

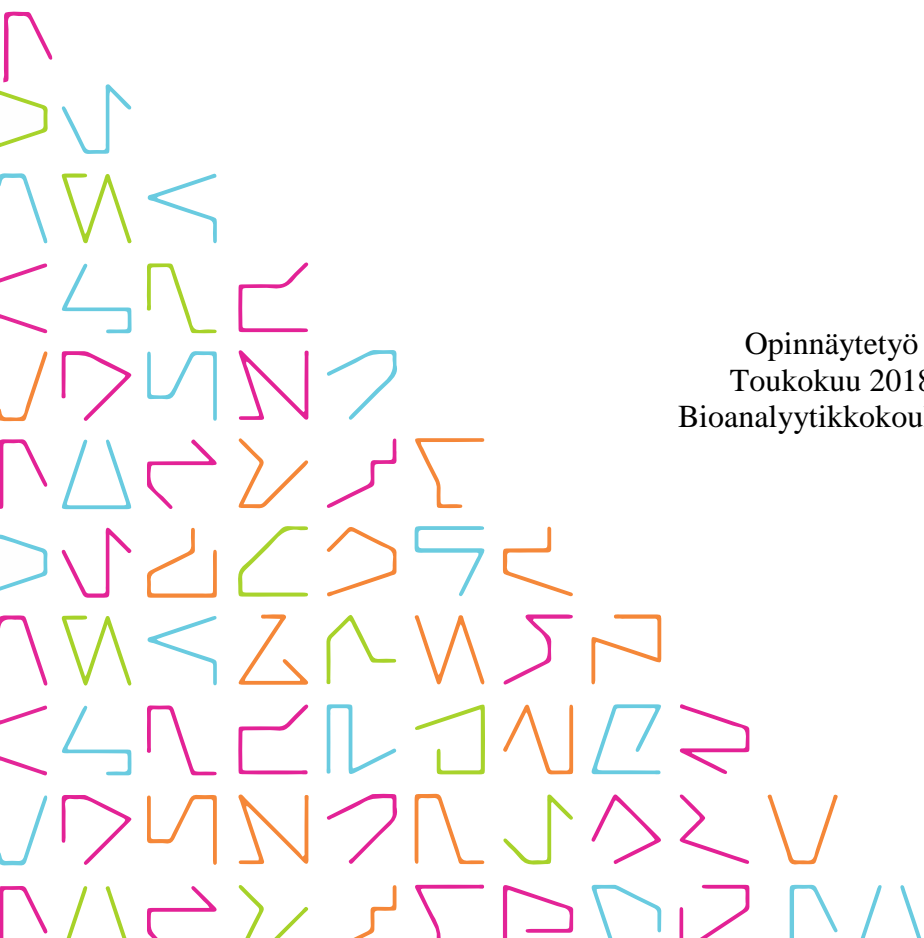


TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

VALON VAIKUTUS SEERUMIN JA KOKOVEREN FOLAATTIPITOISUUTEEN

Milla-Emma Mäki-Pantti

Opinnäytetyö
Toukokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan-koulutusohjelma

MÄKI-PANTTI MILLA-EMMA

Valon vaikutus seerumin ja kokoveren folaattipitoisuuteen

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 10 sivua
Toukokuu 2018

Folaatti eli B9-vitamiini on tärkeä vitamiini, jota ihmisen elimistö ei pysty itse tuottamaan. Folaattia tarvitaan DNA-synteesiin ja sen puutos voi aiheuttaa DNA-synteesin häiriöitä. Folaattia analysoidaan kokoverestä sekä seerumista epäiltäessä folaatin puutosta. Opinnäytetyön tutkimuksen tarkoitus on selvittää, vaikuttaako seerumin ja punasolujen folaattipitoisuuteen näytteiden altistaminen laboratoriovalolle. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian toimintayksikön laboratorion ohjeiden mukaan folaattinäytteet suojataan valolta heti näytteenoton jälkeen. Tutkimuksessa verrataan kahdenkymmenen seerumi- ja kokoverinäytteen pitoisuuksia säilytettäessä rinnakkaisista putkista toista foliosuojassa ja altistaen toinen valolle. Lisäksi selvitetään valon vaikutusta sentrifugoimattomina kuusi tuntia säilytettyjen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksiin. Tutkimukseen kerättiin kaksi kokoveriputkea ja neljä seerumigeeliputkea kahdeltakymmeneltä Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian toimintayksikön laboratorion työntekijältä. Tutkimus suoritettiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian toimintayksikön laboratoriossa, jossa folaattinäytteet analysoidaan immunokemian analysaattorilla Cobas® e602, jonka mittausmenetelmä on elektrokemiluminometrinen.

Tulokset osoittavat, että folaattipitoisuudet eivät muutu näytteitä säilytettäessä ilman foliosuojaa. Seeruminäytteiden valosuojauksella ei huomattu olevan folaattipitoisuuden säilyvyyteen merkitystä, kun näyte sentrifugoitiin vasta 6 tunnin kuluttua näytteenotosta, mutta sentrifugointiajan viivästymisen huomattiin kuitenkin aiheuttavan suurempaa epä-säännöllistä vaihtelua seerumin folaattipitoisuuksiin riippumatta valoaltistuksesta.

Opinnäytetyön tutkimuksen tulokset osoittavat, että foliosuojan poistaminen folaattinäytteiden ympäriltä ei vaikuta näytteiden folaattipitoisuuksiin merkittävästi. Tuloksien perusteella folaattinäytteitä ei tarvitse suojata laboratoriovalolta. Tutkimus osoitti, että seeruminäytteet tulee säilyttää sentrifugoituna. Folaattinäytteiden säilyvyyttä koskeva jatko-tutkimus voisi kohdistua säilytyslämpötilaan. Folaattinäytteet tulisi säilyttää jääkaappi-lämpötilassa, mutta käytännöntyössä näytteitä säilytetään usein pitkiäkin aikoja huoneen-lämmössä.

Asiasanat: folaatti, seerumi, kokoveri, valo

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

MÄKI-PANTTI MILLA-EMMA

The effect of light on red blood cells and serum folate

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 10 pages

May 2018

In this study, the purpose was to analyse the effect of light on red blood cells and serum folate. The human body uses folate for DNA synthesis and folate deficiency can cause disorders in the DNA synthesis. Folate can be analysed from whole blood or from serum. It has been thought that folate samples should be protected from light, especially from direct sunlight. The purpose of this study is to test if folate samples are affected by laboratory lighting. Guidelines of The Hospital District of South Ostrobothnia say that all folate samples must be protected from light exposure after the blood sample has been taken. The blood samples were collected from 20 volunteers who work for The Hospital District of South Ostrobothnia. Two whole blood tubes and four serum tubes were collected from each volunteer. Two serum tubes and one whole blood tube from each person were protected from light with foil and the parallel tubes were left without any protection from light exposure. The study also examines what happens to serum samples that have not been centrifuged for six hours. The study was performed in Seinäjoki Central hospital clinical chemistry and the analyses were made with Cobas® e602 which uses the electrochemiluminescence binding assay.

The results of this study show that folate concentrations do not change whether the samples are exposed to light or not. The light protection of the serum samples was not found to be relevant for the stability of the folate concentration when the sample was not centrifuged within six hours after sampling, but the delay in centrifugation time was found to cause a greater irregular variation in serum folate concentrations, regardless of exposure to light.

The results of the thesis research show that serum and whole blood samples folate concentration do not change significantly when samples are kept without light protection. According to the results of the study, samples do not need to be protected from laboratory light. The study indicates that serum samples should be kept centrifuged, not as whole blood samples. Further studies could be exploring the effects of the storage temperature of folate samples. The laboratory guide says that samples should be stored at refrigerator temperature, but in practice, samples are sometimes kept at room temperature for longer periods of times.

Key words: folate, serum, whole blood, light

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	FOLAATTI JA SEN MERKITYS ELIMISTÖSSÄ	6
2.1	Folaatin rakenne ja tehtävät	6
2.2	Kliininen merkitys	7
2.3	Laboratoriotutkimukset.....	8
2.4	Preanalytiikka ja virhelähteet.....	10
3	ROCHEN COBAS 8000® -ANALYSAATTORI	12
3.1	Cobas 8000	12
3.2	Folaatin analysointi	12
3.3	Virhelähteet.....	13
4	AIEMMAT TUTKIMUKSET	15
5	TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	17
6	TUTKIMUSMENETELMÄ	18
7	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	20
8	SÄILYVYYSTUTKIMUKSEN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	23
8.1	Valon vaikutus punasolujen folaattipitoisuuteen	23
8.2	Valon vaikutus seerumin folaattipitoisuuteen.....	26
8.3	Valon vaikutus kuusi tuntia näytteenoton jälkeen sentrifugoimatta säilytettyihin seeruminäytteisiin	28
8.4	Johtopäätökset.....	31
9	POHDINTA.....	32
	LÄHTEET.....	34
	LIITTEET	36
	Liite 1. Kokoverinäytteiden tutkimustulokset ja eroprosentit (nmol/l).....	36
	Liite 2. Seeruminäytteiden tutkimustulokset (nmol/l).....	38
	Liite 3. Korrelaatiodiagrammit.....	40
	Liite 4. Kuuden tunnin kuluttua sentrifugoitujen seerumiputkien vertailu ½ - 1tunnin kuluttua sentrifugoitujen seerumiputkien folaattipitoisuuteen ...	43
	Liite 5. Eroprosentit (e%) ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen ja kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen välille.....	44
	Liite 6. Eroprosentit (e%) ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen ja kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojaamattoman seeruminäytteen välille.....	45

1 JOHDANTO

Elimistön DNA-synteesi tarvitsee toimiakseen B-ryhmän vitamiineihin kuuluvaa folaattia. Folaattia saadaan ravinnosta ja sen parhaita lähteitä ovat maksa ja kasvikset. Folaatin aktiivinen koentsyymimuoto on tetrahydrofolaatti, joka luovuttaessaan metyyliiryhmän mahdollistaa DNA-synteesin. Epäiltäessä folaatin puutetta sen pitoisuus elimistössä voidaan määrittää punasoluista sekä seerumista. Liian vähäinen folaatin saanti tai imeytymisen heikentää DNA-synteesiä ja aiheuttaa useimmiten megaloblastista anemiaa. (Porkka, Lassila, Remes & Savolainen 2015, 183-184.)

Opinnäytetyön aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin (EPSHP) kliinisen kemian laboratoriolta. EPSHP:n kliinisen kemian toimintayksikön päätoimipaikka on Seinäjoen keskussairaala. Laboratorioon kuuluu myös muita laboratorioita, jotka sijaitsevat Järvi-Pohjanmaan yhteistoiminta-alueella, Terveyskuntayhtymä Kaksineuvoisen terveysasemilla ja muissa terveyskeskuksissa ympäri Etelä-Pohjanmaata. Seinäjoen keskussairaalassa kliinisen kemian toimintayksikkö toimii ympäri vuorokauden tehden noin 2,1 miljoonaa laboratoriotutkimusta vuodessa. (EpsHP 2017.)

EPSHP:n laboratorio-ohjekirjassa folaattinäytteet ohjeistetaan suojaamaan valolta. Kaikkien Suomen laboratorioiden ohjeet eivät kuitenkaan ole valolta suojauksen suhteen yhtenevät. Tarkoituksena on tutkia, vaikuttaako valoaltistus kokoveri- ja seeruminäytteen folaattipitoisuuteen Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön käyttämissä menetelmissä. Nykyisen ohjeen mukaan näytteet suojataan valolta, käärimällä niiden ympärille foliosuoja. Opinnäytetyössä verrataan valoaltistuksen saaneita kokoveri- ja seeruminäytteitä foliosuojalla valolta suojattuihin näytteisiin. Tarkoituksena on seurata pitoisuuksia 24 tuntiin saakka, jolloin saadaan selville, voitaisiinko folaattinäytteiden valosuojauksesta luopua.

Foliosuojasta luopuminen lisäisi luotettavuutta saatuihin tuloksiin, sillä tämän hetkisen ohjeistuksen vuoksi tuloksien luotettavuutta tulee epäillä, mikäli valosuojauksesta on laiminlyöty. Suojauksesta luopumisen myötä laboratorioprosessi helpottuisi, sillä folaattinäytteet eivät vaatisi foliokääreen asettamista näytteenoton jälkeen, eikä valolta suojauksen huolehtimista analysointi vaiheessa. Valosuojauksesta luopuminen folaattinäytteiden kohdalla vähentäisi myös huomattavasti folioroskan määrää laboratoriossa.

2 FOLAATTI JA SEN MERKITYS ELIMISTÖSSÄ

Folaatti on B-ryhmän vitamiineihin kuuluva vitamiini. (Aro 2015.) Ihmisellä folaattia ei syntetisoidu itsestään, mutta sitä saadaan normaalisti ravinnosta riittävästi. (Vilpo & Niemelä 2003, 300.) Ihmisen elimistö tarvitsee normaalisti folaattia vähintään 50 µg päivässä. Saantisuositus on 3 µg painokiloa kohti päivittäin. Folaatin tärkeimpiä lähteitä ovat maksa ja vihreät kasvikset sekä marjat. Elimistö pystyy varastoida folaattia 3-4 kuukauden tarpeeseen, mutta mikäli folaatin tarve kasvaa tai sen saanti loppuu, ilmenee puute hyvin nopeasti. (Mäkinen ym. 2012, 420; Porkka ym. 2015, 183.) Suurin osa folaatista varastoituu maksaan. (Harmening 2009, 145.)

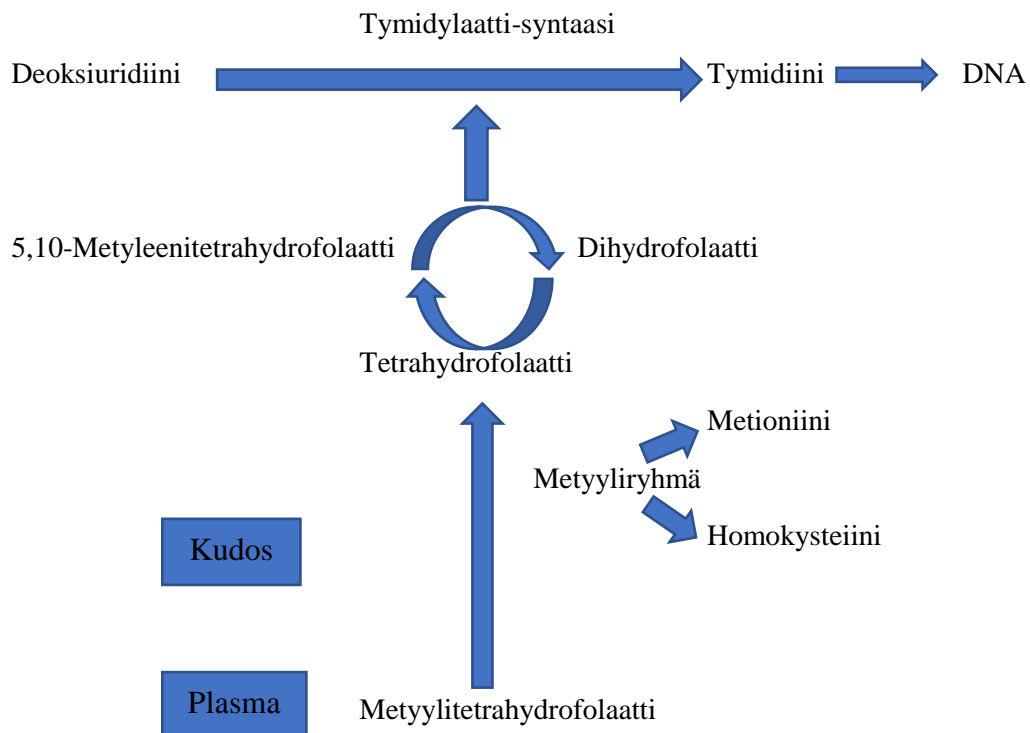
2.1 Folaatin rakenne ja tehtävät

Foolihapon eli pteroyylimonoglutamaatin perusrakenteeseen kuuluu pteridiini, para-aminobentsoaatti ja L-glutamiinihappo. (Porkka ym. 2015, 183.) Perusrakenteesta saadaan aktiivisia folaatteja liittämällä molekyyliin glutamaatteja, pelkistämällä molekyyli tetrahydrofolaatiksi ja liittämällä siihen hiilen fragmentti. (McKenzie & Williams 2015, 283.) Folaatin aktiivinen koentsyymimuoto aineenvaihdunnassa on tetrahydrofolaatti. (Aro 2015.)

Folaatin metyyli-folaatti muodot imeytyvät ohutsuolen alkuosasta passiivisesti ja muut monoglutamaatit aktiivisen kuljetuksen avulla. (Mäkinen ym. 2012, 420.) Ilman suolinukan entsyymien aiheuttamaa polyglutamaattien hydrolysoitumista monoglutamaatiksi, imeytymistä ohutsuolesta ei tapahdu. Folaatti muuttaa muotonsa suolen soluissa takaisin polyglutamaateiksi, mutta siirryttäessä verenkiertoon hydrolysoituu polyglutamaatit monoglutamaateiksi. (Porkka ym. 2015. 184.)

Plasmassa folaatti tavataan metyyli-tetrahydrofolaattimonoglutamaattina ja se on joko vapaana tai sitoutunut heikosti ja epäspesifisesti plasman proteiineihin. Folaatti siirtyy plasmaplasma soluihin spesifisen reseptorin välityksellä metyyli-tetrahydrofolaatti muodossa. (Porkka ym. 2015, 184.) Kun metyyli-tetrahydrofolaatti imeytyy verenkierrosta kudoksiin, se luovuttaa metyyli-ryhmän homokysteiniin muodostaen metioniinin ja tetrahydrofolaatin. Tetrahydrofolaatti metyloidaan koentsyymi metyleenitetrahydrofolaatiksi,

joka luovuttaa metyyliryhmän tymidylaatti-syntaasissa deoksiuridiinimonofosfaatille mahdollistaen DNA-synteesin (kuvio 1). (Harmening 2009, 143,146.)



KUVIO 1. Folaatin rooli DNA-synteesissä (Harmening 2009, muokattu)

2.2 Kliininen merkitys

Yleisimpiä folaatin puutteen aiheuttajia ovat folaatin puutteellinen saanti useimmiten yksipuolisen ravinnon vuoksi ja puutteellinen imeytyminen, joka voi johtua suolistosairauksista, kuten keliakiasta tai synnynnäisestä foolihapon imeytymishäiriöstä. Myös folaatin lisääntynyt tarve tai menetys aiheuttaa elimistön folaatin puutteen. Tarvetta voi lisätä raskaus sekä tilat, joissa solun jakautuminen on lisääntynyt. Maksasairaus tai sydämen vajaatoiminta voi lisätä folaatin menetystä, sillä näissä sairauksissa folaatin varastoituminen maksaan vähenee. Lääkkeet ja toksiset aineet voivat häiritä folaatin metaboliaa ja näin aiheuttaa folaatin puutetta elimistöön. Jotkut lääkeaineet ovat dihydrofoolihapporeduktaasin estäjiä ja niiden käytön on huomattu vaikuttavan folaatin metaboliaan kielteisesti. Dihydrofoolihapporeduktaasin estäjiä ovat esimerkiksi metotreksaatti, triamtereeni ja trimetopriimi. Epilepsialääkkeet voivat häiritä folaatin imeytymistä suolistosta tai saada maksan entsyymien avulla aikaan folaatin aineenvaihdunnan kiihtymistä. Alkoholin

käyttö vähentää folaatin imeytymistä, estää sen kiertoa elimistössä ja lisää erityistä virtsaan. (Porkka ym. 2015, 187-189.)

Folaatti yhdessä B12-vitamiinin kanssa ovat välttämättömiä metioniinisyntaasin kofaktoreita, jotka muuntavat homokysteiinin metioniiniksi mahdollistaen DNA:n synteesin. (Harmening 2009, 147.) Folaatin puute aiheuttaa näin DNA-synteesin häiriön. (Mäkinen ym. 2012, 420.) Vähimmäismäärä folaattia veressä normaalin DNA-synteesin säilymiseksi on noin 4 ng/ml . (Harmening 2009, 148.) Folaatin puute estää tymidiinitrifosfaatin muodostumisen ja näin DNA-synteesi häiriintyy. Folaattia tarvitaan koentsyyminä sellaisissa reaktioissa, joissa yhden hiilen sisältävä rakenneosa siirretään molekyylistä toiseen. Plasmaan sitoutunut folaatin varastomuoto metyylietrahydrofolaatti tarvitsee koentsyymikseen B12-vitamiinin johdoksen, jotta se pystyy muodostaa metyleenetrahydrofolaatin. Tämän reaktion vuoksi folaatti jää elimistölle hyödyttömään varastomuotoon ilman B12- vitamiinia. (Vilpo 2005, 68-69; Porkka ym. 2015, 184-185.)

Folaatin puutteesta johtuvat DNA-synteesin häiriöt voivat aiheuttavat megaloblastista anemiaa. (Porkka ym. 2015, 182.) Folaatin puutoksessa megaloblastista anemiaa aiheuttaa DNA:n tuottamisessa kofaktorina toimivan tetrahydrofolaatin polyglutamaattimuodon tuotannon inhibointi. (Bain ym. 2012, 203-204.) Folaatin puute raskaana ollessa saattaa aiheuttaa lapselle hermostoputken sulkeutumishäiriöitä homokysteiinimetabolian häiriintyessä. (Porkka ym. 2015, 668.) Hermostoputken sulkeutumishäiriöt ovat synnynnäisiä epämuodostumia, jotka kehittyvät mikäli äidin folaatti pitoisuus ei ole riittävä neljän ensimmäisen raskausviikon aikana. (Stefanovic & Nieminen 2010.) Lisääntynyt folaatin puutteen esiintyvyys raskaana olevilla naisilla todennäköisesti johtuu folaatin vähäisistä varastoista elimistössä. Suurentunut plasmavolyymi ja tehostunut munuaispuhdistuminen voi myös olla raskaana olevien folaatin pitoisuuden pienentymisen syynä. (Moore, Knight, Blann. 2010, 129.)

2.3 Laboratoriotutkimukset

Folaattia voidaan tutkia sekä seerumista että kokoveren punasoluista. Erytrosyyttien eli punasolujen folaattipitoisuuden mittaamiseen potilaasta otetaan laskimosta kokoverinäyte EDTA-putkeen. Tutkimuksen tutkimuslyhenne on fE-Folaat. Seerumin folaattipitoisuutta määritettäessä potilaasta otetaan laskimoverinäyte seerumigeeliputkeen. Seeru-

minäytteen tutkimuslyhenne on fS-Folaat. Tutkimuslyhenteiden edessä oleva pieni f-kirjain tarkoittaa, että näytteen tulee olla paastoverinäyte. Paastonäytettä varten potilaan tulee olla syömättä 10-12 tuntia. Paaston aikana saa nauttia enintään 2 dl vettä, sillä sitä suuremmat nestemäärät voivat muuttaa plasmatilavuutta. Veren vitamiinipitoisuudet, kuten folaattipitoisuus, voi nousta, mikäli potilas on syönyt ennen näytteenottoa. Näytteenotossa potilaan tulee istua, sillä seisomaan noustessa veren hematokriitti kohoaa. (Matiainen ym. 2010, 19-20.) Määritettäessä punasolujen folaattia, tulee näytteestä määrittää myös hematokriitti. Hematokriitti kertoo punasolujen tilavuusosuuden kokoverinäytteen tilavuudesta. (Porkka ym. 2015, 90.) Kokoverta analysoitaessa saatu folaattipitoisuus jaetaan näytteen hematokriittiarvolla, jolloin saadaan folaatin määrä suhteessa potilaan punasoluihin. (Roche Diagnostics 2013a.) Taulukossa 1 on esitetty folaatin viitearvot, joita käytetään EPSHP:n laboratorioissa. (Folaatti 2017.)

TAULUKKO 1. Folaatin viitearvot (Folaatti 2015.)

Laboratoriotutkimus	Viitearvot
fE-Folaat	1187 - 2854 nmol/l
fS-Folaat	7.0 – 40.0 nmol/l

Punasolujen folaattipitoisuus kuvastaa elimistön folaattivarastojen määrää, sillä folaatti kertyy punasoluun solun syntyessä. Punasolujen folaatti arvo voi kuitenkin pysyä pitkään tavoitearvoissa, vaikka elimistössä olisi folaatin puute, sillä punasoluilla on pitkä elinikä. Punasolut elävät verenkierrossa noin 120 vuorokautta. Punasolujen keräämä folaatti pitoisuus kuvastaa folaatin määrää useamman kuukauden ajalta. Folaatin kertyminen punasoluihin on riippuvainen B12-vitamiinista, minkä vuoksi seerumin ja punasolujen folaattipitoisuudet voivat erota toisistaan rajusti. B12-vitamiiniin puutteessa punasolujen folaattipitoisuus on seerumin pitoisuutta pienempi. (Porkka ym. 2015, 23, 193-194.) Potilailla, joilla on vakava B12-vitamiinin puutos, on myös alhainen punasolujen folaattipitoisuus, koska B12-vitamiinin puutoksesta johtuva heikentynyt metioniinisynteesi johtaa metyyli-tetrahydrofolaattimonoglutamaatin kerääntymisen plasmaan. Metyyli-tetrahydrofolaattimonoglutamaatti diffundoituu soluista plasmaan ja aiheuttaa korkean folaattipitoisuuden seeruminäytteessä. (Bain ym. 2012, 213.)

Punasolujen folaattipitoisuus kertoo koko folaatin pitoisuuden kudoksessa, sillä yli 95% folaatista esiintyy punasoluissa. Joissakin harvinaisissa tapauksissa erytrosyyttien folaattipitoisuus on matala, mutta seerumin pitoisuus korkea. Näissä tapauksissa erytrosyyttien

folaatikonsentraatio voidaan korjata käyttäen apuna seerumin folaatikonsentraatiota ja hematokriittiarvoa. (Roche Diagnostics 2013a.) Seerumin folaattipitoisuus reagoi muutamassa päivässä folaatin saannin muutoksiin. Seerumin folaattipitoisuuden laskeminen on varhaisin muutos folaatin puutteesta, mutta se ei ole todellinen elimistön folaattimäärä, sillä folaatti varastoituu punasoluihin. (Porkka ym. 2015,193-194.)

2.4 Preanalytiikka ja virhelähteet

Muutokset näytteessä alkavat heti näytteenoton jälkeen, mutta tavoitteena on saada tutkimustulos, joka kuvastaisi elimistön tilaa näytteenottohetkellä. EPSHP:n laboratorio-ohjeiden mukaan folaattinäytteet otetaan joko EDTA- tai seerumigeeliputkeen. Näytteet suojataan heti näytteenoton jälkeen valolta käyttäen foliosuojaa putken ympärillä kuten kuvassa 1. (Folaatti 2017.)



KUVA 1. EDTA-putki foliolla valolta suojattuna (Mäki-Pantti 2018.)

Seerumigeeliputket tulee sentrifugoida $\frac{1}{2}$ - 1 h kuluttua näytteenotosta, sillä seeruminäytteessä solujen sisäiset ainesosat siirtyvät seerumiin, mikäli näytettä säilytetään sentrifugoimatta. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 114.) Folaatin seeruminäytteiden sentrifugoinnin viivästyminen voi siis johtaa siihen, että punasolujen sisällä oleva folaatti siirtyy seerumiin antaen virheellisen korkean seerumin folaattipitoisuuden. EPSHP:n kliini-

sen kemian toimintayksikön ohjeiden mukaan folaattinäytteet tulee lähettää kylmälähettyksenä. (Folaatti 2017.) Kylmälähettyksen vaativat näytteet pakataan eristelaatikkoon, jossa on kylmävaraajat. Näytteet eivät saa olla kosketuksissa kylmävaraajien kanssa, mutta lämpötilan tulee pysyä laatikossa noin neljässä asteessa. Näytteet säilytetään ja lähetetään pystyasennossa. Kuljetuksessa näytteisiin kohdistuva värinä voi aiheuttaa näytteen hemolysoitumista, mikä voi aiheuttaa folaatin vapautumisen punasoluista plasmaan. (Tuokko ym. 2008, 116-117.)

EDTA-kokoverinäyte säilyy folaattimääritystä varten neljä vuorokautta jääkaapissa ja viikon pakastettuna. Hematokriitti tulee määrittää näytteestä ennen pakastamista. (Folaatti 2017.) Tutkimuksena perusverenkuva sisältää hematokriitin määrityksen, B-HKR, ja se tulisi analysoida näytteestä 24 tunnin kuluessa näytteenotosta. Folaatin seeruminäyte säilyy viikon jääkaapissa ja kuukauden pakastettuna. (Folaatti 2017. Perusverenkuva ja trombosyytit 2014.)

3 ROCHEN COBAS 8000® -ANALYSAATTORI

EPSHP:n kliinisen kemian laboratoriossa folaattinäytteet analysoidaan Cobas 8000 -automaattioradan e602 -yksiköllä, jonka folaatin mittaumenetelmä on elektrokemiluminessimmunoanalyysi (ECLIA). Määrityksessä käytetään kilpailukykyistä testiperiaatetta. Kilpailukykyisessä testiperiaatteessa käytetään spesifistä folaattiin sitoutuvaa proteiinia, jonka kanssa näytteessä oleva folaatti kilpailee sitoutumiskohdista. (Roche Diagnostics 2013a, 2015.)

3.1 Cobas 8000

Cobas ® 8000 -analysointia käytetään kemian ja immunokemian analyysien mittaamiseen. Analysointikonaisuus voidaan rakentaa laboratorion tarpeiden mukaan enintään neljästä analysointiyksiköstä. Analysointiyksiköt voivat olla kemian yksiköitä c702, c701 tai c502 sekä immunokemian yksikkö e602 ja e801. Lisäksi analysointia kuuluu keskusyksikkö, kontrolliyksikkö ja ISE-yksikkö. Keskusyksikköön kuuluu näytteiden manuaalinen sisään syöttö sekä ulosvienti, näytteiden kuljetus ja säilytys. ISE-yksikössä analysoidaan kalium, natrium ja kloridi. ISE yksikössä on käytössä elektrolyyttinen mittaussyksikkö. Kliinisen kemian analysointia analysoidaan 57 erilaista kemian analyysiä fotometrisellä menetelmällä ja analysointia c502 mittaa myös kokoverestä esim. Ghb-A1C:n eli glykoituneen hemoglobiinin. Analysointiyksikkö e602 analysoi heterogeenisiä immunoanalyysijä käyttäen määritysmenetelmänä ECLIA:a eli elektrokemiluminometrissäimmunoanalyysiä. Analysointia varten pipetoitava näytemäärä on 1,5–35 µl. (Roche Diagnostic 2013b.)

3.2 Folaatin analysointi

Kokoverestä folaattia mitattaessa erytrosyytit hajotetaan askorbiinihapon avulla niiden sisältämän folaatin vapauttamiseksi. Askorbiinihappoa pipetoidaan käsin 3,0 ml tyhjiin laimennosputkeen ja siihen lisätään 100 µl joko EDTA- tai hepariinikokoverta. Laimennuksen annetaan inkuboitua 90 minuuttia huoneenlämmössä, jolloin erytrosyytit hajoavat

ja vapauttavat folaatin sisältään. Näyte tulee analysoida kahden tunnin sisällä inkubointiajan päätyttyä. (Roche 2013a, 2015.)

Hemolysoitu näytelaimennos sekoitetaan ennen analysointia Cobas e602-analysaattorilla. Tähän hemolysoituun näytteeseen lisätään analysaattorissa kahta esikäsitteilyreagenssia, jotka irrottavat folaatin sitä sitovasta proteiinista. Ruteniumilla leimattua folaattia sitovaa proteiinia inkuboidaan esikäsiteltyyn näytteeseen, jolloin muodostuu leima-folaattikompleksi. Kompleksien määrä riippuu folaatin konsentraatiosta näytteessä. Seuraavassa vaiheessa näyteastiaan lisätään streptavidiinilla päällystettyjä mikropartikkeleita ja biotiinilla leimattua folaattia. Biotiinilla leimattu folaatti kiinnittyy vapaisiin ruteneumilla leimattuihin folaattia sitoviin proteiineihin, joihin ei ole kiinnittynyt näytteestä peräisin olevaa folaattia. Muodostuneet kompleksit kiinnittyvät mikropartikkeleihin biotiinin ja streptavidiinin välisellä sidoksella. Reaktioseos siirretään mittaussolulle, jossa mikropartikkelit kiinnittyvät magneettisesti elektrodin pinnalle ja kiinnittymätön aines pestään pois. Pesun jälkeen elektrodiin johdettu jännite ja reaktiopuskuri aikaansaavat kemiluminesenssireaktion. Muodostunut valon määrä on kääntäen verrannollinen näytteessä olevaan folaattipitoisuuteen. Tulokset määritetään kalibrointikäyrän avulla käyttäen kahden pisteen kalibrointia. Folaatin analysoiminen seerumista ei vaadi näytelaimennoksen pipetointia. (Roche 2013a, 2015.) Analysaattori pipetoi seeruminäytteen, kuten kokoverinäyte laimennoksen.

3.3 Virhelähteet

Seerumin folaattipitoisuutta ei voida määrittää hemolysoituneesta näytteestä, sillä hemolyyysi nostaa merkittävästi folaattiarvoja. Tämä johtuu punasolujen suuresta folaattipitoisuudesta, joka vapautuu seerumiin punasolujen hajotessa antaen virheellisen korkeita seerumin folaattipitoisuuksia. Ikteerisyys ja lipeemisyys ei vaikuta analysoinnissa tapahtuviin reaktioihin mitattaessa folaattia erytrosyyteistä tai seerumista. (Roche 2013a, 2015.) Lipeemisyys tarkoittaa näytteen rasvaisuutta ja ikteerisyys näytteen keltaisuutta. Punasolusiirrot sekä retikulosytoosi eli retikulosyyttien lisääntynyt määrä verenkierrossa voivat aiheuttaa virheellisesti normaaleja punasolujen folaattipitoisuuksia. Retikulosyyttien folaattipitoisuus on punasolujen pitoisuutta suurempi. Retikulosyytit ovat nuoria punasoluja, joilta puuttuu tuma. (Porkka ym. 2015, 91.) Seerumin folaattipitoisuus voi olla virheellisesti tavoite arvoissa, mikäli potilas on korjannut ruokavaliotaan muutama päivä

ennen näytteenottamista. Tällöin elimistön folaattivarastot eivät ole täyttyneet, ja elimistö kärsii folaatin puutteesta. (Porkka ym. 2015, 194.)

Folaatin mittaamista häiritseviä lääkeaineita ovat leukovoriini, joka on foolihapon johdannainen (Lääketieteen sanasto. 2017.) sekä niveltulehdusta rauhoittava (Reumaliitto. 2017.) metotreksaatti. Analyysissä olevat folaatille spesifiset proteiinit sitovat näitä yhdisteitä, jolloin tulos saattaa olla liian korkea. (Roche 2013a, 2015.) Antibiooteista Trimetopriimi vaikuttaa folaatin pitoisuuteen, sillä se estää foolihapon muuttumisen aktiiviseen tetrahydrofoolihappo muotoon. (Valmisteyhteenveto. 2016.) Folaattia ei tule myöskään mitata sellaisen henkilön verestä, jolle on annettu injektiona lihaksensisäisesti biotiinihoitoa. Tällaisen potilaan näyte tulee ottaa vähintään kahdeksan tuntia viimeisen biotiini-injektion antamisen jälkeen. (Roche 2013a, 2015.)

4 AIEMMAT TUTKIMUKSET

Folaattinäytteiden säilyvyyttä valo altistuksessa on tutkittu aikaisemminkin, mutta tutkimusasetelmat ovat vaihdelleet. Jo 25 vuotta sitten *Clinical Chemistry* -lehdessä julkaisussa artikkelissa ”Effect of Light on Serum B12 and Folate Stability” Mastropaolo ja Wilson kirjoittavat tutkimuksestaan B12-vitamiinin ja folaatin säilyvyydestä. Tutkimuksen tutkimusaineisto oli pieni, vain yhdeksän verinäytettä, ja tutkimuksessa tutkittiin vain seeruminäytteitä. Tutkimusnäytteitä säilytettiin huoneenlämmössä, suojaten rinnakkaisista putkista toinen valolta ja altistaen toinen valolle. Näytteet analysoitiin näytteenoton jälkeen 8 ja 24 tunnin kuluttua. Tutkimuksen tulosten mukaan folaattinäytteet voidaan altistaa valolle 8 tunnin ajan ilman kliinisesti merkittävää pitoisuuksien muutosta. (Mastropaolo & Wilson 1993.)

Laboratory Medicine -lehdessä vuonna 2009 julkaistun artikkelin ”Effect of Light on Vitamin B12 and Folate” ovat kirjoittaneet Clementin ja Kendallin. Tutkimuksessa tutkittiin valon vaikutusta sekä B12-vitamiinin että folaatin pitoisuuksiin. Tutkimuksen tutkimusaineisto vastasi kooltaan hyvin tämän opinnäytetyön aineistoa, sillä näytteitä oli kerätty 25 perusterveeltä vapaaehtoiselta. Clement ja Kendall myös tutkivat rinnakkaisia putkia suojaten toisen putken valolta, mutta tutkimuksessa tutkittiin vain seeruminäytteitä. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa, ja pitoisuudet mitattiin sentrifugoinnin jälkeen seuraavan kerran vasta 1, 2 ja 7 vuorokauden kuluttua. Tutkimus tehtiin elektrokemiluminenssi-immonomäärityksellä eikä valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä ilmennyt merkittävää pitoisuuseroa. Clementin ja Kendallin tutkimustulosten mukaan B12-vitamiini- ja folaatti-näytteiden valolta suojaaminen ei ole välttämätöntä. (Clement & Kendall 2009.)

Heikkisen ja Salon folaatin, B12-vitamiinin ja D-vitamiinin säilyvyyttä käsittelevän opinnäytetyön Itä-Suomen laboratorikeskusliikelaitoskuntayhtymän klinisen kemian laboratoriossa vuonna 2011. Valoaltistuksen vaikutus B12-vitamiinin, 25-OH-D-vitamiinin ja folaatin pitoisuuksiin plasma-, seerumi- tai kokoverinäytteissä tutkimukseen osallistui vain kymmenen vapaaehtoista. Opinnäytetyössä tutkittiin seerumin folaattipitoisuuksia ja punasolujen folaattipitoisuuksia. Tutkimuksessa näytteet analysoitiin 4, 8 ja 24 tunnin kuluessa näytteiden valolle altistuksesta. Tutkimustulosten mukaan folaatin pitoisuutta seerumista analysoitaessa tulisi näyte suojata valolta, mutta valolta suojausta ei tarvittaisi

kokoverinäytteen ympärille analysoitaessa folaattia punasoluista. (Heikkinen & Salo 2011.)

Tuorein tutkimus folaatin säilymisestä on Metropolian ammattikorkeakoulussa vuonna 2012 tehty opinnäytetyö Seerumi- ja kokoverinäytteiden folaatin säilyvyys, jonka on kirjoittanut Jägerroos ja Parvila. Tämän tutkimuksen päätarkoitus oli säilyvyystutkimus folaattipitoisuuden suhteen, mutta Jägerroos ja Parvila analysoivat rinnakkaiset valolta suojatun ja suojaamattoman seerumi- ja kokoverifolaattinäytteen vuorokauden kuluttua näytteenotosta. Tutkimustulosten mukaan folaattipitoisuudet eivät eronneet valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä merkittävästi. (Jägerroos & Parvila 2012.)

5 TAVOITTEET, TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää, vaikuttaako valoaltistus punasolujen ja seerumin folaattipitoisuuksiin vai voitaisiinko folaattinäytteitä jatkossa säilyttää ilman foliosuojaa. Tavoitteena on tutkia, vaikuttaako seeruminäytteen folaattipitoisuuteen näytteen säilyttäminen sentrifugoimatta. Erilaisten preanalyyttisten käytäntöjen vuoksi jokaisen näytteen valoaltistuksesta ei ole ollut varmuutta.

Opinnäytetyön tutkimuksen tarkoituksena on verrata valolle altistuneiden kokoveren ja seerumin folaattipitoisuuksia vastaaviin foliosuojassa olleisiin näytteisiin. Kokoverinäytteiden folaattipitoisuudet analysoidaan tunnin sisällä näytteenotosta ja sen jälkeen neljän, kahdeksan sekä 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. Seeruminäytteiden folaattipitoisuudet analysoidaan heti ½ -1 tunnin seisotuksen ja sentrifugoinnin jälkeen sekä kahden, neljän, kahdeksan ja 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. Opinnäytetyön tarkoituksena on lisäksi selvittää kuusi tuntia sentrifugoimatta olleiden seeruminäytteiden folaattipitoisuuksien säilyvyys verrattuna puolen tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen seeruminäytteiden pitoisuuteen.

Tutkimuskysymykset:

1. Muuttuuko punasolujen folaattipitoisuus eri aikapisteissä, kun näyteputkea säilytetään valolta suojaamattomana?
2. Muuttuuko seerumin folaattipitoisuus eri aikapisteissä, säilytettäessä sentrifugoitua seerumigeeliputkea valolta suojaamattomana?
3. Muuttuuko seerumin folaattipitoisuus, jos seerumigeeliputki sentrifugoidaan vasta kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta säilyttäen sitä valossa tai valolta suojattuna?

6 TUTKIMUSMENETELMÄ

Tutkimus tehdään kvantitatiivisena eli määrällisenä tutkimuksena, jonka tutkimusaineisto koostuu vapaaehtoisilta kerättyjen näytteiden punasolujen ja seerumin folaattipitoisuuksista, sekä niiden muutoksista eri aikapisteissä. Opinnäytetyössä käytetään kokeellista tutkimustapaa. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään tutkimaan tutkitun muuttujan eli mitattavan ominaisuuden vaikutusta tuloksiin muiden tekijöiden ollessa vakioitettuja. Kokeellisessa tutkimuksessa tarvitaan koeryhmä ja vertailuryhmä. (Heikkilä 2014, 13, 15-19.) Opinnäytetyön tutkimuksessa koeryhmän ja vertailuryhmän muodostavat rinnakkaiset verinäyteputket. Koeryhmäputket altistetaan laboratoriovalolle, jolloin niihin vaikuttaa koemuuttuja. Vertailuryhmäputket säilytetään valolta suojattuna foliokääreellä, jonka vuoksi vertailuryhmäputkelta puuttuu koemuuttujan vaikutus. Opinnäytetyön tutkimuksen kohteena on folaattinäytteiden säilytysolosuhteiden vaikutus analyysin pitoisuuteen.

Tutkimuksessa tarkastellaan folaattinäytteiden pitoisuuksien muutoksia, säilytettäessä näytteitä valolta suojattuna tai altistettuna valolle. Eroprosentti kertoo, kuinka monta prosenttia saman aikapisteen valolta suojatun ja valolta suojaamattoman näytteen folaattipitoisuudet eroavat toisistaan. Suurin sallittu ero% EPSHP:n sisäisessä näytevertailussa folaatin mittausmenetelmille on 10%. Eroprosentit (e%) on laskettu kaavalla (1), joka esitetään alla.

(1)

$$e\% = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a = foliolla valolta suojatun näytteen folaattipitoisuus

b = valolta suojaamattoman näytteen folaattipitoisuus

Hajontakuvioiden eli korrelaatiodiagrammien avulla voidaan selvittää tarkasteltavien arvojen yhteyden voimakkuus, muoto ja suunta. (Holopainen & Pulkkinen 2015, 229.) Hajontakaaviossa havaitun säännönmukaisuuden lisäksi muuttujien välistä yhteyttä voidaan tutkia laskemalla muuttujien välinen korrelaatiokerroin. Korrelaatiokerroin (R^2) ilmaisee kahden muuttujan välistä riippuvuutta. Korrelaatiokerroimen ollessa nolla lineaarista riippuvuutta ei ole. Korrelaatiokerroin (R^2) saa arvon -1:n ja +1:n väliltä, riippuen siitä

onko pisteet nousevalla vai laskevalla suoralla. Negatiivisen arvon saadessa korrelaatiokerroin tarkoittaa tilannetta, jossa toisen muuttujan arvojen kasvaessa toisen muuttujan arvot pienenevät. Kertoimen ollessa positiivinen molempien muuttujien arvot muuttuvat samaan suuntaan. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013, 138.) Tutkimusarvojen korrelaatiokertoimen ollessa yksi, arvojen välinen lineaarinen yhteys on vahva ja kertoimen ollessa lähellä nollaa arvot ovat riippumattomia. (Heikkilä 2014, 90-91.) Korrelaatiota pidetään tilastollisesti voimakkaana sen ollessa arvoltaan $\geq 0,8$. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013, 138.)

Yleisin käytetty korrelaatiokerroin on Pearsonin korrelaatiokerroin. Pearsonin korrelaatiokertoimella voidaan tarkastella tutkimusarvoista muodostettuja pareja sekä mitata arvojen lineaarista yhteyttä. Korrelaatiokerroin on herkkä poikkeaville arvoille etenkin pienissä aineistoissa. Tällöin yksi poikkeava arvo voi muuttaa korrelaatiokertoimen arvon. (Holopainen & Pulkkinen 2015, 233-235.)

Lisäksi korrelaatiokertoimen arvo testataan laskemalla p-arvo. P-arvon avulla saadaan selville, kuinka suuri on väärän johtopäätöksen todennäköisyys eli todennäköisyyttä sille, että tutkimuksella saatu tulos johtuu sattumasta. Hylkäämisvirheen todennäköisyys eli merkitsevyystaso saa opinnäytetyö tasoisessa tutkimuksessa olla yleensä 5 %. Myös tässä opinnäytetyössä on käytetty merkitsevyystasona 5 %. Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevää, jos korrelaatiokerrointa vastaava p-arvo on käytettyä merkitsevyystasoa pienempi. (Heikkilä 2014, 184, 192-195, Holopainen & Pulkkinen 2014, 176–177, 242.)

7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyön suunnitelma tehtiin keväällä 2017, kun aihe opinnäytetyöhön oli saatu. Kirjallisen työ kirjoittaminen aloitettiin syksyllä 2017 ja opinnäytetyön tutkimusaineisto kerättiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa 9.1-11.1.2018. Näytteet kerättiin kahtena aamuna kymmeneltä vapaaehtoiselta työntekijältä. Näytteitä kerättiin siis yhteensä kahdeltakymmeneltä vapaaehtoiselta työntekijältä. Jokaiselta vapaaehtoiselta otettiin laskimoverta kaksi EDTA-putkea ja neljä seerumigeeliputkea. Putket merkittiin 5-numeroisella tunnisteella sekä viivakooditarroilla ja jokaisen vapaaehtoisesta yksi kokoveriputki sekä kaksi seerumiputkea suojattiin valolta foliokääreellä. Näytteet analysoitiin Cobas® e602-immunokemiananalysaattorilla. Punasolujen folaatin analysointimenetelmä kontrolloitiin aamulla kahdella kontrollilla ja seerumin folaatin analysointimenetelmä kontrolloitiin kaksi kertaa päivässä, iltapäivällä yksi taso ja yöllä kaksi tasoa.

Putkien viisinumeroinen tunniste muodostui näytemateriaalin, potilaan ja valosuojauksen tai valoaltistuksen mukaan. Viimeisenä numerona oli tuntimäärä, jolloin näyte analysoitiin. Jokaiselle analysoinnille kaikille näytteille tehtiin uudet pyynnöt ja näyteputkiin asetettiin uudet tarrat. Esimerkiksi yhden vapaaehtoisesta potilaan kaksi kokoveriputkea merkittiin numeroin 71030 ja 72030, jossa seitsemän tarkoitti näytteen olevan kokoverinäyte, ykkönen merkitsi, että näytettä ei suojata valolta ja numerosarja, jossa toisena numerona oli numero kaksi, tarkoitti saman henkilön rinnakkaista näytettä, joka suojattiin valolta. Potilas merkittiin numeroilla 0-20 numerotunnisteen kolmannessa ja neljännessä numerossa. Viimeinen numero tarkoitti tuntimäärää, joka oli kulunut näytteenotosta. Ensimmäisestä analysoinnista käytetään 0h-nimitystä, vaikka todellisuudessa näytteenotosta oli kulunut enintään 1 tunti. Viimeisessä ajossa 24h kuluttua näytteenotosta viimeisen numeron kohdalla oli numero yksi. Puolen tunnin kuluttua sentrifugoitujen seerumiputkien tunnistenumerot muodostuivat kuten kokoveriputkien, mutta ensimmäisenä numero käytettiin kolmosta. Aiempana esimerkkinä käytetyn potilaan seerumiputkien tunnistenumerot olivat tunnin sisällä näytteenotosta analysoitaessa 31030 ja 32030. Myöhemmin sentrifugoitujen näyteputkien tunnistenumero alkoi numerolla neljä ja muodostui muuten, aiemmin kerrotulla tavalla.

Jokaisen vapaaehtoisen yksi valolta suojattu ja yksi valolta suojaamaton seeruminäyte sentrifugoitiin ½ - 1 tunnin kuluttua näytteenotosta. Toiset seeruminäytteet, joista toinen oli suojattu valolta ja toinen ei, sentrifugoitiin vasta kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta. Taulukossa 2 on kerrottuna näytteiden kulku tutkimuksessa.

TAULUKKO 2. Näytteiden kulku tutkimuksessa

Näyteputki	Säilytys	Sentri- fugointi	Analysointiajat
EDTA x2	Jääkaapissa säilytettynä toinen putki suojattuna valolta foliokääreellä ja toinen altistettuna valolle		0 h (1 h), 4 h, 8 h ja 24 h kuluttua näytteenotosta.
Seerumigeeli x2	Jääkaapissa säilytettynä toinen putki suojattuna valolta foliokääreellä ja toinen altistettuna valolle	½ -1h näytteen- otosta	Heti sentrifugoinnin jälkeen ja 2 h, 4 h, 8 h sekä 24 h kuluttua näytteenotosta.
Seerumigeeli x2	Huoneenlämmössä säilytettynä sentrifugoimattomana ja sentrifugoinnin jälkeen jääkaapissa säilytettynä toinen putki suojattuna valolta foliokääreellä ja toinen altistettuna valolle	6 h näytteenotosta	8 h kuluttua näytteenotosta.

Kokoverestä tehtiin hemolysaatit tunnin sisällä näytteenotosta, sekä neljän, kahdeksan ja 24 tunnin kuluttua. Hemolysaatit tehtiin erotteluputkiin. Kokoveri hemolysoidaan askorbiinihapon avulla, että folaatti saadaan vapautettua punasolun sisältä. Valosuojauksessa olevat hemolysaattiputket suljettiin laatikkoon 90 minuutin inkuboinnin ajaksi. Valoaltistuksessa olevat hemolysaattiputket olivat inkubointiajan pöydällä. Nämä putket suojattiin kelmulla haihtumisen estämiseksi. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa, josta ne otettiin huoneenlämpöön ennen hemolysaattien tekoa. Jääkaapissa oli valot päällä koko tutkimuksen ajan. Hematokriitit määritettiin kokoverinäytteistä ainoastaan ensimmäisten hemolysaat-

tien teon jälkeen, sillä hematokriittiarvo säilyy EDTA-kokoveressä vuorokauden säilytetäessä näytettä jääkaapissa. (Perusverenkuva ja trombosyytit 2014.) Punasolujen folaattipitoisuus laskettiin lopuksi kaavalla (2), joka esitetään alla. (Roche 2013a.)

(2)

$$\text{Punasolujen folaattipitoisuus (nmol/l)} = \frac{E-Fol-osa}{\text{hematokriitti \%}} \times 100$$

Seeruminäytteet analysoitiin sentrifugoinnin jälkeen sekä kahden, neljän, kahdeksan ja 24 tunnin kuluttua näytteenotosta. Valosuojauksessa olevien seerumiputkien foliosuoja poistettiin, kun näytteet laitettiin analysaattoriin. Myös korkit poistettiin seerumigeeliputkista käsin, ennen niiden syöttämistä analysaattoriin. Analysoinnin jälkeen valosuojauksen tarvitsevat putket suojattiin välittömästi foliosuojalla ja kaikki näytteet korkitettiin uusilla korkeilla. Näytteet säilytettiin jääkaapissa, ja ne otettiin huoneenlämpöön ennen analysointia. Seerumigeeliputkista seerumi eroteltiin erotteluputkeen 24 tunnin määrittystä varten, että voitiin varmistaa näytteen laadun säilyminen.

Kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidut seerumiputket analysoitiin kahdeksan tunnin kuluttua näytteenotosta. Näin näytteiden pitoisuuksien muutoksia pystyttiin vertaamaan ½ - 1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen seeruminäytteiden kahdeksan tunnin pitoisuuksiin.

8 SÄILYVYYSTUTKIMUKSEN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa käytetyt kokoveren ja seerumin folaattipitoisuudet eri aikapisteissä sekä valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen väliset prosentuaaliset erot esitetään liitteissä 1 ja 2 olevissa taulukoissa. Eroprosentit on laskettu verraten valolta suojaamatonta näytettä valolta suojattuun. Negatiivinen eroprosentti tarkoittaa, että valolta suojaamattoman näytteen pitoisuus on valolta suojatun näytteen pitoisuutta korkeampi, ja positiivinen eroprosentti tarkoittaa valolta suojaamattoman näytteen pitoisuuden olevan valolta suojatun pitoisuutta matalampi. Eri aikapisteissä analysoitujen rinnakkaisten näytteiden korrelaatiodiagrammit on esitetty liitteessä 3.

8.1 Valon vaikutus punasolujen folaattipitoisuuteen

Punasolujen folaattipitoisuudet on esitetty liitteessä 1. Tuloksia tarkasteltaessa huomataan, että näyte numerolla 11 nousi yli mittausalueen foliolla suojatussa näytteessä neljän tunnin kohdalla, suojaamattomassa näytteessä kahdeksan tunnin kohdalla sekä molemmissa näytteissä 24 tunnin kohdalla. Testin mittausalueen yläraja on 1407 nmol/l, ja näytteen numero 11 tulokset olivat ennen kokonaisfolaatia laskemista ensimmäisessä mittauksessa foliolla suojatussa näytteessä 1340 nmol/l ja suojaamattomassa 1275 nmol/l sekä neljän tunnin kohdalla suojaamattomassa 1406 nmol/l ja kahdeksan tunnin foliolla suojatussa näytteessä 1243 nmol/l. Näyte jätettiin tilastollisen tutkimuksen ulkopuolelle, jolloin tutkimusaineiston näytemääräksi tuli 19 potilaan yksi valolta suojattu ja yksi valolta suojaamaton näyte.

Eroprosentit valolta suojatun ja valolta suojaamattoman näytteen välillä vaihteli -0,14 % eroista 55,02 % eroon. Valolta suojatun ja valolta suojaamattoman kokoverinäytteen välillä olevia prosentuaalisia eroja, jotka ylittävät sallitun 10 % rajan oli tutkimusaineistossa viisi. Tutkimusaineiston korkeista eroprosentteista neljä viidestä saatiin ensimmäisen päivän aikana analysoitujen näytteiden välille. Sallitun eroprosentin ylittävien näytteiden eroprosentit ovat negatiivisia lukuun ottamatta 55,02 % eroprosenttia. Negatiivinen eroprosentti tarkoittaa valolta suojaamattoman näytteen folaattipitoisuuden olevan valolta suojatun pitoisuutta korkeampi. Puolet tutkimuksen näytteiden välisistä prosentuaalisista eroista olivat negatiivisia ja puolet positiivisia. Ensimmäisessä eli 0 tunnin mittauksessa

suurin eroprosentti oli -12,24 %. Neljän tunnin kuluttua näytteenotosta analysoitujen valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden väliset prosentuaaliset erot eivät ole yhdessäkään näytteessä yli 10 %. Korkein prosentuaalinen ero neljän tunnin aikapisteessä analysoitujen näytteiden kohdalla on -9,43 %. Kahdeksan tunnin kuluttua näytteenotosta analysoitujen näytteiden välillä nähdään yksittäinen huomattavasti korkeampi prosentuaalinen ero valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä. Numerolla kahdeksan analysoidun kokoverinäytteen ero valolta suojatun ja valolta suojaamattoman näytteen välillä on -22,6 % kahdeksan tunnin aikapisteessä. 24 tunnin kuluttua näytteenotosta analysoitujen valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden väliset erot vaihtelevat eniten, sillä yli 10 % eroja on kolmen valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä. Suurin prosentuaalinen ero on 55,02 %, mutta samassa aikapisteessä tavataan myös alle 1 % eroja valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä.

Taulukossa 3. on laskettu kokoverinäytteiden valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden prosentuaalisten erojen keskiarvot. Keskiarvot laskettiin muuttamalla eroprosentit positiivisiksi. Laskemalla keskiarvot huomioimatta kumpaanko suuntaan valolta suojaamattoman näytteen pitoisuus muuttui verrattuna valolta suojatun näytteen pitoisuuteen, saadaan koko otoksen muutoksen keskiarvo. 24 tunnin aikapisteen keskiarvoa nostaa näytteen numero 10 valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen folaattipitoisuuksien korkea prosentuaalinen ero, 55,02 %. Valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välisen korkean eroprosentin voi aiheuttaa satunnaisvirhe, ja näytteen numero 10 eroprosentin poistaminen keskiarvosta muuttaa lukeman 5,6 %.

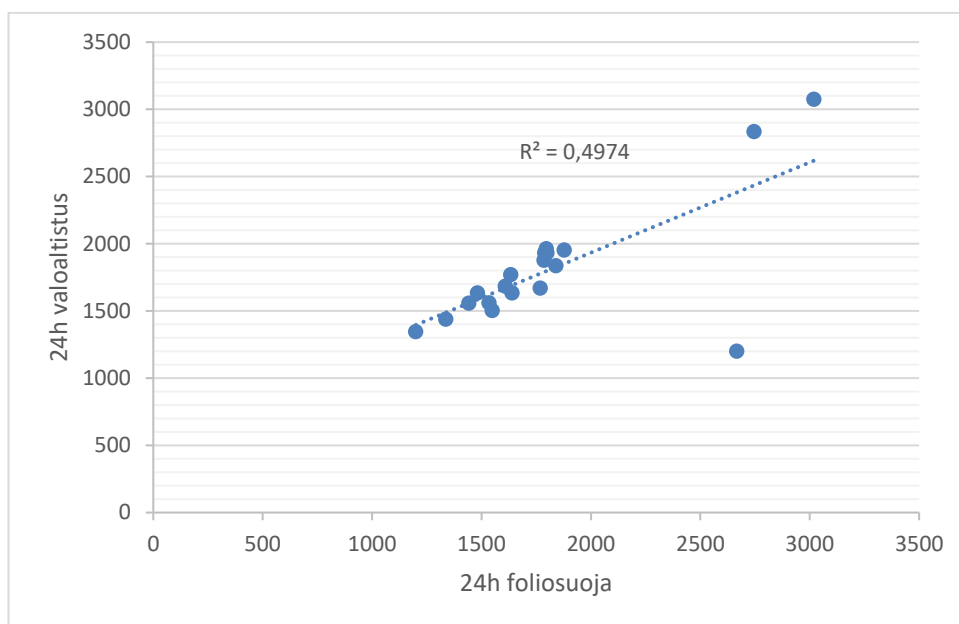
TAULUKKO 3. Kokoverinäytteiden eroprosenttien keskiarvot (n=38)

Aikapiste	0 h	4 h	8 h	24 h
Näytteiden ero- prosenttien keskiarvot	5,4 %	4,2 %	5,1 %	8,2 %

Kokoverinäytteiden korrelaatiokertoimet ovat lähellä lukua yksi ensimmäisessä mittauksessa sekä neljän ja kahdeksan tunnin kohdalla, mutta 24h kohdalla korrelaatiokerroin on huomattavasti pienempi (taulukko 4). Koska korrelaatiokertoimeen vaikuttaa etenkin pienessä aineistossa jo yhden arvon poikkeavuus, voi kyseessä olla yhden näytteen arvojen muutoksen vaikutus koko kertoimeen. Poikkeava arvo näkyy selvästi korrelaatiodiagrammissa kuvio 2.

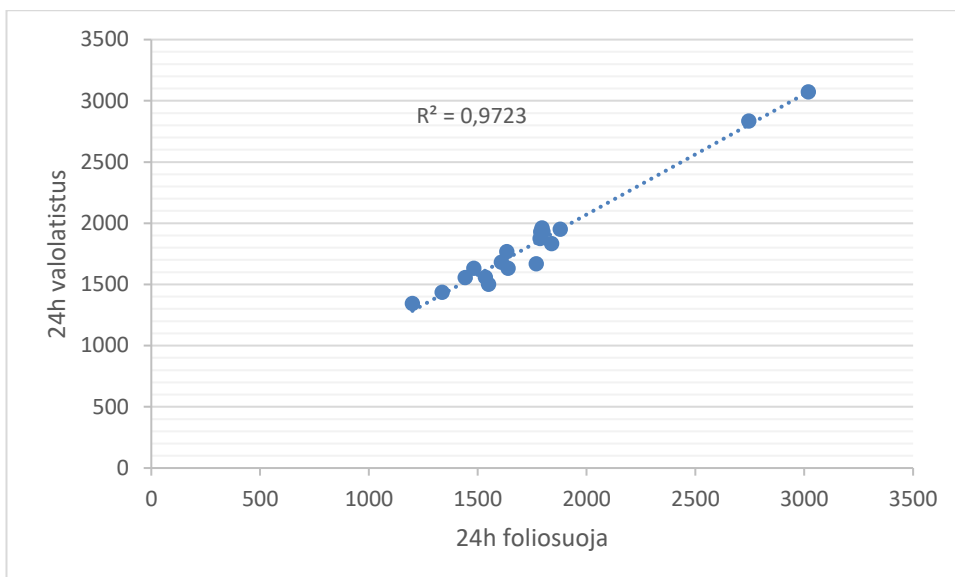
TAULUKKO 4. Kokoverinäytteiden korrelaatiokertoimet

Aikapiste	0h	4h	8h	24h
Näytteiden korrelaatiokerroin R^2	0,96	0,97	0,94	0,5
p-arvo	0,000	0,000	0,000	0,0014



KUVIO 2. 24h kokoverinäytteet

Poikkeavan näytteen arvojen poistaminen 24 tunnin tutkimusaineistosta antaa korrelaatiokertoimeksi 0,97, joka olisi samaa luokkaa ensimmäisen aikapisteen ja neljän tunnin ja kahdeksan tunnin aikapistieden näytteiden korrelaatiokertoimien kanssa. Korrelaatiokeroimella 0,97 p-arvolle saadaan arvo 0,0000. Alla näkyy 24h kokoverinäytteiden hajontakaavio (kuvio 3), josta on poistettu näyte numerolla 10, sen aiheuttaessa korrelaatiokertoimeen muutoksia. Korrelaatiotestin p-arvon ollessa 0,0000 kaikilla kokoverinäytteillä, voidaan todeta folaattipitoisuuksien välillä vallitsevan tilastollisesti merkitsevän ja valosuojauksesta riippumattoman korrelaation.



KUVIO 3. 24h kokoverinäytteet (poistettu näyte numerolla 10)

8.2 Valon vaikutus seerumin folaattipitoisuuteen

Seeruminäytteiden folaattipitoisuudet ja valolta suojatun sekä suojaamattoman näytteen eroprosentit on esitetty liitteessä 2. Seeruminäytteiden folaattipitoisuuden mittausalueen yläraja on 45,4 nmol/l. Seeruminäytteistä numeroilla 1, 10 ja 19 folaattipitoisuudet olivat mittausalueen ylärajaa korkeammat koko tutkimuksen ajan. Näytteet jätettiin tilastollisen tutkimuksen ulkopuolelle, mutta niiden todettiin olevan luotettavia, koska arvot pysyivät korkeina. Tutkiessa valon vaikutusta seerumin folaattipitoisuuteen käytettiin 17 potilaan kahta rinnakkaista seeruminäytettä.

Eroprosentit valolta suojatun ja valolta suojaamattoman seeruminäytteen folaattipitoisuuden välillä vaihteli 0,36 % erosta 15,6 % eroon. Valolta suojatun ja valolta suojaamattoman seeruminäytteen välillä olevia sallitun 10 % eroprosentin ylittäviä eroprosentteja oli tutkimusaineistossa kuusi. Sallitun eroprosentin ylittävien näytteiden eroprosenteista kaksi ovat negatiivisia ja neljä positiivisia. Negatiivisia eroprosentteja eli valolta suojaamattoman näytteen korkeampi folaattipitoisuus valolta suojattuun näytteeseen oli 38:ssa vertailussa. Valolta suojatun näytteen folaattipitoisuus oli valolta suojaamattoman pitoisuutta korkeampi 47 vertailussa, jolloin saatiin positiivinen eroprosentti (liite 2).

Seerumin folaattipitoisuuksien erot valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä ovat alle 10 % kaikissa ensimmäisessä aikapisteessä analysoiduissa näytteissä. Myös neljän tunnin kuluttua näytteenotosta analysoitujen seeruminäytteiden valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden väliset erot jäävät alle 10 %. Kahden tunnin kuluttua näytteenotosta analysoitujen seeruminäytteiden valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen väliset prosentuaaliset erot nousevat yli 10 % kolmessa näytteessä. Eroprosentit ovat näissä näytteissä 10,4 %, -11,73 % ja 11,09 %. Valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välinen prosentuaalinen ero kahdeksan tunnin kuluttua näytteenotosta on yli 10 % yhden näytteen kohdalla. Näytteen numero 20 valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen, prosentuaalinen ero kahdeksan tunnin kuluttua näytteenotosta on 10,85 %. Folaattipitoisuuksien erot valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen välillä ovat 24 tunnin kuluttua näytteenotosta kahdessa näytteessä yli 10 %. Seeruminäytteiden prosentuaalisten erojen keskiarvot (taulukko 5), pysyvät alle 10 % jokaisessa aikapisteessä. Myös seeruminäytteiden ero prosenttien keskiarvot laskettiin muuttamalla ero prosentit positiivisiksi.

TAULUKKO 5. Seeruminäytteiden ero prosenttien keskiarvot (n=34)

Aikapiste	0h	2h	4h	8h	24h
Näytteiden ero prosenttien keskiarvot	4,8 %	6,1 %	3,4 %	4,6 %	5,0 %

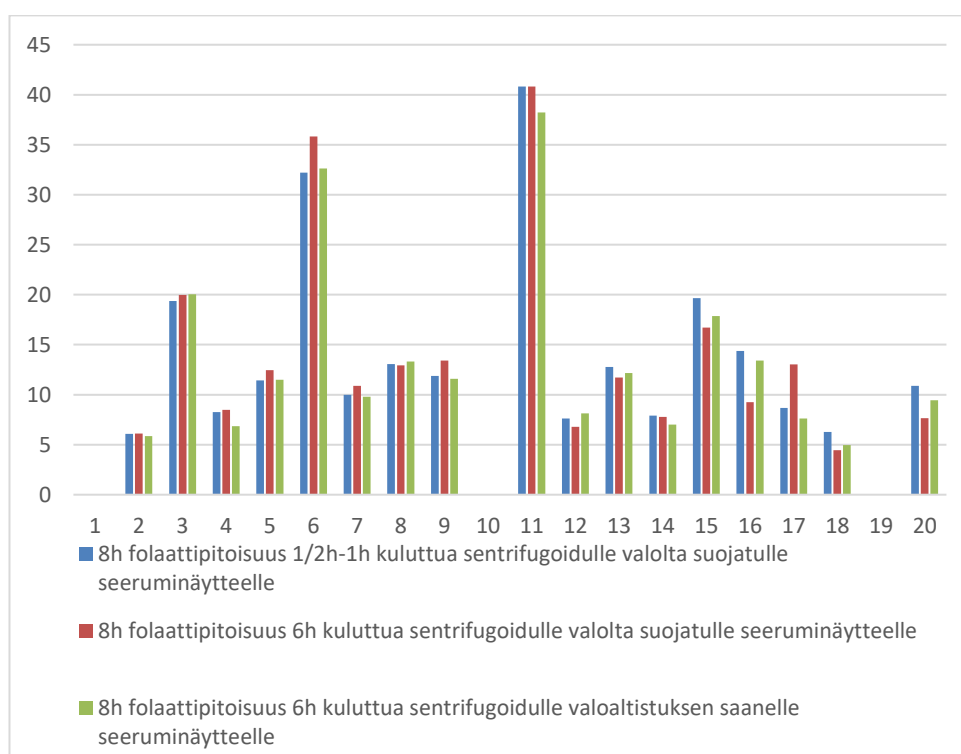
Seeruminäytteiden korrelaatiokertoimet (taulukko 6) ovat lähellä lukua yksi mikä kuvastaa voimakasta lineaarista yhteyttä. Korrelaatiokertoimissa ei myöskään näy suurta vaihtelua eri aikapisteissä. Korrelaatiotestin p-arvon ollessa 0,0000 kaikilla seeruminäytteillä, voidaan todeta folaattipitoisuuksien välillä vallitsevan tilastollisesti merkitsevän ja valosuojauksesta riippumattoman korrelaation

TAULUKKO 6. Seeruminäytteiden korrelaatiokertoimet

Aikapiste	0h	2h	4h	8h	24h
Näytteiden korrelaatiokerroin R^2	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99
p-arvo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

8.3 Valon vaikutus kuusi tuntia näytteenoton jälkeen sentrifugoimatta säilytettyihin seeruminäytteisiin

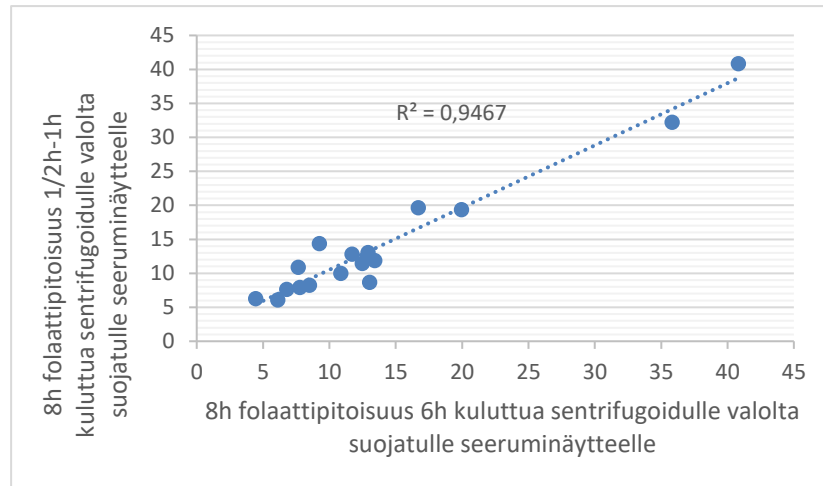
Tutkimuksessa selvitettiin lisäksi valon vaikutusta seerumin folaattipitoisuuteen seeruminäytteiden ollessa sentrifugoimattomina kuusi tuntia näytteenoton jälkeen. Nämä seeruminäytteet analysoitiin rinnan tutkimuksen muiden seeruminäytteiden kanssa kahdeksan tunnin aikapisteessä, jolloin tuloksia voitiin vertailla keskenään. Tutkimuksessa verrattiin samalta vapaaehtoiselta potilaalta otettuja seeruminäytteitä. Valolta suojatun ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun seeruminäytteen kahdeksan tunnin aikapisteessä saatua folaattipitoisuutta verrattiin kuuden tunnin kuluttua sentrifugoidun seeruminäytteen folaattipitoisuuteen, joka analysoitiin kahdeksan tunnin kuluttua näytteenotosta. Liitteessä 4 on laskettu eroprosentit kuusi tuntia sentrifugoimatta olleiden valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden folaattipitoisuuksille. Sentrifugoimattomina säilytettyjen valolta suojattujen ja suojaamattomien seeruminäytteiden folaattipitoisuudet eroavat toisistaan pienimmillään 0,35 % ja suurimmillaan jopa 45,19%. Pitoisuuksien vaihtelua kuvastaa myös pylväsdiagrammi, jossa seeruminäytteiden folaattipitoisuudet ovat rinnakkain (kuvio 4).



KUVIO 4. Kuuden tunnin kuluttua sentrifugoitujen seeruminäytteiden vertailu ½ -1 tunnin kuluttua sentrifugoitujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuteen

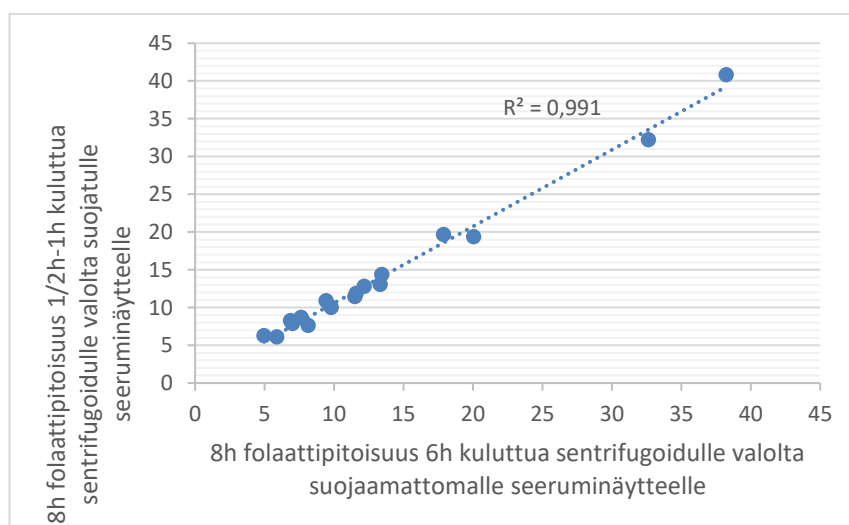
Kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksien eroja verrattiin $\frac{1}{2}$ - 1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksiin laskemalla eroprosentit (liite 5). Kuusi tuntia näytteenoton jälkeen sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden ja $\frac{1}{2}$ - 1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden eroprosentit nousevat yli sallitun 10 % rajan kahdeksan näytteen vertailussa kokonaisnäyttemäärän ollessa 17. Suurin eroprosentti on -49,94 % ja pienin 0,024 %. Eroprosentit kuitenkin nousevat reilusti yli sallitun rajan puolessa vertailussa käytetyistä folaattipitoisuuksista. Myös kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojaamattomien seeruminäytteiden folaattipitoisuuksien ja $\frac{1}{2}$ - 1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksien eroprosentit laskettiin (liite 6). Näytteiden väliset eroprosentit nousivat korkeimmillaan 16,85 % ja olivat pienimmillään 0,44 %. Kuusi tuntia sentrifugoimatta valolta suojattuna säilytettyjen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksista kaksi nousi yli sallitun 10 % rajan verrattessa pitoisuuksia $\frac{1}{2}$ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen seeruminäytteiden pitoisuuksiin.

Folaattipitoisuuksista laskettiin myös korrelaatiokertoimet tutkimalla kuusi tuntia sentrifugoimatta säilytettyjen näytteiden lineaarista yhteyttä $\frac{1}{2}$ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksiin. Kuviossa 5 on esitetty kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden hajontakaavio, verraten folaattipitoisuuksia $\frac{1}{2}$ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden folaattipitoisuuksiin. Korrelaatiokerroin 0,95 kuvastaa voimakasta yhteyttä valolta suojattujen kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen ja $\frac{1}{2}$ -1 tunnin kuluttua sentrifugoitujen näytteiden folaattipitoisuuksille. Korrelaatiokertoimelle laskettiin p-arvo, jonka tulokseksi saatiin 0,0000.



KUVIO 5. Kuusi tuntia sentrifugoimatta olleen valolta suojatun seeruminäytteen folaattipitoisuuden vertailu ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoituun valolta suojattuun seeruminäytteeseen

Kuviossa 6 on esitetty hajontakaavio ja korrelaatiokerroin kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoiduille valolta suojaamattomille seeruminäytteille ja ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoiduille valolta suojaetuille seeruminäytteille. Folaattipitoisuuksien korrelaatiokerroin 0,99 kuvastaa vahvaa lineaarista yhteyttä, jonka tilastollista merkitsevyyttä korostaa korrelaatiokerrointa vastaavan p-arvon arvo 0,0000. P-arvon ollessa 0,0000 muuttujien välillä ei ole yhteyttä ja korrelaatio folaattipitoisuuksien välillä on riippumaton näytteen valolta suojauksesta.



KUVIO 6. Kuusi tuntia sentrifugoimatta olleen valolta suojaamattoman seeruminäytteen folaattipitoisuuden vertailu ½-1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoituun valolta suojattuun seeruminäytteeseen

8.4 Johtopäätökset

Tutkimuksessa valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden tulokset olivat yhteneviä. Valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden väliset erot jäävät tutkimusaineistossa alle hyväksytyyn 10 %, yksittäisiä poikkeuksia lukuun ottamatta. Yli 10 % eroja ei tavattu samojen näytteiden välillä eri aikapisteissä, eikä korkealle prosentuaaliselle erolle huomattu olevan sääntöä, jonka vuoksi yksittäisen valolta suojatun ja suojaamattoman näytteen folaattipitoisuuden eron voidaan katsoa johtuvan satunnaisvirheestä. Korrelaatiokertoimet kuvastavat tutkimusaineiston valolta suojattujen ja suojaamattomien näytteiden olevan voimakkaasti yhteydessä, sillä korrelaatiokertoimet ovat lähellä tavoite korrelaatiokerrointa yksi melkein kaikissa aikapisteissä. Tulosten välillä huomattiin tilastollisesti erittäin merkitsevä ja säilytystavasta riippumaton korrelaatio. Eniten muutoksia nähtiin kokoveren korrelaatiokertoimissa, mikä saattaa johtua virheestä hemolysaatin käsittelyssä.

Korrelaatiokertoimet ovat lähellä lukua yksi, myös kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoitujen seeruminäytteiden kohdalla, kun niitä verrattiin ½ -1 tunnin kuluttua sentrifugoituihin seeruminäytteisiin. Yksittäisten näytteiden prosentuaaliset erot valolta suojattuun ja suojaamattomaan näytteeseen kuitenkin vaihtelivat paljon. Seeruminäytteiden valosuojauksella huomattiin olevan folaattipitoisuuden säilyvyyteen merkitystä, kun näyte sentrifugoitiin vasta kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta. Näytteiden säilyttämisen sentrifugoimatta valolta suojattuna huomattiin aiheuttavan suurempaa epäsäännöllistä vaihtelua seerumin folaattipitoisuuksiin. Johtopäätöksenä voidaan todeta seeruminäytteiden folaattipitoisuuksien vaihtelevan, mikäli näytettä säilytetään sentrifugoimatta.

9 POHDINTA

Opinnäytetyön tutkimustyössä on toimittu eettisesti oikein. Vapaaehtoiset työntekijät tiesivät olevansa osallisena tutkimukseen, eikä heidän henkilötietojaan kerätty koko tutkimuksen aikana. Näytteet numeroitiin numerosarjoilla, jotka eivät ole yhteydessä tutkimukseen osallistuneisiin vapaaehtoiisiin. EPSHP:llä on jatkuva tutkimuslupa, sillä laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (2.2.2001/101) pykälässä 20, sallii näytteiden käytön kehittäessä yksikön toimintaa.

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan tarkastella validiteetin ja reliabiliteetin avulla. Validiteetti kertoo, onko tutkimuksessa saatu vastaukset esitettyihin kysymyksiin. Opinnäytetyössä tutkittiin folaattinäytteiden säilyvyyttä ilman valosuojasta. Tutkimuksessa selvitettiin muuttuuko kokoveren ja seerumin folaattipitoisuus säilytettäessä rinnakkaisia näytteitä suojaten toinen valolta ja altistaen toinen laboratoriovalolle. Tutkimuskysymykseen saatiin vastaukset, joiden mukaan folaattinäytteitä voidaan säilyttää ilman valosuojasta. Käsite reliabiliteetti tarkoittaa toistettavuutta. Tutkimuksessa määritettiin useissa aikapisteissä kahden samasta henkilöstä otetun näytteen folaattipitoisuus saaden lukuarvoltaan samanlaisia vastauksia.

Tutkimuksessa näytteet analysoitiin viimeisen kerran 24h kuluttua näytteenotosta, mikä lisää tutkimuksen luotettavuutta. Rutiinityössä näytteiden saapuminen laboratorioon tai niiden analysoiminen näytteenoton jälkeen voi vaihdella. Osa näytteistä lähetetään laboratorioon vasta tuntien kuluttua näytteenotosta kun taas toiset näytteet analysoidaan heti näytteenoton jälkeen. Tutkimusmateriaali koostui kahdenkymmenen vapaaehtoisen henkilön näytteistä. Seeruminäytteitä oli yhteensä 80 näyteputkea ja kokoverinäytteitä 40 näyteputkea. Tutkimuksen luotettavuutta olisi lisännyt suurempi näytemäärä, mutta silloin tutkimus olisi vaatinut enemmän henkilöstöä.

Tutkimuksen näytteiden pitoisuudet vaihtelivat matalista aina yli mittausrajan. Yli mittausrajan menneitä näytteitä ei laimennettu, koska silloin analysointi aika olisi poikennut sovitusta aikaikkunasta. Korkeiden tulosten oletettiin johtuvan siitä, että tutkimukseen osallistuneet eivät olleet paastonneet. Tästä johtuen määrittärajojen yli saadut tulokset tulivat seeruminäytteistä. Seerumin folaattipitoisuus reagoi folaatin saannin muutoksiin nopeammin kuin punasolujen folaattipitoisuus. Punasolujen folaattipitoisuuksissa ilmeni suurempaa vaihtelua eri aikapisteissä. Numerolla kymmenen analysoidun

kokoverinäytteen arvojen poikkeavuuden voi aiheuttaa näytteen tai hemolysaatin huono sekoitus ennen analysointia. Hemolysaatin huolellinen sekoittaminen takaa sen, että analysaattorin pipetoi näytteen pinnalta homogeenistä näytettä. Mikäli hemolysaatti on sekoitettu huonosti voi näytteen analyytit painua putken pohjaan, ja silloin analysaattorin pipetoi näytteen pinnasta, jossa näyte on laimeampaa.

Opinnäytetyöprosessi sujui suunnitellusti, kuten opinnäytetyösuunnitelmassa oli ajateltu. Näytteet analysoitiin tammikuussa 2018 ja kirjallinen osuus valmistui toukokuussa 2018. Tutkimustyö onnistui hyvin, vaikka näytteiden ajaminen oli haastavaa juuri tiettyyn kellon aikaan laboratorion omien näytteiden ja laitteiden huoltojen takia. Asettamieni tutkimustavoitteiden lisäksi sain paljon kokemusta sekä itsevarmuutta omaan ammattiini sekä kokemusta työskentelystä Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa.

Tutkimuksen tulokset vastaavat aikaisempien tutkimusten tuloksia. Osassa aikaisemmista tutkimuksista näytteitä on säilytetty erilaisissa olosuhteissa. Tutkimuksessani näytteitä säilytettiin EPSHP:n ohjeiden mukaan jääkaapissa, eivätkä näytteet altistuneet auringon valolle missään tilanteessa.

Opinnäytetyössä tehtyä folaatin säilyvyystutkimusta voidaan mielestäni pitää luotettavana sekä eettisesti oikein toteutettuna. Tutkimus suoritettiin rehellisesti ja tutkimuksen tuloksia ei muokattu. Tutkimuksessa otettiin huomioon myös eettiset näkökohdat. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää voitaisiinko foliosuojasta näyteputken ympärillä luopua analysoitaessa folaattia kokoverestä tai seerumista. Opinnäytetyössä oli selvät tutkimuskysymykset joihin saatiin vastaukset. Opinnäytetyön tutkimuksen suorittamiseen saatiin apurahaa Kauhajoen Kulttuurisäätiöltä. Apuraha käytettiin matkakustannuksiin opinnäytetyön tutkimuksen suorittamiseksi Seinäjoen keskussairaalaan.

Jatkotutkimus voisi koskea folaattinäytteiden säilytyslämpötilaa. Ohjekirjan mukaan näytteet tulee säilyttää jääkaappilämpötilassa, mutta käytännön työssä olen huomannut näytteitä säilytettävän huoneenlämmössä. Tutkimuksessa etenkin seeruminäytteet eivät ehtineet analysointien välissä pitkäksi aikaa jääkaappisäilytykseen.

LÄHTEET

- Aro, A. 2015. Folaatti ja foolihappo. Duodecim Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. Luettu 2.2.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skr00043
- Bain, B. J., Bates, I., Laffan, M. A. & Lewis, M. S. 2017. Practical haematology. Philadelphia: Elsevier.
- Clement, N. F. & Kendall, B. S. 2009. Effect of Light on Vitamin B12 and Folate. Laboratory Medicine 40 (11), 657–659. Julkaistu 2015. Luettu 18.1.2018. <https://academic.oup.com/labmed/article/40/11/657/2657518>
- EpsHP. 2017. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Kliininen kemia. Luettu 20.3.2018. http://www.epsHP.fi/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_kemia
- Folaatti. 2017. EpsHP. Luettu 24.3.2018 http://www.epsHP.fi/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_kemia/laboratoriotutkimukset/kliinisen_kemia_ohjekirja
- Harmening, D. M. 2009. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. Philadelphia: F. A. Davis cop.
- Heikkinen, M. & Salo, I. 2011. Valoaltistuksen vaikutus B12-vitamiinin, 25-OH-D-vitamiinin ja folaatin pitoisuuksiin plasma-, seerumi- tai kokoverinäytteissä. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö. http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/35255/Heikkinen_Mari.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: Edita.
- Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2015. Tilastolliset menetelmät. 5-10. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Jägerroos, S. & Parvila, R. 2012. Seerumi- ja kokoverinäytteiden folaatin säilyvyys. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Metropolian ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö. http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/49844/Opinnaytetyo_sonja+ja+riikka.pdf;jsessionid=2A0B25E0BA22CB4A6E7BDDA3760F2554?sequence=1
- Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Lääketieteen sanasto. 2017. Leukovoriini. Duodecim terveystietokirjasto. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 15.1.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01904
- Mastorpaolo, & Wilson. 1993. Effect of Light on Serum B12 and Folate Stability. Clinical Chemistry 39 (5), 913-914. Luettu 18.1.2018 <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/39/5/913.2.full.pdf>

- Matikainen, A-M. Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. Näytteenottajan käsikirja. Helsinki: Edita.
- McKenzie, S. & Williams, J.L. 2014. Clinical laboratory hematology. 3. painos. Pearson Education Inc.
- Moore, G., Knight, G. & Blann, A. 2010. Haematology. 1. painos. New York: Oxford University Press Inc.
- Mäkinen, M., Carpèn, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. 2012. Patologia. 1. painos. Helsinki: Duodecim.
- Perusverenkuva ja trombosyytit. 2014. EpsHP. Luettu 24.3.2018 http://www.epshp.fi/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_kemia/laboratoriotutkimukset/kliinisen_kemia_ohjekirja
- Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E-R. 2015. Veritaudit. 4. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim.
- Reumaliitto. 2017. Metotreksaatti. Suomen reumaliitto Ry. Luettu 15.1.2018. <https://www.reumaliitto.fi/fi/reuma-aapinen/reumalaakkeet/metotreksaatti>
- Roche Diagnostics. 2015. Folate III. Cobas menetelmäkuvaus.
- Roche Diagnostics. 2013a. Folate RBC. Cobas menetelmäkuvaus.
- Roche Diagnostics. 2013b. Cobas® 8000 modular analyzer series-Intelligent LabPower. Luettu 8.4.2018. http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/cobas-8000/cobas%208000%20brochure.pdf
- Stefanovic, V. & Nieminen, A. 2010. Kaikki raskautta suunnittelevat tarvitsevat foolihappolisää. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. 126 (4), 337-339. <http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2010/4/duo98617>
- Tuokko, S. Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoon varten. Helsinki: Tammi.
- Valmisteyhteenveto. 2016. R Trimopan. Orion Pharma. Luettu 15.1.2018. [http://spscam.orion.fi/laakeluettelo/Tiedosto/TRIMOPAN_tabletti_300_mg_tabletti_kalvop%C3%A4%C3%A4lysteinen_100_mg_160_mg_\(2905972\).html](http://spscam.orion.fi/laakeluettelo/Tiedosto/TRIMOPAN_tabletti_300_mg_tabletti_kalvop%C3%A4%C3%A4lysteinen_100_mg_160_mg_(2905972).html)
- Vilpo, J. 2005. Ilmari Palvan veritaudit. 2. uudistettu painos. Helsinki: Medivil Oy.
- Vilpo, J. & Niemelä, O. 2003. Laboratoriolääketiede-kliininen kemia ja hematologia. 2. painos. Kandidaattikustannus Oy.

LIITTEET

Liite 1. Kokoverinäytteiden tutkimustulokset ja ero prosentit (nmol/l)

1(2)

Näyte	0h folio	0h	Ero%	4h folio	4h	Ero%	8h folio	8h	Ero%	24h folio	24h	Ero%
1	2694,1	3023,9	-12,24	2816,5	2997,3	-6,42	2843,1	3117	-9,63	2744,7	2835,1	-3,29
2	1336,1	1354,5	-1,37	1397,3	1347,8	3,54	1409,7	1271	9,84	1199,5	1344,6	-12,1
3	1944,5	2029	-4,36	1821,7	1993,5	-9,43	2024,2	2072,8	-2,40	1799,3	1930,9	-7,31
4	1951,2	1773,8	9,09	2028,3	1999,2	1,43	1941,4	2022,9	-4,20	1795,4	1962,7	-9,32
5	1632,5	1667	-2,11	1550	1463,5	5,58	1664,8	1705,3	-2,43	1441,8	1556,3	-7,94
6	1825,5	1980,9	-8,51	1825,5	1723	5,61	1893,3	1841,6	2,73	1788,4	1932,4	-8,05
7	1768,2	1703,6	3,65	1765,1	1740,8	1,38	1830,8	1787,2	2,38	1633,1	1770	-8,38
8	1308,3	1292,9	1,17	1379,3	1289,8	6,49	1301,9	1596,8	-22,6	1336,3	1437,2	-7,55
9	1471,7	1585,8	-7,75	1432,7	1526,4	-6,54	1664,6	1602,2	3,75	1639,5	1633,2	0,38
10	2867,3	3051,6	-6,42	3029,5	2810,8	7,22	2847,7	2916,5	-2,42	2665,8	1199	55,02

Näyte	0h folio	0h	Ero%	4h folio	4h	Ero%	8h folio	8h	Ero%	24h folio	24h	Ero%
11	3325,1	3163,8	4,85	Yli	3488,8		3084,4	Yli		Yli	Yli	
12	1492,5	1433,6	3,95	1488,1	1531,6	-2,92	1476,3	1480,3	-0,27	1534,3	1560	-1,68
13	1698,1	1593,2	6,18	1632,4	1642,7	-0,63	1685,7	1737	-3,04	1839,5	1835,7	0,20
14	1474,8	1392,7	5,57	1486,8	1439,9	3,15	1502,2	1393,2	7,26	1481,4	1634,2	-10,3
15	1661,7	1695	-2,00	1732,6	1714,92	1,02	1792,5	1693,5	5,52	1878,3	1953	-3,98
16	1525,1	1503,6	1,41	1527,5	1511,6	1,04	1599	1601,2	-0,14	1768,7	1669,2	5,63
17	1391,3	1257,95	9,58	1407	1371	2,56	1497,6	1478,9	1,25	1548,8	1503,3	2,94
18	1388,5	1521,1	-9,55	1673,7	1523,8	8,96	1687	1621,6	3,88	1608,8	1682,5	-4,58
19	2706,5	2756,8	-1,86	2948,1	2904,4	1,48	3021,9	2795,1	7,50	3019,1	3073,8	-1,81
20	1739,9	1631,9	6,21	1677,4	1597,1	4,79	1756,6	1659	5,56	1786,2	1875,5	-5,00

Liite 2. Seeruminäytteiden tutkimustulokset (nmol/l)

1(2)

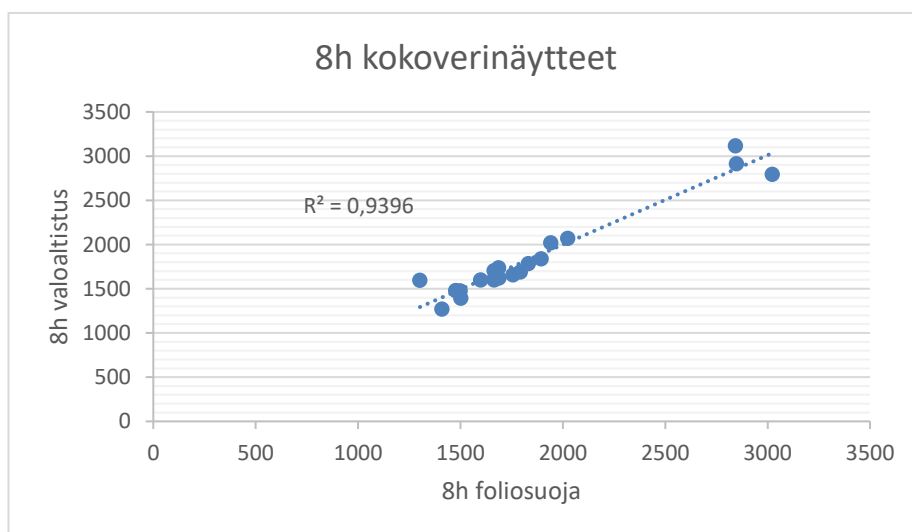
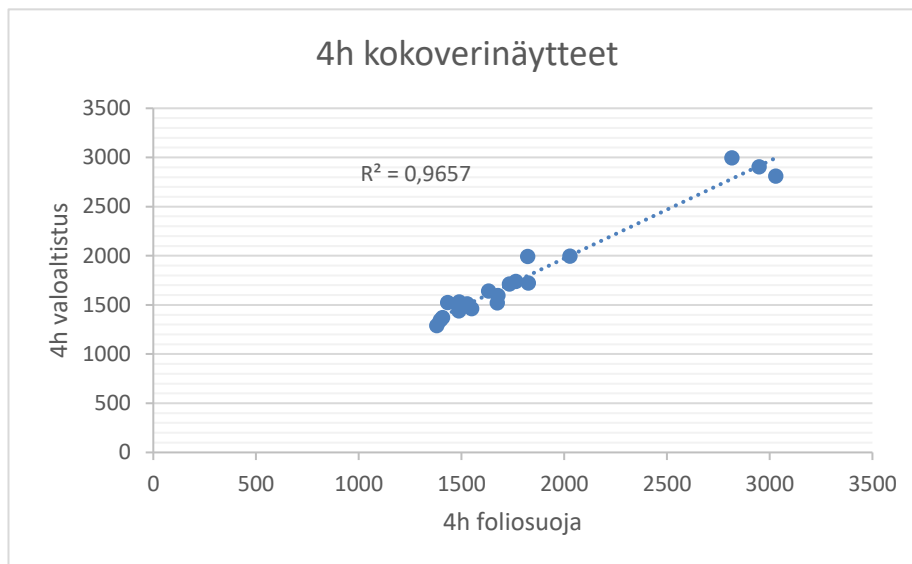
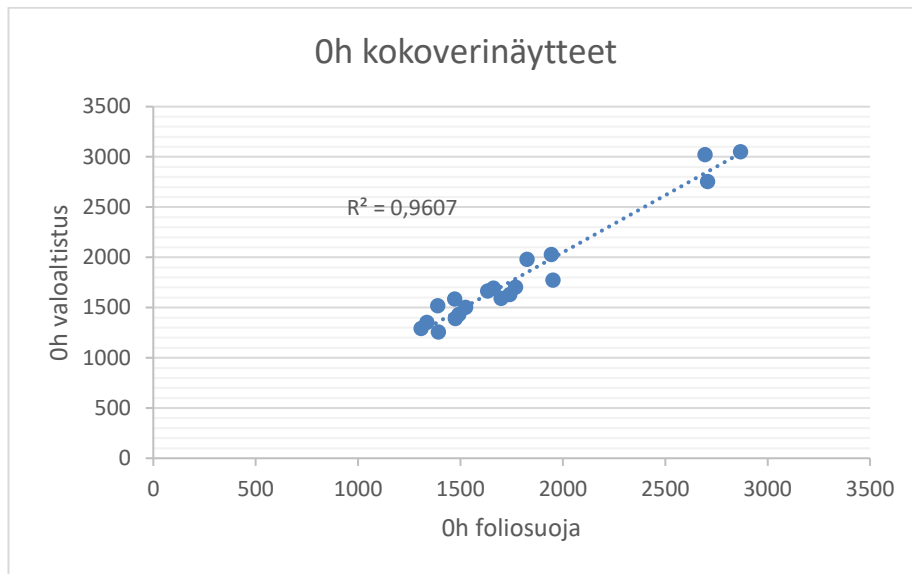
Näyte	0h folio	0h	Ero %	2h folio	2h	Ero %	4h folio	4h	Ero %	8h folio	8h	Ero %	24h folio	24h	Ero %
1	>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4	
2	7,22	7,27	-0,7	6,3	6,65	-5,6	6,69	6,04	9,72	6,09	5,75	5,58	6,04	5,93	1,82
3	20,11	19,71	2,0	19,53	17,5	10,4	18,72	19,12	-2,1	19,38	19,98	-3,1	18,75	18,47	1,49
4	9,25	9,66	-4,4	7,33	8,19	-11,7	8,43	8,21	2,61	8,25	8,22	0,36	8,13	7,97	1,97
5	12,91	13,56	-5,0	12,19	12,98	-6,5	12,47	12,55	-0,6	11,44	12,93	-13,0	11,57	12,57	-8,64
6	33,37	33,6	-0,7	32,23	31,21	3,16	32,92	31,99	2,82	32,2	32,67	-1,46	32,68	31,57	3,4
7	11,27	11,84	-5,0	10,09	10,85	-7,5	10,22	10,45	-2,3	9,99	10,91	-9,21	9,38	9,92	-5,76
8	13,66	13,17	3,6	13,43	12,76	5,0	12,83	12,92	-0,7	13,07	12,87	1,53	12,44	13,36	-7,4
9	11,46	12,17	-6,2	11,33	11,49	-1,4	11,5	11,69	-1,6	11,89	11,37	4,37	10,94	11,53	-5,4
10	>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4	

2(2)

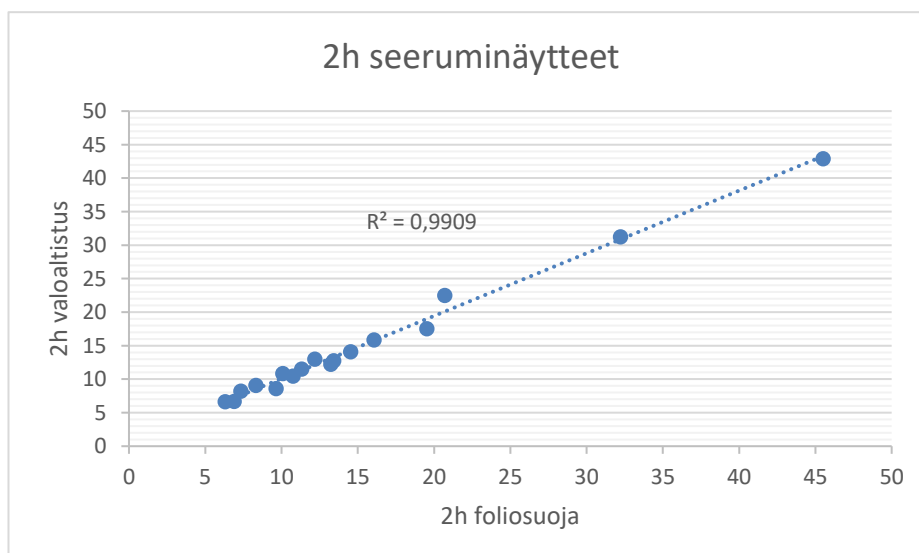
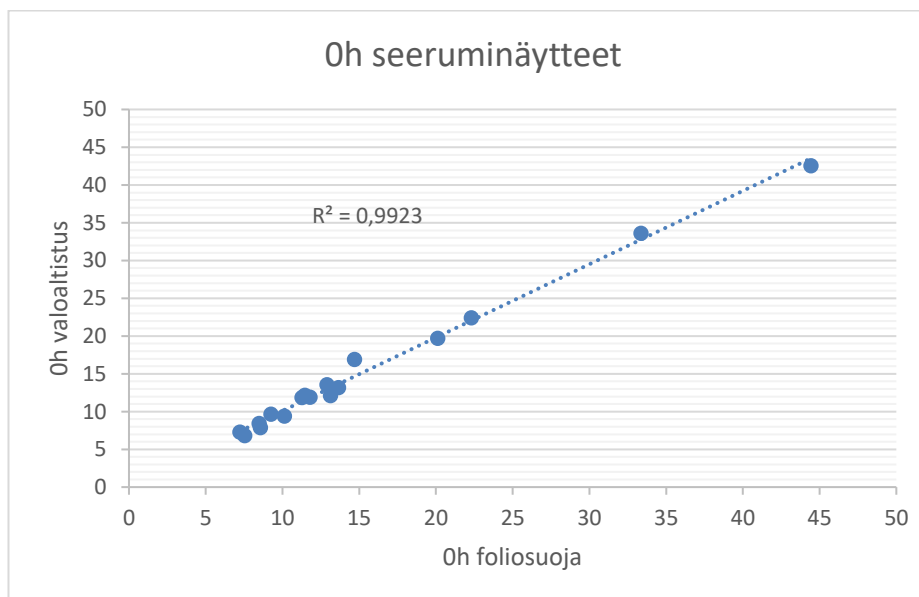
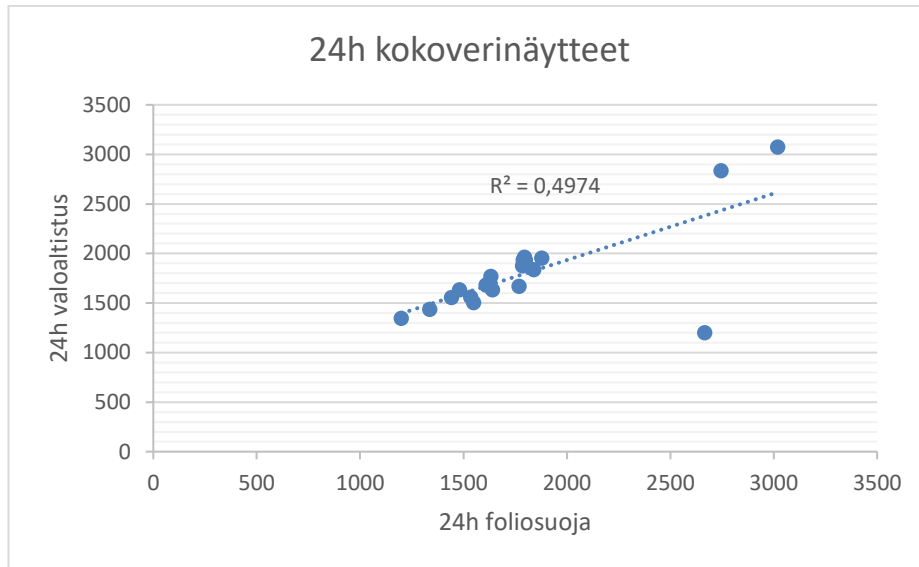
Näyte	0h folio	0h	Ero %	2h folio	2h	Ero %	4h folio	4h	Ero &	8h folio	8h	Ero %	24h folio	24h	Ero %
11	44,44	42,53	4,3	45,5	42,87	5,78	45,5	42,87	5,78	40,83	39,99	2,06	43,99	42,63	3,09
12	8,56	7,88	7,9	8,32	9,06	-8,89	8,56	9,06	-5,84	7,63	7,85	-2,88	9,18	7,82	14,8
13	13,13	12,11	7,7	14,54	14,06	3,3	13,15	14,06	-6,92	12,79	12	6,18	14,52	14,7	-1,2
14	8,48	8,43	0,59	9,65	8,58	11,09	8,48	8,58	-1,18	7,9	7,77	1,65	9,01	8,72	3,22
15	22,3	22,42	-0,5	20,71	22,48	-8,55	22,3	22,48	-0,81	19,66	19,38	1,42	20,95	21,12	-0,81
16	14,69	16,88	-14,9	16,07	15,85	1,37	16,07	15,85	1,37	14,38	15,2	-5,7	15,85	15,27	3,66
17	10,13	9,39	7,3	10,76	10,44	2,97	10,76	10,44	2,97	8,69	8,64	0,58	10,28	10,53	-2,43
18	7,55	6,81	9,8	6,9	6,66	3,48	6,9	6,66	3,48	6,28	5,76	8,28	7,05	5,95	15,60
19	>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4		>45,4	>45,4	
20	11,79	11,89	-0,85	13,23	12,23	7,56	13,23	12,23	7,56	10,88	12,06	-10,9	13,11	12,5	4,65

Liite 3. Korrelaatiogrammit

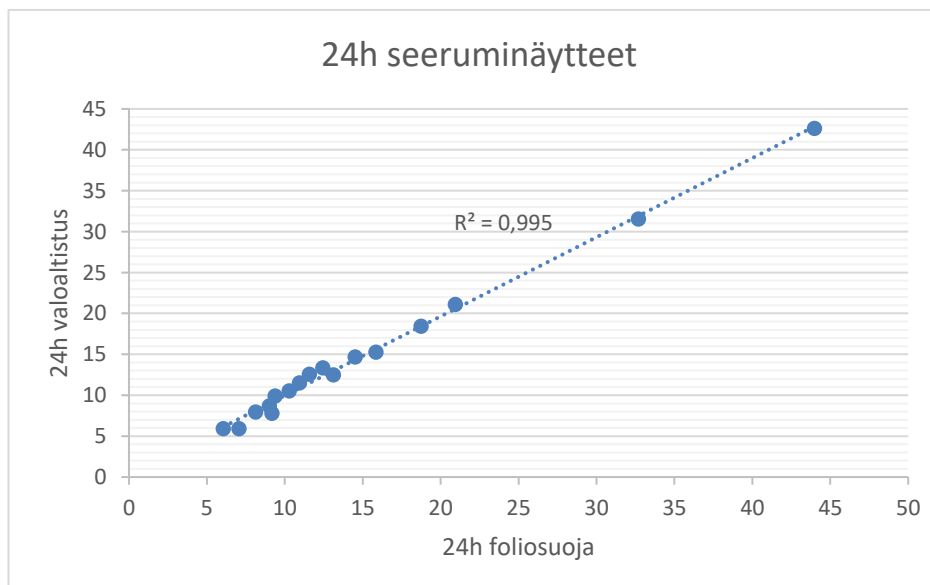
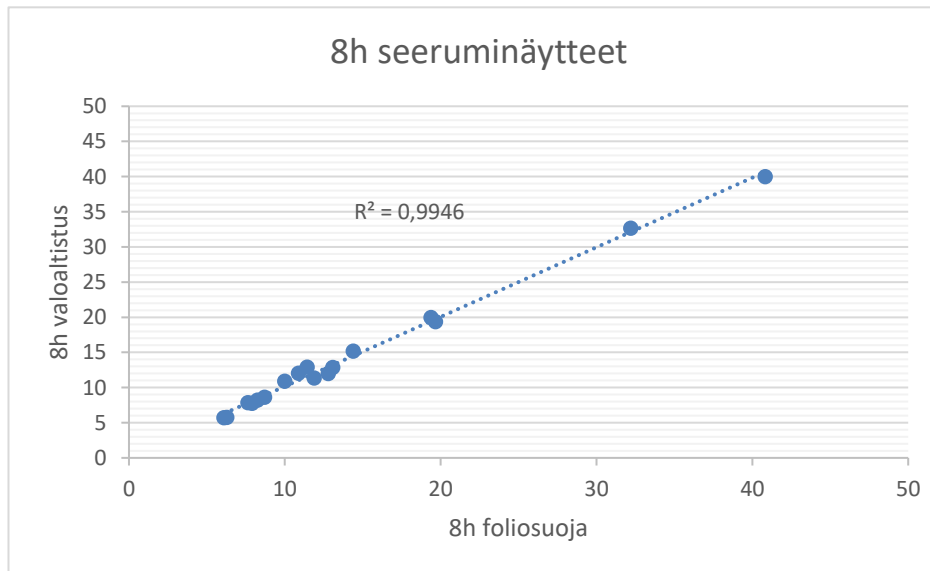
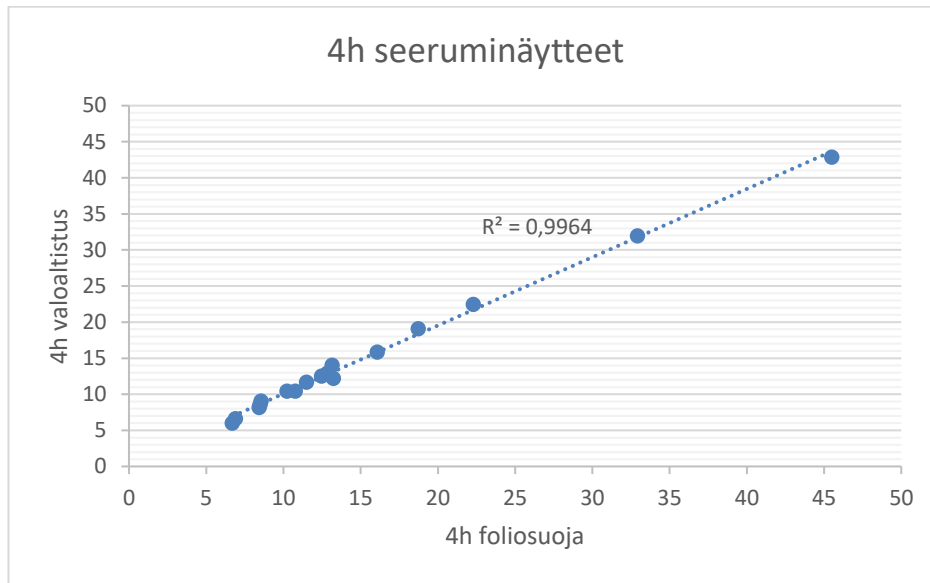
1(3)



2(3)



3(3)



Liite 4. Kuuden tunnin kuluttua sentrifugoitujen seerumiputkien vertailu ½ -1tunnin kuluttua sentrifugoitujen seerumiputkien folaattipitoisuuteen

Näyttenumero	8 tunnin folaattipitoisuus 6 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojatulle seeruminäytteelle (nmol/l)	8 tunnin folaattipitoisuus kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojattomalle seeruminäytteelle (nmol/l)	Ero % kuusi tuntia sentrifugoimatta olleen valolta suojatun ja suojattoman näytteen välille	½- 1 tuntia näytteenoton jälkeen sentrifugoitujen valolta suojattujen seeruminäytteiden folaattipitoisuudet 8h kohdalla (nmol/l)
1	>45,5	>45,5		>45,5
2	6,11	5,87	3,93	6,09
3	19,97	20,04	-0,35	19,38
4	8,5	6,86	19,30	8,25
5	12,47	11,49	7,86	11,44
6	35,83	32,62	8,96	32,2
7	10,87	9,79	9,94	9,99
8	12,92	13,31	-3,02	13,07
9	13,42	11,6	13,56	11,89
10	>45,5	>45,5		>45,5
11	40,82	38,22	6,37	40,83
12	6,78	8,13	-19,91	7,63
13	11,72	12,16	-3,75	12,79
14	7,78	7,01	9,90	7,9
15	16,7	17,88	-7,07	19,66
16	9,25	13,43	-45,19	14,38
17	13,03	7,63	41,44	8,69
18	4,45	4,96	-11,46	6,28
19	>45,5	>45,5		>45,5
20	7,65	9,43	-23,27	10,88

Liite 5. Eroprosentit (e%) ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen ja kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen välille.

Näyttenumero	8 tunnin folaattipitoisuus ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojatulle seeruminäytteelle (nmol/l)	8 tunnin folaattipitoisuus 6 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojatulle seeruminäytteelle (nmol/l)	Ero%
1	>45,5	>45,5	
2	6,09	6,11	-0,33
3	19,38	19,97	-3,04
4	8,25	8,5	-3,03
5	11,44	12,47	-9,0
6	32,2	35,83	-11,27
7	9,99	10,87	-8,81
8	13,07	12,92	1,15
9	11,89	13,42	-12,87
10	>45,5	>45,5	
11	40,83	40,82	0,02
12	7,63	6,78	11,14
13	12,79	11,72	8,37
14	7,9	7,78	1,52
15	19,66	16,7	15,1
16	14,38	9,25	35,67
17	8,69	13,03	-49,94
18	6,28	4,45	29,14
19	>45,5	>45,5	
20	10,88	7,65	29,69

Liite 6. Eroprosentit (e%) ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojatun seeruminäytteen ja kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidun valolta suojaamattoman seeruminäytteen välille.

Näyttenumero	8 tunnin folaattipitoisuus ½ -1 tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojatulle seeruminäytteelle (nmol/l)	8 tunnin folaattipitoisuus kuuden tunnin kuluttua näytteenotosta sentrifugoidulle valolta suojaamattomalle seeruminäytteelle (nmol/l)	Ero%
1	>45,5	>45,5	
2	6,09	5,87	3,61
3	19,38	20,04	-3,40
4	8,25	6,86	16,85
5	11,44	11,49	-0,44
6	32,2	32,62	-1,30
7	9,99	9,79	2,00
8	13,07	13,31	-1,84
9	11,89	11,6	2,44
10	>45,5	>45,5	
11	40,83	38,22	6,39
12	7,63	8,13	-6,55
13	12,79	12,16	4,93
14	7,9	7,01	11,27
15	19,66	17,88	9,05
16	14,38	13,43	6,61
17	8,69	7,63	12,20
18	6,28	4,96	21,02
19	>45,5	>45,5	
20	10,88	9,43	13,33