



Nestekromatografisesta analyysistä vasta-aineperusteiseen, immunokemialliseen analyysiin HbA1c -tutkimuksessa

Niina Puttonen

OPINNÄYTETYÖ
28.11. 2019

Kliininen asiantuntija (ylempi AMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Kliininen asiantuntija (ylempi AMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

PUTTONEN, NIINA:

Nestekromatografisesta analyysistä vasta-aineperusteiseen, immunokemialliseen analyysiin HbA1c -tutkimuksessa

Opinnäytetyö 71 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Joulukuu 2019

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida Cobas c513 -analysaattorin HbA1c -tutkimusmenetelmä Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa. Verifiointissa tehtiin potilasnäytevertailu ja testattiin verifioitavaa Cobas c513 -analysaattorin immunokemiallista menetelmää vertailumenetelmänä olevaan Variant™ II Turbon nestekromatografiseen HPLC -menetelmään. Lisäksi tehtiin laitevertailu Tampereen Cobas c513:n ja Jyväskylän Cobas c513:n välillä. Tavoitteena oli varmistaa, että uusi immunokemiallinen menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset.

Aineisto käsitti 110 kokoverinäytettä, jotka kerättiin sekä Tampereelta että Jyväskylästä. Näytteissä 23:ssa esiintyy Hb -Vaasa -varianttia ja 11 näytteessä esiintyy fetaalihemoglobiinia. Näytteistä määritettiin HbA1c -pitoisuudet sekä kromatografisella että immunokemiallisella menetelmällä. Lisäksi laitevertailua varten kerättiin erikseen kymmenen eritasoista näytettä.

Tulokset analysoitiin SPSS -tilasto-ohjelmalla. Hajontakuviosta huomattiin selvä korrelaatio ($r = 0.99$) Variant II™ Turbon ja Cobas c513:n välillä. Kahden Cobas c513 -analysaattorin välillä havaittiin myös erittäin hyvä korrelaatio ($r = 0.99$). Siksi tehtiin vielä regressioanalyysit. Lopuksi vertailtiin tuloksissa ilmenneitä eroja eroprocentin avulla.

Potilasnäytteiden tulostaso oli yhtenevä verifioitavan menetelmän ja vertailumenetelmän välillä eikä menetelmien välillä ole kliinisesti merkittävää tasoeroa. Paitsi Hb -Vaasa -varianttia sisältävistä potilasnäytteistä saadaan keskimäärin 65%:a korkeampaa tulostasoa verifioitavalla menetelmällä verrattuna referenssimenetelmään. Johtuen siitä, että Hb -Vaasa -variantti häiritsee kromatografista menetelmää. Tampereen ja Jyväskylän Cobas c513:n välisessä laitevertailussa saatiin myös yhteneviä tuloksia.

Cobas c513 -analysaattorin HbA1c -tutkimusmenetelmän verifiointi onnistui ja se otettiin Fimlab Laboratoriot Oy:n Jyväskylän yksikössä käyttöön. Virallinen käyttöönottopäivä oli 29.1.2019.

Asiasanat: HbA1c, nestekromatografia, HPLC, immunokemiallinen menetelmä

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Master's Degree in Clinical Expertise and Development

PUTTONEN, NIINA:

Comparing Liquid Chromatography Analysis and Immunochemical Analysis in Glycated Hemoglobin Method

Master's thesis 71 pages, appendices 9 pages
December 2019

The purpose was to verify a new immunochemical method for glycated hemoglobin. In addition, the purpose was to compare the results of two similar immunochemical analysers. The aim was to ensure that demands placed on a new immunochemical method will be met.

In total, 110 whole blood samples including 23 Hb Vaasa variants and 11 fetal hemoglobin samples were collected from Tampere and Jyväskylä. Subsequently, ten samples were gathered for the evaluation of two parallel immunochemical analysers.

Verification was conducted by comparing patient samples that were determined both high performance liquid chromatography (HPLC) method and immunochemical method. The data were analyzed in SPSS statistics that showed correlations and generated regression analysis. Finally, a comparability test was created.

Results were convergent and no clinically significant difference between these methods was detected, except the samples enclosing Hb Vaasa variant permitted 65 % higher level in the immunochemical method. The results showed that Hb Vaasa disturbs the chromatography method and thus provides false results. The two similar immunochemical analysers provided an efficient outcome.

As a conclusion, verification of immunochemical method was a success. Consequently, a new method and analyser will be enabled.

Key words: HbA1c, liquid chromatography, HPLC, immunochemical method

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	HBA1C JA SEN MÄÄRITYSMENETELMÄT.....	8
	2.1 Hemoglobiini.....	8
	2.1.1 HbA1c:n muodostuminen	8
	2.1.2 Hemoglobiinivariantit	10
	2.2 Määrittäminen.....	12
	2.2.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografinen menetelmä (HPLC) ja Bio-Rad Variant™ II Turbo.....	13
	2.2.2 Kemiallinen määrittäminen ja DCA Vantage®	15
	2.2.3 Immunokemiallinen määrittäminen ja Cobas c513	17
	2.3 Analyysimenetelmien heikkoudet, vahvuudet ja häiriötekijät	19
3	VERIFIOINTI.....	22
	3.1 Fimlab Laboratoriot Oy:ssä noudatettavat verifiointin periaatteet	22
	3.2 Verifiointissa käytettäviä parametreja.....	23
4	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	26
5	TUTKIMUSMENETELMÄT	27
	5.1 Aineiston keruu.....	27
	5.2 Verifiointin toteuttaminen.....	28
	5.3 Aineiston analysointi.....	30
	5.3.1 Yhteyksien tarkastelu korrelaation ja regressioanalyysin avulla.....	30
	5.3.2 Erojen tarkastelua.....	33
	5.3.3 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus	34
6	TULOKSET	35
	6.1 Cobas c513 ja Variant™ II Turbo	35
	6.2 Tampereen ja Jyväskylän Cobas c513 -analysointilaboratorit.....	43
	6.3 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus.....	45
7	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	47
	7.1 Tulosten tarkastelu	47
	7.2 Opinnäytetyön luotettavuus.....	51
	7.3 Opinnäytetyön eettisyys	53
	7.4 Johtopäätökset ja jatkotutkimushaasteet	54
	LÄHTEET	58
	LIITTEET	63

Liite 1. Potilasnäytevertailu Variant II™ Turbon ja cobas c513 - analysaattorin välillä, havaintomatriisi. 1(1).....	63
Liite 2. Näytteissä Hba1c –variantti Hb-Vaasa. Näistä vastattu potilaalle DCA-laitteelta saatu tulos. 2 (1).....	65
Liite 3. Näytteissä fetaalihemoglobiini.....	67
Liite 4. Potilasnäytevertailu Tampere Cobas c513 vs. Jyväskylä Cobas c513.....	68
Liite 5. Sarjan sisäinen toistettavuus: primääritulokset	69
Liite 6. Sarjojen välinen toistettavuus: primääritulokset	70

1 JOHDANTO

Suomalaisista noin puoli miljoonaa sairastaa diabetesta joko piilevänä tai varmistettuna. Sairastuneiden määrä lisääntyy jatkuvasti. (Diabetes: Käypä hoito -suositus 2018.) Diabetes todetaan yleensä potilaan yleisoireiden perusteella. Niitä ovat väsyminen, jano ja polyuria. Lisäksi diabeteksen diagnosointiin tarvitaan veren glukoosikokeet sekä glykoituneen hemoglobiinin, HbA1c:n, määrittäminen. Elimistön glukoosiaineenvaihdunnan häiriintyessä, diabetes vaikuttaa esimerkiksi munuaisten, hermoston, silmien ja lihasten toimintaan. (Penttilä ym. 2016, 133; Diabetes: Käypä hoito -suositus 2018.)

Diabetekseen liittyy riski saada liitännäissairauksia. Niitä voidaan minimoida saamalla verensokeri mahdollisimman normaalille tasolle ja seuraamalla pitkäaikaisverensokeritasoja. (Thorn & Groop 2018). HbA1c:n mittauksen avulla voidaankin arvioida pitkäaikaista elimistön sokerikuormitusta. Mitä korkeampi verensokerin taso on, sitä enemmän sitä kiinnittyy eli glykoituu hemoglobiiniin ja muihin kudosten proteiineihin. (Penttilä ym. 2009, 25.) Lisäksi HbA1c kuvastaa veren glukoositasoa, joka vallitsi määrittämisen edeltävän kahden – kolmen kuukauden aikana (Kahrom 2010; Klingenberg ym. 2017, 458-464).

Tammikuun 2019 puoleen väliin asti HbA1c -tutkimukset määritettiin Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa, joka kuuluu Fimlab Laboratoriot Oy:hyn, Variant™ II Turbolla, jonka toiminta perustuu korkean erottelukyvyn nestekromatografiaan (HPLC). Fimlab Laboratoriot Oy:n automaatiouudistuksen mukaan laitekantaa sekä menetelmiä yhtenäistettiin ja automaatiota lisättiin ja parannettiin. Tämän muutosprojektin myötä Keski-Suomen keskussairaalan laboratorioon hankittiin Cobas c513 -analysaattori, jonka määrittäminen perustuu immunokemiaan.

Joten, tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida HbA1c -tutkimus uudelle, immunokemialliselle menetelmälle. Tavoitteena oli varmistaa, että uusi analyysaattori, Cobas c513 ja sen immunokemiallinen menetelmä HbA1c -tutkimukselle täyttää sille asetetut vaatimukset Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa.

Toissijaisena tavoitteena ja uuden, immunokemiallisen analyysin hyötynä sairaalaoasastot ja terveyskeskukset tulevat saamaan potilastuloksensa aiempaa nopeammin. Fimlab Laboratoriot Oy:n Keski-Suomen yksikköön tästä on hyötynä se, että ensiksikin laitekanta uudistuu ja nykyaikaistuu ja toiseksi uusi analyysilaitte ja -menetelmä sitoo vähemmän työvoimaa ja resursseja kuin edellinen, nestekromatografinenmenetelmä. Jatkossa HbA1c -tutkimukset, joita tehdään Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa noin 60 000 vuodessa, analysoidaan uudella immunokemiallisella analyysilla ja analysaattorilla, Cobas c513:lla.

2 HBA1C JA SEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

Trivelli ym. julkaisivat jo vuonna 1971 ensimmäisen työn, joka osoitti kvantitatiivisesti glykoituneen hemoglobiinin määrittämisen. He osoittivat myös, että veren hemoglobiinin pienfraktioihin (HbA1a, HbA1b, HbA1c ja fetaalihemoglobiini) liittyy hiilihydraatteja diabeetikoilla merkittävästi enemmän kuin terveillä. Trivelli ym. (1971) mukaan ilmiö kohdistui eritoten fraktioon HbA1c. Mitä suurempi veren glukoosipitoisuus on sitä enemmän hemoglobiinia glykoituu. (Penttilä ym. 2018, 132.) Nykyään glykoidun hemoglobiinin määrittäminen perustuu Suomessa lähes ainoastaan HbA1c:n määrittämiseen laskimoverestä (Penttilä ym. 2018, 132).

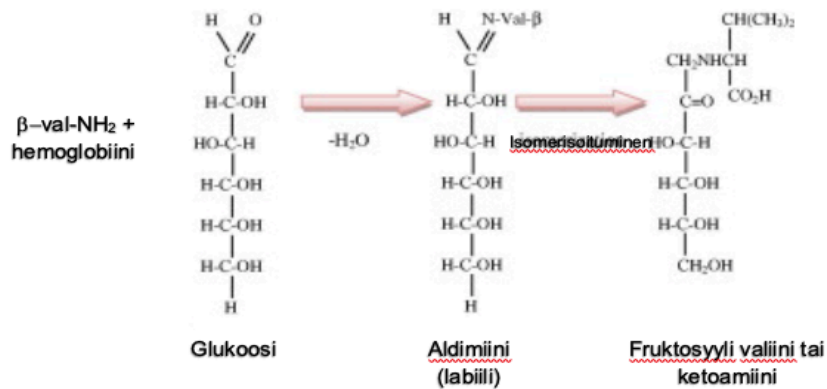
2.1 Hemoglobiini

Hemoglobiinimolekyyli on pallomainen, halkaisijaltaan noin 5,5 nm:n kokoinen proteiini. Se sisältää neljä polypeptidiglobiiniketjua. Hemoglobiinin neljä polypeptidiketjua muodostuvat kahdesta α - ja β -ketjusta. Näin syntyy hemoglobiini A (HbA). Kaikilla polypeptidiketjuilla on hydrofobinen tasku, johon on liittynyt yksi hemiryhmä ja jokainen niistä sitoo yhden happimolekyylin. Hemoglobiinin tärkeisiin tehtäviin kuuluu hapen kuljetus ja toimiminen happi- ja happoemäspuskurina veressä. (Ervasti 2008, 23-24.)

2.1.1 HbA1c:n muodostuminen

Hemoglobiinin glykoituminen on jatkuvaa ja spontaania, ei entsyymattista, verrattain hidasta ja se on lähes peruuttamaton prosessi (Kahrom 2010; Gupta, Jain & Chauhanin 2017). Glukoosi liittyy kovalenttisiin sidoksiin proteiinien N-terminaaliseen valiini- tai lysiini-aminohappoon, mikä riippuu vaikutusajasta. Hemoglobiinin glykoituminen tapahtuu pääsääntöisesti hemoglobiinin β -ketjujen N-terminaaliseen valiiniin koko punasolun noin 120 vuorokauden eliniän ajan. (Penttilä ym. 2009, 25.) Kuviossa 1 esitetään, miten hemoglobiinin glykoitumisessa syntyy

ensin labiili aldimiinimuoto, joka järjestäytyy hitaasti uudelleen ketoamiiniksi. Ketoamiinin hiilihydraattiosan rakenne on fruktoosi-amiini. HbA1c:n virallinen nimi onkin β -N-1-deoksifruktoosylihemoglobiini IFCC-IUPAC:n (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - Committee of Nomenclature and Properties) mukaan (Penttilä ym. 2009, 25).



Hemoglobiinin glykoitumisessa tapahtuvat kemialliset reaktiot

KUVIO 1. Glykoituneen hemoglobiinin muodostuminen (Pundir & Chawla 2014).

Hemoglobiinin glykoitumisen jatkuvuus ja hitaus merkitsevät sitä, että muutokset HbA1c:ssä näkyvät vasta viikkojen tai kuukausien päästä. Siksi esimerkiksi diabeteksen hoidon kannalta, HbA1c -tutkimus on suositeltavaa ottaa kahden - kolmen kuukauden välein. Ihanteellisessa tapauksessa HbA1c -tutkimus tehtäisiin neljän kuukauden välein. Tällöin se antaisi tarkan arvion veren glukoosipitoisuudesta neljältä edeltävältä kuukaudelta ja luotettavan vertailukohtaan aikaisempaan HbA1c -arvoon. (Kahrom 2010.) Normaalit viitearvot HbA1c:lle ovat 20-42 mmol/mol. Diabetes -diagnoosiin viittaava tulos on 48 mmol/mol tai enemmän. Suomessa on ilmoitettu HbA1c:n arvo prosenttien sijasta yksikkönä mmol/mol maaliskuusta 2010 lähtien. (Eskelinen 2016.)

2.1.2 Hemoglobiinivariantit

A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias mukaan 1811 hemoglobiinivarianttia ja talassemiaa on tunnistettu. Viimeisin päivitys tietokannassa on tehty 15.7.2019. Näistä yleisimmät hemoglobiinivariantit jakaantuvat seuraaviin kategorioihin: S, C, E ja D. Yleisin hemoglobiinimuunnos HbS esiintyy erityisesti päiväntasaajan alueella Afrikassa sekä afroamerikkalaisilla. Esiintyvyyden arvioidaan olevan 6-8 %:a afroamerikkalaisilla ja jopa 40%:a osassa Keski-Afrikkaa. Lisäksi HbS:ää esiintyy Välimerenmaiden ihmisillä ja intialaisilla. Hemoglobiini C on toiseksi yleisin variantti, jota esiintyy Länsi-Afrikkalaisilla ja afroamerikkalaisilla, mutta maailmanlaajuisesti hemoglobiini-E on toiseksi yleisin variantti, jota esiintyy erityisesti Kaakkois-Aasiassa. Hemoglobiini D:tä (HbD Punjab) esiintyy tasaisesti ympäri maailman. (Weycamp 2013, 393-400; Rohlfing ym. 2016, 80-83.)

Synteettiset variantit syntyvät, kun hemoglobiiniketjuissa tapahtuu geneettistä muuntelua, mutaatioita. B -talassemiaassa β -ketjujen tuotanto estyy. Kun hemoglobiinimolekyylit kootaan, β -ketjut korvautuvat γ - tai δ - ketjuilla. Täten fetaalihemoglobiini- ja HbA2 -tasot nousevat, mitkä normaalisti ovat hyvin matalia. Johdannaiset eli adduktit ovat seurausta hemoglobiinin posttranslationalisesta muunnoksesta. HbA1c:tä lukuun ottamatta, muita yleisiä johdannaisia ovat karbamyloitunut hemoglobiini (Hb carb) ja Schiffin emäs (esi -HbA1c). (Weycamp 2013, 393-400.)

S-, C-, D - ja E -heterotsygoottiset muodot eivät aiheuta hemolyyttisiä sairauksia, koska kaikilla niillä on terminaalinen β -valiini, jolloin glykoituminen tapahtuu samalla tavalla kuin HbA1c:llä. Silti näiden hemoglobiinien aiheuttama häiriö on variantti- ja menetelmäspesifinen ja sitä on vaikea yleistää. NGSP (National glycohemoglobin standardization program) arvioi useampia menetelmiä ja säännöllisesti päivitettävä listaus löytyy verkkosivustosta. (Weycamp 2013, 393-400.)

Täysiaikaisella vastasyntyneellä fetaalihemoglobiinin osuus on noin 80%:a kokonaihemoglobiinista. Fetaalihemoglobiini ei luovuta happea kudoksille yhtä te-

hokkaasti kuin normaali, aikuishemoglobiini, mutta se kompensoituu vastasyntyneen korkeammalla hemoglobiinitasolla. Fetaalihemoglobiinin muutos aikuishemoglobiiniksi tapahtuu 2-3 kuukauden iässä. (Karjalainen 2003, 140.)

Talassemiot ovat ryhmä perinnöllisiä, hemoglobiiniin vaikuttavia häiriöitä, jotka johtuvat yhden tai useamman hemoglobiiniketjun synteessin puutteesta tai mutaatioista. Globiinityypin mukaan talassemiot voidaan jakaa α -, β -, $\delta\beta$ - talassemioihin sekä perinnölliseen fetaalihemoglobiiniin. Mutaatioista ja perinnöllisyydestä johtuen joillakin aikuisilla fetaalihemoglobiinin osuus voi olla jopa 15 - 30%:a kokonaishemoglobiinista. (He ym. 2018.) β -talassemiassa ja sirppisoluanemiassa potilailla fetaalihemoglobiinin osuus kokonaishemoglobiinista voi olla 2-20 %:n välillä. Fetaalihemoglobiini voi nousta vähän myös raskauden aikana, vakavissa anemioissa ja joissakin leukemioissa. (Bry, Chen & Sacks 2001.)

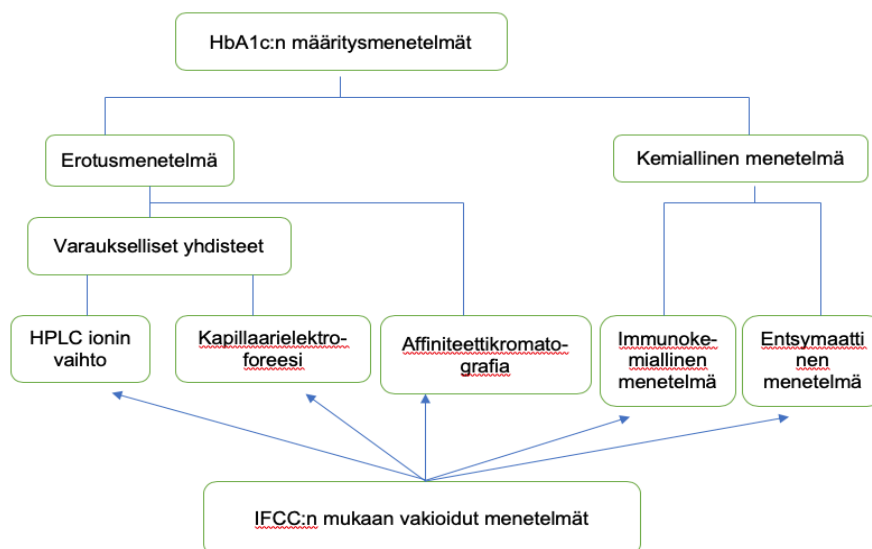
Fetaalihemoglobiinilla ei ole β -ketjua ja sen γ -ketjussa on terminaalinen glysiini valiinin sijasta, niinpä fetaalihemoglobiini voi glykoitua ainoastaan lysiinitähteillä. Tällöin tuloksena on noin yhden kolmasosan Hemoglobiini- A:n glykaatio. Immunokemiallisella menetelmällä HbA1c -pitoisuus laskee yhden prosentin jokaista fetaalihemoglobiiniprosenttia kohden. Yli 10 -15 prosentin tasolla häiriö on huomattava. Yleensä nestekromatografialla voidaan erottaa fetaalihemoglobiini HbA1c:stä. (Weycamp 2013, 393-400.)

Hb-Vaasa- eli $\alpha_2\beta_2$ (39(C5) GLN \rightarrow GLU) variantti löydettiin suomalaistaustaisesta perheestä, jossa tutkimuksen kohteena olevalta henkilöltä löydettiin lievää hemolyyttistä anemiaa aiheuttava sairaus. Tutkimukset suoritettiin Augustassa, Georgian osavaltiossa Yhdysvalloissa, minne näyte oli lähetetty Montrealista, Kanadasta. Potilaalla ja hänen äidillään sekä toisella hänen lapsistaan oli hemoglobiinivariantti, joka ominaisuutensa puolesta sopi hemoglobiiniluokkaan K. Tutkimusten myötä selvisi, että variantti oli lievästi epävakaa. Hb -Vaasa-variantti erotettiin kromatografisella menetelmällä, missä se muistutti fetaalihemoglobiinia. Hb-Vaasa-variantin hybridisaatio koira-eläimen hemoglobiinin kanssa johti tulokseen siitä, että vasta löydetyn hemoglobiinivariantin molekylaariset muutokset sijaitsevat hemoglobiinin β -ketjussa. Hemoglobiinin peptidiketjuja tutkittaessa ja

aminohappojärjestystä selvittäessä kävi ilmi, että Hb-Vaasa-variantti on seurausta glutamiinin korvautumisesta glutamiinihapolla peptidi T-4:n yhdeksännessä paikassa, mikä vastaa paikkaa viisi C-kierteisketjussa ja paikkaa 39 β -ketjussa. Normaalin käytännön mukaisesti variantti nimettiin sen kaupungin mukaan, jossa potilas syntyi. (Kendall ym. 1977, 292-295.)

2.2 Määrittymenetelmät

Weykampin (2013, 393-400) mukaan HbA1c:lle on olemassa kaksi määrittymenetelmää, joista toinen perustuu hemoglobiinifraktioiden erottamiseen ja toinen kemiallisiin reaktioihin. Kuviossa 2 esitetään HbA1c:n erotteluun yleisesti käytetyt menetelmät. Molemmat menetelmät voidaan vakioida IFCC:n referenssimittausmenettelyn mukaisesti.

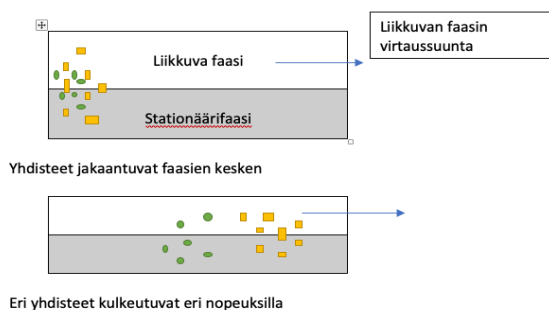


KUVIO 2. HbA1c:n erotteluun käytetyt menetelmät (Mukaiiltu Weykamp 2013, 393-400).

2.2.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografinen menetelmä (HPLC) ja Bio-Rad Variant™ II Turbo

Kromatografian idea perustuu siihen, että näyte jaetaan komponenteikseen tunnistamista varten. Glykoitumattomalla hemoglobiinilla ja HbA1c:llä on erilaiset kemialliset koostumukset, ja tämä mahdollistaa HbA1c:n määrittämisen ja fraktioiden erottamisen. Pääperiaate perustuu ionin vaihtoon, ja ioninvaihtokromatografialla erotetaan jopa 0,02 yksiköllä eroavat HbA1c ja hemoglobiini toisistaan HPLC:n (high performance liquid chromatography) avulla. Sillä nähdään myös fetaalihemoglobiini (HbF), pieni nopea hemoglobiini (HbA1a/b) ja karbamyloitu nut hemoglobiini (HbCarb) sekä geneettiset variantit. (Weycamp 2013, 393 -400.)

Yhdisteiden erottuminen perustuu aina tasapainoihin. Jakautuminen tapahtuu kromatografiakolonissa, jossa kaksi toisiinsa liukenematonta faasia, stationäärifaasi ja liikkuva faasi, ovat toistensa kanssa vuorovaikutuksessa (Kuvio 3). Näytemolekyylit tarttuvat jatkuvasti stationäärifaasiin ja irtoavat siitä liikkuvaan faasiin. Tällä tavoin faasien välillä on dynaaminen tasapaino. Yhdisteet, jotka tarttuvat heikosti stationäärifaasiin etenevät nopeasti, koska ne ovat silloin suurimman osan ajasta liikkuvassa faasissa. Ne yhdisteet, jotka ovat sitoutuneet voimakkaasti stationäärifaasiin kulkeutuvat hitaammin liikkuvan faasin mukana. Yhdisteiden erilainen tasapaino liikkuvan ja stationäärifaasin välillä mahdollistaa niiden erilaiset kulkunopeudet ja siten ne voidaan erottaa toisistaan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 140.)



KUVIO 3. Näytteen eri komponenttien jakaantuminen liikkuvaan faasiin ja stationäärifaasiin (Mukailtu Jaarinen & Niiranen 2005, 140).

Bio-Rad:n Variant™ II Turbo -hemoglobiinitestausjärjestelmää (Kuva 1) on käytetty Keski-Suomen keskussairaalassa pitkään, tammikuun 2019 puoleen väliin asti. Variant™ II Turbo on nestekromatografinen laite, joka sisältää injektorin, eluointiliuokset, pumpun, kolonnin, detektorin sekä näitä yhdistävät kapillaarit ja tulostuslaitteiston (Jaarinen & Niiranen 2005, 153; Bio-Rad Laboratories 2019). Variant™ II Turbo käyttää Bio-Radin HPLC -menetelmää sisältäen automatisoidun Variant™ II Hemoglobin Testing System -järjestelmän. Näytteiden analysointiin se käyttää 97 sekuntia testiä kohden. (Bio-Rad Laboratories 2019.)



KUVA 1. Variant™II Turbo (Bio-Rad Laboratories 2019).

Variant™ II Turbon määrittäminen on ioninvaihtoon perustuva korkean erotuskyvyn nestekromatografinen (HPLC) menetelmä. HbA1c erotetaan nestekromatografisesti kationinvaihtopylväässä muista hemoglobiinifraktioista. Kationinvaihtopylväällä voidaan tehdä noin 2500 analyysia. Näyteasemassa näytteet laimennetaan ja sekoitetaan automaattisesti ennen injisointia analysointikasettiin. Analysointikasetissa hemoglobiinit erottuvat perustuen niiden ionien vuorovaikutukseen näytekasetin sisältämien materiaalien kanssa. Tähän lisääntyneeseen ionipitoisuuteen tuodaan ohjelmoitu puskuriliuos kromatografia-aseman kaksoispumppujen avulla. Sitten erotetut hemoglobiinifraktiot eluoidaan pylväästä suolagradientilla ja havaitaan fotometrisen suodattimen läpi, minkä toiminta perustuu virtaussytometriaan. Muutokset absorbanssissa mitataan aallonpituudella 415 nm:ä. Laitteen suorittama taustakorjausmittaus tehdään aallonpituudella 690 nm:ä. (Hemoglobin A1c on Bio-Rad Variant II Turbo 2.0 2012; Desmond ym. 2017, 378-386.)

Tulostus tapahtuu automaattisesti ja Variant™ II Turbo antaa HbA1c -pitoisuuden sekä prosentteina että mmol/mol -yksikkönä. Laite laskee eksponentiaalisesti modifioitun Gaussin käyrän (EMG -algoritmi) avulla HbA1c -piikin pinta-alan ja vähentää siitä labiilin HbA1c:n ja karbamyloituneen hemoglobiinin piikkien pinta-alat. Kokonaispinta-alan tulisi olla kromatogrammissa 800.000 – 4.000.000 välillä. Pinta-alan ollessa yli tai ali ilmoitettujen rajojen, laimennetaan näyte ohjeiden mukaan ja analysoidaan uudelleen. Epäiltäessä merkittävästi häiritseviä tekijöitä, esimerkiksi näytteessä olevaa Hb -Vaasa -varianttia, näyte määritetään uudelleen DCA Vantage® -laitteella. (B-Hba1c työohje 2015.)

Variant™ II Turbolla on käytössään Hb -Advisor autovalidointiohjelma. Analysaattori vakioidaan reagenssivalmistajan toimittamilla 2-tasovakioilla pylväänvaihdon yhteydessä sekä tarvittaessa pylväänvaihtojen välissä, jos kontrollit eivät ole hyväksymisrajoissa. Pylväänvaihdon yhteydessä sekä noin 500 testin välein vaihdetaan myös esisuodatin. (B-HbA1c -työohje 2015.) Standardien pitoisuudet varmistetaan NGSP/IFCC referenssimenetelmillä reagenssivalmistajan toimesta (NGSP 2010).

2.2.2 Kemiallinen määrittäminen ja DCA Vantage®

HbA1c -pitoisuus mitataan kemiallisissa testeissä spesifisten vasta-aineiden käyttöön perustuvalla menetelmällä. Vasta-aineet tunnistavat valiinin, joka on hemoglobiinin β -ketjun N-termiinalinen glykoitunut aminohappo. Sitten fotometriamenetelmällä mitataan yhtä aikaa kokonaihemoglobiinipitoisuus. HbA1c -pitoisuuden laskemiseksi tarvitaan näin HbA1c ja Hb -kokeet eli kaksi riippumattonta testiä. (Weycamp 2013, 393-400.)

DCA Vantage® on puoliautomaattinen pöytälaite (Kuva 2). Se määrittää kvantitatiivisesti 6-7 minuutissa HbA1c -pitoisuuden prosenttimäärän kokoverestä. DCA Vantage® -järjestelmään kuuluu neljä eri toiminta-aluetta: reagenssikasettikotelo, laitteessa oleva viivakoodinlukija, näyttö ja tulostin. Viivakoodinlukija on järjestelmän kalibroimista sekä reagenssikasettien ja kontrollien skannaamista

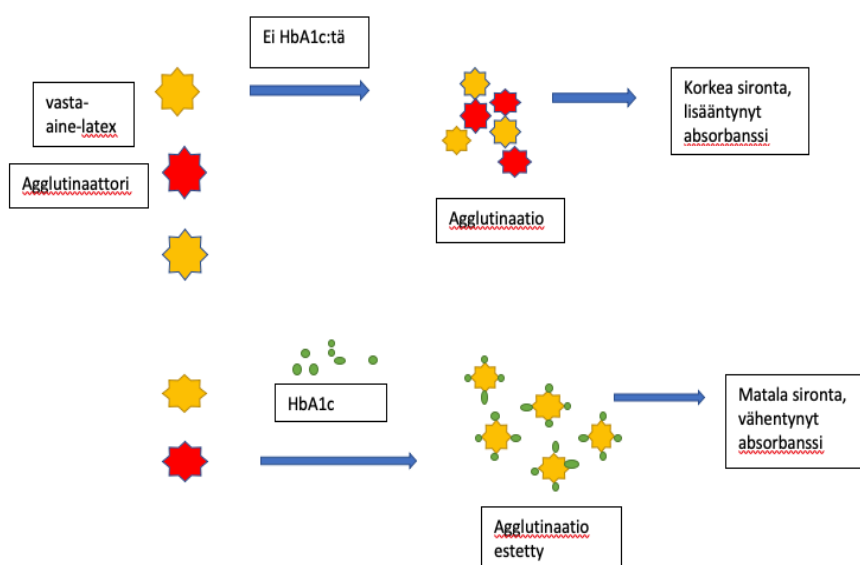
varten. Kalibroinnissa kalibrintikortti liu'utetaan laitteeseen, ja järjestelmä kalibroituu automaattisesti, kun viivakoodinlukija lukee kortin. Reagenssivalmistaja on kalibroinut menetelmän HPLC -referenssimenetelmää vastaan. Testit määritetään kasettikotelossa, jonne reagenssikasetit laitetaan. Analyysi on tehty, kun sisäinen lämpötulostin tulostaa testitulokset. (Whitley, Yong & Rasinen 2015, 201-208.)



KUVA 2. DCA Vantage® (Siemens Healthcare Oy 2019).

DCA Vantage® -analysointilaitteen määrittäminen perustuu kemiallisiin reaktioihin, jotka mitataan spektrofotometrisesti. Spektrofotometri mittaa reaktion aiheuttamaa absorbanssin muutosta, joka syntyy, kun monoklonalisilla vasta-aineilla saadaan aikaan agglutinaatio. Kasetissa olevan optisen ikkunan läpi kulkevan valon voimakkuus mitataan ja tulokset ilmoitetaan laskettuna totaalihemoglobiinista kliinisesti merkittävänä yksikköinä, prosenttiosuutena ja mmol/mol:ssa. Ennen kuin laite laskee HbA1c:n arvot, niin totaalihemoglobiinimäärityksessä kaliumferrosyanidi hapettaa näytteen hemoglobiinin methemoglobiiniksi. Se muodostaa tiosyanaatin kanssa tiosyanaatti-methemoglobiinin, jonka värin voimakkuus on suoraan verrannollinen näytteen hemoglobiinipitoisuuteen aallonpituudella 531 nm:ä. Glykoitunut hemoglobiini määritetään latex-agglutinaation inhibitiomenetelmällä (Kuvio 4). Tässä menetelmässä latex-partikkelien pinnalla on monoklonalisen HbA1c -vasta-aineen sitoutumiskohtia, joista näytteessä oleva HbA1c kilpailee synteettisen polymeerin kanssa aiheuttaen valon sironnan vähenemisen 531 nm:ssä. Valonsironta on verrannollinen näytteessä olevaan

HbA1c:n määrään. (Whitley, Yong & Rasinen 2015, 201-208; Desmond ym. 2017, 378-386.)



KUVIO 4. Latex-agglutinaation inhibitio (Mukaiiltu Siemens Healthcare Diagnostics 2013).

2.2.3 Immunokemiallinen määrittäminen ja Cobas c513

Immunokemiallisessa määrittämissä hemolysoituun näytteeseen lisätään anti-HbA1c -vasta-aineiden ylimäärä, jolloin ne agglutinoituvat HbA1c:hen sitoutumisen jälkeen. Tuloksena syntyvien immunokompleksien sameus mitataan fotometrisesti joko turbidimetrillä tai nefelometrillä. Rinnakkaiset hemoglobiinikokonaispitoisuudet mitataan bikromaattisesti preinkubaatio vaiheessa. (Weycamp 2013, 393-400.)

Roche uusi, Cobas c513 - analysaattori (Kuva 3) on täysautomatisoitu, tehokas laite HbA1c:n määrittämiseen (Lenters-Westra & English 2017; Roche Diagnostics 2019). Sitä ei ole Keski-Suomen keskussairaalaan liitetty automaatiolinjastoon, vaan se on erillinen, niin sanottu stand alone -laite.

Cobas c513 pystyy määrittämään jopa 400 testiä tunnissa. Käyttäjältä se vaatii aikaa vain näytteiden lataamiseen ja tulosten vastaamiseen. Reagenssit säilyvät

laitteen sisällä neljä viikkoa. Analyysaattori kalibroidaan joka kuukausi sekä reagenssi erän vaihtuessa. Tällöin Cobas c513 tarvitsee vain pienen manuaalisen huollon päivittäin. Analyysaattori käynnistyy nopeammin, kun sen automaattinen huolto tehdään laitteen aikataulutetun herätyksen aikana. Näyteputket voidaan laittaa laitteeseen korkkeineen, eikä esikäsitelyä tarvita. Laitteen muihin etuihin kuuluu lisäksi reagenssikasettien merkitseminen radiotaajuustunnistuksella ja automaattinen kalibraattoritietojen ja QC -arvojen lataaminen, mikä vähentää manuaalisten merkintöjen tarvetta. (Lenters-Westra & English 2017; Jaisson ym. 2018; Roche Diagnostics 2019.)



KUVA 3. Cobas c513 (Roche Diagnostics 2019).

Cobas c513 -analyysaattorissa käytetään Rochen kehittämää Tina-quant® HbA1c -kolmannen sukupolven immunokemiallista testiä. Se on valmis käytettäväksi ja yhdestä pakkauksesta voidaan tehdä 500 testiä. Tina-quant®HbA1c on uusi, markkinoille tuotu IFCC:n standardoima immunokemiallinen menetelmä, joka voidaan kääntää myös NGSP:hen. Tätä testiä eivät haittaa myöskään tunnetuimmat HbA1c:n variantit. Cobas c513 antaa suorat tulosraportit IFCC (mmol/mol) - ja NGSP (%) -yksiköissä. (Roche Diagnostics 2019; Jaisson ym. 2018; Lenters-Westra & English 2017.)

Tina-quant® HbA1c -kolmannen sukupolven immunokemiallinen testi perustuu hemolysoidun kokoveren turbidimetriseen immunokemialliseen inhibitioon (TI-NIA). Ensimmäisessä vaiheessa kokoveri hemolysoidaan käyttäen reagenssia, joka sisältää detergenttiä. Toisessa vaiheessa mitataan spektrofotometrillä he-

molysoitunut hemoglobiini, joka on muutettu stabiiliksi johdannaiseksi aallonpituudella 376 nm:ä. HbA1c reagoi anti-HbA1c vasta-aineen kanssa ja muodostaa liukoisin antigeeni-vasta-ainekompleksin. Lopulta reagenssiin sisältyvät polyhapteenit reagoivat ylimääräisen anti-HbA1c -vasta-aineen kanssa ja muodostavat liukenemattoman vasta-aine-polyhapteenikompleksin. Tämä mitataan turbidimetrillä aallonpituudella 340 nm:ä. Tuloksesta voidaan sanoa, että se on kääntäen verrannollinen mitattuun absorbanssiin. Eli, mitä alhaisempi sameus saadaan, sen korkeampi HbA1c -pitoisuus on. Menetelmän lineaarisuus on välillä 23 mmol/ mol (4,3%) – 196 mmol/ mol (20,1%) asti. (Jaisson ym. 2018.)

2.3 Analyysimenetelmien heikkoudet, vahvuudet ja häiriötekijät

Variant II™ Turbon kromatografisen analyysimenetelmän yleisimmät häiriötekijät ovat Hb -variantit, S-, C-, E- ja D (B-HbA1c -työohje), joihin 99 %:a hemoglobiini-varianteista kuuluu (Weycamp 2013, 393-400; Rohlfing ym. 2016, 80-83). Kromatogrammissa näiden pinta-ala on yli 60%. Jatkotutkimukset on tällöin tehtävä immunologisella menetelmällä (Taulukko 1). Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa nämä uusintatutkimukset on tehty DCA -Vantage® -laitteella. (B-Hba1c -työohje 2015). Klingenbergin ym. (2017, 458-464) mukaan HPLC – nestekromatografisella menetelmällä analysoitu HbA1c -tutkimus, jossa on hemoglobiinivariantti E, antaa liian alhaisia tuloksia.

Häiriöitä HbA1c -tutkimuksissa aiheuttavat myös kohonneet fetaalihemoglobiinitasot (yli 25%:a) ja johdannaiset kuten karbamyloitunut hemoglobiini ja esi-HbA1c eli schiffin emäs (Weycamp 2013, 393-400). Näissäkin tapauksissa uusintatutkimus on tehty immunologisella menetelmällä käyttäen DCA Vantage® -laitetta. Rakenteellisista varianteista esimerkiksi Hb -Vaasa -variantti häiritsee kromatografista referenssimenetelmää, koska se eluoituu kromatografiapylvästä yhdessä HbA1c:n kanssa aiheuttaen alhaisempia HbA1c -mittaustuloksia (Liite 2). Siksi Variant™ II Turbolla saadaan matalampaa tulostasoa Hb-Vaasaa sisältävistä näytteistä kuin immunologisella menetelmällä. Rakenteellistenkin varianttien ilmentyessä on uusinta tutkimus suoritettava DCA- Vantage® -laitteella (Taulukko 1). (B-Hba1c -työohje 2015).

Ioninvaihtoon perustuvalla HPLC -nestekromatografialla erotetaan hemoglobiini-variantit ja tätä voidaan pitää vahvuutena. Sen heikkoutena on puolestaan HbA1c:n erilaisten varianttien häiriöt HbA1c:n analysoinnissa (Weycamp 2013.) Variant II™ Turbon varsinaisena heikkoutena ei ole sen määrittämisnopeus, joka on 97 sekuntia HbA1c -näytettä kohti (Bio-Rad Laboratories 2019), mutta kun vertaa sitä Cobas c513:ta, jonka analyysinopeus on 400 näytettä tunnissa (Lenters-Westra & English 2017; Jaisson ym. 2018; Roche Diagnostics 2019) eli yhdeksän sekuntia näytettä kohti, niin Variant II™ Turbon heikkoutena voidaan pitää myös sen analysointinopeutta (Taulukko 1).

Cobas c513 on erillinen, stand alone- laite, mitä Weycampin (2013, 393-400) mukaan voidaan pitää heikkoutena (Taulukko 1). Tämä tarkoittaa, että analysaattoria ei ole liitetty automaatiolinjastoon. Tällöin näytteet pitää ladata analysaattorille manuaalisesti, mikä vie aikaa ja voi tapahtua inhimillisiä virheitä.

Toisaalta Cobas c513:n heikkoutena voidaan pitää myös sen kahta tarvittavaa riippumatonta testiä (Hb ja HbA1c), jotka voivat vaikuttaa negatiivisesti analyysin laatuun (Jaisson ym. 2018). Lisäksi Cobas c513:n käyttämä immunokemiallinen testi ei havaitse hemoglobiinivariantteja, mutta yleensä ne eivät häiritse mittauksia (Taulukko 1) (Weycamp 2013, 393-400). Siksi se on myös Cobas c513:n vahvuus.

Myös korkeat fetaalihemoglobiinipitoisuudet voivat aiheuttaa virheellisen matalia HbA1c -arvoja immunokemiallisessa määrittämismenetelmässä. HbA1c -pitoisuus laskee yhden prosentin jokaista fetaalihemoglobiinia kohden. Yli 10 -15 %:n tasolla häiriö on huomattava (Taulukko 1). (Weycamp 2013, 393-400; Saés-Benito ym. 2014) Fetaalihemoglobiini aiheuttaa häiriöitä sekä kromatografisella että immunologisella menetelmällä, koska se tulee mitatuksi hemoglobiinin kokonaispitoisuuteen (Rohlfing ym. 2008, 811-814).

TAULUKKO 1. Analyysimenetelmien vertailu laitekohtaisesti (Mukaillen Weycamp 2013; Saés-Benito ym. 2014; B-Hba1c -työohje 2015; Rohlifing ym. 2016; Westra & English 2017; Jaisson ym. 2018; Bio-Rad Laboratories 2019 & Roche Diagnostics 2019).

	Heikkoudet	Vahvuudet	Häiriötekijät
Variant II™ Turbo	HbA1c:n erilaisten varianttien häiriöt HbA1c:n analysoinnissa. 97s/ näyte.	Erotetaan variantit.	Hb -variantit (joista 99% kuuluu kategoriaan E, D, S ja C), joiden pinta-ala on yli 60 %. Tehdään jatkotutkimukset DCA Vantagella. Kohonneet fetaalihemoglobiinitasot (yli 25 %) ja johdannaiset (HbCarb, esi -HbA1c eli Schiffin emäs). Uusinta tutkimus DCA Vantagella. Rakenteelliset Hb -variantit (Hb -Vaasa ja sirppisoluanemia). Uusinta DCA Vantagella.
Cobas c513	Stand alone -laite Kaksi riippumatonta testiä (Hb- ja HbA1c -testit), voivat vaikuttaa negatiivisesti analyysin laatuun. Variantit eivät yleensä häiritse.	Variantit eivät yleensä häiritse. Nopea määrittäminen. 400 näytettä/h eli n. 9s/näyte	HbA1c -pitoisuus laskee yhden prosentin jokaista fetaalihemoglobiinia kohden. Yli 10 -15%:n tasolla häiriö on huomattava.

3 VERIFIOINTI

Verifiointi eli todentaminen määritellään ISO 15189 mukaan siten, että verifiointi on objektiiviseen näyttöön perustuva varmistuminen siitä, että määritellyt vaatimukset on täytetty. Verifiointi voi perustua testaamiseen ja koekäyttöön, vaihtoehtoisin laskelmiin, asiakirjojen katselmointiin ennen kuin ne julkaistaan ja menetelmä spesifikaatioiden vertaamiseen. (SFS-EN ISO 15189: 2012.)

Standardit eivät kerro, miten laaja tai perusteellinen verifiointin tulisi olla. Organisaatiot voivat päättää sen itse. Niiden on harkittava tavoitteet, tarkoituksen mukaisuus ja suoritustaso ja sitten suhteutettava ne omiin resursseihinsa. (Laitinen 2017, 34.) Fimlab Laboratoriot Oy on iso organisaatio käsittäen Pirkanmaan, Kanta-Hämeen, Keski-Suomen ja Päijät-Hämeen alueiden isojen sairaaloiden ja terveyskeskusten laboratoriot. Fimlab Laboratoriot Oy:ltä löytyykin periaatteet verifiointiin.

3.1 Fimlab Laboratoriot Oy:ssä noudatettavat verifiointin periaatteet

Fimlab Laboratoriot Oy:n asiakaspalvelussa, diagnostiikkapalveluissa ja näiden palveluiden tukitoiminnoissa käytetään menetelmiä, joilla saavutetaan käyttötarkoitukseensa soveltuva, hyväksyttävä analyttinen ja toiminnallinen laatutaso. Menetelmiä vaihdetaan, kun todetaan niiden toimivuuteen, reagensseihin tai käytettävään laitteistoon liittyviä perusteita. Koestamalla varmistetaan uuden menetelmän, laitteen tai välineen toiminta ennen käyttöönottoa. Jos käytetään valmista, CE -merkittyä menetelmä- tai laitekonseptia, jonka valmistaja on itse laajasti validoinut, niin koestuksesta käytetään silloin termiä verifiointi. Validointi sanaa käytetään koestuksista, joissa testattavat menetelmät tai laitteet ovat avoimia. Tällainen koestus mahdollistaa muun muassa itse valmistettujen tai usean eri valmistajan reagenssien tai testiprotokollien käyttämisen. (Härkönen & Haapala 2018.)

Verifiointia varten tehdään suunnitelma. Menetelmävastuuhenkilö tai lääketieteellinen vastuuhenkilö vastaa suunnitelman laatimisesta, hyväksymisestä sekä tallentamisesta. Suunnitelmassa käy ilmi koestettavat menetelmät ja laitteet, vertailulaite tai -menetelmä, testattava näytemuoto, koestuksen yleiskulku, koestukseen osallistuva henkilöstö, testattavien näytteiden määrä, tavoitteet ja koestuksen aikataulu. Lisäksi suunnitelmassa käydään läpi verifiointikohtaisesti koestuksessa testattavat parametrit. Testattavia parametreja ovat mm. mittausalue, lineaarisuus, kvantitointiraja ja toteamisraja, vertailu käytössä olevaan tai muuhun tunnettuun menetelmään, sarjojen välinen ja sarjan sisäinen toistettavuus, siirtymävirhe ja spesifisyys sekä käytettävyys. (Härkönen & Haapala 2018.)

Verifiointitulokset analysoidaan ja hyväksytään ennen uuden menetelmän käyttöönottoa. Koestuksesta laaditaan aina raportti. Raportissa mainittavia asioita ovat esimerkiksi verifiointin syy, vertailumenetelmä, koestajat, testattava menetelmä, näytemateriaali, ajankohta, tulokset, tietojärjestelmän testaus, käytettävyys, kannattavuuden arviointi, johtopäätökset ja tiedottamistarve. Raporttiin voidaan lisätä liitteeksi verifiointiin liittyvää materiaalia, esimerkiksi primääritulokset. (Härkönen & Haapala 2018.)

Menetelmäverifiointista on vastuussa kyseessä olevan prosessin vastuuhenkilö. Menetelmiä kehitetään, koska halutaan saada asiakkaiden palvelukokonaisuutta tukeva laatutaso. Yhtenäisen tulostason saavuttamiseksi käytetään kansainvälisesti ja kansallisesti tarkoin testattuja suositusmenetelmiä aina, kun se on mahdollista. (Härkönen & Haapala 2018.)

3.2 Verifiointinissa käytettäviä parametreja

Mittausalue on tutkittavan aineen pitoisuusalue tai suureen vaihtelualue, jossa menetelmää käytetään käyttötarkoitukseensa soveltuvalla tarkkuudella. Ihanteellisella pitoisuusalueella kalibrointikuvaaja on lineaarinen, ja yleensä mittausalueeksi valitaan lineaarinen alue, jossa pienimpänä pitoisuutena on menetelmällä luotettavasti saavutettu määrittämissä raja. Lineaarisuus kuvastaa analyysimenetelmän kykyä, missä mittausvasteet ovat suoraan verrannollisia tutkittavan aineen

pitoisuuteen näytteessä menetelmän käyttöalueella. Silti mitta-alue voi olla laajempi kuin lineaarinen alue, mikäli hyväksyttävä tarkkuus saadaan epälineaarisella alueella. (Hägg 2016.)

Määritys- eli kvantitointiraja on kvantitatiivisen määrityksen pitoisuusalaraja. Sille voidaan tehdä epävarmuusarvio. (Ehder 2005.) Alempi määritysraja (LLOQ, lower limit of quantitation) on tutkittavan aineen alhaisin konsentraatio, joka voidaan määrittää luotettavasti hyväksyttävällä täsmävyydellä ja toistettavuudella. Määritysraja pitäisi määrittää ainakin viidellä eri vakionäytteellä. Ylemmällä määritysrajalla (ULOQ, upper limit of quantitation) saadaan korkein analysoitavan aineen pitoisuus, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä toistettavuudella. Monesti se on myös korkein pitoisuus standardisuoralla. (EMEA 2011.) Toteamisrajalla tarkoitetaan puolestaan määritettävän aineen pienintä pitoisuutta, joka eroaa nollanäytteestä merkittävästi, mutta todetaan luotettavasti (Ehder 2005).

Menetelmän tarkkuudella (accuracy) tarkoitetaan esimerkiksi sitä, että verrataan saatuja tuloksia toisella menetelmällä saatuihin tuloksiin tai muuhun tunnettuun menetelmään. Menetelmän tarkkuus voidaan määrittää myös määrittämällä eritasoisia kontrollinäytteitä, joiden pitoisuus tiedetään. Kontrollinäytteiden pitoisuus voidaan määrittää omistakin kontrollinäytteistä, jotka on valmistettu lisäämällä matriisiin tunnettu määrä tutkittavaa näytettä. (EMEA 2011.)

Siirtymävirhettä (carry over) tutkitaan analysoimalla määrityksen ULOQ-näytteen jälkeen nollanäytettä, johon ei ole lisätty tutkittavaa näytettä eikä sisäistä vakiota. Siirtymävirheen pitää olla alle 20%:a määrityksen LLOQ:n vasteesta ja alle viisi prosenttia sisäisen vakion vasteesta. (EMEA 2011.)

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmää, joka tuottaa vasteen ainoastaan tutkitavalle aineelle tai yhdisteelle. Spesifisyys ongelmia ilmenee eri tekniikoilla, joten tekniikoiden perustuntemus on oleellista kokeiden suunnittelussa ja suorittamisessa. Esimerkiksi kromatografiset menetelmät eivät ole spesifisiä. Tämä voidaan todeta määrittämällä nollanäytteitä ja sellaista näytematriisia, joka ei sisällä tutkittavaa ainetta. Sitten mitataan tutkittavaa ainetta ja sen kaltaisia yhdisteitä, mitkä voisivat esiintyä analyysissä ja häiritä sitä. (EMEA 2011.)

Menetelmän toistettavuus (repeatability) tutkitaan määrittämällä variaatiokerroin (CV%). Se ilmoittaa tulosten hajonnan, kun toistetusti samasta näytteestä tehdään määriykset. Sarjan sisäisellä toistettavuudella nähdään menetelmän toistettavuus samoissa olosuhteissa yhdessä mittaussarjassa. Sarjojen välisessä toistettavuudessa menetelmän toistettavuus testataan laboratorion sisällä eri päivinä, eri tarvikkeilla tai eri henkilöiden tekemänä. (Ehder 2005; EMEA 2011.)

ISO 9241-11 -standardin (2018) mukaan käytettävyys (usability) on sitä, että vaikuttavuudella, tehokkuudella ja tyytyväisyydellä tietyt määritellyt käyttäjät saavuttavat määritellyt tavoitteet tietyssä ympäristössä. Nielsen (1994, 26) puolestaan on laajentanut ISO- määritelmää opittavuuden, muistettavuuden ja virheiden vähyyden kriteereillä. Opittavuus on sitä, miten helposti ja nopeasti järjestelmän tai laitteen käyttäjä oppii laitteen toimintalogiikan ja käyttämisen. Muistettavuus kertoo, kuinka helppoa laitteen käytön jo aiemmin oppineen henkilön on palauttaa mieleen laitteen käyttö ja toiminnallisuus. Virheiden vähyydellä tai niiden määrällä tarkoitetaan käyttäjän tekemissä toimenpiteissä tapahtuvien virheiden määrää (Nielsen 1994, 26).

Tietojärjestelmä, jota käytetään tutkimustiedon keräämisessä, tallentamisessa, käsittelyssä, raportoimisessa ja säilyttämisessä on täytettävä ISO 15189:n mukaisia vaatimuksia. Näiden vaatimusten mukaan laboratorion on testattava ja verifioitava tietojärjestelmänsä toimivaksi ennen sen käyttöönottoa. Tietojärjestelmään mahdollisesti tehdyt muutokset on myös hyväksyttävä, dokumentoitava sekä verifioitava. Laboratorion tietojärjestelmässä verifiointi sisältää tarvittaessa myös muiden järjestelmien kuten sairaalan potilastietojärjestelmien, laboratorio-laitteiden ja perusterveydenhuollon järjestelmien välisen tietoliikenteen toimivuuden varmistamisen. On varmistettava, että tieto siirtyy virheettömästi. Tietojärjestelmä on myös suojattava muutoksilta sekä luvattomalta käytöltä. On varmistettava tiedon koskemattomuus ja järjestelmähäiriöiden kohdalla tehtävä tarvittavat korjaavat toimenpiteet. Laboratoriolla on oltava varasuunnitelma, jos tietojärjestelmä lakkaa toimimasta. Tietojärjestelmän tietosuojaa koskee sekä kansalliset että kansainväliset vaatimukset. (SFS-EN ISO 151189: 2012.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida Cobas c513 -analysaattorin HbA1c -tutkimusmenetelmä Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa. Verifiointissa tehtiin potilasnäytevertailu, ja testattiin verifioitavaa Cobas c513 -analysaattorin turbidimetrinen inhibitio-immunomenetelmää (TINIA) vertailu- eli referenssimenetelmänä olevaan Variant™ II Turbon nestekromatografiseen HPLC -menetelmään.

Lisäksi Tampereella Fimlab Laboratoriot Oy:n keskuslaboratoriossa on niin sanottu Master -laite, joka on samanlainen Cobas c513 -analysaattori kuin Jyväskylässä Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa. Näille laitteille tehtiin laitevertailu. Laitevertailu on samalla sisäistä laadunvarmistusta. Varmistetaan, että saadaan samaa tasoa olevia tuloksia sekä Tampereella että Jyväskylässä.

Kemian automaatiouudistuksessa HbA1c -määritys siirrettiin Variant™ II Turbo -laitteelta Cobas c513 -laitteelle, joten tavoitteena on, että uusi immunokemiallinen analyysimenetelmä HbA1c -tutkimukselle ja analysaattori Cobas c513:sta täyttävät niille asetetut vaatimukset. Uuden, immunokemiallisen analyysin hyötynä sairaalaosastot ja terveyskeskukset tulevat saamaan potilastuloksensa aiempaa nopeammin. Lisäksi Fimlab Laboratoriot Oy:n Keski-Suomen keskussairaalan laboratorioon tästä on hyötynä se, että laitekanta uudistuu ja nykyai-kaistuu ja uusi analyysilaitte ja -menetelmä sitoo vähemmän työvoimaa sekä resursseja kuin edellinen, nestekromatografinen menetelmä.

Tutkimuskysymykset

- 1) Miten vertailukelpoisia verifioitavan Cobas c513:n immunokemiallisen analysaattorin HbA1c -tulokset ovat Variant™ II Turbon nestekromatografisen analysaattorin HbA1c -tuloksiin?
- 2) Miten Jyväskylän keskussairaalan laboratorion Cobas c513:n tulokset vastaavat laitevertailussa Tampereen keskuslaboratorion Cobas c513:n tuloksiin?

5 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tämän tutkimuksen lähestymistapa on kvantitatiivinen, koska tutkimusongelmiin saadaan numeeriset vastaukset ja niissä etsitään lineaarista riippuvuutta. Havaintoaineisto sopii määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen. Muuttujat saadaan taulukkomuotoon ja aineisto muokattua tilastollisesti käsiteltävään muotoon. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2001, 129.)

5.1 Aineiston keruu

Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla selvitetään lukumääriin ja prosenttiosuuksiin liittyviä kysymyksiä. Tämä edellyttää riittävän suurta, edustavaa otosta. (Heikkilä 2014, 15.) Kvantitatiivisessa tutkimuksessa aineiston valinta on tarkasti määriteltä, ja siitä tehdään otantasuunnitelma. Tästä määritellään perusjoukko, johon tulosten pitää päteä. Perusjoukosta otetaan vielä otos. Se on pienoiskuva perusjoukosta. (Heikkilä 2014, 31 – 32.) Aineisto on primääristä silloin, kun se on tutkimusta varten kerättyä (Heikkilä 2014, 13). Tutkimusaineisto on saatu Fimlab Laboratoriot Oy:n kautta, joten perusjoukon tai tutkimusotoksen valintaan ei ole voitu vaikuttaa. Aineisto käsittää 110 kokoverinäytettä (K₂EDTA), joista on analysoitu HbA1c -pitoisuudet Variant™ II Turbolla ja Cobas c513:lla. Näytteet olivat potilasnäytteitä, ja ne on valikoitu tähän tutkimukseen sekä Tampereelta että Jyväskylältä. Tampereen keskuslaboratorion Cobas c513:n ja Jyväskylän keskus-sairaalan laboratorion Cobas c513:n laitevertailua varten on kerätty erilliset näytteet.

Vertailu näytteet kerättiin 11.-18.1.2019, ja mukaan otettiin eri tasoisia näytteitä mahdollisimman laajalta mittausalueelta. Lisäksi kerättiin Hb -Vaasa -varianttia ja fetaalihemoglobiinia sisältäviä näytteitä. Näytteistä 23:ssa esiintyi Hb -Vaasa -varianttia ja 11 näytteessä esiintyi fetaalihemoglobiinia. Näytteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa +4 asteessa ja niiden annettiin lämmitä huoneenlämpöön ennen analysointia. Näytteistä analysoitiin saman päivän aikana HbA1c -pitoisuu-

det sekä kromatografisella Variant™ II Turbo -analysaattorilla että immunologisella Cobas c513 -analysaattorilla. Hb -Vaasa -varianttia sisältävät näytteet analysoitiin myös immunologista menetelmää käyttävällä DCA Vantage® -analysaattorilla.

Laitevertailu Tampereen kanssa tehtiin siten, että Tampereella kerättiin kymmenen eritasoista näytettä. Nämä näytteet jaettiin kahteen putkeen, joista toiset putket lähetettiin Jyväskylään seuraavan aamun kuljetuksessa. Sitten näytteet analysoitiin sekä Tampereella että Jyväskylässä kuljetuspäivänä kello 12 jälkeen. Näin menetellen näytteet tulivat analysoiduksi yhtä pitkän säilytysajan jälkeen ja tulokset olivat keskenään vertailukelpoisia. Tämä laitevertailu tehtiin 3.4.2019.

5.2 Verifiointin toteuttaminen

Jyväskylän keskussairaalan laboratoriossa verifiointi tehtiin potilasnäytevertailulla. Potilasnäytevertailu tehtiin laitteen suljetun puolen pipetointia käyttäen rutiinijotilassa. Tämä tarkoittaa sitä, että kumpaakaan analysaattoria ei ole varta vasten kalibroitu Cobas c513:n verifiointin takia. Potilasnäytevertailulla nähdään vanhan ja uuden menetelmän välinen tasoero. Eri menetelmien tasoeroista voidaan tarvittaessa informoida asiakkaita. Kemian automaatiouudistuksessa HbA1c -määritys siirrettiin Variant™ II Turbo -analysaattorilta Cobas c513 -analysaattorille. Variant™ II Turbolla on käytössä kromatografinen HPLC -menetelmä ja Cobas c513 käyttää turbidimetristä inhibiatio-immunomenetelmää (TINIA). Verifiointi toteutettiin 15. - 18.1.2019. Verifiointin toteutuksessa olivat mukana Keski-Suomen keskussairaalan sairaalakemisti, Kristiina Kainulainen, sekä kemian vastuuhoidajat.

Testattavassa eli verifioitavassa menetelmässä käytettiin Cobas c513 (Roche Diagnostics) -analysaattorille reagenssina Tina-quant Hemoglobiin A1cDx gen3, Roche Diagnostics, ref. 07559674190, 500 testiä. Hemolysointiliuoksena käytettiin A1CD (Hemolyzing reagent), Roche Diagnostics, ref. 07224648190. Lisäksi kalibraattorina käytettiin Calibrator f.a.s. HbA1c, Roche Diagnostics, ref. 04528417190.

Vertailu- eli referenssimenetelmässä käytettiin Variant™ II Turbo (Biorad) -analysointilaitteelle kaupallista kittiä: VARIANT II Turbo Hemoglobiin HbA1c kit 2.0, 2500 määritystä, ref. 270-2455EX, Biorad. Kalibraattorina käytettiin Calibrator/Diluent Set, Level 1 ja 2, 2 x 7 ml molempia. Kalibraattori sisältyy reagenssipakkaukseen. Vertailu- eli referenssimenetelmän Hb -Vaasa -variantin sisältäville näytteille käytettiin Siemens DCA System Hemoglobiin A1c, ref. 10698915, Siemens, kaupallista kittiä, joka soveltuu Siemens DCA Vantage Analyzer -laitteelle.

Lisäksi määritettiin sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus. Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus ovat tärkeitä, koska niistä saadaan tietoja arvioitaessa menetelmän suorituskykyä omassa laboratorioissa vallitsevissa olosuhteissa. Cobas c513 -analysointilaitteen menetelmä oli jo verifioitu Tampereen keskuslaboratoriossa aiemmin, joten Jyväskylässä ei tutkittu uudelleen mm. matalan hemoglobiinipitoisuuden ja mittausalueen alittavan HbA1c -pitoisuuden vaikutusta eikä näytteen sekoituksen merkitystä. Myöskään lineaarisuuksia, kvantitointirajoja, siirtymävirheitä ym. valmistajan määrittämiä asioita ei tässä verifiointissa tutkittu. Valmistaja on hakenut tuotteelle IVD -direktiivin mukaisen CE-merkinnän ja se kattaa nämä asiat.

Cobas c513 -analysointilaitteen käytettävyyden on hyvin samankaltaista kuin muilla Cobas-sarjan laitteilla, ja tällöin analysointilaitteen ja cITM-tietojärjestelmän, joka on analysointilaitteen ja varsinaisen laboratoriotietojärjestelmän välinen järjestelmä, perehdyttämiseen peruskäyttäjälle riittää yksi työpäivä. Cobas c513 -analysointilaitteilla HbA1c -näytteiden analysointi on selvästi nopeampaa kuin Variant II™ Turbo- analysointilaitteilla, jotka käyttävät kromatografista menetelmää. Lisäksi Cobas c513 -analysointilaitteen näyteneula ottaa näytteen putken pohjalta, jolloin näytteen, jossa on matala hemoglobiinitaso, analysointi helpottuu. Tällä tavalla saadaan riittävästi punasoluja määrittämiseen. Näytettä voidaan myös seisottaa jonkin aikaa punasolujen konsentroimiseksi putken pohjalle ja analysoida näyte uudelleen seisotuksen jälkeen, mikäli näytteessä on matala hemoglobiini ja vain vähän punasoluja.

Tietojärjestelmien testaus tehtiin siten, että tulosten siirtyminen cITm -väliohtelmaan ja Multilab-laboratoriotietojärjestelmään tarkistettiin HbA1c -pyynnöllä, joka tehtiin testipotilaalle. Vastaus siirtyi oikein cITm -väliohtelmaan ja Multilab-laboratoriojärjestelmään. Samalla tarkistettiin, että kontrollitulokset siirtyivät cITm:lle oikein.

5.3 Aineiston analysointi

Aineiston analysoinnista ja varsinaisesta tulkinnasta vastasi verifiointin vastuuhenkilö, sairaalakemisti Kristiina Kainulainen. Tätä opinnäytetyötä varten tulokset on analysoitu käyttäen SPSS -tilasto-ohjelmaa.

5.3.1 Yhteyksien tarkastelu korrelaation ja regressioanalyysin avulla

Tutkimusongelmiin vastaamiseksi etsittiin yhteyksiä 1) Cobas c513:n tulosten ja Variant II™ Turbon tulosten välillä sekä 2) Jyväskylän Cobas c513:n että Tampereen Cobas c513:n välillä korrelaatioita tarkastelemalla. Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden muuttujan välistä tilastollista riippuvuutta ja sillä mitataan muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta. Riippuvuutta voidaan kuvata kuvioiden sekä korrelaatiokertoimien (r) avulla. (Heikkilä, 2014, 90, 193.) Ennen korrelaatiokertoimien laskemista tehtiin kyseisten muuttujien hajontakuviot, joista nähtiin heti muuttujien välinen lineaarisuus. Korrelaatiokerrotimeksi (r) käytettiin Pearsonin korrelaatiokerrointa, joka lasketaan kaavalla:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} = \frac{s_{xy}}{s_x s_y},$$

jossa (x_i, y_i) ovat jakauman muodostavat lukuparit ja s_x sekä s_y ovat muuttujien x ja y keskihajonnat (Heikkilä 2014, 90). Tämän korrelaatiokertoimen arvo on aina välillä -1 ja +1. Jos korrelaatiokerroin saa arvon nolla, ei tutkittavien muuttujien välillä ole lainkaan lineaarista riippuvuutta. (Heikkilä 2014, 90-91.) Mikäli korre-

laatiokertoimen arvo on lähellä ykköstä, on muuttujien välillä voimakas positiivinen korrelaatio. Jos taas korrelaatiokertoimen arvo on lähellä lukua -1, niin muuttujien välillä on voimakas negatiivinen korrelaatio. (Holopainen & Pulkkinen 1994, 163.)

Yleensä korrelaatiokertoimen tilastollinen merkitsevyys testataan, jotta sitä ei pidettäisi satunnaisista syistä johtuvana. Testin nollahypoteesina oletetaan, että Pearsonin korrelaatiokerroin on nolla. Tämä vastaisi tilannetta, jossa muuttujat ovat lineaarisesti riippumattomia toisistaan. (Holopainen & Pulkkinen 1994, 161.) Riski- eli merkitsevyytaso (significance) ilmoittaa siitä riskistä, että tuloksissa saatu ero tai riippuvuus johtuisi sattumasta. Riskitasosta käytetään lyhennettä p (probability) tai SPSS-tilasto-ohjelmassa myös sig. Riskitaso mittaa todennäköisyyttä tehdä virheellinen johtopäätös, kun nollahypoteesi hylätään. (Heikkilä 2014, 184.) Tässä opinnäytetyössä käytettynä merkitsevyytasona on viiden prosentin merkitsevyytaso, mikä tarkoittaa, että rajana on käytetty merkitsevyyssarvoa 0.05. SPSS-tilasto-ohjelma tulostaa automaattisesti korrelaatiokertoimen testauksen yhteydessä havaitun merkitsevyytason (Heikkilä 2014, 184).

Kun korrelaatiokerrointa vastaava p :n arvo alittaa käytetyn merkitsevyytason 0.05, korrelaation katsotaan olevan tilastollisesti merkitsevä. P -arvon ollessa suurempi kuin valittu merkitsevyytaso, ei riippuvuutta voi todeta olevan. Tällöin korrelaatiokertoimen nollasta poikkeavuus tulkitaan johtuvaksi sattumasta. (Heikkilä 2014, 195).

Testattu ero tai riippuvuus on silloin tilastollisesti erittäin merkitsevä, jos p -arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin 0.001 ($p \leq 0.001$). Tilastollisesti merkitsevä riippuvuus on silloin, kun p -arvo on suurempi kuin 0,001 tai pienempi tai yhtä suuri kuin 0.01 ($0.001 < p \leq 0.01$). Tilastollisesti melkein merkitsevänä eroa tai riippuvuutta pidetään silloin, kun p -arvo on suurempi kuin 0.01 ja pienempi tai yhtä suuri kuin 0.05 ($0.01 < p \leq 0.05$). Jos p -arvo jää 0.05:n ja 0.1:n välille ($0.05 < p \leq 0.1$), on testattu riippuvuus tilastollisesti suuntaa antava. (Heikkilä 2014, 185.)

Mikäli korrelaatio havaitaan, voidaan suorittaa regressioanalyysi (Holopainen & Pulkkinen 1994, 173). Kun korrelaatiokertoimet laskettiin, huomattiin 1) Cobas

c513:n tulosten ja Variant II™ Turbon tulosten välillä sekä 2) Jyväskylän Cobas c513:n että Tampereen Cobas c513:n välillä kaikissa voimakas positiivinen korrelaatio. Täten voitiin suorittaa regressioanalyysit.

Regressioanalyysillä pyritään löytämään muuttujien välillä mahdollisesti vallitseva yhteys ja kuvaamaan sitä matemaattisesti. Mikäli muuttujia on vain kaksi, toista muuttujaa sanotaan selittäväksi (regressor) muuttujaksi (y) ja toista selitettäväksi (regressand) muuttujaksi (x). (Holopainen & Pulkkinen 1994, 173.) Tässä opinnäytetyössä tutkimuskysymyksen yksi selittävä muuttujana on Cobas c513 -analysointilaitteisto ja selitettävä muuttujana Variant II™ Turbo -analysointilaitteisto. Toisen tutkimuskysymyksen kohdalla selitettävänä muuttujan on Tampereen Cobas c513.

Regressiosuoran yhtälö on

$$y = bx + a,$$

missä **b** on selittävä muuttujan kerroin ja **a** on vakio, joka ilmoittaa pisteen, jossa suora leikkaa y-akselin. Regressiokerroin (kulmakerroin) **b** ilmaisee, mihin suuntaan y:n arvo muuttuu ja kuinka paljon, kun x kasvaa yhden yksikön verran. (Heikkilä 2014, 92, 223; Holopainen & Pulkkinen 1994, 174). Suoran $y = bx + a$ kulmakerroin **b** ja vakio **a** saadaan kaavoilla:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \text{ja} \quad a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x}.$$

R^2 on korrelaation selitysaste eli selityskerroin ja se ilmoittaa, kuinka suuren osan selittävä muuttuja (x) selittää selitettävän muuttujan (y) vaihteluista. Selitysasteen saamiseksi korrelaatiokerroin (r) korotetaan toiseen potenssiin. Usein korrelaation selitysaste (R^2) ilmoitetaan prosentteina. (Heikkilä 2014, 193.)

5.3.2 Erojen tarkastelua

Seuraavaksi tarkasteltiin eroja 1) Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon tulosten välillä sekä 2) Jyväskylän Cobas c513:n ja Tampereen Cobas c513:n tulosten välillä. Kun kahta menetelmää verrataan, niin muuttujien mittausten välillä ilmenee aina jonkin verran poikkeavuutta. Monet tutkimukset luottavat korrelaatioker-toimeen (r) osoittaakseen kahden eri mittausmenetelmän välisten tulosten suhdetta tai riippuvuutta. Koska korrelaatio tutkii vähintään kahden muuttujan välistä suhdetta tai riippuvuutta eikä niiden välisiä eroja, sitä ei suositella menetelmäksi arvioitaessa muuttujien välistä vertailtavuutta. (Giavarina 2015.)

Kliinisissä laboratorioissa joudutaan hyvin usein arvioimaan kahden kvantitatiivisen mittausmenetelmän välistä yhteneväisyyttä. Joka kerta, kun vaihdetaan jokin mittausmenetelmä toiseksi tai arvioidaan uutta vaihtoehtoista menetelmää, tarvitaan oikeanlaiset tilastolliset analyysit näiden erojen mittaamiseen ja arviointiin sekä syy näille eroille. (Giavarina 2015.) Niinpä tässä opinnäytetyössä menetelmien välisten tulosten prosentuaalistenerojen tarkastelu 1) Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon sekä 2) Tampereen Cobas c513:n ja Jyväskylän Cobas c513:n välillä on ilmaistu seuraavan kaavan mukaan (Liite 1, 2, 3 ja 4):

$$\left[\frac{\text{verifioitava menetelmä} - \text{referenssimenetelmä}}{\text{referenssimenetelmä}} \right] \times 100\%.$$

Referenssimenetelmän ja verifioitavan menetelmän tulosten luvut syötettiin SPSS -tilasto-ohjelmaan, josta Transform- ja Compute Variables- toimintojen kautta voitiin laskea eroprosentit yllä olevan kaavan mukaan. Graphs -toiminnon kautta saatiin eroprosenttien hajontakuviot, kun y-akselin muuttujaksi laitettiin laskutoiminnolla saatu eroprosentti ja x -akselin muuttujaksi referenssimenetelmä.

5.3.3 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus

Sarjan sisäinen toistettavuus määritettiin 20 kertaa aikuisten normaalialueella 20 - 42 mmol/mol olevalla potilasnäytteellä, jonka pitoisuus oli 35 mmol/mol:ssa ja aikuisten kohonneella, diabeettisella, tasolla olevalla potilasnäytteellä, jonka pitoisuus oli 70 mmol/mol:ssa. Määritykset tehtiin sekä analysaattorin suljetun puolen että avoimen puolen pipetointia käyttäen.

Sarjojen välinen toistettavuus laskettiin rutiinimääritysten yhteydessä kontrollituksista Precicontrol HbA1c norm (Roche Diagnostics, ref. 05479207190) ja Precicontrol HbA1c path (Roche Diagnostics, ref. 05912504190) aikavälillä 1.2. - 28.2.2019. Sarjojen välisiä toistettavuuksia kontrolleilla ajettiin yhteensä 37 kertaa.

Sarjojen sisäistä ja sarjojen välistä toistettavuutta laskettaessa tarvitaan keskihajontaa ja variaatiokerrointa. Keskihajonta (standard deviation) on eniten käytetty ja tärkein hajonnan mitta eli standardipoikkeama. Se kuvaa arvojen hajallaan oloa keskiarvon ympärillä. (Heikkilä 2014, 86). Keskihajonta lasketaan kaavalla:

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

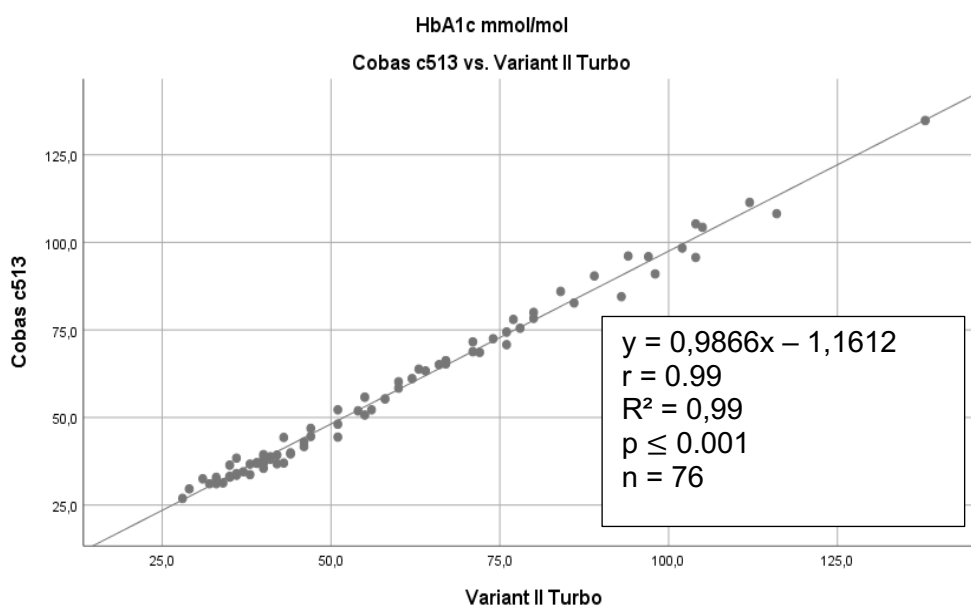
Variaatiokerroin lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon välisenä suhtena ja usein se ilmoitetaan prosentteina. Variaatiokertoimen avulla saadaan vertailukelpoisiksi eri suuruusluokkaa olevien muuttujien arvojen hajonnat. (Heikkilä 2014, 87). Variaatiokerroin lasketaan seuraavasti:

$$V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

6 TULOKSET

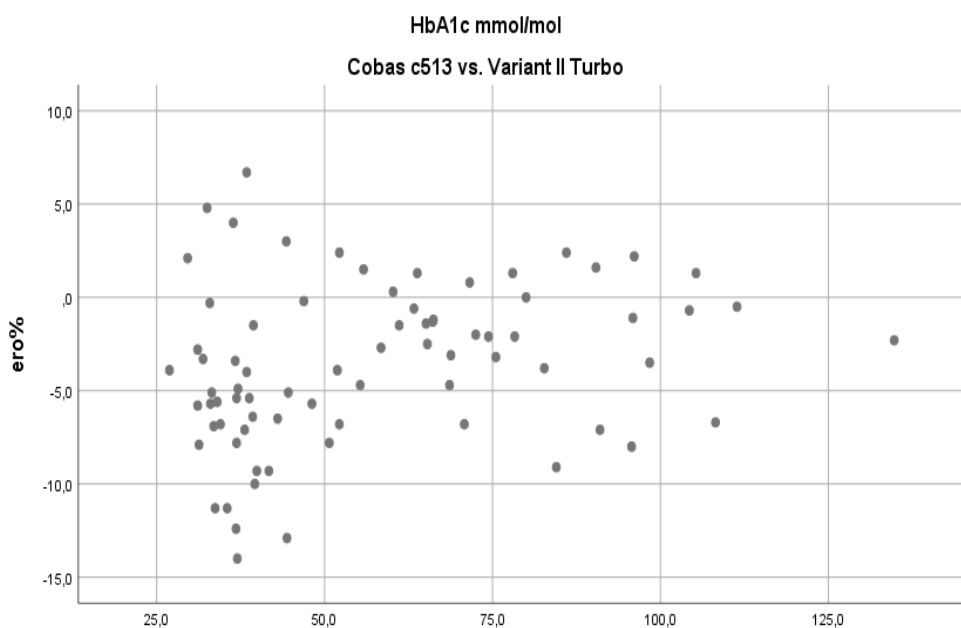
6.1 Cobas c513 ja Variant™ II Turbo

Tässä opinnäytetyössä havaittiin heti tulosten ja hajontakuvioiden perusteella muuttujien välillä selvää lineaarista riippuvuutta. Kuviossa 5 esitetään HbA1c -tulokset (mmol/mol) potilasnäytteistä (n= 76, Liite 1) mahdollisimman laajalta mitausalueelta. Nämä potilasnäytteet eivät sisällä häiriötekijöitä. Regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y = 0,9866x - 1,1612$ ja suoran korrelaatiokertoimeksi (r) tuli $0.995 \approx 0.99$, mikä ilmaisee voimakasta, positiivista korrelaatiota. Merkitsevyystaso tälle korrelaatiolle on $p \leq 0.001$, mikä on tilastollisesti erittäin merkitsevää. Cobas c513:n ja Variant™ II turbon välillä on täten todistettavasti lineaarista riippuvuutta. Selityskertoimeksi R^2 tulee $0,991 \approx 0,99 = 99\%$: a. Mikä tarkoittaa, että Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon välillä vallitsee yhtenevä tulostaso.



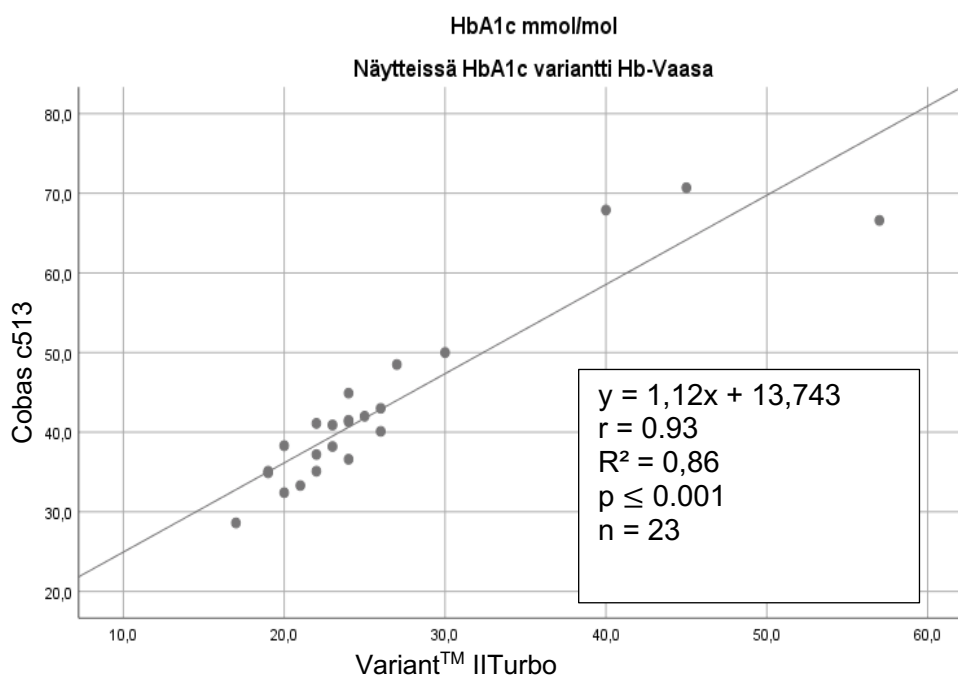
KUVIO 5. Regressiosuora ja suoranyhtälö sekä korrelaatio- että selityskerroin ja merkitsevyystaso 76 potilasnäytteelle Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon HbA1c -tulosten välillä.

Kuviossa 6 esitetään Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon HbA1c -tulosten välisiä eroja potilasnäytteillä (n= 76). Nämä näytteet ovat mahdollisimman laajalta mitausalueelta eivätkä sisällä häiriötekijöitä. Verifioitava menetelmä, Cobas c513, antaa noin kolme prosenttia matalampaa tulostasoa (Liite 1(2)) kuin referenssimenetelmä, Variant™ II Turbo. Ero ei ole kliinisesti merkittävä.



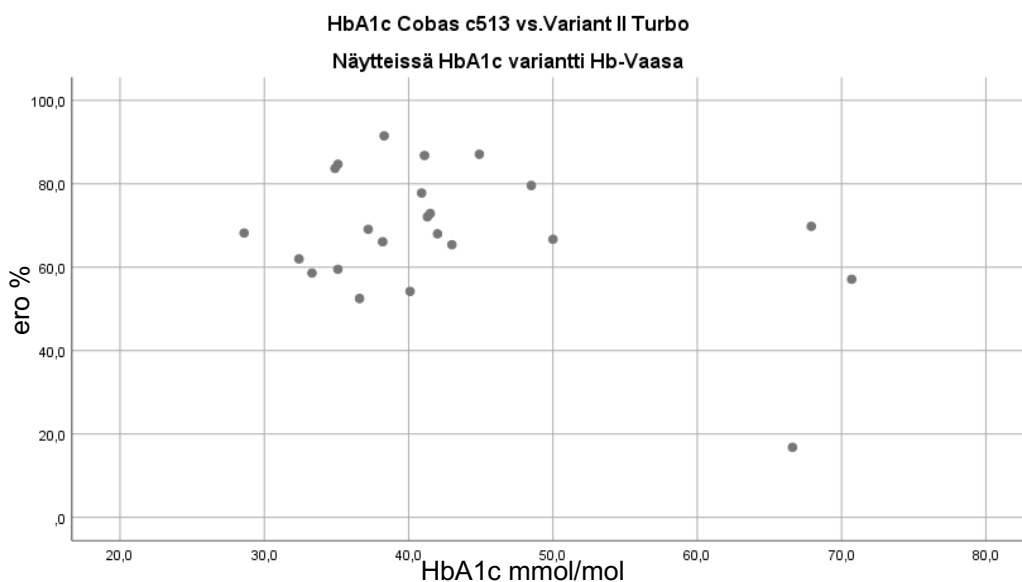
KUVIO 6. Eroprosentit Cobas c513:n ja Variant II™ Turbon HbA1c -tulosten välillä.

Kuviossa 7 esitetään HbA1c -tulokset (mmol/mol) potilasnäytteistä (n=23, Liite 2(1)), jotka sisälsivät Hb-Vaasa-variantin. Regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y = 1,12x + 13,743$ ja suoran korrelaatiokertoimeksi (r) tulee 0.93, mikä tarkoittaa voimakasta, positiivista korrelaatio. Menetelmien välinen korrelaatio on hyvä. Merkitsevyytasoksi muodostuu $p \leq 0.001$ eli kyseessä on tilastollisesti erittäin merkitsevä korrelaatio. Selityskertoimeksi R^2 saadaan $0.86 = 86\%$: a. Käytännössä tämä tarkoittaisi sitä, että 86%:a referenssimenetelmän tuloksista olisi selitettävissä verifioitavan menetelmän tuloksilla. Eli tulostaso on korrelaatioon nähden hyvä Variant™ II Turbon ja Cobas c513:n välillä, kun näytteissä on Hb-Vaasa-variantti, vaikka Variant™ II Turbo antaa matalampia tuloksia (Liite 2(1)) kuin Cobas c513.



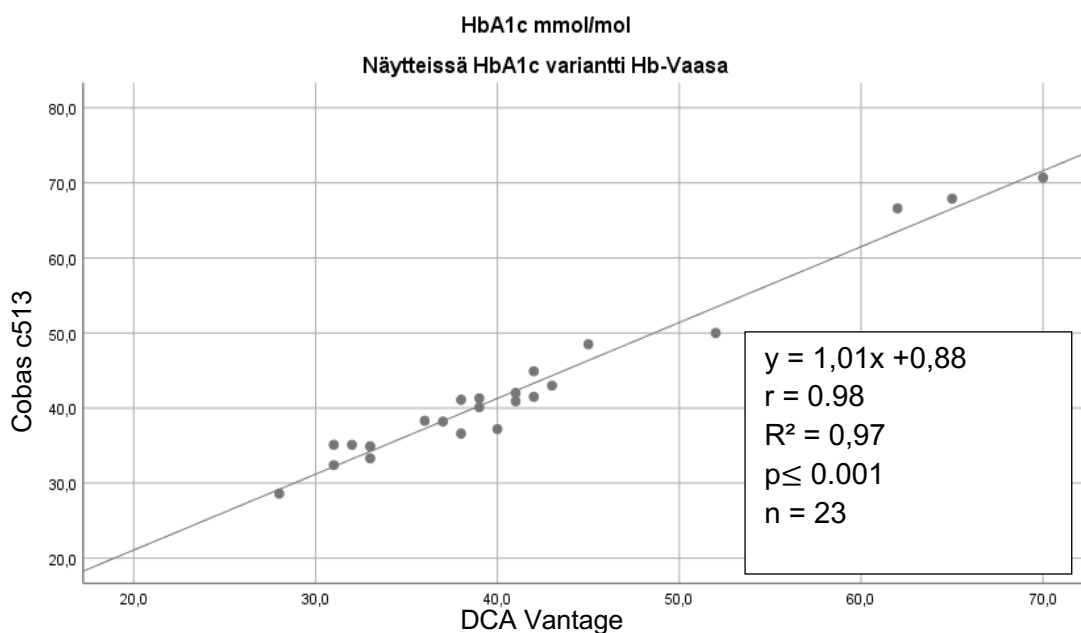
KUVIO 7. Regressiosuora ja suoranyhtälö sekä korrelaatio- että selityskerroin ja merkitsevyytaso 23 potilasnäytteelle, jotka sisälsivät Hb -Vaasa -variantin.

Kuviossa 8 esitetään eroja Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon Hba1c -tulosten välillä, näytteillä, jotka sisältävät Hb -Vaasa-variantin. Hb -Vaasa -varianttia sisältävistä potilasnäytteistä saadaan noin 65%:a korkeampaa tulostasoa verifioitavalla menetelmällä (Liite 2(1)) verrattuna referenssimenetelmään, jota Hb-Vaasa-variantti häiritsee.



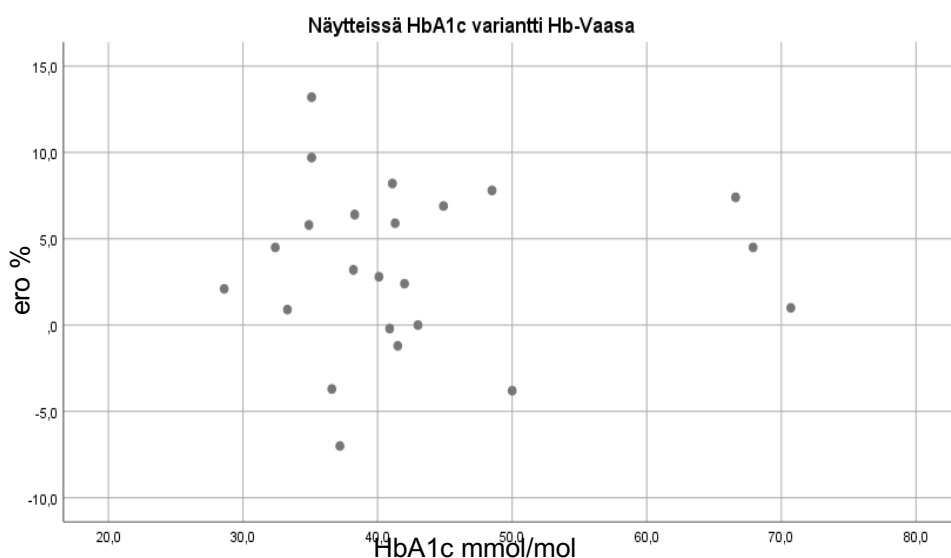
KUVIO 8. Eroprosentit Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon HbA1c -tulosten välillä näytteille, jotka sisälsivät Hb-Vaasa -variantin.

Koska Hb -Vaasa -variantti häiritsee kromatografista menetelmää, on Hb-Vaasa-varianttia sisältävät potilasnäytteet analysoitu immunologisella menetelmällä, missä analysaattorina on käytetty DCA Vantage® -laitetta ja potilastuloksena on vastattu immunologisella menetelmällä saatu tulos (Liite 2(2)). Tässä verifiointissa verrattiin myös Hb-Vaasa -varianttia sisältävistä näytteistä DCA Vantage® -laitteella saatuja tuloksia Cobas c513 -analysaattorilla Tina-quant -menetelmällä saatuihin tuloksiin. Kuviossa 9 esitetään 23:n potilasnäytteen, jotka sisältävät Hb-Vaasa-variantin, regressiosuoranyhtälö $y = 1,01x + 0,88$ ja korrelaatiokerroin (r) 0,98. Merkitsevyydestä saatiin $p \leq 0.001$ eli tilastollisesti erittäin merkitsevä korrelaatio. Selitysasteeksi saadaan $0,97 = 97\%$:a, mikä tarkoittaisi, että 97 %:a DCA Vantage® -laitteella saaduista tuloksista olisi selitettävissä verifioitavan menetelmän tuloksilla. Tulokset olivat yhtenevät eikä menetelmien välillä ole kliinisesti merkittävää tulostaseroa.



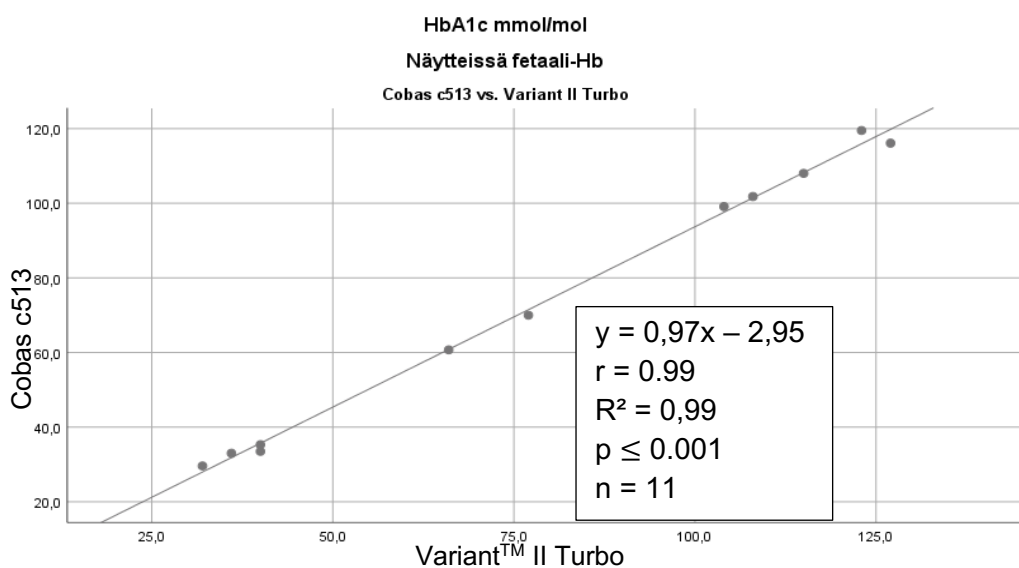
KUVIO 9. Regressiosuora ja suoranyhtälö sekä korrelaatio- että selityskerroin ja merkitsevyydestä 23 potilasnäytteelle, jotka sisälsivät Hb -Vaasa -variantin. Näytteet on analysoitu DCA Vantage® -laitteella ja Cobas c513:lla.

Kun eroprosentteja tarkasteltiin 23:n potilasnäytteen osalta (Kuvio 10), mitkä on analysoitu sekä DCA Vantage® -laitteella että Cobas c513 -analysointilaitteella, ja sisälsivät Hb-Vaasa-variantin, saatiin eroprosentiksi noin kolme prosenttia (Liite 2(2)). Verifioitava menetelmä antaa siis noin kolme prosenttia korkeampaa tulostasoa kuin vastaava immunokemiallinen menetelmä DCA Vantage® -laitteella. Eroprosenttejakin tarkasteltaessa tulostaso on yhtenevä eikä menetelmien välillä ole kliinisesti merkittävää tulostasoeroa.



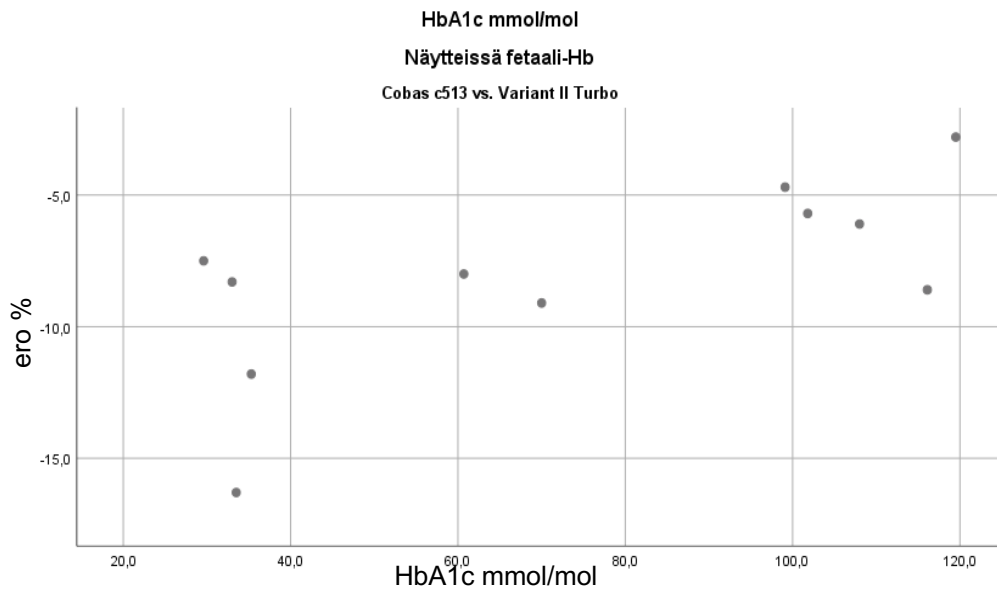
KUVIO 10. Eroprosentit 23 potilasnäytteelle, jotka sisälsivät Hb-Vaasa -variantin. Näytteet analysoitu DCA Vantage® -laitteella ja Cobas c513:lla.

Kuviossa 11 esitetään suoranyhtälö ja regressiosuora potilasnäytteille (n = 11, Liite 3), jotka sisälsivät fetaalihemoglobiinia. Suoranyhtälöksi saatiin $y = 0,97x - 2,95$ ja korrelaatiokertoimeksi (r) tuli 0.99 ja merkitsevyysarvoksi saatiin $p \leq 0.001$ eli tilastollisesti erittäin merkitsevä korrelaatio. Selitysastekin (R^2) oli korkea. Sen mukaan 99 %:a Variant™ II Turbolla saaduista tuloksista olisi selitettävissä verifioitavan menetelmän tuloksilla näytteille, jotka sisältävät fetaalihemoglobiinia. Tässäkin tulokset ovat yhtenevät, eikä menetelmien välillä ole kliinisesti merkittävää tulostaseroa.



KUVIO 11. Regressiosuora ja suoranyhtälö sekä korrelaatio- että selityskerroin ja merkitsevyystaso 11 potilasnäytteelle, jotka sisälsivät fetaalihemoglobiinia.

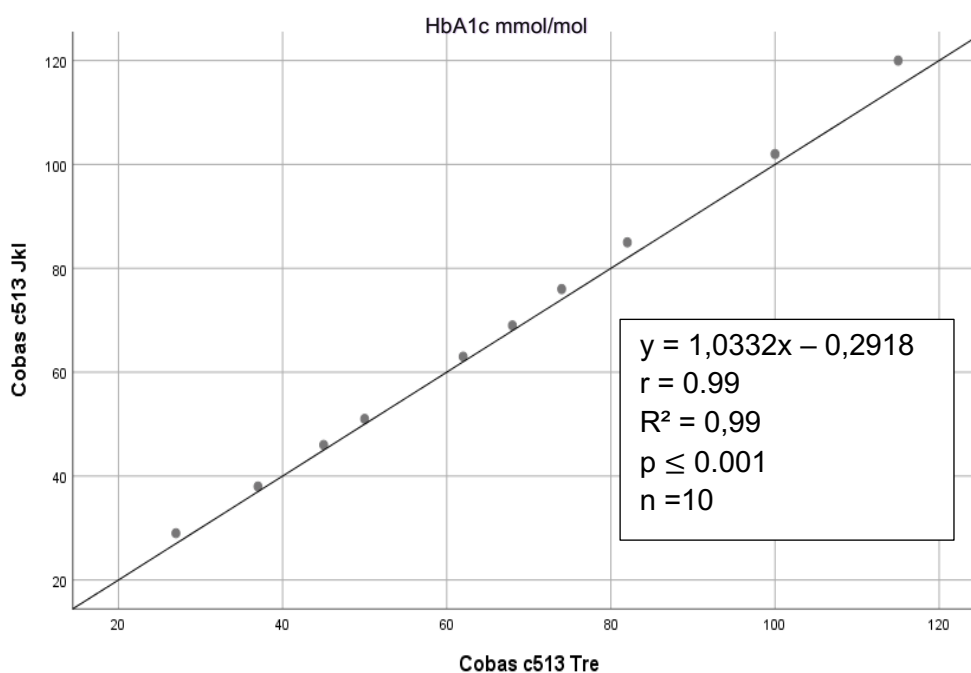
Näytteille, jotka sisälsivät fetaalihemoglobiinia saatiin verifioitavalla menetelmällä noin seitsemän prosenttia matalampaa tulostasoa (Liite 3) kuin referenssimenetelmällä (Kuvio 12). Ero ei ole kuitenkaan kliinisesti merkittävä.



KUVIO 12. Eroprosentit 11 potilasnäytteelle, jotka sisälsivät fetaalihemoglobiinia.

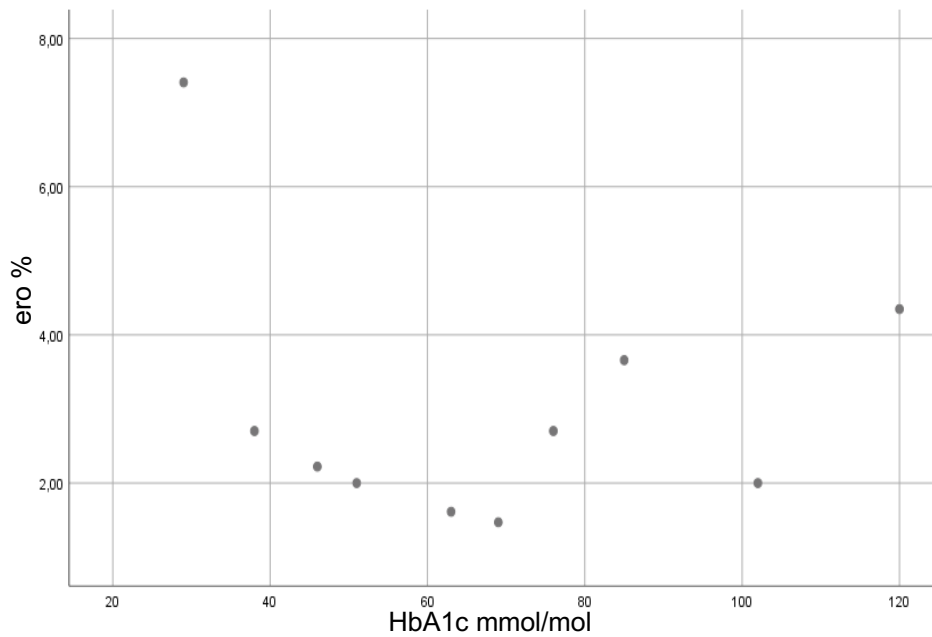
6.2 Tampereen ja Jyväskylän Cobas c513 -analysaattorit

Kuvio 13 esittää Master -laitteen, Tampereen Cobas c513:n, ja Jyväskylän Cobas c513:n välisten tulosten vertailtavuutta. Cobas c513 -analysaattoreita verrattiin toisiinsa kymmenellä potilasnäytteellä (Liite 4). Regressiosuoran yhtälöksi saatiin $y = 1,0332x - 0,2918$. Korrelaatiokerroin oli 0.99 eli kyseessä on varsin voimakas positiivinen korrelaatio. Korrelaation merkitsevyysarvoksi tuli $p \leq 0.001$, mikä viittaa tilastollisesti erittäin merkitsevään korrelaatioon. Näin ollen selityssasteen mukaan 99 %:a Tampereen Master -laitteen tuloksista olisi selitettävissä Jyväskylän Cobas c513:n tuloksilla. Tulokset ovat siten yhtenevät, eikä näiden kahden Cobas c513- analysaattorin välillä ole kliinisesti merkittävää tulostaseroa.



KUVIO 13. Regressiosuora ja suoranyhtälö sekä merkitsevyysarvo, korrelaatiokerroin ja selityssaste kymmenelle potilasnäytteelle, jotka on määritetty Tampereen Cobas c513 -analysaattorilla ja Jyväskylän Cobas c513 -analysaattorilla.

Eroprosentiksi Tampereen Cobas c513:n ja Jyväskylän Cobas c513:n tulosten välillä (kuvio 14) saatiin noin kolme prosenttia. Jyväskylän Cobas c513 antoi hieman korkeampaa tulostasoa (Liite 4) kuin Tampereen Cobas c513. Ero ei ole kliinisesti merkittävä, vaan tulostaso on laitevertailussa Tampereen ja Jyväskylän välillä yhtenevä.



KUVIO 14. Eroprosentit kymmenelle potilasnäytteelle, jotka on analysoitu sekä Tampereen Cobas c513 -analysaattorilla että Jyväskylän Cobas c513 -analysaattorilla.

6.3 Sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus

Sarjan sisäiset toistettavuudet (Liite 5) olivat suljetulla puolella 0,6%:a tasolla 35 mmol/mol:ssa ja 0,7%:a tasolla 70 mmol/mol:ssa (Taulukko 2). Avoimella puolella toistettavuus oli 0,5 %:a tasolla 35mmol/mol:ssa ja 0,6%:a tasolla 70 mmol/mol:ssa (Taulukko 3).

TAULUKKO 2. HbA1c- menetelmän sarjan sisäinen toistettavuus potilasnäytteillä Cobas c513 -analysointilaitteen suljetulla puolella.

Kontrolli	Laite	n	keskiarvo	SD	CV %	Valmistajan ilmoittama CV %
Potilasnäyte 35 mmol/mol normaali taso	Cobas c513	20	34.94	0.22	0.62	0,7
Potilasnäyte 70mmol/mol kohonnut taso	Cobas c513	20	69.38	0.49	0.71	0,5

TAULUKKO 3. HbA1c- menetelmän sarjan sisäinen toistettavuus potilasnäytteillä Cobas c513 -analysointilaitteen avoimella puolella.

Kontrolli	Laite	n	keskiarvo	SD	CV %	Valmistajan ilmoittama CV %
Potilasnäyte 35 mmol/mol normaali taso	Cobas c513	20	34,85	0.19	0.54	0,7
Potilasnäyte 70 mmol/mol kohonnut taso	Cobas c513	20	69.69	0.44	0.62	0,5

Sarjojen väliset toistettavuudet (Taulukko 4, Liite 6) olivat suljetulla puolella 1,8%:a (Precicontrol HbA1c norm) ja 0,9%:a (Precicontrol HbA1c path). Avoin puolella toistettavuudet olivat 1,9%:a (Precicontrol HbA1c norm) ja 1,2%:a (Precicontrol HbA1c path).

TAULUKKO 4. HbA1c -menetelmän sarjojen välinen toistettavuus Cobas c513-analysaattorilla.

Kontrolli	Laite	n	keskiarvo	SD	CV %	Valmistajan ilmoittama CV %
Precicontrol HbA1c norm. tavoite arvo 38.300	Cobas c513 avoin puoli	37	38.797	0.749	1.929	0.8
Precicontrol HbA1c norm. tavoite arvo 38.300	Cobas c513 suljettu puoli	37	38.346	0.684	1.784	0.8
Precicontrol HbA1c path. tavoite arvo 87.500	Cobas c513 avoin puoli	37	91.081	1.112	1.221	0.9
Precicontrol HbA1c path. tavoite arvo 87.500	Cobas c513 suljettu puoli	37	91.276	0.834	0.914	0.9

7 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

7.1 Tulosten tarkastelu

Potilasnäytevertailu ja tulostasoon tarkastelu toteutettiin analysoimalla potilasnäytteitä molemmilla analysaattoreilla. Cobas c513:n tuloksia verrattiin Variant™ II Turbolla saatuihin tuloksiin. Mittaustulosten välinen korrelaatio (r) oli 0,99 ja $p \leq 0.001$ niiden potilasnäytteiden ($n=76$) kohdalla, jotka eivät sisältäneet häiriötekijöitä ja selitysaste oli (R^2) 0,99. Näiden tulosten välillä on voimakas, tilastollisesti merkitsevä positiivinen korrelaatio. Regressiosuorankuvaaja sekä yhtälö osoittavat menetelmien ja tulosten välistä yhtenevyyttä. Tulostasokeroksi menetelmien välille saadaan noin kolme prosenttia, sillä Cobas c513 -analysaattori antaa hieman matalampia tuloksia kuin Variant™ II Turbo, mutta ero ei ole kliinisesti merkittävä.

Kun potilasnäytteitä ($n=23$), jotka sisälsivät Hb-Vaasa -variantin, analysoitiin ja verrattiin Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon välillä, niin tässäkin saatiin voimakkaasti positiivinen korrelaatio (r) 0,93 ja $p \leq 0.001$. Korrelaatio oli korkea Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon välillä siitäkin huolimatta, että tulostasokeroksi näiden menetelmien välille tuli 65%: a. Variant™ II Turbo antoi selvästi matalampia tuloksia kromatografisella menetelmällä kuin Cobas c513:n immunokemiallinen menetelmä. Hb-Vaasa -variantin häiritsevyys kromatografisessa menetelmässä perustuukin sen eluoitumiseen kromatografipylväessä yhdessä HbA1c:n kanssa. 65%:n ero menetelmien välillä on kliinisesti merkittävä ja Variant™ II Turbolla tehdyt potilasnäytteet, jotka sisältävät Hb-Vaasa -variantin, on pitänyt analysoida sitä vastaavalla immunokemiallisella menetelmällä. Nämä samat 23 Hb-Vaasa -variantin sisältävää potilasnäytettä määritettiin DCA Vatantage® -laitteella ja sen sekä Cobas c513:n välille muodostui myös voimakas, positiivinen korrelaatio (r) 0,98 ja $p \leq 0.001$. Tulostasoon tarkastelussa huomattiin, että verifioitava menetelmä antoi kolme prosenttia korkeampaa tulostasoa, mikä ei ole kliinisesti merkittävä ero.

Cobas c513:n ja Variant™ II Turbon välillä tarkasteltiin vielä potilasnäytteitä (n=11), jotka sisälsivät fetaalihemoglobiinia. Korrelaatiokertoimeksi (r) saatiin 0.99 ja merkitsevyysarvoksi $p \leq 0.001$. Kromatografisen ja immunokemiallisen menetelmän välillä oli jälleen voimakas, positiivinen korrelaatio tulostason ollessa yhtenevä. Tulostasoeroja tarkasteltaessa, eroksi muodostui seitsemän prosenttia verifioitavan menetelmän antaessa matalampaa tulostasoja. Seitsemän prosentin ero ei ole kuitenkaan kliinisesti merkittävää.

Sarjan sisäinen toistettavuus laskettiin kahden potilasnäytteen, normaalin ja korkean tason, rinnakkaismääritysten perusteella verifioitavan analysaattorin avoimella ja suljetulla puolella. Variaatioprosentiksi saatiin normaalin tason suljetulla puolella 0.62%:a ja normaalin tason avoimella puolella 0.54%: a. Näin ollen toistettavuudet olivat parempia suljetulla puolella normaalille (35 mmol/mol) tasolle, kun vastaava valmistajan ilmoittama normaalitaso oli 0,7%: a. Variaatioprosentit olivat kohonneen tason suljetulla puolella 0.71%:a ja avoimella puolella 0,62%. Kohonneen tason (70 mmol/mol) toistettavuudet olivat parempia puolestaan avoimella, kun vastaava valmistajan ilmoittama luku oli 0,5%. Sarjojen sisäiset toistettavuudet vastaavat valmistajan vastaavilla pitoisuuksilla määritettyjä lukuja, vaikka primäärituloksissa (Liite 5) onkin nähtävissä suljetun puolen kohonneen tason toistettavuuksissa hieman matalampaa tulostasoja.

Sarjojen välinen toistettavuus määritettiin mittaamalla korkean ja normaalin tason kontrolleja sekä analysaattorin avoimella että suljetulla puolella. Korkean tason kontrollitulosten variaatioprosentiksi saatiin Cobas c513 -analysaattorilla avoimella puolella 1,2%:a ja suljetulla puolella 0,9%: a. Normaalin tason kontrollien variaatioprosentit olivat avoimella puolella 1,9%:a ja suljetulla puolella 1,8 %:a. Valmistajan ilmoittamat sarjojen väliset toistettavuudet samoilla kontrolleilla ovat 0,8%:a normaalitasolla ja 0,9%:a korkealla tasolla Tässä verifiointissa määritetyt toistettavuudet vastaavat riittävän hyvin valmistajan ilmoittamia lukuja, vaikka toistettavuudet hieman poikkesivatkin valmistajan ilmoittamista luvuista lukuun ottamatta korkean tason suljetun puolen toistettavuutta, joka vastaa täysin valmistajan antamaan arvoon.

Lisäksi tehtiin laitevertailu kahden samanlaisen Cobas c513 -analysaattorin välillä. Toinen laitevertailuun osallistunut Cobas c513-analysaattori sijaitsee Fimlab Laboratoriot Oy:n keskuslaboratoriossa Tampereella. Laitevertailu oli samalla sisäistä laadunvarmistusta. Varmistettiin, että saatiin samaa tasoa olevia tuloksia sekä Tampereella että Jyväskylässä. Kahden samanlaisen Cobas c513 -analysaattorin tulostaso oli hyvin yhtenevä korrelaation ollessa (r) 0,99 ja $p \leq 0.001$. Näytemäärä ($n=10$) oli tosin tähän vertailuun vähäinen, mutta on se ainakin suuntaa antavaa. Kun tarkasteltiin tulostaseroa, Jyväskylässä saatiin kolme prosenttia korkeampia tuloksia, mutta tämä ero ei ole kliinisesti merkittävä.

Tarkastellessani aikaisempia tutkimustuloksia kromatografisen ja immunokemiallisen menetelmän välillä havaitsin, että Desmondin ym. 2017, Jaissonin ym. 2018, Klingerbergin ym. 2017, Lenters-Westra & Englishin 2017, Saés-Beniton ym. 2014 ja Wun ym. 2016 tutkimuksissa käsiteltiin suoraan samoja laitteita ja menetelmiä kuin tässä opinnäytetyössä. Desmondin ym. (2017) työssä tutkittiin karbamyloidun hemoglobiinin ja labiilin a1c:n merkitystä HbA1c:n tuloksiin Variant™ II Turbolla ja DCA vantage®:lla. Karbamyloitunut hemoglobiini ja labiili a1c häiritsevät kromatografista menetelmää Hb-Vaasa -variantin tavoin eluoitumalla kromatografipylväessä yhdessä HbA1c:n kanssa antaen matalampaa tulostasoa. DCA Vantage®:lla analysoituna karbamyloitunut hemoglobiini ja labiili a1c eivät vaikuttaneet HbA1c -tuloksiin. Aivan kuten tässä opinnäytetyössä Hb-Vaasa-varianttia sisältäneet näytteet eivät häirinneet immunokemiallista menetelmää vaan molemmilla immunokemiallisen menetelmän analyysilaitteella Cobas c513:lla ja DCA Vantage®:lla saatiin samaa, yhteneväistä tulostasoa.

Eniten tätä opinnäytetyötä muistutti Jaissonin ym. (2018) tutkimus, jossa arvioitiin Cobas c513 – analysaattoria HbA1c -testien osalta, ja verrattiin tuloksia kahteen HPLC -menetelmään, joista toinen analysaattori oli Variant™ II Turbo. Tämänkin suhteellisen tuoreen tutkimuksen näytteistä ($n=100$) osa sisälsi yleisimpiä hemoglobiinivariantteja, jotka eivät häirinneet Cobas c513:n immunokemiallista menetelmää. Jaisson ym. (2018) toteavatkin, että Cobas c513 -analysaattorilla on luotettava immunokemiallinen menetelmä HbA1c -arvojen mittaamiseen rutiini käytössä kliinisissä kemian laboratorioissa.

Klingerbergin ym. (2017, 458-464) tutkimuksessa verrattiin kahta eri kromatografista menetelmää, joista toinen oli HPLC -menetelmä, ja Roche Cobaxen immunokemiallista (TINIA) menetelmää keskenään. Tämän tutkimuksen HbA1c -potilasnäytteet (n=600) sisälsivät myös joitain harvinaisia hemoglobiinivariantteja. Tutkimus osoitti, että HbA1c -tulokset olivat yhteneviä kromatografisen ja immunokemiallisen menetelmän välillä.

Lenters-Westra & English (2017) tekivät tutkimusta HbA1c:n vertailulaboratoriossa Alankomaissa tarkoituksenaan arvioida Roche kolmannen sukupolven (TINIA) menetelmää kahteen muuhun menetelmään, joista toinen oli HPLC -menetelmä, käyttäen erilaisia laatutavoitteita. Heidän tutkimuksessaan arvioitiin hemoglobiinivarianttien, muiden potentiaalisten häiriöiden ja suorituskyvyn vaikutusta sekä IFCC:n että NGSP:n vertailujärjestelmiin käyttäen sertifioituja arviointimenettelyjä. Roche immunokemiallinen menetelmä läpäisi NGSP:n kriteerit eikä tässä tutkimuksessa havaittu, että häiriötekijöillä olisi ollut kliinisesti merkittävää vaikutusta.

Roche Diagnostics:n kehittämän kolmannen sukupolven immunoturbidimetrisen inhibitiomenetelmään (TINIA) perustuvaa HbA1c -tutkimusta kokoverestä tutkittiin myös espanjalaisten työssä (Saés-Benito ym. 2014). Sata HbA1c -näytettä määritettiin ja tuloksia verrattiin HPLC -menetelmään. Tässä tutkimuksessa immunokemiallinen menetelmä vastasi odotettua suorituskykyä lineaarisuutta lukuun ottamatta, joka oli raportoidun alueen ulkopuolella. Immunokemiallinen menetelmä ei havainnut myöskään fetaalihemoglobiini häiriöitä, jos se tapahtui alhaisemmilla tasoilla kuin oli raportoitu. Yli 7,5%:n tasoilla häiriö huomattiin. Lineaarisuudesta ja fetaalihemoglobiinin häiriöistä huolimatta Saés-Benito ym. (2014) toteavat tutkimuksensa lopuksi, että immunokemiallisen menetelmän ja HPLC -menetelmän välillä oli hyvä, yhtenevä tulostaso ja Roche immunokemiallinen menetelmä täyttää rutiinikäytön laatuvaatimukset.

Tässä opinnäytetyössä en ota kantaa lineaarisuuteen, koska sitä ei testattu. Sitä vastoin fetaalihemoglobiinia sisältäviä näytteitä oli mukana. Yhdestäkään fetaalihemoglobiininäytteestä ei ollut riittävästi aiheuttamaan häiriöitä, koska tulostaso

oli yhtenevä kromatografisen ja immunokemiallisen menetelmän välillä ja tulostaseroakin tuli vain 7%: a. Toisaalta näytemäärä (n=11) tähän vertailuun saattoi olla vähäinen. Joten lisätutkimukset olisivat suotavia.

Wun ym. (2016) tutkimuksessa käytettiin HbA1c -mittausten saamiseksi neljää eri analysaattoria, joista yksi oli Roche Cobas c501. Se kuuluu samaan Cobas c500 -sarjaan kuin Cobas c513, mutta käyttää immunokemiallista toisen sukupolven (TINIA) menetelmää. Wun ym. (2016) tutkimuksessa kaikilla neljällä analysaattorilla saatiin samaa tulostasoa sekä matalilla että korkeilla HbA1c -arvoilla. Lisäksi Wun ym. (2016) tutkimuksessa kohonnut fetaalihemoglobiini sai aikaan vääriä HbA1c -tuloksia kaikilla testatuilla laitteilla, mutta yhteenvetonaan he toteivat, että yleisesti käytetyt HbA1c -määritysmenetelmät osoittivat hyvää vertailukelpoisuutta ja luotettavuutta huolimatta joistakin häiriötekijöistä.

Eryteisesti Wun ym. (2016) tuloksissa kiinnosti immunokemiallisen menetelmän ja HPLC -menetelmän yhtenevyys. Sillä näiden menetelmien välinen keskimääräinen tulostaso ero oli Blant-Altmanin -käyrillä vain 0,04 %: a verrattuna tähän verifiointiin, missä päästiin kolmen prosentin tasolle. Tosin laskukaavakin eroprosenteille on erilainen tässä verifiointissa.

7.2 Opinnäytetyön luotettavuus

Tutkimus on validi eli luotettava ja pätevä silloin, kun se mittaa sitä, mitä oli tarkoituskin selvittää. Tutkimuksen validius käsittää myös systemaattisen virheen puuttumisen. (Heikkilä 2014, 177.) Systemaattinen virhe vaikuttaa tuloksiin aina samalla tavalla. Se johtuu jostain toistuvasta virheestä analyysin aikana, kuten esimerkiksi epätarkastavakioinnista, viallisesta laitteesta tai väärästä inkubointilämpötilasta. Saadut tulokset poikkeavat siten todellisista arvoista liian korkeina tai matalina tuloksina. Tulosten tarkastelussa pitää huomioida myös mahdollinen satunnaisvirhe. Satunnaisvirhettä voi aiheuttaa esimerkiksi pipetointi, reagenssit ja näytteen käsittely sekä säilytys. Satunnaisvirhe vaikuttaa määrittämisessä satumanvaraisesti eikä sitä voi poistaa kokonaan. Sitä voidaan kuitenkin vähentää

työskentelemällä huolellisesti ja vakioimalla työskentelyolosuhteet. (Läärä & Lammi 1989, 111-113.)

Validius pätee myös yleistettävyyteen, millä tarkoitetaan tutkimusotoksen edustettavuutta perusjoukkoon nähden (Läärä & Lammi, 1989, 114). Cobas c513 -analysointilaitteen verifiointin validiteetin saavuttamiseksi uskon, että tutkimusotos eli näytemäärä (n=110), jotka sisälsivät sekä matalia että korkeita HbA1c -arvoja ja HbA1c -tutkimusta häiritseviä tekijöitä, oli riittävä. Sillä aikaisempien tutkimustulosten ja vastaavanlaisten laitevertailujen sekä verifiointien näytemäärät ovat olleet samaa luokkaa. Itse en kuitenkaan pystynyt vaikuttamaan näytemääriin tai otoskokoon, vaan ne annettiin minulle. Lisäksi tämän verifiointiprosessin aikana myös näytteiden säilytys, käsittely ja määritys on tapahtunut vakioituissa olosuhteissa, mikä parantaa validiteettia ja vähentää satunnaisvirhettä. Näkisin yleistettävyyden vielä suhteessa aikaisempiin tutkimustuloksiin, joissa on verrattu kromatografista ja immunokemiallista menetelmää keskenään, ja saatu niistä samankaltaista yhtenevää tulostasoa verifioitavan menetelmän ja vertailumenetelmän välillä.

Reliabiliteetin puute alentaa tutkimuksen validiteettia. Reliabiliteetti tarkoittaa tutkimustulosten toistettavuutta. Toistettavuus on sitä parempi, mitä lähempänä eri määrityskertojen antamat tulokset ovat toisiaan. Lisäksi kontrollinäytteistä on saatava tuloksia, jotka vastaavat valmistajan ilmoittamia tavoitearvoja. Kontrollinäytteiden vastatessa tavoitearvojaan lisääntyy tutkimuksen reliabiliteetti ja validiteetti. (Läärä & Lammi 1989, 49.) Mittaustulosten ollessa samat, mittaus on reliabeli. Reliabelissa tutkimuksessa mittaustulokset ovat toistettavissa muissakin tilanteissa ja tutkimuksissa. (Heikkilä 2014, 178.)

Tässä opinnäytetyössä verifiointin reliabiliteetti on huomioitu vakioimalla määrittelyolosuhteet mahdollisimman samankaltaisiksi, koska määrittelyä on tehty eri päivinä ja eri työntekijöiden toimesta. Tämän verifiointin reliabiliteetin kattaa sarjan sisäinen ja sarjojen välinen toistettavuus. Sarjan sisäistä toistettavuutta määritettiin 20 kertaa normaalilla ja kohonneella HbA1c -näytteellä ja sarjojen välistä toistettavuutta testattiin kontrolliarvoilla (Precicontrol norm/path HbA1c) 37 kertaa

rutiinimääritysten yhteydessä. Tämän vuoksi voin luottaa siihen, että tässä verifiointissa määritetyt HbA1c -tulokset ovat hyväksyttäviä. Mielestäni tässä verifiointissa sen reliabeliutta kuvastaa myös kahden samanlaisen Cobas c513:n vertailu, missä saatiin yhteneviä tuloksia.

7.3 Opinnäytetyön eettisyys

Tutkimuksen eettisyys on kaiken tieteellisen toiminnan lähtökohtana. Yleensä tutkimusetiikka on osana normatiivista etiikkaa. Sen avulla yritetään vastata kysymyksiin oikeista säännöistä, joita tulisi käyttää tutkimusta tehdessä. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013, 211-212.) Tutkimusetiikka toimii ohjenuorana koko tutkimusprosessin ajan. Sitä noudatetaan suunnitteluvaiheessa sekä tutkimustulosten julkaisussa ja tiedottamisessa (Vilka 2015, 41.) Kun tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön mukaan, se on eettisesti luotettava ja hyväksyttävä. Tällöin myös tulokset ovat uskottavia. Siksi tutkimustyössä on noudatettava erityistä tarkkuutta, huolellisuutta ja rehellisyyttä. Nämä toimintatavat ovat keskeisessä asemassa myös tulosten esittämisessä ja tutkimusten sekä niiden tulosten arvioinnissa ja tallentamisessa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012, 6.) Tutkittavilla on lisäksi oikeus pysyä tuntemattomana, sillä yksilöihin kohdistuvassa tutkimuksessa tutkittavilla on oikeus vaatia, ettei heidän identiteettinsä ole tunnistettavissa (Soininen 1995, 129).

Tässä opinnäytetyössä on noudatettu näitä eettisiä toimintatapoja kaikissa vaiheissa. Opinnäytetyössä on kiinnitetty huomiota huolellisuuteen ja tarkkuuteen tiedonhaun ja tulosten esittämisen aikana. Rehellisyyden periaatetta on noudatettu siten, että tutkimustuloksia ei ole kaunisteltu, vaan ne on esitetty sellaisina kuin ne ilmenevät. Tämän opinnäytetyön tutkimuksen raportointi ja arviointi sisältävät lisäksi numeerista tietoa, jossa yksilöt eivät näy, joten tutkimuksen eettiset näkökulmat on otettu huomioon.

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (2012, 6) mukaan tutkimus suunnitellaan ja toteutetaan siten, että raportointi ja siitä syntynyt tietoaineisto tallennetaan niiden vaatimusten edellyttämällä, jotka asetetaan tieteelliselle tiedolle. Lisäksi tutkijan

on hankittava tarvittavat tutkimusluvut ja tietyillä aloilla vaaditaan myös eettinen ennakoarviointi. Täten tutkijalla on vastuu tekemästään tutkimuksesta (Vilka 2015, 50). Vilkan (2015) mukaan tutkijan on myös noudatettava tutkimuksen avoimuutta, mikä kuuluu hyvään tieteelliseen käytäntöön. Se tarkoittaa tutkimuksen kannalta sen asianmukaista informointia ja julkista saatavuutta.

Tämä opinnäytetyö ei vaatinut erillistä tutkimuslupaa tai eettisen ennakoarvioinnin tekoa. Tutkimusluvasta kysyttiin Keski-Suomen sairaanhoitopiirin tutkimuskoordinaattorilta (Lampinen 2019). Koska ei tarvittu minkäänlaisia potilastietoja näytteitä varten, eikä niistä tullut tietoa mitään kautta, niin silloin voi opinnäytetyön tehdä Fimlab Laboratoriot Oy:n luvalla eikä erillistä tutkimuslupaa tarvita. Lisäksi kysyttiin lupa käyttää laboratorioden oikeita nimiä. Lupa kysyttiin Fimlab Laboratoriot Oy:n ylikemistiltä (Rontu 2019), joka myönsi sen.

Lisäksi tässä opinnäytetyössä käytettiin analyysilaitteiden kuvia, jotka on otettu suoraan yritysten nettisivuilta. Myös näissä tapauksissa kysyttiin lupaa käyttää laitteiden kuvia. Bio-Rad Laboratories (Nordic Quotes & Tenders Bio-Rad Laboratories AB 2019), Roche Diagnostics Oy (Fagerlund 2019) ja Siemens Healthcare Oy (Rantakangas 2019) myönsivät kuviensa käyttöluvan.

Valmis opinnäytetyö luovutetaan sähköisessä muodossa Theseus -verkkokirjastoon. Se myös esitetään Tampereella Tampereen ammattikorkeakoulun tiloissa sekä tämän opinnäytetyöntekijän työpaikalla Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa.

7.4 Johtopäätökset ja jatkotutkimushaasteet

Cobas c513 -analysaattorin HbA1c -tutkimusmenetelmän verifiointin tavoitteena oli, että uusi immunokemiallinen analyysimenetelmä HbA1c -tutkimukselle ja analysaattori Cobas c513 täyttävät niille asetetut vaatimukset, jotta immunokemiallinen menetelmä voitaisiin ottaa käyttöön Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa osana kemian automaatiouudistusta. Verifiointissa tehtiin potilasnäytevertailu ja testattiin verifioitavaa Cobas c513 -analysaattorin turbidimetrinen

inhibitio-immunomenetelmää (TINIA) vertailu- eli referenssimenetelmänä olevaan Variant™ II Turbon nestekromatografiseen HPLC -menetelmään. Lopuksi tarkasteltiin menetelmien välistä tulostaseroa. Siksi palataan takaisin tutkimuskysymyksiin: 1) miten vertailukelpoisia verifioitavan Cobas c513:n immunokemiallisen analysaattorin HbA1c -tulokset ovat Variant™ II Turbon nestekromatografisen analysaattorin HbA1c -tuloksiin, ja 2) miten Jyväskylän keskussairaalan laboratorion Cobas c513 vastaa laitevertailussa Tampereen keskuslaboratorion Cobas c513:n tuloksiin.

Tutkimuskysymykseen yksi vastaus on: verifioitavan Cobas c513:n immunokemiallisen analysaattorin HbA1c -tulokset olivat erittäin vertailukelpoisia Variant™ II Turbon nestekromatografisen analysaattorin HbA1c -tuloksiin. Potilasnäytteiden tulostaso oli yhtenevä testatun, verifioitavan menetelmän ja vertailumenetelmän välillä eikä menetelmien välillä ollut kliinisesti merkittävää tasoeroa. Hb-Vaasa-variantti ei häirinnyt verifioitua immunologista HbA1c -määritysmenetelmää. Potilasnäytteissä esiintyneillä fetaalihemoglobiinitasoilla ei myöskään ollut tässä verifiointissa häiritsevää vaikutusta, vaikka se voi häiritä immunokemiallista menetelmää kohonneina pitoisuuksina (Saés-Benito ym. 2014). Tulostasovertailussa ei todettu kliinisesti merkittävää ja selvää yhdensuuntaista muutosta verrattuna käytössä olleeseen kromatografiseen menetelmään paitsi Hb-Vaasa -variantin osalta, missä Variant™ II Turbon kromatografinen menetelmä antoi hyvin paljon matalampaa tulostasoa verifioitavaan Cobas c513 -analysaattorin immunokemialliseen menetelmään nähden. Kuitenkin hemoglobiinivariantteja sisältävät näytteet on tätä ennen vastattu ja tehty vaihtoehtoisella immunologisella menetelmällä, DCA Vantage® -laitteella, jonka tulosten korrelaatio ja tulostasero oli hyvä uuden Cobas c513 -analysaattorin HbA1c -pitoisuuksiin nähden. Yksilötasolla voitiin kuitenkin nähdä lievää pitoisuusnousua tai -laskua HbA1c -arvoissa, joten seurantanäytteen ottamista suositellaan tarvittaessa uuden tulostason määrittämiseksi.

Tutkimuskysymykseen kaksi vastaus on: Jyväskylän keskussairaalan laboratorion Cobas c513 vastaa laitevertailussa Tampereen keskuslaboratorion Cobas c513:n tuloksiin erittäin hyvin. Tulostaso oli potilasnäytteiden osalta yhtenevä testatun, verifioitavan menetelmän ja vertailumenetelmän välillä eikä menetelmien välillä ollut kliinisesti merkittävää tasoeroa.

Tutkimuskysymysten vastausten sekä tulosten perusteella tehtiin johtopäätös siitä, että verifiointi oli onnistunut. Cobas c513 ja sen immunokemiallinen määrittäminen menetelmä, turbidimetrinen inhibitio-immunomenetelmä (TINIA), HbA1c -kolmannen sukupolven immunokemiallinen testi täyttää rutiinikäyttöön soveltuvat laatuvaatimukset, vaikka jotkin häiriötekijät voivat haitata HbA1c -määrittystä. Myös aiemmat tutkimustulokset tukevat immunokemiallisen määrittäminen menetelmän käyttöönottoa. Ennen kaikkea immunokemiallinen määrittäminen menetelmä soveltuu kliiniseen käyttöön ja diabeteksen diagnosointiin ja seurantaan. Cobas c513 -analyysointilaitteita otettiin virallisesti käyttöön Keski-Suomen keskussairaalan laboratoriossa 29.1.2019.

Jatkotutkimushaasteena tälle verifiointille voisi toimia uusi verifiointi Cobas c513 -analyysointilaitteiden välillä, vaikka niiden tulokset olivatkin yhtenevät. Keski-Suomeen valmistuu uusi sairaala Nova, ja uuden sairaalan laboratorion tarpeisiin on verifiointi tehtävä uudelleen. Referenssianalyysointilaitteena toimii jälleen Tampereen Cobas c513 -analyysointilaitteita. Tällä kertaa myös näytemäärä olisi suurempi kuin nyt tehdyssä vertailussa.

Jos verifiointia ei oteta huomioon jatkotutkimushaasteita ajatellen, niin tutkimuksia liittyen HbA1c:hen on olemassa. Esimerkiksi voitaisiin tutkia kohonneiden tai hyvin suurten triglyseridi- ja kolesterolipitoisuuksien vaikutusta HbA1c -arvoihin. Wu ym. (2016) huomasivat tutkimuksissaan, että Rochen c501 ja toisen sukupolven TINIA – immunokemiallinen menetelmä antoi virheellisesti alhaisia HbA1c -arvoja niille näytteille, joissa oli kohonnut triglyseridi- ja kolesterolipitoisuus. Myös Lenters-Westra & English (2017) tutkivat kohonneiden triglyseridi -ja kolesterolipitoisuuksien vaikutusta HbA1c -arvoihin, mutta eivät havainneet, että kohonneella triglyseridiarvolla (15,6 mmol/l asti) olisi ollut häiritsevää vaikutusta. Silti olisi mielenkiintoista tehdä tutkimusta aiheesta, jos siihen voisi valikoida yli 15,6

mmol/l olevia triglyseridinäytteitä, ja miten ne vaikuttavat HbA1c- tutkimuksissa, kun analysaattorina ja määrittämenetelmänä käytetään Roche Cobas c513 -analysaattoria ja sen kolmannen sukupolven immunokemiallista (TINIA) menetelmää.

Kolmantena jatkotutkimusaiheena voitaisiin tutkia anemian ja punasoluideksien vaikutusta HbA1c -tutkimuksissa. Sillä immunokemiallinen menetelmä tarvitsee HbA1c -pitoisuuden laskemiseksi kaksi riippumatonta testiä, HbA1c- ja hemoglobiinikokeet. Tällaisiakin tutkimuksia on tehty eri variaatioilla, mutta ei todennäköisesti vielä käyttäen Cobas c513 -analysaattoria ainakaan pikaisen kirjallisuushaun perusteella. Tutkimuskysymyksenä voisi siten olla: miten anemia vaikuttaa HbA1c- tuloksiin, kun määrittäksessä käytetään Roche Cobas c513 -analysaattoria ja sen kolmannen sukupolven immunokemiallista (TINIA) menetelmää.

LÄHTEET

A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. 2019. Luettu 26.8.2019. <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>

Bio-Rad Laboratories. 2019. Variant™ II Turbo. Luettu 27.1.2019. <http://www.bio-rad.com/en-fi/product/variant-ii-turbo-hemoglobin-testing-system?ID=41158308-b08b-4921-af0d-465d46b3f1b5>

Bry, L., Chen, P.C. & Sacks, D. 2001. Effects on Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivatives on Assays for Glycohemoglobin. *Clinical Chemistry* 47 (2), 153-163

Diabetes. Käypä hoito -suositus.2018. Duodecim. Helsinki. Viitattu 30.10.2019. www.kaypahoito.fi

Desmond, A., Jaisson, S., Leroy, N., Gillery, P. & Guillard, E. 2017. Labile glycosylated haemoglobin and carbamylated haemoglobin are still critical points for HbA1c measurement. *Biochimica Medica* 27 (2), 378-386

Ehder, T. (Toim.) 2005. Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta. Julkaisu J6/2005. Luettu 3.8.2019. <https://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

EMA (European medicine agency). 2011. Guideline on bioanalytical method validation. Luettu 3.8.2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

Ervasti, M. 2008. Evaluation of Iron Status Using Methods Based on the Features of Red Blood Cells and Reticulocytes. Kuopion yliopisto. Doctoral dissertation.

Eskelinen, S. 2016. Laboratoriotutkimusten tulkinta. Hemoglobiini HbA1c. Luettu 15.2.19. https://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=snk03092

Giavarina, D. 2015. Understanding Blant Altman analysis. *Biochimica Medica* 25 (2), 141-151

Gupta, S., Jain, U. & Chauhan, N. 2017. Laboratory Diagnosis of Hba1c: A Review. *Journal of Nanomedicine Research* 5 (4), 10 pages

He, S., Wei, Y., Lin, L., Chen, Q., Yi, S., Zuo, Y., Wei, H., Zheng, C., Chen, B. & , X. 2018. The prevalence and molecular characterization of $\delta\beta$ - thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in the Chinese Zhuang population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 32 (3), 6 pages

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. Porvoo. Bookwell Oy. 9. uudistettu painos.

Hemoglobin A1C on Bio-Rad Variant II Turbo 2.0 (Original In-Use Date: July 9, 2012). Luettu 23.1.2019. http://labmed.ucsf.edu/labmanual/db/resource/proc-HgbA1c_NU_VariantII.pdf

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2001. Tutki ja kirjoita. Vantaa. Tummavuoren kirjapaino Oy. 6. -7. painos.

Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 1994. Tilastolliset menetelmät. Porvoo. WSOY:n graafiset laitokset. 1. painos.

Hägg, M. (Toim.) 2016. Validoinnin suunnitteluopas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Luettu 3.8.2019. <https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>

IFCC. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Home Page. Luettu 1.2.2019. <https://www.ifcccha1c.org/>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki. Edita Prima Oy. 5. uudistettu painos.

Jaisson, S., Leroy, N., Soulard, M., Desmons, A., Guillard, E. & Gillery, P. 2018. Evaluation of the analytical performances of the Cobas c513 analyser for HbA1c assay. *Biochemia Medica* 28 (3), Article ID 030708. Luettu 27.1.2019. <https://doi.org/10.11613/BM.2018.030708>

Kahrom, M. 2010. An Innovative Mathematical Model: A Key to the Riddle of HbA1c. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2010, 6 pages. Luettu 23.1.2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/481326>

Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy

Karjalainen, T. 2003. Vastasyntyneen anestesia. *Finnanest* 2/2003, 140

Kendall, A.G., Pas, A., Wilson, J.B., Cope, N., Bolch, K. & Huisman, T.H.J. 1977. Hb Vaasa or $\alpha_2\beta_2$ (39 (C5) GLN GLU), A Mildly Unstable Variant in a Finnish Family. *Hemoglobin. International journal for hemoglobin research* 1 (3), 292-295

Klingenberg, O., Furuset, T., Hestbråten, C., Hallberg, M., Steiro, A., Orset, I. & Berg, J. 2017. HbA1c analysis by capillary electrophoresis comparison with chromatography and an immunological method. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 77 (6), 458 - 464

Laitinen, H. 2017. Validointi ja verifiointi tehokkaasti. *Moodi* 2/2017, 33-34

Lenters-Westra, E. & English, E. 2017. Evaluating new HbA1c methods for adoption by the IFCC and NGSP reference networks using international quality targets. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 55 (9), 1426-1434

Läärä, E. & Lammi, S. 1989. Tilastotieteen perusteet lääketiedettä ja lähialoja varten. Kuopio. Kuopion yliopiston painatuskeskus. 5. painos

NGSP. 2010. IFCC Standardization of HbA1c. National Glycohemoglobin Standardization Program. Home Page. Luettu 1.2.2019. <http://www.ngsp.org/ifccngsp.asp>

Nielsen, J. 1994. Usability Engineering. Academic Press, Inc. United States of America. Elsevier Science & Technology.

Penttilä, I., Halonen, T., Moilanen, L. & Tiikkainen, U. 2009. Glykoituneen hemoglobiinin (HbA1c) yksikön muutos kansainvälisen suosituksen mukaiseksi. *Kliinlab* 26 (2), 25-31

Penttilä, I., Penttilä, K., Holm, P., Laitinen, H., Ranta, R., Törrönen, J. & Rauramaa, R. 2016. Methods, units and quality requirements for the analysis of haemoglobin A1c in diabetes mellitus. *World Journal of Methodology* (6) 2, 133-142

Penttilä, I., Laitinen, H., Ranta, P., Penttilä, K., Törrönen, J. & Rauramaa, R. 2018. HbA1c-analytiikka ja määritysmenetelmien laatu laaduntarkkailutulosten valossa. *Kliinlab* 35 (5), 132-139

Pundir, C.S & Chawla, S. 2014. Determination of glycated hemoglobin with special emphasis on biosensing methods. *Analytical Biochemistry* 444 (1), 47-56

Roche Diagnostics International Ltd. 2019. Cobas c513 analyzer. Luettu 27.1.2019. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-c-513.html>

Rohlfing, C., Connolly, S., England, J., Hanson, S., Moellering, C., Bachelder, J. & Little, R. 2008. The Effect of Elevated Fetal Hemoglobin on Hemoglobin A1c Results. *American Journal of Clinical Pathology* 129 (5), 811-814

Rohlfing, C., Hanson, S., Weycamp, C., Siebelder, C., Higgins, T., Molinaro, R., Yip, P.M & Little, R. 2016. Effects of Hemoglobin C, D, E, and S traits on Measurements of Hemoglobin A1c by Twelve Methods. *Clinica Chimica Acta. International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine* 455 (4), 80-83

Saés-Benito Godino, A., Vergara Chozas, J.M., Marques Ronchel, A., Barrero Alor, F., Papey Ramirez, L., Coronado Alvarez, N.M., Fernandez, J., Luque, F., Camacho Reina, V., Aquilar Pena, R., Carretero, L. & Romero Sotomayor, V. 2014. Multicentre evaluation of glycated haemoglobin (HbA1c) of Roche Diagnostics in Andalusia. *Clinical Biochemistry* 47 (12), 1108-1111

SFS-EN ISO 15189:2012. Medical Laboratories. Requirements for Quality and Competence. Helsinki. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry. Luettu 16.2.2019. Vaatii käyttöoikeuden. <https://online-sfs-fi.libproxy.tuni.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/222545>.

SFS-EN ISO 9241-11:2018. Ergonomics of human system interaction. Part 11: Usability: Definitions and concepts. Helsinki. Suomen Standardisoimisliitto SFS ry. Luettu 3.8.2019. Vaatii käyttöoikeuden. <https://online-sfs-fi.libproxy.tuni.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/9/675851>

Siemens Healthcare Oy. 2019. DCA Vantage® Analyzer. Luettu 27.1.2019. <https://www.healthcare.siemens.com/diabetes/diabetes/dca-vantage-analyzer>

- Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turku: Painosalama Oy.
- Thorn, L. & Groop, P-H. 2018. Miten diabeteksen kokonaisvaltainen hoito huomioidaan avoterveydenhuollon vastaanotolla? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 134 (22), 2237-9
- Trivelli, L.A., Ranney, H.M. & Lai, H-T. 1971. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. New England Journal of Medicine 284, 353-7
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012 Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Luettu 2.5.2019. http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf
- Vilkka, H. 2015. Tutki ja kehitä. 4. uudistettu painos. PS -kustannus.
- Weykamp, C. 2013. HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects. Annals of Laboratory Medicine 33 (6), 393-400
- Whitley, H., Yong, E. & Rasinen, C. 2015. Selecting an A1C Point of Care Instrument. Diabetes Spectrum 28 (3), 201-208
- Wu, X., Chao, Y., Wan, Z., Wang, Y., Ma, Y., Ke, P., Wu, X., Xu, J., Zhuang, J. & Huang, X. 2016. A comparative evaluation of the analytical performance of Capillars 2 Flex Piercing, Tosoh HLC-723 G8, Premier Hb9210 and Roche Cobas c501 Tina-quant Gen 2 analyzers for HbA1c determination. Biochemia Medica 26 (3), 353-364

Julkaisemattomat lähteet

- B-HbA1c -työohje Variant II™ Turbolle. Fimlab Laboratoriot Oy Keski-Suomen alue. 11.8.2015.
- Fagerlund, P. 2019. Netistä otetun kuvan käyttöluupa opinnäytetyötä varten. Sähköpostiviesti. paivi.fagerlund@roche.com. Luettu 7.5.2019
- Härkönen, M. & Haapala, A-M. 2018. Verifiointissa ja validoinnissa noudatettavat periaatteet. Fimlab Laboratoriot Oy. Versio 1.1. Käyttöönottopäivä 19.4.2018
- Lampinen, P. Tutkimuskoordinaattori. 2019. VS Tutkimuslupa. Sähköpostiviesti. paivi.lampinen@ksshp.fi. Luettu 24.4.2019
- Nordic Quotes & Tenders Bio-Rad Laboratories AB. 2019. Netistä otetun kuvan käyttöluupa opinnäytetyötä varten. Sähköpostiviesti. amanda.reiman@bio-rad.com. Luettu 7.5.2019
- Rantakangas, J. 2019. Siemens Healthcare Oy. Netistä otetun kuvankäyttöluupa opinnäytetyötä varten. Sähköpostiviesti. jonna.rantakangas@siemens-healthineers.com. Luettu 3.6.2019

Rontu, R. Ylikemisti. 2019. VS Opinnäytetyö. Sähköpostiviesti. riikka.rontu@fimlab.fi. Luettu 25.4.2019

Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2013. Latex-agglutinaation inhibition mitaus. Koulutus 1.8.2014. Kouluttaja Pirinen, A.

LIITTEET

Liite 1. Potilasnäytevertailu Variant II™ Turbon ja cobas c513 -analysointilaitteiden välillä, havaintomatriisi. 1(1)

HbA1c mmol/mol			
Referenssimenetelmän tulos (Variant II™ Turbo)	Verifioitavan menetelmän tulos (c513)	Erotus c513-Variant	Ero% (erotus/Variant)x100
35	36,4	1,4	4,0
40	39,4	-0,6	-1,5
55	55,8	0,8	1,5
60	60,2	0,2	0,3
67	65,3	-1,7	-2,5
76	70,8	-5,2	-6,8
76	74,4	-1,6	-2,1
80	78,3	-1,7	-2,1
93	84,5	-8,5	-9,1
98	91,0	-7,0	-7,1
102	98,4	-3,6	-3,5
104	95,7	-8,3	-8,0
31	32,5	1,5	4,8
36	38,4	2,4	6,7
43	44,3	1,3	3,0
51	52,2	1,2	2,4
63	63,8	0,8	1,3
66	65,1	-0,9	-1,4
72	68,6	-3,4	-4,7
86	82,7	-3,3	-3,8
42	39,3	-2,7	-6,4
40	35,5	-4,5	-11,3
42	36,8	-5,2	-12,4
33	31,1	-1,9	-5,8
41	38,1	-2,9	-7,1
38	33,7	-4,3	-11,3
44	39,9	-4,1	-9,3
35	33,2	-1,8	-5,1
33	31,9	-1,1	-3,3
36	34,0	-2,0	-5,6
46	43,0	-3,0	-6,5
40	36,9	-3,1	-7,8

jatkuu

1(2)

47	46,9	-0,1	-0,2
41	38,8	-2,2	-5,4
35	33,0	-2,0	-5,7
54	51,9	-2,1	-3,9
39	36,9	-2,1	-5,4
38	36,7	-1,3	-3,4
40	38,4	-1,6	-4,0
37	34,5	-2,5	-6,8
34	31,3	-2,7	-7,9
32	31,1	-0,9	-2,8
33	32,9	-0,1	-0,3
36	33,5	-2,5	-6,9
39	37,1	-1,9	-4,9
43	37,0	-6,0	-14,0
47	44,6	-2,4	-5,1
51	48,1	-2,9	-5,7
58	55,3	-2,7	-4,7
64	63,6	-0,4	-0,6
67	66,1	-0,9	-1,3
71	71,6	0,6	0,8
77	78,0	1,0	1,3
105	104,3	-0,7	-0,7
28	26,9	-1,1	-3,9
29	29,6	0,6	2,1
44	39,6	-4,4	-10,0
46	41,7	-4,3	-9,3
51	44,4	-6,6	-12,9
55	50,7	-4,3	-7,8
56	52,2	-3,8	-6,8
60	58,4	-1,6	-2,7
62	61,1	-0,9	-1,5
67	66,2	-0,8	-1,2
71	68,8	-2,2	-3,1
74	72,5	-1,5	-2,0
78	75,5	-2,5	-3,2
80	80,0	0,0	0,0
84	86,0	2,0	2,4
89	90,4	1,4	1,6
94	96,1	2,1	2,2
97	95,9	-1,1	-1,1
104	105,3	1,3	1,3
112	111,4	-0,6	-0,5
116	108,2	-7,8	-6,7
138	134,8	-3,2	-2,3
ka.	59,6	-2,0	-3,3

Liite 2. Näytteissä Hba1c –variantti Hb-Vaasa. Näistä vastattu potilaalle DCA-laitteelta saatu tulos.

2 (1)

HbA1c mmol/mol			
Referenssimenetelmän tulos Variant II™ Turbo	Verifioitavan menetelmän tulos Cobas c513	Erotus c513 - Variant	Ero% (Erotus/ Variant)x100
21	33.3	12.3	58.6
25	42.0	17.0	68.0
22	37.2	15.2	69.1
20	32.4	12.4	62.0
23	38.2	15.2	66.1
24	41.5	17.5	72.9
40	67.9	27.9	69.8
26	43.0	17.0	65.4
22	35.1	13.1	59.5
24	41.3	17.3	72.1
45	70.7	25.7	57.1
23	40.9	17.9	77.8
24	36.6	12.6	52.5
19	34.9	15.9	83.7
24	44.9	20.9	87.1
20	38.3	18.3	91.5
30	50.0	20.0	66.7
26	40.1	14.1	54.2
17	28.6	11.6	68.2
57	66.6	9.6	16.8
19	35.1	16.1	84.7
22	41.1	19.1	86.8
27	48.5	21.5	79.6
ka. 26.1	43.0	16.9	64.7

jatkuu

2(2)

HbA1c mmol/mol			
DCA -tulos	Verifioitavan metelmän tulos Cobas c513	Erotus c513 - DCA	Ero% (Erotus/ DCA)x100
33	33,3	0,3	0,9
41	42,0	1,0	2,4
40	37,2	-2,8	-7,0
31	32,4	1,4	4,5
37	38,2	1,2	3,2
42	41,5	-0,5	-1,2
65	67,9	2,9	4,5
43	43,0	0,0	0,0
32	35,1	3,1	9,7
39	41,3	2,3	5,9
70	70,7	0,7	1,0
31	40,9	-0,1	-0,2
38	36,6	-1,4	-3,7
33	34,9	1,9	5,8
42	44,9	2,9	6,9
36	38,3	2,3	6,4
52	50,0	-2,0	-3,8
39	40,1	1,1	2,8
28	28,6	0,6	2,1
62	66,6	4,6	7,4
31	35,1	4,1	13,2
38	41,1	3,1	8,2
45	48,5	3,5	7,8
ka. 41,7	43,0	1,3	3,2

Liite 3. Näytteissä fetaalihemoglobiini.

HbA1c mmol/mol			
Referenssimenetelmän tulos Variant II™ Turbo	Verifioitavan metelmän tulos Cobas c513	Erotus c513 - Variant	Ero% (Erotus/Variant)x100
115	108,0	-7,0	-6,1
104	99,1	-4,9	-4,7
77	70,0	-7,0	-9,1
40	35,3	-4,7	-11,8
108	101,8	-6,2	-5,7
127	116,1	-10,9	-8,6
40	33,5	-6,5	-16,3
66	60,7	-5,3	-8,0
32	29,6	-2,4	-7,5
36	33,0	-3,0	-8,3
123	119,5	-3,5	-2,8
ka. 78,9	73,3	-5,6	-7,1

Liite 4. Potilasnäytevertailu Tampere Cobas c513 vs. Jyväskylä Cobas c513.

HbA1c mmol/mol			
Tampere Cobas c513	Jyväskylä Cobas c513	Erotus .Jkl - Tre	Ero% (Erotus/Tre)x100
115	120	5,0	4,3
100	102	2,0	2,0
82	85	3,0	3,7
74	76	2,0	2,7
68	69	1,0	1,5
62	63	1,0	1,6
50	51	1,0	2,0
45	46	1,0	2,2
37	38	1,0	2,7
27	29	2,0	7,4
ka. 66	68	1,9	3,0

Liite 5. Sarjan sisäinen toistettavuus: primääritulokset

	Avoim puoli 35 mmol/mol	Suljettu puoli 35 mmol/mol	Avoim puoli 70 mmol/mol	Suljettu puoli 70 mmol/mol
1.	34,7	34,8	70,1	68,5
2.	34,6	34,9	69,8	68,9
3.	34,7	35,3	69,5	69,2
4.	34,7	34,9	70,1	69,0
5.	34,5	35,0	69,6	69,7
6.	34,8	35,0	70,0	69,2
7.	35,1	35,1	70,7	69,2
8.	34,9	34,6	69,3	69,5
9.	35,1	34,9	69,1	68,8
10.	34,8	35,1	69,0	69,3
11.	35,0	35,4	69,8	69,4
12.	35,2	34,9	69,5	69,4
13.	34,9	34,6	70,1	70,1
14.	35,0	34,6	69,9	69,5
15.	35,0	35,0	69,4	69,1
16.	34,9	35,0	70,2	69,9
17.	34,7	35,0	69,5	70,5
18.	34,7	34,9	69,6	70,2
19.	35,0	34,6	69,0	69,2
20.	34,7	35,1	69,6	69,1

Liite 6. Sarjojen välinen toistettavuus: primääritulokset

6(1)

	Avoim puoli Precicontrol norm 38,3 mmol/mol	Suljettu puoli Precicontrol norm 38,3 mmol/mol	Avoim puoli Precicontrol path 87,5 mmol/mol	Suljettu puoli Precicontrol path 87,5 mmol/mol
1.	38,6	38,3	91,4	90,4
2.	38,6	38,4	91,7	91,6
3.	38,0	37,3	91,3	91,3
4.	38,1	37,0	90,8	90,1
5.	38,8	37,8	91,8	91,7
6.	39,2	38,5	91,1	91,0
7.	38,9	38,4	91,6	91,1
8.	38,8	38,4	91,2	91,3
9.	38,6	38,8	92,5	91,8
10.	39,0	38,3	92,8	92,1
11.	39,4	38,5	91,4	91,3
12.	39,2	38,4	90,6	91,6
13.	39,5	37,9	90,9	91,1
14.	39,3	38,4	91,5	92,9
15.	39,8	37,7	89,9	90,5
16.	38,9	38,4	89,5	90,5
17.	39,3	39,0	89,2	91,4
18.	40,1	39,3	91,7	92,2
19.	39,6	39,3	91,1	92,2
20.	39,3	38,3	88,8	90,7
21.	37,1	38,0	90,8	91,4
22.	37,4	38,4	91,3	91,7
23.	39,3	38,4	88,1	91,2
24.	37,8	35,8	89,8	91,0
25.	36,6	38,2	89,0	88,2
26.	38,5	38,9	90,8	90,8
27.	38,8	37,8	92,4	91,8

jatkuu

6(2)

28.	38,5		38,1	92,0	91,0
29.	38,2		39,2	90,8	91,2
30.	39,2		38,8	92,1	92,6
31.	38,1		38,1	91,9	91,4
32.	39,2		38,7	92,0	91,4
33.	38,9		38,6	91,8	91,1
34.	38,9		38,9	91,3	90,4
35.	39,7		38,7	92,5	92,1
36.	38,8		38,2	90,4	90,6
37.	39,5		39,6	92,2	92,5