



# **Aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika –määrityksen reagenssivertailu**

Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
26-4-2011

---

Riitta Laaksonen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Riitta Laaksonen			
Työn nimi			
Aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika -määrityksen reagenssivertailu			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syky 2010	38 + 1 liite	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika (APTT) on laboratoriotutkimus, joka mittaa hyytymisjärjestelmän niin sanotun sisäisen aktivaatiotien tekijöiden yhteisvaikutusta. Pääasiassa tutkimusta käytetään hyytymistekijävajeiden tai -puutosten seulonnassa vuototaipumuksen yhteydessä. Muita tutkimuksen käyttöalueita ovat hepariini- tai muun antikoagulanttihoidon monitorointi. Tukostaipumuksessa APTT:n pidentymisen taustalla voi potilaalla olla lupusantikoagulantti. Eri APTT-reagenssien herkkyys näille edellä mainituille tekijöille vaihtelee.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin HUSLAB:in Meilahden sairaalan automaatiolaboratorion hyytymistutkimustyöpisteeseen, joka on osa HUS:in hyytymishäiriöyksikköä. Opinnäytetyön päätarkoitus oli vertailla nykyisin käytössä olevan reagenssin (Actin FSL, Siemens) herkkyyttä kahden muun markkinoilla olevan reagenssin (STA PTT, Stago ja IL-APTT, Instrumentation Laboratory) herkkyteen VIII- ja IX-hyytymistekijäpuutoksissa. Samalla testattiin näiden reagenssien herkkyyttä hepariinille ja lupusantikoagulantille.</p> <p>Reagenssien vertailtavuutta varten tehtiin tasovertailu potilasnäytteillä (n=10), joissa APT-aika oli normaaliviitealueella. Sarjan sisäistä ja sarjojen välistä toistuvuutta tarkasteltiin normaali- ja hoitotasokontrollinäytteillä. Reagenssitestauksessa FVIII-herkkyyttä vertailtiin potilasnäytteillä (n=15), joissa oli aiemmin todettu spesifisellä hyytymistekijäaktiivisuusmäärityksellä FVIII-puutos ja FIX-herkkyyttä vertailtiin potilasnäytteillä (n=11), joissa oli todettu FIX-puutos. Hepariniherkkyysvertailua varten valmistettiin hepariinilaimennossarja (n=9). Lupusantikoagulanttiherkkyyttä vertailtiin lupusantikoagulanttipositiivisilla potilasnäytteillä (n=10). Analyysit suoritettiin Sysmex® CA-7000 –analysaattorilla.</p> <p>Testauksen tuloksia käsiteltiin Microsoft Excel 2007 -ohjelmalla. Kaikki reagenssit olivat yhtä herkkiä hyytymistekijäpuutoksissa. Hepariniherkin reagenssi oli Stagon reagenssi. Herkin lupusantikoagulanttivaste saatiin Instrumentation Laboratoryn reagenssilla. Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää tulevaisuudessa mahdollisen kilpailutuksen yhteydessä.</p>			
Avainsanat			
APTT, reagenssivertailu, herkkyys			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Author/Authors		
Riitta Laaksonen		
Title		
Reagent comparison for Activated Partial Thromboplastin Time		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Autumn 2010	38 + 1 appendice
<p>ABSTRACT</p> <p>Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) is a laboratory test that measures the total effect of coagulation factors in intrinsic and common pathways. It is a screening test that is mainly used for detection of coagulation factor's deficiencies in case of bleeding patient. The test is also used for monitoring heparin or other anticoagulant treatment. In thrombosis, patient may have lupus anticoagulant that prolongs APTT. The sensitivity of APTT reagents in these three areas of use varies.</p> <p>This final project was commissioned by HUSLAB, the workstation of the coagulation testing of Meilahti Hospital Automation Laboratory which is part of Coagulation Disorders Unit. The main aim was to compare APTT reagents' sensitivity in coagulation factor VIII and IX deficiencies. Comparison was made between the reagent in use at present (Actin FSL, Siemens) to two other reagents (STA PTT, Stago and IL-APTT, Instrumentation Laboratory) available on the market. In addition, the sensitivity of reagents for heparin and lupus anticoagulant was tested.</p> <p>To be able to standardize differing levels of reagents, we analyzed 10 patient samples that were within a normal range (n=10). Internal frequency of series and frequency between series were tested with normal- and high-level control samples. Sensitivity for coagulation factor VIII was tested with 15 patient samples (n=15) that had decreased activity of coagulation factor VIII. Sensitivity for factor IX was tested with 11 patient samples with decreased coagulation factor activity (n=11). Deficiencies had formerly tested with specific test for coagulation factor activity. To be able to compare reagents' sensitivity to heparin, we made series of heparin dilutions (n=9). Sensitivity to lupus anticoagulant was compared with patient samples that were lupus anticoagulant positive (n=10). Analysis were performed with Sysmex® CA-7000 –analyzer.</p> <p>The results of the testing were analyzed with Microsoft Excel 2007 –software. The tested reagents were equal in sensitivity for coagulation factors. The most sensitive reagent for heparin was the reagent manufactured by Stago. The most sensitive reagent for lupus anticoagulant was the reagent manufactured by Instrumentation Laboratory. The results of this final project can be used in case of competitive bidding in the future.</p>		
Keywords		
APTT, reagent comparison, sensitivity		

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	HEMOSTAASI	2
2.1	Verisuonen supistuminen	4
2.2	Verihiutaletulpan muodostuminen	4
2.3	Hyytymän muodostuminen	5
2.3.1	Ulkoinen aktivaatiotie	8
2.3.2	Sisäinen aktivaatiotie	8
3	AKTIVOITU PARTIAALINEN TROMBOLASTIINIAIKA JA SEN KÄYTTÖALUEET	9
3.1	Perinnölliset hemofiliat ja von Willebrandin tauti	10
3.2	Hepariinihoidon monitorointi	12
3.3	Lupusantikoagulantti	13
4	AKTIVOIDUN TROMBOPLASTIINIAJAN MÄÄRITTÄMINEN HUSLAB:IN HYYTYMISTUTKIMUSTYÖPISTEESSÄ	14
4.1	APTT-reagenssit	15
4.2	Hyytymisajan mittaaminen Sysmex CA-7000-analysaattorilla	16
4.3	Menetelmän uusintavalidointi ja reagenssivertailu	18
5	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	19
6	REAGENSIVERTAILUN SUORITTAMINEN	21
6.1	Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus ja tasovertailu	22
6.2	Hyytymistekijäherkkyyden testaaminen	23
6.3	Hepariiniherkkyyden testaaminen	23
6.4	Lupusherkkyyden testaaminen	24
7	TULOKSET JA TULKINTA	25
7.1	Sarjan sisäinen ja välinen toistuvuus ja vertailumittarin luominen tasovertailunäytteiden avulla	25
7.2	Hyytymistekijäherkkyys	27
7.3	Hepariini- ja lupusherkkyys	30
8	TULOSTEN LUOTETTAVUUS	32
9	POHDINTA	33
	LÄHTEET	35

LIITE Reagenssivertailun alkuperäiset APTT-tulokset ja laskutoimitusten raakadata

## 1 JOHDANTO

Veren hyytyminen on tapahtuma, joka on tarkasti säädelty. Kun suoneen tulee vaurio, hyytyminen käynnistyy välittömästi monien eri mekanismien avulla (Cohen – Taylor 2009: 232-233). Tapahtumaan osallistuu useita kymmeniä osatekijöitä ja siten systeemi on myös äärimmäisen haavoittuvainen. Tiettyjen hyytymistekijöiden puuttuminen, toiminnan häiriö tai vaje voi aiheuttaa potilaalle vuototaipumuksen. (Guyton – Hall 2000: 421). A- ja B-hemofilia sekä von Willebrandin tauti ovat yleisimmät perinnölliset vuototaipumuksen taustalla olevat sairaudet. A-hemofilia johtuu hyytymistekijän VIII puutoksesta tai vajeesta ja B-hemofiliassa on kysymys hyytymistekijän IX puutoksesta tai vajeesta. Von Willebrandin taudissa von Willebrand –tekijä (vWF) on rakenteeltaan virheellinen, se puuttuu kokonaan tai sen toiminta on vajaata. (Lassila – Siimes – Rasi 2007.)

Vuototaipumusta epäiltäessä yhtenä laboratorioseulontakokeena käytetään aktivoitua partiaalista tromboplastiiniaikaa eli APTT-tutkimusta, joka mittaa hyytymisjärjestelmän niin sanotun sisäisen aktivaatiotien tekijöiden yhteisvaikutusta. Kuvasta 1 käy ilmi hyytymiskaskadin sisäisen aktivaatiotien hyytymistekijät (Kuvio 1). APTT-tutkimusta käytetään myös fraktioimattoman hepariinihoidon seurannassa. Tukoshäiriössä APT-ajan pidentymisen voivat aiheuttaa fosfolipidivasta-aineet, lupusantikoagulantti. (HUSLAB 2010a.)

Huhtikuussa 2007 HUSLAB:in Meilahden sairaalan automaatiolaboratorion hyytymistutkimusten työpisteessä (myöhemmin käytän ilmaisua HUSLAB:in hyytymistutkimustyöpiste), joka on osa HUS:in hyytymishäiriöyksikköä, otettiin käyttöön uudet laitteet ja reagenssit (Joutsu-Korhonen 2010). Uuden reagenssin kliinisen käytön myötä hyytymishäiriöyksikössä havaittiin, että lievissä hemofilioissa potilaiden APTT-arvot jäivät viitearvoalueelle, lähelle ylärajaa. Uusien tapausten kohdalla tämä tarkoittaa käytännössä sitä, että APTT-tuloksen ollessa normaalilla viitearvoalueella, lääkäri ei välttämättä pyydä riittäviä jatkotutkimuksia ja pahimmassa tapauksessa lievän hemofilian diagnoosi viivästyy tai jää jopa tekemättä. Tästä huomiosta syntyi kehittämistarve vertailla muita markkinoilla olevia reagensseja tällä hetkellä käytössä olevaan reagenssiin, jotta APTT-tutkimuksesta saataisiin herkempi niin, että myös lievissä hyytymistekijävajauksissa APTT olisi poikkeava eli pidentynyt. (Joutsu-Korhonen 2010; Saarela 2010.)

Opinnäytetyössäni vertailin kahden muun APTT-reagenssin hyytymistekijä-, herpariini- ja lupusherkkyyttä nykyisin käytössä olevan reagenssin herkkyyteen. Työn päätavoite oli reagenssien hyytymistekijäherkkyyden selvitys, koska APTT-tutkimuksen pääkäyttötarkoitus HUSLAB:in hyytymistutkimustyöpiesteessä on vuotohäiriöiden seulonnassa. (Leinonen 2010a). Opinnäytetyö tuotti tietoa näiden kolmen eri reagenssin herkkyysominaisuuksista. Tietoa voidaan käyttää hyödyksi tulevaisuudessa tapahtuvan mahdollisen kilpailutuksen yhteydessä (Leinonen 2010b).

## 2 HEMOSTAASI

Veressä ja kudoksissa tiedetään olevan useita kymmeniä tekijöitä, jotka jollakin tavoin vaikuttavat veren hyytymiseen. Hyytymisjärjestelmään kuuluu sekä hyytymistekijöitä että sääteleviä antikoagulantteja. Hyytymistekijöiden tehtävänä on edistää hyytymän muodostumista, kun taas antikoagulanttien vaikutus on päinvastainen – ne estävät hyytymistä. Normaalisti verenkierrossa antikoagulantit ovat vallitsevia, mutta verisuonivaurion syntyessä hyytymistä edistävät tekijät aktivoituvat ja kumoavat antikoagulanttien vaikutuksen. (Guyton – Hall 2000: 421.) Kuviossa 1 on esitelty hyytymiskaskadi hyytymistekijöiden kannalta.

Käsite hemostaasi tarkoittaa kaikkia niitä mekanismeja, joilla elimistö reagoi verisuonien vaurioihin ja verenvuotoon. Sen tarkoituksena on verenvuodon tyrehtyttäminen ja toisaalta syntyneen hyytymän rajoittaminen paikalliseksi. Hemostaasi käynnistyy välittömästi verisuonen vaurioituttua ja sen vaiheet voidaan jakaa kolmeen eri osaluokkaan: vaurioituneen verisuonen supistuminen, verihitulehduksen muodostuminen ja varsinaisen hyytymän muodostuminen (Haug – Sand – Sjaastaad 2007: 315). Fibrinolyysi taas on tapahtumasarja, joka liuottaa hyytymän, kun kudokset on parantunut (Haug ym. 2007: 321).

Varsinaisen hyytymisjärjestelmän tehtävänä on muodostaa entsyymaattisen ketjureaktion tuotteena trombiinia, joka muuttaa fibrinogeenin fibriniiniksi. (Lassila 2007: 37; Haug ym. 2007: 320.) Tässä ketjureaktiossa yhden hyytymistä edistävän aineen aktivoituminen aktivoi reaktion seuraavan vaiheen (Haug ym. 2007: 317). Yleisesti hyytymisjärjestelmän kohdalla puhutaan kaskadi- eli vesiputousmallista, jossa useat eri tekijät voimistavat reaktiota entisestään. Muun muassa trombiini vaikuttaa moniin eri hyytymiskaskadin vaiheisiin. (Haug ym. 2007: 319; Guyton – Hall 2000: 422.)

Hyytymistekijöistä suuri osa on entsyymejä, joita kutsutaan seriiniproteaaseiksi. Niiden aktivoitumiseen tarvitaan solukalvojen fosfolipidipintoja ja kalsiumia (Ca). Joidenkin hyytymistekijöiden (protrombiini, tekijät FVII, FIX ja FX) toiminta on riippuvaista K-vitamiinista. Plasmaperäiset hyytymistekijät FV ja FVIII sekä suonen seinämän kudostekijä toimivat näissä hyytymiskaskadin entsyymaattisissa reaktioissa kofaktoreina ja ne ovat joko proteiineja tai glykoproteiineja. (Lassila 2007: 37.)

Näin monimutkaisen järjestelmän ollessa kyseessä, on selvää, että mikä tahansa mekanismin osa tai yksittäinen hyytymistekijä toimii puutteellisesti, vaikuttaa se koko hyytymisjärjestelmän toimivuuteen. Hemostaasin häiriöiden taustalla voi olla toimimattomuus verisuonen supistumisessa, verihiutaleiden toiminnassa, varsinaisessa hyytymisjärjestelmässä tai fibrinolyysissä. Käytännössä häiriö voi siis olla millä tahansa hemostaasin osa-alueella ja, mitä useammalla tasolla häiriö on, sitä vakavammasta verenvuototaipumuksesta on silloin kysymys. (Saito 1984: 23; Hillman – Ault 1998: 409.)

Verenvuototaipumusta epäiltäessä lääkäri selvittää potilaan oman ja suvun vuotoanamneesin sekä kartoittaa muut sairaudet ja käytössä olevat lääkkeet. Lisäksi hän pyytää valikoiman erilaisia laboratoriotutkimuksia, joilla voidaan lähteä selvittämään verenvuodon syytä. Yleistyneen vuototaipumuksen ensisijaisia seulontatutkimuksia ovat trombosyyttien laskennan lisäksi aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika eli APTT ja tromboplastiiniaika eli TT. (Elonen 1998: 1221.) TT mittaa hyytymisjärjestelmän tekijöiden FII, FVII, FX yhteisvaikutusta, kun taas APTT:n kohteena on hyytymisjärjestelmän sisäisen aktivaatiotien toiminta (HUSLAB 2006a; Hillman – Ault 1998: 421). Hyytymisjärjestelmän toimintaa niin sisäisen kuin ulkoisenkin aktivaatiotien kannalta kuvataan myöhemmin tässä kappaleessa ja APTT on esitelty tarkemmin luvussa 3.

Jotta hemostaasin häiriöitä voitaisiin ymmärtää, on tunnettava miten hemostaasi toimii terveessä elimistössä (Hillman – Ault 1998: 409). Koska koko hyytymisjärjestelmän ymmärtäminen niin hyytymistä edistävien kuin estävien tekijöiden kannalta on vaativaa ja järjestelmän kuvaaminen lyhyesti on haastavaa, olen tässä työssä rajannut hyytymisjärjestelmän käsittelyn keskeisimpiin hyytymistekijöihin. Hyytymistä edistävien tekijöiden puutokset ovat työn kannalta keskeisiä.

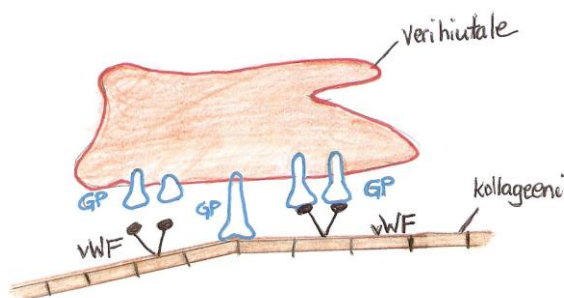
## 2.1 Verisuonen supistuminen

Vaurioituttuaan verisuoni supistuu nopeasti, jonka seurauksena verenvirtaus vaurioalueelle vähenee. Näin ehkäistään liiallista verenhukkaa niin kauan, kunnes verihiutale-  
tulppa on muodostunut ja veri on hyytynyt. (Haug ym. 2007: 316.) Supistumisen saavat  
aikaan hermoimpulssit, paikallinen lihaskouristus sekä vaurioituneesta kudoksesta ja  
verihiutaleista eli trombosyyteistä vapautuvat aineet. Kivun tuntemus vaurioituneessa  
suonessa tai läheisessä kudoksessa laukaisee sympaattisia hermosyitä pitkin välittyvät  
impulssit. Mahdollisesti suonien supistumisen taustalla on enimmäkseen vaurio itse, joka  
aiheuttaa paikallisen lihaskouristuksen. Pienemmissä suonissa supistuksen taustalla on  
verihiutaleista vapautuva verisuonten supistumiseen vaikuttava aine. (Guyton – Hall  
2000: 419.)

Supistus on sitä voimakkaampi, mitä laajempi vaurio on. Siksi terävällä esineellä tehty  
leikkaushaava vuotaa enemmän, kuin rikkoutumisen tai repeytymisen aiheuttama haava.  
Paikallinen suonien sileän lihaseinämän kouristus voi kestää useita minuutteja tai jopa  
tunteja, minkä aikana verihiutaleet ehtivät muodostaa tulpan ja hyytymisen tapahtuu.  
(Guyton – Hall 2000: 419.)

## 2.2 Verihiutaletulpan muodostuminen

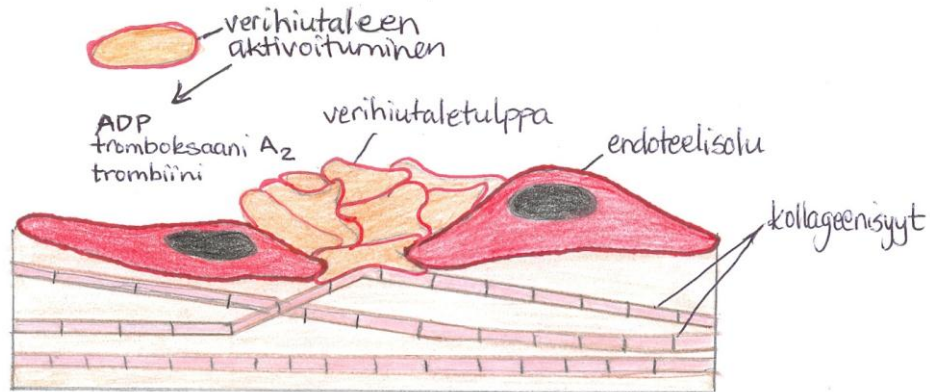
Normaaleissa olosuhteissa verihiutaleet eivät tartu toisiinsa tai verisuonen seinämän  
sileään endoteeliin. Endoteelin vaurioituessa, verihiutaleiden pinnan reseptorit pääsevät  
kosketuksiin kudoksesta paljastuvien kollageenisyyiden kanssa ja sitoutuvat niihin.  
(Haug ym. 2007: 316.) Verihiutaleiden tärkeimmät tarttumisreseptorit ovat glykoprotei-  
iineja ja ne tunnistavat sekä kollageenia että von Willebrand – tekijää (vWF) (kuvio 1).  
vWF:ää on vapaana plasmassa ja se sitoutuu nopeasti vauriokohdasta paljastuneeseen  
kollageeniin. Lisäksi trombiinin, fibriinin, histamiinin ja adrenaliinin vaikutuksesta  
vWF:ää erittyy plasmaan endoteelisoluista. (Lassila 2007: 34.)



KUVIO 1. Verihiutaleen tarttuminen kollageeniin. ( vWF=von Willebrand tekijä, GP-glykoproteiini)



Sitouduttuaan reseptoreillaan kollageeniin ja vWF:ään (trombosyyttien adheesio), aktivoituvat verihiutaleet muuttavat muotoaan ja muodostavat mustekalamaisia lonkeroita (Guyton – Hall 2000: 420, Lassila 2007: 34). Samalla niiden varastorakkuloista vapautuu aineita (sekreetio), muun muassa adenosiinidifosfaattia eli ADP:tä (kuvio 2), joka muuttaa verihiutaleiden pinnan tahmeaksi. Aktivoituneisiin verihiutaleisiin tarttuu uusia verihiutaleita, jolloin ne vapauttavat oman ADP:nsä ja näin prosessi jatkuu. Verihiutaleet muodostavat myös tromboksaani A<sub>2</sub>:ta, joka osaltaan tehostaa verihiutaleiden kiinnittymistä toisiinsa (aggregaatio). (Haug ym. 2007: 316.) Näin syntyy löyhä verihiutale-tulppa, joka myöhemmin lujittuu fibriiniverkon vaikutuksesta (Guyton – Hall 2000: 420).



KUVIO 2. Verihiutaleetulan muodostuminen.

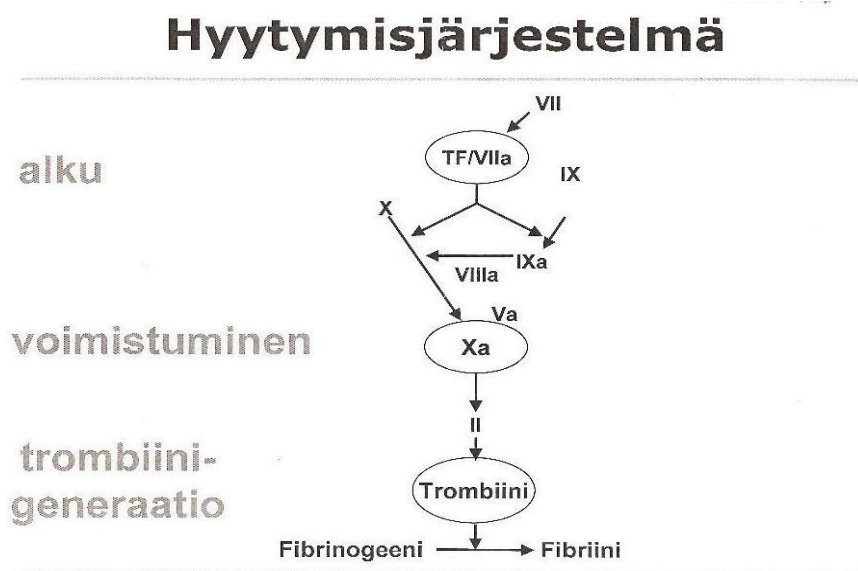
### 2.3 Hyytymän muodostuminen

Verihiutaleetulan sisälle ja ympärille syntyvä fibriiniverkko muodostuu plasman liukoisin proteiinin fibrinogeenin muuttuessa liukenemattomiksi fibriinisäikeiksi. Fibrinogeeni muodostetaan maksassa ja sitä esiintyy aina terveen ihmisen veressä. Sen tehtävä hyytymisessä on keskeinen, koska se liittää verihiutaleet toisiinsa. (Haug ym. 2007: 316–317.) Fibrinogeenin lisäksi myös trombiini on keskeisessä asemassa, koska verihiutaleiden ja muiden solujen pinnalla syntyvä trombiini huolehtii oman muodostumisensa jatkumisesta aktivoimalla monia hyytymistekijöitä ja verihiutaleita (Lassila 2007: 37). Trombiinia tarvitaan fibrinogeenin muuttamisessa fibriiniksi, mutta se vaikuttaa myös fibriiniverkon stabiloitumiseen aktivoimalla hyytymistekijää FXII (Haug ym. 2007: 317). Toisaalta trombiini aktivoi endoteelisolujen pinnalla hyytymistä sääteleviä

tekijöitä, jotka käynnistävät fibrinolyysin. Näin hyytymisjärjestelmän toiminta pysyy tasapainossa. (Lassila 2007: 37.)

Jotta fibrinogeenistä saadaan fibriniä, tarvitaan siis trombiinia. Sitä ei kuitenkaan voi olla normaalisti veressä, vaan se on inaktiivisena esiasteena protrombiinina (tekijä II). (Haug ym. 2007: 317.) Trombiinin muodostus on riippuvainen kahdesta eri hyytymistekijäkompleksista, tenaasista (IXa ja VIIIa), joka aktivoi hyytymistekijän X ja protrombinaasista (Va ja Xa), joka muuttaa lopulta protrombiinin trombiiniksi. Näiden kompleksien vaikutuksesta trombiinia syntyy suuria määriä (voimistuminen). (Abshire – Jobe 2009: 437; Lassila 2007: 38).

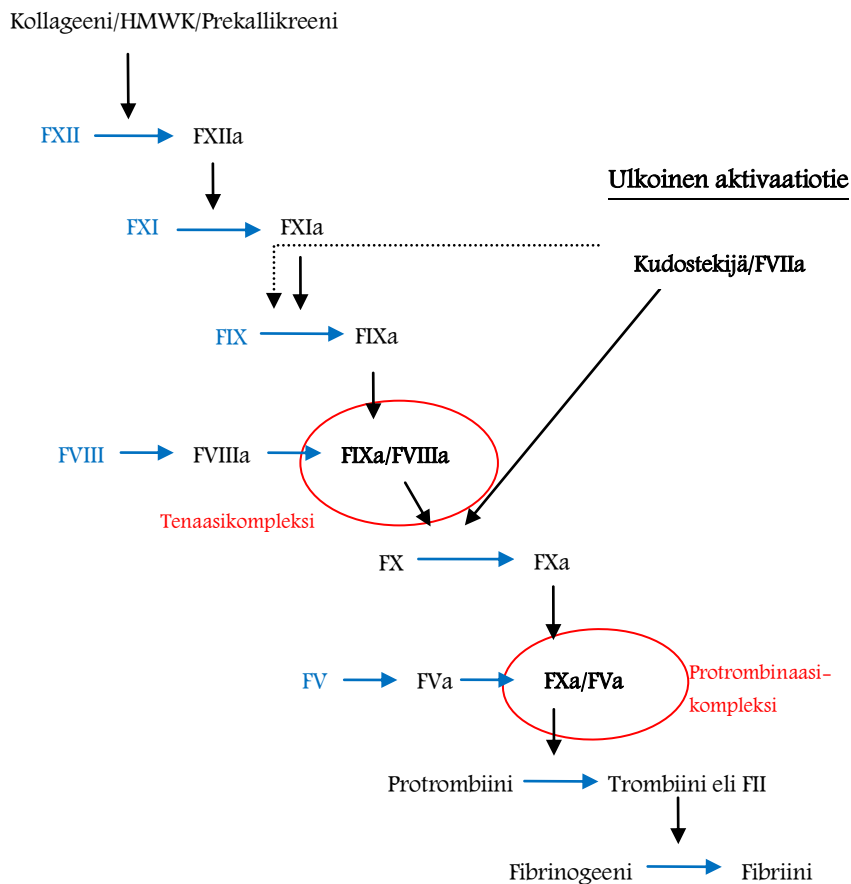
Hyytymistekijä X (FX) voi aktivoitua kahta eri reittiä pitkin (kuvio 4): sisäistä ja ulkoista (Haug ym. 2007: 317; Lassila 2007: 37–38). Oikeastaan hyytymistapahtuman jaottelu sisäiseen ja ulkoiseen aktivaatiotiehen on vanhentunut käsitys. Sen sijaan hyytymän muodostumisessa tärkeitä vaiheita on kolme: alku (ulkoisen aktivaatiotien kautta), voimistuminen ja trombiinigeneraatio (kuvio 3). Koska APTT -tutkimuksen kannalta sisäinen aktivaatiotie on kuitenkin keskeinen, olen päättänyt kuvaamaan hyytymisen aktivaatiotieiden kautta. Nykytietämyksen mukaan hyytymistapahtuman käynnistymisessä päärooli on niin sanotussa ulkoisessa aktivaatiotiessä. (Abshire – Jobe 2009: 437.)



KUVIO 3. Hyytymisjärjestelmän toiminta. (Joutsi-Korhonen – Koski 2010.)

Aktiivisesta hyytymistekijästä X (FXa) lähtien sisäinen ja ulkoinen aktivaatioreitti jatkuu samanlaisena hyytymän muodostumiseen saakka (kuvio 4). Tenaasi on sisäisen aktivaatioreitin kompleksi, kun taas protrombinaasi vaikuttaa hyytymiskaskadin loppupäässä. Verisuonen vaurioitua hyytyminen käynnistyy molempien aktivaatioteiden kautta, kun kudostekijä joutuu tekemisiin veren kanssa. (Haug ym. 2007: 317; Lassila 2007: 37–38). Sisäisestä ja ulkoisesta aktivaatiotiestä puhuttaessa ei niitä voida kokonaan erottaa toisistaan, koska ulkoisessa aktivaatiotiessä aktivoitunut hyytymistekijä VII (FVIIa) aktivoi myös sisäisen aktivaatioreitin FIX:n (Haug ym. 2007: 320; Lassila 2007: 38; Maki – Tambyah 2001).

#### Sisäinen aktivaatiotie



KUVIO 4. Hyytymiskaskadi. Tenaasi- ja protrombinaasikompleksit on ympyröity punaisella. (Mukaiillen Zimring 2009: 607; Lassila 2007: 38; Maki – Tambyah 2001).

### 2.3.1 Ulkoinen aktivaatiotie

Kun vahingoittuneesta kudoksesta vapautuu kudostekijää, käynnistyy niin sanottu ulkoinen aktivaatiotie (Kuvio 4). Myöhemmin kudostekijä ja hyytymistekijä VII muodostavat kompleksin, joka kalsiumionien läsnä ollessa vaikuttaa entsyymaattisesti tekijään X muuttaen sen aktiiviseen muotoon (Xa). Tästä eteenpäin sekä ulkoinen että sisäinen aktivaatiotie jatkuu samanlaisena aina siihen asti, kunnes hyytymä muodostuu. Xa yhdistyy välittömästi sekä fosfolipidien, että tekijän V kanssa muodostaen protrombinaasikompleksin, joka vaikuttaa protrombiiniin. Kalsiumionien läsnä ollessa tämä kompleksi pilkkoo protrombiinin trombiini-muotoon. (Guyton – Hall 2000: 423; Lassila 2007: 38.) Trombiini on entsyymi, joka vaikuttaa fibrinogeeniin irrottamalla siitä kaksi peptidiä, jolloin syntyy ensin liukoisessa muodossa olevia fibriinimonomeereja. Liukenematon hyytymä syntyy, kun nämä fibriinimonomeerit polymerisoituessaan haaroituvat ja trombiinin aktivoima tekijä XIIIa stabiloi fibriinisäikeet. (Guyton – Hall 2000: 422–423 ; Lassila 2007: 38.)

### 2.3.2 Sisäinen aktivaatiotie

Niin sanottu sisäinen aktivaatiotie (kuvio 4) käynnistyy, kun vereen kohdistuva trauma tai kosketus verisuonen seinämästä paljastuvien kollageenisyyden kanssa muuttaa hyytymistekijän XII aktiiviseksi (FXIIa) (Guyton – Hall 2000: 423). Kontaktipinnan (kollageenisyyt) lisäksi tähän aktivoitumiseen tarvitaan kofaktoreita kuten prekallikreeni ja korkean molekyylipainon kininogeeni (HMWK, high-molecular-weight kininogen) (Hillman – Ault 1998: 413; Abshire – Jobe 2009: 437). XIIa vaikuttaa entsyymaattisesti hyytymisjärjestelmän seuraavaan tekijään XI aktivoien sen. XIa taas aktivoi seuraavan tekijän IX. Nykyisin tiedetään, että nämä tapahtumat ovat sivuroolissa varsinaisen hyytymisen kannalta. (Abshire – Jobe 2009: 437.)

Aktivoitunut tekijä IXa toimii yhdessä trombiinin aktivoiman hyytymistekijän VIIIa, verihiutaleiden fosfolipidien ja kalsiumionien ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kanssa niin, että hyytymistekijä X aktivoituu. (Guyton – Hall 2000: 423). Tästä eteenpäin reaktio jatkuu samanlaisena, kuin ulkoisessa aktivaatioreitissä olen kuvannut.

Sisäisen aktivaatiotien viimeinen vaihe, jossa tarvitaan tekijöitä IXa, VIIIa, verihiutaleiden fosfolipidejä sekä kalsiumioneja, on kriittinen siksi, että tekijöiden VIII ja IX synnynäiset puutokset aiheuttavat verenvuototaudin eli hemofilian. (Guyton – Hall 2000:

423; Haug ym. 2007: 321). Myös hemofilioissa pieni määrä trombiinia muodostuu ulkoisen aktivaatiotien kautta kudostekijän ja FVIIa:n reagoiessa keskenään, ja näin hyytymisen alussa syntyy fibriiniverkko. Tämä tapahtuma on kuitenkin riittämätön hyytymisen ylläpitämiseksi, koska lisätrombiinin muodostus on riippuvainen tenaasi-kompleksista. Lisäksi ulkoisen aktivaatiotien vaikutus vaimenee nopeasti, koska sitä säätelemään tulee kudostekijäinhibiittori eli TFPI (tissue factor pathway inhibitor). (Abshire – Jobe: 2009: 437.) Tenaasissa VIIIa toimii kofaktorina IXa:n ollessa entsyymi. Näiden molempien hyytymistekijöiden toiminta on yhtä tärkeä hyytymistapahtuman etenemiselle. (Lassila – Siimes – Rasi 2007: 519-20.)

von Willebrand –tekijä (VWF) vaikuttaa välillisesti myös sisäisen aktivaatiotien hyytymistekijän VIII määrään, koska VWF:n tehtävänä on vaikuttaa paitsi verihiutaleiden tarttuvuuteen myös toimia hyytymistekijä VIII:n kantajana verenkierrossa. von Willebrandin –tauti voi siis aiheuttaa APT-ajan pidentymistä, mikäli VIII:n taso on alentunut. (Mäkipernaa – Armstrong 2007: 534). Verenvuototaipumuksen taustalla voi olla myös jonkin muun plasman hyytymistekijän puute, verihiutaleiden puute tai toimimattomuus tai vaskulaarinen syy. Yleistyneen vuototaipumuksen seulontakokeita ovat trombosyyttien laskenta, tromboplastiiniaika eli TT sekä aktivoitu partiaallinen tromboplastiiniaika eli APTT (Elonen 1998: 1221).

### 3 AKTIVOITU PARTIAALINEN TROMBOLASTIINIAIKA JA SEN KÄYTTÖ-ALUEET

Aktivoitu partiaallinen tromboplastiiniaika eli APTT on seulontatutkimus, jota käytetään ensisijaisesti hyytymishäiriöiden selvittelyyn (HUSLAB 2010a). Mikäli potilaalla on epäselviä verenvuotoja, voidaan APTT:n avulla seuloa mahdollisuutta sisäisen aktivaatiotien hyytymistekijävajauksesta. Yleisimmät perinnölliset hyytymistekijävajaukset ovat FVIII- ja FIX-tekijöiden puutoksia tai vajauksia, jolloin kyseessä on A- tai B-hemofilia. Von Willebrandin –taudissa vWF:n aktiivisuus tai pitoisuus tai molemmat on alentunut ja vaikeisiin tautimuotoihin liittyy FVIII-tason alentuminen. APTT:n käytön kannalta nämä sairaudet nousevat merkittävimiksi, koska ne ovat yleisimmät perinnölliset verenvuototaudit. (Kolde 2001: 78–79; Lassila ym. 2007: 516.)

FVIII ja FXI –puutosten lisäksi, myös muut sisäisen aktivaatiotien faktorien vakavat puutokset tulevat APTT:llä näkyviin hyytymisajan pidentymisenä. Nämä tautitilat ovat

kuitenkin harvinaisia. APTT:llä esiin tulevan vuototaipumuksen taustalla voi myös olla disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio (DIK), maksan vajaatoiminta (koska suurin osa hyytymistekijöistä tuotetaan maksassa) tai hankinnainen tautitila. (Kolde 2001: 79; Lassila ym. 2007: 516; HUSLAB 2010a.) Hankinnaisessa hemofiliassa henkilölle kehittyy autovasta-aineita useimmiten hyytymistekijä FVIII:a kohtaan, ja se nähdään APT-ajan pidentymisenä. Autoimmuunitauti ja syövät ovat hankinnaiselle hemofialle altistavia sairauksia. Hankinnainen hemofilia on hyvin harvinainen (yksi miljoonasta sairastuu vuosittain). (Oksanen 2007:559.)

APTT-tutkimuksen toinen käyttötarkoitus on fraktioimattoman hepariinihoidon seuranta. Myös suonensisäisten suorien trombiinimestäjien seurannassa voidaan käyttää APTT-tutkimusta. Pienimolekyylinen hepariini ei yleensä pidennä APT-aikaa, mutta pidentyessään APTT-tulos viittaa lääkkeen kumuloitumiseen lähinnä munuaisten vajaatoiminnan yhteydessä. Tukoshäiriöissä APTT-arvoa voi pidentää niin sanottu lupusantikoagulantti, joka on fosofolipidivasta-aine. Kuten jo edellä on useasti mainittu, APTT mittaa sisäisen aktivaatiotien hyytymistekijöiden (XII, XI, IX, VIII, X, V, II ja I) yhteisvaikutusta. On muistettava, että seulontatutkimuksena se on yksinään epäspesifinen ja epäherkkä, mutta sitä käytetään yhdessä tromboplastiiniaika -tutkimuksen (P-TT) kanssa hyytymishäiriöiden seulonnassa. (HUSLAB 2010a; Leinonen 2010.) Tutkimuksen epäherkkyydestä kertoo se, että APTT tulos poikkeaa vasta, kun joku sisäisen aktivaatiotien tekijät VIII, IX tai XI vähenevät alle 30-40 %:iin normaalista. Tällaisia alenemia havaitaan vaikeassa ja keskivaikeassa hemofiliassa ja von Willebrandin taudissa. (Oksanen 2007: 551.)

### 3.1 Perinnölliset hemofiliat ja von Willebrandin tauti

A-hemofilia eli klassinen hemofilia on verenvuototauti, joka johtuu hyytymistekijän VIII puutoksesta tai vajauksesta ja B-hemofilian taustalla on vajaus tai puutos entsyymaattisessa tekijässä IX (Forbes 1984: 177; Brower – Thompson 2000a,b; Lassila ym. 2007). Hyytymistekijöitä VIII ja IX koodaavat geenit sijaitsevat X-kromosomissa, joten näiden periytyminen on kytkeytynyt naissukupuoleen. Mutaatio jommassa kummassa näistä geeneistä tekee naisesta hemofilian kantajan. Useimmiten kantajanaisella ei esiinny kliinistä tautia, koska hänen toinen, terve vastinkromosomissa oleva geeni korvaa virheellisen geenin toimintaa. (Brower – Thompson 2000a; Lassila ym. 2007: 517.) Kantajanaisella on kuitenkin jokaisessa raskaudessa 50 % mahdollisuus siirtää mutatoitunut geeni lapselleen. Mutatoituneen geenin perineet poikalapset saavat kliinisen tau-

din, koska heiltä puuttuu kompensoiva kromosomi. Tytöistä taas tulee kantajia. Sairastuneet pojat siirtävät virheellisen geenin aikanaan kaikille tyttärilleen, mutta eivät pojilleen. (Forbes 1984: 177, Brower – Thompson 2000a; Lassila ym. 2007: 517.)

Sekä A- että B-hemofilioissa esiintyy eri vaikeusasteita ja ne määritetään kliinisen kuvan ja hyytymistekijäaktiivisuuden perusteella. Hyytymistekijän aktiivisuuden puutos voi olla vaikea, keskivaikea tai lievä. Mitä alhaisempi hyytymistekijäaktiivisuus on, sitä vaikeammasta verenvuototaudista on kyse. Terveellä ihmisellä FVIII ja FIX aktiivisuus on 50 – 150 %, kun taas vaikeassa hemofiliassa plasmassa ei todeta lainkaan näiden hyytymistekijöiden aktiivisuutta. Laboratoriokokeiden spesifisten hyytymistekijäaktiivisuusmääritysten herkkyys riittää havaitsemaan 1 %:n aktiivisuuden, joten vaikeaa hemofiliaa sairastavilla aktiivisuuden ilmoitetaan olevan alle 1 %. Keskivaikeassa hemofiliassa hyytymistekijäaktiivisuus on 1 – 5 % ja lievässä tautimuodossa liikutaan 5 – 40 %:n välillä. (Rasi, Vesa 2007: 11–12 .)

Vaikeat hemofiliat diagnosoidaan usein jo ensimmäisenä ikävuotena, mutta lievät tautimuodot saattavat tulla esiin vasta aikuisiällä esimerkiksi hampaanpoiston yhteydessä tai muun toimenpiteen yhteydessä, kun verenvuoto ei tyrehdykään normaalisti. (Forbes 1984: 178; Brower – Thompson 2000 a,b; Lassila 2007: 520.) Kliinisinä oireina vaikeassa A-hemofiliassa ovat spontaanit nivel- ja lihasvuodot, aina poikkeavat leikkausvuodot ja vuoto aina hampaanpoiston yhteydessä. Lisäksi verivirtsaisuus on tavallista. Keskivaikeassa ja lievässä tautimuodossa oireet ovat lievemmat. (Lassila ym. 2007: 521.) Vuotohäiriöiden hoitona käytetään suonensisäisesti annettavaa hyytymistekijää, jolla hyytymismekanismi normalisoidaan tilapäisesti. Käytössä on sekä ennaltaehkäisevää että tarpeen mukaan annettavaa hoitoa ja hoitomuoto riippuu taudin vaikeusasteesta ja siitä onko potilas lapsi vai aikuinen. (Lassila ym. 2007: 523.)

von Willebrandin tauti (VW-tauti) on yleisin verenvuotohäiriön taustalla oleva sairaus, mutta vaikka jopa 1 %:lla väestöstä voidaan todeta tautiin viittaavia laboratoriolöydöksiä, vain noin kymmenesosalla heistä esiintyy kliinisesti merkittäviä vuoto-oireita. Tautidiagnoosia asetettaessa on siis syytä tarkastella laboratorioarvoja ennen kaikkea vuoto-oireiden kannalta. VW-tauti periytyy autosomissa ja voi siis esiintyä sekä miehillä että naisilla. VW-tautia on montaa eri tyyppiä. (Mäkipernaa – Armstrong 2007: 532, 535–537.)

Se, miten tautiin liittyvä von Willebrandin tekijän (VWF) aleneminen vaikuttaa APT-aikaan, liittyy VWF:n tärkeään tehtävään toimia sisäisen aktivaatiotien tekijän VIII kantajana verenkierrossa. VWF suojaa hyytymistekijää VIII (FVIII) pilkkoutumiselta niin kauan kuin se on sitoutuneena VWF:ään. Ilman VWF:ää FVIII:n puoliintumisaika on huomattavan lyhyt ja tästä seuraa se, että VWF:n puutos vaikuttaa myös FVIII:n määrään veressä. Jotta FVIII:n puutos vaikuttaisi APT-ajan pidentymiseen, täytyy tämän hyytymistekijätason olla alle 30 %. von Willebrandin taudissa APTT tulos voi olla myös normaali. (Mäkipernaa – Armstrong 2007: 534, 538.)

### 3.2 Heparinihoidon monitorointi

Vuototaipumuksen selvittelyn lisäksi liuotushoidon seuranta on yksi tärkeimpiä APTT:n käyttöalueita. Veritulpan liuotushoidon yhteydessä suonensisäisesti annettu fraktioimaton hepariini (UFH) vaatii jatkuvaa APTT-arvojen seurantaa, jotta potilaan annostus pysyy terapeutisella alueella ja toisaalta ettei potilaalle aiheuteta vuotokomplikaatioita. Hepariini on yleisin käytössä oleva nopeavaikutteinen antikoagulantti ja sitä käytetään laskimo- ja keuhkoveritulpan ensivaiheen hoidossa sekä näiden sairauksien ehkäisyssä. Lisäksi sitä käytetään äkillisten valtimotukosten hoidossa, sydän- ja verisuonikirurgian, hemodialyysihoidojen ja plasmanvaihtojen yhteydessä sekä DIK:n hoidon osana. (Mustonen – Lassila 2007: 602.)

Hepariini on eripituisten hepariiniglykosaminoglykaanien seos ja se eristetään sian suoliston syöttösoluista tai naudän keuhkokudoksesta. Hepariinin tärkein antikoagulaatiovaikutus perustuu siihen, että se parantaa antitrombiinin kykyä estää trombiinin ja aktivoituneen tekijän X toimintaa hyytymistapahtumassa. (Eby 1997: 1105; Rossinen – Lassila – Nieminen 2004: 636; Mustonen – Lassila 2007: 603.) Vaikka hepariinin vaikutus ei ulotu hyytymään sitoutuneeseen trombiiniin, on hepariinilla kuitenkin tärkeä osuus infarktisuonen auki pitämisessä, sillä sekä trombiini, että FXa voivat aiheuttaa uuden veritulpan paljastuessaan hyytymästä fibrinolyysin yhteydessä (Rossinen ym. 2004: 636).

Heparinihoito aloitetaan boluksena laskimoon, jonka jälkeen annostus jatkuu infuusiona potilaan painokilojen mukaan. APTT-määritys tehdään neljän tunnin kuluttua hoidon aloittamisesta ja seurantaa jatketaan aluksi useita kertoja päivässä ja myöhemmin kerran päivässä aina samaan aikaan, jotta vältetään hepariinin kumulaatio. APTT:n tavoitearvon tulisi olla 2-3 kertaa potilaan normaaliarvoa korkeampi. (Heparin Leo 2002; Rossi-



nen ym. 2004: 636; Mustonen – Lassila 2007: 602.) APTT-tuloksen perusteella annostusta muutetaan tarvittaessa ja hoitoa jatketaan yleensä vähintään 5-6 vuorokautta (Heparin Leo 2002).

Nykyisin fraktioimattoman hepariinin sijasta käytetään yhä enemmän lyhytketjuista hepariinia (LMWH, low molecular weight heparin), koska sillä on monia etuja fraktioimattomaan hepariiniin nähden. Yksi helppokäyttöisyyteen ja edullisuuteen liittyvä tekijä on se, että se ei vaadi (APTT-tutkimuksen) laboratorioseurantaa samoin kuin fraktioimatonta hepariiniä. Lyhytketjuinen hepariini ei kuitenkaan tule täysin syrjäyttämään fraktioimatonta hepariinia, koska sillä on kilpailijaansa nähden erityisiä etuja. Nämä edut tulevat esille sydän- ja keuhkokonetta vaativissa sydänleikkauksissa, plasmanvaihdossa ja tapauksissa, joissa vuotoalttiilla tai välittömään leikkaukseen joutuvalla potilaalla on aktiivinen tromboosi tai munuaisten vaikeata vajaatoimintaa sairastava saa ennaltaehkäisevää hepariinihoitoa tromboosiin. (Hirsh ym. 1995: 258S, 267S; Lassila – Heinonen 2001: 2598; Lassila – Mäkipernaa 2007: 2925 – 2926.) Näin ollen, koska jatkossakin fraktioimatonta hepariinia käytetään erityistilanteissa, pysyy myös APTT-tutkimus tarpeellisena hepariinihoidon seurannan mittarina.

### 3.3 Lupusantikoagulantti

Selittämättömän pitkän APTT:n taustalla voi potilaalla olla niin sanottu lupusantikoagulantti, johon luetaan kuuluvan joukko spesifiteetiltään heterogeenisiä fosfolipidivastaaineita. Lupusantikoagulantti liittyy fosfolipidivasta-aineoireyhtymään, joka voi olla primaarinen tai sekundaarinen eli esiintyä muiden sairauksien, kuten autoimmuunisairauksiin kuuluvan SLE:n tai esimerkiksi syöpäkasvaimen, yhteydessä. Fosfolipidivasta-aineoireyhtymä on hankinnainen tukostaipumusta aiheuttava tila. Oireyhtymän diagnostisina kriteereinä pidetään joko aiemmin sairastettua veritulppaa tai toistuvia keskenmenoja sekä lupusantikoagulantin, kardiolipidivasta-aineiden tai beeta2-glykoproteiini I –vasta-aineiden toteamista vähintään kahdessa laboratorioskokeessa kuuden viikon välein. 3 – 14 %:lla laskimotukoksen sairastaneista potilaista todetaan lupusantikoagulantti. (Halonen 2006; Puurunen – Syrjälä 2007.)

Lupusantikoagulantti pidentää APTT-tulosta, koska se on fosfolipideistä riippuvainen hyytymistekijämääritys. Lupusantikoagulantin aiheuttama APTT:n pidentyminen on paradoksaalista, koska lupusantikoagulantti aiheuttaa potilaalle tukostaipumuksen, mut-

ta APTT-arvo viittaa vuototaipumukseen. Tämä johtuu siitä syystä, että lupusantikoagulantti pidentää veren hyytymistä vain koeputkessa, ei elimistössä. (HUSLAB 2010c.)

Haasteellista APTT-määrityksen kannalta on se, että veritulppaan hepariinihoitoa saavalla potilaalla voi olla lupusantikoagulantti, jolloin APT-ajan pidentymisen taustalla on sekä hepariini, että lupusantikoagulantti. Tämä voi johtaa epätarkoituksenmukaiseen hepariinin annosteluun, jos hoitoa suunnitellaan ainoastaan APTT:n perusteella. Tämä problematiikka tekee reagenssin valinnasta haastavaa, sillä se ei saa olla liian herkkä lupusantikoagulantin vaikutukselle, jotta se olisi vielä luotettava hepariinihoidon mittari. (Kolde 2001: 80; Saarela 2010 b.)

#### 4 AKTIVOIDUN TROMBOPLASTIINIAJAN MÄÄRITTÄMINEN HUSLAB:IN HYYTYMISTUTKIMUSTYÖPISTEESSÄ

APTT -määritys tehdään HUSLAB:in hyytymistutkimustyöpiesteessä plasmasta ja tutkimuslyhenteenä käytetään näin ollen P-APTT. Menetelmä mittaa hyytymisaikaa sekunteina ja tutkimuksen viitearvot nykyisellä reagenssilla ovat (vuodesta 2007 alkaen) kaikille 23 – 33 sekuntia. Viitearvot ylittävän APTT-tuloksen syy täytyy aina selvittää jolloin ensisijaisesti on suljettava pois näytteenoton hepariiniokontaminaatio. Hepariniokontaminaatio voi tapahtua, mikäli näyte otetaan heparinisoidusta kanyylistä ilman riittävää verihukkamäärää. (HUSLAB 2010a; CLSI 2008.) Alentuneita APTT-arvoja taas tavataan potilailla, joilla on tukostaipumus tai tilanteessa, jossa akuutin faasin reaktiosta johtuen FVIII-taso on kohonnut (Kolde 2001: 79; Leinonen 2008).

Ilmaisu ”partiaalinen” eli osittainen tromboplastiini tarkoittaa sitä, että verrattuna TT-määritykseen, APTT-reagenssi sisältää fosfolipidejä ja kalsiumkloridia ( $\text{CaCl}_2$ ), mutta ei kudostekijää. APTT:n normaali viiteväli on riippuvainen reagenssista ja käytetystä laitteesta, jolloin kunkin klinisen laboratorion on itse määritettävä viitearvot käyttämänsä menetelmä huomioon ottaen. Koska APTT-reagenssien ominaisuudet vaihtelevat laajasti, kliniset päätökset APTT:n perusteella voidaan tehdä vain, mikäli reagenssin ominaisuudet tunnetaan. (Kolde 2001: 78–79.)

APTT-määritystä varten näyte otetaan kansainvälisen sopimuksen mukaan silikonoituun lasi- tai muoviputkeen, jossa antikoagulanttina on 3,2 % natriumsitraatti (CLSI 2008). Natriumsitraatin antikoagulaatiovaikutus perustuu siihen, että se sitoo näytteen  $\text{Ca}^{2+}$  -ionit, jotka ovat välttämättömiä hyytymistapahtuman käynnistymiselle ja etenemiselle.

APTT-määrityksessä potilasnäytettä inkuboidaan fosfolipidejä ja kontaktiaktivaattoria sisältävän APTT-reagenssin kanssa, jonka vaikutuksesta näytteessä käynnistyy niin sanottu kontaktiaktivaatio FXII:n aktivoituessa. Reagenssin fosfolipidit korvaavat elimistön verihiutaleiden kalvojen roolia ja kontaktiaktivaattori taas jäljittelee kosketusta verisuonen seinämän kollageenin kanssa. Kun aktivaatio on tapahtunut täydellisesti, näytteeseen lisätään kalsiumkloridia varsinaisen hyytymisen käynnistämiseksi. Hyytymän muodostumiseen kulunut aika mitataan. (Saarela 2007; Leinonen 2008; Lassila 2007: 37.) APTT-näyte säilyy erottelemattomana huoneenlämmössä 4 tuntia. Mikäli näytteen toimitus viivästyy, on se sentrifugoitava ja pakastettava. (CLSI 2008.) HUSLAB:issa APTT-näytteen säilyvyys ja käsittely on ohjeistettu erikseen. Sentrifugointi tapahtuu 2500 g:n nopeudella 10 minuuttia. (Saarela 2007.)

#### 4.1 APTT-reagenssit

APTT-reagenssi sisältää fosfolipidejä ja kontaktiaktivaattoria. Riippuen reagenssivalmistajasta, kalsiumkloridi tulee joko reagenssipakkaukseen mukana tai hankitaan erikseen. Kontaktiaktivaattori on seos, jossa on joko negatiivisesti varautuneita partikkeleita, kuten kaoliinia tai silikaa, happoa (ellagic acid) ja polyfenolia tai sulfatideja, jotka on yhdistetty kaoliinin kanssa. Reagenssin fosfolipidit voivat olla synteettisesti valmistettuja, eläimen kudoksesta eristettyjä tai peräisin jostakin kasvista, kuten soijapavusta. Yleensä erilaisten fosfolipidien seos, mukaan lukien fosfatidyyli seriini, toimii parhaiten. Reagenssin ominaisuuksista kontaktiaktivaattoria tärkeämpi on fosfolipidien tyyppi ja konsentraatio. (Kolde 2001: 79.)

Meilahden hyytymistutkimustyöpisteessä APTT-määrityksissä on vuodesta 2007 alkaen ollut käytössä saksalaisen valmistajan Siemensin Actin FSL –reagenssi. Lyhenne FSL tulee sanoista ”Factor Sensitive and Lupus anticoagulant sensitive reagent”. Tämä viittaa siihen, että reagenssi on tunnettu hyytymistekijä- sekä lupusantikoagulanttiherkkänä reagenssina. (Lawrie A.S. ym. 1998: 180.) Muut testattavat reagenssit olivat ranskalaisen Diagnostica Stagon valmistama PTT Automate (myöhemmin STAGO) ja italialaisen Instrumentation Laboratoryn IL Test APTT-SP (IL). Viimeksi mainittu reagenssi on jo HUSLAB:issa käytössä lupusantikoagulantti (P-LupusAK) määrityksissä. (Leinonen 2010a.)

Actin FSL –reagenssia voidaan käyttää manuaalisesti toimivissa tai täysin automatisoiduissa hyytymisanalysointilaitteissa. Käyttövalmisreagenssi säilytetään jääkaapissa

+4°C:ssa. Ennen käyttöä se on kuitenkin sekoitettava hitaasti käännelellä 5 – 8 kertaa. Avaamaton reagenssi säilyy jääkaapissa viimeiseen käyttöpäivään asti. Avattu reagenssi on säilytettävä jääkaapissa ja se on toimiva seitsemän päivän ajan avaamisesta. Actin FSL –reagenssi sisältää sekä soijasta peräisin olevia että kanin aivoista eristettyjä puhdistettuja fosfatidejä hapossa (allagic acid). Lisäksi siihen on lisätty puskuria ja stabiointi- sekä säilöntäaineita. Kalsiumkloridi ei tule reagenssipakkauksen mukana, vaan se täytyy tilata erikseen. (Siemens 2006.)

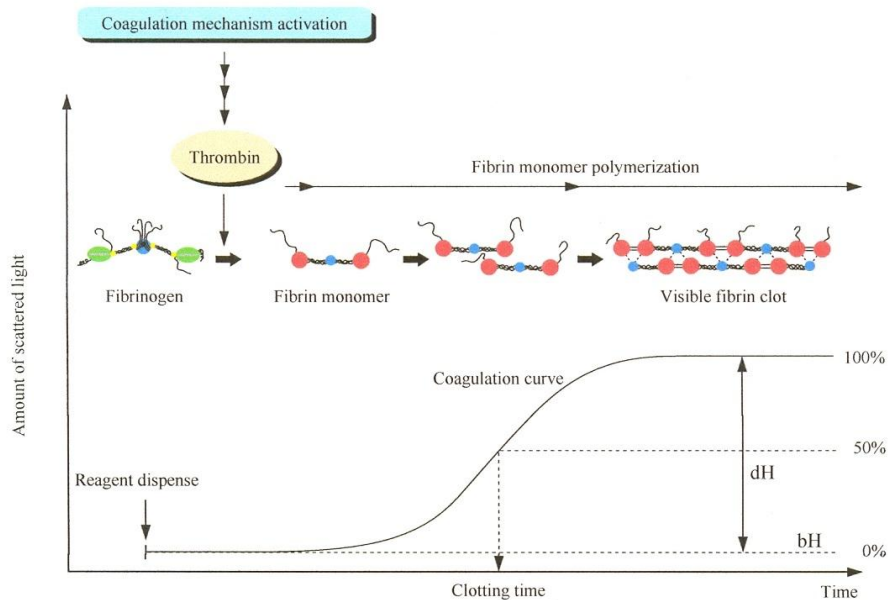
Stagon reagenssi on muista poiketen kylmäkuivattu jauhe, joka liuotetaan 5 ml:aan tislattua vettä, jonka jälkeen sen annetaan seistä huoneenlämmössä 30 minuuttia. Ennen käyttöä liuos sekoitetaan. Pakkaus ei sisällä kalsiumkloridia. Kylmäkuivattuna tämä reagenssi säilyy jääkaapissa viimeiseen käyttöpäivään asti, mutta valmiina liuksena säilymisaika jääkaappilämpötilassa (+4°C:ssa) on seitsemän päivää. Reagenssi sisältää kanin aivoista eristettyjä trombosyyttejä korvaavia aineita ja partikkeliaktivaattoria puskuroidussa ympäristössä. (Diagnostics Stago 2005.)

IL:n reagenssipakkauksessa kalsiumkloridi on käyttövalmis sellaisenaan, mutta varsinainen reagenssi vaatii voimakkaan sekoittamisen ennen käyttöä (käsin 15 sekuntia tai 5 sekuntia Vortex-sekoittajassa). Sekä reagenssi että kalsiumkloridi säilytetään jääkaapissa, ja avaamisen jälkeen molempia voidaan käyttää 30 päivää. Avattuna tämä reagenssi säilyy huomattavan paljon kauemmin kuin Actin FSL tai Stago-reagenssi. Avaamattomana IL-reagenssi säilyy viimeiseen käyttöpäivään asti. IL-reagenssi on kolloidi silika dispersio, jossa on synteettisiä fosfolipidejä, puskuria ja säilöntäaineita. (Instrumentation Laboratory 2005.)

#### 4.2 Hyytymisajan mittaaminen Sysmex® CA-7000-analysaattorilla

Reagenssitestaukset tehtiin HUSLAB:in hyytymistutkimustyöpisteessä Sysmex CA-7000 –analysaattorilla, koska se on ensisijaisesti käytössä oleva APTT-määrityslaite. (Kuvio 6). Hyytymisajan mittaaminen Sysmex® CA-7000-analysaattorilla perustuu sekä valonsirontaan että hyytymisen prosentuaaliseen mittaamiseen päätepiestimenetelmällä. Sysmexin® CA-sarjan analysaattorille on ominaista, että hyytymistutkimuksen ollessa kyseessä näytteessä ei tapahdu suurta muutosta valonsironnan suhteen heti reagenssin lisäämisen jälkeen. Hyytymistapahtuman edetessä fibriinimonomeerien polymeerisaatio kiihtyy ja reaktioseos tulee sameaksi. Reaktioseos valaistaan kirkasvalosäteilyä

emittoivan diodin avulla ja 90 asteen kulmassa mitattu valonsironnan määrä muutetaan sähköiseksi signaaliksi, jolloin reaktioseoksen sameus voidaan havaita optisesti. Tämä on valonsirontamenetelmä. (Sysmex 2007.)



KUVIO 5. Hyytymisajan mittaaminen Sysmex® CA-7000 –analyssaattorilla.

Hyytymisajan määrittäminen prosentuaalisella päätepiestemenetelmällä tapahtuu niin, että 0 %:n taso saadaan mittaamalla valonsironta heti reagenssin lisäämisen jälkeen ja 100 %:n taso määritellään mittaamalla valonsironta reaktion päätyttyä. Hyytymisaika (APTT-tulos) Sysmex® CA-analyssaattorissa määritetään reaktion puolivälistä eli 50 %:n kohdalta, koska siinä kohdassa valonsironnan muutos on voimakkainta ja fibriinimonomeerien polymerisaation nopeus reaktiossa on korkea. (Sysmex 2007.) Hyytymisajan mittausalue Sysmex® CA-7000 –analyssaattorilla on 18-150 sekuntia (Saarela 2007).



KUVIO 6. Sysmex® CA-7000 –analysointilaitteisto (Siemens 2010).

#### 4.3 Menetelmän uusintavalidointi ja reagenssivertailu

Yleisesti validoinnilla tarkoitetaan niitä toimenpiteitä, joilla osoitetaan, että kemiallinen mittausten menetelmä sopii aiottuun käyttötarkoitukseen (Ehder 2005: 25). Varsinainen menetelmävalidointi taas on laboratorion suorittama työ, joka dokumentoidaan ja jonka avulla osoitetaan, että menetelmän tulokset täyttävät asetetut laatuvaatimukset. Täysimittainen menetelmävalidointi suoritetaan silloin, kun ei ennestään ole olemassa tai saatavissa tuloksia niistä laatumittareista, jotka sopisivat käytettävään menetelmään. (Simonsen 2009: 38.)

Menetelmän validoinnissa tutkittavia asioita ovat: selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamisraja, määrittämissä, poikkeama, saanto, häiriökestävyys tai toimintavarmuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus. Uusintavalidoinnissa taas on kysymys siitä, että käytössä olevaa menetelmää halutaan uudistaa tietyillä parannuksilla. Tällöin validoinnin laajuus riippuu siitä millaisia muutoksia olemassa olevaan menetelmään halutaan tehdä käyttötarkoituksen, laitteiston, henkilökunnan tai olosuhteiden johdosta. (Simonsen 2009: 38; Ehder 2005: 26.) Tässä opinnäytetyössä on kyse alustavasta reagenssikoestuksesta, joka sisältää uusintavalidointiin liittyviä toimenpiteitä, koska APTT-menetelmää halutaan tutkia reagenssien herkkyyden osalta.

Toistettavuudella tarkoitetaan sitä, kun samaa määrittäystä tehdään yhdestä pienempiin eriin jaetusta näytteestä useita kertoja peräkkäin, pysyvissä olosuhteissa ja lyhyellä ai-

kävälillä. Pysyvillä olosuhteilla tarkoitetaan sitä, että tekijä, laite, reagenssi, lämpötila tai muu sellainen ei määritysten välillä vaihdu. Tavoite on, että määritysten tulokset poikkeavat toisistaan mahdollisimman vähän eli peräkkäisten mittaustulosten keskihajonta on mahdollisimman pieni. Sarjan sisäinen vaihtelu on yleensä pienempää kuin sarjojen välinen vaihtelu. (Jaarinen – Niiranen 2005: 12; Ehder 2005: 37.) Validointisuunnitelmassamme sarjojen sisäiselle toistuvuudelle asetettu tavoite oli  $CV \% \leq 5 \%$ , kun se sarjojen välisessä toistuvuudessa oli hiukan suurempi,  $CV \% \leq 6 \%$  (Leinonen 2010a).

Käytännössä sarjan sisäistä toistuvuutta mitataan niin, että samaa näytettä analysoidaan esimerkiksi 20 kertaa peräkkäin. Sarjojen välinen toistuvuus taas saadaan selville, kun esimerkiksi päivän aikana joka tunti sama 20 näytteen sarja analysoidaan uudestaan ja sarjojen tuloksia verrataan keskenään. Koska toistettavuus määritetään analysoimalla useita rinnakkaismäärytyksiä erilaisista näytteistä, joiden pitoisuudet (tässä tapauksessa hyytymisajat) vaihtelevat, oli tässä reagenssivertailussa sarjan sisäistä toistuvuutta mittaessa näytteenä sekä normaalitaso- että hoitotasokontrollinäyte (Ehder 2005: 37). Molemmat näytesarjat koostuivat 20 pieniin putkiin jaetuista ja pakastetuista näytteistä.

Opinnäytetyöni tarkoitus oli verrata reagenssien herkkyyttä niin hyytymisvajeiden, hepariinihoidon kuin lupusantikoagulantinkin havaitsemisessa. Menetelmän herkkyydellä validointikielessä tarkoitetaan suhdetta, miten analyysin tulos muuttuu analyysin pitoisuuden muuttuessa (Jaarinen – Niiranen 2005: 13; Simonsen 2009: 44). Tässä tapauksessa APTT-määrittelyn ollessa kyseessä pitoisuuden muutoksen sijaan tarkastellaan hyytymisajan muutosta. Esimerkiksi mitä vähemmän näytteessä on hyytymistekijäaktiivisuutta, sitä enemmän APT-aika pitenee tai toisaalta, mitä enemmän näytteessä on hepariinia tai lupusantikoagulanttia, sitä korkeampi APTT tulos saadaan. Usein kliinisessä laboratorioslangissa herkkyydestä puhuttaessa tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, jonka jokin menetelmä pystyy mittaamaan, jolloin on kyseessä termi ”määrittelyraja”. Sitä ei saisi sekoittaa käsitteeseen analyytin herkkyys, mikä tarkoittaa sitä, kuinka herkästi jokin menetelmä reagoi analyysin pitoisuuden muutoksiin. (Linnet – Boyd 2008: 210.)

## 5 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

APTT-tutkimuksen monikäyttöisyys niin hyytymistekijävajeiden seulonassa, hepariinihoidon monitoroinnissa kuin lupusantikoagulantin havaitsemisessa luo kliiniselle labo-

ratoriolle haasteen valita sopiva reagenssi, koska eri APTT-reagenssien herkkyys kullakin käyttöalueella vaihtelee. Yksi reagenssi voi olla erityisen herkkä havaitsemaan lupusantikoagulantia, kun jonkin toisen reagenssin avulla APTT-määrittämisestä saadaan herkempi hyytymistekijävajeiden seulontaa varten. (Lawrie ym. 1998: 179-180.)

HUSLAB:issa APTT:n käytön painopiste on tätä nykyä yhä enemmän hyytymistekijävajeiden havaitsemisessa. Tästä syystä opinnäytetyöni päätavoite oli vertailla kolmen reagenssin herkkyyttä hyytymistekijävajeiden havaitsemisessa. Hepariini- ja lupusherkkyydet testattiin samalla, sillä APTT-tutkimuksen tulisi olla luotettava mittari kaikilla käyttöalueilla. (Leinonen 2010a.) Opinnäytetyöni tulosten avulla saatiin tietoa näiden kolmen eri reagenssin herkkyyksistä. Näin ollen tulevaisuuden varalta on olemassa tietoa siitä, minkälaisia herkkyysominaisuuksia näillä reagensseilla on, mikäli reagenssien valmistajia halutaan kilpailuttaa (Leinonen 2010b).

Opinnäytetyöni tavoitteet ovat:

1. Vertailumittarin luominen ja menetelmän toistettavuuden arvioiminen:  
Vertailumittarin luomista varten mitattiin APTT:n suhteen normaalitasoisia näytteitä oli kymmenen (n=10). Sarjojen sisäistä ja sarjojen välistä toistuvuutta tarkasteltiin normaalitaso- ja hoitotasokontrollin avulla. Sarjojen sisäisessä toistuvuusmäärittämisessä käytettiin näytesarjaa (n=20) ja sarjojen välisessä toistuvuudessa molempia kontrolleja oli kaksi (n=2).
2. Mikä testatuista reagensseista on herkin lievien hyytymistekijävajeiden FVIII (A- hemofilia) ja FIX (B-hemofilia) havaitsemisessa?  
Hyytymistekijäherkkyyden määrittämiseksi reagenssitestauksessa analysoitiin potilasnäytteitä, joissa oli aiemmin todettu hyytymistekijäaktiivisuuden alenema. FVIII-puutosnäytteitä oli viisitoista (n=15) ja FIX-puutosnäytteitä kymmenen (n=10).
3. Mikä testatuista reagensseista on herkin fraktioimattomalle hepariinille?  
Hepariiniherkkyyttä varten tehtiin laimennossarja, jossa käytettiin fraktioimatonta Leo Hepariini 5000 U/ml -injektionestettä ja Octaplas® -plasmavalmistetta.



#### 4. Mikä testatuista reagensseista on herkin lupusantikoagulantille?

Lupusherkkyyttä tutkittiin kymmenen (n=10) potilasnäytteen avulla, joissa aiemmin oli todettu positiivinen lupusantikoagulantti.

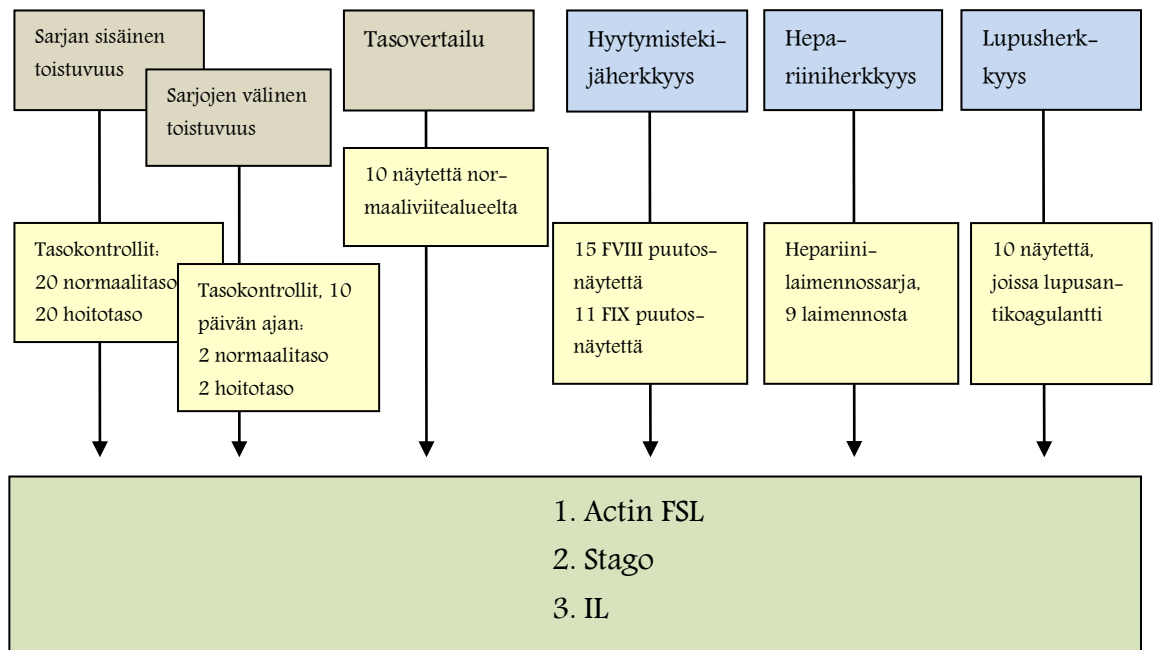
## 6 REAGENSIVERTAILUN SUORITTAMINEN

Reagenssivertailussa haettiin kolmella eri reagenssilla parasta mahdollista faktoriherkkyyttä hyytymistekijöille FVIII ja FIX, koska APTT-määrityksen käyttötarkoitus on HUSLAB:in hyytymistutkimustyöpisteessä suuntautumassa enenevässä määrin hyytymistekijävajausten havaitsemiseen. Samalla verrattiin näiden kolmen reagenssin hepariini- ja lupusherkkyyksiä. Validointisuunnitelman alustavaa APTT-reagenssikoestusta varten laati kemisti Jari Leinonen ja se on päivätty 18.3.2010. Se käsittää seuraavat reagenssin suorituskkyominaisuutta mittaavat validointiosiot: sarjan sisäinen toistuvuus, sarjojen välinen toistuvuus, kokonaisvariaatio, faktoriherkkyys, hepariiniherkkyys ja lupusherkkyys. (Leinonen 2010a.) Lisäksi koestukseen tuli mukaan tasovertailu, jonka avulla luotiin testattaville reagensseille teoreettiset viitearvot ja näin saatiin erilaiset reagenssit vertailukelpoisiksi keskenään.

Reagenssivertailun mittaukset suoritettiin validointisuunnitelman mukaisesti 5.6.-18.6.2010 Meilahden sairaalan automaatiolaboratorion hyytymistutkimusten työpisteessä. Testauksessa mukana olivat työpisteen vastuuhoitaja Ellen Saarela ja laboratoriohoitaja Liisa Tulikallio. Validointisuunnitelmasta poiketen testauksessa analyysit tehtiin pelkästään Sysmex® CA-700 analysaattorilla, vaikka rutiinilyössä APTT-määrityksiä tehdään myös Siemens BCS-XP analysaattorilla. Tämä valinta tehtiin siitä syystä, että kaikissa muissa HUSLAB:in toimipisteissä, joissa tehdään APTT-määrityksiä, on myös käytössä Sysmex laitteisto.

Reagenssitestauksessa käytössä oli APTT:n suhteen eritasoisia näytteitä. Kuviosta 7 käy ilmi mitä analyysejä vertailussa tehtiin ja millaisia näytteitä käytettiin (kuvio 7). Ennen näytteiden analysointia Stagon reagenssi liuotettiin 5 ml:aan tislattua vettä. Kaksi muuta reagenssia, Actin FSL ja IL, olivat valmiita liuoksia, joten ne otettiin jääkaapista huoneenlämpöön. Pakastetut normaalitaso- ja hoitotasokontrollinäytteet sulatettiin lämpöblokillä. Reagensseille oli määritelty jo aiemmin paikat analysaattorissa. Reagenssien lisäksi neulojen puhdistusta varten tarvittiin kaksi pullollista pesuliuosta sekä

kalsiumkloridia (CaCl<sub>2</sub>). Ennen analyysien aloitusta Sysmex® CA-7000:lla suoritettiin huuhteluohjelma tislatulla vedellä.



KUVIO 7. Reagenssitestauksen prosessikaavio. Ylimpänä validointiosiot, keskellä näytteiden määrä ja laatu ja alla reagenssit.

### 6.1 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistuvuus ja tasovertailu

Sarjan sisäistä toistuvuutta tarkasteltiin 20 normaalitasokontrollin sekä 20 hoitotasokontrollin avulla (kuvio 7). Sarjojen välinen toistuvuus suoritettiin kymmenen päivän aikana kahdella normaalitaso- ja kahdella hoitotasokontrollilla. Sarjan sisäisen toistuvuuden mittaamista varten normaali- ja hoitotasokontrollit (yhteensä 40) siirrettiin analyysiputkiin ja normaalitason kontrollit merkittiin N-kirjaimella ja numeroilla 1-20 (N1, N2, N3 jne...) Vastaavasti hoitotasoiset kontrollit merkittiin H-kirjaimella ja juoksevilla numeroilla 1-20. Näytteet täytyi ohjelmoida analysaattorille manuaalisesti, koska niissä ei ollut mitään viivakooditunnistetta. Tasovertailussa analysoitiin näytteitä (n=10), joiden tulokset olivat Actin FSL-reagenssille määritellyllä normaaliviitealueella (kuvio 7).

## 6.2 Hyytymistekijäherkkyyden testaaminen

Hyytymistekijöiden FVIII- ja FIX-puutoksien vaikutusta APTT:hen testattiin potilasnäytteillä, joissa hyytymistekijäaktiivisuustasot olivat matalia, välillä 0-50 %. FVIII:n suhteen matalia näytteitä oli 15 ja FIX:n suhteen matalia näytteitä oli 11 (kuvio 7). Näistä potilasnäytteistä laadittiin alkuperäisten viivakooditarrojen avulla lista, joka numeroitiin. Näyteputkia merkittiin ainoastaan juoksevilla numeroilla; näytteet käsiteltiin nimettöminä koko validoinnin ajan. Näytteille luotiin uudet viivakoodit, jotka analysaattori pystyi tunnistamaan. Sekä FVIII- että FIX-puutosnäytteet analysoitiin kahtena sarjana ja kukin sarja kolme kertaa, kolmella eri reagenssilla. Joidenkin hyytymistekijäpuutosnäytteiden osalta hyytymisaika oli analysaattorin mittausalueen ulkopuolella, joten niiden tuloksia ei voinut käyttää tilastoanalyysissä. Näitä olivat vaikeata hemofiliaa sairastavien potilaiden näytteet, joissa hyytymistekijäaktiivisuus oli < 1 %.

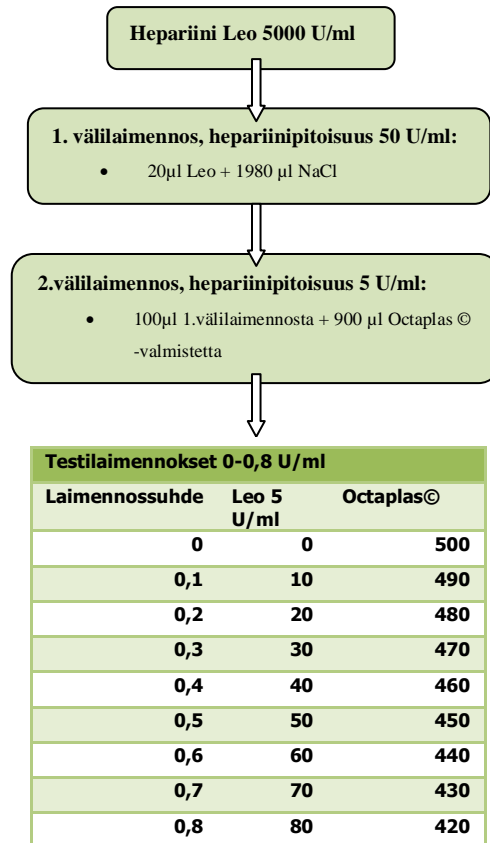
## 6.3 Hepariiniherkkyyden testaaminen

Hepariiniherkkyyden testaamista varten tehtiin hepariinilaimennossarjan, johon käytettiin Hepariini-Leo 5000 U/ml liuosta ja Octaplas® -plasmavalmistetta (kuvio 8). ”Normaaliplasma” käytettiin Octaplas® -plasmavalmistetta. Octaplas® on ihmisen plasmaa, joka on yhdistelty monen eri verenluovuttajan plasmasta ja käsitelty virusten inaktivoimiseksi. Sitä käytetään verenvuotojen aiheuttaman hyytymistekijäpuutoksen, vaikean maksan vajaatoiminnan tai yleistyneiden pienten verenvuotojen yhteydessä. (Pharmaca Fennica 2010; Octapharma 2006.)

Octaplas® -valmisteen vaikuttavana aineena on ihmisen plasmaproteiineja, johon myös hyytymistekijät kuuluvat. Octaplas® -valmisteen plasmaproteiinipitoisuus vaihtelee 45 – 70 mg/ml. Muita valmisteen ainesosia ovat natriumsitraattihydraatti 4,4 – 7,4 mg, natriumdivetyfosfaatti 0,31 – 1,17 mg, glysiini 4,0 – 6,0 mg, TNBP ≤ 2 mikrog/ml ja Triton X-100 ≤ 5 mikrog/ml. Octaplas® -valmiste säilytetään pakastettuna vähintään – 18 °C:n lämpötilassa ja sulatus tapahtuu ulkokääreessä +30 - +37 °C:ssa vesihauteessa, jossa on hyvä sekoitus. (Pharmaca Fennica 2010; Octapharma 2006.)

Varsinainen laimennossarja tehtiin kahden välilaimennoksen kautta (kuvio 8). Ensimmäinen välilaimennos tehtiin NaCl:iin, jossa hepariinin pitoisuus oli 50 U/ml. Tästä tehtiin toisen laimennoksen Octaplas® -plasmavalmisteseen ja sen hepariinipitoisuu-

deksi tuli 5 U/ml. Varsinaisen laimennossarjan konsentraatiot olivat 0 – 0,8 U/ml Heparini-Leo liuosta Octaplasissa. Myös hepariinilaimennossarjasta tehtiin kolme eri analyysia kullakin reagenssilla (Actin FSL, Stago ja IL).



KUVIO 8. Hepariinilaimennossarja.

#### 6.4 Lupusherkkyyden testaaminen

Reagenssien lupusherkkyyttä tarkasteltiin 10 potilasnäytteellä (kuvio 7), joissa aiemmin oli kahdella seulontatestillä todettu lupusantikoagulantti (HUSLAB 2010c). Näytteet listattiin samalla tavoin kuin hyytymistekijäpuutosnäytteet eli alkuperäiset viivakooditarrat numeroitiin ja luotiin uudet viivakooditarrat. Kaikista edellä mainituista näytesarjoista tehtiin kustakin kolme sarjaa analyysijä, yksi kullakin reagenssilla.

## 7 TULOKSET JA TULKINTA

Käsittelin tulokset Microsoft Excel 2007 taulukkolaskentaohjelmalla, koska laskelmien suorittaminen ei vaatinut monimutkaisia tilastollisia laskutoimituksia. Lisäksi reagenssitestauksen näytemäärät olivat pieniä, joten tilastollisille testeille ei ollut perustetta. Opinnäytetyön suorituspaikka toivoi tulokset excel-tiedostoina ja työskentely onnistui kotikoneelta käsin, joten Excel-ohjelman valinta tuntui tarpeisiin ja resursseihin nähden perustellulta ja riittävältä.

### 7.1 Sarjan sisäinen ja välinen toistuvuus ja vertailumittarin luominen tasovertailunäytteiden avulla

Sarjan sisäiselle toistuvuudelle oli validointisuunnitelmassa asetettu tavoitteeksi CV %  $\leq 5$  %. Tätä sovellettiin testattaviin reagensseihin (Stago ja IL), kun taas käytössä olevan reagenssin tavoite CV %  $\leq 3$  saatiin HUSLABin laatutavoitetaulukosta. CV% lasketaan alla olevan kaavan mukaan.

$$CV\% = SD/ka * 100$$

CV = vaihtelukerroin  
SD = keskihajonta  
ka = keskiarvo

Laskin kustakin näytesarjasta ensin sekä keskiarvot että keskihajonnat. Normaalitasonäytteiden CV%:t olivat seuraavat: Actin FSL 0,4 %, Stago 0,6 % ja IL 0,3 %. Hoitotasonäytteiden vastaavat luvut olivat hieman korkeammat: Actin FSL 1,5 %, Stago 0,6 % ja IL 0,9 %. Luvut jäivät reilusti tavoitearvojen sisäpuolelle (Taulukko 1).

Sarjojen välisen toistuvuuden tavoite käytössä olevalle menetelmälle (Actin FSL) oli HUSLAB:in laatutavoitetaulukon mukaan CV %  $\leq 4$  % ja testattaville reagensseille validointisuunnitelman mukaan CV%  $\leq 6$  %. Normaalitasokontrolleilla tuloksiksi sain Actin FSL 1,3 %, Stago 1,1 % ja IL 0,5 %. Nämä ylsivät laatutavoitteeseen. Hoitotasokontrolleilla sen sijaan tuloksiksi sain seuraavat luvut: Actin FSL 5,9 %, Stago 3,3 % ja IL 4,4 % (Taulukko 1). Actin FSL:llä saatu tulos ei yllä tavoitteeseen (CV %  $\leq 4$  %). Tämä johtunee kuitenkin epästabiilista kontrollinäytteestä, jonka kanssa HUSLAB:issa oli ollut ongelmia jo aiemmin, minkä vuoksi se on nykyisin korvattu toisella hoitotasokontrollilla. Tarkemmat tulokset sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä toistuvuudesta on liitteessä (Liite 1).

TAULUKKO 1. Sarjan sisäisen ja sarjojen välisten toistuvuuksien CV%:it normaali- ja hoitotasokontrollinäytteillä mitattuna.

	Sarjan sisäinen toistuvuus, CV%			Sarjojen välinen toistuvuus, CV%		
	Tavoite	Norm.tasok.	Hoitotasok.	Tavoite	Norm.tasok.	Hoitotasok.
<b>Actin FSL</b>	≤ 3 %	0,4 %	1,5 %	≤ 4 %	1,3 %	5,9 %
<b>STAGO</b>	≤ 5 %	0,6 %	0,6 %	≤ 6 %	1,1 %	3,3 %
<b>IL</b>	≤ 5 %	0,3 %	0,9 %	≤ 6 %	0,5 %	4,4 %

Eri reagenssilla mitatut APTT-tulokset poikkeavat reagenssien erilaisista ominaisuuksista johtuen toisistaan, joten niille kullekin täytyi olla myös omat viitearvot. Koska testattaville reagensseille ei luonnollisestikaan ollut olemassa viitearvoja, niille täytyi luoda teoreettinen viitearvon yläraja. Näin pystyin tarkastelemaan kuinka paljon viitearvot ylittyivät vertailumenetelmään eli Actin FSL:llä mitattuihin tuloksiin nähden. Teoreettiset viitearvot laskin Bias %:n avulla. Sana 'bias' tulee englanninkielestä ja tarkoittaa validointikielessä poikkeamaa tai mittalaitteen systemaattista virhettä. Yleensä sitä käytetään mittausepävarmuuden määrittämiseen, mutta se otettiin tässä tapauksessa soveltaen avuksi kartoittamaan sitä ”poikkeamaa”, joka on käytössä olevan menetelmän ja testattavan menetelmän välillä. (Ehder 2005: 30-31.) Bias % lasketaan kaavalla:

$$B (\%) = \frac{x-T}{T} * 100$$

x = useampien mittaustulosten keskiarvo  
T= standardimenetelmälle sovittu arvo  
(Ehder 2005: 31).

Tässä työssä x:n paikalle sijoitin joko Stago – tai IL – reagenssilla saadun APTT-arvon, joka oli mitattu tasovertailunäytteellä ja T:n paikalle laitoin Actin FSL –reagenssilla saadun vastaavan tuloksen. Esimerkiksi tasovertailunäytteellä numero 1 saatiin tuloksiksi Actin FSL 25,4 sekuntia, Stago 28,3 sekuntia ja IL 25,6 sekuntia. Laskutoimitukset olivat seuraavat:

$$B (\%) = (28,3 - 25,4) / 25,4 * 100 = 11,42 \% \quad (\text{Stago})$$

$$B (\%) = (25,6 - 25,4) / 25,4 * 100 = 0,79 \% \quad (\text{IL})$$

Tasovertailuun oli tarkoitus ottaa mukaan näytteet, joiden tulos on Actin FSL-viitealueella (23-33 s). Yksi tasovertailunäyte hylättiin, koska sen tulokset näyttivät poikkeavan muista tuloksista siten, että IL:llä mitattu tulos sen kohdalla jäi Actin FSL

tulosta alhaisemmaksi, kun kaikkien muiden näytteiden kohdalla arvot olivat Actin FSL:ää korkeampia. Tämä olisi mahdollisesti vääristänyt Bias- % -tuloksia.

Lopulliseen tasovertailuun sisältyi yhdeksän näytettä, joiden tulosten perusteella laskin kullekin näytteelle reagenssikohtaisen oman Bias-%:n Actin FSL:ään verrattuna kuten yllä esitin. Näistä prosenttiluvuista laskin keskiarvot. Stagon reagenssille sain Bias-%:n 11,08 ja IL:n reagenssille 5,25. Näiden Bias% -lukujen avulla laskin testattaville reagensseille teoreettiset viitearvojen ylärajat laskutoimituksella:  $(33 \text{ s} + \text{Bias}\% \times 33\text{s})$ . Näin laskemalla viitearvojen ylärajoiksi tuli Stagon reagenssille 36,7 sekuntia ja IL:n reagenssille 34,7 sekuntia (Liite 1).

Näiden viitearvojen ylärajojen avulla voitiin eri reagensseilla saadut mittaustulokset saada keskenään vertailtaviksi laskemalla kuinka paljon tulos poikkesi reagenssikohtaisesta viiterajasta. Laskin myös poikkeamat prosentteina ylärajasta (taulukko 1). Tein näin kaikkien mitattujen arvojen kohdalla eli hyytymistekijä-, hepariini- ja lupusherkyttä tulkittaessa (Liite 1). Alla on esimerkkitaulukko havainnollistamaan edellä kuvattuja laskutoimituksia. Taulukossa on esimerkkinä käytetty Actin FSL:llä saatuja tuloksia. Vastaavalla tavalla laskin samat laskutoimitukset kahdella muulla reagenssilla.

TAULUKKO 2. Esimerkit laskutoimituksista reagenssien vertailtavuuden luomiseksi.

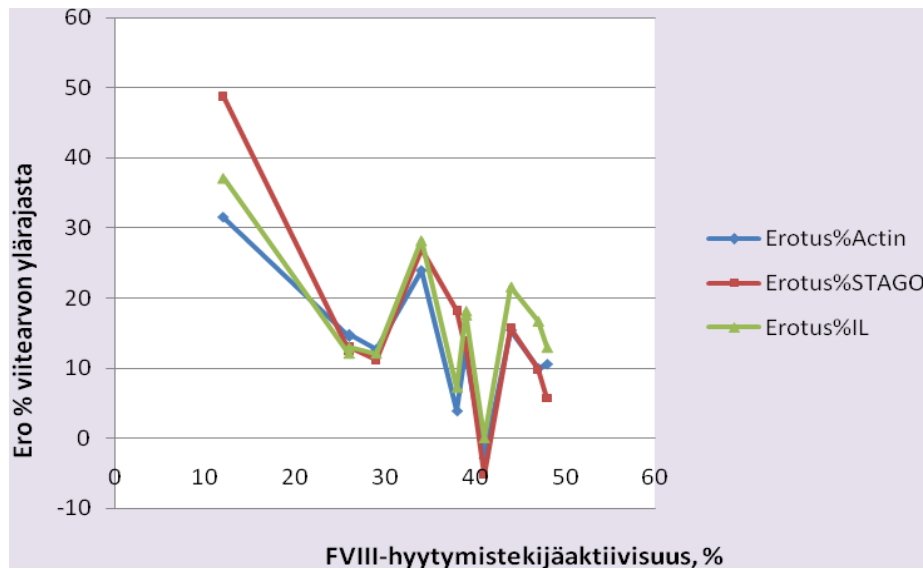
Lupusherkyys	ActinFSL	Laskutoim.1	ErotusActin	Laskutoim.2	Erotus%Actin
	sekuntia	sekuntia	sekuntia	%	%
1	37,8	37,8 - 33	4,8	$4,8/33 * 100$	14,5
2	50,8	50,8 - 33	17,8	$17,8/33 * 100$	53,9
3	32,5	32,5 - 33	-0,5	$(-0,5)/33 * 100$	-1,5
4	31,6	jne.	-1,4	jne.	-4,2
5	49,9		16,9		51,2
6	48,7		15,7		47,6
7	49		16		48,5
Viitearvon yläraja	33				

## 7.2 Hyytymistekijäherkkyys

Hyytymistekijän FVIII –puutosnäytteissä kolmessa (yhteensä 15) oli hyytymistekijäaktiivisuustaso alle 1 %, jolloin näiden näytteiden APTT –arvo oli kaikilla reagensseilla mitattuna yli analysaattorin mittausalueen (150 sekuntia). Näin pienissä aktiivisuus-

tasoissa näyte ei käytännössä hyydy ollenkaan ja siksi mittausalue ylittyy. Laskelmiin pystyin näin ollen ottamaan mukaan 12 näytteen tulokset (Liite 1).

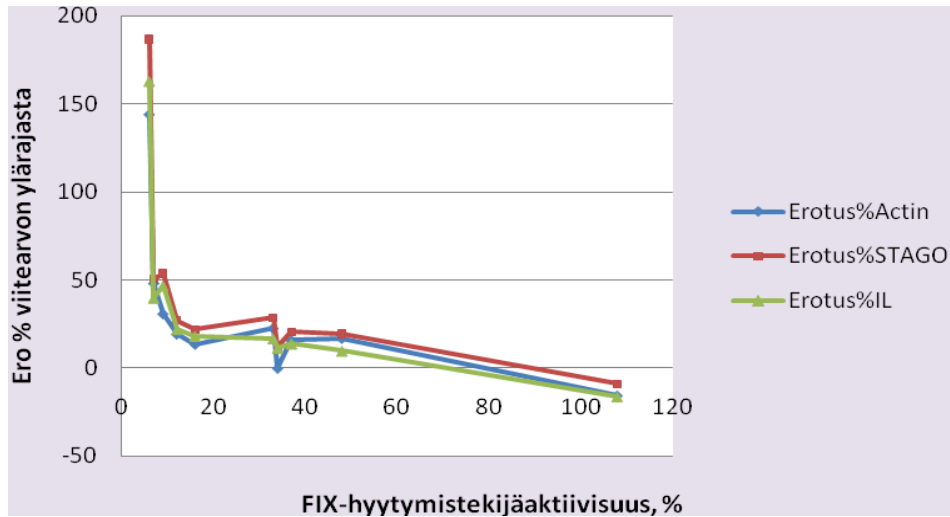
Kuviosta 9 nähdään, että eri reagenssien kyky havaita FVIII-puutokset oli hyvin samankaltainen. Viitearvon ylitys vaihtelee jonkin verran näytekohtaisesti eri reagenssien välillä. Asiaa olisi syytä tutkia isommalla näytemäärällä, mutta näiden tulosten valossa voidaan alustavasti todeta, että kaikki kolme reagenssia ovat yhtä herkkiä havaitsemaan FVIII-puutoksia.



KUVIO 9. FVIII-hyytymistekijäherkkyys.

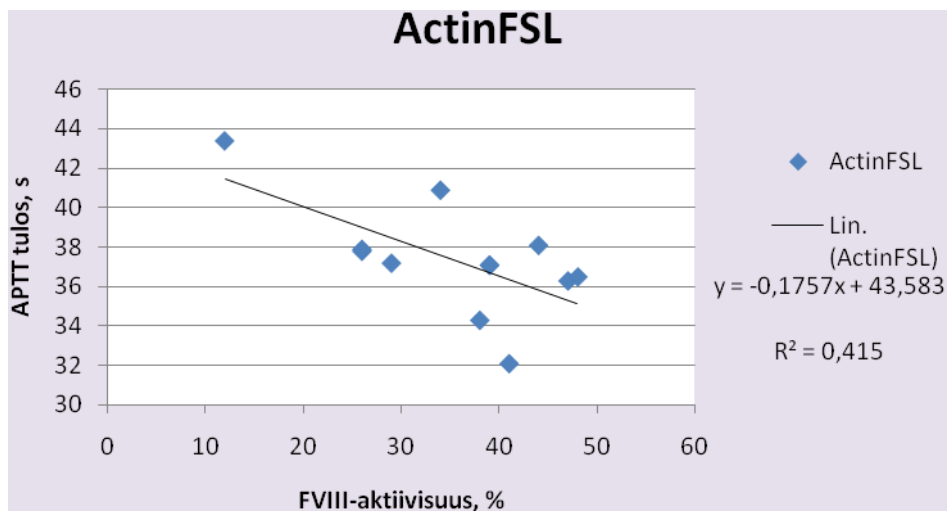
FIX –puutosnäytteissä (yhteensä 11) mittausalueen ulkopuolelle kaikilla reagensseilla jäi vain yksi näyte. Laskelmiin voitiin mukaan ottaa kymmenen näytteen tulokset (Liite 1). Kuviossa 10 on esitetty FIX-herkkyyslaskelmien tulokset. Kuviosta 10 voidaan havaita, että eri reagenssit reagoivat samankaltaisesti FIX-puutoksiin. Yhden näytteen kohdalla Actin FSL ei reagoanut kuten muut reagenssit. Stagon reagenssi näyttäisi olevan hieman muita reagensseja herkempi FIX-puutoksissa. Tässä ei näy samanlaista vaihtelua eri reagenssien välillä kuin FVIII-puutosnäytteissä. Testauksessa käytetty näytemäärä on pieni, mutta alustavasti voidaan todeta, että Stagon reagenssi on herkin havaitsemaan FIX-puutoksia.





KUVIO 10. FIX-herkkyys.

Jotta voitaisiin arvioida kuinka paljon APTT-tulokset ovat selitettävissä hyytymistekijäaktiivisuustulosten perusteella, tein lineaarisen regressioyhtälön FVIII-aktiivisuusprosenttien ja Actin FSL:llä mitattujen APT-aikojen välille (kuvio 11). Excel-ohjelma laskee  $R^2$ -kertoimen eli selitysasteen, joka on korrelaatiokertoimen neliö. Se kuvaa sitä, millä todennäköisyydellä toisen muuttujan arvo, voidaan päätellä toisesta muuttujasta. (Stadia 2007.)

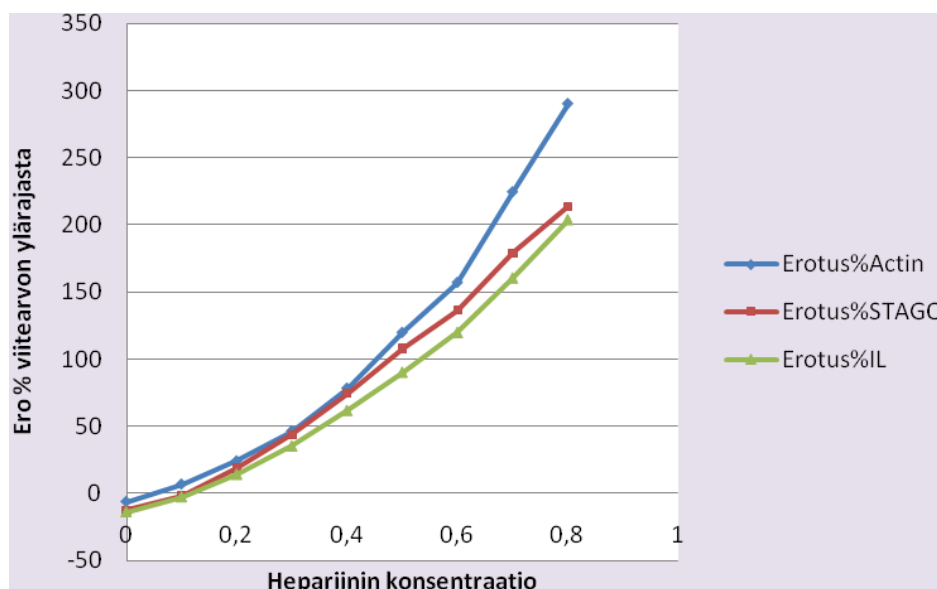


KUVIO 11. FVIII-aktiivuuksien ja Actin FSL:llä mitattujen APTT-tulosten välinen lineaarinen regressio.

Kuviosta 11 (huomioi, että y-akseli ei lähde nollassa) voidaan todeta, että testauksessa käytettyjen FVIII-puutosnäytteiden FVIII-aktiivisuustuloksen ja APTT-tuloksen selityssaste ( $R^2$ ) on 0,415. Tämä tarkoittaa sitä, että vain noin 42 % todennäköisyydellä tässä tapauksessa APTT-tulos on selitettävissä hyytymistekijäaktiivisuuden perusteella. Tein vastaavan regressioyhtälön myös FIX-puutosnäytteille ja Actin FSL:llä mitattujen APTT-tulosten välille ja tulos oli edellistä alhaisempi,  $R^2$  oli 0,3142. Testattujen FIX-puutosnäytteiden APTT-tulos on selitettävissä 31 % todennäköisyydellä FIX-hyytymistekijäaktiivisuuden perusteella. Tulokset vahvistavat, että APTT soveltuu hyytymistekijävajeiden seulontaan, mutta tarkan pitoisuuden määrittäminen edellyttää spesifiä faktorimäärittystä.

### 7.3 Hepariini- ja lupusherkkyyys

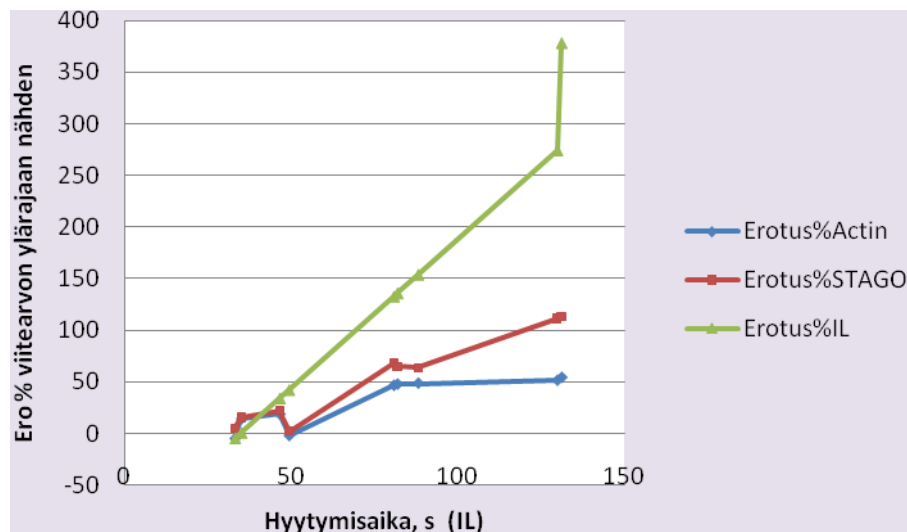
Kuviosta 12 voidaan todeta, että pienissä hepariinipitoisuuksissa kaikki kolme reagenssia reagoivat samansuuntaisesti hepariinille. Actin FSL reagoi mataliin hepariinipitoisuuksiin herkimmin. Jo 0,1 U/ml hepariini pidentää hyytymisaikaa. Samoin korkeat hepariinipitoisuudet pidentävät Actin FSL:llä mitattua hyytymisaikaa suhteellisesti enemmän. Selkeää eroa reagenssien välille näyttää tulevan siinä kohtaa, jossa hepariinin pitoisuus normaaliplasmassa ylittää 0,6 U/ml.



KUVIO 12. Hepariiniherkkyyys.

Hepariiniherkimmäksi reagenssiksi osoittautui käytössä oleva menetelmä Actin FSL (kuvio 12). Sen suhteelliset tulokset olivat systemaattisesti muita reagensseja korkeampia (Liite 1). Matalin hepariinivaste saatiin IL:n reagenssilla. Kaikki hepariinilaimennossarjan näytteet olivat analysaattorin mittausalueella.

Lupusantikoagulanttiherkkyyden laskelmiin voitiin ottaa mukaan vain yhdeksän näyttettä kymmenestä, koska yhden näytteen APTT-tulos ylitti Stagon ja IL:n reagensseilla tehdyissä mittauksissa analysaattorin mittausalueen (Liite 1). Kuvioon 13 olen x-akselille sijoittanut IL-reagenssilla mitatut APTT-arvot (sekunnit), jotta jonkinlainen ”pienimmästä suurimpaan” järjestys voitiin luoda ja viivakuvion käyttö tuli mahdolliseksi. Lupusantikoagulanttipositiivisten vertailuun otettujen näytteiden valinta perustuu siihen, että kyseessä olevasta potilaasta oli pyydetty P-LupusAK määrittäminen. Koska varmistettua diagnoosia ei ole, tulokset ovat vain suuntaa antavia. Instrumentation Laboratory:n (IL) reagenssi on yksi HUSLAB:in lupus-seulontamenetelmistä. Testatuista reagensseista herkin lupusantikoagulanttivaste saatiin IL:n reagenssilla. Heikoin vaste oli Actin FSL:llä eikä se näytä reagoivan lupusantikoagulanttiin samoin kuin kaksi muuta (kuvio 13).



KUVIO 13. Lupusherkyys.

Yhteenvedon tuloksista voidaan todeta, että FVIII-puutoksissa reagenssien välillä ei löytynyt eroa. FIX-puutoksien kohdalla hieman muita herkempi reagenssi oli Stago.

Herkin hepariinivaste oli Actin FSL:llä. Lupusantikoagulanttipositiivisiin näytteisiin herkimmin reagoi IL. Reagenssivertailun tulokset osoittavat, että kaikki kolme reagenssia sopivat sekä hyytymistekijävajeiden seulontaan että hepariinihoidon monitorointiin. Instrumentation Laboratory'n reagenssi soveltuu parhaiten lupusantikoagulantin seulontaan.

## 8 TULOSTEN LUOTETTAVUUS

Tulosten luotettavuutta arvioitaessa preanalytiikan osalta voin arvioida näytteenottoa yleisesti, koska en ole itse ollut ottamassa tässä testauksessa käytettyjä näytteitä. HUSLAB:in Meilahden sairaalan laboratorion näytteenotto on hyvin ohjeistettua ja akreditoitua toimintaa, joten näytteet täyttävät niille asetetut vaatimukset: APTT-näytettä ei voi ottaa heparinisoidusta kanyylistä ilman riittävää hukkaverimäärää, näytteet on otettu hyytymistutkimukseen soveltuvaan näyteputkeen (3,2 % natriumsitraatti) ja näytteiden esikäsittely on ohjeiden mukainen. Ennen testausta näytteet on säilytetty -70 asteessa pakastimessa ja säilytysaika ei ole ylittänyt yhtä kuukautta. (CLSI 2008).

Reagenssien esikäsittelyjen osalta työskentelyssä noudatettiin reagenssivalmistajien ohjeita. Käytimme avaamattomia reagensseja, joten kontaminaatiovaaraa ei ollut. Laboratoriotyöskentelyssä mukana olivat hyytymistutkimustyöpisteen kokeneet ammattihenkilöt Ellen Saarela ja Liisa Tulikallio, mikä takaa suorituksen hyvän laadun. Sarjan sisäinen toistuvuus täytti vertailumenetelmän osalta HUSLAB:in laatutavoitteeseen kirjattun  $CV \% \leq 3 \%$  niin normaali- kuin hoitotasokontrollienkin osalta, joten kontrollit ovat tässä testauksessa olleet tavoiterajoissa. Myös testattavat reagenssit ylsivät helposti validointisuunnitelmaan kirjattuun tavoitteeseen  $CV \% \leq 5 \%$ .

Sarjojen välinen toistuvuus Actin FSL:llä mitatuissa normaalitasokontrollin tuloksissa ylsi HUSLAB:in analyttiseen laatutavoitteeseen  $CV \% \leq 4 \%$ , mutta hoitotasokontrollin osalta tavoite ei täytynyt, koska  $CV \%$  oli 5,9 %. Tämä ei kuitenkaan heikennä mitausten luotettavuutta, koska ongelman tiedetään johtuvan epästabiiilista kontrollista. Testattavat reagenssit täyttivät validointisuunnitelmaan sarjojen väliselle toistuvuudelle asetetun tavoitteen  $CV \% \leq 6 \%$ , niin normaalitaso- kuin hoitotasokontrolleilla.

Tulosten käsittelyssä pyrin itse huolellisuuteen. Kirjatessani tuloksia Excel-taulukoihin tarkistin luvut useamman kerran välttyäkseni näppäilyvirheiltä. Sain apua kemisti Jari Leinoselta vertailumittarin ja viitearvojen ylärajojen luomisessa Bias % avulla ja ym-

märsin laskutoimitusten idean mielestäni syvällisellä tasolla. Laskutoimituksia tehdessä tein pistokokeen luonteisesti tarkistuksia siitä, että kussakin solussa laskukaava oli oikein.

Koska kyseessä oli alustava koestus ja näytemäärät olivat pieniä, ovat nämä tulokset vain suuntaa antavia. Hyytymisherkkyuden osalta voimakkaampien johtopäätösten tekeminen vaatisi suurempaa näytemäärää, mutta tätä hankaloittaa se, että hemofiliapotilaiden näytteitä ei ole helposti saatavilla. Systemaattisesti samansuuntaiset tulokset niin hepariini- kuin lupusherkkyydessä lisäävät luotettavuutta siinä mielessä, että näissä molemmissa testattavissa ominaisuuksissa pystyttiin reagenssit asettamaan järjestykseen. Vaihtelua ja sitä kautta tulkintavaikeuksia ei ollut. Se, että päädyin vertailemaan viitearvojen ylityksiä suhteellisina ylityksinä eikä raakoina sekunteina lisää reagenssien vertailtavuutta, mutta jättää auki kysymyksen, olisiko herkkyudeksi riittävä määritelmä siinä, että viitearvo ylipäätään ylittyy? Tarkemmat tulokset olisivat edellyttäneet viitearvomäärityksiä.

## 9 POHDINTA

APTT mittaa useiden hyytymistekijöiden funktionaalista yhteisvaikutusta epäfysiologisissa olosuhteissa. APTT –määritys on seulontatutkimus ja sen käyttöalueet joko hyytymistekijävajeiden osoittamisessa, hepariinihoidon ja muiden antikoagulanttien monitorinnissa tai lupusantikoagulantin havaitsemisessa, ovat hyvin erilaisia. Lisäksi eri reagenssien herkkyys näille eri tekijöille vaihtelee, jolloin kliiniseen toimintaan soveltuvan reagenssin valinta muodostuu todella haasteelliseksi tehtäväksi. Tämänkin opinäytetyön myötä todettiin, että reagenssien herkkyys eri käyttöalueilla vaihtelee paljon: yksi on parempi lupusherkkyydessä ja toisen reagenssin paremmuus tulee esille hepariiniherkkyydessä. Näiden eri ominaisuuksien suhteen on yritettävä kompromissina löytää käyttötarkoitukseen parhaiten soveltuva reagenssi.

Reagenssitestauksen pääasiallinen tarkoitus oli verrata FVIII- ja FIX-herkkyksiä. Samalla verrattiin näiden kolmen reagenssin herkkyyttä hepariinille ja lupusantikoagulantille. Faktoriherkkyysien osalta voitiin APTT-tulokset suhteuttaa spesifisten faktori-määritysten tuloksiin. Hepariinitulokset voidaan suhteuttaa ”spaikkaamalla” valmistetuihin tunnetun pitoisuuden hepariininäytteisiin. Vaikka faktoripuutosnäytteitä ei ollut lukumäärällisesti paljon, tulosten perusteella APTT-menettelmien kyky reagoida fakto-

ripuutoksiin on melko samanlainen. Huomioitava on myös se, että APT-aika riippuu myös lukuisista muista eri näytteiden välillä vaihtelevista tekijöistä (esimerkiksi fibriinistasosta) ja että kahdelle reagenssille käytettiin laskelmissa vain teoreettisia viitearvoja.

Hepariinireaktiivisuuden osalta Actin FSL oli tässä testauksessa hieman herkempi kuin muut reagenssit. Koestus perustui kuitenkin keinotekoisesti plasmaan valmistetuista hepariininäytteistä eikä todellisten potilasnäytteiden vertailua suoritettu. Lupusherkkyydessä oli eroja ja herkimmäksi osoittautui Instrumentation Laboratory'n reagenssi (IL). Lupusantikoagulanttiherkkyyden tulosten osalta voidaan tehdä vain alustavia arvioita, koska testauksessa käytettyjen lupusantikoagulanttipositiivisten näytteiden luokittelu perustui vain aiempaan positiiviseen Lupus-seulontamenetelmän tulokseen. Tämän perusteella diagnoosi ei ole vielä annettavissa.

Vertailun perusteella kaikki menetelmät soveltuvat käytettäväksi seulontamenetelmänä FVIII- ja FIX-puutoksissa. Hepariini- ja lupusherkkyyksissä on reagenssikohtaisia eroja, mutta kaikkia menetelmiä voidaan käyttää myös hepariinihoidonmonitoroinnissa. Lupusantikoagulantti vertailussa Instrumentation Laboratory'n (IL) reagenssi oli herkin. Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää tulevaisuudessa mahdollisen kilpailutuksen yhteydessä. Testattujen kolmen reagenssin ominaisuuksista on nyt olemassa laadullista tietoa. Laadun tulisi olla hinnan lisäksi tärkeä kilpailutuskriteeri.

Opinnäytetyö prosessissa opin hakemaan tietoa, tuottamaan ”tieteellistä tekstiä” ja käyttämään lähdekirjallisuutta. Raportin teoriaosuudessa esittelemäni asiat hallitsen hyvin. Analyysivaiheessa opin käyttämään monipuolisesti Excel-ohjelmaa, jota olin aiemmin käyttänyt vain tietotekniikan kurssien yhteydessä. Myös Word-ohjelman käyttö tuli syvällisemmin tutuksi. Ohjausprosessissa opin ottamaan vastaan palautetta omasta työkentelystä ja suhtautumaan kriittisesti omaan kirjalliseen tuotokseen. Lisäksi opinnäytetyön tekeminen vahvisti yhteistyötaitoja.

## LÄHTEET

- Abshire, Thomas C. – Jobe, Shawn M. 2009: Overview of the Coagulation System. Teoksessa Hillyer, Christopher D. – Shaz, Beth H. – Zimring, James C. – Abshire, Thomas C. (toim.): Transfusion Medicine and Hemostasis, Clinical and Laboratory Aspects. 1<sup>st</sup> edition. Elsevier. 433–438.
- Brower, Cheryl – Thompson, Arthur R. 2000a: Hemophilia A. National Center for Biotechnology Information, USA. Verkkodokumentti. Luettu 26.5.2010. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=hemo-a>>. Päivitetty 25.3.2008.
- Brower, Cheryl – Thompson, Arthur R. 2000b: Hemophilia B. National Center for Biotechnology Information, USA. Verkkodokumentti. Luettu 26.5.2010. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=hemo-b>>. Päivitetty 8.4.2008.
- CLSI 2008: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays. Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 5<sup>th</sup> edition. Wayne, PA.
- Diagnostica Stago 2005: PTT Automate, Bestämning av aktiverad partiell tromboplastintid (APTT). Pakkausseloste.
- Eby, Charles 1997: Standardization of APTT Reagents for Heparin Therapy Monitoring: Urgent of Fading Priority. Clinical Chemistry 43 (7). 1105 – 1107.
- Ehder, Tapio (toim.) 2005: Kemia metrologian opas. Helsinki: Mittatekniikan keskus.
- Elonen, Erkki 1998: Akuutti hematologia. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. 114. 1219–1230.
- Forbes, Charles D. 1984: Clinical Aspects of the Hemophilias and Their Treatment. Teoksessa Ratnoff, Oscar D. – Forbes, Charles D. (toim.): Disorders of Hemostasis. Orlando: Grune & Stratton. 177- 239.
- Guyton, Arthur C. – Hall, John E. 2000: Textbook of Medical Physiology. 10<sup>th</sup> edition. USA, Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company.
- Halonen, Susanna 2006: Fosfolipidivasta-aineoireyhtymä (APS). Oulun yliopisto. Verkkodokumentti. Päivitetty 19.1.2006. <<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/060119.htm>>. Luettu 24.9.2010.
- Haug, Egil – Sand, Olav – Sjaastad, Oystein V. 2007: Ihmisen fysiologia. 1.-3.painos. Porvoo: WSOY.
- Heparin Leo 2002: 5000 IE/KY/ml ja 25 000 IE/KY/ml injektioneste, liuos. Tuoteseloste. Leo Pharma Oy.

- Hillman, Robert S. – Ault, Kenneth A. 1998: Hematology in Clinical Practice. 2<sup>nd</sup> edition. USA. The McGraw-Hill Companies.
- Hirsh, Jack – Raschke, Robert – Warkentin, Theodore E. – Dalen, James E. – Deykin, Daniel – Poller, Leon 1995: Heparin: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy and Safety. Chest 108 (4). 258S–275S.
- HUSLAB 2010a: Tromboplastiiniaika, aktivoitu, partiaalinen, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.12.2010. <<http://huslab.fi/ohjekirja/index.html>>. Luettu 18.12.2010.
- HUSLAB 2010b: Tromboplastiiniaika, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.12.2010. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=1731&terms=tromboplastiiniaika](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1731&terms=tromboplastiiniaika)>. Luettu 18.12.2010.
- HUSLAB 2010c: Lupusantikoagulantti, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 17.12.2010. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=3578&terms=p-lupus](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=3578&terms=p-lupus)>. Luettu 18.12.2010.
- Instrumentation Laboratory 2005: APTT-SP (liquid). Pakkausseloste.
- Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005: Laboratorion analyysitekniikka. 5.painos. Helsinki. Edita.
- Joutsu-Korhonen, Lotta 2010. Erikoislääkäri. HUSLAB. Helsinki. Suullinen tiedonanto 5.2.2010.
- Joutsu-Korhonen, L. – Koski, T. 2010: Hemostaasin tutkimukset. Teoksessa Niemelä O. – Pulkki K. (toim.): Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia 3.painos. Helsinki: Kandidaattikustannus. 275–284.
- Kolde, Hans-Jürgen 2001: Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics. Pentapharm Ltd. Switzerland.
- Lassila, Riitta – Leinonen, Hannu 2001: Tarvitaanko enää fraktioimatonta hepariinia? Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 117. 2597–2599.
- Lassila, Riitta – Mäkipernaa, Anne 2007: Lyhyttä vai pitkää hepariiniketjua tukospotilaalle? Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 123. 2925–2927.
- Lassila, Riitta – Siimes, Martti A. – Rasi, Vesa 2007: Hemofiliat ja muut perinnölliset hyytymistekijöiden puutokset. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit 3.painos. Helsinki: Duodecim. 513 – 531.
- Lassila, Riitta 2007: Veren hyytyminen ja fibrinolyysi. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit 3.painos. Helsinki: Duodecim. 30-44.



- Lawrie, A.S. – Kitchen, S. – Purdy, G. – Mackie, I.J. – Preston, F.E. – Machin, S.J. 1998: Assesment of Actin FS and Actin FSL sensitivity to specific clotting factor deficiencies. *Clinical and Laboratory Haematology* 20 (3). 179–186.
- Leinonen, Jari 2008: Tromboplastiiniaika ja APTT. HUSLAB. Power point –esitys 6.11.2008.
- Leinonen, Jari 2010a: Validointisuunnitelma. HUSLAB. 18.3.2010.
- Leinonen, Jari 2010b. Kemisti. HUSLAB. Helsinki. Suullinen tiedonanto 30.9.2010.
- Linnet, Kristian – Boyd, James C. 2008: Selection and Analytical Evaluation of Methods – With Statistical Techniques. Teoksessa Burtis, Carl A. – Ashwood, Edward R. – Bruns, David E. (toim.): *Fundamentals of Clinical Chemistry* 6<sup>th</sup> edition. Saunders Elsevier. St. Louis, Missouri. 210–228.
- Maki – Tambyah 2001: Coagulation Cascade. Figure 3. Verkkodokumentti. Luettu 20.10.2010. <[http://www.medscape.com/viewarticle/415065\\_](http://www.medscape.com/viewarticle/415065_)>. Päivitetty 11.1.2001.
- Mustonen, Pirjo – Lassila Riitta 2007: Antitromboottinen ja fibrinolyyttinen hoito. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): *Veritaudit 3.painos*. Helsinki: Duodecim. 596-611.
- Mäkipernaa, Anne – Armstrong, Elina 2007: von Willebrandin tauti. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): *Veritaudit 3.painos*. Helsinki: Duodecim. 532-545.
- Octapharma AB 2006: Octaplas® . Pakkausseloste.
- Oksanen, Kalevi 2007: Hankinnaisen vuototaipumuksen selvittely ja hoito. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): *Veritaudit 3.painos*. Helsinki: Duodecim. 546–560.
- Pharmaca Fennica 2010: Octaplas O 45-70 mg/ml inf, liuos.
- Puurunen, Marja – Syrjälä, Martti 2007: Hankinnainen ja perinnöllinen tukostaipumus. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): *Veritaudit 3.painos*. Helsinki: Duodecim. 572 – 581.
- Rasi, Vesa 2006: Hemofilian taudinkuva. Teoksessa Forsman, Arja – Kontuniemi, Timo – Lassila, Riitta – Rasi, Vesa – Toiviainen, Markku (toim.): *Verenvuototaudit, tietopaketti potilaille*. Helsinki: Suomen Hemofiliayhdistys r.y. 11–16.
- Rossinen, Juhani – Lassila, Riitta – Nieminen, Markku S. 2004: Liuotushoito ja siihen liittyvän vuotoriskin hallinta akuutissa sydäninfarktissa. *Lääkärilehti* 59 (7). 635 – 641.
- Saarela, Ellen 2007: Työohje, Plasman aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika Sysmex CA-7000-analysaattorilla. HUSLAB.

- Saarela, Ellen 2010. Vastuuhoitaja. HUSLAB. Helsinki. Suullinen tiedonanto 9.3.2010.
- Saito, Hidehiko 1984: Normal Hemostatic Mechanisms. Teoksessa Ratnoff, Oscar D. – Forbes, Charles D. (toim.): Disorders of Hemostasis. Orlando: Grune & Stratton. 23 – 42.
- Siemens 2010: Valokuvat.
- Siemens 2006: Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent, Actin FSL. Pakkausseoste.
- Simonsen, Flemming 2009: Analysteknik, Instrument och metoder. 10. painos. Denmark: Studentlitteratur.
- Stadia 2007: Lineaarinen regressio. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Verkkodokumentti. Luettu 1.12.2010. <<http://cs.stadia.fi/~kuivanen/TiVe/Excel/linreg/linreg.html>>. Päivitetty 30.1.2007.
- Sysmex Corporation 2007: Principle of CA series, Coagulation method. Menetelmäkuvaus.
- Zimring, James C. 2009: Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time. Teoksessa Hillyer, Christopher D. – Shaz, Beth H. – Zimring, James C. – Abshire, Thomas C. (toim.): Transfusion Medicine and Hemostasis, Clinical and Laboratory Aspects. 1<sup>st</sup> edition. Elsevier. 607–610.

Tasovertailu					
Normaalitasokontrolli	ActinFSL	STAGO	Bias-% STAGO	IL	Bias-% IL
1	25,4	28,3	11,42	25,6	0,79
2	26,0	27,2	4,62	26,2	0,77
3	33,8	40,1	18,64	37,6	11,24
5	24,2	25,8	6,61	26,7	10,33
6	27,0	29,6	9,63	27,4	1,48
7	33,0	39,3	19,09	35,1	6,36
8	27,6	28,8	4,35	27,8	0,72
9	28,4	31,8	11,97	29	2,11
10	29,8	33,8	13,42	33,8	13,42
Keskiarvo	28,4	31,6	11,08	29,9	5,25
Viitearvon yläraja, s	33		36,7		34,7

Sarjan sisäinen toistuvuus							
Normaalitaso	ActinFSL	STAGO	IL.APTT	Hoitotaso	ActinFSL	STAGO	IL.APTT
1	31,6	33,2	30,7		80,5	79,9	71,4
2	31,2	32,8	30,3		80,1	80,1	71,1
3	31,3	32,7	30,4		81,2	80,2	71,9
4	31	32,3	30,5		81,2	80,2	71,4
5	31,2	32,8	30,5		81,6	80,1	71,7
6	31,1	32,4	30,3		81	79,2	71,7
7	31,2	32,5	30,6		83,9	80,2	72,9
8	31,4	32,7	30,5		81,6	80,1	71,9
9	31,4	32,7	30,6		83	80,5	72,9
10	31,3	32,6	30,5		84,2	80,5	73,3
11	31,1	32,5	30,5		83	79,1	72,8
12	31,2	32,7	30,5		82,3	80,6	71,8
13	31,2	32,9	30,5		81,6	80,5	71,8
14	31,4	32,9	30,5		82	79,9	72,3
15	31,2	32,6	30,5		83	80,2	72,9
16	31,3	32,9	30,5		82,6	80,6	71,9
17	31,4	32,9	30,5		82,1	79,9	71,8
18	31,2	32,7	30,3		82,1	79,8	72,8
19	31,1	32,8	30,5		82,4	80,6	72,2
20	31,3	32,7	30,5		84,8	80,8	73,4
Keskiarvo	31,3	32,7	30,5		82,2	80,2	72,2
SD	0,1	0,2	0,1		1,2	0,4	0,7
CV%	0,4	0,6	0,3		1,5	0,6	0,9

Sarjojen välinen toistuvuus							
Normaalitaso	Actin FSL	Stago	IL.APTT	Hoitotaso	Actin FSL	Stago	IL.APTT
Päivä 1	31,6	33,2	30,7		80,5	79,9	71,4
	31,2	32,8	30,3		80,1	80,1	71,1
Päivä 2	31,3	32,7	30,4		81,2	80,2	71,9
	31	32,3	30,5		81,2	80,2	71,4
Päivä 3	31,2	32,8	30,5		81,6	80,1	71,7
	31,9	33,4	30,7		89,3	85,2	78,3
Päivä 4	31,8	33,2	30,6		87,4	84,6	75,7
	31,8	33,5	30,6		88,1	85,5	77,3
Päivä 5	32	33,8	30,9		86,7	84,5	76,5
	31,5	33	30,4		90,3	85,9	78,6
Päivä 6	32,1	33,3	30,7		95,4	84,5	80,5
	31,6	32,5	30,5		92,8	83,2	78,8
Päivä 7	31,7	32,8	30,6		91,4	83	78
	31,6	32,7	30,6		90	82,7	77,3
Päivä 8	31,7	32,5	30,5		89,3	81,7	76,6
	32,7	33,2	30,8		81,2	78,8	72,2
Päivä 9	32	32,9	30,7		82,7	79,4	72,5
	31,8	32,8	30,5		80,1	78,7	71
Päivä 10	31,8	32,7	30,5		80,6	78,1	71,4
	32,2	33,2	30,9		80,5	78,1	71,4
Keskiarvo	31,7	33,0	30,6		85,5	81,7	74,7
SD	0,4	0,4	0,2		5,0	2,7	3,3
CV%	1,3	1,1	0,5		5,9	3,3	4,4

FVIII-herkkyys										
Näytenumero	FVIII-aktiivisuus	ActinFSL, s	ErotusActin,s	Erotus%Actin	STAGO, s	ErotusSTAGO,s	Erotus%STAGO	IL.APTT, s	ErotusIL, s	Erotus%IL
1	26	37,8	4,8	14,5	41,3	4,6	12,5	38,9	4,2	12,1
3	47	36,3	3,3	10,0	40,3	3,6	9,8	40,5	5,8	16,7
4	34	40,9	7,9	23,9	46,6	9,9	27,0	44,5	9,8	28,2
5	39	37,1	4,1	12,4	41,4	4,7	12,8	40,8	6,1	17,6
6	26	37,9	4,9	14,8	41,5	4,8	13,1	39,2	4,5	13,0
7	44	38,1	5,1	15,5	42,5	5,8	15,8	42,2	7,5	21,6
8	39	37,1	4,1	12,4	41,8	5,1	13,9	41	6,3	18,2
10	29	37,2	4,2	12,7	40,8	4,1	11,2	38,9	4,2	12,1
11	12	43,4	10,4	31,5	54,6	17,9	48,8	47,6	12,9	37,2
12	38	34,3	1,3	3,9	43,4	6,7	18,3	37,2	2,5	7,2
13	41	32,1	-0,9	-2,7	34,8	-1,9	-5,2	34,7	0	0,0
14	48	36,5	3,5	10,6	38,8	2,1	5,7	39,2	4,5	13,0
Viitearvon yläraja, s		33			36,7			34,7		

FIX-herkkyys										
Näytenumero	FIX-aktiivisuus	ActinFSL, s	ErotusActin, s	Erotus%APTT	STAGO, s	ErotusSTAGO, s	Erotus%STAGO	IL.APTT, s	ErotusIL, s	Erotus%IL
1	108	27,9	-5,1	-15,5	33,4	-3,3	-9,0	29,1	-5,6	-16,1
2	37	38,2	5,2	15,8	44,2	7,5	20,4	39,5	4,8	13,8
3	12	39,4	6,4	19,4	46,6	9,9	27,0	42,3	7,6	21,9
4	7	48,9	15,9	48,2	55,2	18,5	50,4	48,5	13,8	39,8
5	34	33	0	0,0	41,2	4,5	12,3	38,6	3,9	11,2
6	33	40,5	7,5	22,7	47,2	10,5	28,6	40,5	5,8	16,7
7	6	80,5	47,5	143,9	105,2	68,5	186,6	91,1	56,4	162,5
8	48	38,6	5,6	17,0	43,8	7,1	19,3	38,1	3,4	9,8
9	6									
10	16	37,5	4,5	13,6	44,7	8	21,8	41	6,3	18,2
11	9	43,2	10,2	30,9	56,4	19,7	53,7	50,9	16,2	46,7
Viitearvon yläraja, s		33			36,7			34,7		

Hepariiniherkkyys										
Näytenumero	Konsentraatio	ActinFSL, s	ErotusActin, s	Erotus%Actin	STAGO, s	ErotusSTAGO, s	Erotus%STAGO	IL.APTT, s	ErotusIL, s	Erotus%IL
1	0	30,9	-2,1	-6,4	32,1	-4,9	-13,2	29,9	-5,1	-14,6
2	0,1	35,2	2,2	6,7	36,0	-1,0	-2,7	33,8	-1,2	-3,4
3	0,2	40,9	7,9	23,9	43,6	6,6	17,8	39,6	4,6	13,1
4	0,3	48,3	15,3	46,4	52,7	15,7	42,4	46,9	11,9	34,0
7	0,4	58,8	25,8	78,2	64,0	27,0	73,0	56,1	21,1	60,3
6	0,5	72,5	39,5	119,7	76,3	39,3	106,2	66,0	31,0	88,6
7	0,6	84,8	51,8	157,0	86,7	49,7	134,3	76,3	41,3	118,0
8	0,7	107,1	74,1	224,5	102,4	65,4	176,8	90,4	55,4	158,3
9	0,8	128,8	95,8	290,3	115,1	78,1	211,1	105,5	70,5	201,4
Viitearvon yläraja, s		33			37,0			35		



Lupusherkkyyks									
Näytenumero	ActinFSL,s	ErotusActin,s	Erotus%Actin	STAGO, s	ErotusSTAGO, s	Erotus%STAGO	IL, s	ErotusIL, s	Erotus%IL
1	37,8	4,8	14,5	42,4	5,7	15,5	35,1	0,4	1,2
2	50,8	17,8	53,9	78,4	41,7	113,6	131,1	131,1	377,8
3	32,5	-0,5	-1,5	37,6	0,9	2,5	49,4	14,7	42,4
4	31,6	-1,4	-4,2	38,4	1,7	4,6	33,2	-1,5	-4,3
5	49,9	16,9	51,2	77,6	40,9	111,4	129,8	95,1	274,1
6	48,7	15,7	47,6	60,5	23,8	64,9	81,9	47,2	136,0
7	49,0	16,0	48,5	60,0	23,3	63,5	88,1	53,4	153,9
8	129,8	96,8							
9	39,2	6,2	18,8	44,8	8,1	22,1	46,6	11,9	34,3
10	48,3	15,3	46,4	61,7	25,0	68,1	80,8	46,1	132,9
Viitearvon yläraja, s	33,0			36,7			34,7		