



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

VIIDEN JA KYMMENEN MINUUTIN
SENTRIFUGOINNIN VAIKUTUS
PLASMAN TROMBOSYYTTIPITOI-
SUUTEEN

Leena Lahtinen
Pia Sippola

Opinnäytetyö
Toukokuu 2018
Bioanalytiikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

LAHTINEN LEENA & SIPPOLA PIA:

Viiden ja kymmenen minuutin sentrifugoinnin vaikutus plasman trombosyyttipitoisuuteen

Opinnäytetyö 46 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Toukokuu 2018

Sentrifugointi on kliinisen kemian laboratorioissa oleellinen preanalyttinen vaihe. Sentrifugoinnilla verinäytteistä erotellaan veren eri osat toisistaan ja tavoitteena on saada aikaan mahdollisimman vähäsoluinen seerumi tai plasma. Suuri osa kliinisen kemian määrityksistä tehdään seerumista tai plasmasta ja mitä puhtaampia ne ovat, sitä luotettavampia analyysituloksia saadaan.

Tutkimuksen aihe saatiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksiköltä. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, onko mahdollista lyhentää toimintayksikössä käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiaikaa 5 minuuttiin natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia käytettäessä ja siten nopeuttaa näytteiden läpimenoaikoja. Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata 5 ja 10 minuutin ajan sentrifugoitujen verinäytteiden plasmasta eroteltujen pinta-, keski- ja pohjafraktioiden puhtautta mittaamalla niiden trombosyyttipitoisuudet.

Tutkimus toteutettiin kvantitatiivisena- eli määrällisenä tutkimuksena. Kokeellisen osuuden tutkimusmateriaali koostui 160 verinäytteestä, joista 80 oli otettu natriumsitraattiputkeen ja 80 litiumhepariinigeeliputkeen. Molempien putkityyppien näytteistä 40 näytettä sentrifugoituihin 5 minuuttia ja 40 näytettä 10 minuuttia, Thermo Scientific SL 40R-sentrifugilla 2500 g:n suhteellisella sentrifugaalivoimalla. Jokaisen sentrifugoidun näytteen plasma pipetoitiin manuaalisesti kolmeen fraktioon, joista mitattiin trombosyyttipitoisuus Sysmex XE-5000-verenkuvaa-analysaattorilla. Tulokset käsiteltiin IBM SPSS Statistics-analysointiohjelmalla ja Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmalla.

Tuloksista selvisi, että plasman trombosyyttipitoisuudet olivat pääsääntöisesti pienimmät pintafraktioissa ja määrät nousivat pohjafraktiota kohden riippumatta sentrifugointiajasta ja putkityypistä. Molempiin putkityyppisiin jäi trombosyyttejä selvästi enemmän 5 minuutin kuin 10 minuutin sentrifugoinnilla. Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksia tarkasteltaessa, 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnin erot olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä molemmissa putkityypeissä. Tuloksista voitiin vetää se johtopäätös, että verinäytteiden nykyisin käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiaikaa ei voi lyhentää 5 minuuttiin käytettäessä natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia eikä läpimenoaikoja saada näin nopeutettua.

Asiasanat: sentrifugointi, trombosyyttivapaa plasma, läpimenoaika

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

LAHTINEN LEENA & SIPPOLA PIA:

The effect of five and ten minutes centrifugation time on plasma platelet count

Bachelor's thesis 46 pages, appendices 4 pages

May 2018

Centrifugation is an essential pre-analytical step in clinical chemistry laboratories. By centrifugation, blood samples are separated into different blood components. The goal is to achieve as low-cellular serum or plasma as possible. Most of the clinical chemistry assays are made of serum or plasma, and it depends on their purity, how reliable the analytical results will be.

The topic of the study was received from the Clinical Chemistry Unit at Seinäjoki Central Hospital. The aim of the thesis was to research whether it is possible to shorten the 10 minutes centrifugation time in the Clinical Chemistry Unit for 5 minutes using sodium citrate tubes and lithium heparin gel tubes and thereby accelerate sample turnaround times. The purpose of the study was to compare the purity of the surface, middle and bottom fractions separated from the plasma of centrifuged blood samples for 5 and 10 minutes by measuring their platelet count.

The study was carried out as a quantitative study. The experimental part of the study material consisted of 160 blood samples, 80 of which were taken on a sodium citrate tubes and 80 lithium heparin gel tubes. From the samples of both type of tubes, 40 samples were centrifuged for 5 minutes and 40 samples for 10 minutes using a Thermo Scientific SL 40R centrifuge at 2500 g of relative centrifugal force. The plasma of each centrifuged sample was manually pipetted into three fractions of which the platelet count was measured with the Sysmex XE-5000 Blood Analyzer. The results were processed using the IBM SPSS statistical analysis software and the Microsoft Excel spreadsheet program.

The results showed that the plasma platelet count mainly was at its lowest in surface fractions and the amounts ascended towards the bottom fractions, regardless of the centrifugation time and the tube type. It remained significantly more platelets after 5 minutes centrifugation compared with 10 minutes centrifugation in both tube types. The differences between 5 and 10 minutes centrifugation time were statistically very significant in both tube types when focusing on the platelet count in the surface fractions. The findings indicate that it is not valid to shorten the 10 minutes centrifugation time to 5 minutes using sodium citrate tubes and lithium heparin gel tubes. Thereby, the turnaround time cannot be accelerated.

Key words: centrifugation, platelet free plasma, turnaround time

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	VEREN OSAT	7
3	VERINÄYTEPUTKET	9
	3.1 Putkimateriaalit	9
	3.2 Putkien lisäaineet	10
4	SENTRIFUGOINTI	13
	4.1 Verinäytteiden käsittely ennen sentrifugointia	13
	4.2 Sentrifugin toimintaperiaate	14
5	LÄPIMENOAIKA KLIINISESSÄ LABORATORIOSSA	16
6	VERISOLUJEN KONEELLINEN LASKENTA	18
7	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT	20
8	TUTKIMUSMENETELMÄ	21
9	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	23
10	TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	27
	10.1 Fraktioiden trombosyyttipitoisuudet	27
	10.2 Fraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot.....	30
	10.3 Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuudet	31
	10.4 T-testien tulokset.....	33
	10.5 Johtopäätökset.....	34
11	POHDINTA.....	36
	11.1 Tutkimuksen objektiivisuus, eettisyys ja luotettavuus	36
	11.2 Jatkotutkimusaiheet ja opinnäytetyöprosessi	37
	LÄHTEET	40
	LIITTEET	43

1 JOHDANTO

Useimmat verinäytteet, joista tehdään erilaisia tutkimuksia kliinisen kemian laboratorioissa, täytyy sentrifugoida ennen analysointia (Minder ym. 2011, 1). Sentrifugointi on tärkeä preanalyttinen vaihe, jonka tarkoitus on erottaa verisolut ja muut verenosat seerumista tai plasmasta, joista kulloinkin tarvittavien analyyttien määritykset tehdään. Seerumiin tai plasmaan sentrifugoinnin jälkeen mahdollisesti jääneet solut voivat haitata joidenkin analyyttien mittaamista ja siksi on tärkeää, että sentrifugointi onnistuu mahdollisimman hyvin. Esimerkiksi plasmaan jääneet trombosyytit eli verihiutaleet voivat nostaa virheellisesti muun muassa kaliumin tai laktaattidehydrogenaasin pitoisuuksia. (Dimeski, Solano, Petroff & Hynd 2011, 218.) Sentrifugoinnin onnistumiseen vaikuttavat käytettävä suhteellinen sentrifugaalivoima (RCF, relative centrifugal force) eli g-arvo, lämpötila ja sentrifugointiaika (Minder ym. 2011, 1).

Ehdotus opinnäytetyön aiheeksi saatiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksiköstä ja opinnäytetyö tehdään yhteistyössä toimintayksikön kanssa. Toimintayksiköllä on tarve tällaiselle tutkimukselle ja aihe valittiin, koska se on käytännönläheinen ja riippuen tutkimuksesta saatavista tuloksista, niillä on todellista merkitystä laboratorion rutiinikäytäntöihin. Aiheesta on olemassa melko vähän tutkimuksia.

Tällä hetkellä Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä verinäytteet sentrifugoidaan 2500 g:n sentrifugaalivoimalla 10 minuutin ajan 20 °C lämpötilassa. Opinnäytetyössä tarkastellaan, miten sentrifugointiajan muutos 10 minuutista 5 minuuttiin vaikuttaa näytteiden plasman trombosyyttipitoisuuteen natriumsitraattiputkissa ja litiumhepariinigeeliputkissa. Tutkimus rajataan näihin kahteen putkityyppiin, sillä kyseisiä putkia käytetään eniten monien päivittäisten kliinisen kemian analyysien tekemiseen (Kultti, 2017). Sentrifugin lämpötila (20 °C) ja g-arvo (2500 g) pidetään tutkimuksessa koko ajan samoina. Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, saadaanko 5 minuutin sentrifugointiajalla puhdasta plasmaa. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mukaan sentrifugointi on onnistunut ja plasma puhdasta, jos trombosyyttien määrä on pienempi kuin 10 000/μl (Sultan 2010, 234). Tutkimuksessa trombosyyttipitoisuudet mitataan 5 ja 10 minuutin ajan sentrifugoitujen verinäytteiden plasman pinta-, keski- ja pohjafraktoista eli eri kerroksista. Mittauksissa keskitytään trombosyytteihin, koska ne ovat

veren osista pienimpiä ja kevyimpiä, ja on todennäköistä, että ne erottuvat sentrifugoinnissa viimeisinä (Perez ym. 2013, 309). Mikäli sentrifugointiaikaa voitaisiin lyhentää 10 minuutista 5 minuuttiin, se nopeuttaisi näytteiden läpimenoaikoja ja siten myös tulosten valmistuminen sekä potilaiden diagnosointi ja hoidon aloitus nopeutuisivat. Läpimenoaika (TAT, turnaround time) on laboratorion laadun ja palvelun yksi tärkeimmistä mittareista. Se kuvaa aikaa, joka kuluu lääkärin tekemästä laboratoriotutkimuspyynnöstä valmiisiin analyysituloksiin, joiden perusteella lääkäri tekee potilaan hoitopäätöksen. (Hawkins 2007, 179–180.)

2 VEREN OSAT

Verta on ihmisessä 7–8 prosenttia kehon painosta. Verenkierto ylläpitää elimistön koostumusta, aineenvaihduntaa ja sisäistä tasapainoa, lisäksi se turvaa koko elimistön solujen hyvinvoinnin ja solunsisäiset toimintaedellytykset. Veren tehtävänä elimistössä on kuljettaa happea, hiilidioksidia, ravintoaineita, kuona-aineita, rakennusaineita sekä hormoneja ja muita viestiaineita. Veren muita tärkeitä tehtäviä ovat elektrolyyttipitoisuuksien ja osmoottisen paineen säätely sekä happo-emäs-tasapainon säätely ja ylläpito. Veri osallistuu myös immuunipuolustukseen ja lämmön säätelyyn sekä kuljetukseen. (Leppäluoto ym. 2015, 123–124; Sand ym. 2011, 316.)

Veri muodostuu verisoluista ja verisolujen nestemäisestä väliaineesta eli plasmasta. Verisoluja ovat erytrosyytit eli punasolut, leukosyytit eli valkosolut ja trombosyytit eli verihiutaleet. Verisoluista on erytrosyyttejä yli 90 prosenttia ja niiden tehtävä on kuljettaa happea ja hiilidioksidia. Leukosyyttejä ovat neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit, lymfosyytit ja monosyytit ja ne ovat välttämättömiä elimistön puolustusjärjestelmässä. Trombosyytit ovat keskeisessä osassa hemostaasissa eli verenvuodon tyrehtyttämisenä. (Leppäluoto ym. 2015, 124, 132; Sand ym. 2011, 316–317, 325.) Taulukosta 1 nähdään elimistön veren solujen jakauma, esimerkiksi trombosyyttejä on veressä 40–50 kertaa enemmän kuin valkosoluja (Leppäluoto ym. 2015, 127).

Taulukko 1. Veren solumäärät (Leppäluoto ym. 2015, 127, muokattu)

SOLUTYYPPI	MÄÄRÄ	YKSIKKÖ
ERYTROSYYTTI	3,9–5,7	$10^{12}/l$
LEUKOSYYTTI	3,4–8,2	$10^9/l$
TROMBOSYYTTI	150–360	$10^9/l$

Verisuonistossa virratessaan veren solut jakaantuvat tasaisesti plasmaan. Plasma on läpinäkyvää, vaaleakellertävää nestettä, joka koostuu pääosin vedestä ja sisältää veren pääasialliset aineosat. Plasma sisältää vesiliukoisia aineita kuten elektrolyyttejä, ravintoaineita, hormoneita ja rasvoja. Lisäksi plasmassa on noin 7 prosenttia plasmaproteiineja eli valkuaisaineita. Plasmaproteiineja ovat albumiini, globuliinit ja fibrinogeeni. Albumiini on muiden molekyylien kantajaproteiini, johon sitoutuu elimistön aineenvaihduntatuotteet ja sen osuus plasmaproteiineista on noin 60%. Globuliinit muodostavat noin 40 % ja

fibrinogeenit noin 4 % plasmaproteiineista. Plasmaproteiinit osallistuvat veren hyytymiseen, puskuroivat happo-emäs-tasapainoa ja ylläpitävät kolloidiosmoottista painetta. Immunoglobuliinit sitovat bakteereja ja viruksia. Soluaineenvaihdunnassa voidaan hyödyntää plasmaproteiinien osasia eli aminohappoja. Seerumissa eli veriherassa on muuten sama koostumus kuin plasmassa, seerumista puuttuu ainoastaan veren hyytymistekijät ja fibrinogeeni. Kliinisiin laboratoriotutkimuksiin voidaan käyttää joko kokoverta, plasmaa tai seerumia. (Leppäluoto ym. 2015, 123–126; Sand ym. 2011, 316.)

3 VERINÄYTEPUTKET

Yleisimmin käytetyt verinäyteputket ovat vakuumiputkia, jotka ovat kooltaan 75–100 mm pitkiä, 13 mm halkaisijaltaan ja niihin voidaan ottaa 2–10 ml kokoverta (Bowen & Remaley 2014, 32). Vakuumiputkien sisällä on alipaine, joka imee suonesta neulan kautta putkeen automaattisesti ennalta määritellyn määrän verta. Vakuumitekniikan käyttö on turvallista, koska veri liikkuu suljetussa järjestelmässä ja näytteenottajan riski altistua veriroiskeille on vähäinen. (Tuokko 2014, 27.)

3.1 Putkimateriaalit

Vakuuminäyteputket kehitettiin 1940-luvulla, jolloin ne valmistettiin lasista. Nykyisin lähes kaikki käytössä olevat vakuumiputket ovat muovia, joka syrjäytti lasin putkimateriaalina 1990-luvulla. Yleisimmin putkissa käytetyt muovilaadut ovat polyetyleenitereftalaatti (PET) ja polypropeeni (PP) tai näiden kahden muovin yhdistelmät. Korkkien materiaaleina käytetään mm. polyeteeniä, polypropeenia ja butyylikumia. (Bowen & Remaley 2014, 31–33.)

Lasiin verrattuna muoviputket ovat käytössä turvallisempia, koska ne eivät rikkoudu yhtä helposti ja siten vähentävät laboratoriohenkilökunnan altistumista veriroiskeille sekä veressä mahdollisesti oleville taudinaiheuttajille. Lisäksi muoviputket kestävät suurempia sentrifugointinopeuksia, ovat kevyempiä ja niiden hävittäminen on helpompaa ja halvempaa kuin lasiputkien. Toisaalta muoviputket läpäisevät paremmin kaasuja, mikä voi vaikuttaa mitattavien analyyttien pitoisuuksiin. Useissa tutkimuksissa, joissa on verrattu muovi- ja lasiputkilla tehtyjen määritysten tuloksia, on kuitenkin todettu, että kaasunläpäisevyydestä johtuvat erot muovi- ja lasiputkien välillä eivät ole kliinisesti merkittäviä. (Bowen & Remaley 2014, 32–33.)

3.2 Putkien lisäaineet

Näyteputkissa käytetään erilaisia lisäaineita, kuten antikoagulantteja eli hyytymisenestoaineita, hyytymisaktivaattoreita tai veren komponenttien erottelua helpottavia geelejä. Näyteputkien korkit on värikoodattu, minkä perusteella tiedetään, mitä lisäainetta kussakin putkessa on. (Warekois & Robinson 2016, 120).

Tutkittaessa kokoverta tai plasmaa, verinäyte otetaan antikoagulanttia sisältävään näyteputkeen, jolloin näytteen hyytyminen saadaan estettyä. Seerumista tehtäviä määrittäviä varten näyte otetaan lisäaineettomaan putkeen tai hyytymistä nopeuttavaa hyytymisaktivaattoria sisältävään putkeen, ja veren annetaan hyytyä. (Matikainen, Miettinen & Wasström 2016, 78.)

Antikoagulantti on putkissa jauheena, nesteinä tai sumutteina putken sisäseinämissä. Sumutteen etuna on sen hyytymistä estävän vaikutuksen alkaminen jo ennen kuin putkea sekoitetaan. Tämä parantaa näytteiden laatua ja siksi sumutteen käyttö onkin yleistynyt. Jauheen käyttö antikoagulanttina on sen sijaan vähentynyt. Jauhe jää helposti putken korkkiin kiinni aiheuttaen kontaminaatoriskin, sillä näytteenoton yhteydessä jauhe saattaa siirtyä neulan mukana seuraavaan näyteputkeen. Näyte on sekoitettava putkea kääntelemällä välittömästi näytteenoton jälkeen, jotta antikoagulantti sekoittuu kunnolla vereen. (Matikainen ym. 2016, 72, 74.) Sitraatti, hepariini, ja EDTA eli etyleenidiamiinotetraetikkahappo ovat yleisimmät antikoagulantit (Bowen & Remaley 2014, 34).

Käytetty antikoagulantti valitaan tehtävän laboratoriotutkimuksen mukaan. Natriumsitraattia käytetään hyytymisaika- ja laskotutkimuksissa. Sitraattiputkissa oleva natriumsitraatti estää veren hyytymisen sitoutumalla veren kalsiumiin. Hepariinia käytetään useimmiten plasmanäytteissä, kuten kalium-, proteiini- ja kolesterolitutkimuksissa. Hepariinigeeliputkissa oleva litium- tai natriumhepariini estää fibriinin muodostumisen fibrinogeenista ja estää siten veren hyytymisen. Hepariinia on ihmisen elimistössä luonnostaan ja se ei hemolysoi eli hajota erytrosyyttejä, eikä vaikuta näytteen pH-arvoon. EDTA-putket soveltuvat hyvin hematologisiin määrittämiin, joita ovat mm. perusverenkuva ja hemoglobiinimääritys, sillä EDTA säilyttää hyvin verisolujen muodon ja koon. EDTA estää veren hyytymisen sitomalla verestä kalsiumin. Glukoosiputkissa käytetään natriumfluoridia estämään glykolyysiä eli glukoosin hajotusta. Glukoosiputkissa on lisäksi oksalaattia tai EDTA:ta antikoagulanttina. (Matikainen ym. 2016, 78.)

Seerumiputkiin lisätään hyytymisaktivaattoria, joka nopeuttaa veren hyytymistä. Lisäaineettomassa seerumiputkessa hyytyminen kestää noin 60 minuuttia, mutta hyytymisaktivaattoria sisältävässä putkessa veri hyytyy jo 30 minuutissa. Hyytymisaktivaattoreina käytetään usein lasi- tai silikapartikkeleita, jotka lisäävät trombosyyttiaktivaatiota. Partikkelit kiinnitetään yleensä putken sisäpinnalle sumutteena. Näytettä on sekoitettava riittävästi, jotta veri pääsee kosketuksiin aktivaattorin kanssa ja hyytyminen käynnistyy. (Warekois & Robinson 2016, 119, 121.)

Hyytymisaktivaattorina voidaan käyttää myös trombiinia, joka lisää välittömästi veren hyytymistä. Trombiini on entsyymi, joka pilkkoo fibrinogeeniä fibriniiksi. Tutkimuksen tulokset saadaan nopeasti, koska hyytymä muodostuu jo viidessä minuutissa, jonka jälkeen putki voidaan heti sentrifugoida. Trombiini saa aikaan täysin kirkkaan ja fibriinittömän seerumin. Tällaista putkea voidaan käyttää esimerkiksi kiireellisissä päivystysnäytteissä ja potilailla, joilla on antikoagulanttilääkitys. (Warekois & Robinson 2016, 121; BD 2014, 13.)

Verinäyteputkissa voi olla mukana geeli, joka helpottaa veren osien erottelua (Matikainen ym. 2016, 78.) Geelinä käytetään polymeerigeeliä, jonka tiheys on pienempi verrattuna soluihin, mutta suurempi verrattuna plasman ja seerumin tiheyteen. Kun vakuumigeeli-putkessa olevaa näytettä sentrifugoidaan, geelin viskositeetti pienenee ja geeli muuttuu nestemäiseksi. Geeli asettuu putken pohjalla olevan solukerroksen ja putken pinnalla olevan plasman tai seerumin väliin. Sentrifugoinnin jälkeen geeli kovettuu ja muodostaa kerrosten väliin liikkumattoman ja kiinteän esteen, joka pitää veren osat erillään. (Warekois & Robinson 2016, 121; Bush & Cohen 2003, 308–309.)

Geeli estää myös kontaminaatioita eri kerrosten välillä. Esimerkiksi hepariinigeeli-putkissa, joilla määritetään kaliumia, geeli estää erytrosyyteistä vapautuvan kaliumin pääsyn eroteltuun plasmaan. (Warekois & Robinson 2016, 121.) Lisäksi geelillä eroteltua näytettä voidaan analysoida, käsitellä ja säilyttää alkuperäisessä putkessa, ilman erottelua uuteen putkeen. (Bush & Cohen 2003, 308.) Vakuumiputkien geeli saattaa kuitenkin aiheuttaa myös ongelmia analytiikkaan. Jotkut lääkeaineet ja analyytit voivat imeytyä geeliin. Seurauksena niiden konsentraatio pienenee plasmassa tai seerumissa, aiheuttaen virheellisiä analyysituloksia. Erytrosyytit voivat kulkeutua putken pohjalta geeliesteen ohi plas-

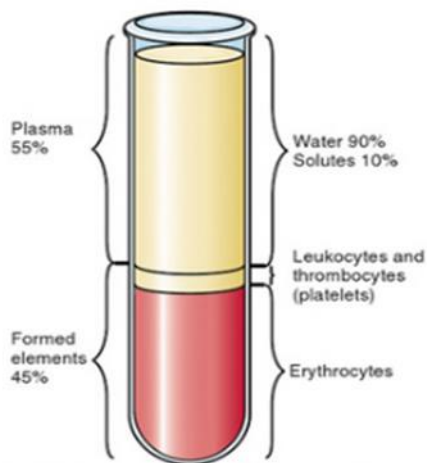
maan tai seerumiin, jos geeli ei ole kiinnittynyt tarpeeksi tiukasti putken seinämiin. Geelistä voi myös irrota palasia tai vapautua jotakin haitallista ainetta, kuten silikoniöljyä, näytteeseen ja nämä voivat vaikuttaa tuloksiin ja häiritä analysaattorin toimintaa. (Bowen & Remaley 2014, 36–37.)

BD:n Vacutainer® Barricor™ plasmaputkessa on sisällä muovista valmistettu mekaaninen erottelija geelin sijaan. Verinäytettä otettaessa erottelija on putken yläosassa sellaisessa asennossa, että veri pääsee virtaamaan erottelijan läpi putkeen. Erottelija muodostuu kahdesta osasta, jotka ovat tiheydeltään erilaisia. Tällä varmistetaan erottelijan asettuminen aina oikeaan asentoon sentrifugoinnin aikana. Toinen osista on elastinen ja se venyy sentrifugoinnin aikana, samalla kun erottelija laskeutuu alemmas putkessa. Erottelijan ja putken sisäseinämien väliin muodostuu avoimet kanavat, jotka pysyvät auki koko sentrifugoinnin ajan. Kanavien kautta suurin osa soluista ehtii kulkeutua plasmasta putken pohjalle. Kanavat sulkeutuvat vasta sentrifugoinnin loppuvaiheessa, kun sentrifugin vauhti hidastuu. Tällöin elastinen osa palautuu takaisin alkuperäiseen muotoonsa ja muodostaa tiiviin esteen plasman ja solukerroksen välille. (BD 2017a; 2017b.)

Barricor-putken avulla saadaan nopeasti puhtaita ja korkealaatuisia plasmanäytteitä. Putkivalmistajan mukaan Barricor-putkelle riittää jopa kolmen minuutin sentrifugointiaika ja 4000 g:n sentrifugaalivoima. Valmistajan sentrifugointisuositukset putkelle vaihtelevat 3–10 minuutin ja 1850–4000 g:n välillä. Lyhyempien sentrifugointiaikojen ansiosta myös näytteiden käsittelyajat lyhenevät ja läpimenoaikoja on mahdollista nopeuttaa. (BD 2017b; 2017c.) Mekaanisen erottelijan ansiosta Barricor-putkella saadaan puhtaampaa plasmaa verrattuna plasmageeliputkeen. Barricor-putken plasmaan jää sentrifugoinnin jälkeen 55 % vähemmän trombosyyttejä kuin BD:n plasmageeliputkeen. Barricor-putken erottelijasta ei irtoa yhtä helposti artefaktoja plasmaan kuin geelistä. (BD 2017d.) Lisäksi erottelija on päällystetty aineella, joka estää solujen tarttumisen erottelijan pintaan ja analyttien imeytymisen erottelijan sisään (BD 2017b).

4 SENTRIFUGOINTI

Laboratorioanalyysyjä tehdään kokoverestä, plasmasta ja seerumista. Verinäytteet käsitellään näytteenoton jälkeen kunkin näytetyypin vaatimalla tavalla. (Matikainen ym. 2016, 81.) Kun määrittäminen tehdään kokoverestä, näytettä ei tarvitse esikäsitellä ennen analysointia. Suurin osa analytiikasta tehdään kuitenkin plasmasta tai seerumista, jotka erotetaan kokoverestä sentrifugoimalla. (Åkerman 2014, 79.) Kun veri sentrifugoidaan näyteputkessa, siitä erottuvat veren eri osat kuvan 1 mukaisesti (Warekois & Robinson 2016, 103).



KUVA 1. Veren koostumus (Warekois & Robinson 2016, 103)

4.1 Verinäytteiden käsittely ennen sentrifugointia

Seeruminäytettä seisotetaan ennen sentrifugointia, kunnes putkeen muodostuu hyytymä. Hyytymisen on tapahduttava täydellisesti, koska huonosti hyytynyt näyte jatkaa hyytymistä vielä sentrifugoinnin jälkeenkin, mikä häiritsee näytteen analysointia. Huoneenlämpöinen näyte hyytyy 30–60 minuutissa. Viileät näytteet ja hyytymishäiriöistä kärsivien sekä antikoagulanttihoitoa saavien potilaiden näytteet hyytyvät tätä hitaammin. Sentrifugoinnin aikana punasoluhyytymä painuu putken pohjalle, hyytymän päälle jää ohut valkosolukerros ja päällimmäisenä putkessa erottuu seerumi. Plasmanäytteet otetaan antikoagulanttia sisältäviin putkiin ja ne voidaan sentrifugoida heti näytteenoton jälkeen, jolloin putken pohjalle jää kerros irrallisia verisoluja ja niiden yläpuolelle plasma. Trombosyytit erottuvat sentrifugoinnissa viimeisinä valkosolujen päälle, koska ne ovat pieniä

ja kevyitä soluja. (Matikainen ym. 2016, 81; Guder ym. 2009, 44; Perez ym. 2013, 309; Warekois & Robinson 2016, 238.)

Verinäytteet suositellaan sentrifugoitavan viimeistään kahden tunnin kuluttua näytteenotosta. Mitattavan analyysin säilyvyydestä riippuu, miten nopeasti näyte on eroteltava. (Warekois & Robinson 2016, 263.) Suurin osa näytteistä sentrifugoidaan huoneenlämpöisinä, mutta osa näytteistä säilyy vain kylmässä ja ne täytyy sentrifugoida 4 °C:ssa (Matikainen ym. 2016, 81). Näyteputkia ei voi säilyttää liian kauan sentrifugoimatta, koska solujen aineenvaihdunta jatkuu putkessa näytteenoton jälkeenkin. Tällöin aineita siirtyy soluista plasmaan tai seerumiin ja päinvastoin. Tämän seurauksena esimerkiksi kaliumin ja laktaattidehydrogenaasin pitoisuudet näytteessä voivat nousta virheellisen korkeiksi tai näytteen glukoosipitoisuus voi laskea virheellisen matalaksi. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 114; Warekois & Robinson 2016, 263.)

4.2 Sentrifugin toimintaperiaate

Sentrifugia käytetään verinäytteiden esikäsittelyyn. Laitteen avulla erotellaan verinäytteiden solut plasmasta tai seerumista. Verinäyteputket laitetaan sentrifugin pyörivään roottoriin, jota pyöritetään suurella kierrosnopeudella (rpm, revolutions per minute). Tavallisissa sentrifugeissa roottorin pyörimisnopeus on 1800–4000 kierrosta minuutissa. Tiheydeltään suurimmat eli raskaimmat partikkelit painuvat putken pohjalle keskipakoisvoiman vaikutuksesta ja plasma tai seerumi jää solukerroksen päälle. (Turgeon 2016, 145; Hänninen, Ruismäki, Seikola & Slöör 2007, 101.) Tätä partikkeleihin kohdistuvaa voimaa kutsutaan suhteelliseksi sentrifugaalivoimaksi (RCF, relative centrifugal force). RCF ilmaistaan g-arvona, joka kuvaa sentrifugin tehokkuutta. Arvo ilmaisee, kuinka moninkertainen nesteen kiihtyvyys on maan vetovoiman aiheuttamaan kiihtyvyyteen verrattuna. Esimerkiksi 500 g tarkoittaa sitä, että nesteen kiihtyvyys näyteputkessa on 500 kertaa suurempi kuin maan vetovoima. Kun tiedetään roottorin säde ja sentrifugin kierrosnopeus, g-arvo voidaan laskea. Roottorin säde mitataan sentrifugin keskiakselin keskipohdasta näyteputken pohjaan, putken ollessa vaakatasossa roottorissa. (Majekodunmi 2015, 67–68.) Arvo lasketaan seuraavalla kaavalla, jossa n = kierrosnopeus (rpm) ja r = roottorin säde (m):

$$g = 0,001117 \times n^2 \times r$$

Kierrosnopeudet ovat kuitenkin sentrifugikohtaisia ja ne eivät ole keskenään vertailukelpoisia erikokoisilla sentrifugeilla. Mitä suurempia pyörimisnopeus ja roottorin koko ovat, sitä tehokkaammin erottuminen tapahtuu. Tämän takia g-arvo on käyttökelpoisempi parametri kuvaamaan sentrifugin tehokkuutta. (Hänninen ym. 2007, 101.) Åkermanin ja Anttilan (2017) mukaan kierrosnopeus voidaan tarvittaessa laskea seuraavalla kaavalla, jossa RCF = suhteellinen sentrifugaalivoima eli g-arvo ja r = roottorin säde (mm):

$$\mathbf{rpm} = \sqrt{\frac{\mathbf{RCF}}{\mathbf{r \times 1,118}}} \times \mathbf{1000}$$

Putkivalmistajat antavat omat suosituksensa kunkin putkityypin sentrifugointiarvoiksi. Yleensä sentrifugoinnin ohjeellisiksi g-arvoiksi suositellaan 1000–2500 g:tä, lämpötilaksi 20–24 °C ja sentrifugointiajaksi 5–15 minuuttia. Tavoitteena on, että solut erottuvat mahdollisimman hyvin plasmasta ja seerumista. (Åkerman 2014, 80.) Mikäli esimerkiksi plasmaan jää sentrifugoinnin jälkeen trombosyyttejä, voivat kaliumin, laktaattidehydrogenaasin, happaman fosfaatin ja epäorgaanisen fosfaatin pitoisuudet näytteessä nousta virheellisesti (Guder, Narayanan, Wisser & Zawta 2009, 44).

Tutkimuksessaan Minder ym. (2011) kyseenalaistivat World Health Organization (WHO) suosituksen 15 minuutin sentrifugointiajasta, joka ei heidän mielestään perustu tieteellisiin tutkimuksiin. Tutkimuksessa verrattiin erilaisia sentrifugointiaikoja ja tehtiin kliinisen kemian ja immunologian määrittäviä tavoitteena tutkia eroavatko tulokset merkittävästi toisistaan. Tutkimuksessa oli mukana 74 parametria ja näytteitä 44 potilaasta. Käytössä oli Rotixa 50 RS Hettich sentrifugi ja Roche Cobas 6000 analysaattori sekä Greiner Bio-Onen kaksi erilaisilla erottimilla varustettua litiumhepariinigeeliputkea. Näytteitä sentrifugoitii 2180 g:lla 10 ja 15 minuutin ajan ja 1870 g:lla 7 minuutin ajan. Raportissa eri sentrifugointiajat eivät tuoneet tuloksiin merkittäviä eroja, vain 3,6 prosenttia tilastollisista testituloksista jäi $p < 0,05$: n merkitsevyydellä ulkopuolelle. Raportissa esiteltiin, että 7 tai 10 minuutin sentrifugointiaika antoi samanlaiset testitulokset verrattuna WHO:n suosittelemaan 2000–3000 g:n sentrifugaalivoimaan ja 15 minuutin sentrifugointiaikaan (WHO 2002, 10).

5 LÄPIMENOAIKA KLIINISESSÄ LABORATORIOSSA

Analysoitavien näytteiden läpimenoaika (TAT, turnaround time) on kliinisissä laboratorioissa laadun ja laboratorion tehokkuuden mittari. Kokonaisläpimenoaikaan (total TAT) voidaan määritellä kuuluvaksi yhdeksän vaihetta, jotka ovat tutkimuspyynnön tekeminen, näytteenotto, näytteen identifiointi, kuljetus laboratorioon, esikäsittely (esim. sentrifugointi ja näytteen erottelu), näytteen analysointi, tulosten varmistaminen ja raportointi tilaavalle lääkärille, tulosten tulkinta ja tulosten perusteella tehtävät hoitopäätökset. (Stotler & Kratz 2012, 724; Goswami, Singh, Chawla, Gupta & Mallika 2010, 376–377.)

Läpimenoaika voidaan jaotella preanalyyttiseen, analyttiseen ja postanalyttiseen vaiheeseen näytteenkäsittelyn eri vaiheiden perusteella (Goswami ym 2010, 377). Preanalyttisiä vaiheita ovat kaikki ennen näytteen varsinaista analysointia tapahtuvat vaiheet, ja postanalyttiset vaiheet puolestaan tapahtuvat analysoinnin jälkeen (Matikainen ym. 2016, 12). Pre- ja postanalyttiset vaiheet muodostavat noin 75 % kokonaisläpimenoajasta. Laboratoriot eivät kuitenkaan täysin pysty kontrolloimaan kaikkia laboratorion ulkopuolella tapahtuvia pre- ja postanalyttisiä vaiheita, esimerkiksi kuljetuksiin kuluva aikaa. Tällaiset ei-analyttiset viivästyksset voivat muodostaa jopa 96 % kokonaisläpimenoajasta. Siksi laboratorioden on toisaalta mahdotonta käyttää kokonaisläpimenoaikkaa luotettavana laboratorion laadunvarmistuksen mittarina. Laboratoriot ilmoittavatkin usein näytteen läpimenoajaksi sen ajan, joka kuluu laboratorioissa näytteen tietojärjestelmään kirjaamisesta valmiin tuloksen vastaanamiseen. Tällöin läpimenoajan määrittely perustuu niihin näytteen käsittelyn vaiheisiin, joita laboratorio pystyy itse luotettavasti kontrolloimaan. Lääkärit puolestaan pitävät yleisesti läpimenoaikana näytteen tilaamisen ja tulosten raportoinnin välistä aikaa. (Goswami ym. 2010, 376; Stotler & Kratz 2012, 724–725.)

Läpimenoaika on tärkeä ja havaittavissa oleva osa laboratorion palvelua ja monet lääkärit pitävät läpimenoaikkaa tärkeimpänä laboratorion toiminnan mittarina (Hawkins 2007, 179). Lääkärit haluavat analyysien tulokset nopeasti, jotta potilaalle saadaan diagnoosi mahdollisimman varhaisessa vaiheessa, pystytään päättämään potilaan hoidosta ja voidaan tehdä kotiutus päätöksiä päivystyksestä tai osastolta. Mahdollisimman nopealla läpimenoajalla ja toiminnan tehostamisella sairaalat tavoittelevat myös kustannussäästöjä. Läpimenoaikojen mittaaminen ja nopeuttaminen ovat yksi oleellinen osa laboratorioden

laadun hallintaa, minkä avulla pyritään parempaan asiakas- sekä potilastyytyväisyyteen. (Goswami ym 2010, 376.)

Kao, Shu ja Yen (2010) tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia laboratorion läpimenoajan nopeuttamista. Työssä tutkittiin 4000 g:n, 5000 g:n, 6000 g:n, 7000 g:n ja 8000 g:n suhteellisen sentrifugaalivoiman vaikutusta hyytymistutkimuksiin, kun sentrifugointiaika oli 1 minuutti. Referenssinä toimivat näytteet, joita sentrifugoitii 15 minuuttia 1500 g:n voimalla. Tutkimuksessa käytettiin Greiner Vacuetten 2 ml:n natriumsitraattiputkia ja sentrifugointiin käytettiin KUBOTA 3700 sentrifugia, referenssilaitteena oli KUBOTA 5420 pöytäseentrifugi. Tutkimuksessa mitattiin sentrifugoidun supernatantin eli plasman trombositipitoisuus ja verrattiin lisäksi hyytymistutkimusten tuloksia. CLSI:n (Clinical and Laboratory Standards Institute) mukaan trombositivapaassa plasmassa verihutalemäärä jää alle 10 000/ μ l ja he suosittelevat tämän saavuttamiseksi 15 minuutin sentrifugointia 1500 g:n suhteellisella sentrifugaalivoimalla. Tutkimusraportissa todettiin, että 1 minuutin sentrifugointi 7000 g:n voimalla riitti trombositivapaan plasman aikaansaamiseksi. Tutkimus osoitti, ettei merkittäviä eroja löytynyt määritysten tuloksissa referenssimenetelmään verrattuna, lisäksi läpimenoaika nopeutui 14 minuuttia.

Toisin kuin edellisessä tutkimuksessa, Holland ja Dombourian (2012) käyttivät tutkimuksessaan automatisoitua näytteen käsittelyjärjestelmää manuaalimenetelmän sijaan. Käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiajan ja 1600 g:n sentrifugaalivoiman yhdistelmää verrattiin 4 minuutin sentrifugointiaikaan ja 1900 g:n sentrifugaalivoimaan. Tutkimuksessa testattiin ajan vaikutusta kemian määritysten tuloksiin ja laboratorion läpimenoaikaan. Kaksi paria laskimoverinäytteitä kerättiin 20 terveestä vapaaehtoisesta BD Vacutainerin seerumigeeliputkiin ja litiumhepariinigeeliputkiin. Seerumigeeliputken annettiin hyytyä 30 minuuttia ennen käsittelyä. 10 minuutin sentrifugointi suoritettiin käyttämällä Drucker 642 VES pöytäseentrifugia ja suhteellista sentrifugaalivoimaa 1600 g. 4 minuutin sentrifugointi suoritettiin Beckman Coulterin automaatiolinjaston näytteenkäsittelyjärjestelmällä ja 1900 g:n sentrifugaalivoimalla. Sentrifugointiajan lyhentäminen 4 minuuttiin ei vaikuttanut merkittävästi tulosten tilastolliseen tarkkuuteen, keskimääräisen prosentuaalisen eron ollessa kaikilla analyyteillä alle 3%. Vaikutus oli merkittävä läpimenoaikaan, joka nopeutui jopa 10 minuuttia. Ottaen huomioon putkivalmistajien hyvinkin erilaiset suositukset sentrifugointiolosuhteista, johtuen mm. näyteputkien lisäaineiden erilaisista kemiallisista koostumuksista, tulokset eivät välttämättä ole yleistettävissä eri valmistajien näyteputkille.

6 VERISOLUJEN KONEELLINEN LASKENTA

Verenkuva-analysointia käytetään normaalisti koneelliseen erytrosyyttien, leukosyyttien ja trombosyyttien laskentaan sekä hemoglobiinipitoisuuden mittaamiseen kokove-
restä (Savolainen 2014, 70). Tässä opinnäytetyössä keskitytään mittaamaan ja tutkimaan lähinnä plasman trombosyyttien määrää. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden mittauksissa käytettiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorion Sysmex XE-5000-verenkuva-analysointia (kuva 2). Laitteen toiminta perustuu radiotaajuuteen, sähköiseen impedanssiin ja optisen valonsironnan mittaamiseen sekä fluoresenssivirtaus-
sytometriaan (Savolainen, Pelliniemi & Koski 2014, 87).



KUVA 2. Sysmex XE-5000 (Kuva: Sippola 2017)

Mittausmenetelmässä, joka perustuu sähköiseen impedanssiin, näyte laimennetaan ensin elektrolyyttiliuokseen. Liuos on hyvä sähkönjohte, päinvastoin kuin solut. Elektrolyyttiliuos soluineen kulkee pienen mitta-aukon läpi, jossa kahden elektrodin välillä on sähkövirta. Solut synnyttävät elektrodien välillä läpi kulkiessaan hetkellisiä vastuksen muutoksia, jotka muodostavat laskettavia pulsseja. Näistä pulsseista saadaan selville partikkelien määrä ja solun koko, joka on verrannollinen pulssin korkeuteen. Menetelmän käyttäessä virtausytometriaa ja optista valonsirontaa, virtauskammiossa paineistetussa vaippanesteessä virtaaviin soluihin kohdistetaan laservalonsäde, jonka valo siroaa kaikkiin suuntiin

sen osuessa soluun. Siroavaa valoa mitataan kahdesta eri suunnasta, valodetektorit keräävät eri suuntien sironnat ja sironnatiiedot muunnetaan dataksi. Sivusironta kertoo solujen granulaarisuudesta, tumien monimuotoisuudesta ja tuma-sytoplasmasuhteesta ja eteenpäin siroava valo kertoo solujen koosta. Näiden tietojen perusteella solut voidaan tunnistaa. Solujen tunnistamista voidaan parantaa fluoresoivalla väriaineella, joka sitoutuu solujen nukleiinihappoihin. (Kurvinen 2017; Savolainen 2014, 71; Savolainen, Pellinniemi & Koski 2014, 87.)

Sysmex XE-5000-verenkuva-analysaattori mittaa leukosyytit WBC/BASO-kanavalla ja hemoglobiini mitataan fotometrisesti. Erytrosyytit, trombositit ja hematokriitti mitataan punasolukanavalla sähköisen impedanssin avulla. Ns. optiset trombositit voidaan myös laskea retikulosyyttikanavalla virtausytometriä ja optisen valonsironnan avulla. Tällöin solut värjätään ja tunnistetaan eteenpäin sironneen valon ja sivulle heijastuneen fluoresenssivalon perusteella. Lopuksi verenkuva-analysaattorin eri kanavilta saadut tulokset yhdistetään ja ne siirtyvät tietokoneelle IPU-ohjelmiston potilastulosvalikkoon. (Åkerman 2015.)

7 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT

Opinnäytetyön tavoite on tutkia, onko verinäytteiden läpimenoaikojen nopeuttamiseksi mahdollista lyhentää Seinäjoen klinisen kemian toimintayksikössä nykyisin käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiaikaa 5 minuuttiin käytettäessä natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia. Sentrifugointiajan muutos 5 minuuttiin hyödyttäisi laboratoriota, lääkäreitä ja ennen kaikkea potilaita. Laboratoriotulosten vastausnopeus parantuisi, lääkärit saisivat tulokset nopeammin käyttöönsä ja potilaat saisivat diagnoosin ja hoidon nopeammin.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, saadaanko 5 minuutin sentrifugoinnilla trombosyyttivapaa plasmaa. Tämä saadaan selville vertaamalla 5 ja 10 minuutin ajan sentrifugoitujen verinäytteiden plasmasta eroteltujen pinta-, keski- ja pohjafraktioiden trombosyyttipitoisuudet natriumsitraattiputkissa ja litiumhepariinigeeliputkissa.

Tutkimusongelmat:

1. Saavutetaanko natriumsitraattiputkien ja litiumhepariinigeeliputkien eri fraktioissa trombosyyttivapaa plasma 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnilla?
2. Onko natriumsitraattiputkien ja litiumhepariinigeeliputkien plasman kolmessa eri fraktiossa merkitseviä eroja trombosyyttipitoisuudessa 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnilla?
3. Voidaanko 10 minuutin sentrifugointiaika lyhentää 5 minuuttiin käytettäessä natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia?

8 TUTKIMUSMENETELMÄ

Tässä opinnäytetyössä käytetään kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusmenetelmää. Määrällisen tutkimuksen on tarkoitus tuottaa perusteltua, luotettavaa ja yleistettävää tietoa (Kananen 2008, 10). Määrällisessä tutkimusmenetelmässä aineistoa kuvataan numeerisesti ja etsitään eri ominaisuuksien välisiä riippuvuuksia. Tutkimuksen tuloksia kuvataan esimerkiksi erilaisilla tunnusluvuilla ja grafiikalla. (Heikkilä 2014, 13, 15, 85, 192.) Menetelmä sopii tähän tutkimukseen erinomaisesti sen kokeellisen, numeerisen ja riippuvuuksia selvittävän luonteen vuoksi.

Määrällinen tutkimus pyrkii etsimään säännönmukaisuuksia aineistosta järjestelmällisen tutkimustyön synnyttämien teoreettisten käsitteiden avulla. Teoria tarkoittaa tutkittavan asian sisältämiä lakeja ja lainalaisuuksia. Määrällinen tutkimus pohjautuu aina teoriaan ja mitattavat asiat muodostetaan useimmiten teorian pohjalta. Tutkimuksen rakenteellinen kulku etenee teorian pohjalta käytännön tutkimuksen suorittamiseen. Ja käytännön toiminnan jälkeen polku johtaa analyysin, tulosten ja tulkinnan kautta takaisin teoriaan. (Vilka 2007, 18, 25–26.)

Määrälliselle tutkimusmenetelmälle on ominaista muuttujien, eli erilaisilla mittavälineillä mitattavissa olevien ominaisuuksien, välisten suhteiden ja erojen tutkiminen. Määrällisessä tutkimuksessa mittaaminen on erojen tekemistä havaintoyksiköiden välille ja näitten erojen määrittelyä erilaisilla symboleilla. Tutkimusaineistosta pyritään löytämään syy-seuraussuhteita ja löytämään ne lainalaisuudet, joilla nämä suhteet selitetään. (Vilka 2007, 13–16, 23.) Tässä tutkimusraportissa avataan ja tulkitaan numeeriset tiedot sanallisesti kuvaamalla muuttujien riippuvuuksia toisiinsa nähden.

Määrällinen tutkimus erotellaan eri tutkimustyyppihin. Määrällisen tutkimuksen tarkoitus on joko selittää, kuvata, kartoittaa, vertailla tai ennustaa. (Vilka 2007, 19.) Tämä opinnäytetyö kuuluu tutkimustyyppiltään lähinnä vertailevaan tutkimukseen. Vertailevassa tutkimuksessa yritetään tutkimuskohteen avulla ymmärtää peremmin tutkittavaa asiaa ja tuoda esiin mahdollisia eroja (Vilka 2007, 21).

Tässä opinnäytetyössä käytettiin IBM SPSS Statistics analysointiohjelmaa sekä Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmaa. Tutkimuksesta saatua numeerista dataa analysoitiin

kuvaajien ja taulukoiden kautta sekä prosenttivertailujen ja T-testien avulla. Opinnäytetyössä käytetty T-testi on keskiarvotesti, jossa testataan, poikkeavatko kahden muuttujan keskiarvot toisistaan ja mitataan näitten erojen merkitsevyyttä. T-testin edellytyksenä on normaalisti jakautuneet muuttujat, mutta vähintään 30 ryhmässä ei normaalijakautuneisuutta ole välttämätön tutkia. Normaalijakaumassa eli Gaussin käyrällä suurin osa arvoista sijaitsee keskiarvon läheisyydessä ja symmetrisesti keskiarvon molemmilla puolilla. Testissä saadaan selville tilastollinen merkitsevyytaso Sig (significance), jota kutsutaan myös p-arvoksi. (Heikkilä 2014, 99, 184–185, 211.) Tässä opinnäytetyössä käytettiin merkitsevyytason rajana p-arvoa 0,05. Taulukossa 2 kerrotaan p-arvon tulkinnasta (Karjalainen 2010, 221).

TAULUKKO 2. p-arvon tulkinta (Karjalainen 2010, 221, muokattu)

$p \leq 0,001$	Tilastollisesti erittäin merkitsevä
$0,001 < p \leq 0,01$	Tilastollisesti merkitsevä
$0,01 < p \leq 0,05$	Tilastollisesti melkein merkitsevä
$0,05 < p \leq 0,10$	Tilastollisesti suuntaa antava
$p > 0,05$	Ei ole tilastollisesti merkitsevä

T-testin käyttö edellyttää ryhmien välistä riippumattomuutta ja tällöin käytetään riippumattomien otosten t-testiä (Independent Samples Tests). Jos ryhmien välillä on kuitenkin selvä yhteys eikä riippumattomuus toteudu, käytetään riippuvien otosten t-testiä (Paired-Samples T Test). (Heikkilä 2014, 209–210.) Tässä opinnäytetyössä käytetyissä T-testeissä verrattiin saman henkilön eri näytteitä keskenään, eli testiryhmät olivat toisistaan riippuvia. Tällä perusteella valitsimme analysointiin toisistaan riippuvien parien t-testin (Paired-Samples T Test).

9 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyön aihe valittiin huhtikuussa 2017. Heti sen jälkeen aloitettiin teoria-aineiston keruu ja kirjoitettiin opinnäytetyösuunnitelma. Käytännön tutkimukseen tekoon päästiin syksyllä ja verinäytteet tutkimusta varten kerättiin 8.–11.8.2017 Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin Seinäjoen keskussairaalan Y-laboratorion asiakkailta. Jokaiselta asiakkaalta kysyttiin suullinen lupa näytteenottoon.

Verinäyteputkien keruu tapahtui normaalin verinäytteenoton yhteydessä laboratoriohoitajien toimesta. Jokaiselta luvan antaneelta asiakkaalta otettiin joko 2 ylimääräistä natriumsitraattiputkea (SPA-P) tai 2 ylimääräistä litiumhepariinigeeliputkea (Hep-Gel). Käytössä oli BD Vacutainerin® sinikorkkiset hyytymistutkimusputket (natriumsitraatti) sekä vaaleanvihreäkorkkiset plasmageeliputket (PST II) (kuva 3).



KUVA 3. BD Vacutainer® natriumsitraattiputki ja litiumhepariinigeeliputki (Kuva: Lahinen 2018)

BD Vacutainerin® sitraattiputkia käytetään laajalti hyytymistutkimuksissa ja niissä on antikoagulanttina puskuroitua natriumsitraattiliuosta. Plasmageeliputkia puolestaan käytetään useisiin kliinisen kemian määrittelyihin. Lisäaineena niissä on erottelun parantamiseksi akryylipohjaista geeliä sekä putken seinämässä kuivasumutteena litiumhepariinia, joka estää näytteen hyytymisen. Molemmat putket on valmistettu polyeteenitereftalaatista (PET). Lisäksi natriumsitraattiputkessa on polypropeenista (PP) valmistettu sisäputki, joka estää natriumsitraattiliuoksen haihtumista eli pitää nestemäisen antikoagulantin määrän ja konsentraation pidempään oikeana. (BD 2014, 15, 18–19; Bowen & Remaley 2014, 33.) Tutkimukseen valittiin mukaan nimenomaan nämä kaksi putkityyppiä,

koska näitä putkityyppejä käytetään eniten moniin päivittäisiin tutkimuksiin kliinisen kemian laboratoriossa (Kultti, 2017).

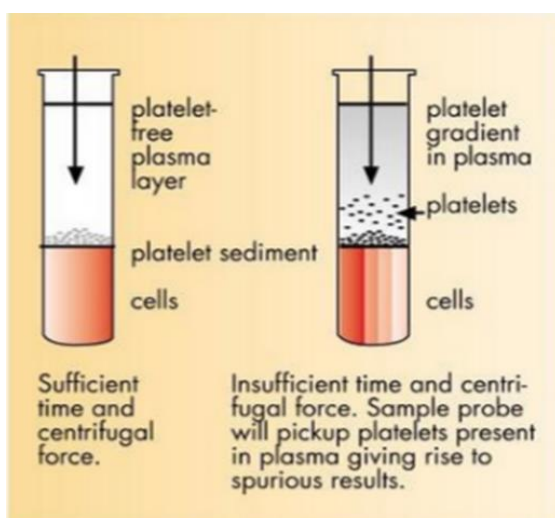
Tarvittavat näytteet kerättiin neljänä peräkkäisenä aamupäivänä siten, että kahtena ensimmäisenä päivänä kerättiin kaikki natriumsitraattiputket ja kahtena jälkimmäisenä kaikki litiumhepariinigeeliputket. Jokaisena näytteenottopäivänä otettiin näytteet 20 asiakkaalta eli näytemateriaalia kertyi 40 näyteputkea per päivä. Tähän otoskokoon päädyttiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön kemistien pohdinnan tuloksena. Tutkimusta varten tarvittiin kaikkiaan 80 natriumsitraattiputkea ja 80 litiumhepariinigeeliputkea eli näytteitä kerättiin yhteensä 160 putken aineisto. Kunkin päivän näytteet kerättiin puoleenpäivään mennessä ja putket sentrifugoitiin Thermo Scientific SL 40R-sentrifugilla (kuva 4) 20 °C:ssa 2500 g:n suhteellisella sentrifugaalivoimalla. Kummastakin putkityypistä toista putkea sentrifugoitiin 5 minuutin ajan, ja toista putkea sentrifugoitiin samalla suhteellisella sentrifugaalivoimalla 10 minuutin ajan. Tutkimuksen vaiheet sentrifugoinnista lähtien suoritettiin opinnäytetyön tekijöiden toimesta. Sentrifugoitujen näytteiden plasma pipetoitiin manuaalisesti ja erotettiin silmämääräisesti kolmeen eri fraktioon, pinta-, keski- ja pohjafraktioon. Näyteputket sekoitettiin varovasti kääntelemällä ja ajettiin Sysmex XE-5000 verenkuvaa-analysointilaitteella manuaalisesti. Jokaisen putken jokaisesta fraktiosta mitattiin solupitoisuudet. Erotelluista fraktioista mitattiin perusverenkuvaa ja trombosyytit. Tutkimuksen parametreina ovat leukosyytit, erytrosyytit, trombosyytit, hemoglobiini ja hematokriitti.



KUVA 4. Thermo Scientific SL 40R-sentrifugi (Kuva: Lahtinen & Sippola 2018)

Käytännön tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, jääkö 5 minuutin sentrifugoinnilla plasmaan enemmän soluja kuin 10 minuutin sentrifugoinnilla, ja saavutetaanko 5 minuutin sentrifugoinnilla kuvan 5 mukainen soluton ja trombosyyttivapaa plasma (Guder ym.

2009, 45). Korkealaatuinen, hyvin verisoluista erottunut plasma ei sisällä verisoluja, solujen jäänteitä tai mikrohyytymiä (Dimeski ym. 2011, 218).



KUVA 5. Vasemmalla trombosyyttivapaata plasmaa ja oikealla plasmaan on jäänyt trombosyyttejä sentrifugoinnista huolimatta (Guder ym. 2009, 45)

Mittaamalla fraktioiden solupitoisuudet selvitettiin, miten hyvin erottelu on onnistunut plasman eri kerroksissa. Opinnäytetyö on perustutkimus ja se rajattiin koskemaan fraktioiden solupitoisuutta, koska tästä näkökulmasta tutkimuksia ei ole juurikaan tehty. Käytännössä tutkimuksessa keskityttiin tarkastelemaan ensisijaisesti fraktioiden trombosyyttipitoisuuksia, koska trombosyytit pieninä ja kevyinä soluina erottuvat sentrifugoinnissa viimeisinä. On siis todennäköistä, että mikäli plasmaan jää soluja, ne ovat pääasiassa trombosyyttejä. (Perez ym. 2013, 309.) Lisäksi tutkimuksessa kiinnitettiin erityistä huomiota pintafraktioiden trombosyyttiarvoihin. Plasma voidaan erotella sentrifugoinnin jälkeen uusiin putkiin ennen analysointia, mutta suurin osa analyyteistä mitataan kuitenkin suoraan primääriputken plasmasta geelin tai solujen päältä. Tällöin analysaattori pipetoi näytteen nimenomaan plasman pintafraktiosta ja siksi juuri pintafraktion trombosyyttipitoisuus on merkityksellisin. (Kultti 2018.)

Kerätyn tutkimusaineiston käsittelyyn käytettiin IBM SPSS Statistics-analysointiohjelmaa ja Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmaa. Analysoinnissa verrattiin 5 ja 10 minuutin sentrifugointiajan vaikutusta molempien putkityyppien fraktioiden trombosyyttimääriin. Lisäksi verrattiin eri fraktioiden trombosyyttimäärien suhdetta toisiinsa, suoritettiin prosenttivertailuja ja keskiarvotestejä. Plasman pintafraktiosta mitattiin viiden ja kymmenen minuutin sentrifugoinnin jälkeisen trombosyyttimäärien ero ja testattiin eron

tilastollisen merkitsevyys t-testillä. T-testi tehtiin erikseen natriumsitraattiputkella ja li-tiumhepariinigeeliputkella. Käytännössä verrattiin keskenään näytteiden trombosyyttimäärien keskiarvoja pintafraktiossa.

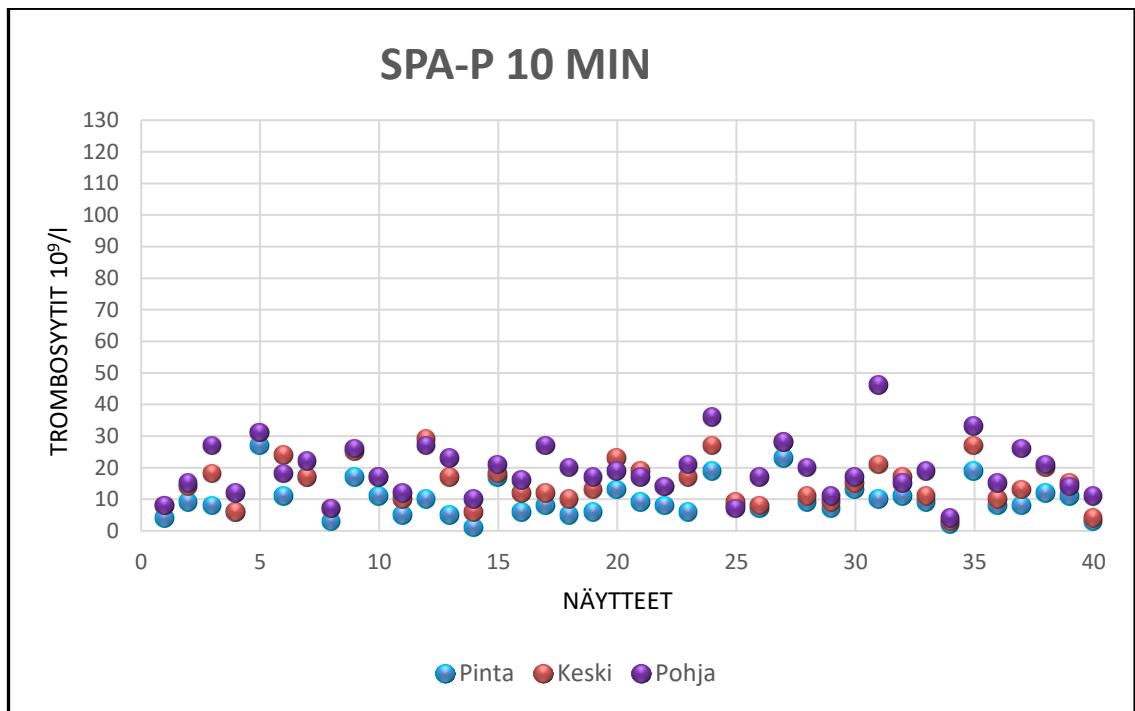
10 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Erytrosyytit ja leukosyytit erottuivat sentrifugoinnissa hyvin. Kaikki erytrosyytit erottuivat plasmasta putken pohjalle, erytrosyyttien määrän ollessa 0 koko aineistossa. Plasman korkein leukosyyttitulos oli $0,23 \times 10^9/l$ litiumhepariinigeeliputken pohjafraktiossa 10 minuutin sentrifugoinnilla. Hemoglobiiniarvot vaihtelivat arvojen 0–2 g/l välillä, 0 oli kuitenkin yleisin tulos. Hematokriittiarvo oli 0 kaikissa tutkituissa näytteissä. Tutkimustuloksissa keskitytään ainoastaan mitattuihin absoluuttisiin trombosyyttipitoisuuksiin sekä keskiarvoihin (näytteittäin ja fraktioittain).

10.1 Fraktioiden trombosyyttipitoisuudet

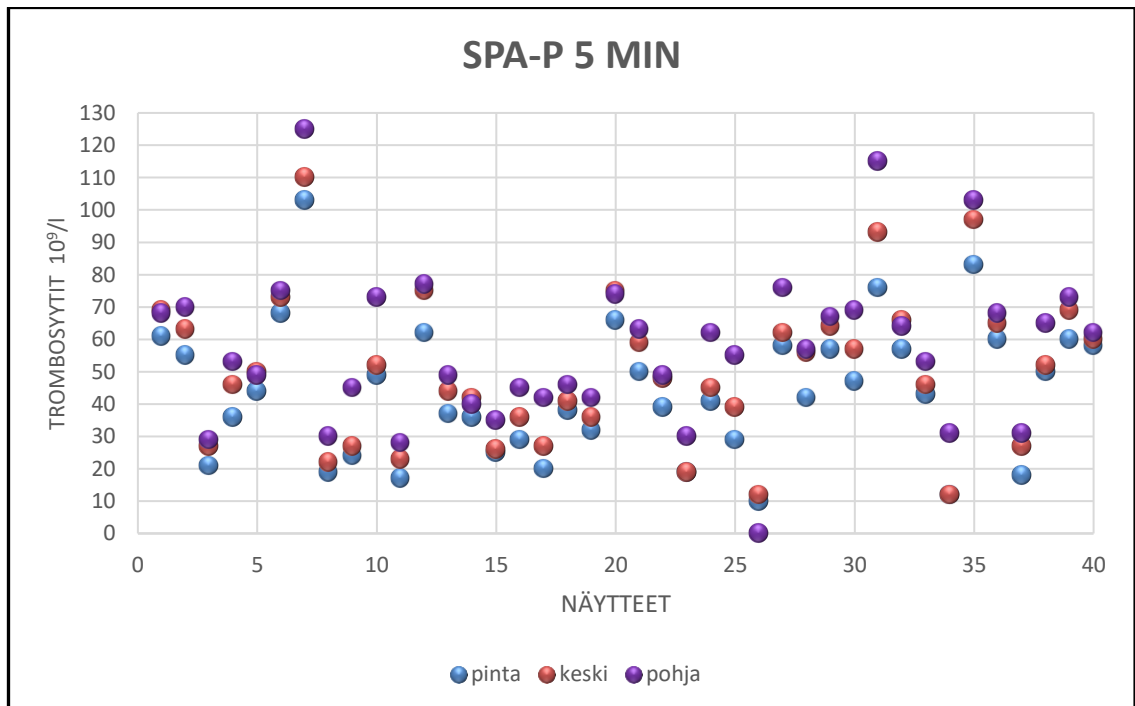
Sysmex XE-5000-verenkuva-analysaattorilla ajetuista plasman pinta-, keski- ja pohjafraktioista saatiin tulokset absoluuttisina trombosyyttipitoisuuksina. Nämä arvot ovat nähtävissä liitteissä 1 ja 2 taulukoituna putkityyppien ja sentrifugointiaikojen mukaan. Kuvioissa 1–4 havainnollistetaan fraktioiden absoluuttiset trombosyyttipitoisuudet näytteittäin. Ensin käsitellään 10 ja 5 minuuttia sentrifugoidut natriumsitraattiputket, ja niiden jälkeen 10 ja 5 minuuttia sentrifugoidut litiumhepariinigeeliputket.

Kuvioista 1 nähdään 10 minuutin sentrifugoinnin vaikutus natriumsitraattiputkissa. Yleisesti ottaen tässä putkityypissä plasman trombosyyttipitoisuudet ovat huomattavasti pienemmät 10 kuin 5 minuutin sentrifugoinnin jälkeen. Kuviossa 1 erot eri näytteiden trombosyyttipitoisuuksien välillä ovat pienet. Kuvioista paljastuu, että pintafraktiossa on vähiten trombosyyttejä ja määrä lisääntyy pohjaa kohti mentäessä.



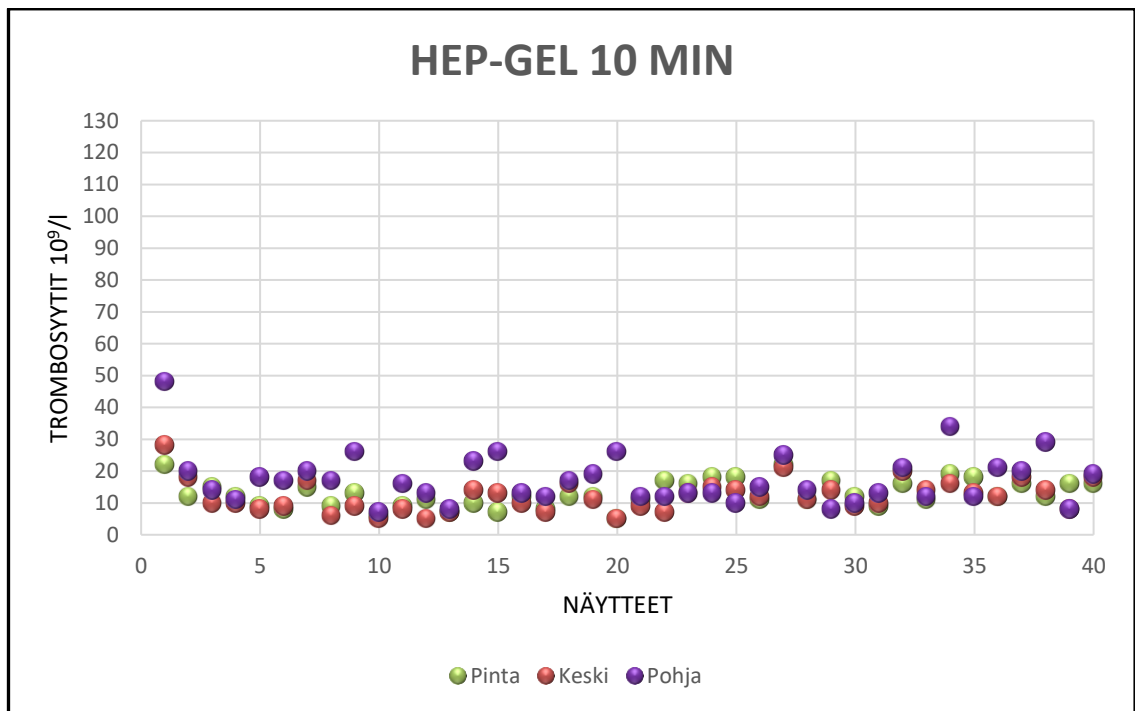
KUVIO 1. Trombosyyttipitoisuudet natriumsitraattiputkien kolmessa fraktiossa näytteittäin 10 minuutin sentrifugoinnilla

Kuviossa 2 nähdään, että natriumsitraattiputkissa 5 minuutin sentrifugoinnilla plasman trombosyyttipitoisuudet vaihtelevat huomattavasti eri näytteiden välillä. Kuitenkin suurin osa näyteputkien eri fraktioista on sentrifugoitunut yhdenmukaisesti niin, että pintafraktiossa on vähiten trombosyyttejä.



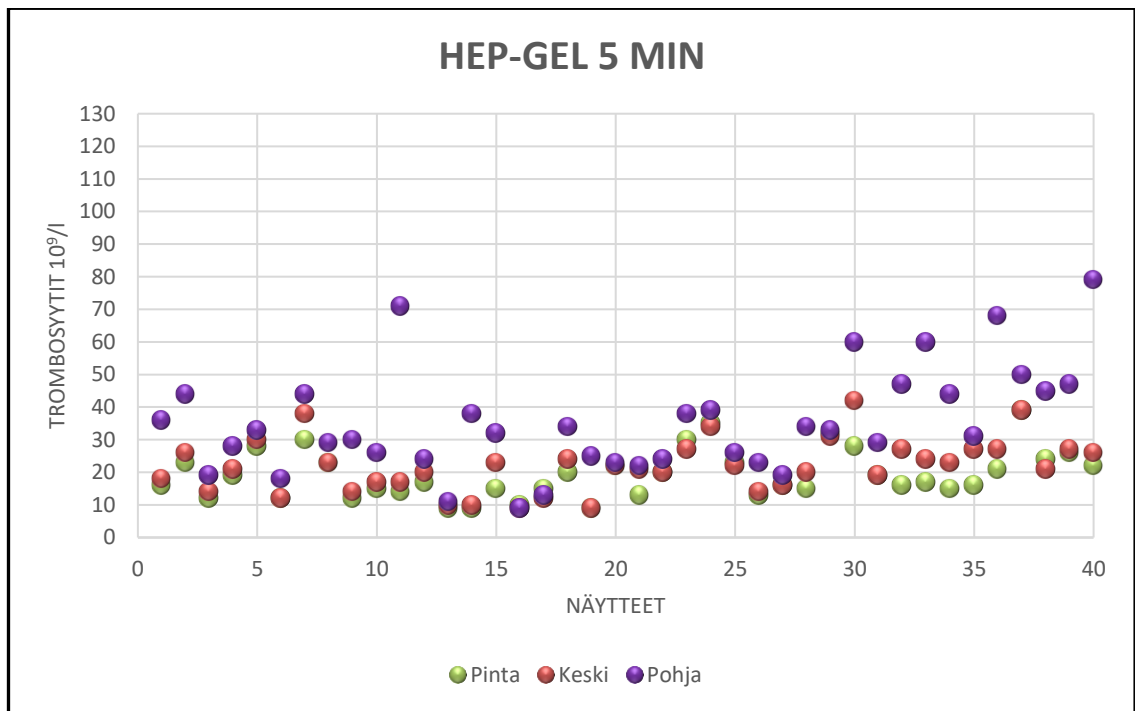
KUVIO 2. Trombosyyttipitoisuudet natriumsitraattiputkien kolmessa fraktiossa näytteittäin 5 minuutin sentrifugoinnilla

Litiumhepariinigeeliputken ja 10 minuutin sentrifugoinnin yhdistelmä näyttää kuvion 3 mukaiselta. Plasman trombosyyttipitoisuudet ovat pieniä ja hajonta on vähäistä sekä näytteiden että fraktioiden välillä. Kuviossa kiinnittää huomiota pinta- ja keskifraktion trombosyyttipitoisuuksien pieni ero, kummankin fraktion saavuttaessa välillä pienimmän trombosyyttipitoisuuden. Pohjafraktio pääsääntöisesti kuitenkin sisältää tässä kuviossa eniten trombosyyttejä.



KUVIO 3. Trombosyyttipitoisuudet litiumhepariinigeeliputkien kolmessa fraktiossa näytteittäin 10 minuutin sentrifugoinnilla

Kuviossa 4 on esitetty plasman trombosyyttipitoisuudet 5 minuutin sentrifugoinnin jälkeen litiumhepariinigeeliputkissa. Kuvioista paljastuu jonkin verran hajontaa saman näytteen eri fraktioiden trombosyyttipitoisuuksissa sekä jonkin verran vaihtelua myös eri näytteiden välillä. Tässäkin putkityypissä eniten trombosyyttejä löytyy pohjafraktiosta.



KUVIO 4. Trombosyyttipitoisuudet litiumhepariinigeeliputkien kolmessa fraktiossa näytteittäin 5 minuutin sentrifugoinnilla

10.2 Fraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot

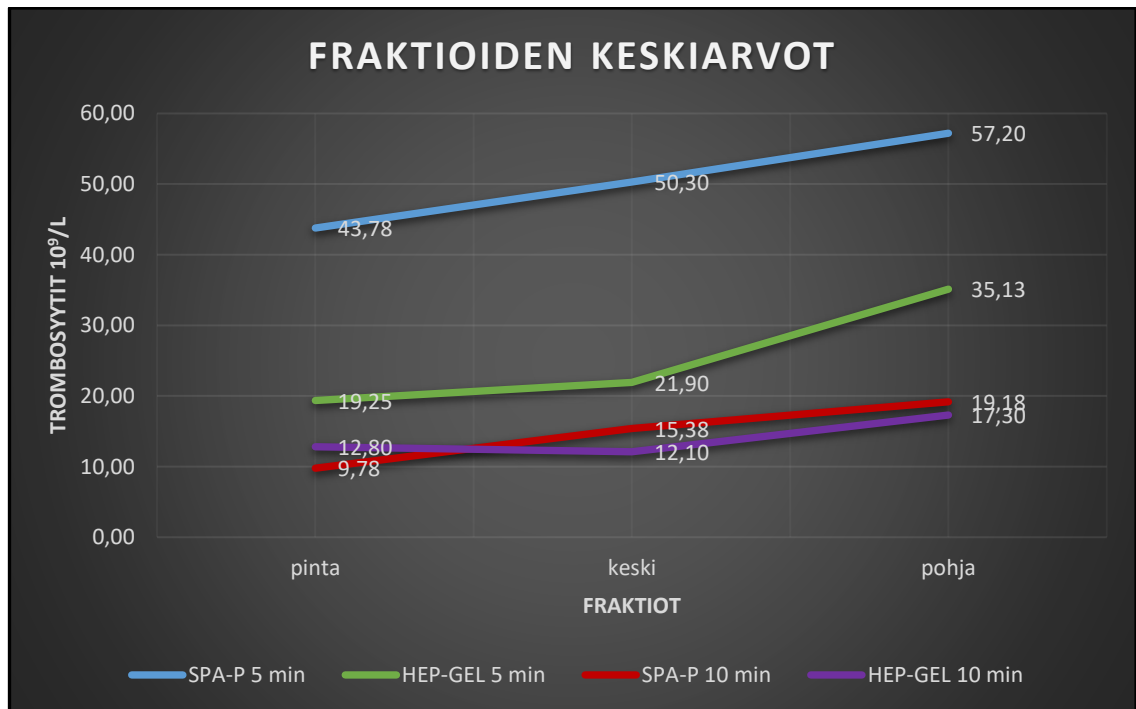
Taulukkoon 3 on koottu kaikkien fraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot luokiteltuna putkityypin ja sentrifugointiajan mukaan. Mittayksikkönä on trombosyyttien määrä litraa kohden ja yksikkö on $10^9/l$. Havainnollisuuden vuoksi nämä mittaustulokset on siirretty myös kuvioon 5.

TAULUKKO 3. Trombosyyttien keskiarvot pinta-, keski- ja pohjafraktioissa

NÄYTE-PUTKI	SENTRI-FUGOINTIAIKA	PINTA-FRAKTIO	KESKI-FRAKTIO	POHJA-FRAKTIO	YK-SIKKÖ
SPA-P	10 MIN	9,78	15,38	19,18	$10^9/l$
SPA-P	5 MIN	43,78	50,30	57,20	$10^9/l$
HEP-GEL	10 MIN	12,80	12,10	17,30	$10^9/l$
HEP-GEL	5 MIN	19,25	21,90	35,13	$10^9/l$

Kuviosta 5 ilmenee natriumsitraattiputkien ja litiumhepariinigeeliputkien plasman kaikkien fraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot 5 ja 10 minuutin sentrifugointien jälkeen. Molemmassa putkityypeissä trombosyyttipitoisuudet nousevat pohjafraktiota

kohden riippumatta sentrifugointiajasta. Pitoisuudet ovat pääsääntöisesti pienimmät pintafraktioissa. Ainoastaan 10 minuuttia sentrifugoiduissa litiumhepariinigeeliputkissa pienin pitoisuus on keskifraktiossa, eron ollessa kuitenkin hyvin pieni verrattuna ko. putken pintafraktioon. Molempiin putkityyppeihin jää trombosyyttejä selvästi enemmän 5 minuutin kuin 10 minuutin sentrifugoinnilla. Varsinkin 5 minuuttia sentrifugoiduissa natriumsitraattiputkissa plasman trombosyyttipitoisuudet ovat jokaisessa fraktiossa huomattavasti suuremmat kuin 5 minuutin ajan sentrifugoiduissa litiumhepariinigeeliputkissa.

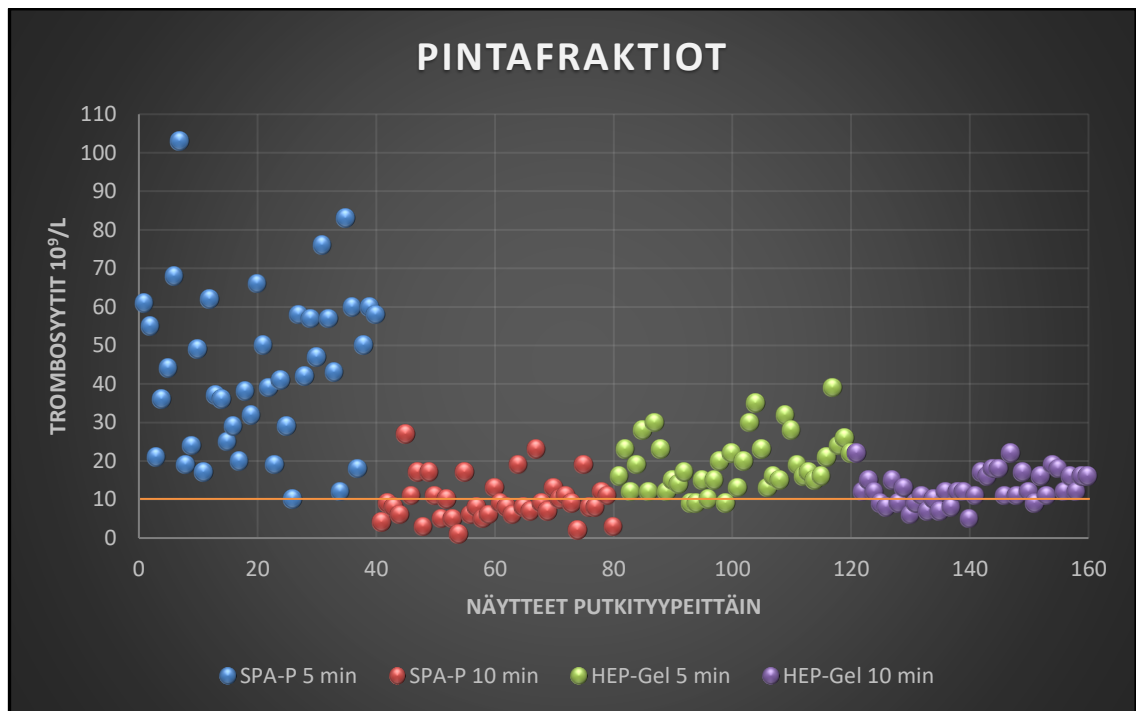


KUVIO 5. Fraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot putkityypeittäin

10.3 Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuudet

Kuviosta 6 selviää, että näytteiden pintafraktioiden trombosyyttipitoisuudet vaihtelevat selvästi riippuen putkityypistä ja sentrifugointiajasta. Trombosyyttivapaan plasman raja-arvona pidetään 10 000 trombosyyttiä/ μl ($=10 \times 10^9/\text{l}$) (Rodak, Fritsma & Keohane 2012, 740.) Raja on merkitty viivalla kuvioon 6. Parhaiten tämä tavoite saavutetaan 10 minuutin sentrifugoinnilla natriumsitraattiputkissa, joissa 65 %:ssa pintafraktion trombosyyttipitoisuus on 10 000 trombosyyttiä/ μl tai sen alle. Näistä putkista korkein mitattu pintafraktion trombosyyttipitoisuus on $27 \times 10^9/\text{l}$ ja matalin $1 \times 10^9/\text{l}$ (liite 1). Litiumhepariinigeeliputkissa 10 minuutin sentrifugoinnilla 27,5 % trombosyyttipitoisuuksista alittaa trombosyyttivapaan plasman raja-arvon. Näistä putkista korkein mitattu yksittäinen trombosyyttipitoisuus on $22 \times 10^9/\text{l}$ ja matalin $5 \times 10^9/\text{l}$ (liite 2).

Sentrifugointiajan ollessa 5 minuuttia, litiumhepariinigeeliputkista vain 10 %:ssa pintafraktio on riittävän puhdasta. Suurimmillaan trombosyyttipitoisuus on $39 \times 10^9/l$ ja matalimmillaan $9 \times 10^9/l$ (liite 2). Eniten hajontaa pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksissa on 5 minuuttia sentrifugoiduissa natriumsitraattiputkissa, joissa korkein yksittäinen trombosyyttipitoisuus on $103 \times 10^9/l$ ja matalin $10 \times 10^9/l$ (liite 1). Näissä putkissa vain 2,5 % arvoista alittaa trombosyyttivapaan plasman raja-arvon, eli vain yhdessä 40 putkesta on trombosyyttivapaa pintafraktio.



KUVIO 6. Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuudet näytteittäin

10.4 T-testien tulokset

Riippuvien parien t-testillä testattiin taulukossa 4 näkyviä pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvoja putkityypeittäin.

TAULUKKO 4. Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot

NÄYTEPUTKI	SENTRIFUGOINTIAIKA	TROMBOSYYTIT/ PINTAFRAKTIO	YKSIKKÖ
SPA-P	10 MIN	9,78	10 ⁹ /l
SPA-P	5 MIN	43,78	10 ⁹ /l
HEP-GEL	10 MIN	12,80	10 ⁹ /l
HEP-GEL	5 MIN	19,25	10 ⁹ /l

Taulukosta 5 nähdään, että riippuvien parien t-testillä tulokseksi saatu p-arvo (Sig) oli 0,00 kummallakin putkityypillä verrattaessa 5 ja 10 minuutin ajan sentrifugoituja putkia. Tämä tarkoittaa sitä, että pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksissa 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnin erot ovat tilastollisesti erittäin merkitseviä sekä natriumsitraattiputkea että litiumhepariinigeeliputkea käytettäessä.

TAULUKKO 5. Pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksien välinen t-testi

VERTAILTAVAT PINTAFRAKTIOT/SENTRIFUGOINTIAIKA		p-ARVO
SPA-P/10 MIN	SPA-P/5 MIN	0,00
HEP-GEL/10 MIN	HEP-GEL/5 MIN	0,00

Riippuvien parien t-testillä testattiin myös pinta-, keski- ja pohjafraktion trombosyyttipitoisuuksien välisiä merkitsevyyseroja kummallakin putkityypillä 5 sekä 10 minuutin sentrifugointiajalla. T-testien tulokset ovat nähtävissä taulukossa 6. P-arvot olivat melkein poikkeuksetta 0,00 eli erot olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä muutamaa p-arvoa lukuun ottamatta. 10 minuuttia sentrifugoidun litiumhepariinigeeliputken pinta- ja pohjafraktion välinen p-arvo oli 0,01, ero oli kuitenkin vielä tilastollisesti merkitsevä. Samalla putkityypillä- ja sentrifugointiajalla pinta- ja keskifraktion välinen merkitsevyyss- taso ei kuitenkaan ollut enää tilastollisesti merkitsevä p-arvon ollessa 0,23. Tämä olikin ainut saatu tulos, missä fraktioiden väliselle erolle ei löytynyt tilastollista merkitsevyyttä.

TAULUKKO 6. Riippuvien pariin t-testi eri fraktioiden välillä

PUTKITYYPPI	SENTRIFUGOINTIAIKA	VERTAILTAVAT		p-ARVO
		FRAKTIOT		
SPA-P	5 MIN	PINTA	KESKI	0,00
SPA-P	5 MIN	KESKI	POHJA	0,00
SPA-P	5 MIN	PINTA	POHJA	0,00
SPA-P	10 MIN	PINTA	KESKI	0,00
SPA-P	10 MIN	KESKI	POHJA	0,00
SPA-P	10 MIN	PINTA	POHJA	0,00
HEP-GEL	5 MIN	PINTA	KESKI	0,00
HEP-GEL	5 MIN	KESKI	POHJA	0,00
HEP-GEL	5 MIN	PINTA	POHJA	0,00
HEP-GEL	10 MIN	PINTA	KESKI	0,23
HEP-GEL	10 MIN	KESKI	POHJA	0,00
HEP-GEL	10 MIN	PINTA	POHJA	0,01

10.5 Johtopäätökset

Tutkimuksen tuloksista selvisi, että plasman trombosyyttipitoisuudet olivat pääsääntöisesti pienimmät pintafraktioissa ja määrät nousivat pohjafraktiota kohden riippumatta sentrifugointiajasta ja putkityypistä. Parhaiten trombosyyttivapaan plasman raja-arvo, 10 000 trombosyyttiä/ μl tai alle, saavutettiin 10 minuutin sentrifugoinnilla natriumsitraatti-putkien pintafraktiossa, 65 % näistä näytteistä alitti raja-arvon. Litiumhepariinigeeliputkien pintafraktiossa trombosyyttivapaan plasman raja-arvon saavutti 27,5 % näytteistä 10 minuutin sentrifugoinnilla. Litiumhepariinigeeliputkista vain 10 %:ssa pintafraktio oli riittävän puhdasta sentrifugointiajan ollessa 5 minuuttia. Natriumsitraatti-putkien pintafraktiossa 5 minuutin sentrifugoinnilla vain 2,5 % arvoista alitti trombosyyttivapaan plasman raja-arvon. Keski- ja pohjafraktioissa ei saavutettu trombosyyttivapaan plasman pitoisuuksia. Sekä keski- että pohjafraktioissa trombosyyttipitoisuuksien keskiarvot vaihtelivat huomattavasti natriumsitraatti-putkissa 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnilla, vaihteluvälin ollessa 15,38–57,20 x 10⁹/l. Litiumhepariinigeeliputkissa vastaava ero oli paljon pienempi vaihteluvälin ollessa 12,10–35,13 x 10⁹/l.

Molempiin putkityyppeihin jäi trombosyyttejä selvästi enemmän 5 minuutin kuin 10 minuutin sentrifugoinnilla. Litiumhepariinigeeliputkissa trombosyyttipitoisuudet olivat huomattavasti pienemmät kuin natriumsitraattiputkissa 5 minuutin sentrifugoinnilla. Olettavasti litiumhepariinigeeliputken geeli vaikuttaa jonkin verran tuloksiin, koska oikein toimiessaan geeli tehostaa solujen erottumista plasmasta.

Riippuvien parien t-testissä verrattiin plasman pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksia eri sentrifugointiaikojen jälkeen kummallakin putkityypillä. Saatu tulos (p-arvo 0,00) tarkoittaa, että pintafraktioiden trombosyyttipitoisuuksissa 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnin erot ovat tilastollisesti erittäin merkitseviä molemmissa putkityypeissä. Riippuvien parien t-testillä testattiin myös pinta-, keski- ja pohjafraktion välisiä merkitsevyyseroja kummallakin putkityypillä 5 sekä 10 minuutin sentrifugointiajalla. P-arvot olivat melkein poikkeuksetta 0,00 eli erot olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä.

Opinnäytetyön tuloksista voitiin vetää se johtopäätös, että 5 minuutin sentrifugoinnilla ei saavuteta riittävän puhdasta plasmaa kummassakaan putkityypissä. Tämän havainnon perusteella Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä nykyisin käytössä olevaa verinäytteiden 10 minuutin sentrifugointiaikaa ei ole perusteltua lyhentää 5 minuuttiin käytettäessä natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia. Näin ollen läpi-menoaikojakaan ei saada nopeutettua, koska sentrifugointiaikaa ei voida lyhentää.

Opinnäytetyöstä saadut tulokset eivät ole yhteneväisiä aiempien tutkimuksien tulosten kanssa. Tämä selittyy todennäköisesti sillä, että aiemmat tutkimukset eroavat yksityiskohdiltaan tästä opinnäytetyöstä, jossa keskitytään tutkimaan nimenomaan plasman trombosyyttipitoisuuksia, eikä tutkita sentrifugoinnin vaikutusta yksittäisten analyyttien tuloksiin. Kao, Shu ja Yen (2010) tutkimuksessa todettiin, että jopa 1 minuutin sentrifugointi tuottaa trombosyyttivapaata plasmaa natriumsitraattiputkissa, mutta se vaatii 7000 g:n sentrifugaalivoiman. Minder ym. (2011) tutkimus osoitti, että litiumhepariinigeeliputkien sentrifugointi 1870 g:lla 7 minuutin ajan antoi saman tasoisia kemian ja immunologian tuloksia kuin 10 tai 15 minuutin sentrifugointi 2180 g:lla.

11 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, onko verinäytteiden läpimenoaikojen nopeuttamiseksi mahdollista lyhentää Seinäjoen kliinisen kemian toimintayksikössä nykyisin käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiaikaa 5 minuuttiin käytettäessä natriumsitraattiputkia ja litiumhepariinigeeliputkia. Tutkimuksen kokeellisessa osassa selvitettiin, riittääkö 5 minuutin sentrifugointi trombosyyttivapaan plasman muodostumiseen. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata 5 ja 10 minuutin ajan sentrifugoitujen verinäytteiden plasmaplasta eroteltujen pinta-, keski- ja pohjafraktioiden puhtautta mittaamalla fraktioiden trombosyyttipitoisuudet.

Tulokset osoittivat, että molempiin putkityyppeihin jäi trombosyyttejä huomattavasti enemmän 5 minuutin kuin 10 minuutin sentrifugoinnilla. Plasman trombosyyttipitoisuudet olivat pienimmät pintafraktioissa. Pintafraktioissa erot 5 ja 10 minuutin sentrifugoinnin välillä olivat kuitenkin tilastollisesti erittäin merkitseviä. Natriumsitraattiputkissa 5 minuutin sentrifugoinnilla vain yhdessä ja litiumhepariinigeeliputkissa vain neljässä putkessa pintafraktion plasma oli trombosyyttivapaata. Keski- ja pohjafraktioissa ei saavutettu lainkaan trombosyyttivapaita pitoisuuksia kummallakaan sentrifugointiajalla. Opinnäytetyön tuloksista vedettiin johtopäätös, että sentrifugointiaikaa ei voi lyhentää, eikä läpimenoaikoja saada siten nopeutettua.

11.1 Tutkimuksen objektiivisuus, eettisyys ja luotettavuus

Määrällinen tutkimus on yleistävä tutkimus. Pieni tutkittavien joukko toimii otoksena, joka edustaa koko joukkoa eli perusjoukkoa. (Kananen 2008, 10.) Määrällisen tutkimuksen tavoitteena on suuri vastaajien määrä. Otoksen vähimmäismääränä pidetään usein lukua 100. Otoksen suuruus on suoraan verrannollinen tulosten edustavuuteen. Mitä suurempi otos, sitä paremmin tulos vastaa koko perusjoukon tuloksia. (Vilka 2007, 17.) Tässä opinnäytetyössä satunnaisotos oli yhteensä 160 näyteputkea. Tämä määrä sisälsi 80 näyteputkea kutakin putkityyppiä. Tutkimuksen otoksen pienehkö koko asettaa siis epävarmuustekijöitä tulosten soveltamiseksi suurempaan perusjoukkoon.

Määrälliselle tutkimukselle on tärkeää, että tutkimus on objektiivinen. Tavoitteena on puolueettomuus, niin itse tutkimuksen teossa kuin tutkimustuloksissakin. Tutkimuksen objektiivisuus edellyttää myös puolueetonta tulosten tulkintaa. Tätä on käytännössä mahdollista kokonaan saavuttaa. Tutkimuksen tulokinnassa tukeudutaan aina johonkin ulkopuoliseen viitekehykseen, mihin tulokset asetetaan. Tulosten tulkinta väistämättä vaihtelee viitekehyksen mukaan. Myös mm. erilaiset valmiit teoriat, mallit ja tutkimusperinteet vaikuttavat tulosten tulkintaan. (Vilka 2007, 16.)

Eettisyys tutkimuksen aikana edellyttää tutkijan ja tutkittavan mahdollisimman etäistä suhdetta toisiinsa (Vilka 2007, 16). Tässä opinnäytetyössä eettisyys taattiin ottamalla näytteet sattumanvaraisesti vapaaehtoisilta Y-laboratorion asiakkailta ilman henkilötietojen merkitsemistä näytteisiin. Näytteet nimettiin keksittyjen testipotilaiden nimillä ja tunnuksilla. Tutkimuksen eettisyys varmistettiin myös kysymällä vapaaehtoisilta asiakkailta suullista lupaa näytteenottoon. Tässä tapauksessa suullinen lupa riitti, koska tutkimus tehtiin Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksikön luvalla laboratorion oman toiminnan kehittämiseksi ja tutkimuksessa ei käsitelty henkilötietoja (Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 2001).

Opinnäytetyön luotettavuus varmistettiin huolellisella suunnittelulla, jatkuvalla tiedonkeruulla ja tulosten huolellisella käsittelyllä. Lähteet valittiin myös huolellisesti, kiinnittäen huomiota lähteiden alkuperään, luotettavuuteen ja laadukkuuteen. Luotettava tutkimus mittaa tarkasti haettua asiaa (validiteetti), on toistettavissa (reliabiliteetti) ja antaa oikeita vastauksia tutkimuskysymyksiin. Tärkeitä keinoja tämän saavuttamiseksi ovat oikein asetetut, yksiselitteiset ja koko tutkimusongelman kattavat tutkimuskysymykset. (Heikkilä 2014, 27–28; Kananen 2008, 79–81.) Validissa tutkimuksessa tehdään oikeita johtopäätöksiä jotka vastaavat tutkimusongelmiin. Validiteetti merkitsee myös oikean tutkimusasetelman kautta tulosten yleistettävyyttä. Tutkimuksen reliabiliteetti merkitsee analysoinnin johdonmukaisuutta ja tulosten pysyvyyttä tutkijasta riippumatta. (Karjalainen 2010, 16.)

11.2 Jatkotutkimusaiheet ja opinnäytetyöprosessi

Opinnäytetyössä tulosten trombosyyttipitoisuuksissa oli selvästi potilaskohtaisista eroja. Oletettavasti potilaan kokonaistrombosyyttipitoisuudella voi olla huomattava vaikutus

sentrifugoidun plasman trombosyyttipitoisuuteen eli sentrifugoinnin onnistumiseen. Tutkimuksessa olisi ollut mielenkiintoista mitata myös potilaan veren kokonaistrombosyyttipitoisuus asiayhteyden varmistamiseksi.

Tutkimusta tehtäessä ja tuloksia raportoitaessa heräsi kysymys, riittääkö nykyinen Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä käytössä oleva 10 minuutin sentrifugointiaika puhtaan plasman saavuttamiseksi. Tämän tutkimuksen mukaan natriumsitraattiputkissa 10 minuutin sentrifugoinnilla 65 %:ssa pintafraktio oli trombosyyttivapaata, litiumhepariinigeeliputkissa vastaava luku oli vain 27,5 %. Jatkotutkimuksena voisi verrata mahdollisia eroja, jotka muodostuvat 10 ja 15 minuutin sentrifugoinnilla plasman puhtauteen. Tutkimuksen laajentaminen eteenpäin voisi koskea myös sitä, kuinka trombosyyttipitoisuus vaikuttaa mitattaessa eri analyyttejä. Mukaan otettavia tutkimuksia voisivat olla mm. INR, LD ja kaliumpitoisuus.

Plasman trombosyyttipitoisuus oli tämän tutkimuksen mukaan järjestelmällisesti pienimmillään pintafraktiossa putkityypistä ja sentrifugointiajan muutoksista huolimatta. Tällä hetkellä maakunnasta Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorioon analysoitavaksi lähetettävät INR-näytteet sentrifugoidaan ja erotellaan lähettävässä laboratoriossa, elleivät näytteet ehdi samana päivänä perille. (Kultti 2017). Eroteltu plasma sisältää kaikki plasman fraktiot, joten sen trombosyyttipitoisuus on suurempi kuin pelkän pintafraktion trombosyyttipitoisuus. Jos näyteputket lähetettäisiin kokoverenä kliinisen kemian laboratorioon, siellä suoritettaisiin sentrifugointi ja analysointi tapahtuisi plasman pintafraktiosta. Jatkotutkimusaiheena voisi olla näiden kahden eri preanalyttisen toimintatavan vertailu ja niiden vaikutus trombosyyttipitoisuuksiin ja analysointituloksiin.

Opinnäytetyötä oli antoisa tehdä, koska opimme paljon uutta tilastollisesta analysoinnista, Microsoft Excel-ohjelman käytöstä ja parityöskentelystä. Opimme aikataulutamaan työskentelyämme sopiviin jaksoihin, työ eteni sujuvasti ja parityöskentelymme sujui ongelmitta. Haastetta työhön toi etenkin se, että kumpikaan ei ollut aikaisemmin tehnyt kvantitatiivista tutkimusta. Koko määrällinen tutkimusprosessi oli siis vieras ja vaati perehtymistä. Varsinkin mittauksista saatujen tulosten tilastollista käsittelyä ja testausta piti opiskella, ennen kuin pystyimme tarkoituksenmukaisesti käsittelemään ja arvioimaan aineistoa ja tuloksia. Tähän saatiin onneksi hyvää ohjausta opinnäytetyötä ohjaavalta kemistiltä ja tilastotieteen opettajalta. Myös ohjaava opettaja oli hyvin tavoitettavissa ja

saimme häneltä ohjauskeskusteluissa rakentavaa palautetta työmme kehittämiseksi. Teoriatietao opinnäytetyöhön löytyi hyvin. Ainoastaan aiempia tutkimuksia sentrifugointiin liittyen oli haasteellista löytää. Suomalaisia tutkimuksia ei löytynyt ollenkaan ja ulkomaalaisissakin tutkimuksissa oli yleensä tutkittu asiaa jostakin eri näkökulmasta verrattuna omaan tutkimukseemme. Itse tutkimuksen teko sujui suunnitellun aikataulun mukaisesti ja tutkimuksen tulokset antoivat tarvittavat vastaukset tutkimuskysymyksiin. Tutkimus antoi selkeän tuloksen, että Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä nykyisin käytössä olevaa 10 minuutin sentrifugointiaikaa ei ole syytä lyhentää.

LÄHTEET

BD. 2014. Product Catalogue. BD Diagnostics. Preanalytical Systems. Luettu 6.5.2018. <http://www.bd.com/resource.aspx?idx=30770>

BD. 2017a. How BD Barricor™ Tube Works. Luettu 8.5.2018. <http://barricor.bd.com/eu/how-bd-barricor-tube-works.xml>

BD. 2017b. BD Vacutainer® Barricor™ Product Overview. Luettu 8.5.2018. <http://barricor.bd.com/eu/barricor-product-overview.xml>

BD. 2017c. Harness the Power of Centrifugation. Luettu 8.5.2018. <http://barricor.bd.com/eu/harness-the-power-of-centrifugation.xml>

BD. 2017d. BD Barricor™ Tubes Provide a Fast, Clean, High-Quality Plasma Sample. Luettu 8.5.2018. <http://barricor.bd.com/eu/barricor-provides-cleaner-samples.xml>

Bowen, R. & Remaley, A. 2014. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochemia Medica* 24 (1), 31–44.

Bush, V. & Cohen, R. 2003. The Evolution of Evacuated Blood Collection Tubes. *Laboratory Medicine* 34 (4), 304–310.

Dimeski, G., Solano, C., Petroff, M. & Hynd, M. 2011. Centrifugation protocols: tests to determine optimal lithium heparin and citrate plasma sample quality. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 48 (3), 218–222.

Goswami, B., Singh, B., Chawla R., Gupta, V. & Mallika, V. 2010. Turn Around Time (TAT) as a Benchmark of Laboratory Performance. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 25 (4), 376–379.

Guder, W., Narayanan, S., Wisser, H. & Zawta, B. 2009. Diagnostic Samples: From the Patient to the Laboratory. The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results. 4. uudistettu painos. Weinheim: Wiley-Blackwell.

Hawkins, R. 2007. Laboratory Turnaround Time. *The Clinical Biochemist Reviews* 28 (4), 179–194.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Holland, L. & Dombourian, M. 2012. Evaluation of an Abbreviated Centrifugation Protocol for Chemistry Testing. *Labmedicine* 43 (3), 78–81.

Hänninen, H., Ruismäki, M., Seikola, A. & Slöör, S. 2007. Laboratoriotyön perusteet. Helsinki: Edita.

Kananen, J. 2008. Kvantti: kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

Kao, C-H., Shu, L-C. & Yen, W-H. 2010. Evaluation of a High-speed Centrifuge with Rapid Preparation of Plasma for Coagulation Testing to Improve Turnaround Time. *J Biomed Lab Science* 22 (1), 23–28.

Karjalainen, L. 2010. Tilastotieteen perusteet. 1. painos. Keuruu. Otavan kirjapaino Oy.

Kultti, J. Sairaalakemisti. 2017. Henkilökohtainen tiedonanto. Keskustelu käyty 5.5.2017.

Kultti, J. Sairaalakemisti. 2018. Viiden ja kymmenen minuutin sentrifugointiajan vaikutus näytteen laatuun opinnäytetyö. Sähköpostiviesti. Johanna.Kultti@epshp.fi. Luettu 8.2.2018.

Kurvinen, K. 2017. Trombosyyttien laskenta. Abstrakti. Labquality days.

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä. 2.2.2001/101

Leppäluoto, J., Kettunen, R., Rintamäki, H., Vakkuri, O., Vierimaa, H. & Lätti, S. 2015. Anatomia ja fysiologia. Rakenteesta toimintaan. 3.–5. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Majekodunmi, S. 2015. A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. *American Journal of Biomedical Engineering* 5 (2), 67–78.

Matikainen, A-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2016. Näytteenottajan käsikirja. 2. uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Minder, E., Schibli, A., Mahrer, D., Nestic, P. & Plüer, K. 2011. Effects of different centrifugation conditions on clinical chemistry and Immunology test results. *BMC Clinical Pathology* 11 (6), 1–15.

Perez, A., Lichy, R., Lana, J., Rodrigues, A., Luzo, A., Belangero, W. & Santana, M. 2013. Prediction and Modulation of Platelet Recovery by Discontinuous Centrifugation of Whole Blood for the Preparation of Pure Platelet-Rich Plasma. *BioResearch* 2 (4), 307–314.

Rodak, B., Fritsma, G. & Keohane, E. 2012. Hematology. Clinical principles and applications. St. Louis. Elsevier Saunders.

Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E. & Bjälle, J. Toverud, K. 2011. Ihminen: Fysiologia ja anatomia. Suom. Hekkanen, R. 1. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Savolainen, E-R. 2014. Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3.–4. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 70–73.

Savolainen, E-R., Pelliniemi, T-T. & Koski, T. 2014. Hematologian analysaattorit. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3.–4. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 86–92.

Stotler, B. & Kratz, A. 2012. Determination of Turnaround Time in the Clinical Laboratory: “Accessioning-to-Result” Time Does Not Always Accurately Reflect Laboratory Performance. *American Journal of Clinical Pathology* 138 (5), 724–729.

- Sultan, A. 2010. Five- minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. *Eastern Mediterranean Health Journal* 16 (2). 233–236.
- Tuokko, S., Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. *Kliiniset laboratorionäytteet: opas näytteiden ottoa varten*. Helsinki: Tammi.
- Tuokko, S. 2014. Verinäytteiden otto. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede*. 3.–4. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 27–33.
- Turgeon, M. 2016. *Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: Concepts, Procedures, and Clinical Applications*. 7. painos. Elsevier.
- Vilkkä, H. 2007. *Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet*. Helsinki. Hanna Vilkkä ja Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Warekois, R. & Robinson, R. 2016. *Phlebotomy: Worktext and Procedures Manual*. 4. painos. Elsevier Health Sciences.
- WHO. World Health Organization. 2002. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Luettu 21.4.2018 http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65957/WHO_DIL_LAB_99.1_REV.2.pdf;jsessionid=92B4A3FEC6BECB966E8FD22DC4932872?sequence=1.
- Åkerman, K. & Anttila, P. 2017. *Sentrifugoitavien verinäytteiden käsittely ja säilytys. Menettelytapaohje*. Seinäjoen keskussairaala.
- Åkerman, K. 2015. *Kliinisen hematologian työohjeet*. Seinäjoen Keskussairaala.
- Åkerman, K. 2014. Näytteiden esikäsittelylaitteet. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia*. 3.–4. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 79–80.

LIITTEET

Liite 1. Trombosyyttien absoluuttiset pitoisuudet natriumsitraattiputkissa. 1 (2)
Yksikkönä $10^9/l$.

Näytenro	Sentrifugointiaika	Pintafraktio	Keskifraktio	Pohjafraktio
1	10 min	4	8	8
	5 min	61	69	68
2	10 min	9	14	15
	5 min	55	63	70
3	10 min	8	18	27
	5 min	21	27	29
4	10 min	6	6	12
	5 min	36	46	53
5	10 min	27	31	31
	5 min	44	50	49
6	10 min	11	24	18
	5 min	68	73	75
7	10 min	17	17	22
	5 min	103	110	125
8	10 min	3	7	7
	5 min	19	22	30
9	10 min	17	25	26
	5 min	24	27	45
10	10 min	11	17	17
	5 min	49	52	73
11	10 min	5	10	12
	5 min	17	23	28
13	10 min	10	29	27
	5 min	62	75	77
14	10 min	5	17	23
	5 min	37	44	49
15	10 min	1	6	10
	5 min	36	42	40
16	10 min	17	18	21
	5 min	25	26	35
17	10 min	6	12	16
	5 min	29	36	45
18	10 min	8	12	27
	5 min	20	27	42
19	10 min	5	10	20
	5 min	38	41	46
20	10 min	6	13	17
	5 min	32	36	42

2 (2)

Näytenro	Sentrifugointiaika	Pintafraktio	Keskifraktio	Pohjifraktio
20	10 min	13	23	19
	5 min	66	75	74
21	10 min	9	19	17
	5 min	50	59	63
22	10 min	8	14	14
	5 min	39	48	49
23	10 min	6	17	21
	5 min	19	19	30
24	10 min	19	27	36
	5 min	41	45	62
25	10 min	8	9	7
	5 min	29	39	55
26	10 min	7	8	17
	5 min	10	12	0
27	10 min	23	28	28
	5 min	58	62	76
28	10 min	9	11	20
	5 min	42	56	57
29	10 min	7	9	11
	5 min	57	64	67
30	10 min	13	15	17
	5 min	47	57	69
31	10 min	10	21	46
	5 min	76	93	115
32	10 min	11	17	15
	5 min	57	66	64
33	10 min	9	11	19
	5 min	43	46	53
34	10 min	2	3	4
	5 min	12	12	31
35	10 min	19	27	33
	5 min	83	97	103
36	10 min	8	10	15
	5 min	60	65	68
37	10 min	8	13	26
	5 min	18	27	31
38	10 min	12	20	21
	5 min	50	52	65
39	10 min	11	15	14
	5 min	60	69	73
40	10 min	3	4	11
	5 min	58	60	62

Liite 2. Trombosyyttien absoluuttiset pitoisuudet litiumhepariinigeeliputkissa.
Yksikkönä $10^9/l$.

1 (2)

Näytenro	Sentrifugointiaika	Pintafraktio	Keskifraktio	Pohjafraktio
1	10 min	22	28	48
	5 min	16	18	36
2	10 min	12	18	20
	5 min	23	26	44
3	10 min	15	10	14
	5 min	12	14	19
4	10 min	12	10	11
	5 min	19	21	28
5	10 min	9	8	18
	5 min	28	30	33
6	10 min	8	9	17
	5 min	12	12	18
7	10 min	15	17	20
	5 min	30	38	44
8	10 min	9	6	17
	5 min	23	23	29
9	10 min	13	9	26
	5 min	12	14	30
10	10 min	6	5	7
	5 min	15	17	26
11	10 min	9	8	16
	5 min	14	17	71
12	10 min	11	5	13
	5 min	17	20	24
13	10 min	7	7	8
	5 min	9	10	11
14	10 min	10	14	23
	5 min	9	10	38
15	10 min	7	13	26
	5 min	15	23	32
16	10 min	12	10	13
	5 min	10	9	9
17	10 min	8	7	12
	5 min	15	12	13
18	10 min	12	16	17
	5 min	20	24	34
19	10 min	12	11	19
	5 min	9	9	25
20	10 min	5	5	26
	5 min	22	22	23

Näytenro	Sentrifugointiaika	Pintafraktio	Keskifraktio	Pohjifraktio
21	10 min	11	9	12
	5 min	13	21	22
22	10 min	17	7	12
	5 min	20	20	24
23	10 min	16	13	13
	5 min	30	27	38
24	10 min	18	15	13
	5 min	35	34	39
25	10 min	18	14	10
	5 min	23	22	26
26	10 min	11	12	15
	5 min	13	14	23
27	10 min	22	21	25
	5 min	16	16	19
28	10 min	11	11	14
	5 min	15	20	34
29	10 min	17	14	8
	5 min	32	31	33
30	10 min	12	9	10
	5 min	28	42	60
31	10 min	9	10	13
	5 min	19	19	29
32	10 min	16	20	21
	5 min	16	27	47
33	10 min	11	14	12
	5 min	17	24	60
34	10 min	19	16	34
	5 min	15	23	44
35	10 min	18	13	12
	5 min	16	27	31
36	10 min	12	12	21
	5 min	21	27	68
37	10 min	16	18	20
	5 min	39	39	50
38	10 min	12	14	29
	5 min	24	21	45
39	10 min	16	8	8
	5 min	26	27	47
40	10 min	16	18	19
	5 min	22	26	79