamin levels is recommended as the primary test when searching for the cause of vitamin B12 deficiency.</p> <p>Equipment used in health care is required to fill the criteria set for it. It must be suitable for its intended purpose, and it must reach the performance and functionality designed for it when properly operated. Before introduction, the functionality of validated equipment or process should be verified to make sure it corresponds to the values provided by the manufacturer.</p> <p>The purpose of this thesis was to verify the active vitamin B12 measurement process by the Abbott Architect ci4100 analyzer. Verification was done to determine the functionality of an already validated process in its designated environment. The repeatability and accuracy of the process was ensured using research data consisting of patient samples and control samples.</p> <p>The verification was performed in the laboratory of the Joint Municipal Authority of Wellbeing in Raahe District in spring 2017. Based on the results of sample comparison, some difference in levels of results can be observed compared to the reference method, but it is not clinically significant. However, the treatments units ordering the measurement should be informed of this difference. Also, based on these findings we can conclude that the criteria for repeatability measurements provided by the equipment and reagent manufacturer are met with sufficient exactness, and the process can be introduced.</p>			
Keywords Active-B12, vitamin B12, verification			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	B12-VITAMIINI	7
2.1	Imeytyminen	7
2.2	Oireet ja löydökset.....	7
3	B12-VITAMIININ PUUTOSTILAT	8
3.1	Laboratoriotutkimukset.....	8
3.2	Megaloblastinen anemia	9
3.3	Pernisiöosi anemia	10
3.4	Muut B12-vitamiinin puutteen syyt.....	10
4	B12-VITAMIINI TIETEELLISISSÄ TUTKIMUKSISSA	11
5	BIOLOGISESTI AKTIIVINEN B12-VITAMIINI	12
5.1	Transkobalamiini II:een sitoutunut B12-vitamiini (S-B12-TC2)	12
5.1.1	Esivalmistelu ja näytteenotto	12
5.1.2	Näytteen käsittely, säilytys ja lähettäminen.....	13
5.1.3	Tulosten tulkinta	14
5.2	Aktiivisen B12-vitamiinin määrittäminen	14
5.3	Abbott Architect ci4100-analysaattori	16
6	LABORATORIMENETELMÄN LAATU JA VERIFIOINTI	17
6.1	Verifioinnin parametrit.....	17
6.1.1	Toistotarkkuus ja toistettavuus	18
6.1.2	Tarkkuus, oikeellisuus ja poikkeama	18
6.1.3	Spesifisyys ja herkkyys	18
6.1.4	Lineaarisuus ja mittausalue.....	19
6.1.5	Toteamis- ja määrittämissrajat	19
6.1.6	Mittausepävarmuus	19
6.1.7	Saanto	20
6.1.8	Uusittavuus	20
6.1.9	Toimintavarmuus	21
6.1.10	Häiriökestävyys.....	21
6.2	Korrelaatio.....	21
7	OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYS	22

8	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS.....	23
8.1	Opinnäytetyön prosessi	23
8.2	Kvantitatiivinen tutkimus	23
9	TYÖVAIHEET.....	24
10	TULOKSET	26
11	POHDINTA.....	33
	LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT	34
	LIITE 1: MENETELMÄOHJE.....	37

1 JOHDANTO

B12-vitamiini eli kobalamiini osallistuu elimistön solujen DNA-synteesiin ja on välttämätön veren punasolujen sekä hemoglobiinin muodostuksessa (Punnonen 2010, 258). Sitä saadaan ainoastaan eläinperäisestä ravinnosta. Elimistö tarvitsee B12-vitamiinia hyvin pieniä määriä, ja muista B-ryhmän vitamiineista poiketen se varastoituu maksaan. Maksan suuren vitamiinivaraston ja enterohepaattisen kierron ansiosta B12-vitamiinin puutteesta johtuvan anemian kliiniset oireet ilmaantuvat vasta useiden vuosien kuluttua sen saannin loputtua (Leino 2007, 408).

Megaloblastinen anemia on B12-vitamiinin puutteen tavallisin löydös, jossa verenkuvassa todetaan suurentuneita soikeanmuotoisia punasoluja ja yliliuskoittuneita neutrofiilejä (Leino 2007, 408). Kyseessä on puutostilasta johtuva DNA-synteesin häiriö, joka aiheuttaa luuytimen ja veren punasolujen ja niiden esiasteiden morfologisia muutoksia (Punnonen 2010, 258).

B12-vitamiini imeytyy ohutsuolen kautta elimistöön mahalaukun limakalvon tuottaman proteiinin ns. sisäisen tekijän (*intrinsic factor*) avulla. Joillakin henkilöillä mahan limakalvo surkastuu autoimmuunitaudin takia ja sisäisen tekijän muodostuminen loppuu. Tällöin B12-vitamiini ei pysty imeytymään elimistöön, mikä aiheuttaa vähitellen anemian muodostumisen. Tätä anemiamuotoa kutsutaan pernisiösi anemiaksi. (Mustajoki ja Jalanko 2006, 38.)

B12-vitamiini on seerumissa kahteen kantajaproteiiniin sitoutuneena, haptokorriiniin ja transkobalamiiniin. Transkobalamiiniin sitoutunut B12-vitamiini eli holotranskobalamiini on vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto. Seerumin B12-vitamiinista vain 10-30 % on tätä biologisesti aktiivista muotoa. Ensimmäisenä tutkimuksena B12-vitamiinin puutteen selvittelyssä suositellaan aktiivisen B12-vitamiinin määritystä (S-B12-TC2), jossa mitataan biologisesti aktiivista transkobalamiini II:een sitoutunutta B12-vitamiinia, sillä se on luotettavampi, kuin B12-vitamiinin kokonaispitoisuuden (S-B12-Vit) määrittäminen. (Eskelinen 2016; Loikas 2015, 183.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on seerumin transkobalamiini II:een sitoutuneen B12-vitamiinin eli aktiivisen B12-vitamiinin määritysmenetelmän verifiointi Abbott Architect ci4100-kemia-immunokemian yhdistelmäanalysaattorilla. Verifiointin tarkoituksena on todentaa tutkimusmenetelmän soveltuvuus tarkoituksenmukaiseen käyttöön ja varmistaa tulosten luotettavuus. Lisäksi laadin verifiointin pohjalta menetelmäohjeen. Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymä, joka vastaa Raahen kaupungin, Pyhäjoen ja Siikajoen kuntien yhteensä noin 34 000 asukkaan terveystalusten järjestämisestä. Työn kokeellinen osuus suoritetaan hyvinvointikuntayhtymän laboratorioissa. Hyvinvointikuntayhtymän laboratorio tarjoaa monipuolisesti laadukkaita laboratoriopalveluita nopeasti ja taloudellisesti. Laboratorioissa otetuista näytteistä tehdään noin 430 000 määritystä/ vuosi, joista yli 90 prosenttia analysoidaan Raahessa ja loput lähetetään tutkittavaksi muualle.

2 B12-VITAMIINI

B12-vitamiini eli kobalamiini on elimistölle välttämätön vesiliukoinen B-ryhmän vitamiini. Sen tehtävänä on toimia koentsyyminä DNA-synteesiin johtavissa reaktioissa, ja se osallistuu veren punasolujen sekä hemoglobiinin muodostukseen (Savolainen ja Parviainen 2010, 310; Punnonen 2010, 258). Tätä kyseistä vitamiinia saadaan ainoastaan eläinperäisestä ravinnosta kuten esimerkiksi lihasta, kalasta ja maitotuotteista. Tiukkaa kasvisruokavaliota noudattavien (vegaanit) on varmistettava B12-vitamiinin saanti ravintolisällä. Elimistön päivittäinen B12-vitamiinin tarve on vain 2-5 mikrogrammaa ja tavanomaisen länsimaisen ravinnon mukana sitä saadaan 3-30 mikrogrammaa. Muista B-ryhmän vitamiineista poiketen se varastoituu tehokkaasti maksaan. Enterohepaattisen kierron ja maksan suurten varastojen ansiosta B12-vitamiinin puutteesta johtuvan anemian kliiniset oireet ilmaantuvat vasta 5-10 vuoden kuluttua sen saannin loputtua (Ihanainen, Lehto, Lehtovaara ja Toponen 2008, 165, 186 - 187; Leino 2007, 408).

B12-vitamiinin rakenne koostuu korriinirenkaasta, jonka keskellä on kobolttiatomi ja siihen liittynyt ribonukleosidi. Biologisesti aktiivisissa kobalamiineissa kobolttiatomiin on liittyneenä myös deoksadenosyyli- tai metyyliiryhmä. Aktiiviset kobalamiinit ovat labiileja yhdisteitä. Hydroksikobalamiini ja syanokobalamiini, joita käytetään lääkkeenä, ovat stabiileja yhdisteitä. (Loikas 2015, 182.)

2.1 Imeytyminen

B12-vitamiini on ravinnossa sitoutuneena proteiiniin. Se irtoaa proteiinista mahalaukun happamuuden johdosta ja kiinnittyy vatsan limakalvon tuottamaan R-proteiiniin. Haiman entsyymit vapauttavat B12-vitamiinin ohutsuolen alkuosassa, jolloin se sitoutuu vatsan parietaalisolujen tuottamaan sisäiseen tekijään (*intrinsic factor*). B12-vitamiinin ja sisäisen tekijän muodostoma kompleksi etenee ohutsuolen loppuosaan, jossa se sitoutuu lieriöepiteelin solun pinnalla olevaan resptoriin, kubiliiniin. Kubiliini on sitoutuneena toiseen suureen proteiiniin, megaliiniin, minkä välityksellä B12-vitamiini kulkeutuu lieriöepiteelin sisälle. Ohutsuolen lieriöepiteelin solussa eli enterosyytissä se irrottautuu sisäisestä tekijästä ja kiinnittyy kantajaproteiiniin transkobalamiini II:een siirtyen verenkiertoon. (Leino 2007, 408 - 409.)

2.2 Oireet ja löydökset

B12-vitamiinin puutostila johtaa megaloplastisen anemian kehittymiseen, joka on monimuotoinen ja oirekuvaltaan vaihteleva anemian muoto. Potilaalla voi esiintyä hematologisten löydösten lisäksi neurologisia oireita kuten raajojen puutumista, pistelyä tai ihotunnon heikentymistä. Pitkään jatkunut B12-vitamiinin puutostila voi aiheuttaa lisäksi näköhermon tulehdusta sekä virtsa- ja ulosteninkontinenssia. Megaloplastiseen anemiaan liittyy myös gastrointestinaalisia oireita, esimerkiksi pahoinvointia, ripulia, ummetusta ja suutulehdusta (Leino 2007, 408). Lisäksi potilaalla voi ilmetä väsymystä, sekavuutta, ruokahaluttomuutta, lievää keltaisuutta sekä kielen sileyttä ja arkuutta (Färkkilä ja Leino 2013, 379).

3 B12-VITAMIININ PUUTOSTILAT

Puutostila johtuu hyvin harvoin vitamiinin riittämättömästä saannista ravinnon mukana vaan kyseessä on yleensä sen imeytymisestä johtuvat häiriöt. Yleisin B12-vitamiinin imeytymishäiriö aiheutuu mahan parietaalisolujen puutteellisesta kyvystä erittää sisäistä tekijää, jonka vuoksi B12-vitamiinin ja sisäisen tekijän kompleksia ei muodostu ja vitamiini jää imeytymättä ohutsuolessa. (Mutanen ja Voutilainen 2005, 186.)

Vitamiinin puutos etenee neljässä eri vaiheessa. Aluksi seerumin vitamiinipitoisuus pienenee, jolloin myös transkobalamiini II:en ja B12-vitamiinin muodostamien kompleksien määrä vähenee. Seuraavaksi puute ilmenee soluissa, esimerkiksi punasoluissa. Puute ilmenee pääasiassa nopeasti jakautuvissa soluissa, esimerkiksi luuytimen erytropoieettisissa soluissa ja ohutsuolen limakalvon soluissa. Biokemiallinen puute ilmenee vähentyneenä DNA-synteesinä ja seerumin homokysteini- ja metyyli-malonaattipitoisuuksien suurentumisena. Lopulta kliininen puute ilmenee megaloblastisena anemiana. (Mutanen ja Voutilainen 2005, 186.)

Länsimaissa B12-vitamiinin puutos on yleinen etenkin iäkkäillä ihmisillä ja sen esiintyvyys lisääntyy iän myötä. Puutostilaa esiintyy noin 10 prosentilla yli 65-vuotiaista (Loikas 2015, 185). Ikäihmisten yleisimpänä vitamiinin puutteen syynä on proteiiniin sitoutuneen B12-vitamiinin imeytymishäiriö, jossa elimistö ei kykene irrottamaan sitä ravinnon proteiinista. Näiden potilaiden osuus on 60-70% kaikista B12-vitamiinin puutostiloista. Toiseksi yleisin aiheuttaja on pernisiöösi anemia, jonka osuus on 15-20%. Malabsorption osuus on alle 5 % ja perinnöllisten B12-vitamiinin aineenvaihduntahäiriöiden osuus alle 1% (Leino 2007, 409).

3.1 Laboratoriotutkimukset

Perusverenkuvatutkimusta (PVK) käytetään aina ensijaisena laboratoriotutkimuksena anemiaa epäiltäessä. Sen pohjalta anemia voidaan luokitella morfologisesti mikrosyyttisiin, normosyyttisiin ja makrosyyttisiin anemioihin (Nuutinen 2013, 59). Perusverenkuvan tutkimukseen sisältyvä osatutkimus E-MCV (punasolujen keskitilavuus) voi antaa viitteitä morfologisista muutoksista veren sivelyvalmisuudessa. B12-vitamiinin ja folaatin puute ovat tavallisimpia makrosyyttisen anemian aiheuttajia. Punasolujen folaattipitoisuus (fE-Folaat) tutkitaan folaatin puutteen poissulkemiseksi. B12-vitamiinin puutteen diagnoosi perustuu kliinisen oirekuvan lisäksi sen pitoisuuden määrittämiseen. Seerumista voidaan määrittää B12-vitamiinin kokonaispitoisuus (S-B12-Vit) tai spesifisempi transkobalamiini II:een sitoutunut B12-vitamiini (S-B12-TC2). Jos vitamiinin kokonaispitoisuus on 140-250 pmol/l, suositellaan puutoksen varmistamiseksi vielä S-B12-TC2-määrittystä. Lisäksi maksa-arvojen ja kilpirauhasarvojen sekä retikulosyyttien tutkiminen ovat tarpeen. (Färkkilä ja Leino 2013, 377; Loikas 2015, 189, 191).

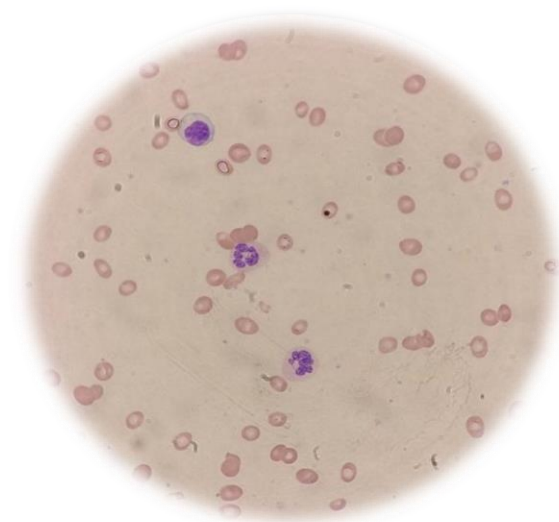
Jos edellä mainittujen laboratoriotutkimusten perusteella ei voida selvittää makrosytoosin etiologiaa, on luuydintutkimus aiheellinen. Sen avulla voidaan erottaa megaloblastinen ja normoblastinen makro-

syttinen anemia toisistaan mahdollisen perussairauden (esim. myelodysplastinen oireyhtymä) toteamiseksi ja jatkoselvittelyn arvioimiseksi. B12-vitamiinihoitoa ei tule aloittaa ennen luuydinnäytteen ottoa, sillä megaloblastiset muutokset korjaantuvat luuytimessä nopeasti. (Loikas 2015, 191 - 192.)

Muita B12-vitamiinin puutteen selvittelyssä käytettäviä laboratoriotutkimuksia ovat mm. homokysteiinin (P-Hcyst), metyyylimalonaatin (S-MetMal) ja laktaattidehydrogenaasin (P-LH) sekä seerumin parietaali- ja IF-vasta-aineiden määritykset. (Eskelinen 2016; Färkkilä ja Leino 2013, 379.)

3.2 Megaloblastinen anemia

Makrosyyttinen anemia ja punasoluesiasteiden morfologiset muutokset luuytimessä ovat megaloblastiselle anemialle ominaisia piirteitä. Se johtuu yleensä B12-vitamiinin tai foolihapon puutteesta aiheutuvasta DNA-synteesin häiriöstä. Megaloblastinen anemia todetaan usein myöhäislöydöksenä. Suurella osalla potilaista ilmenee neurologisia oireita jo pitkään ennen kuin hematologiset muutokset havaitaan. (Loikas 2015, 182.)



KUVA 1. Hypersegmentoituneita neutrofiilejä (Paavola 2017-02-24).

Veren sivelyvalmisteessa esiintyy suurentuneita sekä soikean muotoisia punasoluja (makro-ovalosytoosi) ja niiden esiasteita sekä neutrofiilien tuman yliuskottumista (Färkkilä ja Leino 2013, 379). Luuytimen punasoluesiasteiden morfologiset muutokset johtuvat häiriintyneestä DNA-synteesistä. Luuytimen megaloblastien tuman kromatiinirakenne kypsyy hitaammin verrattuna sytoplasman kypsymiseen. Taustalla on yleensä DNA-synteesiin tarvittavien vitamiinien puute ja Suomessa sen yleisimpänä syynä on ylivoimaisesti B12-vitamiinin puute. Lievissä megaloblastisissa anemioissa verenkuvatutkimuksissa havaitaan punasolujen keskitilavuuden kasvua (E-MCV) ja pienentyneitä hemoglobiiniarvoja. Vaikemmissä tapauksissa valkosolujen ja trombosyyttien määrä on vähentynyt (Punnonen 2010, 258 - 259).

Luuydinnäytteessä esiintyy runsaasti soluja ja varsinkin punasolutuotanto on hyvin vilkas. Punasolujen muodostumisessa eli erythropoiesissa nähdään tyypilliset megaloblastisen muutokset esimerkiksi

suuri koko, löyhä kromatiinirakenne ja tuman kypsymisen estyminen verrattuna sytoplasman hemoglobinoitumiseen. Nämä muutokset ovat todettavissa kaikissa erytropeiesin kypsyyssasteissa. Myös valkosolutuotannossa on havaittavissa tyypillisiä muutoksia kuten jättimetamyelosyyttejä ja suurikokoisia yliliuskoittuneita neutrofiilejä. (Loikas 2015, 192 - 193.)

3.3 Pernisiöosi anemia

Pernisiöosi anemia on autoimmunisairaus, joka kohdistuu mahalaukun runko-osaan ja mahanpohjukkaan aiheuttaen limakalvon surkastumisen ja hapottomuuden. Ei-autoimmuunigastritissa atrofiiset muutokset kohdistuvat myös mahan antrum-osaan. Taudissa mahalaukun parietaalisoluja ja B12-vitamiinin imeytymiseen tarvittavaa sisäistä tekijää vastaan muodostuu vasta-aineita, joka johtaa vähitellen megaloblastisen anemian kehittymiseen. (Leino 2007, 410.)

3.4 Muut B12-vitamiinin puutteen syyt

B12-vitamiinin imeytymishäiriön tai puutostilan syntymiseen voivat vaikuttaa myös esimerkiksi maha-suolikanavaan kohdistuvat kirurgiset toimenpiteet, perinnölliset B12-vitamiinin metaboliset sairaudet, suolistosairaudet ja jotkut lääkkeet sekä lapamato. (Färkkilä ja Leino 2013, 377 - 378.)

Gastrektomia eli mahalaukun totaalinen poistaminen johtaa B12-vitamiinin imeytymiseen tarvittavan sisäisen tekijän tuotannon loppumiseen, joka puolestaan aiheuttaa megaloblastisen anemian. Anemian kehittymiseen kuluu keskimäärin noin viisi vuotta riippuen maksan B12-vitamiinivarastojen suuruudesta. Osittainen mahalaukun poisto aiheuttaa puutteellisen vitamiinin imeytymisen noin joka kolmannella potilaalle, mutta megaloblastisia muutoksia ilmenee harvemmin (Loikas 2015, 185 - 186). Myös ohutsuolen loppuosan (*ileum terminale*) poistaminen voi aiheuttaa imeytymishäiriötä ja kehittää anemian, jos sen B12-vitamiini-IF-reseptorit vaurioituvat (Färkkilä ja Leino 2013, 378).

Haiman eksokriininen osa tuottaa entsyymejä, jotka katalysoivat B12-vitamiinin irtoamista haptokoriinista ohutsuolen alkuosassa. Haiman vajaatoimintaa aiheuttavat sairaudet esimerkiksi krooninen haimatulehdus tai Zollinger-Ellisonin oireyhtymä laskee suoliston alkuosan pH-arvoa ja vähentää siten sisäisen tekijään sitoutuvan B12-vitamiinin osuutta. Nämä saattavat aiheuttaa imeytymishäiriön, mutta johtaa harvoin megaloblastiseen anemiaan. (Loikas 2015, 186.)

Muita B12-vitamiinin puutteen syitä voivat olla perinnölliset B12-vitamiinin metaboliset sairaudet ja erilaiset DNA-mutaatiot, jotka aiheuttavat puutteellista vitamiinin imeytymistä. Gräsbeck-Imerslundin oireyhtymä on Suomessa esiintyvä perinnöllinen sairaus, jossa sisäisen tekijän erittyminen on normaali, mutta ohutsuolen loppuosan kubiliini-reseptorissa on mutaatio, joka vähentää B12-vitamiini-IF-kompleksin sitoutumista aiheuttaen imeytymishäiriön. (Leino 2007, 410.)

4 B12-VITAMIINI TIETEELLISISSÄ TUTKIMUKSISSA

Elimistön B12-vitamiinin pitoisuuden ja sen puutteen yhteyttä erilaisten sairauksien ja tautitilojen välillä on tutkittu laajasti ympäri maailman. Tieteellisissä tutkimuksissa on selvitetty B12-vitamiinin pitoisuustason yhteyttä mm. muistiin ja aivojen rakenteeseen sekä neurologisten sairauksien ja mielenterveysongelmien syntyyn. Tässä kappaleessa on tuotu esille muutamia aiheesta julkaistuja tutkimuksia.

The Official Journal of the American Academy of Neurology - sivustolla julkaistussa artikkelissa kerrotaan Oxfordin yliopiston tekemästä tutkimuksesta, jossa selvitettiin B12-vitamiinitason ja aivojen tilavuuden yhteyttä toisiinsa. Tutkimuksella haluttiin selvittää, kuinka paljon aivojen tilavuus pienenee vuoden aikana viisi vuotta kestävässä seurannassa. Kohderyhmäksi valittiin yli sata vapaaehtoista, iältään 61 - 87 vuotiasta henkilöä, joilla ei esiintynyt kognitiivisen toimintakyvyn heikentymistä. Lähtötilanteessa kohderyhmältä tutkittiin plasman B12-vitamiinin, transkobalamiinin, holotranskobalamiinin (holoTC), metyyylimalonaatin ja totaalisen homokysteiniinin (tHcy) pitoisuudet sekä seerumin folaatti. Heitä arvioitiin vuosittaisissa kliinisissä tutkimuksissa ja heille tehtiin kognitiivisia testejä sekä aivojen magneettikuvaus. Tutkimuksessa todettiin, että aivojen tilavuuden lasku oli suurempi heillä, joilta mitattiin lähtötilanteessa matalempia B12-vitamiini ja holoTC pitoisuuksia ja korkeampia tHcy ja metyyylimalonaatin pitoisuuksia. (Vogiatzoglou, Refsum, Johnston, Smith S.M., Bradley, De Jager, Budge ja Smith A.D. 2008.)

Kohonnut plasman tHcy-pitoisuus voi johtua B12-vitamiinin puutteesta ja sen on todettu olevan yhteydessä Alzheimerin taudin syntyyn. Tutkimustulokset ovat kuitenkin ristiriitaisia eikä asialle ole riittävästi näyttöä. Tukholman Karoliinisen Instituution tekemässä tutkimuksessa selvitettiin homokysteiniinin ja holotranskobalamiinin vaikutusta dementian ja Alzheimerin taudin kehittymisessä. Tutkimuksessa käytettävät näytteet olivat osa ikääntyneen väestön pitkäaikaistutkimuksesta (Kungsholmen projekti). Kerätyistä näytteistä analysoitiin lähtötilanteessa tHcy- ja holoTC-pitoisuudet. Koehenkilöiden seuranta tehtiin keskimäärin yli kuusi vuotta ja tulokset osoittivat, että suurentuneet tHcy-pitoisuudet lisäsivät yli kaksinkertaisesti Alzheimerin taudin riskiä. HoloTC:n eli aktiivisen B12-vitamiinin merkityksestä ei saatu riittävästi näyttöä, joten sitä on tutkittava edelleen. Tutkimus on julkaistu kirjassa *European Journal of Neurology*. (Kivipelto, Annerbo, Hultdin, Bäckman, Fratiglioni ja Löck 2009.)

Jeff Brady, Lesley Wilson, Lynda McGregor ja Edward Valente sekä Lars Orning kehittivät automaatiomenetelmän aktiivisen B12-vitamiinin määrittämiseksi Abbott AxSYM-immunokemian analysointilaitteella. Kehitetty menetelmä on kaksivaiheinen mikropartikkeli entsyymi-immunomääritys. Ensimmäisessä vaiheessa plasma- tai seeruminäytteen aktiivinen-B12 sidottiin holoTC-spesifisellä vasta-aineella päällystettyihin mikropartikkeleihin. Toisessa vaiheessa sidottu aktiivinen-B12 havaitaan alkaalisen fosfataasi-konjugaatin ja anti-TC-vasta-aineiden avulla. Menetelmän toimivuutta ja luotettavuutta testattiin erilaisten parametrien avulla huomioiden mahdolliset virhelähteet. AxSYM aktiivisen-B12 menetelmä mahdollistaa elimistön plasman tai seerumin holoTC-pitoisuuden nopean, tarkan, herkän ja spesifisen automaatioanalyysin. (Brady, Wilson, McGregor, Valente ja Orning 2008.)

5 BIOLOGISESTI AKTIIVINEN B12-VITAMIINI

5.1 Transkobalamiini II:een sitoutunut B12-vitamiini (S-B12-TC2)

Seerumin transkobalamiini II:een sitoutuneen B12-vitamiinin eli aktiivisen B12-vitamiinin (holotranskobalamiini) määrittäminen on kvantitatiivinen kemiluminesenssi menetelmään perustuva immunokemiallinen tutkimus (CMIA). Aktiivisen B12-vitamiinin pitoisuuden määrittämistä käytetään B12-vitamiinin puutteen diagnostiikassa ja se on luotettavampi B12-vitamiinipitoisuuden osoittaja kuin vitamiinin kokonaispitoisuuden määrittäminen. (NordLab 2017.)

B12-vitamiini on seerumissa kahteen kantajaproteiiniin sitoutuneena; haptokoriiniin ja transkobalamiiniin. Transkobalamiiniin sitoutunut B12-vitamiini, holotranskobalamiini, on vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto. Seerumin B12-vitamiinista vain 10-30 % on tätä biologisesti aktiivista muotoa. Suurin osa on sitoutuneena metabolisesti inaktiiviseen haptokoriiniin. Transkobalamiinia syntetisoidaan ohutsuolessa, maksassa ja munuaisissa sekä keskushermostossa. Haptokoriini on puolestaan peräisin granulocyteista, mutta sitä muodostuu myös useissa eri elimistön rauhasissa. (Eskelinen 2016; Loikas 2015, 183.)

Seerumin tai plasman B12-vitamiinin kokonaispitoisuuden määrittäminen on helppoa ja nopeasti saatavilla. Sen hinta on myös edullinen, jonka vuoksi se on edelleen yleisin B12-vitamiinin puutteen diagnostiikassa käytetty laboratoriotutkimus. Puutostilaa ja siitä johtuvia kliinisiä oireita voi olla potilaalla, jonka B12-vitamiinipitoisuus on viitealueella. Tästä syystä B12-vitamiinin kokonaispitoisuuden määrittämisellä ei aina pystytä yksiselitteisesti varmentamaan tai poissulkemaan B12-vitamiinin puutteen mahdollisuutta. Virheellisesti viitealueella olevia tai suuria B12-vitamiinin kokonaispitoisuuksia voi esiintyä kroonisissa myeloproliferatiivisissa taudeissa, maksasairauksissa tai munuaisten vajaatoiminnassa. Nämä taudit voivat peittää todellisen puutostilan. Puolestaan lievä perinnöllinen haptokoriinin puute ja muutokset B12-vitamiinin sitojaproteiinien pitoisuuksissa voivat aiheuttaa virheellisen matalia tuloksia. (Loikas 2015, 193.)

Biologisesti aktiivinen B12-vitamiini on teoreettisesti herkin ja spesifisin varhaisen B12-vitamiinin puutteen osoittaja. Vasta viime vuosina on kehitelty anti-transkobalamiini-vasta-aineiden avulla spesifisiä ja yksinkertaisia automaatioon soveltuvia menetelmiä, joilla pystytään määrittämään aktiivisen B12-vitamiinin pitoisuutta. Suomalaiset ja kansainväliset asiantuntijat ovatkin päätyneet pitämään aktiivisen B12-vitamiinin määrittämistä ensisijaisena laboratoriotutkimuksena puutostilan selvittelyssä. (Loikas 2015, 193.)

5.1.1 Esivalmistelu ja näytteenotto

Nordlabin tutkimusohjekirjassa ohjeistetaan, että S-B12-TC2-näyte tulee ottaa ennen B12-vitamiinilääkitystä ja näyte otetaan 5 ml:n seerumi-geeliputkeen.

Näytteenottajan tulee varmistaa, että potilas on noudattanut annettuja valmistautumishojeita ja tekee saamiensa tietojen perusteella päätöksen siitä, otetaanko näytettä vai ei. Fyysinen rasitus, stressi, vuorokaudenaika, ravitsemus ja lääkeaineet voivat vaikuttaa laboratoriotulokseen. Potilaan fyysistä tilaa pyritään vakioimaan ennen näytteenottoa vaikuttamalla fyysisen ja psyykkisen rasituksen, ravitsemuksen sekä muiden käytettyjen aineiden määrään, jotta laboratoriotulokset olisivat vertailukelpoisia keskenään. (Tapola 2004, 22 - 23.)



KUVA 2. Seerumi-geeliputki (Paavola 2017-03-13).

5.1.2 Näytteen käsittely, säilytys ja lähettäminen

Aktiivista B12-vitamiinimääritystä varten otettava näyte tulee sentrifugoida ennen analysointia tai lähetystä. Hemolyysi häiritsee näytteen analysointia. Seeruminäyte säilyy kolme vuorokautta jääkaapissa ja pidempi aikainen säilytys pakastettuna. Seeruminäyte lähetetään huoneenlämpöisenä, mikäli se on perillä vuorokauden sisällä, ja kylmälähetystenä, jos perillä kolmen vuorokauden sisällä. Pidempiaikaista säilytystä varten seerumi on eroteltava geelin päältä ja pakastettava. (NordLab 2017; HUSLAB 2016.)

Ihmisestä otettu näyte on biologista materiaalia, jossa aineenvaihdunnan reaktiot jatkuvat edelleen elimistön ulkopuolella, vaikkakin hidastuen. Näytteen koostumus voi muuttua verrattuna näytteenottohetkellä olleeseen tilanteeseen. Useat näytteessä olevat yhdisteet, joita tutkitaan, ovat huonosti säilyviä ja niiden pitoisuudet muuttuvat ajan kuluessa. Näyte voi myös kontaminoitua ulkopuolelta tulleiden aineiden johdosta, minkä vuoksi sen koostumus saattaa muuttua. Myöhemmin tapahtuvaa analysointia varten näytteessä tapahtuvat reaktiot halutaan pysäyttää tai minimoida, jotta tutkittavat komponentit säilyisivät sellaisina, kuin ne olivat näytteenottohetkellä. (Tapola 2004, 29.)

Näytteen säilytyksen ja kuljetuksen aikana tapahtuvat muutokset aiheutuvat fysikaalisista, kemiallisista ja mikrobiologisista ilmiöistä. Näytteessä tapahtuu solujen aineenvaihduntaa ja tutkittavien komponenttien siirtymistä soluista plasmaan ja päinvastoin silloin, kun plasma- tai seeruminäytettä säilytetään sentrifugoimatta tai erottamatta soluista. Kyseinen ilmiö on merkittävä, jos tutkittavan analyysin solunsisäinen pitoisuus poikkeaa selvästi plasman tai seerumin pitoisuudesta. Näytteessä

voi tapahtua myös haihtumista tai konsentroitumista. Jo muutaman tunnin säilytys avonaisessa astiassa saattaa muuttaa näytteen koostumusta huomattavasti ja lisätä haihtumattomien analyyttien pitoisuutta riippuen näytemäärästä ja näyteastian laaudesta. Haihtumista tapahtuu myös jääkaappilämpötilassa ja pakastettuna. Lisäksi bakteerikontaminaatio voi aiheuttaa muutoksia näytteen koostumuksessa, sillä bakteerit käyttävät ravinnokseen joitakin tutkittavia komponentteja (esim. glukosia) tai tuottavat niitä (esim. B12-vitamiinia). Bakteerit voivat myös aiheuttaa näytteen sameutta tai pH-muutoksia, jotka häiritsevät erityisesti immunokemiallisia määrittämiä. Säilytyksestä ja kuljetuksesta johtuvia häiriötekijöitä voidaan vähentää noudattamalla annettuja ohjeita. (Tuokko, Rautajoki ja Lehto 2008, 114 - 115.)

5.1.3 Tulosten tulkinta

Aktiivisella B12-vitamiinilla on iästä ja sukupuolesta riippumatta samat viitearvot, yli 35 pmol/l. Merkittävästi pienentyneet alle 20 pmol/l tulokset viittaavat vahvasti B12-vitamiinin puutukseen. Raja-alueella 20-50 pmol/l vitamiinin puutos on mahdollinen. Silloin on harkittava lisätutkimuksina homokysteiniin tai metyyylimalonaatin määrittämiä (Eskelinen 2016; HUSLAB 2016). NordLabin tutkimusohjekirjassa em. viitearvo on korvattu tavoitearvolla, joka on kaikille yli 50 pmol/l.

Laboratoriotutkimusten tulosten kliininen käyttö edellyttää, että tuloksia käytävillä ja niitä tulkitsevilla ammattihenkilöillä on riittävästi tietoa siitä, millaisia tuloksia on odotettavissa terveillä henkilöillä ja miten mahdolliset sairaudet vaikuttavat niihin (Tuokko ym. 2008, 119). Viiteväli on tilastollinen suure, joka kuvaa ns. terveiden ihmisten keskimääräistä jakautumaa kattaen siitä 95 %. Täten viitevälistä hieman poikkeava arvo ei välttämättä tarkoita, että potilas on sairas, vaan se voi olla hänelle tyypillinen arvo (Penttilä 2004, 20).

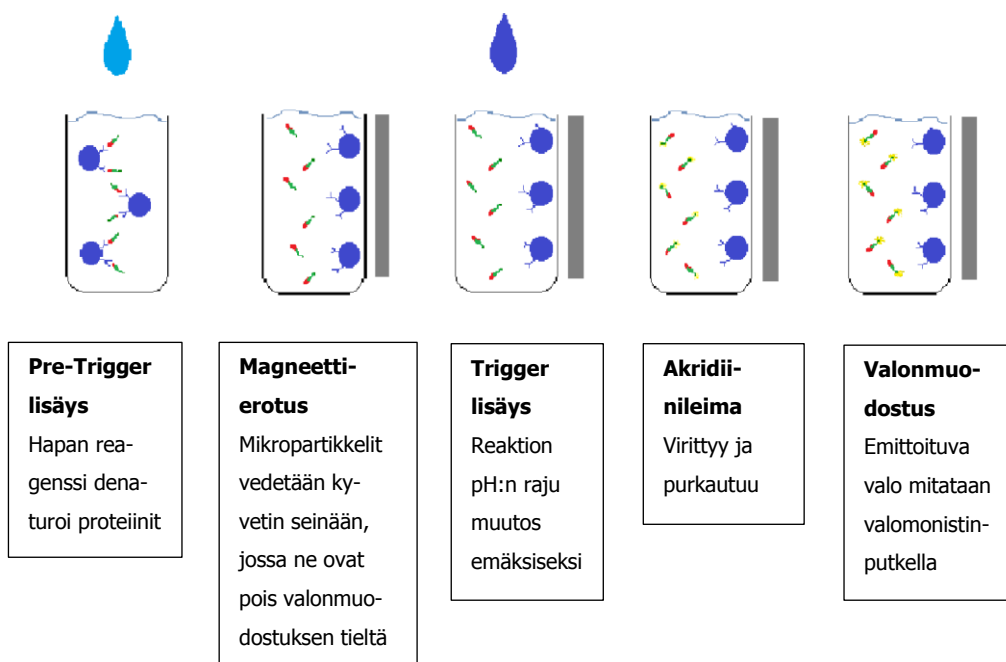
Postanalyttisessä vaiheessa arvioidaan analyttisen vaiheen onnistumista ja saatujen tulosten luotettavuutta. Tulosten luotettavuutta voidaan arvioida tarkastelemalla analysaattorin antamia virheilmoituksia ja näytteestä johtuvia virhetekijöitä. Esimerkiksi kemiallisten määrittämiä yhteydessä tarkistetaan näytteen hemolyysin, ikteerisyyden tai lipeemisyyden aste. Kvantitatiivisia määrittämiä varten ajettavilla kontrollinäytteillä on olemassa hyväksymis- ja hylkäämisrajat, jotka auttavat tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Joillakin analysaattoreilla on käytössä autovalidointijärjestelmä, joka tarkistaa kaikki tulokset ohjelmoitujen hyväksymis- ja kiinniottokriteereiden mukaisesti, jolloin vain autovalidoinnissa ”kiinni” jääneet tulokset jäävät manuaalisesti tarkastettavaksi. Tarvittaessa näyte analysoidaan uudelleen tai pyydetään kokonaan uusi näyte. (Tuokko 2008, 12 - 13.)

5.2 Aktiivisen B12-vitamiinin määrittäminen

Näytteiden analyttisessä vaiheessa käsitellyistä potilasnäytteistä määritetään tutkittavan analyytin pitoisuus. Analysoinnissa käytetään vain laitteistoa, jonka soveltuvuus käyttötarkoitukseensa on testattu ja hyväksytty, ja jonka antamien tulosten oikeellisuus voidaan varmentaa ja jäljittää. Jokaiselle kliiniselle laboratoriotutkimukselle on olemassa omat, hyväksytyt tutkimusmenetelmät ja analytiikan laadunvarmistukselle sovitut toimintaperiaatteet. (Tuokko ym. 2008, 12.)

Aktiivinen-B12 (holotranskobalamiini) on kaksivaiheinen kemiluminesenssiin perustuva kvantitatiivinen immunomääritys. Menetelmä perustuu CMIA (*Chemiluminescent microparticle immunoassay*) -tekniikkaan ja Chemiflex™ -teknologiaan.

1. Näyte ja anti-holotranskobalamiinilla päällystetyt paramagneettiset mikropartikkelit yhdistetään. Näytteen aktiivinen B12-vitamiini sitoutuu mikropartikkeleihin anti-holoTC-vasta-aineiden avulla ja näytteen sitoutumattomat komponentit pestään pois.
2. Pesun jälkeen akridinium-leimattu anti-transkobalamiini konjugaatti lisätään reaktioliuokseen.
3. Toinen pesu. Reaktioliuokseen lisätään Pre-Trigger- ja Trigger-liuoksia. Pre-Trigger denaturoi näytteen proteiinit ja vapauttaa konjugaatin mikropartikkeleista, mikä lisää valonmuodostusta. Trigger-liuos aiheuttaa rajun pH-muutoksen ja saa leiman virittymään.
4. Virittynyt akridiinileima purkautuu ja emittoituva valo mitataan valomonistinputkella. Tuloksena saatu kemiluminesenssi reaktio on mitattu suhteellisen valon yksikkönä (RLU), joka on suoraan verrannollinen näytteen holotranskobalamiini pitoisuuteen. (Active-B12 menetelmän insertti.)



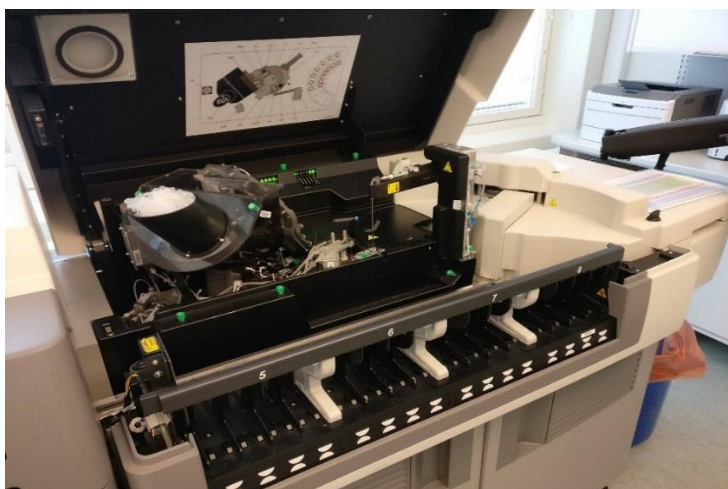
KUVA 3. Detektiomekaniikka (Architect i1000SR–koulutusmateriaali).

Luminesenssi tarkoittaa valo- tai säteilyenergian lähettämää säteilyä, joka syntyy elektronin palatessa virittyneeltä tai korkeammalta energiatasolta matalammalle energiatasolle. Liuoksen läpi kulkevan emittoitun säteilyenergian osuessa partikkeliin, valo siroaa kaikkiin suuntiin. Kemiluminesenssi menetelmässä elektronin virittyminen saadaan aikaan kemiallisen reaktion avulla. Siinä hapetetaan orgaanista yhdistettä hapettimella katalyyttien avulla. Hapettuessaan virittyneet yhdisteet emittoivat

valoa palatessaan takaisin perusenergiatilaansa. Tätä menetelmää sovelletaan usein hormonien ja vitamiinien sekä lääkeainepitoisuuksien immunokemiallisissa määrittämissä. (Halonen 2004, 74 - 76.)

5.3 Abbott Architect ci4100-analysaattori

Aktiivisen B12-vitamiinin määrittäminen tässä opinnäytetyössä tehtiin Abbott:n valmistamalla Architect ci4100-yhdistelmäanalysaattorilla, joka koostuu kliinisen kemian (c4000) ja immunokemian (i1000SR) analysaattoreista. Analysaattoreilla on yhteinen näytteenkuljetusrata ja näyttöpäätte, jolta laitteiden toimintaa ohjataan. Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa on käytössä kaksi identtistä ci4100-yhdistelmäanalysaattoria.



KUVA 4. Architect i1000SR-analysaattori (Paavola 2017-02-24).

Näytteet syötetään laitteelle näytetelineissä, joihin mahtuu viisi näytettä kerrallaan. Immunokemian (i1000SR) laitteella on yhteensä 65 näytepaikkaa. Yhteisen näytteenkuljetusradan RSH:n (*Robotic Sample Handler*) ansiosta immunokemian näytteitä voidaan syöttää samanaikaisesti myös kemian puolelle. Immunokemian ja kemian näytteitä voidaan sijoittaa myös samaan näytetelineeseen ja jopa samaan näyteputkeen, sillä laite tunnistaa näytteen tutkimuspyynnöt viivakoodin perusteella ja kuljettaa sen oikeille pipetointiasemille.

Immunokemian reagenssit säilytetään aina kylmässä ja ne syötetään laitteelle niille tarkoitetuissa näytetelineissä samalla tavoin kuin muutkin näytteet. RSH kuljettaa ne viivakoodien perusteella jäädytettyyn reagenssialtaaseen ja poistaa ne automaattisesti laitteelta niiden loputtua tai vanhentua.

Reaktiokyvetit ovat laitteen ainoa kiinteää kulutustavaraa. Kaikki immunomääritykset tapahtuvat kertakäyttöisissä reaktiokyveteissä ja niitä säilytetään analysaattorin väliavarastossa ja ne ladataan automaattisesti prosessointiasemaan väliavarastosta aina tarvittaessa.

Muut i1000SR-analysaattorin käyttämät liuokset ja jätesäiliöt sijaitsevat laitteen alaosassa, joita täytetään, vaihdetaan ja tyhjennetään päivittäisten huoltotoimien yhteydessä. Laitteen ohjaintietokone, UPS ja piirikortit sekä jäädytys sijaitsevat myös laitteen alaosassa.

6 LABORATORIMENETELMÄN LAATU JA VERIFIOINTI

Terveydenhuollon laitteen tulee täyttää sitä koskevat olennaiset kriteerit. Se täyttää olennaiset vaatimukset silloin, kun se on suunniteltu, valmistettu ja varustettu sitä koskevien kansallisten standardien mukaisesti. Laitteen tulee soveltua käyttötarkoitukseensa ja sen tulee oikein käytettynä saavuttaa sille suunniteltu suorituskyky ja toimivuus. (Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista 2010, §6.)

Verifioinnilla varmistetaan, että käyttöönotettavalla menetelmällä saadaan luotettavia ja toistettavia tuloksia verifiointiympäristössä. Verifiointi eli todentaminen suoritetaan silloin, kun halutaan varmistaa, että jo validoitu menetelmä täyttää sille ennalta asetetut kriteerit. Validointi tehdään silloin, kun käyttöönotettava menetelmä tai laite on uusi tai sitä on muutettu. Validoinnin ja verifioinnin tarkoituksena on varmistaa tulosten oikeellisuus ja menetelmän soveltuvuus tarkoituksenmukaiseen käyttöön. (Liimatainen 2002, 12-13.)

Menetelmän verifiointiin sisältyy työsuunnitelman laatiminen, mittausten suorittaminen, saatujen tulosten tilastolliset käsittelyt, tulosten arviointi ja menetelmäohjeen sekä siihen liittyvän laadunvalvonnan laatiminen. Verifioinnin eri vaiheet sekä niiden aikana tehdyt mittaukset ja johtopäätökset dokumentoidaan verifiointiraporttiin. Verifioitavaa menetelmää valittaessa on otettava huomioon analyysille asetetut vaatimukset, joita ovat esim. menetelmällä mitattavien analyttien pitoisuudet ja tulosten tarkkuus, soveltuvuus eri näytetyypeille sekä menetelmän nopeus ja taloudellisuus. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 30.)

Verifiointiraporttiin kirjataan menetelmän luotettavuuskriteereitä kuvaavat parametrit ja arvioidaan menetelmän soveltuvuutta tarkoituksenmukaiseen käyttöön. Alkuperäinen raportti arkistoidaan erillisen arkistointiohjeen mukaan ja siihen voidaan palata, jos verifiointi joudutaan suorittamaan uudelleen myöhemmin, esimerkiksi silloin kun menetelmän laadunvarmistustulosten perusteella todetaan systemaattisia muutoksia. Tulosten pohjalta laaditaan menetelmäohje, jota noudattamalla varmistetaan, että saadut tulokset ovat luotettavia. Ohjeeseen kirjataan tunnustiedot, joista selviää kuka vastaa sen laatimisesta ja milloin se on laadittu. Laboratorion on huolehdittava, että sen työntekijöillä on käytössään aina menetelmäohjeen uusin versio. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 14 - 15.)

6.1 Verifioinnin parametrit

Verifioinnissa selvitetään vertailumateriaalien avulla menetelmän kyky antaa oikeita tuloksia sekä toistomittausten avulla menetelmän sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus. Ne tarkastetaan suunnitellun pitoisuusalueen alarajalla, keskivaiheilla ja ylärajalla. Vakioinnin yhteydessä määritetään lineaarinen mittausalue. Samalla selvitetään menetelmän luotettava mittausalue, jolla hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys pystytään saavuttamaan. Tavallisesti luotettava mittausalue on hieman laajempi, kuin lineaarinen mittausalue. Lisäksi selvitetään myös todennäköisten häiriöiden ja olosuhde-

muutoksien vaikutusta menetelmän toimivuuteen. Tällaisia olosuhdemuutoksia ovat mm. eri henkilöiden erilaiset työskentelytavat, näytteiden erilaiset koostumukset ja liuottimet tai näytteiden käsittelyyn kuluva aika.

Muita verifiointissa tutkittavia parametreja valitaan tarpeenmukaan ja tapauskohtaisesti. Mitä useampia parametreja valitaan ja toistoja tehdään eri vaiheissa, sitä kattavempi ja luotettavempi on saatujen tulosten pohjalta lasketut menetelmän ja mittausten luotettavuutta kuvaavat tunnusarvot. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 30.)

Koska opinnäytetyössä käytettävän laitteen ja reagenssien valmistaja on sama, ei menetelmää tarvitse validoida, vaan verifiointi riittää. Laite- ja reagenssivalmistaja on jo suorittanut validoinnin aktiiviselle B12-vitamiinille ja verifiointilla tarkistetaan, vastaako saadut tulokset laitevalmistajan ilmoittamia arvoja. Verifiointin aikana suoritettiin potilasnäytevertailu, jossa saatuja tuloksia verrattiin referenssilaboratorion antamiin tuloksiin (Nordlab Oulu). Lisäksi selvitettiin menetelmän sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus kontrolliliuosten avulla. Potilasnäytevertailu suoritettiin sekä laite 1:lle, että laite 2:lle. Toistettavuusmittaukset tehtiin vain laiteelle 1.

6.1.1 Toistotarkkuus ja toistettavuus

Toistotarkkuus on yleiskäsite, joka tarkoittaa toisistaan riippumattomien tunnetuissa olosuhteissa mitattujen tulosten keskinäistä paikkansapitävyyttä. Menetelmän satunnaisvirhettä voidaan arvioida mittaussarjan sisäisellä ja sarjojen välisellä toistettavuudella. Sarjojen sisäistä toistettavuutta eli peräkkäisten mittaustulosten keskihajontaa selvitetään mittaamalla samaa näytettä samalla menetelmällä ja laitteella, samoissa olosuhteissa lyhyen ajan sisällä. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 12; Åkerman ja Jokela 2010, 50.)

6.1.2 Tarkkuus, oikeellisuus ja poikkeama

Oikeellisuus on saatujen mittaustulosten keskiarvon ja todellisen arvon välinen yhtäpitävyys. Tarkkuudella tarkoitetaan tässä yhteydessä mitatun arvon ja todellisen tai oletetun arvon välistä yhteensopivuutta, johon systemaattinen ja satunnaisvirhe vaikuttavat. Tarkkuutta ilmaistaan yleensä mittaustulosten keskiarvo \pm pitoisuus, jolla välillä saadut tulokset ovat tietyllä todennäköisyydellä eli luotettavuustasolla. Systemaattinen virhe eli poikkeama on aina samalla tavalla vaikuttava virhe, ja se voi johtua esimerkiksi virheellisestä kalibrointiliuoksesta tai analysaattorin viasta. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 12, 34.)

6.1.3 Spesifisyys ja herkkyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä mitata vain haluttua yhdistettä. Siihen voivat vaikuttaa muut näytteen sisältämät komponentit, jolloin kyseessä on häiriövaikutus eli interferenssi tai immunomäärityksissä ristireaktio. Spesifisyyteen vaikuttaa lisäksi matriisivaikutus eli näytteiden koostumuksen vaihtelusta johtuvat vaikutukset analyysin määrittämisessä. (Åkerman ja Jokela 2010, 50.)

Herkkyydellä eli sensitiivisyydellä tarkoitetaan mittalaitteen signaalin arvon muutoksen suhdetta tutkittavan analyytin pitoisuuden muutokseen. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 13.)

6.1.4 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisella mittausalueella mittalaitteen herkkyys on vakio eli saatujen tulosten ja näytteestä tutkittavien analyyttien pitoisuuksien välillä on lineaarinen korrelaatio. Käytössä olevalla mittausalueella mittauslaitteen virhe on tunnetuissa ja määritellyissä rajoissa. Mittausalueella menetelmä kykenee tuottamaan tuloksia hyväksyttävällä tarkkuudella ja toistettavuudella. Lineaarisella mittausalueella mittaussignaalin ja tutkittavan aineen pitoisuus ovat suoraan verrannollisia toisiinsa ja vakiointikäyrä on suora. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 13, 18.)

6.1.5 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- eli detektorirajalla tarkoitetaan tutkittavan analyytin pitoisuutta, jonka antama mittalaitteen signaalin taso pystytään toteamaan luotettavasti (95 %:n todennäköisyydellä) ja joka poikkeaa merkittävästi nollanäytteen arvosta esimerkiksi kolme kertaa nollanäytteen keskihajonnan (s) suuruiseksi eli

$$\text{toteamisraja} = \text{nollanäytteen keskiarvo} \pm 3 \times s.$$

Mittalaitteen toteamisraja pystytään määrittämään ajamalla rinnakkaismittaukset samasta yhtä suuriin osiin jaetusta näytteestä, jonka pitoisuus on lähellä toteamisrajaa. Menetelmän detektorirajaa määritettäessä tehdään jokaista rinnakkaismittausta varten omat näytteet siten, että näytteenkäsittelyn eri vaiheet suoritetaan kaikilla näytteillä. Näin toteamisrajasta saadaan arvoltaan suurempi, mutta se on lähempänä todellista tilannetta. Määrittäys- eli kvantitointiraja on pienin näytetaustaa vastaan mitatun tutkittavan analyytin pitoisuustaso, jolle voidaan tehdä kvantitatiivisia mittauksia tietyllä luotettavuustasolla. Määrittäysraja voidaan laskea nollanäytteen keskihajonnan (s) avulla kuten toteamisrajakin. Esimerkiksi:

$$\text{määrittäysraja} = \text{nollanäytteen keskiarvo} \pm 10 \times s.$$

Jos tutkittavan analyytin pitoisuus sijoittuu toteamis- ja määrittäysrajan välille, voidaan todeta näytteessä olevan sitä, mutta sen pitoisuus on "alle määrittäysrajan." (Jaarinen ja Niiranen 2005, 13.)

6.1.6 Mittausepävarmuus

Menetelmän kokonaismittausepävarmuudella tarkoitetaan vaihteluväliä, jolle mittaustulos sijoittuu tietyllä todennäköisyydellä. Menetelmän mittausepävarmuutta arvioitaessa on otettava huomioon kaikki mahdolliset tekijät, jotka ovat voineet vaikuttaa saatuun mittaustulokseen (Jaarinen ja Niiranen 2005, 35). Analyyttisen mittausvirheen ohella tuloksen kokonaisvirheeseen vaikuttavat potilaan esivalmistelusta, näytteenotosta, näytteen käsittelystä, säilytyksestä sekä kuljettamisesta johtuvat

virhetekijät. Analyttiset mittausvirheet koostuvat satunnaisista ja systemaattisista virheistä. Satunnaisvirhettä arvioidaan toistotarkkuutena tai toistuvuutena, ja systemaattista virhettä tarkkuutena tai poikkeamana. Analyysissä käytetty menetelmä ja mittalaite vaikuttavat mittausvirheen suuruuteen (Åkerman ja Jokela 2010, 50).

Analysaattorin suorituskyky, reagenssien säilyvyys ja tutkimusta suorittavan henkilökunnan ammattitaito vaikuttavat satunnaisvirheeseen. Sitä voidaan mitata kontrollinäytteiden avulla sarjojen sisäisenä ja sarjojen välisenä variaationa. Tutkimuksessa käytetty menetelmä, menetelmän vakiointi ja spesifisyys puolestaan vaikuttavat systemaattiseen virheeseen. (Åkerman ja Jokela 2010, 50.)

Kokonaismittausepävarmuus (U) voidaan laskea seuraavalla kaavalla:

$$U = 2 \times \sqrt{(CV_{sis}^2 + CV_{väl}^2 + CV_{syst}^2 + CV_{muut}^2)}$$

Määrittelyn kokonaismittausepävarmuuteen on tarkoitus sisällyttää kaikki määrittelyn kannalta oleelliset virhetekijät. Tällaisina virhetekijöinä voidaan pitää kaikkia niitä, joiden osuus on vähintään 1/5, joidenkin lähteiden mukaan 1/3, suurimmasta virhetekijästä. (Åkerman ja Jokela 2010, 50.)

6.1.7 Saanto

Saantoprosentti selvitetään, jos menetelmään liittyy näytteen käsittelyä tai on muuten aihetta olettaa, että menetelmä ei havaitse tutkittavan analyytin kokonaismäärää. Tämä suoritetaan mittaamalla analyytin pitoisuus varsinaisesta näytteestä (C) sekä valmistamalla näyte, mihin on lisätty tunnettu määrä analyyttiä (C_1) ja mittaamalla tämän pitoisuus (C_2).

$$\text{Saanto-\%} = (C_2 - C) / C_1 \times 100 \%$$

Tavoitteena on, että menetelmä havaitsee koko lisäystä vastaavan analyytin määrän ja $C_2 - C = C_1$. Toistuvasti alle 100 %:n jäävä tulos korjataan vastaavalla kertoimella, mikäli siihen ei voida koejärjestelyillä vaikuttaa. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 30 - 31.)

6.1.8 Uusittavuus

Laboratorioiden suorituskykyä ja analyysimenetelmien siirrettävyyttä laboratorioista toiseen arvioidaan uusittavuuden avulla. Uusittavuus on saman mittaussuureen mittaustulosten yhteneväisyys muuttuneissa olosuhteissa, esimerkiksi silloin kun mittaukset uusitaan eri laboratorioissa tai eri menetelmällä. Yleensä testataan menetelmän sisäistä uusittavuutta, jolloin samaa näytettä analysoidaan eri laboratorioissa, eri menetelmillä ja eri henkilöiden toimesta. Uusittavuuden yhteydessä kerrotaan olosuhteiden muutoksista. Uusittavuus on lukuarvoltaan toistuvuutta suurempi. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 12, 34.)

6.1.9 Toimintavarmuus

Toimintavarmuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä antaa hyväksyttäviä tuloksia mittausmenetelmien yksityiskohtien poikkeamista huolimatta esimerkiksi, silloin kun pH-arvo tai mittaustilapöytä poikkeaa ohjeen mukaisesta. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 12.)

6.1.10 Häiriökestävyys

Häiriökestävyydellä tarkoitetaan tutkimusolosuhteiden ja toteuttamisen eri vaiheiden aikana tehtyjen muutosten vaikutusta saatujen tulosten oikeellisuuteen esimerkiksi silloin, kun määrittäminen tapahtuu eri analysointitilillä tai eri valmistuserän kemikaaleilla. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 12.)

6.2 Korrelaatio

Korrelaatio kuvaa kahden muuttujan välistä riippuvuutta ja sitä kuvaavaa tunnuslukua kutsutaan korrelaatiokertoimeksi r . Korrelaatiokertoimen arvo vaihtelee välillä $-1 \dots +1$. Mitä enemmän arvo poikkeaa yhdestä, sitä enemmän mittauksiin liittyy hajontaa. Arvon ollessa 0 muuttujien välillä ei ole lineaarista riippuvuutta. Korrelaatiokertoimen lisäksi raportoidaan usein korrelaatiokertoimen neliö r^2 . Korrelaatiokertoimella viitataan yleensä Pearsonin korrelaatiokertoimeen. (Jaarinen ja Niiranen 2005, 25; KvantiMOTV 2004).

7 OPINNÄYTETYÖN TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYS

Opinnäytetyön tarkoituksena on suorittaa järjestelmällinen verifiointi, jolla varmistetaan seerumin transkobalamiini II:een sitoutuneen B12-vitamiinin määritysmenetelmän toimivuus ja luotettavuus Abbott Architect ci4100 -analysaattorilla. Laadin lisäksi menetelmä- ja työohjeen aiheesta. Verifiointin avulla voidaan varmistua siitä, että se soveltuu tarkoituksenmukaiseen käyttöön ja tulokset vastaavat laite- ja reagenssivalmistajan määrittämiä arvoja. Tällä hetkellä S-B12-TC2-näytteet lähetetään Ouluun Nordlabin laboratorioon analysoitavaksi. Verifiointin ansiosta biologisesti aktiivisen B12-vitamiinin määrittäminen voidaan jatkossa suorittaa Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa. Kyseisen tutkimuksen suorittaminen Raahen laboratoriossa tulee taloudellisesti kannattavammaksi, ja tutkimustulokset saadaan saman päivän aikana. Lisäksi näytteen lähettämisestä ja säilytyksestä johtuvien preanalyttisten virhetekijöiden määrä pienenee.

Työn tavoitteena on saada vastaukset seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

- Vastaako saadut tutkimustulokset laite- ja reagenssivalmistajan ilmoittamia arvoja?
- Ovatko S-B12-TC2-näytteiden tulokset luotettavia?
- Soveltuuko menetelmä käytettäväksi Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa?

8 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

8.1 Opinnäytetyön prosessi

Sain opinnäytetyön aiheen Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratorion ylikemistiltä joulukuussa 2016. Hyväksytyn aihekuvauksen jälkeen aloin valmistella tutkimussuunnitelmaa ja keräsin aiheeseen liittyvää kirjallisuutta ja muuta aineistoa, jota hyödynsin myös varsinaisessa opinnäytetyössä. Tutkimussuunnitelmani hyväksyttiin helmikuussa 2017, jonka jälkeen hain tutkimuslupaa hyvinvointikuntayhtymän terveyden- ja sairaanhoidon tulosalueen johtajalta. Tutkimusluvan saatuaani suoritin työn kokeellisen osuuden, jonka ohella kirjoitin opinnäytetyön teoriaosuuden. Lopuksi kokosin verifiointin tulokset ja laadin loppuraportin tutkimustuloksista ja opinnäytetyön onnistumisesta. Opinnäytetyö valmistui 30.04.2018.

8.2 Kvantitatiivinen tutkimus

Tutkimusta suunnittelevan tulee pohtia, mikä menettelytapa tuo parhaiten selvyyttä käsiteltäviin tutkimuskysymyksiin ja -ongelmiin. Tämän opinnäytetyön lähestymistapana on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Kvantitatiivinen tutkimus käsittelee numeroita ja tilastoja, ja on yleisesti käytetty menetelmä sosiaali- ja terveysalan sekä yhteiskuntatieteiden tutkimuksissa. Sen keskeisiä piirteitä ovat aiemman teoriatiedon esittely ja käsitteiden määrittely, koejärjestelyjen ja aineistonkeruun suunnittelu ja toteuttaminen sekä päätelmien tekeminen perustuen havaintoaineiston tilastolliseen analysointiin. (Hirsijärvi, Remes ja Sajavaara 1997, 126 - 131.)

9 TYÖVAIHEET

Menetelmän käyttöönottoa varten tarvittavat reagenssit, kalibrointi- ja kontrolliliuokset tilattiin laitevalmistajalta tammikuussa 2017. Niiden saavuttua otin menetelmän käyttöön laboratorion ylikemistin ohjauksessa, jonka jälkeen reagenssit syötettiin analysaattorille. Suoritin menetelmän käyttöönoton ja reagenssien syötön toiselle käytössä olevalle analysaattorille itsenäisesti saamieni ohjeiden mukaan.

Menetelmään sisältyy kaksi reagenssipulloa. Ensimmäinen reagenssipullo sisältää anti-holotranskobalamiinilla päällystettyjä paramagneettisia mikropartikkeleita. Toinen reagenssi sisältää akridiniumleimatun anti-transkobalamiini konjugaattiliuoksen. Ennen laitteelle syöttöä pulloista poistettiin korkit ja niiden tilalle asetettiin kumiset suojakorkit (septumit), jotka estävät liuosten haihtumista ja kontaminoitumista. Reagenssipullot syötettiin laitteelle niille tarkoitettussa telineessä näytteensyöttöradan kautta, josta näyteenkuljetin (RSH) vei ne jäähdytettyyn reagenssialtaaseen. Reagenssipulloissa olevien viivakoodien perusteella analysaattori tunnistaa reagenssit.

Reagenssien syötön jälkeen menetelmä vakioitiin kalibrointiliuoksilla, joiden tarkka pitoisuus tunnettiin. Active-B12 kalibraattoreita oli yhteensä kuusi eri tasoa. Aluksi analysaattorin näyttöpäätteellä tehtiin vakiointipyyntö, jonka jälkeen jokaista tasoa laitettiin kahdeksan tippaa omiin näyteastioihin, jotka syötettiin laitteelle näyteräkeissä. Vakioinnin tarkoituksena on määrittää näyteen mitattavissa olevien ominaisuuksien ja analyysin pitoisuuden välinen suhde sekä analyysiin soveltuva pitoisuusalue (Jaarinen ja Niiranen 2005, 18).

Onnistuneen vakioinnin jälkeen menetelmä kontrolloitiin kahdella eri konsentraation omaavalla active-B12 kontrolliliuoksella. Kontrollien ajo suoritettiin samalla tavalla kuin vakiointi. Ensin tehtiin näyttöpäätteellä kontrollipyyntö laitteelle, jonka jälkeen kumpiakkin kontrolliliuoksia laitettiin viisi tippaa omiin näyteastioihin ja syötettiin näyteräkissä laitteelle. Kontrolliliuosten avulla varmistetaan vakioinnin pysyvyyttä (Jaarinen ja Niiranen 2005, 21).

Tämän jälkeen alkoi varsinainen verifiointiosuus. Tässä verifiointissa tarkasteltiin menetelmän toimivuutta ja luotettavuutta potilasvertailunäytteiden, sarjojen sisäisen ja ulkoisen toistettavuuden avulla.

Potilasvertailussa käytetyt näytteet saatiin Nordlabin laboratorion, jossa niiden aktiivisen B12-vitamiinin pitoisuus oli jo aiemmin määritetty. Jokaisen näyteen tutkimuspyyntötarran tilalle oli laitettu referenssilaitteella saatu tulos. Osa potilasvertailussa käytetyistä näytteistä oli puolestaan kerätty toimeksiantajan laboratoriossa. Anonyymit potilasvertailunäytteet analysoitiin samalla tavalla kuin kalibrointi- ja kontrolliliuokset. Tein analysaattorin näyttöpäätteellä tutkimuspyynnöt keksityillä näytetunnisteilla, jotta pystyin yhdistämään saadut tulokset referenssilaitteen tulosten kanssa. Tutkin potilasvertailunäytteet heti niiden saavuttua laboratorioon, sillä viivästynyt analysointi olisi saattanut vaikuttaa tulokseen. Kirjasin referenssilaitteen tulokset valmiiseen excel-tilukkaan, johon lisäksi

saamani tulokset. Näytteet tutkittiin kahdessa erässä. Ensimmäisen erän näytteet ajettiin kummallakin laitteella. Referenssilaboratorion laitteisto vaihtui, jonka vuoksi näytevertailua haluttiin jatkaa. Toisen erän näytteet analysoitiin ainoastaan toisella laitteella ja niitä verrattiin uuden referenssilaitteen tuloksiin. Menetelmä vakioitiin uudelleen ennen toista näytevertailua, koska käyttöön otettiin uutta LOT:a oleva reagenssierä.

Sarjojen sisäistä ja ulkoista toistettavuutta tarkasteltiin potilasnäytteiden ja kontrolliliuosten avulla. Sarjojen sisäisen toistettavuuden mittauksessa käytettiin kolmea eri pitoisuustason omaavaa potilasnäytettä. Näytteet olivat peräisin potilasvertailunäytteistä. Jokaista näytetasoa analysoitiin kymmenen kertaa samassa sarjassa siten, että sillä hetkellä analysaattorilla ei ajettu mitään muita näytteitä.

Sarjojen välisen toistettavuuden mittauksessa ajoin matalaa ja korkeaa active-B12 kontrollitasoa yhteensä 14 kertaa kymmenen päivän sisällä. Laitteella analysoitiin saman aikaisesti myös potilasnäytteitä. Viimeiset kolme toistuvuusmittausta suoritettiin myöhemmin viiden päivän aikana, koska reagenssit loppuivat kesken ja uusien tilausta jouduttiin odottamaan. Toistuvuuden mittaukset suoritettiin käytännössä samalla tavalla, kuin menetelmän vakiointi tai kontrollointi eli tehtiin ensin tutkimuspyyntö näyttöpäätteellä, jonka jälkeen näytteet syötettiin laitteelle näyteräkeissä.

10 TULOKSET

Potilasvertailunäytteiden tulokset ovat kirjattu kahteen eri taulukkoon. Ensimmäisessä taulukossa on vertailussa toimeksiantajan laboratorion kummankin laitteen (laite 1 ja laite 2) ja referenssilaitteen tulokset (taulukko 1). Toiseen taulukkoon on kirjattuna päälaitteena toimivan laite 1:n ja referenssilaboratorion uuden menetelmän tulokset (taulukko 2). Taulukkojen tyhjät tuloskentät tarkoittavat, että tulokset ovat mittausalueen ulkopuolella eikä ne siksi sovellu näytevertailuun. Näytevertailutulosten pohjalta on laadittu graafeja, joiden avulla lopputulosta on helpompi tarkastella ja arvioida.

TAULUKKO 1. Potilasvertailunäytteiden tulokset.

	pvm	näyte-tunniste	Tuuri 2.vertailu-laite	Onni 1.vertailu-laite	Oulun ABBOTT (=ref.laite)
1	10.2.2017	HoloTC 1	60,0	60,3	62,2
2	10.2.2017	HoloTC 2			
3	10.2.2017	HoloTC 3	51,5	51,2	52,0
4	10.2.2017	HoloTC 4	108,6	110,8	123,5
5	10.2.2017	HoloTC 5	12,2	12,1	11,8
6	10.2.2017	HoloTC 6	96,0	84,5	94,3
7	10.2.2017	HoloTC 7	78,0	70,6	79,1
8	10.2.2017	HoloTC 8	55,0	52,5	62,4
9	10.2.2017	HoloTC 9	73,7	71,7	76,3
10	10.2.2017	HoloTC 10	115,9	104,6	115,7
11	10.2.2017	HoloTC 11	63,2	57,8	63,9
12	10.2.2017	HoloTC 12	68,6	62,7	67,7
13	10.2.2017	HoloTC 13	124,2	109,7	122,8
14	10.2.2017	HoloTC 14	56,5	50,9	56,9
15	10.2.2017	HoloTC 15	59,8	54,0	57,3
16	10.2.2017	HoloTC 16			
17	10.2.2017	HoloTC 17	57,1	52,1	53,3
18	10.2.2017	HoloTC 18	103,5	100,0	113,9
19	10.2.2017	HoloTC 19	43,1	39,7	42,7
20	10.2.2017	HoloTC 20	87,1	81,1	95,9
21	10.2.2017	HoloTC 21	104,5	98,8	116,1
22	10.2.2017	HoloTC 22	77,2	73,3	75,6
23	10.2.2017	HoloTC 23			
24	10.2.2017	HoloTC 24	66,8	66,8	68,8
25	10.2.2017	HoloTC 25	124,0	120,0	123,1
26	10.2.2017	HoloTC 26	49,0	47,2	49,0
27	10.2.2017	HoloTC 27	116,6	110,9	126,9
28	10.2.2017	HoloTC 28	87,1	81,1	94,3
29	10.2.2017	HoloTC 29	70,0	66,2	77,0
30	10.2.2017	HoloTC 30	106,3	99,5	110,8

TAULUKKO 2. Potilasvertailunäytteiden tulokset.

	pvm	näyte- tunniste	Laite 1. vertailulaite	Nordlab:n Siemens
31	13.3.2017	Z518580	67,6	51,9
32	13.3.2017	Z500593		
33	13.3.2017	Z541408		
34	15.3.2017	Z553473		
35	15.3.2017	Z396297		
36	15.3.2017	Z303755		
37	15.3.2017	Z134947		
38	15.3.2017	Z330933		
39	15.3.2017	Z216501		
40	15.3.2017	Z378347	42,5	52,8
41	15.3.2017	Z509740	93,8	114,7
42	15.3.2017	Z243761	122,3	118,8
43	15.3.2017	426136	125,9	120,8
44	17.3.2017	Z264922	113,8	96,7
45	17.3.2017	Z252153		
46	17.3.2017	Z542291	79,6	67,5
47	20.3.2017	Z145212		
48	20.3.2017	Z202973		
49	20.3.2017	Z436839		
50	20.3.2017	Z584206	78,5	67,6

Regressioanalyysin avulla voidaan selvittää yhden tai useamman selittävän muuttujan vaikutusta selitettävään muuttujaan (KvantiMOTV 2008). Tämän verifiointin potilasvertailunäytteiden tuloksista laadittiin regressioanalyysin avulla kuvaajat, joiden avulla vertailtiin eri menetelmillä saatuja tuloksia (kuva 5 ja kuva 6). Regressioanalyysissä kuvaajan X-akselille asetettiin verifiointin kohteena olevan menetelmän tulokset. Niiden perusteella laskettiin regressiosuoran yhtälö pienimmän neliösumman eli ns. lineaarisen regression menetelmällä kaavalla $y=b+ax$. Jos menetelmät olisivat antaneet täysin samat tulokset, suoran kulmakerroin a olisi 1 ja y -akselin leikkauspiste 0. Ideaalitapauksessa kuvaajien selitysasteet (R^2) olisivat 1, mutta tähän ei päästä käytännössä koskaan.

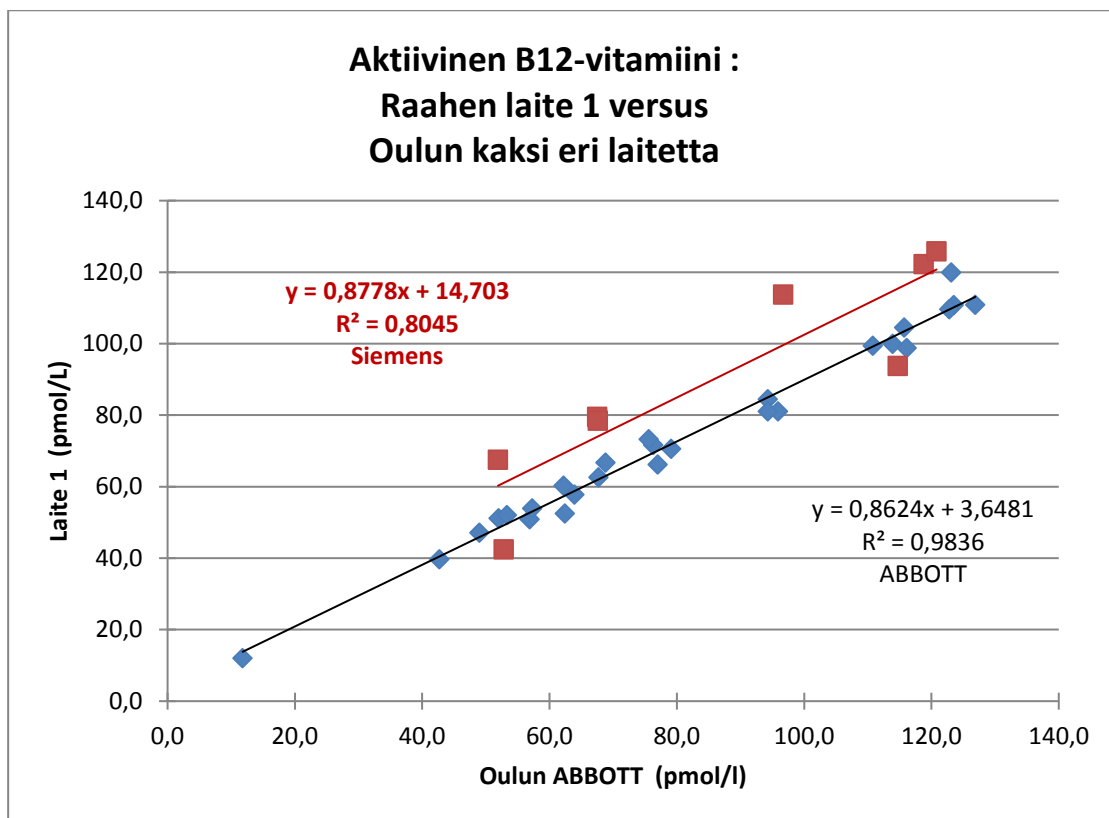
Uuden referenssimenetelmän ja laite 1:n välillä ilmeni tulostaseroa, joka on havaittavissa parhaiten graafisesta kuvaajasta (kuva 5). Samassa kuvaajassa näkyy uuden referenssimenetelmän tuloksissa epälineaarisuutta johtuen kahdesta poikkeavasta tuloksesta. Poikkeavat tulokset voivat johtua esimerkiksi näytteiden pitkittyneestä säilytyksestä tai menetelmän satunnaisesta analyysivirheestä. Nämä kaksi näytettä olisi kannattanut analysoida uudelleen ja tarkastella tulosten eroa. Jos tulokset olisivat olleet samaa tasoa, olisi kyseessä todennäköisesti jokin näytteestä johtuva syy. Mikäli tuloksissa olisi ollut suurta eroa, olisi se mahdollisesti johtunut satunnaisesta analyysivirheestä.

Vanhan referenssimenetelmän, laite 1:n ja laite 2:n välinen tulostasero ei ollut merkittävä. Kaikki kolme oli saman laitevalmistajan laitteita ja käyttivät samaa menetelmää. Laite 1:n ja laite 2:n välisen näytevertailun tulos oli odotettavissa, koska kyseessä oli kaksi täysin samanlaista laitetta sa-

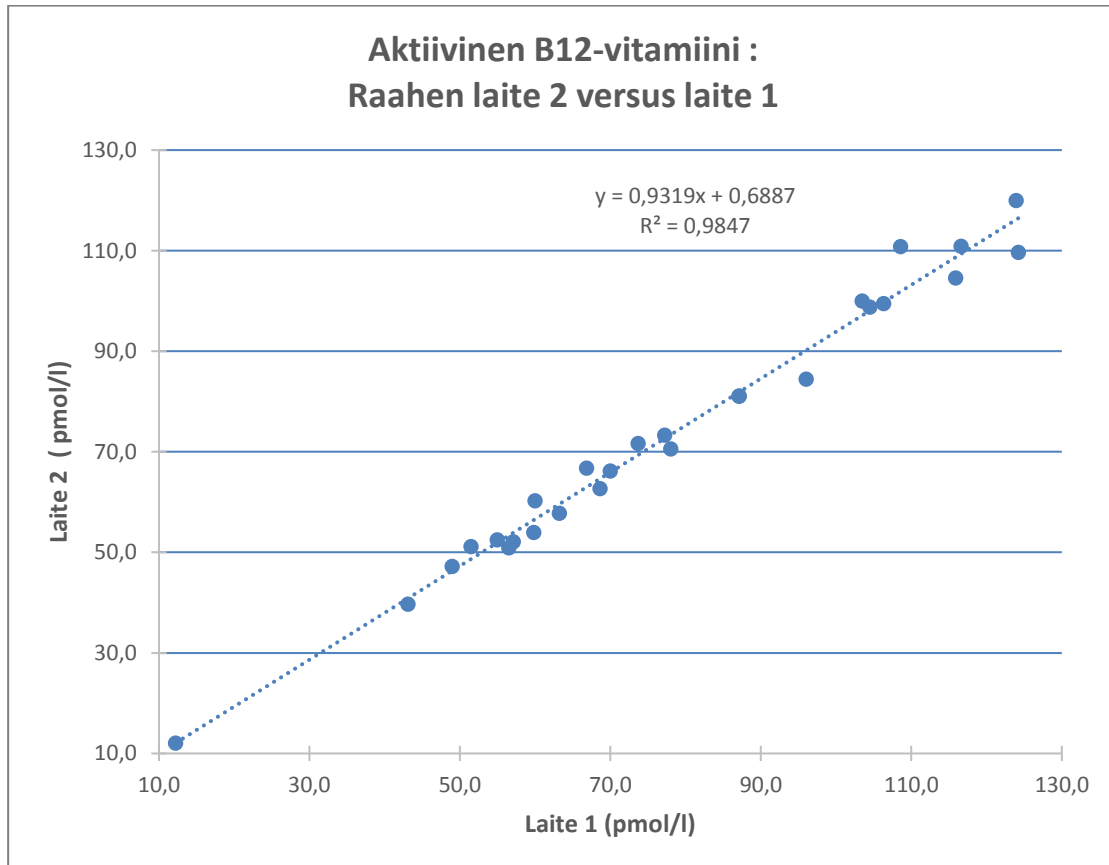
moissa olosuhteissa (kuva 6). Graafinen kuvaaja on lineaarinen eikä laitteiden välillä ole havaittavissa tulostaseroa. Tuloksista laadittiin myös graafit, joissa kuvataan tulosten suhteellista eroa toisiinsa prosentteina ja yksiköissä (pmol/l) (kuva 7 ja kuva 8).

Sarjojen sisäisen toistettavuuden mittauksessa ei päästy aivan laite- ja reagenssivalmistajan ilmoittamiin arvoihin (taulukko 3). Tulokset poikkeavat kuitenkin niin vähän annetuista kriteereistä, ettei se ole este menetelmän käyttöönotolle. Analysaattorilla ajetaan jatkuvasti näytteitä ympärivuorokautisesti, jolloin esimerkiksi laitteen näyteneulan epäpuhtaudet ovat voineet kontaminoida toistettavuusmittauksissa käytettäviä näytteitä, mikä puolestaan on voinut vaikuttaa tuloksiin. Sarjojen välinen toistettavuus oli hyvä ja laite- ja reagenssivalmistajan ilmoittamat toistettavuuskriteerit täyttyivät (taulukko 4).

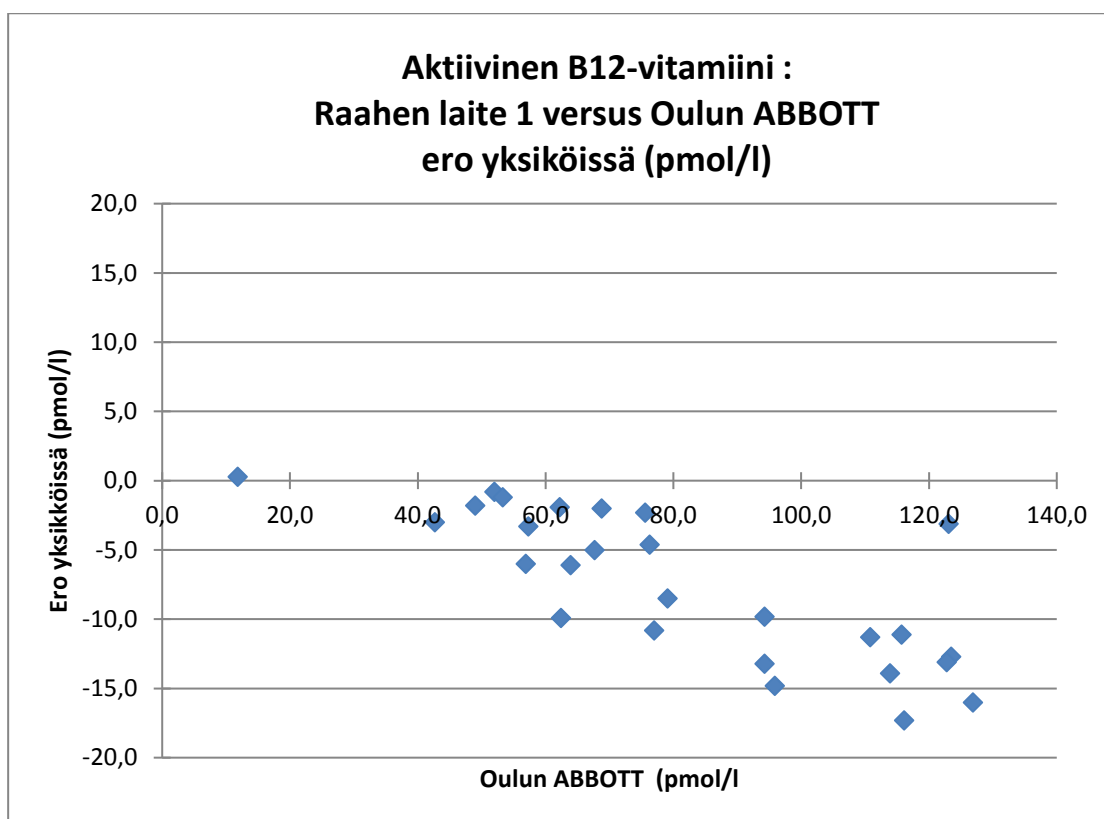
Verifiointi oli laajuudeltaan melko suppea. Potilasvertailussa käytettiin yhteensä 50 näytettä, joista 15 ei soveltunut näytevertailuun, koska niiden tulos meni yli mittausalueen (>128,0 pmol/l). Uuden referenssimenetelmän ja laite 1:n välisessä vertailussa oli vain kahdeksan näytettä, minkä vuoksi kahdesta näytteestä saadut toisistaan selvästi poikkeavat tulokset vaikuttivat merkittävästi vertailutulokseen. Menetelmien välinen tulostasero ei ole kliinisesti merkittävä, mutta tulostaseroista on kuitenkin tiedotettava tutkimuksen tilaavia yksiköitä. Verifiointin tulosten pohjalta voidaan yhteenvetona todeta, että menetelmä voidaan ottaa käyttöön Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa.



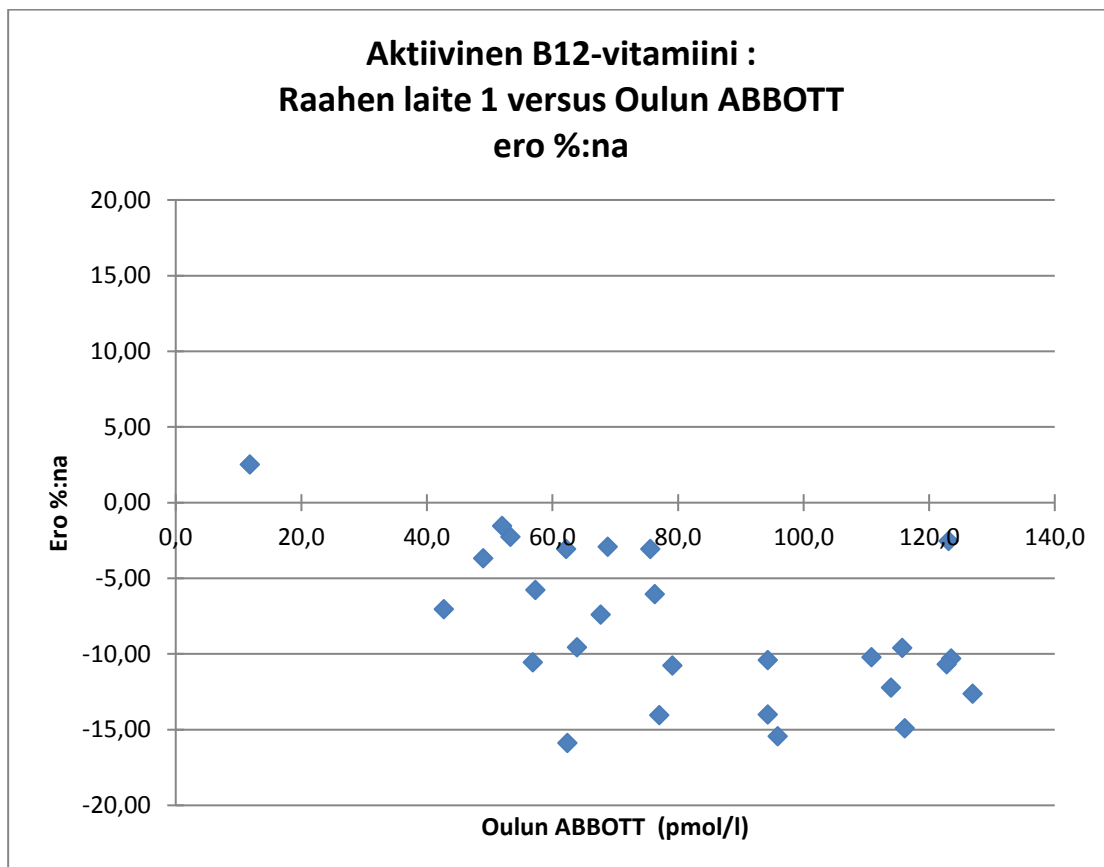
KUVA 5. Potilasvertailunäytteet: laite 1 versus referenssimenetelmät. Punaisella on merkitty uuden ref.menetelmän tulokset ja sinisellä laite 1:n ja vanhan ref.menetelmän tulokset.



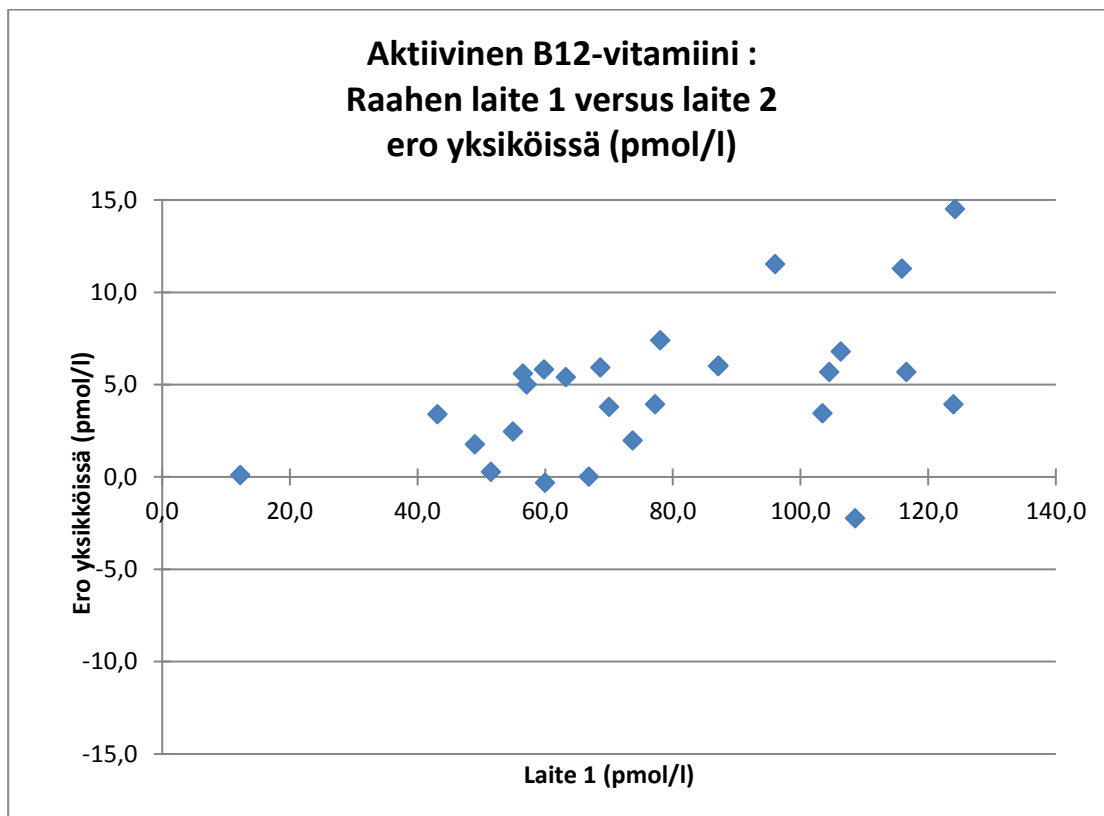
KUVA 6. Potilasvertailunäytteet: laite 2 versus laite 1.



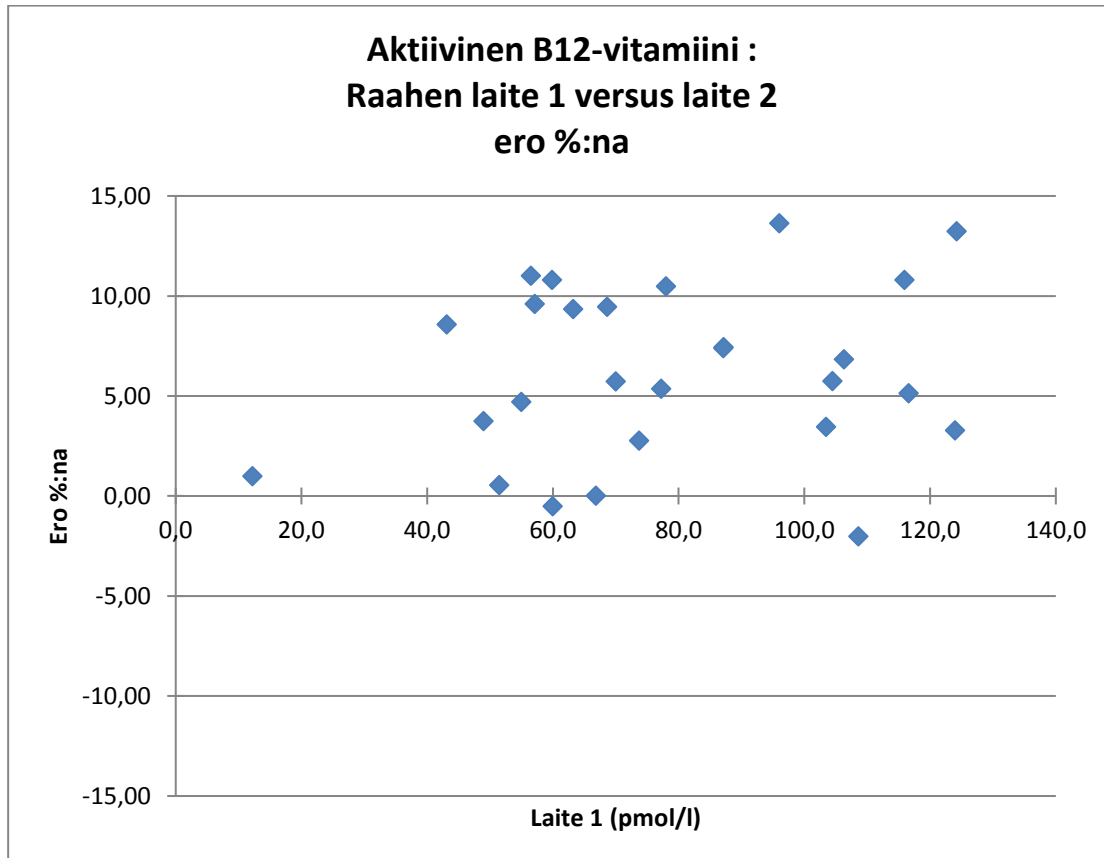
KUVA 7.0. Tulosten suhteellinen ero yksiköissä.



KUVA 7.1. Tulosten suhteellinen ero prosentteina.



KUVA 8.0. Tulosten suhteellinen ero yksiköissä.



KUVA 8.1. Tulosten suhteellinen ero prosentteina

TAULUKKO 3. Sarjojen sisäisen toistettavuuden tulokset.

	näyte 1		näyte 2		näyte 3
1	22		59,5		89,9
2	22,7		60,9		88,9
3	22		57,7		86,6
4	22,1		59,3		86,2
5	21,6		67,4		83,5
6	23,9		61,5		88,7
7	22,1		59,3		89,4
8	21,5		60,8		87,3
9	24,2		63,8		86,4
10	22		58,5		90,9
ka	22,41		60,87		87,78
sd	0,924302		2,869398		2,193323
cv%	4,124505		4,713977		2,498659
reagenssivalmistajan ilmoittama toistettavuus (insertistä)					
pitoisuus	24,62		52,95		81,34
cv%	2,3		1,6		2,2

TAULUKKO 4. Sarjojen välisen toistettavuuden tulokset.

PVM	taso1		taso2
20.helmi	16,1		46,8
20.helmi	16,4		48,2
21.helmi	16,1		50,3
21.helmi	15,9		46,5
22.helmi	16,2		48,7
22.helmi	17,1		45,5
23.helmi	15,8		47,9
24.helmi	17,6		53,2
24.helmi	15,7		49,2
27.helmi	17,4		50,5
28.helmi	17		50,7
13.maalis	15,5		47
15.maalis	15,2		46,1
17.maalis	15,6		48
ka	16,25714		48,47143
sd	0,744946		2,13557
cv%	4,582271		4,405833
reag.valmistajan ilmoittama toistettavuus			
pitoisuus	15,42		49,82
cv%	4,9		5,3

11 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli suorittaa järjestelmällinen verifiointi, jolla selvitettiin aktiivisen B12-vitamiinin määritysmenetelmän toimivuus ja luotettavuus Architect ci41000 -analysaattorilla. Sain vastaukset kaikkiin tutkimuskysymyksiin ja työn tavoitteet täyttyivät. Verifiointilla on varmistettu, että menetelmä toimii ja sillä saadaan luotettavia tuloksia. Aktiivinen-B12 menetelmä voidaan näin ollen ottaa käyttöön Raahen seudun hyvinvointikuntayhtymän laboratoriossa.

Laite- ja reagenssivalmistajan ilmoittamat toistuvuuskaiteerit täyttyivät riittävässä määrin. Sarjojen sisäisessä toistuvuudessa ilmennyt poikkeama oli niin pieni, ettei se estäisi menetelmän käyttöönottoa. Laite- ja reagenssivalmistajan menetelmien validoinnit tehdään laitteilla, joilla ei ajeta muita potilasnäytteitä, kuten tässä opinnäytetyössä käytetyillä analysaattoreilla. On mahdollista, että esimerkiksi näyteneula on kontaminoitunut, joka on sotkenut sisäisen toistuvuuden mittauksessa käytetyt kontrolliliuokset. Tuloksiin on voinut vaikuttaa myös jokin satunnaisvirhe. Näytevertailussa havaittu tulostasoero ei ole kliinisesti merkittävä. Siitä on kuitenkin ilmoitettava tutkimusta tilaaville yksiköille, jotta se osattaisiin ottaa huomioon, kun vertaillaan uudella menetelmällä saatuja tuloksia potilaiden aiempiin tuloksiin. Näytevertailuun on voinut vaikuttaa näytteiden eriaikainen analysointi ja niiden välillä tapahtuneet muutokset näytteessä.

Opinnäytetyön prosessiin liittyi myös erinäisiä hankaloittavia tekijöitä, joiden vuoksi verifiointisuunnitelmaa jouduttiin muuttamaan useaan otteeseen. Reagenssien loppuminen ja viivästynyt toimitus pidensivät kokeellisen osuuden kestoa kuukaudella. Lisäksi referenssilaboratorion laitekannan vaihtuminen kesken verifiointin aiheutti muutoksia alkuperäiseen suunnitelmaan.

Suppea verifiointi pienellä näytemäärällä lyhyessä ajassa, ei anna kuitenkaan täydellistä kokonaiskuvaa menetelmän käytettävyydestä. Jatkotutkimuksena tämän opinnäytetyön pohjalta voitaisiin tehdä laajempi potilasnäytevertailu suuremmalla näytemäärällä, jotta saataisiin kattavempi ja luotettavampi tulos. Silloin yksittäiset satunnaisvirheestä tai näytteestä johtuvat tekijät eivät vaikuttaisi niin merkittävästi lopputulokseen, kuin tässä opinnäytetyössä. Lisäksi voitaisiin myös tutkia, miten näytteen laatu, käsittely, säilytys sekä kuljetus vaikuttavat tulosten luotettavuuteen.

Opinnäytetyön toteutuksessa ja raportoinnissa on noudatettu eettisiä toimintaperiaatteita. Kaikki tutkimuksissa käytetyt potilasnäytteet olivat tehty anonyymeiksi verifiointia varten. Laboratorionäytteiden jäännösten käyttäminen tutkimuspyynnön ulkopuoliseen tarkoitukseen on standardi SFS-EN ISO 15189 (Lääketieteelliset laboratoriot. Laatu ja pätevyyttä koskevat vaatimukset) mukaan sallittua, jos jäännösnäytteet ovat tätä tarkoitusta varten tehty anonyymeiksi. Kaikki verifiointissa saadut tulokset kirjattiin ylös välittömästi, jotta virheellisiä merkintöjä ei tulisi. Verifiointin tulokset ovat kirjattuna verifiointiraporttiin, jonka toimeksiantaja on arkistoinut. Näin ollen alkuperäiset tulokset ovat jäljitettävissä ja niihin voidaan palata tarvittaessa. Tämä opinnäytetyö edisti ammatillista kehitystäni. Opin ymmärtämään, miten paljon uuden menetelmän käyttöönotto vaatii, mitä erilaisia testauksia siihen voi sisältyä ja kuinka niitä tehdään käytännössä. Lisäksi opin käyttämään ja huoltamaan Architect ci4100-analysaattoria paremmin.

LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT

ARCHITECT Active-B12 (Holo transcobalamin) – kalibraattoripakkauksen insertti.

ARCHITECT Active-B12 (Holo transcobalamin) – kontrollipakkauksen insertti.

ARCHITECT Active-B12 (Holo transcobalamin) – reagenssipakkauksen insertti.

ARCHITECT i1000SR – koulutusmateriaali.

BRADY, Jeff, WILSON, Lesley, MCGREGOR, Lynda, VALENTE, Edward ja ORNING, Lars 2008. Active B12: A Rapid, Automated Assay for Holo transcobalamin on the Abbott AxSYM Analyzer. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-03-27]. Saatavissa: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/54/3/567>

ESKELINEN, Seija 2016. Senkka ja 100 muuta tutkimusta. B12-vitamiini, transkobalamiini II:een sitoutunut (S-B12-TC2). Duodecim. Terveyskirjasto. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-01-15]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk99003

FÄRKKILÄ, Martti ja LEINO, Rauli 2013. B12-vitamiinin imeytymishäiriöt. Julkaisussa: FÄRKKILÄ, Martti, ISONIEMI, Helena, KAUKINEN, Katri ja PUOLAKKAINEN, Pauli 2013. Gastroenterologia ja hepatologia. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

HALONEN, Toivo 2004. Fotometriset menetelmät. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

HIRSIJÄRVI, Sirkka, REMES, Pirkko ja SAJAVAARA, Paula 1997. Tutki ja kirjoita. 10. osin uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

HUSLAB 2017. B12-vitamiini, transkobalamiini II:een sitoutunut, seerumista. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-03-25]. Saatavissa: http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1142&terms=s-b12-tc2

IHANAINEN, Merja, LEHTO, Marjaana, LEHTOVAARA, Armi ja TOPONEN, Tiina 2008. Ravitsemustieto. 2. painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

JAARINEN, Soili ja NIIRANEN, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. - 6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

KIVIPELTO, Miia, ANNERBO, Sylvia, HULTDIN, Johan, BÄCKMAN, Lars, VIITANEN, Matti, FRATIGLIONI, Laura ja LÖKK, Johan 2009. Homocysteine and holo-transcobalamin and the risk of dementia and Alzheimers disease: a prospective study. Julkaisussa: European Journal of Neurology 2009.

LAKI TERVEYDENHUOLLON LAITTEISTA JA TARVIKKEISTA. L 2010/629. Finlex. Lainsäädäntö. [Viitattu 2017-01-30]. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2010/20100629#Pidp816208>

LEINO, Rauli 2007. B12-vitamiinin absorptiohäiriöt. Julkaisussa: HÖCKERSTEDT, Krister, FÄRKKILÄ, Martti, KIVILAAKSO, Eero ja PIKKARAINEN, Pekka 2007. Gastroenterologia ja hepatologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

LIIMATAINEN, Oili 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa. Moodi 1.

LOIKAS, Saira 2015. Megaloblastinen anemia. Julkaisussa: PORKKA, Kimmo, LASSILA, Riitta, REMES, Kari ja SAVOLAINEN, Eeva-Riitta 2015. Veritaudit. 4. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Lääketeolliset laboratoriot. Laatu ja pätevyyttä koskevat vaatimukset. SFS-EN 15189. Vahvistettu 2013. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.

MUSTAJOKI, Pertti ja JALANKO, Hannu 2006. Anemia. Julkaisussa: HANNUKSELA, Matti, HUOVINEN, Pentti, HUTTUNEN, Matti, JALANKO Hannu, MUSTAJOKI, Pertti, SAARELMA, Osmo ja TIITINEN, Aila 2006. Terve ihminen - Suomalainen lääkärikirja. Helsinki: WSOY.

MENETELMÄOPETUKSEN TIETOVARANTO 2004. Korrelaatio ja riippuvuusluvut. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2018-04-24]. Saatavissa: <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>

MENETELMÄOPETUKSEN TIETOVARANTO 2008. Regressioanalyysi. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2018-04-29]. Saatavissa: <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/regressio/analyysi.html>

MUTANEN, Marja ja VOUTILAINEN, Eeva 2005. Vitamiinit ja kivennäisaineet. Julkaisussa: ARO, Antti, MUTANEN, Marja ja UUSITUPA, Matti 2005. Ravitsemustiede. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

NORDLAB 2017. POHJOIS-SUOMEN LABORATORIOKESKUKSEN LIIKELAITOSKUNTAYHTYMÄ. B12-vitamiini, transkobalamiini II:een sit., seerumista. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2017-03-25]. Saatavissa: http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1142&terms=s-b12-tc2

NUUTINEN, Hannu 2013. Kroonisen anemian selvittely. Julkaisussa: FÄRKKILÄ, Martti, ISONIEMI, Helena, KAUKINEN, Katri ja PUOLAKKAINEN, Pauli 2013. Gastroenterologia ja hepatologia. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

PAAVOLA, Niko 2017-02-24. KUVA 1. Hypersegmentoituneita neutrofiilejä. [Digikuva].

PAAVOLA, Niko 2017-03-13. KUVA 2. Seerumi-geeliputki. [Digikuva].

PAAVOLA, Niko 2017-02-24. KUVA 4. Architect i1000SR–analysointila. [Digikuva].

PUNNONEN, Kari 2010. Anemiat. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari 2010. Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

SAVOLAINEN, Kari ja PARVIAINEN, Markku 2010. Vitamiinit ja hivenaineet. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari 2010. Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

TAPOLA, Hilka 2004. Näytteiden käsittely ja lähettäminen sekä kuljetus. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY.

TAPOLA, Hilka 2004. Tutkimuspyyntö ja potilaan valmistautuminen tutkimuksiin ja toimenpiteisiin. Julkaisussa: PENTTILÄ, Ilkka 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY.

TUOKKO, Seija, RAUTAJOKI, Anja ja LEHTO, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

VOGIATZOGLU, A., REFSUM, H., JOHNSTON, C., SMITH, S. M., BRADLEY, K. M., DE JAGER, C., BUDGE, M. M. ja SMITH, A. D. 2008. Vitamin B12 status and rate of brain volume loss in community-dwelling elderly. [Verkojulkaisu]. [Viitattu 2017-03-26]. Saatavissa: <http://www.neurology.org/content/71/11/826.abstract>

ÅKERMAN, Kari ja JOKELA, Hannu 2010. Laboratorion perusmenetelmät. Julkaisussa: NIEMELÄ, Onni ja PULKKI, Kari 2010. Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

LIITE 1: MENETELMÄOHJE**B12-VITAMIINI, TRANSKOBALAMIINI II: EEN SITOUTUNUT, SEERUMISTA**

1142 S-B12-TC2

INDIKAATIOT

B12-vitamiinin puutoksen tutkiminen.

MENETELMÄ

Kemiluminesenssiin perustuva immunokemiallinen määrittäminen (CMIA).

NÄYTE

Seerumi-geeliputki 5ml. Seerumi säilyy 3 vrk jääkaapissa, pitempiaikainen säilytys pakastettuna. Hemolyysi häiritsee määrittäystä.

LAITTEISTO

Abbott Architect ci4100

REAGENSIT

Active-B12 Reagent Kit. Reagenssit ovat valmiita käytettäväksi. Säilytys jääkaapissa pystyasennossa. Menetelmä sisältää kaksi reagenssipulloa. Ladattaessa reagenssia analysaattorille, mikropartikkelipullo täytyy ensin sekoittaa ja sen jälkeen molempien reagenssipullojen päälle tulee vaihtaa korkin tilalle septumi. Näin reagenssi säilyy laitteella 30 päivää.

VAKIOINTI

Active-B12 Calibrators: 6 tasoa, vakiointi LOT:n vaihtuessa tai jos kontrollit eivät ole annetuissa rajoissa.

LAADUNVARMISTUS

Active-B12 Controls: tasot L (low) ja H (high).

YLEISTÄ

B12-vitamiini on seerumissa kahteen kantajaproteiiniin sitoutuneena; haptokoriiniin ja transkobalamiiniin. Transkobalamiiniin sitoutunut B12-vitamiini, holotranskobalamiini, on vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto. Seerumin B12-vitamiinista vain 10-30 % on tätä biologisesti aktiivista muotoa. Suurin osa on sitoutuneena metabolisesti inaktiiviseen haptokorriiniin. Aktiivisen B12-vitamiinin määrittäystä suositellaan ensisijaisena tutkimuksena puutostilan selvityksessä.

