



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Kati Kemppainen ja Maria Oravala

Amylaasin verifiointi Konelab20i – analysointorille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

21.4.2021

Tekijät Otsikko	Kati Kemppainen ja Maria Oravala Amylaasin verifiointi Konelab20i–analysointilaitteelle
Sivumäärä Aika	33 sivua 21.4.2021
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava, Ylikemisti Seppo Laitinen
<p>Validointi tarkoittaa oikeellisuutta ja tulostason tarkistusta, jolla osoitetaan uuden menetelmän sopivuus ja suorituskky. Verifiointi on toimintana suppeampaa kuin validointi. Verifiointi tehdään uudelle jo aiemmin käyttöön otetulle menetelmälle, joka on validoitu jo aiemmin analysointilaitteelle esim. valmistajan toimesta. Validoinnin jälkeen verifiointi suoritetaan laboratoriossa jokaiselle analysointilaitteelle erikseen. Verifiointi on toimivuuden varmentamista käyttötarkoitukseensa.</p> <p>Amylaasientsyymi on ruoansulatusentsyymi, joka pilkkoo ravinnon tärkkelystä. Sitä erittyy sylkirauhasista ja haimasta. Plasman amylaasientsyymien pitoisuus kohoaa moninkertaiseksi haimasolujen vaurioitessa haimatulehduksen yhteydessä. Muita syitä kohoamiselle voi olla akuutti sappirakontulehdus, suolistotulehdus, suolinekroosi, sylkirauhasten tulehdus tai makroamylasemia. Amylaasientsyymi mitataan plasmasta entsyymimäärityksellä, joka mitataan fotometrisesti Konelab20i –analysointilaitteella, joka on Thermo Scientific:n valmistama kliinisen kemian analysointilaitte. </p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli kuvata verifiointiprosessi ja analysoida verifiointista saadut testitulokset kvantitatiivisin menetelmin. Verifioitavana oli uusi amylaasientsyymi -menetelmä Konelab20i –analysointilaitteelle. Analysointilaitteelle sijaitsee Sotkamon toimipisteessä ja referenssianalysointilaitteena toimii Roche Cobas c501 –analysointilaitte Kajaanin aluelaboratoriossa. Verifiointissa testattiin sarjojen sisäistä toistettavuutta, sarjojen välistä toistettavuutta sekä suoritettiin potilasnäytevertailu.</p> <p>Menetelmä todettiin käyttötarkoitukseensa sopivaksi ja voitiin ottaa käyttöön Sotkamon toimipisteessä. Potilasnäytevertailussa kaksi tulosta ylitti NordLabin laatutavoitteen, mutta ne eivät ei olleet merkityksellisiä, koska toisen tuloksen pitoisuudet olivat hyvin matalat ja toinen todettiin satunnaisvirheeksi.</p>	
Avainsanat	verifiointi, amylaasi, Konelab20i –analysointilaitte

Authors Title	Kati Kemppainen, Maria Oravala Amylase Verification for Konelab20i Analyzer in Finland
Number of Pages Date	33 pages 21 April 2021
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Senior Lecturer Seppo Laitinen Chief Clinical Chemist
<p>Validation means the accuracy and verification of the level of performance to demonstrate the suitability and performance of a new method. Verification is narrower in operation than validation. The verification is performed on a new method that has already been introduced and has already been validated for the analyzer, for example by the manufacturer. After validation, verification is performed in the laboratory for each analyzer separately. Verification means checking the functionality for the intended use.</p> <p>An amylase enzyme is a digestive enzyme that breaks down food starch. It is excreted from salivary glands and pancreas. Plasma amylase levels are multiplied when pancreatic cells are damaged in pancreatitis. Other causes of elevation may include acute cholecystitis, intestinal inflammation, intestinal necrosis, inflammation of the salivary glands, or macroamylasemia. The amylase enzyme is measured in plasma by an enzyme assay measured photometrically with a Konelab20i analyzer, a clinical chemistry analyzer manufactured by Thermo Scientific.</p> <p>This final project is commissioned by the Northern Finland Laboratory Center, Nordlab. The purpose of this final project was to describe the verification process and analyze the results using quantitative methods. A new amylase enzyme method was verified for the Konelab20i analyzer. The analyzer is located at the Sotkamo, Finland and the reference analyzer is the Roche Cobas c501 –analyzer in the Kajaani, Finland regional laboratory. The verification tested intra-batch reproducibility, inter-batch reproducibility, and performed patient sample comparison.</p> <p>In the patient sample comparison, there were two abnormal findings which differed Nordlab's quality objective. They were not relevant because the concentrations of one result were very low and the other was found to be random. The method was found to be suitable for its purpose and may use at the laboratory in Sotkamo Finland.</p>	
Keywords	verification, amylase, Konelab20i –analyzer

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Validointi ja verifiointi	2
2.1	ISO Standardi 15189	3
2.2	Verifiointisuunnitelma	3
2.3	Verifiointin laatua kuvaavat käsitteet	4
3	Amylaasientsyymi	6
4	Analysaattori ja mittausmenetelmä	7
4.1	Konelab20i –analysaattori	7
4.2	Fotometrinen mittaus amylaasin määrittämisessä	9
5	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset	12
6	Opinnäytetyön menetelmät	13
6.1	Aineisto	13
6.2	Aineiston analysointimenetelmät ja mittausparametrit	13
7	Opinnäytetyön toteutus	15
8	Tulokset	18
8.1	Sarjojen välinen toistuvuus	18
8.2	Potilasnäytevertailu	19
8.3	Sarjan sisäinen toistuvuus	21
9	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	22
10	Pohdinta	23
10.1	Luotettavuus	24
10.2	Eettisyys	24
10.3	Opinnäytetyöprosessin ja ammatillisen kasvun arviointi	25
	Lähteet	27

1 Johdanto

On olemassa standardeja, joita tulee noudattaa kliinisessä laboratoriossa esimerkiksi otettaessa käyttöön uusi tutkimusmenetelmä. Validoinnin ja verifiointin osalta on noudatettava SFS-EN ISO 15189 2012 –standardia. (Roelofsen-de Beer ym. 2019.) Validoinnilla varmistetaan uuden tai päivitetyn määritysmenetelmän toimivuus omassa laboratoriossa tiettyyn käyttötarkoitukseen. Otettaessa käyttöön jo aiemmin validoitu menetelmä tai analysaattori esim. pienemmässä aluelaboratoriossa, tulosten varmentamiseksi riittää menetelmän verifiointi. Laboratoriot käyttävät aina määritysmenetelmiä, jotka se on validoinut eli vahvistanut tai verifioinut eli todentanut käyttötarkoitukseensa. Käytännössä esimerkiksi menetelmää, analysaattoria tai reagenssia verifioitaessa terveyskeskuslaboratoriossa, verifiointin tuloksia verrataan tukilaboratoriossa saatuihin tuloksiin. (Hägg 2016: 7; Labquality 2020.)

Opinnäytetyön aihe, amylaasientsyymien verifiointi, saatiin työelämästä NordLab Kajaanin aluelaboratoriosta. Amylaasientsyymi on ruoansulatusentsyymi, jota erittyy sylkirauhasta ja haimasta (Penttilä 2003; 229). NordLab on liikelaitoskuntayhtymä, joka toimii Pohjois-Suomen alueella. Pohjois-Suomen laboratoriokeskuksen aluelaboratoriot sijaitsevat Kajaanissa, Kemissä, Kokkolassa, Oulussa ja Rovaniemellä. Tässä opinnäytetyössä keskitytään tutkimaan verifiointin prosessia ja siitä saatavia verifiointin testituloksia. Verifiointin kohteena on amylaasientsyymi–menetelmä Konelab20i –analysaattorilla Sotkamon kuntatoimipisteessä, joka on yksi Kajaanin toimipisteistä. Referenssilaboratoriona amylaasientsyymi-menetelmän verifiointissa toimii Kajaanin aluelaboratorio. Amylaasientsyymi–menetelmän verifiointin tarkoituksena oli saada uudistettu menetelmä käyttöön luotettavasti. Amylaasi -tutkimusta tehdään Sotkamossa päivystysluonteisesti, jolloin tämä mahdollistaa nopeamman potilastuloksen asiakkaalle eli hoitavaan yksikköön ja tätä kautta edistää potilaan hoitoa.

Opinnäytetyö suoritettiin pääosin kirjallisuuteen tietoon perustuen ja kvantitatiivisia tutkimusmenetelmiä hyödyntäen työelämälähtöisesti. Aiemmin Sotkamon kuntatoimipisteen Konelab20i -analysaattorilla oli käytössä amylaasin määrittämiseen yhden reagenssin menetelmä. Thermo Fisherin vaihtaessa menetelmän kahden reagenssin menetelmäksi, tulee amylaasimenetelmä verifioida uudelleen. Uusi applikaatio muuttui kahden reagenssin menetelmäksi ja kalibroitavaksi eCal – kalibraattorilla. Uuden kalibraattorin arvo on jäljitettävissä IFCC:n (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) kansainväliseen referenssimateriaaliin IRMM/IFCC-456. IFCC on kansainvälinen

kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen liitto. IFCC on maailmanlaajuinen organisaatio, joka muun muassa asettaa maailmanlaajuisia standardeja yhdessä muiden toimijoiden kanssa. (IFCC 2021.)

Amylaasientsyymin verifiointi tehtiin NordLabissa elokuun 2020 aikana. Opinnäytetyön halusimme olevan työelämälähtöinen ja selkeästi käytännön työhön liittyvä. Tässä opinnäytetyössä keskitytään verifiointin prosessin kuvaamiseen sekä analysoimaan verifiointista saatuja testituloksia kvantitatiivisin menetelmin.

2 Validointi ja verifiointi

Termejä validointi ja verifiointi käytetään kuvaamaan työstä riippuen, samaa asiaa. Joskus verifiointista käytetään myös nimeä uudelleen validointi, vaikka niitä ei tule tulkita synonyymeiksi. Käytännössä verifiointi on toimintana suppeampi kuin validointi. (Hägg 2016: 7.) Tulkinnoissa ja termien käytössä voi olla myös maiden välisiä eroja. Näitä termien välisiä eroja on täsmennetty vuonna 2012 laaditussa ISO 15189: 2012 standardissa. (Roelofsen-de Beer ym. 2019.)

Validointi tarkoittaa oikeellisuutta ja tulostason tarkistusta. Validoinnilla osoitetaan, että uusi menetelmä on sopiva ja suorituskykyinen käyttötarkoitukseensa. Validointi tehdään vertaamalla tulevaa valittua menetelmää ja sen tulostasoa kansainväliseen referenssitason. Uudesta menetelmästä on vakuutettava, että toistotarkkuus ja oikeellisuus ovat riittäviä. Validoinnista saatavat tulokset ja johtopäätökset dokumentoidaan. (Labquality 2020.)

Verifiointi tehdään uudelle jo aiemmin käyttöön otetulle menetelmälle, joka on validoitu jo aiemmin analysaattorille esim. valmistajan toimesta. Validoinnin jälkeen verifiointi suoritetaan jokaiselle analysaattorille erikseen. Toimenpiteenä validointi ei ole kertaluonteinen vaan uudelleen validoinnin periaatteet kerrotaan laboratorion johtamisjärjestelmässä. Laboratorion tulee tietyin väliajoin varmistaa, että validointi on edelleen voimassa oleva. (Hägg 2016: 8.) Verifiointi on toimivuuden varmentamista. Käytännössä tämä voidaan tehdä siten, että otetaan 10–20 potilasnäytettä, joiden tuloksia verrataan laboratorion käytössä olevan menetelmän tulostason. Verifiointi prosessi alkaa verifiointisuunnitelman teolla ja kaikki verifiointiin liittyvät toimenpiteet dokumentoidaan. (Labquality 2020.)

2.1 ISO Standardi 15189

ISO-standardit standardisoivat käytäntöjä globaalisti. ISO standardi 15189:n vaatimuksia sovelletaan henkilöstöön, laboratoriotiloihin, laboratoriolaitteisiin, laboratoriovälineisiin, reagensseihin ja tarvikkeisiin, sekä tutkimus- ja testausprosesseihin ja niiden laadunvarmistamiseen. Lisäksi vaatimuksia sovelletaan tulosten raportointiin, tulosten julkaisemiseen sekä laboratorion tiedonhallintaan. (Pereira 2020.)

Kaikkien lääketieteellisten laboratorioden laadunarviointia ohjaa ISO 15189:2012 –standardi, joka ohjaa laboratorioden laitteiden ja menetelmien validointia ja verifiointia sekä niihin liittyvien dokumenttien laadintaa. ISO 15189:2012 –standardi ohjaa myös laboratorioden henkilökuntaan liittyviä pätevyysvaatimuksia sekä henkilökunnan toimintaa. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että standardi ohjaa työntekijää arvioimaan kriittisesti laboratorion tuottamaa laatua. (Roelofsen-de Beer ym. 2019.)

2.2 Verifiointisuunnitelma

Verifiointisuunnitelmassa kerrotaan ennalta vahvistetut ja perustellut verifiointien hyväksymiskriteerit. Hyväksymiskriteerien lisäksi suunnitelmassa tulee käydä ilmi verifioitavien näytteiden määrä, käyttötarkoitus ja tutkimusmenetelmä. Suunnitelmaan kirjataan myös verifiointisuunnitelman laatijat. (Roelofsen-de Beer ym. 2019.)

Menetelmävastuuhenkilö laatii suunnitelman verifiointista. Verifiointisuunnitelmaa laatiessa menetelmän vastuuhenkilö voi tarvittaessa konsultoida lääketieteellistä vastuuhenkilöä. Konsultoitu henkilö, esimerkiksi lääkäri, kirjataan myös verifiointisuunnitelman laatijoihin. (NordLab Verifiointi ja Validointi 2020.) Suunnitelmaan täytyy kirjata, onko kyseessä validointi vai verifiointi sekä validoinnin/verifiointin syy, käytettävä laitteisto, testattavat tutkimukset, tarvittavat reagenssit ja vakiot, sekä niiden valmistaja. Lisäksi suunnitelmassa tulee käydä ilmi suunnitelma toistuvuuden, tarkkuuden, mittausalueen, mittausepävarmuuden määrittämiseksi. Verifiointisuunnitelmaan liitetään tarvittaessa erillinen suunnitelma tietojärjestelmien testaamiseksi. Valmis suunnitelma lähetetään hyväksyttäväksi laatuysteyshenkilölle. Suunnitelman hyväksymisen jälkeen vastuuhenkilö kirjaa suunnitelmaan hyväksyjän ja hyväksymispäivämäärän. (NordLab 2020.) Myös tavoiteaikataulu olisi hyvä käydä ilmi verifiointisuunnitelmassa (Hägg 2016: 11). Suunnitelmaa laadittaessa mitattaville parametreille annetaan tulosvaatimukset, joiden pitää täytyä (Hägg 2016: 14).

2.3 Verifioinnin laatua kuvaavat käsitteet

Validoinnin suunnittelun oppaan mukaan validointiin liittyviä käsitteitä kliinisen kemian osalta ovat; havaitsemisraja, herkkyys, häiriöalttius, lineaarisuus, mittausalue, mit-tausepävarmuus, määritysraja, oikeellisuus, osoituskyky, resoluutio, saanto, selektiivi-syys, spesifisyys, stabiilisuus, suorituskyky, toistettavuus, täsmällisyys, uusittavuus (Hägg 2016: 13). Verifioinnissa käytettävät parametrit määräytyvät verifioitavan kohteen mukaan.

Seuraavassa avataan keskeisimpiä käsitteitä:

- **havaitsemisraja;** tarkoittaa tutkittavan yhdisteen pienintä pitoisuutta, joka voi-daan todeta luotettavasti. Havaitsemisraja määritetään nollanäytteellä tai näyt-teellä, joka sisältää hyvin pienen pitoisuuden mitattavaa analyyttiä. (Hägg 2016: 20.)
- **herkkyys;** tarkoittaa menetelmän kykyä todeta pienetkin vaihtelut analyyttien pi-toisuuksissa. Kemian alalla käytettäessä lineaarista kalibrintia herkkyys on suo-ran kulmakerroin eli menetelmä on sitä herkempi mitä jyrkempi kalibraatiosuora on. (Hägg 2016: 21.)
- **häiriöalttius;** tarkoittaa menetelmän kykyä vastustaa pieniä muutoksia testauk-sen aikana. Ennen testausta arvioidaan muutosalttiit tekijät ja laaditaan suunni-telma, jossa määritetään riittävä analyysien lukumäärä muutosalttiiden tekijöiden testaamista vuoksi. Häiriöalttiuteen vaikuttavat erilaiset muuttuvat tekijät esim. lämpötila ja pH, reaktioaika. Satunnaisvirheitä mittauksissa syntyy aina, kun taas systemaattisia virheitä voi poistaa tai korjata. Tästä syystä on erittäin tärkeitä kirjata ylös muuttuvat tekijät, jos mittausepävarmuutta ei pystytä laskemaan. (Hägg 2016: 22.)
- **mittausalue ja lineaarisuus;** mittausalue tarkoittaa sitä analyytin pitoisuutta, jolla menetelmää voidaan käyttää riittävällä tarkkuudella. Kalibrintisuoran ol-lessa lineaarinen pitoisuusalue on optimaalinen. Lineaarinen suora saadaan, kun analysoitavan yhdisteen vaste ja konsentraatio esiintyvät lineaarisesti toisiinsa nähden. Mittausalue on se alue, jossa lineaarisuus on nähtävissä. Lineaarisuus

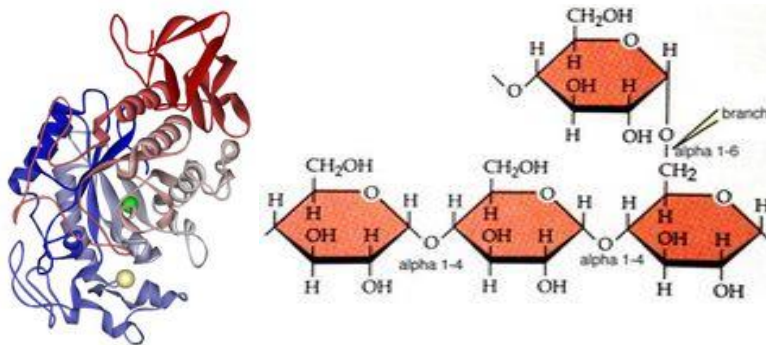
arvioidaan regressiosuoran muodosta. Kemian alalla käytetään pitoisuuksiltaan tiedettyjä liuoksia esim. standardi- vakio- ja kalibrointiliuoksia. (Hägg 2016: 23.)

- **mittausepävarmuus**; tarkoittaa yleistä mittaustulosten vaihtelua, joka voi johtua näytteenotosta, näytteen säilytyksestä, laitteesta tai analyysin eri vaiheista. Mittausepävarmuus on arvio rajoista, joiden välissä se ”oikea” tulos on tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus koostuu systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Mittausepävarmuuden määrittämisessä voidaan käyttää esim. keskijajontaa. Mittausepävarmuudentietoja tarvitaan arvioidessa mittaustulos-tarkkuuden riittävyyttä esim. tietyn päätöksenteon kannalta sekä vertaillaessa eri laboratorioden tuloksia keskenään. (Hägg 2016: 23–25.)
- **oikeellisuus (todenmukaisuus)**; menetelmän oikeellisuuden selvittämiseksi tulee tietää määritettävän analyytin pitoisuus ja ominaisuudet. Oikeellisuus ilmaistaan suhteellisena poikkeamana prosentteina (%). Oikeellisuuden arviointi edellyttää vertailevia mittauksia tai tunnetun vertailumateriaalin käyttöä. Sitä arvioidaan myös vertaamalla validoitavaa menetelmää referenssimenetelmään. (Hägg 2016: 27.)
- **selektiivisyys** (valikoivuus) tarkoittaa kykyä mitata tiettyä analyyttia useiden analyyttien joukosta. Selektiivisyyttä testattaessa pyritään saamaan selville systemaattisia virheitä (Hägg 2016: 29). Menetelmä katsotaan selektiiviseksi, kun on tutkittu vähintään kuuden henkilön näytettä (esim. plasmaa, virtsaa tai muuta matriisia) (Hägg 2016: 45). Menetelmäselektiivisyyttä tutkittaessa kartoitetaan häiritsevät tekijät, jos niitä on vaikea tunnistaa, selektiivisyyttä voidaan tutkia myös vertaamalla menetelmää muihin selektiivisyydellä tunnettuihin menetelmiin (Metrologian neuvottelukunta: 11).
- **spesifisyys**; Spesifinen menetelmä tarkoittaa, että tulos antaa vasteen vain tutkittavalle analyyttille (Hägg 2016: 30).
- **toistettavuus**; tarkoittaa, että tulokset ovat toistuvia, kun määrittäminen tehdään samalla laitteella, samassa laboratoriossa, saman tekijän toimesta, samasta näytteestä, samalla menetelmällä, lyhyen aikavälin sisällä (Hägg 2016: 31–32.).

- **täsmällisyys**; tarkoittaa mitattujen arvojen yhtäpitävyyttä ja täsmällisyys määritetään toistamalla kokeita (Hägg 2016: 32).
- **uusittavuus**; tarkoittaa tulosten välistä pysyvyyttä, kun määrittäminen tehdään samalla menetelmällä, mutta muutetaan esim. mittauslaitetta, suorituspaikkaa tai suorittajaa (Hägg 2016: 32).

3 Amylaasientsyymi

Amylaasi on ruoansulatusentsyymi, joka hajottaa ravinnon tärkkelystä. Amylaasia erittyy sylkirauhasista ja haimasta. (Mustajoki, Kaukua, 2008: 58–59.) Amylaasimolekyylin koko on pieni, jonka vuoksi plasman amylaasi-entsyymi erittyy munuaisten kautta virtsaan ja amylaasin puoliintumisaika on noin 12 tuntia (Kuvio 1.). Amylaasientsyymien viitearvot ovat terveellä ihmisellä 25–120 U/L (Nordlab 2017.).



Kuvio 1. Haiman amylaasin molekyylikaava (Maailman tietosanakirjamainen tieto 2018 mukailen)

Amylaasia erittyy vereen suuria määriä, jos haimasolut vaurioituvat haimatulehduksen yhteydessä. Tämän seurauksena plasman amylaasientsyymien pitoisuus kohoaa moninkertaiseksi. Käytännössä amylaasin määrittämisellä voidaan selvittää, onko äkillisesti ilmaantuneiden vatsakipujen syynä haimatulehdus. Haimatulehdus on sairaalahoitoa vaativaa sairaus. (Mustajoki, Kaukua, 2008: 58–59). Barbierin, Riggion ja Jaffen vuonna 2016 tehdyn tutkimuksen mukaan, tutkittaessa haimatulehduksista eli pankreatiitista, amylaasi pitoisuus nousee nopeasti, edellä mainitun tutkimuksen mukaan, myös haiman erittämä toinen entsyymi, lipaasi, olisi herkempi, mutta diagnostiikan kannalta amylaasi on nopeammin määritettävissä oleva tutkimus. (Barbieri, Riggio ja Jaffe 2016.)

Amylaasipitoisuus plasmassa voi olla kohonnut ilman haimatulehdusta muun muassa akuutin sappirakon tulehduksen, suolistotulehduksen, suolinekroosin tai sylkirauhasten tulehduksen seurauksena. (Nieminen 2001: 1257–1260.) Yksi syy amylaasipitoisuuden kohoamiseen voi olla makroamylasemia. Makroamylasemiassa amylaasi sitoutuu verenkierrassa suurimolekyyliseen kantajaproteiiniin esim. immunoglobuliiniin, jonka seurauksena syntyy kompleksoitunut makroamylaasi. Makroamylaasi erittyy virtsaan hitaasti, jolloin veren amylaasipitoisuus kohoaa ja virtsa amylaasipitoisuus pysyy normaalina. Makroamylasemian syytä ei tunneta ja se on kliinisesti merkityksetön. (Nieminen 2001: 1257–1260.)

4 Analysaattori ja mittausmenetelmä

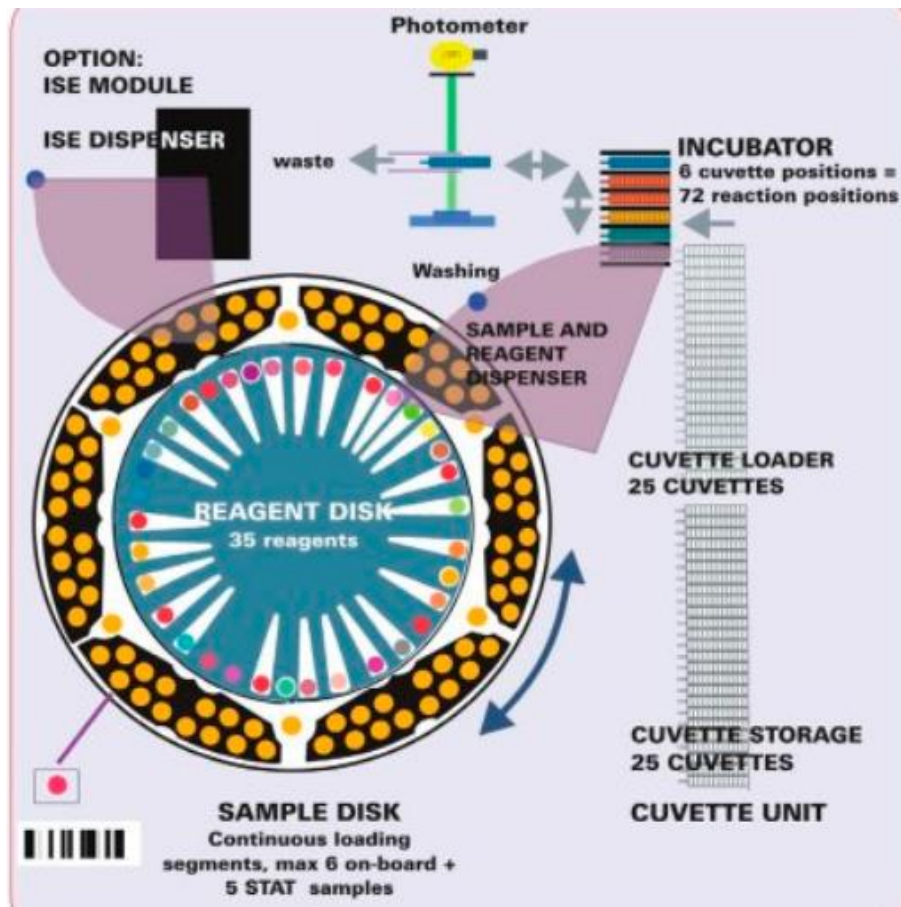
4.1 Konelab20i –analysaattori

Konelab20i on Thermo Scientific:n valmistama kliinisen kemian analysaattori (Kuvio 2), jolla voidaan tehdä tutkimuksia plasmasta, seerumista, virtsasta, sekä aivo-selkäydinnesteestä. Analysaattorilla voidaan analysoida jopa 200 näytettä tunnissa. (Technical Specification 2008.) Analysaattorilla voidaan määrittää entsyymejä, elektrolyyttipitoisuuksia, substraatteja sekä spesifisiä proteiineja (Thermo Scientific Konelab 20 Brochure 2008).



Kuvio 2. Kliininen kemian Konelab20i-analysaattori. Tässä analysaattorissa näytteet ladataan punaisen kannen alla olevalle näytekielelle, reagenssit ladataan reagenssikielelle, joka sijaitsee pyöreän keltaisen kannen alla. Kuvassa oikealla puolella olevan sinisen kannen alla on kyvettyyksikkö. Kuvassa kahdessa alla olevissa vetolaatikoissa on kyvettiroskakori sekä vesi- ja jätekanisteri. (Kati Kemppainen, Maria Oravala 2021.)

Konelab 20i –analysaattorissa on pyörivä kiekko (Sample Disk) analysoitaville näytteille, joita voidaan lisätä jatkuvasti. Laitteessa on myös paikkoja ns. STAT-näytteille, jotka voidaan tarvittaessa analysoida nopeammin sarjoista erillisinä näytteinä. Analysaattorissa on viilennetty reagenssikiekko (Reagent Disk), johon voidaan ladata 35 eri reagenssia. Laitte siirtää näytteet koneen inkubaattoriin (Inkubator), josta ne siirtyvät mitattaviksi laitteen fotometriseen yksikköön (Photometer). Konelab20i –analysaattorissa on myös erillinen ISE-yksikkö (Ise Module), jota käytetään eri elektrolyyttien mittauksessa, kuten kalium, natrium, kloridi ja litium. (Kuvio 3) Fotometriaa analysaattori käyttää entsymaattisiin määrittämiin, kuten amylaasi (AMYL), alkalinenfosfataasi (AFOS), alaniini-aminotransferaasi (ALAT), C-reaktiivinen proteiini (CRP).



Kuvio 3. Kuvituskuva Konelab20i -analysoittorin sisältä. Analysoittori sisältää ISE-yksikön (ISE module), fotometrinen (photometer), inkubaattorin (inkubator), sekä kyvetin yksikön (cuvette unit), reagenssikiekkon (regent disk), jonka ympärillä näytekiekko (sample disk). (Thermo Scientific. 2008.)

4.2 Fotometrinen mittaus amylaasin määrityksessä

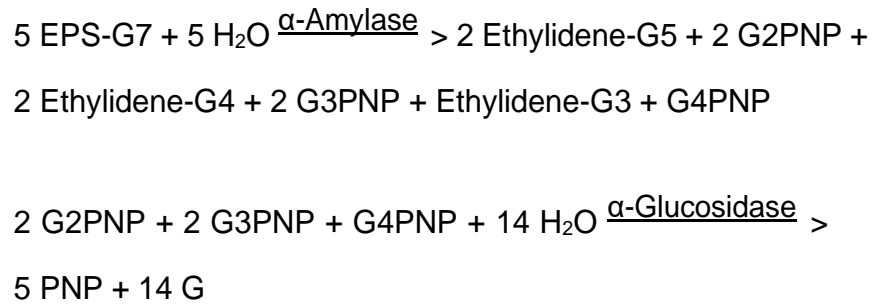
Amylaasientsyymiä mitataan plasmasta entsyymiaktiivisuusmäärityksellä. Entsyymit ovat valkuaisaineita eli proteiineja, jotka katalysoivat kemiallisia reaktioita elimistössä. Entsyymit nopeuttavat reaktiota pienentämällä aktivaatioenergiaa. Entsyymien vaikutus kohdistuu aineeseen, jota kutsutaan substraatiksi. (Bjälle ym.2009: 459) Tällaisille reaktioille on tyypillistä entsyymi-substraatti-kompleksi, joka muodostuu entsyymien aktiiviseen kohtaan (Kuvio 5). Aktiivinen kohta vastaa reaktion spesifisyydestä. Entsyymit pysyvät sitomaan vain yhtä tai muutamaa lähes samankaltaista substraattia. (Entsyymit 2006.)



Kuvio 4. Entsyymi-substraatti –reaktio (Kati Kemppainen, Maria Oravala 2021)

Entsyymiaktiivisuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat pH (7–7,5), lämpötila (37°C) sekä entsyymireaktioseoksessa vaikuttavat aktivaattorit (mm. magnesium, rauta, sinkki, kalsium ja kalium) ja inhibiittorit (mm. lyijy, elohopea) sekä koentsyymit ja prosteettiset ryhmät (esimerkiksi NAD ja NADP). Yleisimpiä klinisen kemian analyysejä ovat entsyymiaktiivisuusmääritykset. Entsyymien yksikkö (U) on kansainväliseksi sovittu, joka tarkoittaa sitä entsyymimäärää, joka katalysoi yhden mikromoolin (μmol) substraatteja minuutin aikana. Tavallisesti aktiivisuus ilmoitetaan U/L. (Jokela 1998; 68–69) Amylaasin viitearvot terveellä ihmisellä ovat 25–120 U/L (NordLab 2017).

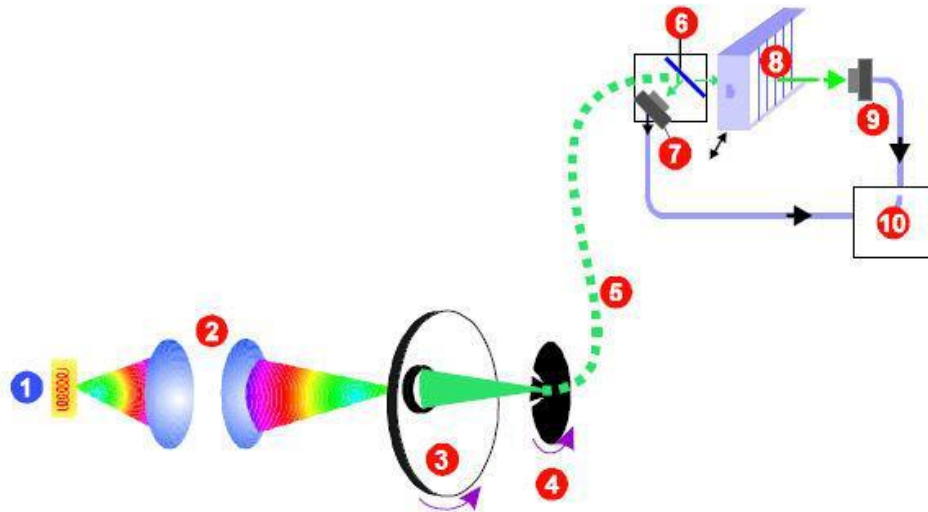
Konelab20i -analysaattori määrittää amylaasin (IFCC) kahden reagenssin menetelmällä kuvion 6 mukaisesti, jossa reagenssi käyttää EPS-G7:a (4,6 etylideeni-(G7) -p-nitrofenoli- (G1) -a-D-maltoheptaosidi) substraattina. Etylideenin käyttö estää eksoentsyymejä hajottamasta substraattia, joten α -amylaasin puuttuessa värin muutosta ei havaita. Kun substraatti pilkotaan amylaasilla, pienempiä palasia voidaan hydrolysoida α -glukoosidaasilla, joka aiheuttaa kromoforin vapautumisen. Syntyvän lopputuotteen (PNP= p-nitrofenoli) absorbanssin nopeutta mitataan aallonpituudella 405nm, näin saadaan näytteen α -amylaasiaktiivisuus mitattua.



Kuvio 5. Amylaasin (IFCC) reaktio (Amylase (IFCC) 2019.)

Fotometrisessä mittausmenetelmässä käytetään hyödyksi valon läpäisevyyttä (transmittanssia) tai imeytymistä (absorptiota) väliaineessa. Valo on monokromaattista silloin, kun se sisältää vain tietyn aallonpitoisuusalueen omaavaa valoa. Valoa voi hävitä mittakylvetin pinnasta tai absorboitumalla mittakylvetissä olevaan liuokseen vaikkei liuos sisällä mitattavaa ainetta. Edellä mainittua voidaan korjata käyttämällä vertailukylvettä tai niin sanottua nollamittausta. Käytännössä kun liuoksen pitoisuus kasvaa, absorbanssi kohoaa eli valon läpäisevyys vähenee logaritmisessa suhteessa. Kuviossa 4 ovat fotometrin osat, jossa valo läpäisee linssin ja suodattuu interferenssisuodattimien läpi, jonka jälkeen monokromaattinen valo läpäisee mittakylvetin. Kylvetistä transmittoitunut valo menee ilmaisimelle, ja mittauselektroniikan avulla se havaitaan ja saadaan mitattua numeeriseen muotoon. (Jokela 1998: 51–53.)

Fotometrisessä mittauksessa voidaan käyttää 11 eri aallonpituutta. Mittaus voidaan suorittaa aallonpituuksien 340–800 nanometrin välillä. Mittauslämpötilana käytetään 37 °C. Analyytistä riippuen mittaus tapahtuu päätepiستمittauksella tai kineettisesti. Kineettinen mittaus voi kestää 30 s – 60min ja voidaan mitata korkeintaan 12 mittauspistettä. (Thermo Scientific. 2008).



Kuvio 6. Fotometrin rakenne ja osat. 1. Halogeeni lamppu, 2. Kokoojalinssit, 3. Interferenssi-suodatin, 4. Valon katkoja, 5. Kvartsi kuitu, 6. Säteenjakaja, 7. Vertailutunnistin, 8. Kyvetti, 9. Ilmaisin, 10. Mittauselektronikka (Konelab service manual. 2003: 20 mukailten)

5 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyömme tarkoituksena on kuvata verifiointiprosessi sekä analysoida tuloksia kvantitatiivisin menetelmin. Verifiointin tarkoituksena on testata sarjojen sisäistä toistettavuutta, sarjojen välistä toistettavuutta sekä potilasnäytevertailun suorittaminen. Amylaasientsyymi –menetelmän verifiointin tavoitteena on todentaa, että uudella amylaasimenetelmällä saadaan yhtenevät tulokset referenssimenetelmään verrattuna. Tämän jälkeen amylaasi –tutkimus voidaan ottaa potilaskäyttöön Sotkamon toimipisteessä. Tavoitteena on myös syventää tietoa mitä verifiointiprosessiin sisältyy ja miksi, ja harjaantua tilastomatematiikan menetelmien käytössä.

Opinnäytetyö pyrkii vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

- Mitä tarkoittaa validointi ja verifiointi?
- Millainen on verifiointiprosessi ja miten varmistetaan verifiointitulosten luotettavuus?
- Miten verifiointi tuloksia tarkastellaan ja raportoidaan?

6 Opinnäytetyön menetelmät

Kvantitatiivinen tutkimus on yksi empiirisen tutkimuksen ryhmä. Kvantitatiiviset tutkimukset vastaavat kysymyksiin mikä, missä, kuinka usein ja kuinka paljon. Kvantitatiivinen tutkimus käyttää hyväksi numeraalisia tuloksia (Holopainen, Pulkkinen Pekka. 2008: 20–21).

6.1 Aineisto

Amylaasientsyymin verifiointissa aineistoina käytettiin 20 pakastettuja Litium-hepariini putkeen otettua plasmanäytettä, jotka kerättiin potilasnäytteistä anonymisti potilastulosten perusteella edellisten kuukausien aikana. Potilasnäytteet valittiin niin, että näytteiden amylaasiaktiivisuudet kattavat verifioitavan menetelmän mittausalueen mahdollisimman hyvin (10–7500 U/L, valmistajan ilmoittama). Näytteet otettiin laskimonäytteenä Litium-hepariini-näyteputkeen, tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin, eroteltiin plasmanäytteeksi ja pakastettiin verifiointia varten. (NordLab 2020.) Tässä verifiointissa käytettiin myös niin sanottuja poolattuja näytteitä. Poolatussa näytteessä oli useista samantasoisista potilasnäytteistä yhdistämällä tehty yksi yhteinen näyte eli pooli. Aineistossa käytettiin kahta poolattua näytettä, joista toinen edusti matalan tason ja toinen korkean tason näytettä.

Lisäksi käytettiin menetelmän toimivuuden varmistamiseen kaupallisia Bio-Rad:n valmistamia Unassayed Multiquel kontrollinäytteitä. Bio-Rad:n humaaniperäiset kontrollit olivat käyttövalmiita liuoksia, jotka sulatuksen jälkeen oli jaettu käyttölaboratoriossa pienempiin käyttöeriin pakasteeseen. Verifiointissa käytettiin ThermoFisher Scientifin valmistaa eCal kalibraattoria ja Amyl (IFCC) reagenssia amylaasimenetelmässä.

6.2 Aineiston analysointimenetelmät ja mittausparametrit

Tutkimus oli määrällinen ja vertaileva analyysi menetelmä, koska vertailun kohteena olivat amylaasin analysoinnista saatavat numeeriset tulokset kahdella eri analysaattorilla. Aineisto analysoitiin tilastomatemaattisin keinoin, saatavat tulokset koottiin Microsoft Excel -taulukointi ohjelmaan. Excel -taulukointi ohjelman avulla laskettiin tulosten keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s), variaatiokerroin (CV) ja korrelaatiokerroin, jonka perusteella tehdään regressiosuora. Edellä mainittujen tulosten perusteella arvioitiin amylaasi menetelmän luotettavuutta.

Toistettavuutta tutkitaan variaatiokerroimen (CV) avulla. Sarjan sisäinen toistuvuus tarkoittaa menetelmän toistettavuutta mittaussarjan sisällä. Sarjojen välinen toistettavuus tarkoittaa menetelmän toistettavuutta eri päivänä eri laitteilla, eri tarvikkeilla tai eri henkilöiden suorittamana. (Hägg 2016: 31) Tarkkuutta arvioidaan regressiosuoran, kulma- ja korrelaatiokerroimen avulla. Seuraavassa esitetään keskiarvon, keskihajonnan, variaatiokerroin, korrelaatiokerroimen, regressiosuoran käsitteet ja laskukaaviot:

Keskiarvo

Keskiarvo (\bar{x} tai \bar{ka}) tarkoittaa lukujen yhteenlaskettua summaa jaettuna lukujen lukumäärällä. (Keskiarvo 2020)

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n}$$

Keskihajonta

Keskihajonta (s tai sd) kuvaa arvojen sijoittumista keskiarvon ympärille. Keskihajonta lasketaan ottamalla varianssista neliöjuuri. (Keskihajonta 2020)

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

Variaatiokerroin

Variaatiokerroin (CV) tarkoittaa keskiarvoon suhteutettua hajontaa. Ilmoitetaan yleensä prosenttilukuna. (Variaatiokerroin 2020)

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Korrelaatio

Korrelaatiokerroin kuvaa muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta. Yleisesti käytetään Pearsonin korrelaatiokerrointa (r), jolla mitataan vain lineaarista yhteyttä. Korrelaatiokerroin vaihtelee -1 :stä $+1$:een. Jos korrelaatiokerroin on lähellä 0, muuttujien välillä ei huomata lineaarista yhteyttä. Kun korrelaatiokerroin on 0, muuttujien välillä voi olla epälineaarista yhteyttä. (Korrelaatio 2020; Pearsonin korrelaatiokerroin 2020)

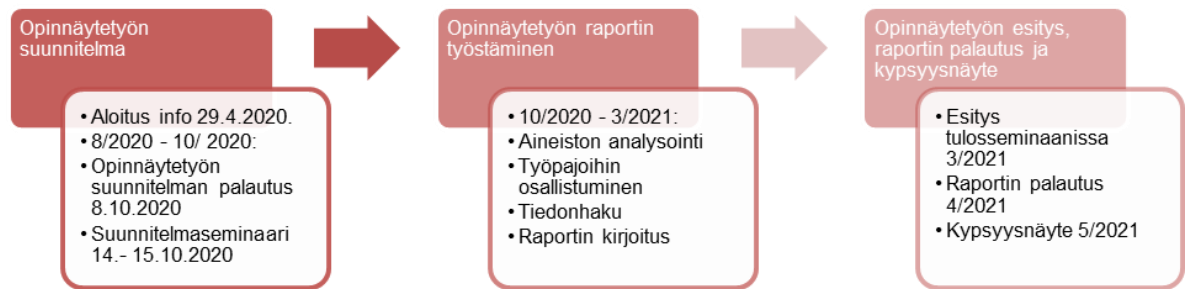
Regressiosuora

Regressiosuoralla mallinnetaan lineaarista regressioanalyysia, eli muuttujien välistä riippuvuussuhdetta. Se mallintaa sitä, kuinka paljon toisen arvon muuttuminen vaikuttaa toisen muuttujan arvon muuttumiseen ja toisinpäin. (Regressioanalyysi 2020)

7 Opinnäytetyön toteutus

Aloittaessa opinnäytetyöprosessia laadittiin alustava suunnitelma aikataulusta (kuvio 7). Opinnäytetyöprosessi alkoi keväällä 2020, Bioanalyytikko SXJ18K2-ryhmälle järjestettävällä infotilaisuudella. Opinnäytetyön aihe saatiin työelämästä NordLab Kajaanin aluelaboratoriosta elokuussa 2020. NordLab on liikelaitoskuntayhtymä, joka toimii Pohjois-Suomen alueella. Pohjois-Suomen laboratoriokeskuksen aluelaboratoriot sijaitsevat Kajaanissa, Kemissä, Kokkolassa, Oulussa ja Rovaniemellä.

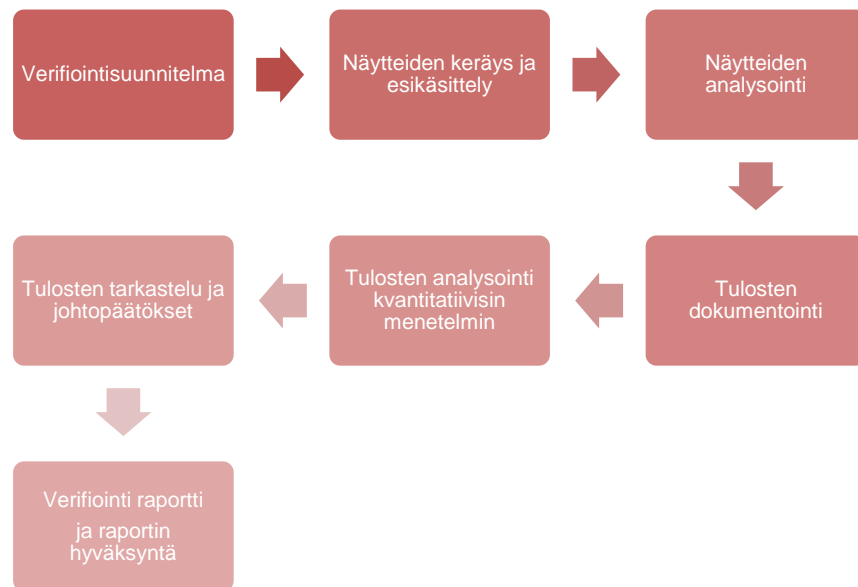
Opinnäytetyön tarkoituksena oli amylaasientsyymi-menetelmän verifiointi Konelab20i –analysaattorilla Sotkamon kuntatoimipisteessä, joka on yksi Kajaanin toimipisteistä. Aiheesta keskusteltiin ohjaavien opettajien ja yhteistyötahon kanssa ja sitä tarkennettiin syyskuun puolella, josta päästiin aloittamaan opinnäytetyönsuunnitelman laatiminen. Opinnäytetyö aloitettiin syksyllä 2020 perehtymällä aiheeseen ja laatimalla opinnäytetyönsuunnitelma. Työtä varten laadittiin NordLabin ja Metropolia Ammattikorkeakoulun kanssa sopimus. Tutkimusluvan jälkeen aloitettiin varsinainen työ (kuvio 7).



Kuvio 7. Opinnäytetyöprosessin aikataulu aloitusinfosta kypsyyinäytteeseen (Kati Kempainen, Maria Oravala 2020)

Verifiointiprosessi eteni Kuvio 8 mukaisesti. Ennen opinnäytetyön aiheen varmistumista amylaasientsyymi -menetelmän kirjallinen verifiointisuunnitelma oli laadittu NordLab Kajaanin menetelmävastuuhenkilön toimesta. Verifiointisuunnitelman mukaan mitattavat parametrit olivat toistettavuus ja tarkkuus. Aineisto oli kerätty, pakastettu ja sulatettu ennen analysointia. Verifioitavan aineiston analysointi suoritettiin Konelab20i- ja Roche Cobas c501-analysointilaitteilla elokuussa 2020 samana päivänä kello 10–14 välillä.

Ennen verifiointia analysointilaitteiden toimivuus oli varmistettu Bio-Rad:n Unassayed Multiquel kontrolleilla, jotka olivat käyttövalmiita sellaisenaan. Kontrollitulokset tarkistettiin, että saadut kontrollitulokset ovat kontrollierän mukaisesti tavoiterajoissa. Kontrollit analysoitiin kolmessa eri tasossa; matala, keskitaso ja korkea. Matalimman kontrollin tavoiterajat amylaasin osalta olivat 37.01–48.75 U/L, keskitason tavoiterajat olivat 111.07–146.29 U/L, korkeimman kontrollin tavoiteraja olivat 242.88–319.90 U/L.



Kuvio 8. Verifiointiprosessi (Kati Kempainen ja Maria Oravala 2021)

Tässä amylaasientsyymien verifiointissa määritettiin verifiointiparametrit suorittamalla mittaussarjoja. Toistettavuutta mitattiin sarjan sisäisellä toistuvuudella (CVsis%) ja sarjojen välisellä toistuvuudella (CVväl%). Uutta amylaasientsyymi menetelmää varten sarjan sisäistä toistettavuutta testattiin potilasnäytevertailun avulla. Sarjan sisäistä toistettavuutta mitattaessa, analysoitiin matalan ja korkean tason poolattua näytettä 10 kertaa. Analysaattorin kykyä toistaa sarjojen välistä toistettavuutta mitattiin käyttäen Bio-Rad Unassayed Multiquel kontrolliliuoksia kolmessa eri tasossa, joita analysoitiin kymmenä eri päivänä.

Amylaasientsyymien analysaattorien välistä tarkkuutta mitattiin analysoimalla 20 potilasnäytettä. Konelab20i –analysaattorin tuloksia verrattiin Rochen Cobas c501-analysaattorilla saatuihin tuloksiin. Mittausalue, joka on 10–7500 U/L oli ilmoitettu valmistajan Thermo Fisher Scientific toimesta.

Verifiointi tulosten ja aineiston analysoinnissa käytettiin Microsoft Excel -taulukointiohjelmaa sekä Microcal Origin 50 –statistiikka ohjelmaa. Analysoinnista saadut kontrollitulokset, poolattujen näytteiden tulokset sekä 20 potilasnäytteiden tulokset kirjattiin Excel-taulukkoon, joista laskettiin tulosten keskiarvo (ka) ja eroprosentti (ero%). Tulostaulukoista saatiin selville näytteiden keskiarvo, keskihajonta, variaatiokerroin, ja analysoitiin lineaarisuus, ja korrelaatiokerroin sekä hajontakuviot, joiden avulla arvioitiin menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta. Näiden kaavioiden ja tulostasovertailun avulla pääteltiin, soveltuuko menetelmä aiottuun käyttötarkoitukseensa.

8 Tulokset

Sotkamon toimipisteen Konelab20i –analysointilaitteen tuloksia verrattiin Nordlab Kajaanin aluelaboratorion Roche Cobas c501 -analysointilaitteelta saatuihin tuloksiin, koska Kajaani toimii referenssilaboratoriona. Verifiointin tarkemmat tulokset esitetään seuraavissa kappaleissa taulukoina ja graafisina kuvioina. Verifiointissa mitattiin sarjojen välistä ja sarjojen sisäistä toistettavuutta sekä tarkkuutta.

8.1 Sarjojen välinen toistuvuus

Toistettavuutta mitattiin Bio-Rad:n kolmen eri tason humaniperäisillä sisäisen laadunohjauksen kontrolleilla 10:nä eri päivänä. Bio-Rad kontrolliliuokset ovat valmiita pakastettuja liuoksia, jotka sulatetaan ja jaetaan käyttölaboratoriossa pienempiin käyttöeriin. Bio-Rad matalan tason kontrollin keskiarvoksi saatiin 46,60 U/L, keskitason Bio-Rad 2-kontrollin keskiarvo oli 140,20 U/L, korkean tason keskiarvoksi saatiin 309,60 U/L (taulukko 1).

Taulukko 1. Sarjojen välinen toistettavuus

Analyysointi kerta	Taso 1 U/L	Taso 2 U/L	Taso 3 U/L
1	46	138	310
2	47	141	308
3	47	140	310
4	47	141	312
5	46	142	310
6	47	139	307
7	47	139	309
8	46	141	312
9	47	141	310
10	46	140	308
Ka	46,60	140,20	309,60
S	0,52	1,23	1,65
CVväl%	1,11	0,88	0,53
n	10	10	10
Sallittu ero%	3	3	3

8.2 Potilasnäytevertailu

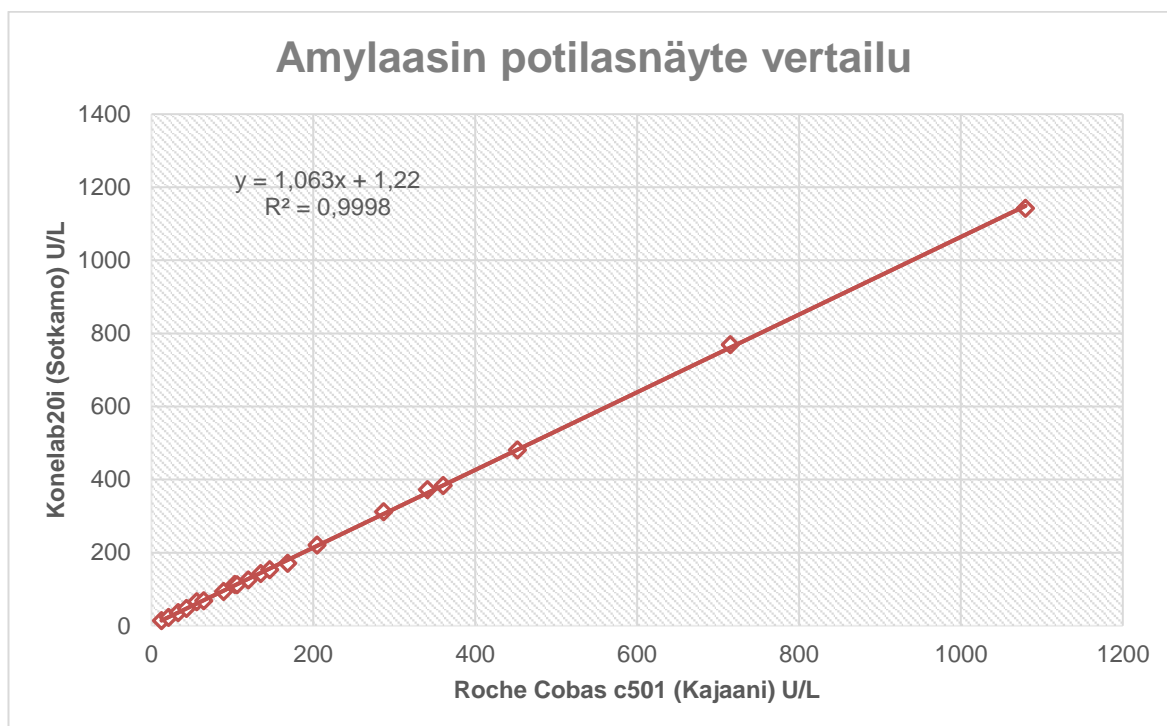
Potilasnäytevertailulla mitattiin mittauksen tarkkuutta. Molemmilla analyysiaattoreilla analysoitiin 20 potilasnäytettä. Tuloksista laskettiin analyysiaattoreilta saatujen tulosten erotus (ero U/L) sekä eroprosentti (ero%), jotka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Potilasnäytevertailun tulokset (Roche Cobas c501 ja Konelab20i)

Näyte	Roche Cobas c501 U/L	Konelab20i U/L	ERO U/L	ERO%
1	12,4	14	1,60	12,90 %
2	21,2	23	1,80	8,49 %
3	33	36	3,00	9,09 %
4	43,4	47	3,60	8,29 %
5	55,7	66	10,30	18,49 %
6	64,4	68	3,60	5,59 %
7	103	113	10,00	9,71 %
8	89,1	94	4,90	5,50 %
9	105,6	112	6,40	6,06 %
10	119,5	125	5,50	4,60 %
11	135,1	143	7,90	5,85 %
12	145,9	153	7,10	4,87 %
13	168	171	3,00	1,79 %
14	204,7	221	16,30	7,96 %
15	286,7	312	25,30	8,82 %
16	341	372	31,00	9,09 %
17	360,3	384	23,70	6,58 %
18	452,1	481	28,90	6,39 %
19	715,2	769	53,80	7,52 %
20	1079,7	1142	62,30	5,77 %
Keskiarvo	226,8	242,3		7,67 %
Tasoero %		6,83 %		12,00 %

Kuviossa 9 esitetään potilasnäytevertailu kaaviona, jossa oli analysoitu 20 potilasnäytettä, joista saadut Konelab20i –analyysiaattorin tulokset ovat lähes yhteneväisiä Roche Cobas c501:n tulosten kanssa. Analyysiaattoreilta saatuja potilasnäytteiden pitoisuuksien eroavaisuutta (U/l) verrataan keskenään. Pisteiden sijoittuminen lineaarisesti kertoo tulosten yhteneväisyydestä. Mittausten välillä on voimakas yhteys, joka näkyy nousevana regressiosuorana ja pisteiden sijoittumisena regressiosuoran linjalle. Roche Cobas c501

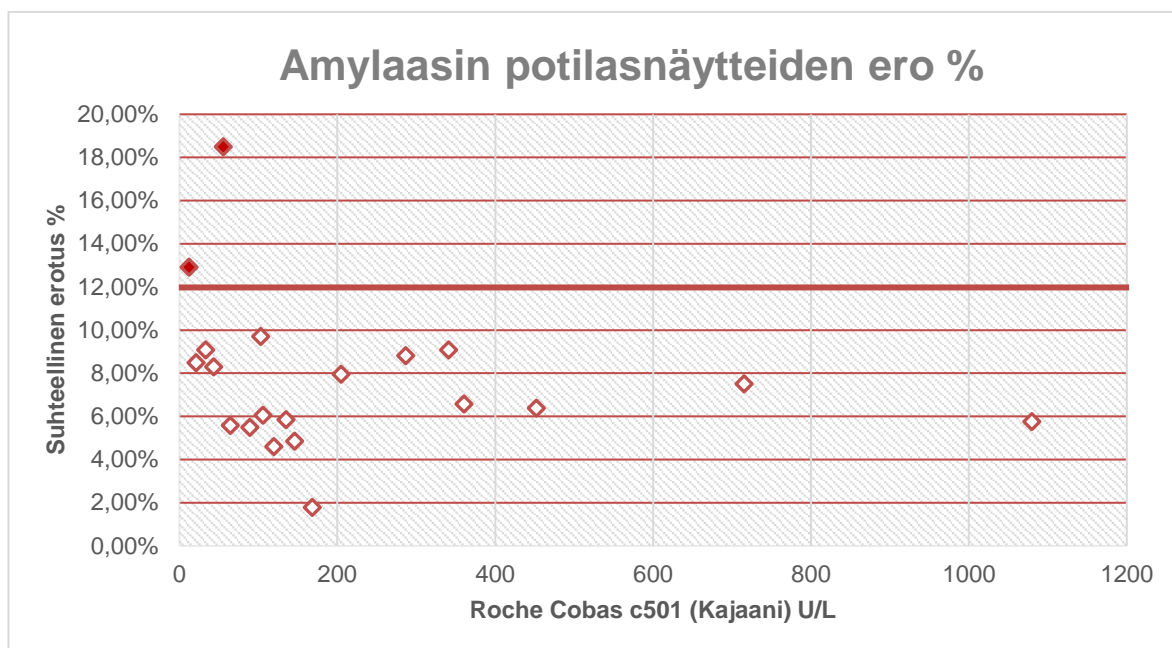
referenssianalysaattorin mittausten avulla pystytään selittämään 99,8 % ($=R^2$) Konelab20i –analysaattorin mittausten vaihtelusta. Yhteyttä kuvaa malli $\text{Konelab20i (y)} = 1,063 * \text{Roche Cobas c501 (x)} + 1,22$.



Kuvio 9. Potilasnäytteiden vertailu graafisena esityksenä. Konelab20i potilasnäytteiden tuloksia verrataan Roche Cobas c501 potilastuloksiin.

Kuviossa 10 havainnollistetaan potilasnäytteiden prosentuaaliset poikkeavuudet verrattuna Konelab20i –analysaattorin antamia tuloksia Roche Cobas c501 –analysaattorin antamiin tuloksiin. Molemmilta analysaattoreilta saatujen tulosten ollessa täysin yhteneväiset ero prosentiksi saataisiin nolla. NordLabin tavoite 12 %, kaksi näytettä eroaa enemmän kuin tavoite ero%. Suurin osa tuloksista sijoittuu välille 4 %–10 %.

Vertailtava laite (Konelab20i) antaa suurempia mittaus tuloksia kuin referenssi analysaattori (Roche Cobas c501). Pienissä mittaus tuloksissa erot ovat suurempia. Mittausten keskiarvojen ero prosentista näkyy sama kuin mitä keskiarvo kertoo.



Kuvio 10. Tulosten graafinen esitys Konelab20i ja Roche Cobas c501 analysaattoreiden tuloksista (potilasnäytteiden ero %) suhteessa Roche Cobas c501 referenssi analysaattorin tuloksiin. Viiva esittää NordLabin laatu tavoitetta (12 %).

8.3 Sarjan sisäinen toistuvuus

Sarjan sisäistä toistuvuutta mitattiin matalalla (näyte1) ja korkealla (näyte2) poolatulla näytteellä. Taulukossa 3 on esitetty saadut tulokset. Näyte 1 analysoitiin 10 kertaa peräkkäin, näytteen amylaasiaktiivisuuden keskiarvoksi saatiin 26,3 U/L. Näyte 2, jota analysoitiin myös 10 kertaa peräkkäin, josta näyte 2 amylaasiaktiivisuuden keskiarvoksi saatiin 301,50 U/L.

Taulukko 3. Sarjan sisäinen toistuvuus Konelab20i -analysaattorilla

Analysointi kerta	NÄYTE 1 (matala) U/L	NÄYTE 2 (korkea) U/L
1	25	294
2	26	301
3	27	304
4	27	305
5	27	305
6	26	304
7	26	302
8	26	300
9	26	299
10	27	301
KA	26,3	301,5
S	0,68	3,38
Cvsis%	2,57	1,12
n	10	10
Sallittu ero%	2	2

9 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Tässä verifiointissa NordLab Sotkamon Konelab20i -analysaattorin antamia tuloksia verrattiin NordLab Kajaanin Roche Cobas c501 -analysaattorin tuloksiin. Näin toimiessa varmistettiin alueellisten menetelmien tulosten yhteneväisyyttä, mikä on tärkeää, koska potilasnäytteitä pitää voida määrittää eri laboratorioissa tulostason pysyessä samana.

Amylaasientsyymin verifiointissa sarjan sisäisen toistuvuuden laatutavoitteeksi oli määritetty 2.00 (CV%) ja sarjojen välisen toistuvuuden laatutavoitteeksi oli määritetty 3.00 (CV%) (NordLab 2020). Sarjan sisäistä toistettavuutta mitattaessa näyte 1 analysoitiin 10 kertaa peräkkäin, joiden amylaasiaktiivisuuden tulosten keskiarvoksi saatiin 26,3 U/L. Näin ollen näyte 1:n keskiarvo sijoittuu viitevälin 25–120 U/L alarajalle. Näytteen 1 CV% saadaan 2.57, joka ylittää NordLabin laatutavoitteen, mutta tällä ei ole kliinistä merkitystä, koska tulokset ovat käytännössä välillä 25–27 U/L. Näyte 2, jota analysoitiin myös 10 kertaa peräkkäin, josta näyte 2 amylaasiaktiivisuuden keskiarvoksi saatiin 301,50 U/L. Tämän näytteen CV% täyttää NordLabin laatutavoitteen, joka on 2.00 %.

Sarjojen välisen toistettavuuden kolmen eri tason (CVväl%) tulokset sijoittuvat välille 0,53–1,11, joten ne täyttävät NordLabin laatutavoitteen eli 3.00 %. (Nordlab 2020). Sarjan välisellä toistettavuudella varmistettiin Konelab20i -analysaattorin toiminta, tuloksia ei kuitenkaan oteta huomioon varsinaisessa menetelmävertailussa.

Potilasnäytevertailun näytteiden tuloksista kaksi näytettä (näyte 1 ja näyte 5 taulukossa 2) poikkeavat NordLabin laatutavoitteesta (12.00 %). Näyte 1 Roche Cobas c501 tulos on 12.40 U/L ja Konelab20i tulos 14.0 U/L, jolloin prosentteina ero on 12,90 %. Erolla ei kuitenkaan ole kliinistä merkitystä, koska molempien analysaattoreiden antamat tulokset ovat selkeästi alle viitevälin (25–120 U/L). Näyte 5 Roche Cobas c501 tulos on 55.7 U/L ja Konelab20i tulos 66.00 U/L, ero prosentiksi saadaan 18.49 %. Näytteen 5 antama poikkeama tulkitaan satunnaisvirheeksi. Vertailuissa todettiin Konelab20i:n suhteelliseksi eroksi +7.67 %, mikä täyttää NordLabin asettaman laatutavoitteen maantieteellisesti eri tiloissa oleville laitteille (12 %).

Amylaasimenetelmän verifiointiin liittyvien tulosten analysointi osoittaa, että Sotkamon Konelab20i -analysaattorin uuden amylaasimenetelmän tulokset vastaavat hyvin NordLab Kajaanin Roche Cobas c501 tuloksia. Tulokset täyttävät NordLabin kriittisimmät laatutavoitteet ja menetelmä soveltuu hyvin aiottuun käyttötarkoitukseensa. Lopullisen verifiointiraportin hyväksyi menetelmävastuuhenkilö.

10 Pohdinta

Tässä opinnäytetyöprosessissa tarkasteltiin ja syvennyttiin verifiointiprosessiin. Tämän lisäksi analysoimme verifiointista jo aiemmin saadut testitulokset kvantitatiivisin keinoin. Verifiointi on tärkeä osa laadunhallintaa laboratorio työskentelyssä, koska verifiointilla varmistetaan analysaattoreiden toimivuus ja menetelmän luotettavuus käyttötarkoitukseen. Onnistuneen verifiointin ja päivittäisten huoltotoimenpiteiden jälkeen potilastuloksia voidaan vastata luotettavasti.

Tavoitteenamme oli saada opinnäytetyön raportissa verifiointiprosessi avattua kokonaisvaltaisesti ja kirjoittaa se auki selkeästi ja ymmärrettävästi lukijaa ajatellen. Mielestämme onnistuimme tässä hyvin, koska kävimme verifiointi prosessin vaihe vaiheelta läpi ja erottelimme ja kirjasimme prosessin eri vaiheet kaavio kuvaksi. Lisäksi raportistamme selviää verifiointissa tarvittavat keskeiset käsitteet ja parametrit. Opinnäytetyöraporttia voisi

hyödyntää lisämateriaalina esim. bioanalyttikko-opiskelijoiden opetuksessa ja syventyessä biokemian osa-alueeseen.

10.1 Luotettavuus

Kvantitatiivisen tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida tarkastelemalla tutkimuksen validiteettia ja reliabiliteettia. Validiteetti kertoo siitä, onko tutkimuksessa mitattu sitä, mitä siinä on ollut tarkoitus mitata. Reliabiliteetti kertoo tulosten pysyvyydestä eli kyvystä tuottaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. (Kankkunen, Vehviläinen-Julkunen 2013. s.189.)

Verifioinnissa käytettiin pakastettuja plasmanäytteitä, jotka lähetettiin Kajaanin aluelaboratoriosta sisäisellä postilla Sotkamon toimipisteeseen analysointia varten. Ennen pakastusta näytteiden laatu oli tarkistettu hemolyysin, ikteerisyyden ja lipeemisyysosalta. Luotettavuutta lisäsi myös oikeaoppinen säilytys ja kuljetus. Aineisto voidaan katsoa luotettavaksi, koska on toimittu organisaation mukaisten käytäntöjen mukaisesti. Menetelmän tulostason oikeellisuutta varmennetaan jatkossa ulkoisilla laadunarviointikierroksilla esim. Labquality–kierroksilla.

Opinnäytetyöprosessin aikana haimme tietoa erilaisista tietokannoista kuten PubMed, Google Scholar, ja NordLabin tutkimusohjekirja. Kiinnitimme erityistä huomiota lähteiden luotettavuuteen ja monipuolisuuteen. Pyrimme käyttämään erilaisia lähteitä monipuolisesti, mukaan lukien kansainväliset lähteet. Huolehdimme siitä, että käyttämämme kirjat, artikkelit ja lehdet ovat mahdollisimman tuoreita. Erityisesti toteutus vaiheessa käytimme hyväksi kirjallisuutta liittyen tilastollisiin menetelmiin. Käytetyt kirjalliset lähteet olivat luotettavia ja tutkittuun tietoon perustuvia.

10.2 Eettisyys

Tutkimuksen eettisyys on tieteellisen tutkimuksen lähtökohta. Tutkimuksen yksi perusvaatimuksista on, ettei tutkimusaineistoa väärennetä tai tekaista. Suomessa tutkimuksen eettisyyttä turvataan Helsingin julistuksen (1964) mukaisesti. Helsingin julistuksen uusi suomennos on hyväksytty Suomen Lääkäriliiton hallituksessa 10.5.2001 ja se on kansainvälisesti hyväksytty tutkimusetiikan ohjeistukseksi. (Kankkunen, Vehviläinen-Julkunen 2013. s.211–212.) Työtä tehdessä varmistettiin, ettei verifioinnissa käytettyjä näytteitä voida identifioida. Plagiaatintunnistusjärjestelmän avulla tarkistettiin, että teksti on itse tuotettua eikä kopioitua tai lainattua (Arene 2020).

Bioanalyttikoiden ja laboratoriohoitajien eettisen ohjeiden mukaan bioanalyttikon velvollisuus on ylläpitää ja kehittää osaamistaan. Bioanalyttikon tulee kyetä omaksumaan uusia näyttöön perustuvia ja hyväksytyjä menetelmiä ja toimintatapoja. Bioanalyttikon tulee tutustua ammattitoimintaansa koskeviin säädöksiin, määräyksiin, standardeihin ja suosituksiin. (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry 2017). Bioanalyttikko vastaa laboratoriotutkimusten laadusta ja luotettavuudesta laboratoriotutkimuksen kaikissa vaiheissa pre-analyttisestä vaiheesta post-analyttiseen vaiheeseen. Bioanalyttikko kantaa vastuuta myös oman ammattinsa ja työyhteisönsä kehittämisestä. Bioanalyttikko osallistuu työssään verifiointiprosessiin ja näin ollen olisi hyvä tuntee verifiointiprosessi ja työhön liittyvät eettiset ohjeet. Bioanalyttikko toimii työssään eettisten ohjeiden ja periaatteiden mukaisesti ja näin voidaan varmistua luotettavista käytännöistä laboratoriotyöskentelyssä verifiointiprosessiin liittyen.

10.3 Opinnäytetyöprosessin ja ammatillisen kasvun arviointi

Opinnäytetyöprosessia aloittaessamme toiveemme oli, että opinnäytetyön aihe olisi käytännön läheinen sekä kehittäisi ja syventäisi ammatillista osaamistamme tulevina bioanalyttikkoina. Aiheena amylaasin verifiointi oli mielenkiintoinen ja vastasi toivettamme käytännönläheisyyteen liittyen. Opinnäytetyöprosessin aikana pääsimme perehtymään kliiniseen kemian osa-alueeseen syvemmin sekä näkemään käytännössä mitä verifiointiprosessi pitää sisällään suunnitelmasta raporttiin saakka. Aiheena verifiointi on ammatillista kasvua tukevaa, koska bioanalyttikko osallistuu työssään verifiointiprosessiin käytännönläheisesti analysoimalla tarvittavat näytteet. Bioanalyttikon tulee ymmärtää myös tulosten merkitys ja laatuun liittyvät seikat. Mielestämme saimme vastaukset asettamiimme tutkimuskysymyksiin. Saimme selvitettyä mitä tarkoittaa termit validointi ja verifiointi sekä niiden eroavaisuudet. Opinnäytetyön raportissa selvitetään mitä verifiointiprosessissa tapahtuu sekä mitä parametrejä käytetään. Tästä myös selviää, kuinka näiden parametrien avulla varmistetaan tulosten luotettavuus. Lopuksi opinnäytetyön raportissa selvitimme, kuinka tuloksia tarkastellaan ja raportoidaan.

Aiheen saatuaamme ja työtä aloittaessamme haasteeksi nousi, kuinka saamme opinnäytetyön raportin sisällöllisesti riittävän kattavaksi, koska verifiointiprosessi oli aloitettu. Aiheeseen syvennyttyämme huomasimme mahdollisuutemme kertoa ja avata itse verifiointiprosessia enemmän opinnäytetyön raportissa. Haastavana tekijänä opinnäytetyö-

prosessissa koimme tilastomatematiikkaan liittyvät osiot sekä kemiaan liittyvät asiat. Kemiaan liittyen erityisiä haasteita tuotti analyysoijan sisällä tapahtuvat toiminnot, joita ei omin silmin näy, eli fotometria ja reaktioyhtälön ymmärtäminen ja kirjaaminen auki.

Opinnäytetyön prosessi oli kokonaisuutena hyvin intensiivinen. Aikataulullisesti haasteita emme kokeneet; olimme tehneet alustavan suunnitelman aikataulusta ja pysyimme siinä. Etenimme johdonmukaisesti koko prosessin ajan, teimme työtä vähän kerrallaan, mutta tapasimme usein opinnäytetyön parissa. Emme nähneet tarpeelliseksi jakaa osia alueita keskenään, vaan toimimme koko prosessin ajan yhdessä. Mielestämme tämä antoi molemmille yhdenmukaisen ymmärryksen asioista. Kieliasun luominen yhteiseksi oli helpompaa, kun tuotimme tekstiä yhdessä.

Opiskelijoina yhteistyömme sujui hyvin ja opinnäytetyötä oli mukavaa tehdä. Molemmat osallistuivat prosessiin tasapuolisesti, pääsääntöisesti tuotimme tekstiä yhdessä pohdittujen. Työelämästä opinnäytetyötämme ohjasi NordLab Kajaanin ylikemisti, joka vahvisti johtopäätöksemme. Häneltä saimme ohjausta ja tukea prosessin aikana verifiointiin liittyen, lähinnä kemiaan ja analysointiin liittyvien termien oikeaan käyttöön sekä asiakokonaisuuksien ymmärtämisessä. Metropolia Ammattikorkeakoulun ohjaavalta opettajalta saimme tukea opinnäytetyön sisältöön ja sen riittävyteen ja siihen, että opinnäytetyö on arviointikriteereiden mukainen. Molemmilta ohjaajilta saimme palautetta ja apua sitä tarvitessamme, yhteistyö sujui ongelmitta. Vastasimme opinnäytetyölle asettamiimme tutkimuskysymyksiin mielestämme kattavasti ja ymmärrettävästi. Saimme itse selkeän kuvan sekä verifiointi- että opinnäytetyöprosessista.

Lähteet

Amylase (IFCC). 2019. Reagenssipakkausinsertti. Thermo Scientific.

Arene 2020. Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Päivitetty 9.1.2020. Saatavana osoitteessa: <<http://www.arene.fi/julkaisut/raportit/opinnaytetoiden-eettiset-suositukset/>>. Luettu 1.10.2020.

Aritmeettinen keskiarvo. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <https://www.stat.fi/meta/kas/aritmeet_ka.html>. Luettu 10.1.2021.

Barbieri, John S., Riggio Jefferey M. & Jaffe Rebecca. 2016. Amylase testing for abdominal pain and suspected acute pancreatitis. *Journal of Hospital Medicine* Toukokuu 2016; 11 (5). 366–368. Saatavana myös sähköisesti osoitteessa: <<https://www.journalofhospitalmedicine.com/jhospmed/article/127955/amylase-testing-acute-pancreatitis>> Luettu 26.9.2020.

Bjällie Jan G. – Haug Egil – Sand, Olav – Sjaastad Øystein V. – Toverud Kari C. 2009. *Ihminen - Fysiologia ja anatomia*. 1–6. painos WSOY.

Entsyymit. 2006. *Solubiologia*. Solunetti. Saatavana osoitteessa: <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymit1/2/>>. Luettu 10.2.2021.

Heikkilä, Tarja. 2014. *Tilastollinen tutkimus*. 9. uudistettu painos. Porvoo: Edita Publishing Oy.

Hiltunen, Erkki – Linko, Linnea – Hemminki, Sari – Hägg, Margareta – Järvenpää, Eila – Saarinen, Pertti – Simonen, Seppo – Kärhä, Petri (toim.) 2011. *Laadukkaan mittauksen perusteet*. Metrologian neuvottelukunta ja Mittatekniikan keskus, MIKES. Saatavana osoitteessa <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>>. Luettu 15.1.2021.

Holopainen, Martti – Pulkkinen Pekka. 2008. *Tilastolliset menetelmät*. 5.–6. painos. Helsinki: WSOY oppimateriaalit Oy.

Hägg Margareta (toim.) 2016. *Validoinnin suunnittelu opas*. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy Espoo. Saatavana osoitteessa:<<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 4.9.2020.

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2021. About IFCC. Saatavana osoitteessa: <<https://www.ifcc.org/about/>>. Luettu 2.3.2021.

Jokela, Hannu 1998. *Entsyyttiset menetelmät*. Teoksessa *Lääketieteen Kandidaattiseura ja Vilpo, Juhani (toim.). Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus

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

Keskihajonta. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <<https://www.stat.fi/meta/kas/keskihajonta.html>>. Luettu 10.1.2021.

Konelab Servise Manual. 2003. Käyttöohje. Thermo Electron Corporation.

Korrelaatio. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <<https://www.stat.fi/meta/kas/korrelaatio.html>>. Luettu 10.1.2021.

Labquality 2020. Validointi ja verifiointi. Saatavana osoitteessa: <https://www.labquality.fi/vieritestisuositus/luotettava_vieritesti/validointi_verifiointi/>. Luettu 2.9.2020.

Laitinen Harri 2017. Validointi ja verifiointi tehokkaasti. MOODI 2/2017. 33-34. Saatavana myös osoitteessa <https://digiplus.fi/www/Moodi/2017Moodi_2/#/34/>. Luettu 5.9.2020.

Laitinen Seppo, Nagy Irina, Liimatainen Sinikka, Nelo Katri, Vuolteenaho Olli 2020. Verifiointisuunnitelma. NordLab.

Maailman tietosanakirjamainen tietoa 2018. Swewe. Saatavana osoitteessa: <http://fi.swewe.net/word_show.htm/?78418_1&Haiman_amylaasi>. Luettu 12.12.2020

Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. Senkka ja 100 muuta tutkimusta. Kustannus OY Duodecim.

Nieminen Urpo 2001. Makroamylasemia; veren suuri amylaasipitoisuus ilman sairautta. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 2/2001. 1257–1260. Saatavana myös osoitteessa <<https://www.duodecimlehti.fi/duo92325>>. Luettu 8.2.2021.

NordLab 2017. Amylaasi, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Saatavana osoitteessa: <http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4589&terms=-amyl>. Luettu 26.9.2020.

NordLab 2018. Lipaasi, plasmasta, paastotilasta. Tutkimusohjekirja. Saatavana osoitteessa: <http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=10305&terms=lipaasi>. Luettu 26.9.2020.

Pearsonin korrelaatiokerroin. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <https://www.stat.fi/meta/kas/pearson_kor_ker.html>. Luettu 10.1.2021.

Pearsoninkerroin. Tilastokoulu. Johdatus tilastotieteeseen. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <https://tilastokoulu.stat.fi/verkkokoulu_v2.xql?course_id=tkoulu_tilaj&lesson_id=4&subject_id=4&page_type=sisalto>. Luettu 10.1.2021.

Penttilä, Ilkka 2003. Ruuansulatuskanavan ja maksan toiminnan häiriöt ja niiden tutkiminen. Teoksessa Ilkka Penttilä (toim.). Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Pereira, Paulo 2020. Part 2 – ISO 15189; 2012 "Medical laboratories – Requirements for quality and competence". Westgard QC. Päivitetty tammikuu 2020 <<https://www.westgard.com/iso-15189-2012-requirements-1.htm>>. Luettu 9.9.2020.

Putkijärjestys vakuuminäytteenotossa. 2020. Synlab. Saatavana osoitteessa: <<https://www.yml.fi/laboratoriokasikirja/verinaytteenottoputket-naytteenottojarjestyksessa>> Luettu. 2.9.2020.

Puukka Katri, Liimatainen Sinikka, Hegberg Pirjo, Mäntynen Vesa, Väisänen Marja-Leena, Ikäheimo Irma, Kauranen Jari 2020. Validointi ja Verifiointi.

Regressioanalyysi. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: < <https://www.stat.fi/meta/kas/regressioanalyy.html>>. Luettu 10.1.2021.

Roelofsen-de Beer, Roseri, Wielders, Jos, Boursier, Guilaine, Vodnik, Tatjana, Vanstapel, Florent, Huisman, Willem, Vukasović, Ines, Vaubourdolle, Michel, Sönmez, Çiğdem, Linko, Solveig, Brugnoli, Duilio, Kroupis, Christos, Lohmander, Maria, Šprongl, Luděk, Bernabeu-Andreu, Francisco, Meško Brguljan, Pika & Thelen, Marc 2019. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) Marraskuu 2019 58 (3) Saatavana myös osoitteessa: <<https://www.degruyter.com/view/journals/cclm/58/3/article-p361.xml>>. Luettu 4.9.2020.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Saatavana osoitteessa: <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Luettu 13.1.2021.

Theodorsson, Elvar 2017. Uncertainty in Measurement and Total Error Tools for Coping with Diagnostic Uncertainty. Clin Lab Med 37/2017. 15-34. Saatavana osoitteessa: <<https://www.jclm.org/media/1076/theodorsson-clin-lab-med-2017.pdf>>. Luettu 15.1.2021.

Thermo Scientific Konelab 20 Brochure. 2008. Esite. Thermo Fisher Scientific. Saatavana osoitteessa: <<https://www.medwrench.com/documents/view/889/thermo-scientific-konelab-20-brochure>>. Luettu 5.10.2020.

Thermo Scientific. 2008. Esite. Technical Specification Konelab 20. 2008. <<https://pdf.medicaexpo.com/pdf/thermo-scientific/konelab-20/78678-85059.html>> Luettu 6.10.2020.

Variaatiokerroin. 2020. Tietoa tilastoista. Käsitteet. Tilastokeskus. Saatavana osoitteessa: <<https://www.stat.fi/meta/kas/variaatiokerroi.html>>. Luettu 10.1.2021.

Verenaineosat. 6.5.2016. Duodecim Terveyskirjasto. Saatavana osoitteessa:
<https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02011> Luettu
2.9.2020.