



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Netta Koskinen, Kati Nevalampi

Hemolyysi-indeksin verifiointi kemian ja immunokemian tutkimuksille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyytikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

11.11.2019

Tekijät Otsikko	Netta Koskinen ja Kati Nevalampi Hemolyysi-indeksin verifiointi kemian ja immunokemian tutkimuksille
Sivumäärä Aika	120 sivua 11.11.2019
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	kemisti Mia Sneck erikoistuva kemisti Eveliina Korhonen lehtori Merja Ojala
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää, minkä asteinen hemolyysi vaikuttaa tutkittavien analyttien mittaustuloksiin kliinisesti merkittävästi ja luoda hemolyysi-indeksille raja-arvot Siemens Healthineersin Atellica® Solution -laitteelle. Työ toteutettiin HUSLAB-talon automaatiolaboratoriossa Helsingin Meilahdessa.</p> <p>Opinnäytetyötä varten valmistettiin neljä eritasoista hepariiniplasmapoolia, yksi fluoridiok-salaattiplasmapooli, kaksi EDTA-plasmapoolia ja hemolysaatti. Pooleista valmistettiin hemolysaattilaimennossarjat, joihin lisättiin kasvavina pitoisuuksina hemolysaattia. Sarjoihin lisättiin myös vettä. Hepariininäytesarjoista analysoitiin AFOS, ALAT, ASAT, CK, CRP, haptoglobiini, kalium, LD, CK-MBm ja myoglobiini kahtena rinnakkaisena mittauksena. Fluoridioksalaattinäytesarjasta analysoitiin laktaatti ja EDTA-näytesarjoista ammoniumioni kahtena rinnakkaisena mittauksena. Tulokset analysoitiin Microsoft Excel -taulukko-ohjelmaa käyttäen. Hemolyyttisille näytteille laskettiin variaatiokertoimet Dahlbergin menetelmällä. Hemoglobiinipitoisuuksien raja-arvot määritettiin HUSLABin sisäisen variaatiokertoimen laatuavoitteiden perusteella analyttikohtaisesti. Hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruutta tarkasteltiin erotuksen ja eroprosentin avulla referenssitason verraten.</p> <p>Hemolyysi ei aiheuttanut kliinisesti merkittävää poikkeamaa myoglobiini- ja CRP-tuloksiin. LD-, kalium-, ammoniumioni- ja ASAT-pitoisuudet nousivat merkittävästi jo alhaisilla hemoglobiinipitoisuuksilla (alle 0,5 g/l). ALAT- ja CK-pitoisuudet nousivat merkittävästi kohtalaisilla hemoglobiinipitoisuuksilla (alle 1,5 g/l). Laktaattipitoisuus nousi merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 4 g/l. AFOS-pitoisuus laski merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 1,5 g/l ja haptoglobiinipitoisuus laski hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,2 g/l. Haptoglobiini-, CRP- ja myoglobiinitutkimuksissa analyttien pitoisuustasolla ei ollut vaikutusta hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen. ALAT-, AFOS-, ASAT-, CK- ja LD-tutkimuksissa hemolyysi aiheutti suhteellisesti suuremman muutoksen matalilla analyttipitoisuuksilla korkeisiin verrattuna.</p> <p>Analyttien pitoisuuden nousu johtui tyypillisesti punasolujen sisältämistä komponenteista. Spektrofotometrisen interferenssin vaikutus tuloksiin arvioitiin melko pieneksi. Opinnäytetyössä tuotetut tulokset ovat sovellettavissa Atellica® Solution -laitteelle konfiguroitavina hemolyysi-indeksin rajoina.</p>	
Avainsanat	hemolyysi, hemolyysi-indeksi, interferenssi

Authors Title	Netta Koskinen and Kati Nevalampi Verification of Hemolysis Index in Clinical Chemistry and Immunochemistry Testing
Number of Pages Date	120 pages 11 November 2019
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Mia Sneck, Clinical Biochemist Eveliina Korhonen, Specializing Chemist Merja Ojala, Lecturer
<p>The purpose of this final project was to determine whether hemolysis causes a clinically significant change in the measuring results of the analytes that were chosen for this project. The aim was to generate hemolysis index decision limits for each analyte using Atellica® Solution system by Siemens Healthineers. The project was carried out in the HUSLAB Automation Laboratory in Meilahti, Helsinki.</p> <p>Four heparin plasma pools, one fluoride-oxalate plasma pool, two EDTA plasma pools and a hemolysate were prepared. All the pools were divided evenly into seven tubes and hemolysate was gradually added into them. Water was also added. ALP, ALT, AST, CK, CRP, haptoglobin, potassium, LD, CK-MBm and myoglobin were analyzed from the heparin sample sets as two parallel measurements. Lactate was analyzed from the fluoride-oxalate sample set and ammonium ion from the EDTA sample sets also as two parallel measurements. The results were analyzed with Microsoft Excel. Dahlberg's equation was used to calculate the coefficient of variation for each hemolyzed sample and HUSLAB's target values for the coefficient of variation were used to evaluate the threshold value for the hemoglobin concentration. The degree of interference caused by hemolysis was analyzed using percentage calculations and the results were compared to the non-hemolyzed reference level.</p> <p>Hemolysis had no clinically significant impact on the values of myoglobin and CRP. The concentrations of LD, potassium, ammonium ion and AST raised significantly at low hemoglobin concentrations (below 0,5 g/l). The values of ALT and CK elevated significantly at moderate hemoglobin concentrations (below 1,5 g/l). The values of lactate elevated significantly when hemoglobin concentration exceeded 4,0 g/l. The values of ALP decreased when hemoglobin concentration exceeded 1,5 g/l. The values of haptoglobin decreased when hemoglobin concentration exceeded 0,2 g/l. In the haptoglobin, CRP and myoglobin measurements the level of analyte concentration had no effect on the extent of the hemolysis interference. In the ALT, ALP, AST, CK and LD measurements hemolysis caused a relatively bigger change at low analyte concentrations compared to high analyte concentrations.</p> <p>The increase in the concentration of the analytes was typically due to the components within the red blood cells. The effect of spectrophotometric interference on the results was estimated to be quite insignificant. The results of this final project can be applied as the configurable hemolysis index decision limits for the Atellica® Solution system.</p>	
Keywords	hemolysis, hemolysis index, interference

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Hemolyysi ja sen mittaaminen	2
2.1	Hemolyysi <i>in vivo</i> ja <i>in vitro</i>	3
2.2	Hemolyysin seuraukset	4
2.3	Hemolyysin mittaaminen hemolyysi-indeksin avulla	5
2.4	Hemolyyttisen näytteen aiheuttamat toimenpiteet	6
2.5	Hemolyysin aiheuttaman interferenssin tutkiminen hemolysaatin avulla	7
3	Verifiointi	9
4	Kemialliset menetelmät	11
4.1	Potentiometria	11
4.2	Fotometria ja spektrofotometria	12
4.2.1	Kolorimetria	13
4.2.2	Immunoturbidometria	14
4.3	Tutkitut kemian analyytit	15
4.3.1	Alaniiniaminotransferaasi	15
4.3.2	Alkalinen fosfataasi	16
4.3.3	Ammoniumioni	18
4.3.4	Aspartaattiaminotransferaasi	19
4.3.5	C-reaktiivinen proteiini	21
4.3.6	Haptoglobiini	22
4.3.7	Kalium	23
4.3.8	Kreatiinikinaasi	25
4.3.9	Laktaatti	27
4.3.10	Laktaattidehydrogenaasi	28
5	Immunokemialliset menetelmät	29
5.1	Immunokemiluminometria	30
5.2	Tutkitut immunokemian analyytit	31
5.2.1	Kreatiinikinaasin MB-alayksikkö	31
5.2.2	Myoglobiini	32
6	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	34
7	Opinnäytetyön menetelmät	34

7.1	Näytemateriaalin keruu ja näytepoolien valmistus	35
7.2	Hemolysaattien valmistus	37
7.3	Hemolysaattilaimennossarjojen valmistus ja analysointi	39
7.4	Tulosten analysointimenetelmät	44
8	Tulokset ja tulosten tulkintaa	46
8.1	Alaniiniaminotransferaasi	48
8.2	Alkalinen fosfataasi	54
8.3	Ammoniumioni	57
8.4	Aspartaattiaminotransferaasi	61
8.5	C-reaktiivinen proteiini	64
8.6	Haptoglobiini	68
8.7	Kalium	72
8.8	Kreatiinikinaasi	75
8.9	Kreatiinikinaasin MB-alayksikkö	80
8.10	Laktaatti	83
8.11	Laktaattidehydrogenaasi	86
8.12	Myoglobiini	89
9	Pohdinta	93
9.1	Tulosten tarkastelu	93
9.2	Johtopäätökset	104
9.3	Eettisyys	105
9.4	Luotettavuus	106
9.5	Kehittämisehdotukset	108
9.6	Ammatillinen kasvu	110
	Lähteet	111

1 Johdanto

HUSLAB on Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) laboratoriopalveluita tuottava yksikkö ja osa HUS Diagnostiikkakeskusta. HUSLAB-talon automaatiolaboratorioon Helsingin Meilahdessa on keskitetty suurin osa HUSin alueella tehtävistä kliinisen kemian ja immunokemian laboratoriotutkimuksista: automaatiolinjastolla kulkee noin 14000 näyteputkea päivässä ja jopa 3000 putkea tunnissa. (HUS 2019b; Salmenkivi 2018; Sneck 2019d.)

HUSLAB-talon automaatiolaboratoriossa käytössä olleet Abbott Architect -laitteet korvataan syksyn 2019 aikana uusilla Siemens Healthineersin Atellica® Solution -laitteilla. Hemolyysi-indeksille tehtiin verifiointi, jossa laitevalmistajan ehdottamat hemolyysi-indeksin raja-arvot tarkistettiin ja päivitettiin vastaamaan automaatiolaboratorion tarpeita. (Sneck 2019a.) Hemolyysi-indeksi on laskennallinen arvio hemolyysin asteesta näytteessä, joka perustuu absorbanssin mittauksiin spektrofotometrisesti eri aallonpituuksilla hemoglobiinin absorptiospektriin perustuen. Absorbanssin mittaukset muokataan käyttökelpoisiksi tuloksiksi algoritmien avulla, jolloin lopullinen hemoglobiinipitoisuus saadaan mittayksikkönä esimerkiksi g/l. (Lippi 2015: 162–163.) Opinnäytetyö tehtiin kiinnostuksesta kliiniseen biokemiaan.

In vitro -hemolyysiä tapahtuu, kun verinäytteen solut hajoavat ja niiden sisältämät komponentit vapautuvat plasmaan tai seerumiin. Hemolyysiä tapahtuu melko helposti näytteenoton yhteydessä, kun solut joutuvat puristuksiin, sekä vajaatäyttöisessä vakuumi-putkessa paineen vaikutuksesta. Hemolyysiä voi tapahtua myös *in vivo* elimistössä tapahtuvan verisolujen hajoamisen seurauksena, johon ei voida vaikuttaa näytteenotolla tai näytteen käsittelyllä. Soluista vapautuvat komponentit puolestaan vaikuttavat tunnetusti useampien analyyttien mittaustuloksiin. Hemolyysiä voidaan mitata ja sen vaikutusta arvioida hemolyysi-indeksin avulla. Eräiden analyyttien kohdalla hemolyysitason nousu saattaa estää analyytin mittaamisen luotettavasti.

Verifiointiin tarpeeseen vaikutti se, että laitevalmistajan ehdottamat alkuperäiset hemolyysi-indeksit eivät olleet tarpeeksi kattavia automaatiolaboratorion käyttöön. Laitevalmistaja ei myöskään ollut tutkinut hemolyysin aiheuttamaa häiriötä kovin pitkälle kliinisen kemian ja immunokemian tutkimusten osalta, jolloin alkuperäiseksi rajaksi oli laitevalmis-

tajan toimesta asetettu hyvin matala hemolyysi-indeksi. Matalaa rajaa käytettäessä tarpeettoman suuri määrä näytteitä jäisi kiinni hemolyysistä johtuen, vaikka hemolyysillä ei välttämättä olisikaan niin suurta merkitystä annetulla rajalla. HUSLABilla on käytössä myös muilla analysaattoreilla määritettyjä vanhempia hemolyysi-indeksin raja-arvoja, jotka eivät kuitenkaan välttämättä suoraan sovellu käytteenotettaviksi Atellica® Solution -laitteilla. Tämän vuoksi raja-arvot haluttiin tarkistaa nimenomaan uusilla Siemens Healthineersin laitteilla. (Sneck 2019c.)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, kuinka suuri hemoglobiinipitoisuus aiheuttaa kliinisesti merkittävän poikkeaman opinnäytetyössä tutkittujen kliinisen kemian ja immunokemian analyyttien pitoisuuksiin. Lisäksi tutkittiin, onko analyyttien pitoisuustasoilla vaikutusta hemolyysin aiheuttaman poikkeaman suuruuteen. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa luotettavia tuloksia, joiden perusteella voitiin määritellä hemolyysi-indeksille raja-arvot analyyttikohtaisesti.

2 Hemolyysi ja sen mittaaminen

Hemolyysillä tarkoitetaan ilmiötä, jossa punasoluista, valkosoluista ja verihutaleista vapautuu solukalvojen vaurioitumisen takia hemoglobiinia sekä muita intrasellulaarisia komponentteja plasmaan tai seerumiin (Thomas 2002: 95). Näytteen hemolytyisyys vaikuttaa voimakkaasti laboratoriotutkimustulosten luotettavuuteen ja tarkkuuteen, sillä hemolyysi aiheuttaa erilaista interferenssiä kliinisessä laboriodiagnostiikassa. Interferenssillä eli häiriöllä tarkoitetaan mitä tahansa kliinisesti merkittävää poikkeamaa mitatun analyytin pitoisuudessa, joka aiheutuu näytteen toisesta komponentista tai ominaisuudesta. Hemoglobiinin spektriset ominaisuudet voivat aiheuttaa spektrofotometristä interferenssiä erityisesti sellaisten analyyttien määrittämisessä, jotka perustuvat absorbanssin mittauksiin tietyillä aallonpituuksilla. Biologisella interferenssillä tarkoitetaan verisolujen komponenttien vapautumista *in vivo*, eli elimistössä. Analyttisessä interferenssissä verisolujen komponenttien vapautuminen tapahtuu näytteenoton jälkeen *in vitro*, eli koeputkessa. (Dolci – Panteghini 2014: 39; Lippi – Salvagno – Montagnana – Brocco – Guidi 2006: 311; Thomas 2002: 95.)

Hemolyysin määrää voidaan arvioida laboratoriossa ennen kemiallisen analyysin tekoa, jotta voidaan erottaa näytteet, joiden tutkimuksia hemolyysi mahdollisesti häiritsee. Hemolyysi voidaan havaita silmämääräisesti erotellun plasman punertavana värinä, kun hemoglobiinkonsentraatio on yli 0,3 g/l (Lippi ym. 2009: 935; World Health Organization

2002: 13). Automatisoidun hemolyysi-indeksin käyttö tarjoaa kuitenkin objektiivisemmän ja tarkemman arvion näytteen hemolyysin asteesta kuin klassinen näytteen visuaalinen tarkastaminen (Dolci – Panteghini 2014: 39). Hemolyysi-indeksin avulla hemolyysin määrää voidaan arvioida näytteen absorbanssiin perustuen, spektrofotometriaan perustuvassa mittauksessa. Hemolyysin kvantifioinnissa voidaan käyttää myös plasman tai seerumin vapaan hemoglobiinin pitoisuusmittausta.

2.1 Hemolyysi *in vivo* ja *in vitro*

Hemolyysi voi tapahtua joko *in vivo* (elimistössä) tai *in vitro* (koeputkessa). Näytteen *in vivo* -hemolyysi voi olla seurausta vasta-ainetuotannosta, lääkeaineiden biokemiallisista vaikutuksista, toksisista aineista, entsyymipuutoksista, tai potilaan perinnöllisestä tai hankituista sairaudesta. Nämä ovat näytteenottajasta riippumattomia tekijöitä joihin näytteenottaja ei käytännössä voi omalla toiminnallansa tai näytteenottotekniikallansa vaikuttaa. Epäiltäessä näytteen *in vivo* -hemolyysiä tulisi eroteltua plasmaa tarkastella huolellisesti, jotta voidaan poissulkea mahdollisuus ylimääräisestä *in vitro* -hemolyysistä. (Lippi ym. 2006: 311–312; Thomas 2002: 96.)

Näytteen *in vitro* -hemolyysi aiheutuu useimmiten näytteen sopimattomasta käsittelystä näytteenoton aikana tai sen jälkeen kuljetuksessa ja säilytyksessä (Thomas 2002: 95). Näytteenotossa näytteenottotekniikan ja staasin käytön ohella hemolyysiä voivat aiheuttaa pistokohdan puhdistuksessa käytetyn ihon puhdistusaineen joutuminen näytteeseen, neulan liian pieni läpimitta, näytteenoton suoritusvaikeudet, laskimon pieni koko, mustelmainen näytteenotto kohta, näyteputken alitäytyminen, sekä näyteputken ylenmääräinen sekoittaminen näytteenoton jälkeen. Näytteen kuljetuksen aikana hemolyysiä aiheuttavat näyteputken altistaminen äärimmäisille lämpötiloille tai näyteputken mekaaninen vaurioituminen kuljetuksessa. Näytteen käsittelyssä ennen varsinaista analysointia viivästynyt sentrifugointi sekä sentrifugointi liian korkeilla kierrosnopeuksilla ajallisesti liian kauan tai ennen kuin näytteen koagulaatioprosessi on ohi aiheuttavat hemolyysiä. Näytteen säilytyksessä säilytysolosuhteilla, kuten lämpötilalla ja säilytysajalla, on vaikutusta hemolyysin syntyyn. Kokoverinäytteitä ei tulisi jäädyttää, sillä kylmässä ympäristössä hemolyysiä syntyy punasolujen solukalvojen hajoamisen seurauksena. (Carraro – Servidio – Plebani 2000: 306; Higgins 2018; Lippi ym. 2006: 311; Lippi ym. 2008: 765–766.)

2.2 Hemolyysin seuraukset

Näytteen hemolysoituminen tulee tavallisimmin näkyviin vasta näytteen sentrifugoinnin jälkeen, kun plasma tai seerumi on eroteltu kokoverestä. Tällöin nähdään punasolujen vaurioitumisesta johtuva plasman tai seerumin vaaleanpunainen tai punertava sävy, kun vapaan hemoglobiinin konsentraatio on 0,1–0,3 g/l. Hemolysoitumattomassa näytteessä vapaan hemoglobiinin konsentraation ylärajana pidetään 0,2 g/l plasmassa ja 0,5 g/l seerumissa. Vapaan hemoglobiinin konsentraation ylittäessä 0,3 g/l hemolyysi näkyy selvästi ja tällöin punasoluista noin 0,5–1 % on hajonneita. Vaikka hemolyysiä ei olisi visuaalisesti havaittavissa, intrasellulaaristen komponenttien vapautuminen plasmaan tai seerumiin on mahdollista. Jo pelkästään verihiutaleiden tai valkosolujen hajoaminen voi vaikuttaa laboratoriotutkimustuloksiin. (Lippi ym. 2006: 312; Lippi ym. 2009: 935; Thomas 2002: 95–96.)

Hemolyysin aiheuttama interferenssi on riippuvainen hemolyysin asteesta sekä käytetävästä analysointimenetelmästä. Verisolusta ympäröivään nesteeseen vapautuneet solukomponentit voivat reagoida tai kilpailla analyysissä käytettävien reagenssien kanssa, tai vaihtoehtoisesti virheellisesti nostaa tai laimentaa tutkittavien analyyttien pitoisuuksia hemolyysistä johtuen. Pitoisuuksien muutokset ovat seurausta konsentraatiogradientista solujen ja plasman välillä. Interferenssiä tapahtuu esimerkiksi silloin, kun eri komponenttien konsentraatio plasmassa on alhaisempi kuin punasoluissa ja punasoluista vapautunut sisältö siten nostaa näiden analyyttien pitoisuuksia. Analyyteistä esimerkiksi alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, kalium, kreatiniini, kreatiiniikinaasi, laktaattidehydrogenaasi ja rauta saavat kohonneita pitoisuuksia hemolyysistä johtuen. Hemolyysin seurauksena laimenemiselle alttiita analyyttejä ovat puolestaan albumiini, alkalinen fosfataasi, bilirubiini, glukoosi, gammaglutamyylitransferaasi, lipaasi, natrium ja urea. (Dolci – Panteghini 2014: 39; Koseoglu – Hur – Atay – Çuhadar 2011: 83; Lippi ym. 2006: 314; Lippi ym. 2008: 766; Lippi – Cervellin – Favalaro – Plebani 2012: 46.)

Hemolyysi voi aiheuttaa interferenssiä myös immunokemiallisissa määryyksissä (Dolci – Panteghini 2014: 39). Immunokemiallisissa määryyksissä interferenssiä syntyy enemmän verisolujen hajoamisessa vapautuneista komponenteista kuin vapaasta hemoglobiinista plasmassa tai seerumissa. Solukomponentit voivat häiritä vasta-aine-antigeenireaktioita, värinmittausmääryksiä sekä entsyymireaktioita, joissa käytetään erilaisia leimattuja vasta-aineita. Interferenssiä syntyy myös, kun määryyksissä käytetyt vasta-

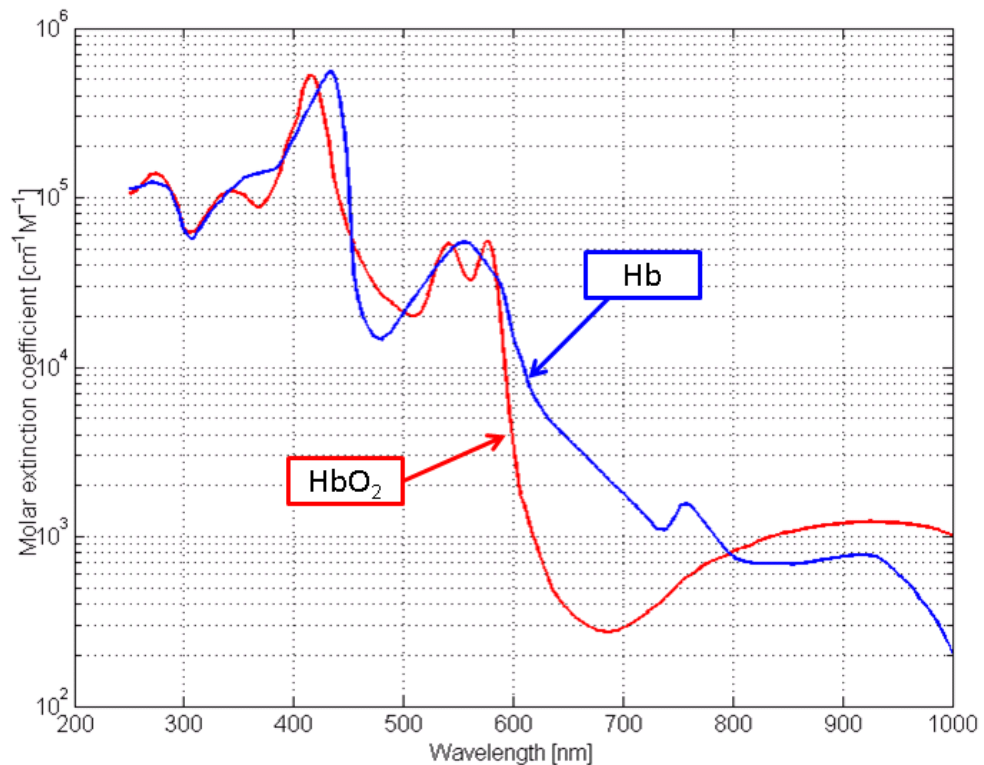
aineet ristireagoivat verisoluista vapautuneiden yhdisteiden kanssa tai vapautuneet yhdisteet sitoutuvat tutkittavaan analyyytiin ja peittävät vasta-aineiden sitoutumispaikkoja. Hemolyysi voi myös kiihdyttää tai vaimentaa immunoreaktioita. (Lippi ym. 2012: 49.)

2.3 Hemolyysin mittaaminen hemolyysi-indeksin avulla

Hemolyysin aiheuttamaa interferenssiä plasma- tai seeruminäytteessä voidaan nykykäsillä kemian analyysaattoreilla automaattisesti mitata ja arvioida hemolyysi-indeksin (H-indeksi) avulla. Tuloksena saadaan kvantitatiivinen tai semikvantitatiivinen arvio hemolyysin asteesta näytteessä. Tulos voidaan ilmaista myös kvalitatiivisesti (Lippi – Plebani 2012: 186). Hemolyysi-indeksi on laskelma, joka perustuu absorbanssin mittauksiin eri aallonpituuksilla spektrofotometrisesti hemoglobiinin absorptiospektriin perustuen (Lippi 2015: 162–163).

Hemoglobiini absorboi merkittävästi välillä 340–440 nm ja 540–580 nm. Hemoglobiinin absorptiohuippu on noin 415 nm:ssä (kuvio 1), jonka lisäksi se absorboi voimakkaasti myös 540 ja 575 nm:ssä. Täten hemolyysi aiheuttaa ilmeisen kasvun näillä alueilla mitattujen analyyttien pitoisuuksissa. (Koseoglu ym. 2011: 83; Thomas 2002: 97.) Hemolyysi-indeksin optisessa arvioinnissa voidaan yhdistellä eri aallonpituuksia ja käyttää esimerkiksi useampaa aallonpituutta samanaikaisesti tai absorptiohuippuja parittaisilla aallonpituuksilla. (Lippi 2015: 162–163; Lippi – Favalaro – Franchini 2018: 434.)

Absorbanssin mittaukset muokataan tuloksiksi ennalta määriteltyjen algoritmien avulla ja lopullinen hemoglobiinikonsentraatio voidaan muuntaa tavanomaiseksi mittayksiköksi, kuten g/l. Laskelmien lisäksi voidaan tarvita korjauskertoimia päällekkäisten häiriöspektrien eliminoimiseksi. Hemolyysi-indeksin määrittämisen etuja rutiinidiagnostiikassa ovat sen täysautomatisoitu määrittäminen, nopea läpimenoaika ja pieni näytevolyyymi. Määrittäminen ei myöskään aiheuta suuria lisäkustannuksia, sillä testimenetelmissä näytteiden laimennus tapahtuu tyypillisesti vedellä, suolaliuoksella tai Tris-puskurilla. (Lippi 2015: 162–163; Lippi ym. 2018: 434.)



Kuvio 1. Hemoglobiinin absorptiospektri, josta nähdään, että oksihemoglobiinin (HbO_2) ja deoksihemoglobiinin (Hb) absorptiohuippu on noin 415 nm:ssä (Wikimedia Commons. 2010). Hapen sitoutuminen hemoglobiiniin on reversiibeliä eli palautuvaa. Oksihemoglobiinissa happi on sitoutuneena hemoglobiiniin. Deoksihemoglobiini ei ole sitoutunut happeen, mutta se pystyy muodostamaan sidoksen, mikäli happea on käytettävissä. (Ehrmeyer – Ancy 2013: 383.)

Hemolyysi-indeksi on pelkkä arvio hemolyysin asteesta, sillä se perustuu hemoglobiinin määrän arviointiin. Kuten yllä on todettu, kaikki hemolyysi ei sisällä hemoglobiinin vapautumista plasmaan tai seerumiin ja toisaalta hemoglobiinin perusteella ei voida luotettavasti arvioida muiden soluista vapautuvien komponenttien määrää, jotka osaltaan vaikuttavat interferenssin syntymiseen. Hemoglobiini on kuitenkin tärkeä interferenssin aiheuttaja ja automatisoituina menetelmänä hemolyysi-indeksi on toimiva tapa hemolyyttisten näytteiden osoittamiseen automatisoidussa laboratoriossa. (Lippi – Plebani 2012: 184–187.)

2.4 Hemolyyttisen näytteen aiheuttamat toimenpiteet

Ensisijainen toimi hemolyysin aiheuttaman virheen välttämiseksi on pyrkiä vähentämään hemolyysiä aiheuttavia preanalyttisiä tekijöitä. Kaikki hemolyyttiset näytteet tulisi doku-

mentoida ja selvittää hemolyysin aiheuttava tekijä. Kun hemolyysihäiriö aiheutuu hemoglobiinin toiminnasta kromogeeninä eli väriaineena liuoksessa, häiriövaikutusta voidaan estää vaihtamalla mittausaallonpituutta (käyttämällä toista aallonpituutta hyödyntävää menetelmää), käyttämällä mittauksessa kahta eri aallonpituutta, dialyysiä tai kineettisiä menetelmiä, deproteinisaatiolla (kuten proteiinisuoatus) tai käyttämällä näytenollausta reaktiossa (Sonntag 1986: 137). Kliinisen kemian analyyseissä on tyypillisesti käytettävissä ainoastaan yksi mittausmenetelmä, joten ensimmäiset vaihtoehdot ovat siten usein poissuljettuja. Proteiinisuoatuksen tarkoituksena on poistaa näytteestä proteiini ja sen mukana tutkimusta häiritsevä hemoglobiini. Tämä ei sovi kaikkien analyyttien mittaukseen ja on työlästä. (World Health Organization. 2002: 14.) Näytenollauksessa reaktiollaksi määritetään näytteen lähtötilanne ennen reaktiota, jolloin menetelmä ottaa huomioon ainoastaan absorbanssissa tapahtuneen muutoksen (Sonntag 1986: 137).

Jos hemolyysi häiritsee tutkimusta, eikä häiriö ole poistettavissa menetelmävalinnalla tai esikäsitteilyllä, ei tulosta tulisi vastata. Häiriön poistoon on kehitetty korjausyhtälö, jolla näytteen todellisen pitoisuuden voisi laskea hemoglobiinin mittauksen jälkeen. Yhtälö ei kuitenkaan pysty huomioimaan hemolyysin erilaisia syntytapoja, minkä takia sitä ei suositella käytettäväksi rutiinomaisessa analytiikassa. (World Health Organization. 2002: 14; Guder 1986: 126; Lippi – Cadamuro – von Meyer – Simundic 2018: 5–6.)

Hemolyyttiselle näytteelle voidaan määrittää toimenpiteet hemolyysi-indeksin perusteella. Hemolyysi-indeksi voidaan siirtää laboratorion LIS-järjestelmään väliohjelmiston kautta. Järjestelmään tallennetaan hemolyysi-indeksin raja-arvot, jotka osoittavat kliinisesti merkittävän häiriön rajan kullekin testille, sekä päätöksentekorajat ja testitulosten käsittelyssä tarvittavat toimenpiteet. Kun hemolyysi-indeksi on analyytille määritetyn raja-arvon yläpuolella, tulos käsitellään automaattisesti ennalta määritettyjen kriteerien mukaisesti. Tämä voi tarkoittaa näytteen yhteyteen lisättävää kommenttia kliinikolle, tuloksen liputtamista tai näytteen hylkäämistä. Tällä tavoin kliinisesti merkittävä hemolyysin aiheuttama interferenssi, hemolyysi-indeksin arvot ja toteutetut korjaustoimenpiteet arkistoidaan LIS-järjestelmään lisäarviointeja varten. (Dolci – Panteghini 2014: 39.)

2.5 Hemolyysin aiheuttaman interferenssin tutkiminen hemolysaatin avulla

Hemolyysin tutkimuksissa näytteet tyypillisesti hemolysoidaan keinotekoisesti tai niihin lisätään solujen sisältämiä komponentteja. Lippin (2012: 352) mukaan esimerkiksi puhdistetun hemoglobiinin käyttö hemolyysin vaikutuksen tutkimisessa on kyseenalaista,

sillä se ei ota huomioon muuta soluista vapautuvaa sisältöä. Jos tutkimus tehdään valmistamalla hemolysaatti, suosittelee Lippi (2012: 352) käyttämään kokoverta pestyjen punasolujen sijaan hemolysaatin valmistuksessa, sillä myös valkosolujen ja verihiutaleiden hajotessa vapautuvalla solunsisällöllä voi olla vaikutusta hemolyysin aiheuttamisessa häiriöissä. Tarkempien häiriömekanismien tutkimuksessa voi olla joskus perusteltua käyttää solun sisäisiä komponentteja erikseen.

Hemolysaatti voidaan valmistaa hajottamalla näytteen punasolut. Tämä onnistuu tehokkaasti pakastamalla punasoluja -10°C – -40°C asteen lämpötilassa 30 minuutin ajan. Kuitenkin tutkittaessa hemolyysin aiheuttamia häiriötekijöitä, parempi tulos saadaan, jos punasolujen lisäksi myös valkosolut ja verihiutaleet hajoavat. Tähän tarvitaan joko alempi lämpötila tai pidempi pakastusaika. Muita vaihtoehtoja hemolysaatin valmistamiseksi on solujen hajotus veden kanssa joko detergentin avulla tai ilman, sonikaatio eli hajotus ääniaaltojen avulla, veren puristaminen ohuen neulan läpi, sekoittaminen metallisauvan avulla tai hajotus kudoshomogenisaattorin avulla. Jos hemolysaatin valmistuksessa käytetään liuoksia, on huomioitava sen lisäämisellä oleva laimentava vaikutus ja se, että käytettävän liuoksen sisältämät molekyylit voivat vaikuttaa mittaustuloksiin. (Lippi 2012: 352–353.)

Sonntag (1986: 128) käytti tutkimuksessaan yhden luovuttajan plasmaa, josta osa hemolysoitiin pakastamalla kokoverenä ja erottelemalla sen jälkeen. Tutkimuksessa hemolysoitunutta plasmaa siirrettiin kasvavana määränä ei-hemolysoituneeseen plasmaan.

Nordic Hemolysis Projectissa 2014 tehtiin kahdeksan luovuttajan näytepoolista neljä eri tasoista hemolyyttistä näytettä, jotka lähetettiin 143 pohjoismaiseen laboratorioon analysoitavaksi. Hemolyysi aiheutettiin hemolysaatin avulla, joka valmistettiin samojen luovuttajien hepariinikokoveresta säilyttämällä sitä kahden tunnin ajan -80°C :n lämpötilassa. Hemolysaattia lisättiin näytteisiin tietyt määrät halutun hemoglobiinikonsentraation saamiseksi. (EQAnord. 2014.)

Koseoglu ym. (2011: 80) keräsivät hepariiniverinäytteet 16 terveeltä luovuttajalta. Kuitenkin kerättiin viisi näyteputkea, joista neljä hemolysoitiin puristamalla näyte useita kertoja ohutneulaisen ruiskun läpi, jotta solujen hajoaminen muistuttaisi näytteenotosta johtuvaa hajoamista. Solujen hajoaminen oli näin ollen riippuvainen henkilön punasolujen mekaa-

nisesta kestävydestä ja tuloksena saatiin vaihtelevia vapaan hemoglobiinin pitoisuuksia. Tutkimuksessa näytteet ryhmiteltiin vapaan hemoglobiinin pitoisuuden mukaisiin ryhmiin ja niistä mitattiin halutut parametrit.

Lippin ym. (2009: 935) tutkimuksessa yhdeltä potilaalta kerättiin 50 ml verta kymmeneen lisäaineettomaan vakuumputkeen, joista yksi näyte hemolysoitiin kokoverenä pakastamalla yön yli ja muiden näytteiden seerumit poolattiin yhdeksi näytteeksi ja pakastettiin yön yli. Vapaa hemoglobiini mitattiin kokoverinäytteen supernatantista spektrofotometrillä käyttäen syanmethemoglobiinin menetelmää. Poolatusta näytteestä valmistettiin viisi sarjalaimennosta jakamalla se ja lisäämällä osanäytteisiin kasvava määrä hemolysoitua seerumia. Lopullinen vapaan hemoglobiinin konsentraatio vaihteli välillä 0,09–2,0 g/l.

Guderin (1986: 126) mukaan uusien laitteistojen ja reaktiokittien käyttöönoton yhteydessä tulisi tehdä testi eri hemolyysitasoilla. Tämä voidaan tehdä lisäämällä näytteisiin hemolysoitua ekstraktia tai seisottamalla näytteitä eripituisia aikoja tietyissä lämpötiloissa. Jälkimmäisessä plasma tai seerumi voi hemolysoitua ilman, että hemoglobiinin konsentraatio kasvaa.

3 Verifiointi

Verifiointi eli todentaminen on objektiivisen näytön esittämistä siitä, että tietty kohde täyttää määritellyt vaatimukset. Verifiointi on suppeampaa kuin validointi ja toisinaan verifiointia käytetään, kun menetelmä on jo muualla validoitu esimerkiksi tuotevalmistajan toimesta. Verifiointia tehdään myös, kun aiemmin validoituun menetelmään tehdään muutoksia esimerkiksi laitteiden osalta. Validoinnilla tarkoitetaan objektiivista menettelyä, jolla arvioidaan menetelmän ja laitteen soveltuvuutta ja suorituskykyä tiettyyn käyttötarkoitukseen. Validoinnilla tuotetaan ennalta suunniteltujen testien avulla erilaisia vertailuarvoja parametreille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta. Tilastollisten menetelmien avulla voidaan tunnistaa kohtia, jotka ovat kriittisiä tulosten luotettavuuden kannalta. Validoinnin vaatimukset ovat tapauskohtaisia ja ne asetetaan menetelmän ja käyttötarkoituksen mukaan. Validoinnin laajuuteen vaikuttavat tutkittava analyysimenetelmä ja sen käyttötarkoitus. (Hägg 2016: 6–8.)

Toistettavuus tarkoittaa tulosten välistä täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun määriykset tehdään samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä lyhyen aikavälin sisällä käyttäen samoja tekijöitä, laitteita, reagensseja ja lämpötiloja. Toistettavuutta testataan tekemällä

useita rinnakkaismääryksiä erityyppisistä näytteistä eri pitoisuusalueilla. Näytesarjan sisäinen toistettavuus ilmaisee menetelmän toistettavuuden samoissa käyttöolosuhteissa yhden mittausarjan sisällä. Näytesarjojen sisäinen vaihtelu on yleensä näytesarjojen välistä vaihtelua pienempää. Mikäli näytesarjojen välinen vaihtelu on merkittävää, tulee vaihtelun syy selvittää. Näytesarjan välinen toistettavuus ilmaisee menetelmän toistettavuuden eri päivinä, kun tekijät, laitteet, reagenssit ja lämpötilat vaihtelevat laboratorion sisällä. Toistettavuuden tarkastelussa näytteistä lasketaan keskimääräinen pitoisuus eli keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s) ja variaatiokerroin (CV%). Variaatiokerroin ilmoittaa tulosten hajonnan, kun määrykset tehdään toistetusti samasta näytteestä. Määrytysten variaatiokertoimelle ei voida määrittää yksiselitteistä kaikkia menetelmiä koskevaa raja-arvoa, sillä sallittu variaatio riippuu tutkimuksen käyttötarkoituksesta. (Ehder 2005: 37; Hägg 2016: 31, 44–45; Sneck 2019b.)

Näyte koostuu yhdestä tai useammasta tutkittavasta aineesta eli analyytistä sekä näytestaustasta eli matriisista. Analyytin pitoisuuden mittaukseen voivat vaikuttaa myös näyteen muut analyytit ja matriisi. Spesifisessä analyysimenetelmässä mittauksesta saatava signaali on peräisin vain tutkittavasta analyytistä. Selektiivisyys kuvaa sitä, kuinka hyvin analyytit voidaan erottaa matriisista ja kuinka hyvin niiden pitoisuudet voidaan määrittää, kun matriisissa esiintyy muita komponentteja. (Jaarinen – Niiranen 2005: 11.)

Selektiivisyyden testaamiseksi laitteen analyysimenetelmä tulee tuntea hyvin. Selektiivisyyskokeissa näytematriisiin voidaan lisätä systemaattisen virheen aiheuttavaa taustatekijää standardinlisäyssiä. Menetelmän selektiivisyys osoitetaan laimennossarjan lineaarisuuden perusteella. Mikäli menetelmä tuottaa vasteen ainoastaan mitattavalle analyytille, se on spesifinen ja tulos siten riippumaton taustatekijästä. Spesifisyyttä voidaan osoittaa mittaamalla näytematriisia, joka ei sisällä tutkittavaa analyyttiä. Usein täydellistä spesifisyyttä ei voida mittausten menetelmillä saavuttaa, mutta tietyn asteinen selektiivisyys on tarkoitukseen nähden täysin riittävä. Menetelmä määrittää selektiiviseksi, kun muiden komponenttien vaste on alle 20 % mittauksen alarajan vasteesta. (Hägg 2016: 29–31, 45.)

Selektiivisyyden lisäksi tarkastellaan hemolyysin aiheuttamaa mittausvirhettä. Mittausvirhe tarkoittaa suuren mitatun arvon ja referenssiarvon erotusta (Hägg 2016: 26). Systemaattinen virhe on mittausvirheen osa, joka pysyy mittauksista toistettaessa vakiona tai vaihtelee ennustettavalla tavalla (Hiltunen ym. 2011: 14).

4 Kemialliset menetelmät

Analyttiset menetelmät ja instrumentit tarjoavat perustan kaikille mittauksille, joita tehdään modernissa kliinisen kemian laboratoriossa (Drees – Petrie – Wu 2013: 101). Opin- näytetyössä käytettyjä kemiallisia mittausten menetelmiä olivat potentiometria sekä fotometrisistä menetelmistä kolorimetria ja immunoturbidometria. Immunoturbidometriassa mitataan fotometrisesti vasta-aineiden sitoutumisesta aiheutuvaa samentumaa. Se luetaan toisinaan immunokemialliseksi menetelmäksi vasta-aineiden hyödyntämisen vuoksi, joka näkyy myös menetelmän nimessä. Tässä työssä se luokitellaan kuitenkin fotometriseksi ja siten kemialliseksi menetelmäksi, sillä kliinisen kemian analysaattoreissa immunoturbidometriset mittaukset tehdään tavallisessa kemian moduulissa immunoke- mian moduulin sijaan. Hemolyysi-indeksin ja plasman hemoglobiinin mittauksessa käy- tettiin spektrofotometristä mittausta.

4.1 Potentiometria

Potentiometriassa mitataan sähköpotentiaalia, joka aiheutuu vapaiden ionien aktiivisuu- desta. Ioniselektiiviset elektrodit (ISE) ovat herkkiä yksittäisiä ioneja kohtaan ja niiden potentiaali määräytyy mielenkiinnon kohteena olevan ionin pitoisuuden mukaan. Ne siis tuottavat pienen jännitteen joutuessaan kosketuksiin tiettyjä ioneja sisältävän liuoksen kanssa. Ioniselektiivisen elektrodin lisäksi mittauslaitteisto sisältää vertailu- eli referens- sielektrodin ja yhdessä nämä elektrodit muodostavat sähköparin. Referenssielektrodin tehtävänä on tuottaa stabiili sähköinen potentiaali ilman ioniselektiivisen elektrodin häi- rintää. Referenssielektrodi eristetään näyteliuksesta suolasillan avulla, jolloin suolasil- lan ja näyteliuoksen väliseen rajapintaan muodostuu myös pieni jännite. Menetelmässä ioniselektiivinen elektrodi ja referenssielektrodi upotetaan näytteeseen ja niiden välistä jännitettä mitataan: referenssielektrodin potentiaali säilyy vakiona ja ioniselektiivisen elektrodin potentiaali muuttuu mitattavan ionin pitoisuuden mukaisesti. Elektrodien väli- nen mitattu jännite kertoo kiinnostuksen kohteena olevan ionin pitoisuuden. (Drees ym. 2013: 112; Lee-Lewandrowski – Burnett – Lewandrowski 2000: 347; Opetushallitus 2010.)

4.2 Fotometria ja spektrofotometria

Fotometriassa mitataan valon aiheuttamaa säteilyenergiaa vakio-olosuhteissa (Halonen 2004: 66). Tyypillisesti fotometriassa käytetään hyväksi valon läpäisevyyttä eli transmitanssia tai imeytymistä eli absorptiota väliaineessa (Åkerman – Jokela 2014: 55). Näyttekyvetissä olevan liuoksen läpi johdetaan valoa, joka sisältää vain kyseisen aallonpituusalueen omaava valoa (Åkerman – Jokela 2014: 56). Kun valo osuu värillistä näytettä sisältävään näyttekyvetiin, osa valosta absorboituu liuokseen ja loppuosa valosta transmitoituu ja osuu detektorille (Halonen 2004: 67).

Valo on aaltomaisesti etenevää sähkömagneettista säteilyenergiaa, jonka valoaaltojen välinen etäisyys eli aallonpituus vaihtelee välillä 200–1000 nm. Aallonpituus on riippuvainen energian määrästä ja valon väri puolestaan aallonpituudesta. Näkyvän valon aallonpituus on 380–700 nm ja sen alapuolella oleva alue on ultravioletialue, <380 nm, joka ei ole silmin näkyvä. (Halonen 2004: 66; Åkerman – Jokela 2014: 54.) Infrapunasäteilyn aallonpituus on 700 nm–1 mm (Liew 2001).

Spektrofotometrillä pystytään erottelamaan eri aallonpituudet toisistaan ja mittaamaan kutakin aallonpituutta vastaavat intensiteetit ultravioletialueelta infrapuna-alueelle saakka jatkuvasti säädettävän monokromaattorin avulla (Halonen 2004: 67). Näytteen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhde mitataan aallonpituuden funktiona. Tutkittavan analyytin absorptio saadaan selville, kun näytteen absorptiosta vähennetään taustan osuus, joka aiheutuu näyttekyvetin pinnoista tapahtuvista heijastuksista ja näytetaustan eli matriisin absorptiosta. (Jaarinen – Niiranen 2005: 55.)

Aallonpituuksien erottelu saadaan aikaan monokromaattorilla eli prismalla tai hilalla. Prismassa valkoinen valo, joka sisältää kaikkia näkyvän alueen aallonpituuksia, jakaantuu useiksi eri väreiksi eli spektriksi. Tavallisimmin käytetään hilaa, sillä se erottaa eri aallonpituudet paremmin kuin prisma. Hilojen yhteydessä käytetään usein suodattimia. Suodatin läpäisee tietyn aallonpituuskaistan valoa, joka mahdollistaa valon jakamisen spektrialueisiin. (Halonen 2004: 68; Jaarinen – Niiranen 2005: 46–47, 57.)

Spektrofotometrin pääkomponentteja ovat valonlähde, monokromaattori, näytetila ja valodetektor. Monokromaattorilla erotellaan haluttu aallonpituus kaikkia aallonpituuksia sisältävästä säteilystä. Valonsäde ohjataan sisäänmenoraon kautta peilien välityksellä hi-

lalle. Hila hajottaa säteen eri aallonpituuksia sisältäväksi spektriiksi ja hilan asento määrittää, minkä aallonpituuden omaava säde ohjautuu monokromaattorin ulosmenorakoon. Mitä kapeampi ulosmenorako on, sitä kapeampi aallonpituuskaista tulee ulos, säteilyn kokonaisintensiteetti pienenee ja kohina kasvaa. (Halonen 2004: 68–70; Jaarinen – Niiranen 2005: 55–57.)

Näytetilassa on kyveti, jossa on kaksi yhdensuuntaista optista pintaa ja mittausvalo kulkee kohtisuoraan niiden läpi. Monissa kliinisen kemian analysaattoreissa käytetään läpivirtauskyvettejä, joissa liuokset aspiroidaan pumpun avulla kyvetiin. Valodetektorin muuttaa valon sähköiseksi signaaliksi, jonka voimakkuus on suoraan verrannollinen valon intensiteettiin eli detektorin pinnalle osuvien valonsäteiden fotonien lukumäärään. Lopuksi signaali johdetaan tietokoneelle, jonka avulla lasketaan yhdisteen pitoisuus. (Halonen 2004: 68–70; Jaarinen – Niiranen 2005: 57–59.)

4.2.1 Kolorimetria

Kolorimetria on spektrofotometrillä tehtävä mittaus, jossa mitataan absorbansseja tietyillä näkyvän valon aallonpituuksilla, perustuen mitattavan kohteen väriin ja absorptiospektriin. Kun liuosta katsotaan silmin valkoisessa valossa, se absorboi valoa tietyillä aallonpituuksilla ja havaittu väri muodostuu niistä aallonpituuksista, jotka eivät absorboitu. Väriaineella on absorptiomaksimi, joka on aallonpituudeltaan kaukana havaitusta väristä. Lisäksi voi olla muita absorptiohuippuja. Yhdisteen pitoisuus voidaan määrittää yhdisteen maksimiabsorption aallonpituudella tapahtuvassa mittauksessa Lambert-Beerin lain mukaan, jos mittauksessa käytetään monokromaattista valoa, liuoksen absorptio on vähäistä, eikä liuoksessa ole optisesti häiritseviä yhdisteitä. Useammin kuitenkin pitoisuusmäärittämisessä käytetään pitoisuusvakiota, sillä mitattavan yhdisteen absorbanssi on suoraan verrannollinen sen pitoisuuteen liuoksessa edellä kuvatuin edellytyksin. (Halonen 2004: 66–67.)

Hemoglobiinin mittauksessa voidaan suoraan mitata näytteessä valmiina olevaa värillistä yhdistettä. Usein kuitenkin tarvitsee ensin tuottaa värillinen yhdiste kemiallisen tai entsyymaattisen reaktion kautta. Tällaisissa reaktioissa muodostuvan reaktiotuotteen määrä on verrannollinen mitattavan yhdisteen määrään, jolloin mittauksissa voidaan tietyllä pitoisuusalueella hyödyntää reaktiotuotteen absorbanssia. Entsyymaattisissa substraattimäärittämisissä käytetään kahden pisteen kineettistä mittausta, jossa absorbanssi mitataan usein tietyin aikaväleihin. Tällöin absorbanssien erotus on verrannollinen

lähtöaineen konsentraatioon. Entsyymiaktiivisuusmäärittelyksissä kuluvan substraatin tai muodostuvan tuotteen absorbanssin perusteella mitataan entsyymin aktiivisuutta näytteessä. Useissa entsyymaattisissa reaktioissa kuluu tai muodostuu NADH:ta tai NADPH:ta, joiden pitoisuutta voidaan mitata aallonpituudella 340 nm. (Åkerman – Jokela 2010: 69–70.)

4.2.2 Immunoturbidometria

Immunoturbidometriassa määritetään kvantitatiivisesti erilaisia proteiineja spesifisten vasta-aine-antigeenireaktioiden avulla. Vasta-aine-antigeenikompleksit aiheuttavat suspensiossa agglutinaatiota eli saostumista, joka johtaa turbiditeetin eli sameuden muodostumiseen. Sameus vaikuttaa suoraan läpäisevän valon voimakkuuteen ja mitattavan signaalin intensiteetti laskee johtuen siitä, että suspensiossa olevat hiukkaset siroavat valoa. Valon voimakkuuden vähenemistä mitataan spektrofotometrisesti ja voimakkuus korreloi tutkitun analyytin pitoisuuteen näytteessä. Partikkeliavusteisessa immunoturbidometriassa käytetään vasta-aineilla päällystettyjä partikkeleita, jotka muodostavat komplekseja näytteen antigeenien kanssa. Partikkeliavusteinen menetelmä on hyödyllinen, kun antigeeniä esiintyy vain pieniä määriä näytteessä. Mikroskooppiset partikkelit suurentavat suspensiossa muodostuneiden immunokompleksien kokoa ja monistavat mitattavan signaalin intensiteettiä. Täten ne lisäävät merkittävästi menetelmän herkkyyttä. (DiaSys 2004: 2; Moore 2000: 251.)

Immunoturbidometrisen reaktion kannalta on tärkeää, että suspensiossa vasta-aine-antigeenisuhde on optimaalinen, jolloin saavutetaan maksimaalinen saostuminen. Jos antigeenin pitoisuus ylittää tietyn tason, vasta-aine saturoituu eli kyllästyy. Tästä seuraa sameuden vähentymistä ja mitattavan signaalin intensiteetti laskee. Tätä kutsutaan hook-vaikutukseksi. (DiaSys 2004: 2.) Reagenssit ja näyte eivät saa myöskään sisältää mitään ulkopuolisia partikkeleita tai hiukkasia, jotka voivat aiheuttaa valon sirontaa. Näytettä voidaan esikäsitellä polyetyleeniglykolilla (PEG), joka parantaa vasta-aine-antigeeni-interaktiota. PEG on ioneja sisältämätön polymeeri, joka on hydrofiilisempi kuin antigeeni tai vasta-aine. Täten se sitoo vettä itseensä ja mahdollistaa nopean immunokompleksien muodostumisen. (Moore 2000: 251; Wu 2013: 165.)

4.3 Tutkitut kemian analyytit

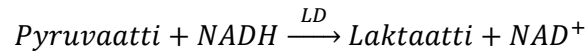
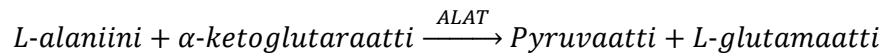
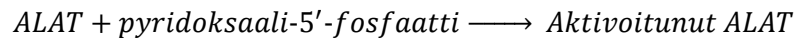
Tässä kappaleessa esitellään lyhyesti opinnäytetyössä tarkasteltujen kemian analyyttien merkitys elimistössä, kliininen käyttö ja analyysimenetelmä. Lisäksi tarkastellaan tutkimuksiin vaikuttavia häiriötekijöitä erityisesti hemolyysin vaikutuksen kannalta.

4.3.1 Alaniiniaminotransferaasi

Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on transferaasien ryhmään kuuluva entsyymi. Entsyymi katalysoi aminoryhmän reversiibeliä siirtymistä alaniinilta α -ketoglutaratille pyridoksaalifosfaatin toimiessa koentsyyminä. Lopputuotteena reaktiossa muodostuu glutamaattia ja pyruvaattia. Pyruvaatilla on tärkeä osa sitruunahappokierrossa, jossa se hapettuu elimistön soluille energianlähteeksi. (Esani 2014: 17; Johnson-Davis 2013: 278.)

Korkeita ALAT-pitoisuuksia tavataan maksan parenkyymisoluisissa; pienempiä pitoisuuksia puolestaan luurankolihasissa, munuaisissa, keuhkoissa ja sydämessä. Entsyymi kuvastaa melko spesifisesti maksasoluvauriota, joten kliinisesti ALAT-määritys soveltuu parhaiten maksa- ja sappisairauksien arviointiin. Ilman maksavauriota ALAT-pitoisuus nousee kohtalaisesti sepsiksessä, keuhkoinfarktissa, lihasdystrofoissa sekä sydämen ja munuaisten vajaatoiminnassa. Sydänlihaskudoksessa on pieniä määriä ALAT-aktiivisuutta ja entsyymien pitoisuus säilyy yleensä normaalina akuutissa sydäninfarktissa, ellei infarktia seuraa sekundaarinen maksan vaurioituminen. (Alaniiniaminotransferaasi, plasma. 2019; Johnson-Davis 2013: 278–279.)

ALAT-määritys perustuu entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen. Menetelmässä koentsyyminä toimiva pyridoksaali-5'-fosfaatti liittyy alaniiniaminotransferaasin inaktiiviseen muotoon, eli apoentsyymiin (kuvio 2). Liittymisen seurauksena transferaasi muuttuu aktiiviseksi (Marshall 2011a: 2). ALAT katalysoi aminoryhmän siirron alaniinilta α -ketoglutaratille, jonka seurauksena muodostuu pyruvaattia ja glutamaattia. Pyruvaatti pelkistyy laktaatiksi laktaattidehydrogenaasin katalysoidessa reaktiota. Samassa reaktiossa vastaava määrä NADH:ta hapettuu NAD⁺:ksi. NADH:n absorbanssin laskua mitataan fotometrisesti aallonpituudella 340/410 nm ja absorbanssin alenemisnopeus on suoraan verrannollinen alaniiniaminotransferaasin aktiivisuuteen näytteessä. (Alanine Aminotransferase. 2017; Ferrier 2017: 250–251.)



Kuvio 2. Reaktiokaava ALAT-määrittelylle (mukaillen Alanine Aminotransferase. 2017).

Hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää ALAT-määrittelyssä, sillä hemolyyysi aiheuttaa virheellisen korkeita aktiivisuuksia näytteessä (Alaniiniaminotransferaasi, plasmasta. 2019). Hemolyyssissä ALAT-entsyymien katalyyttisen pitoisuuden kasvu on seurausta punasoluista vapautuvasta intrasellulaarisesta ALAT-entsyymistä, jonka pitoisuus on noin 7-kertainen plasmaan verrattuna (Sonntag 1986: 132). Kuitenkaan Esanin (2014: 17) mukaan punasolujen sisältämällä ALAT-entsyymillä ei ole häiritsevää vaikutusta mittaus-tuloksiin.

4.3.2 Alkalinen fosfataasi

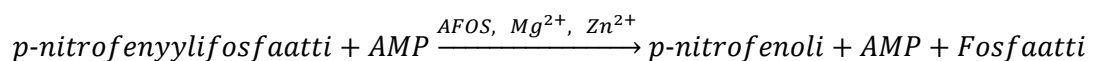
Alkalinen fosfataasi (AFOS) kuuluu ryhmään entsyymejä, jotka katalysoivat erilaisten fosfomonoestereiden hydrolyysiä alkalisessa eli emäksisessä pH:ssa. AFOS on epäspesifinen entsyymi, sillä se reagoi monien eri substraattien kanssa. Entsyymi toimii vapauttaen epäorgaanisen fosfaatin orgaanisesta fosfaattiesteristä ja saman aikaisesti reaktiossa syntyy sivutuotteena alkoholia. Toimiakseen entsyymi tarvitsee aktivaattoriin joko Mg^{2+} - tai Zn^{2+} -ioneja. (Johnson-Davis 2013: 279–280; Sharma – Pal – Prasad 2014: 269.)

AFOS-aktiivisuutta esiintyy useimpien kudosten solupinnoilla. Korkeita entsyymipitoisuuksia tavataan suolistossa, maksassa, luustossa, ja istukassa. Maksassa entsyymiä on sekä sinusoideissa että ohuissa maksansisäisissä sappitiehyissä. Entsyymien aktiivisuus luustossa rajoittuu luumatriksia syntetisoiviin osteoblasteihin. Aikuisilla suurin osa AFOS-entsyymistä on normaalisti maksaperäistä; kasvuikäisillä lapsilla luustoperäinen entsyymi on vallitseva muoto. Loppuraskaudessa AFOS-aktiivisuus nousee istukkaperäisen entsyymien vaikutuksesta ja raskaudenaikaiset komplikaatiot voivat nostaa entsyymien pitoisuutta. AFOS-pitoisuuden nousun selvittämisessä voidaan käyttää isoentsyymitutkimusta, jonka avulla määritetään, mistä elimistöstä vapautunut AFOS on peräisin.

Tutkituimmat ovat maksa-, luusto-, suolisto- ja istukkaperäiset isoentsyymit. (Alkalinen fosfataasi, plasmasta. 2018; Johnson-Davis 2013: 279; Sharma ym. 2014: 269.)

Entsyymien pitoisuuden kohoamisella on suurin diagnostinen merkitys maksan ja sappiteiden sairauksissa sekä luuston sairauksissa. Maksa- ja sappiperäisissä häiriöissä entsyymiaktiivisuuden kohoaminen on vallitsevaa obstruktiivisissa eli ahtaavissa tiloissa. Esimerkiksi sappiteiden ahtaumassa pitoisuuden nousu on seurausta kiihtyneestä entsyymien synteesistä, jota sapen kertyminen indusoi. Suolistoperäisen entsyymien kohoaminen voi johtua suolistoperäisistä kasvaimista. Luustoperäisen entsyymien nousua havaitaan tiloissa, joihin liittyy osteoblastien lisääntynyttä aktiivisuutta. Tällaisia tiloja ovat esimerkiksi Pagetin tauti, luusarkooma, riisitauti ja hyperparatyreoosi. Entsyymien aktiivisuus on merkittävästi vähentynyt hypofosfataasiassa, joka on perinnöllinen aineenvaihduntasairaus. (Alkalinen fosfataasi, plasmasta. 2018; Johnson-Davis 2013: 279.)

AFOS-määritys perustuu entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen. Menetelmässä alkalinen fosfataasi katalysoi substraattina toimivan p-nitrofenyylifosfaatin transfosforylaatiota p-nitrofenoliksi (kuvio 3). Substraatti on väritön yhdiste, joka muuttuu hydrolysaation seurauksena keltaiseksi. Puskurina ja pH:n säätelijänä toimii 2-amino-2-metyyli-1-propanoli eli AMP. Mg^{2+} - ja Zn^{2+} -ionit toimivat aktivaattoreina ja tehostavat reaktiota emäksisessä ympäristössä, jonka pH-arvo on 10,25. Muodostuneen p-nitrofenolin määrä määritetään mittaamalla absorbanssin kasvu fotometrisesti aallonpituudella 410/478 nm ja absorbanssin kasvu on suoraan verrannollinen alkalisien fosfataasin aktiivisuuteen näytteessä. (Alkaline Phosphatase. 2018; Johnson-Davis 2013: 281.)



Kuvio 3. Reaktiokaava AFOS-määritykselle (mukaillen Alkaline Phosphatase. 2018).

Hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää AFOS-määrityksessä (Alkalinen fosfataasi, plasmasta. 2018). Hemolyysi aiheuttaa intrasellulaaristen Mg^{2+} - ja Zn^{2+} -ionien vapautumisen näytteeseen, jonka seurauksena vapaiden ionien konsentraatio kasvaa. Pitoisuuden kasvulla on inhibitorinen vaikutus reaktiossa käytettävien aktivaattorien sekä AFOS-entsyymien aktiivisuuteen, jonka seurauksena entsyymien pitoisuus voi laskea virheellisen matalaksi näytteessä. (Farah – Al-Atoom – Shehab 2012: 125, 127.) Johnson-Davisin (2013: 281) mukaan hemolyysi voi puolestaan aiheuttaa entsyymien pitoisuuden vähäistä

nousua, sillä punasolujen sisältämä AFOS-pitoisuus on 6-kertainen seerumiin verrattuna. Tällöin hemolyysissä punasoluista vapautuva AFOS-entsyymi aiheuttaa interferenssiä nostamalla entsyymien pitoisuuden virheellisen korkeaksi. Myös Sonntag (1986: 133) on arvioinut, että AFOS-aktiivisuus kasvaa hemolyysin seurauksena, sillä punasoluista vapautuvat fosfomonoesteraasit nostavat entsyymien aktiivisuutta.

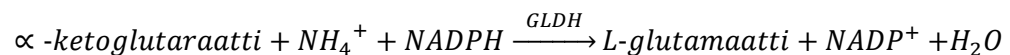
4.3.3 Ammoniumioni

Ammoniakkia (NH_3) muodostuu aineenvaihdunnassa proteiinien ja aminohappojen kataboliassa. Maksassa tapahtuvan glutamaatin deaminaation seurauksena muodostuu α -ketoglutarattia ja ammoniakkia. Suurin osa elimistön ammoniakista absorboituu suolistosta, missä koolonin bakteeriperäiset proteaasit, ureaasit ja amiinioksidaasit katalysoivat ammoniakkia proteiineista, aminohapoista ja ureasta. Suolistosta ammoniakki absorboituu porttiverenkierron kautta maksan parenkymisoluihin, joissa siitä metaboloituu ureaa ureasyklin avulla. Pieni osa ammoniakista muuntuu glutamaatiksi, joka varastoituu maksaan, aivokudokseen ja luurankolihasiin. Glutamaatti voidaan muuttaa glutamiiniksi, joka toimii tärkeänä metabolisena polttoaineena kudoksille ja aminoryhmien lähteenä puriineille ja pyrimidiineille. Osa endogeenisestä ammoniakista on peräisin luurankolihasista, sillä ammoniakkia muodostuu anaerobisissa aineenvaihduntareaktioissa fyysisen rasituksen vaikutuksesta. (Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. 2018; Frank 2013: 257; Gifford – Nguyen – de Koning – Seiden-Long 2018: 37–38; Hartmann 2000: 387; Hashim – Cuthbert 2014: 233; Hawke 2012: 1.)

Normaalissa fysiologisessa pH:ssa suurin osa eli noin 97 % veren ammoniakista esiintyy ammoniumionina (NH_4^+ -ioni) (Hawke 2012: 1). Hyperammonemia häiritsee aivojen aineenvaihduntaa ja voi johtaa maksakoomaan. Maksasairaudet kuten maksan vajaatoiminta, vaikea hepatiitti, maksakirroosi ja Reyen oireyhtymä ovat yleisimpiä syitä NH_4^+ -ionin metabolian häiriintymiseen. Näissä tiloissa maksan kyky muuntaa ammoniakkia ureaksi on häiriintynyt. NH_4^+ -ionin määritystä käytetään myös epäiltäessä vastasyntyneillä ja pienillä lapsilla ureasyklin sekä rasvahappo- ja aminohappoaineenvaihdunnan synnynnäisiä entsyymipuutoksia. Tietyillä lääkaineilla on ammoniakkin tuotantoa lisäävä vaikutus, jolloin ammoniakkin muodostuminen ylittää maksan metabolisen kapasiteetin ja ammoniakkin siirtyminen ureasykliin estyy. Munuaisten vajaatoiminnassa ureapitoisuuden nousu johtaa NH_4^+ -ionin pitoisuuden nousuun. Pitoisuuden nousu voi olla myös seurausta näytteen virheellisestä käsittelystä, sillä NH_4^+ -ioni on epästabiili analyyttilä ja herkkä

erilaisille preanalyttisille häiriötekijöille. (Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. 2018; Frank 2013: 257; Gifford ym. 2018: 37; Hashim – Cuthbert 2014: 233.)

Ammoniumionin entsyymaattisessa määrittämisessä NH_4^+ -ioni reagoi α -ketoglutaraatin ja NADPH:n kanssa glutamaattidehydrogenaasin katalysoimassa reaktiota (kuvio 4). Samalla reaktiossa läsnä oleva NADPH hapettuu NADP^+ :ksi ja reaktiossa muodostuu glutamaattia ja vettä (Hawke 2012: 2). NADPH:n hapettumisesta johtuvaa absorbanssin laskua mitataan fotometrisesti aallonpituudella 340/694 nm ja absorbanssin alenemisnopeus on suoraan verrannollinen NH_4^+ -ionin pitoisuuteen näytteessä. (Ammonia. 2017.)



Kuvio 4. Reaktiokaava NH_4^+ -ionin määrittämiselle (mukaillen Ammonia. 2017).

Hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä, sillä hemolyyysi aiheuttaa huomattavaa interferenssiä nostamalla NH_4^+ -ionin pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Ammonia. 2017). Punasolujen sisäinen NH_4^+ -ionin pitoisuus on noin 2–3-kertainen plasmaan verrattuna (Frank 2013: 258). Näytteenottoon liittyy myös erityispiirteitä, sillä näytteenoton jälkeen NH_4^+ -ionin pitoisuus näytteessä nousee aminohappojen entsyymaattisen hajoamisen ja punasoluista vapautuvan NH_4^+ -ionin vuoksi (Favresse ym. 2017: 65). Näytteenotto tulisi suorittaa ilman staasia kylmänäytteenottona, jolloin käytetään esijäädetyttä näyteputkea, joka kuljetetaan jäissä analysoivaan laboratorioon. Plasman erottelu tulisi tapahtua kylmäseentrifugia käyttäen 15 minuutissa näytteenotosta, sillä kokoverinäytteessä NH_4^+ -ionin pitoisuus nousee nopeasti *in vitro* aminohappojen deaminaation seurauksena. Näytteen analysointi tulisi suorittaa välittömästi plasman erottelun jälkeen, kuitenkin viimeistään 30 minuutin kuluttua näytteenotosta. (Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. 2018; Frank 2013: 258; Hashim – Cuthbert 2014: 233; Hawke 2012: 1; Nikolac – Omazic – Simundic 2014: 991.)

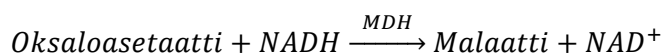
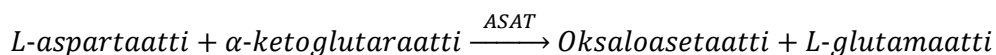
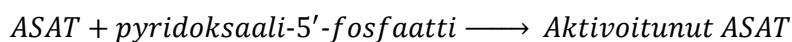
4.3.4 Aspartaattiaminotransferaasi

Aspartaattiaminotransferaasi (ASAT) on transferaasien ryhmään kuuluva entsyymi. Sen tehtävänä on katalysoida aminoryhmän reversiibeliä siirtoa aspartaatin ja α -ketoglutaraatin välillä pyridoksaalifosfaatin toimiessa koentsyyminä. Entsyymistä on olemassa kaksi isoentsyymifraktiota, jotka sijaitsevat sytoplasmassa ja mitokondrioissa. Solunsisäinen ASAT-pitoisuus voi olla 7000-kertainen verrattuna solunulkoiseen pitoisuuteen.

Sytoplasminen isoentsyymi on seerumissa vallitseva muoto, kun taas solujen nekroosia aiheuttavissa sairauksissa mitokondriaalinen muoto voi olla huomattavankin koholla. (Johnson-Davis 2013: 277–278.)

Entsyymi on laajalti jakautunut kehossa eri kudoksiin, joten entsyymin määrittäminen on kudoslähteen suhteen epäspesifistä. Korkeita entsyymipitoisuuksia tavataan sydämessä, maksassa ja luurankolihasissa; pienempiä pitoisuuksia puolestaan munuaisissa, haimassa ja punasoluissa. Tutkimusta käytetään pääasiassa maksa- ja lihasperäisten sairauksien diagnostiikassa. ASAT-pitoisuuden nousua tavataan virusperäisissä, toksisissa ja iskeemisissä hepatiiteissa, sekä alkoholi-, lääkaine- ja autoimmunihepatiiteissa. Myös maksakirroosi, maksakarsinoma ja maksametastaasit sekä lihasdystrofiat, lihasrasituksen jälkitilat ja tulehdukselliset lihassairaudet aiheuttavat kohonneita ASAT-pitoisuuksia. (Aspartaattiaminotransferaasi, plasmasta. 2018; Johnson-Davis 2013: 277–278.)

ASAT-määrittäminen perustuu entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen. Menetelmässä koentsyyminä toimiva pyridoksaali-5'-fosfaatti liittyy aspartaattiaminotransferaasin inaktiiviseen muotoon, eli apoentsyymiin (kuviokuva 5). Liittymisen seurauksena transferaasi muuttuu aktiiviseksi (Marshall 2013b: 2). ASAT katalysoi aminoryhmän siirron aspartaatilta α -ketoglutaraatille ja reaktiossa muodostuu glutamaattia ja oksaloasettaattia. Oksaloasettaatti pelkistyy malaatiksi malaattidehydrogenaasin katalysoidessa reaktiota. Samassa reaktiossa vastaava määrä NADH:ta hapettuu NAD⁺:ksi. NADH:n absorbanssin laskua mitataan fotometrisesti aallonpituudella 340/410 nm ja absorbanssin alenemisnopeus on suoraan verrannollinen aspartaattiaminotransferaasin aktiivisuuteen näytteessä. (Aspartate Aminotransferase. 2017; Ferrier 2017: 250–251.)



Kuvio 5. Reaktiokaava ASAT-määrittämiselle (mukaillen Aspartate Aminotransferase. 2017).

Hemolyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä, sillä punasolujen sisäinen ASAT-aktiivisuus on noin 40-kertainen plasmaan verrattuna (Aspartaattiaminotransferaasi, plasmasta. 2018; Sonntag 1986: 133). Hemolysissä punasoluista vapautuva ASAT-entsyymi aiheuttaa huomattavaa interferenssiä nostamalla entsyymien pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Aspartate Aminotransferase. 2017).

4.3.5 C-reaktiivinen proteiini

C-reaktiivinen proteiini (CRP) on maksan hepatosyyttien syntetisoima akuutin faasin proteiini, joka nousee tulehduksellisissa tiloissa muita yleisesti käytössä olevia akuutin faasin proteiineja nopeammin ja voimakkaammin (C-reaktiivinen proteiini, plasmasta. 2018). Myös sileäliihassolut, makrofagit, endoteelisolut, lymfosyytit ja adiposyytit osallistuvat proteiinin synteisiin. Proteiinin synteesiä säätelee proinflammatorinen sytokiini interleukiini 6, jota vapautuu makrofageista inflammaatiovasteen seurauksena. Eliminoinnissa CRP sitoutuu erilaisten mikrobien polysakkaridirakenteisiin, vaurioituneista soluista vapautuneisiin yhdisteisiin ja muihin molekyyliin. Patogeeniin sitoutunut CRP edistää komplementtijärjestelmän, neutrofiilien ja makrofagien aktivaatiota sekä mikroorganismien fagosytoosia. (Keil 2013: 225–226; Kratz – Lee-Lewandrowski – Lewandrowski 2000: 274; Rifai – Warnick – Remaley 2008: 427–428; Sproston – Ashworth 2018: 2.)

C-reaktiivisen proteiinin määrittämistä käytetään erilaisten akuutin faasin reaktioiden toteamisessa ja seurannassa. CRP on kuitenkin epäspesifi tulehdusmarkkeri, sillä se ei ole elinkohtainen eikä täten kerro, mihin elimeen kudonvaurio kohdistuu. Plasmapitoisuus nousee jyrkästi kudon nekroosissa sekä infektioiden ja inflammaatioreaktioiden yhteydessä. Lyhyen puoliintumisaikansa vuoksi pitoisuuden lasku tapahtuu nopeasti toipumisvaiheessa. Pitkään koholla oleva CRP indikoi sairaustilan pitkittymistä ja uudelleen nousu tilan aktivoitumista tai komplikaatiota. CRP-pitoisuus nousee voimakkaasti bakteeriperäisissä infektioiden ja määrittämistä voidaan käyttää antibakteerisen hoidon tehon seurannassa. Määrittämistä käytetään myös kudon tuhon toteamisessa ja sen laajuuden arvioimisessa esimerkiksi akuutissa sydäninfarktissa, sekä lisäksi malignien tautien ja postoperatiivisten komplikaatioiden seurannassa. (C-reaktiivinen proteiini, plasmasta. 2018; Keil 2013: 225–226; Kratz ym. 2000: 274; Roberts 2012: 1–3.)

CRP-määrittäminen tapahtuu partikkeliavusteista immunoturbidometriaa hyödyntäen. Menetelmässä käytetty lateksireagenssi sisältää polystyreenilateksipartikkeleita, jotka on

päällystetty jäniksen anti-CRP-vasta-aineella. Kun antigeeni eli C-reaktiivista proteiinia sisältävä plasmanäyte sekoitetaan lateksireagenssin kanssa, muodostuu agglutinaatiota, joka puolestaan johtaa suspensiossa sameuden lisääntymiseen. Agglutinaatiossa muodostuneet vasta-aine-antigeenikompleksit siroavat valoa. Näytekyvetin läpäisseen valon voimakkuuden vähenemistä mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 571 nm. Analyytin pitoisuus näytteessä on lateksipartikkeleiden aiheuttaman sironneen valon voimakkuuden funktio. Lopullinen CRP-pitoisuus määritetään kalibraatiokäyrältä, joka on muodostettu kuudesta eritasoisesta kalibraattorista, joiden CRP-pitoisuus tunnetaan. (CRP. 2017.)

Hemolyysillä ei ole vaikutusta CRP-määritykseen, ellei hemolyysi ole erittäin voimakasta (Roberts 2012: 2). Näytteen epätavallisen korkea CRP-pitoisuus voi saada aikaan hook-vaikutuksen, jolloin mitattu tulos jää virheellisen alhaiseksi (CRP. 2017).

4.3.6 Haptoglobiini

Haptoglobiini on maksan hepatosyyttien syntetisoima α_2 -glykoproteiini. Molekyylin fysiologisena tehtävänä on poistaa verenkierrosta vapaa, punasolujen ulkoinen hemoglobiini. Haptoglobiini sitoo plasmaan hemolyysissä vapautuneen hemoglobiinin ja täten estää hemoglobiinin ja raudan menetyksen virtsaan. Muodostuneet haptoglobiini-hemoglobiinikompleksit ovat suurehkoja, joten ne eivät kokonsa puolesta pääse erittymään munuaisten glomerulusten kautta. Näin haptoglobiini säästää munuaistubuluksia ja estää niissä syntyviä vaurioita, sillä vapaa hemoglobiini on munuaistoksista. Haptoglobiinin eliminoimiseksi maksan ja pernan retikuloendotelialisolut poistavat nopeasti haptoglobiini-hemoglobiinikompleksit verenkierrosta; hemiryhmät hajoavat raudaksi ja bilirubiiniksi sekä aminohapot kierrätetään uusiokäyttöön. (Gupta – Ahern – Nakhil – Forte 2011: 1; Haptoglobiini, plasmasta. 2018; Keil 2013: 222–223; Kratz ym. 2000: 272.)

Haptoglobiinimääritystä käytetään *in vivo* -syntyisen hemolyysin toteamiseksi. Proteiinin pitoisuus voi olla mittaamattoman alhainen hemolyytisissä tiloissa. Pitoisuuden laskua aiheuttavat intra- ja ekstravaskulaarinen hemolyysi, hemolyytiset anemiat, hemoglobiinopatit, hemolyytiset verensiirtoreaktiot, infektioivinen erytropoieesi, malaria ja DIC-oireyhtymä. Vakavassa akuutissa hemolyysissä haptoglobiinivarastot voivat kokonaan ehtyä 6–12 tunnissa, sillä maksassa tapahtuva proteiinisynteesi ei ehdi vastaamaan proteiinin kasvavaan kulutukseen. Pitoisuuden korjaantumiseen voi kulua siten viikkokin. Hap-

toglobiini määritellään myös yhdeksi akuutin faasin proteiineista, sillä sen pitoisuus nousee monien infektioiden, inflammaatioiden ja kudsvaurioiden yhteydessä. Mikäli akuutin faasin reaktioon liittyy hemolyyttinen tila, haptoglobiinipitoisuuden nousu voi puuttua. (Haptoglobiini, plasmasta. 2018; Keil 2013: 222–223; Kratz ym. 2000: 272.)

Haptoglobiinin määrittäminen tapahtuu immunoturbidometrisesti. Määrittämisessä vasta-aineena on vuohen antihaptoglobiinivasta-ainetta. Vasta-aineen reagoiessa antigeenin eli plasmanäytteen haptoglobiinin kanssa muodostuu liukenemattomia komplekseja, jotka voidaan mitata niiden tuottaman turbiditeetin perusteella. Muodostuneiden kompleksien määrä vaihtelee suhteessa haptoglobiinin pitoisuuteen näytteessä. Reaktiossa polyetyleeniglykolin käyttö kiihdyttää vasta-aine-antigeenikompleksien muodostumista. Muodostuneet vasta-aine-antigeenikompleksit siroavat valoa. Näytekyvetin läpäisseen valon voimakkuuden vähenemistä mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 340/694 nm. Lopullinen haptoglobiinipitoisuus määritetään kalibraatiokäyrältä, joka on muodostettu kuudesta eritasoisesta kalibraattorista, joiden haptoglobiinipitoisuus tunnetaan. (Haptoglobiini. 2017.)

In vitro -hemolyysillä ei ole pitoisuutta nostavaa tai laimentavaa vaikutusta haptoglobiinimääritykseen, sillä punasolujen hajoamisen aikana muodostuneet haptoglobiini-hemoglobiinikompleksit eliminoidaan heti verenkierrosta monosyyttien ja kudosten makrofagien toimesta. Tämän ominaisuutensa vuoksi haptoglobiinimääritystä hyödynnetään usein *in vivo*- ja *in vitro* -hemolyysin erottamiseksi toisistaan. (Wan Azman – Omar – Koon – Tuan Ismail 2019: 95.) Shih, McFarlane ja Verhovsek (2013: 445) kannattavat kuitenkin näkemystä, jonka mukaan preanalyttisten virhetekijöiden aiheuttama *in vitro* -hemolyysi johtaa näytteessä virheelliseen matalaan haptoglobiinipitoisuuteen. Myöskään laitevalmistajan mukaan hemolysoitunutta näytettä ei tulisi käyttää analyysissä. Antigeenin ylimäärästä johtuva hook-vaikutus on mahdollinen tavattaessa korkeita haptoglobiinipitoisuuksia. (Haptoglobiini. 2017.)

4.3.7 Kalium

Kalium on elektrolyytti ja tärkein intrasellulaarinen kationi. Kaliumin tehtävänä on säädellä neuromuskulaarista ärtyvyyttä, sydämen supistustoimintaa, intrasellulaarisen nestemäärän tilavuutta, sekä katalysoida erilaisten entsyymien toimintaa ja solujakautumista. Monet solutoiminnot edellyttävät, että elimistö ylläpitää alhaista K⁺-ionitasapainoa

solunulkoisessa nesteessä. Tästä syystä vain noin 2 % kehon kokonaiskaliumin määrästä kiertää plasmassa ja 98 % on varastoituneina soluihin. Korkeasta intrasellulaarista pitoisuudesta vastaa Na^+/K^+ -pumppu, joka kuljettaa jatkuvasti kaliumia soluihin konsentraatiogradienttia vastaan. Na^+/K^+ -pumppu ylläpitää ja säätelee ionigradietteja, joilla on merkitystä hermoimpulssien kulkuun sekä lihasten supistuvuuteen. Kun pumpun aktiivisuus vähenee, kaliumia diffundoituu soluista ulos plasmaan enemmän kuin sitä pumpataan soluihin sisälle. Jos pumpun toiminta estyy, kaliumia menetetään ekstraselulaariseen nesteeseen. (Harwell 2013: 353–354; Kalium, plasmasta. 2018; Kardalas ym. 2018: 135–136; Scott – LeGrys – Klutts 2008: 432–433.)

Kaliumin määritystä käytetään neste- ja elektrolyyttitasapainon sekä happo-emästasapainon seurantaan. Hypokalemia on usein seurausta kaliumin lisääntyneestä menetyksestä joko ruoansulatuskavanan tai munuaisten kautta. Kaliumia voi myös siirtyä liikaa soluihin. Harvinaisissa tapauksissa hypokalemian taustalla on kaliumin vähentynyt saanti ravinnosta. Hyperkalemia aiheutuu yleensä kaliumin liiallisesta saannista, heikentyneestä kaliumin erittymisestä tai solutasen muutoksista. Munuaisten vajaatoiminnassa kaliumin erityks heikkenee, jolloin pitoisuus voi kerääntyä myrkylliselle tasolle elimistössä. Solutasolla kaliumia vapautuu solunulkoiseen nesteeseen lisääntyneen kudostuhon tai katabolian aikana. Pseudohyperkalemiaa tulisi epäillä, kun laboratorioissa näytteestä mitattu kaliumarvo on poikkeuksellisen korkea, mutta potilas ei kliinisesti osoita hyperkalemian merkkejä. (Harwell 2013: 354–355; Higgins 2018; Kardalas ym. 2018: 136–138; Scott ym. 2008: 433.)

Kaliumin määrittäminen näytteestä tapahtuu potentiometrisesti ioniselektiivisellä elektrodilla. Määritys voidaan tehdä suorasti tai epäsuorasti. (Kalium, plasmasta. 2018.) K^+ -ioneille selektiivisessä elektrodissa kantajamolekyylinä toimiva valinomysiini on liitetty PVC-membraaniin. Valinomysiini on neutraali ionofori ja sen rakenne sallii K^+ -ionien muodostaa spesifejä komplekseja itsensä kanssa (SYNCHRON® Systems 2011). Sitoutuminen aiheuttaa impedanssimuutoksen, joka korreloi K^+ -ionipitoisuuden kanssa. Sisäisenä elektrolyyttiliuoksena käytetään KCl-liuosta. (Harwell 2013: 357.)

Epäsuorassa menetelmässä laimennettu näyte sijoitetaan anturiin ja K^+ -ionit muodostavat tasapainotilan elektrodin pinnan kanssa. Membraanin ja näyteliuoksen rajapinnassa tuotettu sähköinen potentiaali syntyy suhteessa näytteessä olevien K^+ -ionien aktiivisuuden logaritmiin (D’Orazio – Meyerhoff 2008: 84). Näytteessä syntyneitä sähköistä poten-

tiaalia verrataan standardiliuoksella tuotettuun potentiaaliin ja K^+ -ionien pitoisuus laskeaan käyttämällä Nernstin yhtälöä. Suorassa menetelmässä laimennusta ei käytetä. (ALYTE Integrated Multisensor. 2018; Scott ym. 2008: 434.)

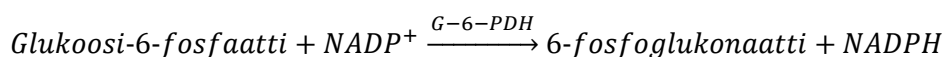
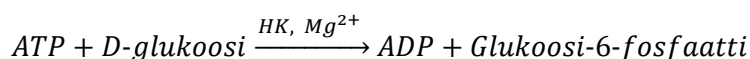
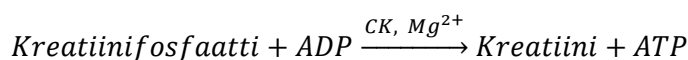
Hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä, sillä kaliumin keskimääräinen pitoisuus punasoluissa on noin 23-kertainen plasmaan verrattuna (Kalium, plasmasta. 2018; Scott ym. 2008: 433). Hemolyysissä punasoluista vapautuva kalium aiheuttaa huomattavaa interferenssiä nostamalla näytteen kaliumpitoisuuden virheellisen korkeaksi (Delaney 2013: 1). Näytteenottoon ja näytteen käsittelyyn tulee kiinnittää erityistä huomiota. Näytteenotossa tulee huomioida oikeaoppinen putkijärjestys, ettei K_2 -EDTA-antikoagulanttia joudu kaliumnäytteeseen. Plasma tai seerumi tulisi erotella 3–4 tunnin kuluttua näytteenotosta, sillä näytteen lämpötilan laskiessa Na^+/K^+ -pumpun aktiivisuus vähenee ja kaliumia diffundoituu passiivisesti verisoluista plasmaan tai seerumiin. (Harwell 2013: 356; Higgins 2018.)

4.3.8 Kreatiinikinaasi

Kreatiinikinaasi (CK) on entsyymi, joka osallistuu ATP-molekyylien regeneraation elimistön supistumis- ja kuljetusjärjestelmissä. Entsyymien pääasiallinen fysiologinen toiminta tapahtuu lihassoluissa, joissa se varastoi korkeaenergistä kreatinifosfaattia. Jokainen lihasten supistumissykli johtaa ADP:n ja kreatinifosfaatin käyttöön ja lopputuotteena muodostuu kreatiinia ja ATP:tä. CK-entsyymi katalysoi kaksisuuntaista reaktiota. Tämä johtaa suhteellisen tasaisiin lihasten ATP-pitoisuuksiin. Korkeita entsyymipitoisuuksia tavataan luurankolihasissa, sydänlihaksessa ja aivokudoksessa; pienempiä pitoisuuksia puolestaan munuaisissa, keuhkoissa, pernassa, maksassa ja haimassa. (Johnson-Davis 2013: 271.)

Tutkimusta hyödynnetään pääosin lihastautien diagnostiikassa. CK-pitoisuuden nousu on herkkä indikaattori etenkin sydäninfarktissa, lihasdystrofoissa ja raskomyolyysissä. Entsyymien aktiivisuus nousee myös lihastraumojen, lihasperäisten infektioiden ja fyysisen rasituksen yhteydessä, sekä kouristusten, leikkausten ja intramuskulaaristen injektoiden jälkeen. Kohonneita pitoisuuksia tavataan keskushermostoperäisissä halvauksissa, kohtauksissa ja rappeumissa, jolloin veri-aivoesteen vaurioitumisen seurauksena entsyymiä vapautuu perifeeriseen verenkiertoon. CK-pitoisuuteen vaikuttavat vaihdellen yksilön lihasmassan määrä ja fyysinen kunto, sukupuoli ja ikä. (Johnson-Davis 2013: 271; Kreatiinikinaasi, plasmasta. 2018.)

CK-määritys perustuu entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen. Menetelmässä kreatiinikinaasi katalysoi reaktiota kreatiinifosfaatin ja ADP:n välillä ja reaktiossa muodostuu kreatiinia ja ATP:tä (kuvio 6). ATP fosforyloi glukoosin glukoosi-6-fosfaatiksi heksokinaasin katalysoidessa reaktiota. Mg^{2+} -ionit toimivat reaktioissa aktivaattoreina (Johnson-Davis 2013: 267). Mg^{2+} -ionien optimaalinen pitoisuusalue on kapea, sillä Mg^{2+} -ioneilla on suurissa määrin reaktioon inhibitorinen vaikutus (Panteghini – Bais 2008: 318). Glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasi katalysoi glukoosi-6-fosfaatin hapettumista 6-fosfoglukonaatiksi ja samaan aikaan $NADP^+$ pelkistyy $NADPH$:ksi. Muodostuneen $NADPH$:n määrä määritetään mittaamalla absorbanssin kasvu fotometrisesti aallonpituudella 340/596 nm ja absorbanssin kasvu on suoraan verrannollinen kreatiinikinaasin aktiivisuuteen näytteessä. (Creatine Kinase. 2018; Ferrier 2017: 106, 145–146.)



Kuvio 6. Reaktiokaava CK-määritykselle (mukaillen Creatine Kinase. 2018).

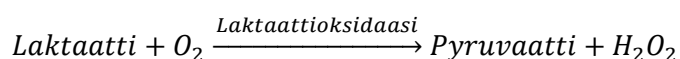
Hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä, sillä hemolyysi aiheuttaa huomattavaa interferenssiä nostamalla entsyymin pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Creatine Kinase. 2018). Vaikka punasoluissa ei käytännössä ole solunsisäistä kreatiinikinaasia, ne sisältävät kuitenkin runsaasti adenylaattikinaasia. Adenylaattikinaasi on entsyymi, joka reagoi ADP:n kanssa tuottaen ATP:tä, joka puolestaan osallistuu määritysreaktioon aiheuttaen virheellisen korkean CK-pitoisuuden näytteessä. Adenylaattikinaasin toimintaa voidaan inhiboida lisäämällä reaktioon joko adenosiinimonofosfaattia tai diadenosiinipentaosfaattia (Koseoglu ym. 2011: 84). Seeruminäytteessä CK-pitoisuus säilyy suhteellisen epävakaana ja entsyymin aktiivisuus vähenee nopeasti sulfhydryyliryhmän hapettumisen seurauksena entsyymin aktiivisessa kohdassa. Entsyymien inaktivaatiota voidaan estää lisäämällä reagenssiin jokin sulfhydryyliryhmän sisältävä yhdiste, kuten N-asetyylikysteiini. (Johnson-Davis 2013: 275; Panteghini – Bais 2008: 318.)

4.3.9 Laktaatti

Laktaatti on molekyyli, jota muodostuu elimistössä pyruvaatista anaerobisen glykolyysin aikana. Pääosa laktaatista muodostuu lihaksissa. Hapenpuutteen aikana laktaatti on glykolyysin lopputuote. Hapan laktaatti-ioni siirtyy soluista verenkierron kautta maksaan, jossa sen poistuminen tapahtuu glukoneogeenin avulla. Myös munuaisissa voi tapahtua jonkin verran laktaatin eliminaatiota. (Andersen ym. 2014.)

Laktaatin kohoamisen syynä voi olla lisääntynyt laktaatin muodostus tai alentunut poistuminen. Solujen altistuessa hapettomuudelle veren laktaattipitoisuus nousee, ja yleisin syy kohonneelle laktaatille onkin heikentynyt verenkierto, jonka seurauksena hapensaanti kudoksissa vähenee. Syynä kohonneelle laktaatille voi olla myös maksan toiminnan heikkeneminen. Potilaat, joilla laktaatti on koholla, ovat erittäin huonokuntoisia. Laktaatti on maitohapon vastinemäs, ja sen muodostuminen aiheuttaa happamoitumista. Laktaattiasidoosista voidaan puhua, kun veren pH laskee laktaatin vaikutuksesta alle 7,35. (Andersen ym. 2014; Laktaatti, plasmasta, paastotilassa. 2018.)

Ensymaattisessa substraattimäärityksessä laktaattioksideasi hapettaa laktaatin, jolloin muodostuu pyruvaattia ja vetyperoksidia. Muodostunut vetyperoksidi reagoi edelleen reaktioseoksessa olevan kromogeenin kanssa peroksidaasientsyymin vaikutuksesta, jolloin muodostuu väriainetta (kuvio 7). Muodostuneen väriaineen määrä on verrannollinen laktaatin määrään ja se määritetään mittaamalla absorbanssin kasvu fotometrisesti aallonpituudella 545/694 nm. (Lactate. 2017.)



Kuvio 7. Reaktiokaava laktaattimääritykselle (mukaiillen Lactate. 2017).

Laktaatti analysoidaan fluoridioksalaattiplasmasta. Muuhun lisäaineeseen otettu näyte säilytetään kylmässä, jotta vältetään laktaattiarvojen kohoaminen lämmön seurauksena. Näyte otetaan ilman staasia ja erotellaan 30 minuutin kuluessa näytteenotosta. Potilaan tulee olla levossa vähintään 30 minuuttia ennen näytteenottoa. (Laktaatti, plasmasta, paastotilassa. 2018.)

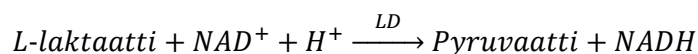
Hemolyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä. Hemolyysi voi nostaa mittauksen absorbanssia aallonpituusvälillä 540–580 nm, mikä voi aiheuttaa virheellisen korkean laktaattituloksen (Dolci – Panteghini 2013: 39). Toisaalta häiriövaikutusta vähentää se, että mittauksessa käytetään kahta aallonpituutta (Sonntag 1986: 137). Punasoluista vapautuvan raudan peroksidaasiaktiivisuus voi virheellisesti voimistaa mittausreaktiota (Dolci – Panteghini 2013: 39).

4.3.10 Laktaattidehydrogenaasi

Laktaattidehydrogenaasi (LD) on solun sytosolifraktiossa esiintyvä vedynsiirtäjäentsyymi, joka katalysoi laktaatin konversiota pyruvaatiksi koentsyymi NAD^+ :n avulla. Reaktio tapahtuu myös toiseen suuntaan. Entsyymi voidaan erottaa viideksi erilaiseksi fraktioksi LD-1–LD-5, joista kukin koostuu neljästä H- tai M-alyksiköstä tai niiden yhdistelmistä. (Johnson-Davis 2013: 276; Laktaattidehydrogenaasi, plasmasta. 2018.)

Korkeita entsyymipitoisuuksia tavataan sydämässä, maksassa, luurankolihasissa, munuaisissa, haimassa ja punasoluissa; pienempiä pitoisuuksia puolestaan keuhkoissa, sisleissä lihaksissa ja aivoissa. Entsyymien pitoisuus nousee monissa erilaisissa elimistön häiriöissä ja elinvaurioissa, mutta nousu on kudoslähteen suhteen epäspesifistä. Tutkimusta käytettäessä indikaationa voi olla esimerkiksi sydän- tai keuhkoinfarkti, maksavaurio, munuaisvaurio, lihasvaurio, pernisiöösi anemia, hemolyttinen sairaus, leukemia tai muu maligni sairaus. Epäspesifisyytensä vuoksi plasman LD-pitoisuuden ollessa koholla on usein suotavaa tehdä isoentsyymifraktiointi entsyymien aktiiviteetin kudosalikuepään selvittämiseksi. (Johnson-Davis 2013: 275; Laktaattidehydrogenaasi, plasmasta. 2018.)

LD-määritys perustuu entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen. Menetelmässä laktaattidehydrogenaasi katalysoi substraattina toimivan L-laktaatin hapettumista pyruvaatiksi (kuvio 8). Samalla reaktiossa läsnä oleva NAD^+ pelkistyy NADH :ksi. Laktaattidehydrogenaasin entsyymaattinen aktiivisuus näytteessä on suoraan verrannollinen NADH :n muodostumisnopeuteen. Muodostuneen NADH :n määrä määritetään mittaamalla absorbanssin kasvu fotometrisesti aallonpituudella 340/410 nm. (Lactate Dehydrogenase. 2018.)



Kuvio 8. Reaktiokaava LD-määritykselle (mukailten Lactate Dehydrogenase. 2018).

Punasolujen sisäinen LD-pitoisuus on noin 100–150-kertainen seerumiin verrattuna, jonka vuoksi hemolyyttistä näytettä ei tulisi käyttää analyysissä (Johnson-Davis 2013: 277). Hemolyysissä punasoluista vapautuva LD aiheuttaa huomattavaa interferenssiä nostamalla entsyymin pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Lactate Dehydrogenase. 2018). Myös verihiutaleet sisältävät suuria pitoisuuksia laktaattidehydrogenaasia, jolla voi olla vaikutusta plasmanäytteistä analysoituihin tuloksiin (Panteghini – Bais 2008: 322).

5 Immunokemialliset menetelmät

Immunokemialliset menetelmät hyödyntävät immunologisia ilmiöitä eli vasta-aineiden ja antigeenien välisiä kemiallisia reaktioita, jotka ovat erittäin spesifisiä ja sensitiivisiä. Kiinnostuksen kohteena oleva molekyyli voi olla vasta-aine tai antigeeni ja tavoitteena voi olla näiden havaitseminen tai kvantifiointi. Menetelmät perustuvat antigeenien selektiiviseen, reversiibeliin ja ei-kovalenttiseen sitoutumiseen vasta-aineiden avulla. Sitoutumiseen vaikuttavat kummankin reaktantin pitoisuus, vasta-aine-antigeenikompleksien spesifisyys, affiniteetti eli sitoutumisen voimakkuus, aviditeetti eli kaikkien sidosten aiheuttama sidosvoima, sekä reaktio-olosuhteet. (Immunochemical Techniques. 2017: 308–309; Wu 2013: 161.)

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, jotka jaotellaan eri luokiksi IgG, IgA, IgD, IgM ja IgE. Rakenteellisesti vasta-aineita kuvataan Y-kirjaimen muotoisina molekyyleinä, joista kukin sisältää neljä polypeptidiä: kahta identtistä polypeptidiyksikköä kutsutaan raskasketjuiksi ja vastaavasti kahta muuta kevytketjuiksi. Vasta-aineen rakenteessa on toiminnallinen Fab-alue, joka sitoutuu antigeeniin. Antigeenin kohtaa, johon vasta-aine sitoutuu, kutsutaan epitoopiksi tai antigeeniseksi determinantiksi. Antigeenit ovat elimistölle vieraita aineita, jotka indusoivat elimistössä biologista immuunivastetta ja vasta-aineiden synteesiä. Antigeeninä voivat toimia lähes kaikki riittävän suuret biomolekyylit ja niissä on yleensä useita kohtia, jotka voivat sitoutua vasta-aineisiin eri spesifisyydellä. (Immunochemical Techniques. 2017: 308, 310; Wu 2013: 161.)

Vasta-aineita voidaan valmistaa laboratoriokäyttöön kahdella eri tapaa. Monoklonaaliset vasta-aineet on tuotettu jatkuvasti jakautuvista plasmalolinjoista. Ne on suunnattu vain yhtä epitooppia vastaan, eli ne ovat identtisiä kopioita rakenteellisesti ja antigeenispesifisesti. Polyklonaaliset vasta-aineet on tuotettu immunisoimalla koe-eläimiä antigeeneillä. Siten ne ovat monoklonaalisten vasta-aineiden seoksia, jotka ovat spesifisiä useille eri antigeeneille. (Immunochemical Techniques. 2017: 312; Wu 2013: 162.)

5.1 Immunokemiluminometria

Immunokemiallisista menetelmistä opinnäytetyössä käytettiin kaksoisvasta-ainetekniikkaa hyödyntävää immunokemiluminometriaa. Kaksoisvasta-ainetekniikassa kiinteään faasin vasta-aineen lisäksi käytetään yleensä leimattua vasta-ainetta. Molemmat vasta-aineet tunnistavat kiinnostuksen kohteena olevan antigeenin. (Wu 2013: 169–170.)

Luminesenssia tapahtuu sähköisen, biokemiallisen tai kemiallisen reaktion vaikutuksesta, jolloin atomin tai molekyylin viritystila purkautuu ja atomi palaa alemmalle energiatasolle. Reaktiossa ylimääräinen energia vapautuu valona, kun atomi tai molekyyli emittoi samalla fotonin eli valokvantin. Kemiluminesenssi on kemiallisen reaktion aiheuttamaa sähkömagneettista emissiota eli säteilyä, joka tuottaa valoa. (CD Creative Diagnostics® 2019; Tiensuu 2000: 13; Wu 2013: 167.)

Leimamenetelmässä vasta-aine merkitään kiinnittämällä siihen molekyyli, joka mahdollistaa vasta-aine-antigeenikompleksien havaitsemisen pienilläkin pitoisuuksilla lisäten analyttistä herkkyyttä määrittämisessä. Leimattua vasta-ainetta tarvitaan ylimäärin, jotta leimavasta-aine ei muodostu reaktiota rajoittavaksi tekijäksi. Antigeenin pitoisuus näytteessä on suoraan verrannollinen siihen, kuinka paljon sitä on sitoutuneena leimavasta-aineeseen. (Wu 2013: 166–170.) Opinnäytetyössä tutkittujen immunokemian analyttien menetelmät käyttävät leimavasta-aineena luminesoivaa akridiiniesteriä. Akridiiniesteri on rengasrakenteinen orgaaninen molekyyli, jossa on esterisidos. Emäksisissä olosuhteissa vetyperoksidin vaikutuksesta akridiiniesterin esterisidos katkeaa ja jäljelle jää epästabiili molekyyli, N-metyyliakridoni. Reaktiossa emittoituu valoa aallonpituudella 430 nm, kun epästabiili molekyyli palaa takaisin vakaampaan perustilaansa. (CD Creative Diagnostics® 2019; Wu 2013: 167.)

Leimamenetelmää käytettäessä vasta-aine-antigeenisuhde on lineaarinen tiettyyn pisteeseen saakka, jonka jälkeen se on altis hook-vaikutukselle. Hook-vaikutuksessa analyytin konsentraatio ylittää analyytin mitta-alueen. Kun näytteessä esiintyy erittäin suuria antigeenipitoisuuksia, leimavasta-aine saturoituu eli kyllästyy, jonka seurauksena kaksoisvasta-ainetekniikalle ominaista sandwich-rakennetta ei muodostu ja emittoitua signaali jää virheellisen alhaiseksi. Näytettä voidaan laimentaa, jolloin saadaan korkeampi, mutta tarkempi lopullinen tulos (McCudden – Willis 2013: 671; Wu 2013: 169–170.)

5.2 Tutkitut immunokemian analyytit

Tässä kappaleessa esitellään lyhyesti kreatiinikinaasin MB-alayksikön ja myoglobiinin merkitys elimistössä, kliininen käyttö ja analyysimenetelmä. Lisäksi tarkastellaan tutkimuksiin vaikuttavia häiriötekijöitä erityisesti hemolyyysin vaikutuksen kannalta.

5.2.1 Kreatiinikinaasin MB-alayksikkö

Kreatiinikinaasi esiintyy dimeerinä, joka koostuu kahdesta alayksiköstä. Alayksiköt voidaan erottaa kolmeksi erilliseksi molekyyli muodoksi, joita ovat CK-BB (aivoperäinen), CK-MB (sydänperäinen) ja CK-MM (lihasperäinen). Tavallisesti seerumista noin 94 % on MM-isoentsyymiä ja noin 6 % MB-isoentsyymiä. Herkillä menetelmillä myös pieniä määriä BB-isoentsyymiä voidaan havaita seerumissa. Samoin luurankolihasissa esiintyvä MM-isoentsyymi muodostaa valtaosan entsyymin aktiivisuudesta MB-isoentsyymin osuuden jäädessä alle 4 %. Sydänlihaksessa suurin osa CK-aktiivisuudesta on MM-isoentsyymiä ja noin 20 % MB-isoentsyymiä. (Johnson-Davis 2013: 271–272; Kreatiinikinaasi, plasmasta. 2018.)

Vaikka hybridimuotoista MB-isoentsyymiä tavataan pienissä määrin muissakin kudoksissa, sydänlihaskudos on olennaisesti ainoa kudos, josta MB-isoentsyymiä siirtyy seerumiin merkittävässä määrin. MB-isoentsyymin immunokemiallista määrittämistä käytetäänkin hyödyksi erilaisten sydänlihaskudosten sairauksien diagnostiikassa. CK-MB-pitoisuus nousee akuutissa sydäninfarktissa, iskeemisessä sydänlihaskudon vauriossa, angina pectoris -kivussa, inflammatorisissa sydänlihassairauksissa sekä sydänlihaskirurgisten toimenpiteiden yhteydessä. (Johnson-Davis 2013: 273; Kreatiinikinaasi, MB-alayksikkö, massa, plasmasta. 2018.)

CK-MB-isoentsyymin määrittäminen näytteestä tapahtuu immunokemiluminometrisesti ja menetelmässä hyödynnetään kaksoisvasta-ainetekniikkaa (Creatine Kinase MB. 2017; Kreatiini-kinasi, MB-alyksikkö, massa, plasmasta. 2018). Isoentsyymistä mitataan sen massakonsentraatio entsyymaattisen aktiivisuuden sijaan, jolloin voidaan havaita myös entsyymaattisesti inaktiivinen MB-isoentsyymi (Johnson-Davis 2013: 274).

Määrittämisessä leimavasta-aineena on hiiren monoklonaalista anti-CK-MB-vasta-ainetta, joka on leimattu akridiiniesterillä. Määrittäminen kiinteän faasin vasta-aine on hiiren monoklonaalista anti-CK-BB-vasta-ainetta, joka on kovalenttisesti sidottu paramagneettisiin partikkeleihin. Antigeenin eli CK-MB-isoentsyymien havaitsemiseksi kiinteän faasin vasta-aine kiinnittää itseensä antigenin. Reagoimattomat molekyylit pestään pois ja reaktioon lisätään leimattu detektorivasta-aine. Toisessa pesussa vapaa sitoutumaton leimavasta-aine pestään pois. Leimavasta-aine signaloi valoa ja signaali on verrannollinen detektorivasta-aineeseen kiinnittyneen antigenin määrään, eli CK-MB-pitoisuus näytteessä on suoraan verrannollinen suhteellisten valoyksikköjen (relative light unit, RLU) määrään, jotka mittaustekninen laitteisto havaitsee. (Creatine Kinase MB. 2017; Wu 2013: 169–170.)

Hemolyyysillä on vähemmän haitallista vaikutusta CK-MB-isoentsyymien massamäärittäykseen kuin entsyymiaktiivisuuteen perustuviin menetelmiin. Hemolyyysi voi toisaalta aiheuttaa häiriötä massamäärittäykseen erittäin korkeilla hemoglobiinipitoisuuksilla. (Özcan – Karakaş – Yücel 2012: 382.) Näytteen poikkeuksellisen korkea CK-MB-pitoisuus voi aiheuttaa paradoksaalista laskua RLU-yksikköjen määrään hook-vaikutuksen takia. Myös näytteessä mahdollisesti olevat epätavanomaiset vasta-aineet voivat reagoida määrittämisessä johtaen virheellisen korkeaan tai matalaan tulokseen. (Creatine Kinase MB. 2017.) Häiritsevä vasta-aine kiinnittyy sekä leimavasta-aineeseen että kiinteän faasin vasta-aineeseen ja tuottaa signaalin ilman mitattavaa analyysiä (Wu 2013: 172).

5.2.2 Myoglobiini

Myoglobiini on globulaarinen hemoproteiini, joka koostuu yhdestä 154 aminohappoa sisältävästä polypeptidiketjusta ja porfyriinirenkaasta, jonka keskusta sisältää ferrorauta-atomia. Myoglobiini on primaarinen happea kuljettava proteiini luurankolihasissa ja sydänlihaksessa ja suurimmaksi osaksi liuenneena sytoplasmaan. Kuten hemoglobiini, myoglobiini pystyy reversiibelisti sitomaan happea. Hemoglobiinista poiketen sillä on rakenteessaan kuitenkin vain yksi happea sitova kohta, jonka affiniteetti on hyvin korkea.

Kudostasolla myoglobiini pystyy vastaanottamaan happea hemoglobiinilta ja joko säilyttämään vastaanottamansa hapen tai toimittamaan sen lihassoluihin esimerkiksi lisääntyneen metabolisen aktiivisuuden aikana. Normaaleissa olosuhteissa myoglobiini kiertää veressä sitoutuneena plasmaproteiineihin. Kun myoglobiinipitoisuus nousee merkittävästi, proteiinien sitoutumiskapasiteetti ylikuormittuu ja myoglobiinia erittyy nopeasti virtsaan. (Gossman – Foris – Richards 2019; Keil 2013: 227.)

Myoglobiinipitoisuus nousee erilaisissa lihassairauksissa ja -vammoissa kuten lihasdystrofiassa, myosiiteissa, myopatioissa, palovammoissa ja rabdomyolyysissä. Pitoisuuden nousua voi esiintyä myös jo minimaalisissa lihastraumoissa kaatumisen, fyysisen rasituksen tai intramuskulaaristen injektoiden yhteydessä. Myoglobiinipitoisuuden nousua aiheuttavat lisäksi elimistön pitkäaikainen immobilisaatio, metaboliset sairaudet, infektiot, epileptiset kohtaukset, tietyt lääkkeet, sekä pitkittynyt päihteiden käyttö. Edellä mainitut syyt voivat aiheuttaa epätasapainon lihasenergian tuotannon ja kulutuksen välillä, mikä johtaa lihasten vaurioitumiseen ja täten myoglobiinin vapautumiseen. (Gossman ym. 2019; Keil 2013: 227–228; Lawrence – Broussard 2013: 432; Myoglobiini, plasmasta. 2018.)

Myoglobiinin määrittäminen näytteestä tapahtuu immunokemiluminometrisesti, ja menetelmässä hyödynnetään kaksoisvasta-ainetekniikkaa (Myoglobiini. 2017; Myoglobiini, plasmasta. 2018). Määrittämisessä leimavasta-aineena on vuohen polyklonaalista antimyoglobiinivasta-ainetta, joka on leimattu akridiiniesterillä. Määrittämisessä kiinteän faasin vasta-aine on hiiren monoklonaalista antimyoglobiinivasta-ainetta, joka on kovalenttisesti sidottu paramagneettisiin partikkeleihin. Antigeenin eli myoglobiinin havaitsemiseksi kiinteän faasin vasta-aine kiinnittää itseensä antigeenin. Reagoimattomat molekyylit pestään pois ja reaktioon lisätään leimattu detektorivasta-aine. Toisessa pesussa vapaa sitoutumaton leimavasta-aine pestään pois. Leimavasta-aine signaloi valoa ja signaali on verrannollinen detektorivasta-aineeseen kiinnittyneen antigeenin määrään, eli myoglobiinin pitoisuus näytteessä on suoraan verrannollinen suhteellisten valoyksikköjen (RLU) määrään, jotka mittaustekninen laitteisto havaitsee. (Myoglobiini. 2017; Wu 2013: 170.)

Özcanin ym. (2012: 384) mukaan hemolyysillä ei ole häiritsevää vaikutusta myoglobiinipitoisuuden määrittämisessä. Muihin määrittämisessä virhelähteisiin lukeutuvat näytteen poikkeuksellisen korkeasta myoglobiinipitoisuudesta johtuva hook-vaikutus sekä näytteessä mahdollisesti olevat epätavanomaiset vasta-aineet (Myoglobiini. 2017).

6 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää, minkä asteinen hemolyysi vaikuttaa tutkittavien analyyttien mittaustuloksiin kliinisesti merkitsevästi ja luoda hemolyysi-indeksille raja-arvot. Tavoitteena oli tuottaa luotettavia tuloksia, joita voidaan automaatiolaboratoriossa hyödyntää laitteille asetettavina autovalidointikriteereinä. Työssä analysoitiin hemolysaattilaimennossarjoista kaikkiaan 25 analyyttiä ja opinnäytetyössä käsiteltiin näistä 12. Kaikki tulokset jäivät automaatiolaboratorion hyödynnettäviksi.

Tutkimuskysymykset:

- 1) Kuinka suuri hemoglobiinipitoisuus aiheuttaa kliinisesti merkittävän poikkeaman tutkittujen analyyttien pitoisuuksiin?
- 2) Vaikuttaako analyytin pitoisuustaso hemolyysin aiheuttaman poikkeaman suuruuteen?

7 Opinnäytetyön menetelmät

Opinnäytetyön aiheen toimeksiantajana toimi HUSLAB-talon automaatiolaboratorio, jonka tiloissa ja laitteilla opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin. Työtä ohjasivat kemisti Mia Sneck, erikoistuva kemisti Eveliina Korhonen ja Metropolian lehtori Merja Ojala. Opinnäytetyön aiheena oli hemolyysi-indeksin verifioiminen Siemens Healthineersin Atellica® Solution -laitteille, kliinisen kemian ja immunokemian analyyteille. Myöhemmin opinnäytetyössä laitekokonaisuuteen viitataan vain Atellica® Solution -nimellä.

Opinnäytetyössä esiteltäviksi valittiin analyyttejä niiden tunnetun hemolyysiherkkyden perusteella. Opinnäytetyötä ohjaavilta kemisteiltä opinnäytetyön tekijät saivat valintaa varten listan HIL-indekseistä, jotka ovat Siemens Healthineersin listaamia ehdotettuja rajoja Atellica® Solution -laitteelle. Listauksen matalien hemolyysi-indeksien perusteella tutkittavaksi valittiin ALAT, kalium ja CK edustamaan analyyttejä, jotka ovat tunnetusti hemolyysiherkkiä. Osan analyyteistä (ASAT, LD ja ammoniumioni) tiedettiin kirjallisuuden perusteella olevan hemolyysille herkkiä, mutta niille ei löytynyt vielä käyttökelpoista tutkittua tietoa Atellica® Solution -analysointoreiden hemolyysihäiriöstä. Myöskään immunokemian analyyteille ei ollut ehdotettua hemolyysirajaa. CRP valittiin ei-hemolyysiherkäksi verrokiksi. Analyyttien lopullisessa valinnassa tarkasteltiin analyyttikohtaisia

menetelmäohjeita, erityisesti niissä olevia virhelähdetaulukoita tai suosituksia hemolyytisten näytteiden välttämisestä. Hemolyysiherkkien analyyttien ohella pyrittiin valitsemaan analyyttejä, joiden hemolyysihäiriön kliinisestä merkityksestä ei ollut varmuutta.

Opinnäytetyö toteutettiin määrällisen tutkimuksen menetelmin. Määrällisessä tutkimuksessa tarkastellaan muuttujien välistä tilastollista yhteyttä. Muuttujat jaetaan riippumattomiin eli selittäviin ja riippuviin eli selitettäviin muuttujiin. (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen 2015: 55.) Tässä työssä selittävän muuttujan asemassa olivat näytteen hemolyytisyyttä kuvaavat näytteen hemolyysi-indeksi ja vapaan hemoglobiinin pitoisuus. Selitettäviä muuttujia taas olivat mitattujen analyyttien pitoisuudet. Mittausmenetelmänä käytettiin kemian ja immunokemian analysaattorilla sekä spektrofotometrillä tapahtuvaa mittaamista.

Opinnäytetyön mittaukset tehtiin kolmen päivän aikana 29.8., 30.8. ja 17.9. Ensimmäisenä päivänä valmistettiin hemolysaatti ja valittiin hepariiniplasmanäytteet sekä tehtiin niistä näytepoolit. Seuraavana päivänä mitattiin hemolysaatti, valmistettiin fluoridiok-salaattiplasmasta laktaattinäytepooli ja valmistettiin hepariini- ja laktaattipoolista hemolysaattilaimennossarjat sekä analysoitiin ne. Kolmantena päivänä tehtiin ammoniumionin analysoimista varten EDTA-plasmapoolit ja hemolysaattilaimennossarjat sekä analysoitiin ne. Työvaiheet toteutettiin opinnäytetyötä ohjaavien kemistien ohjeiden mukaisesti. Tulokset analysoitiin syys-lokakuun aikana 2019.

7.1 Näytemateriaalin keruu ja näytepoolien valmistus

Hepariiniplasmanäytemateriaaliksi kerättiin HUSLAB-talon automaatiolaboratoriosta vuorokauden vanhoja, hävitettäväksi joutuvia plasmanäytteitä, joista potilastulokset oli jo analysoitu. Näytemateriaalia käytettiin näytepoolien ja hemolysaattien valmistukseen. Sopivien potilasnäytteiden keräämiseksi luotiin aluksi valintakriteerit. Tarkoituksena oli kerätä kiinnostuksen kohteena olevien analyyttien pitoisuuksien suhteen toisistaan poikkeavia näytteitä. Tutkimusvalikoiman laajuuden ja ajankäytön vuoksi ei ollut tarkoituksenmukaista löytää jokaiselle analyyttille näytettä, jossa analyytin pitoisuus oli suhteellisen korkea ja vastaavasti näytettä, jossa analyytin pitoisuus oli matala. Täten hakuehtoja rajattiin koskemaan kahta tutkittavaa analyyttiä.

Ensimmäisenä valintakriteerinä hepariininäytteille oli kerätä potilasnäytteitä, joissa oli joko matala tai korkea plasman ALAT-pitoisuus. Toisena valintakriteerinä oli kerätä potilasnäytteitä, joissa oli joko korkea tai todella korkea plasman CRP-pitoisuus. Eritasoisten näytteiden keräämisellä pyrittiin varmistamaan, että myös muiden tutkittavien analyyttien pitoisuudet sijoittuisivat mahdollisimman laajalle skaalalle ja että analyyttien pitoisuudet eivät laimenisi liikaa laimennossarjoja valmistettaessa.

Näytteitä kerättiin aluksi ylimäärin, jonka jälkeen näytepoolien valmistusta varten seulottiin edustavimmat näytteet. Jokaisen potilasnäytteen eroteltua hepariiniplasmaa tarkasteltiin visuaalisesti ja näytteet, jotka olivat silminnähtävien joko hemolyyttisiä tai lipeemisiä, hylättiin. Hemolyysiasteen tuli olla näytteissä matala, jotta saatiin matalan hemolyysiasteen vertailunäyte, johon hemolysaatilla käsiteltäviä näytteitä voitiin verrata ja siten luotettavasti todeta hemolyysiasteen vaikutus tulostasoon. Lipeemisiä näytteitä ei hyväksytty, sillä tiettyjen analyyttien pitoisuuksien mittaamiseen hyödynnettiin näytteiden saameuden mittaamista. Näytteitä käsiteltiin nimettöminä ja potentiaalisesti tartuntavaarallisina sekä niistä poistettiin potilaiden tunnistamiseen johtavat tiedot.

Näytepoolien valmistukseen käytettiin valikoitujen ALAT- ja CRP-näytteiden plasmaa. Neljä näytepoolia valmistettiin yhdistämällä plasmat 10 ml lisäaineettomiin putkiin, jotka merkittiin numeroilla 1, 2, 3 ja 4. Jokaiseen pooliin pipetoitiin plasmaa ad 10 ml, eli jokainen pooli sisälsi 6–7 eri näytteen plasmat. ALAT-näytteistä plasmat yhdistettiin omiksi pooleikseen siten, että pooli 1 sisälsi hemolysaatien valmistuksen yhteydessä eroteltujen ja muiden matalien ALAT-näytteiden plasmat (ALAT-pitoisuus oli noin 10–40 U/l) ja pooli 2 sisälsi korkeiden ALAT-näytteiden plasmat (ALAT-pitoisuus oli yli 100 U/l). CRP-näytteistä plasmat yhdistettiin omiksi pooleikseen siten, että pooli 3 sisälsi korkeiden CRP-näytteiden plasmat (CRP-pitoisuus oli noin 100 mg/l) ja pooli 4 sisälsi todella korkeiden CRP-näytteiden plasmat (CRP-pitoisuus oli noin 200 mg/l). Lopuksi jokaista tehtyä poolia sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla.

Laktaattipooli valmistettiin toisena tutkimuspäivänä. Laktaatin tutkimista varten kerättiin kaikki hävitettäväksi menevät fluoridioksalaattiplasmat, joita oli sillä hetkellä saatavilla. Plasmat tarkastettiin visuaalisesti samoin kuin hepariininäytteiden kohdalla ja kaikki soveltuvat näytteet yhdistettiin 10 ml lisäaineettomaan putkeen, joka sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla. Pooli merkittiin L-kirjaimella ja sen kokonaistilavuudeksi saatiin noin 4 ml.

Ammoniumionipoolit valmistettiin kolmantena tutkimuspäivänä. Vanhentuneita NH_4^+ -ioninäytteitä oli kerätty edellisellä viikolta ja näytteet oli pakastettu. Näiden lisäksi kerättiin vuorokauden sisällä otettuja, huoneenlämmössä säilytettyjä näytteitä, jotka olivat menossa hävitettäviksi. Näytteiden NH_4^+ -ionipitoisuudet tarkistettiin ja ne jaoteltiin arvoiltaan kohonneisiin (NH_4^+ -ionin pitoisuus oli $50 \mu\text{mol/l}$ tai enemmän) ja normaaleihin (NH_4^+ -ionin pitoisuus oli alle $50 \mu\text{mol/l}$). Kaikki näytteet olivat seisseet useita tunteja huoneenlämmössä, minkä vuoksi pitoisuudet olivat todennäköisesti kohonneet alkuperäiseen mittausajankohtaan verrattuna. Pitoisuuksien tarkastamisella pyrittiinkin ennen kaikkea saamaan näytepoolit hieman eri tasoisiksi, eikä pitoisuuksien muutoksella ollut merkitystä lopullisten tulosten kannalta, sillä kaikki tutkimusnäytteet analysoitiin samanaikaisesti.

Ammoniumionipoolien tekoa varten valittiin kaikki huoneenlämpöiset näytteet sekä viisi pakastettua ja sulatettua näytettä. Näytteet tarkastettiin visuaalisesti valinnan yhteydessä eikä hemolyttisiä tai sameita näytteitä otettu mukaan tutkimukseen. Pakastimessa olleet näytteet sentrifugoitii ennen niiden lisäämistä pooleihin. Sentrifugointiin käytettiin Hettich™ ROTIXA 500 RS -lattiasentrifugia, johon asetettiin RCF- eli g-arvoksi 2000, ajaksi 10 minuuttia ja lämpötilaksi $+20^\circ\text{C}$. Kaikkiin työn aikana suoritettuihin sentrifugointeihin käytettiin kyseisiä arvoja, joten arvoja ei ole myöhemmin tekstissä erikseen mainittu. Normaaliarvoja antaneet näytteet yhdistettiin pooliksi A1 ja korkeita arvoja antaneet näytteet pooliksi A2 10 ml lisäaineettomiin putkiin, jotka sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla. Kummankin poolin tilavuudeksi saatiin noin 5 ml.

7.2 Hemolysaattien valmistus

Hemolysaatteja valmistettiin ensin neljä eripitoista seosta, jotta niistä voitiin lopuksi valita suurimman hemoglobiinipitoisuuden omaava seos. Tavoitteena oli valmistaa mahdollisimman vahva hemolysaatti, jotta sen lisääminen laimentaisi mahdollisimman vähän tutkittavia näytepooleja. Hemolysaattien valmistukseen käytettiin neljän satunnaisesti valitun matalan ALAT-näytteen heparinisoidun kokoveren punasoluosaa. Plasma pipetoiitiin pois primääriputkista, jolloin putkien pohjalle jäljelle jäi ainoastaan punasoluosa. Pipetoitaessa oli tarkoituksellista saada pois kaikki plasma, jotta sen pitoisuudet eivät vaikuttaisi lopullisiin mittaustuloksiin niissä näytteissä, joihin hemolysaattia lisättäisi. Samalla menetettiin myös punasolujen pinnalla oleva valkosolut ja verihiutaleet sisältävä buffy coat -kerros ja pieni osa punasoluista. Eroteltuja plasmoja ei heitetty pois, vaan ne hyödynnettiin yhden näytepoolin valmistukseen edellä kuvatulla tavalla.

Hemolysaatit nimettiin kirjain-numeroyhdistelmillä H1, H2, H3 ja H4. Jokaisen hemolysaatin viskositeettia alennettiin lisäämällä solujen joukkoon pieni määrä vettä taulukon 1 mukaisesti. Veden lisäyksen tavoitteena oli alentaa hemolysaattien osmoottista painetta ja samalla tehostaa solujen hajoamista. Veden lisäämisen jälkeen jokaista hemolysaattia sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla. Hemolysaatteja pakastettiin yhden tunnin ajan -80°C :ssa. Pakastuksen tarkoituksena oli maksimoida hemolysaattien kaikkien solujen hajoaminen.

Taulukko 1. Hemolysaatteihin lisätyn veden määrä eri kerroilla.

Hemolysaatti	Veden lisäys 1. kerran	Veden lisäys 2. kerran
H1	250 μl	3000 μl
H2	500 μl	2000 μl
H3	750 μl	1000 μl
H4	1000 μl	1000 μl

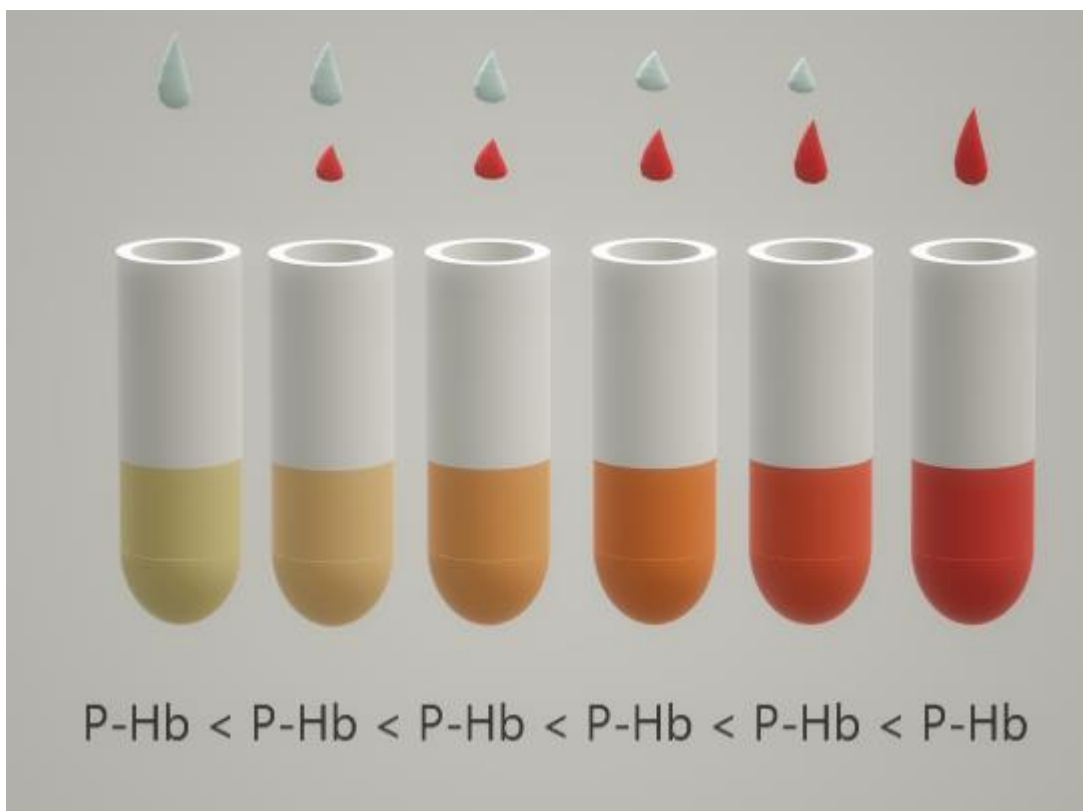
Pakastusajan jälkeen hemolysaatit haettiin huoneenlämpöön ja niiden annettiin sulaa yhden tunnin ajan. Sulatuksen jälkeen hemolysaatit sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla ja sentrifugoitiin Hettich™ ROTIXA 500 RS -lattiasentrifugilla solukappaleiden poistamiseksi. Sentrifugoinnin jälkeen jokainen hemolysaatti siirrettiin primääriputkesta omaan erotteluputkeen siten, että primääriputkien pohjalle jätettiin pieni määrä punasolujen kappaleita sisältävää massaa.

Erotteluputkiin lisättiin toisen kerran pieni määrä vettä (taulukko 1). Hemolysaatit sekoitettiin huolellisesti koeputkiravistelijalla, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin jälleen Hettich™ ROTIXA 500 RS -lattiasentrifugilla. Sentrifugoinnin tarkoituksena oli saada hemolysaattien supernatantti ja sakka erottautumaan toisistaan, jotta kemian ja immunokemian analysointoreiden näytenäytteet eivät tukkeutuisi solumassasta. Hemolysaatit ajettiin hematologian Sysmex XE-5000 -virtausytometrillä hemoglobiinipitoisuuden selvittämiseksi. Saatujen soluparametrien perusteella hemolysaatit sisälsivät vielä tässä vaiheessa liikaa soluja, joten hemolysaattien käsittelyä jatkettiin. Jokaista hemolysaattia sekoitettiin vielä käsin pipetoimalla punasoluosaa edestakaisin erotteluputkessa, jotta toistuva mekaaninen liike hajottaisi lisää soluja. Lopuksi hemolysaatit vietiin -80°C :n pakkaseen 15 tunnin ajaksi.

Pakastusajan jälkeen hemolysaattien annettiin sulaa huoneenlämmössä. Sulamista nopeutettiin hieman lämmittämällä putkia käsin, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin Hettich™ ROTIXA 500 RS -lattiasentrifugilla. Hemolysaatit ajettiin toistamiseen Sysmex XE-5000 -virtaussytometrillä hemoglobiinipitoisuuden selvittämiseksi. Jatkoon hemolysaattilaimennossarjojen valmistukseen valittiin hemolysaatti H3, jonka lopullinen hemoglobiinipitoisuus oli 146 g/l. Valintaa perusteltiin sillä, että kaikista hemolysaateista H3 antoi korkeimman hemoglobiinipitoisuuden.

7.3 Hemolysaattilaimennossarjojen valmistus ja analysointi

Toisena päivänä valmistettiin viidestä näytepoolista (näytepoolit 1, 2, 3, 4 ja L) seitsemän näytteen hemolysaattilaimennossarjat, jotka sisälsivät tasot 0–6. Kullakin tasolla oli hemoglobiinille oma tavoitepitoisuus, joka löytyy laimennostaulukoista 2 ja 3. Tavoitepitoisuuksien perusteella tutkimusnäytteisiin lisättiin hemolysaattia. Hemolysaatin aiheuttaman laimenemisen kompensoimiseksi näytteitä laimennettiin vedellä hemolysaatin lisäystä vastaava määrä. Kaikkiin näytteisiin lisättiin siis sama nestetilavuus, mutta hemolysaatin ja veden suhde vaihteli. Referenssinäytteenä käytettiin tasoa 0, johon lisättiin vain vettä. Vahvimman tason 6 näytteisiin lisättiin vain hemolysaattia. Hemolysaattilaimennossarjan valmistusta havainnollistaa kuvio 9.



Kuvio 9. Hemolysaattilaimennossarjan valmistus. Kaikkiin sarjan näytteisiin lisättiin sama nestetilavuus. Vahvimpaan näytteeseen lisättiin pelkkää hemolysaattia ja referenssinäytteen pelkkää vettä.

Veden lisäyksellä pyrittiin siihen, että kaikissa samasta näytepoolista peräisin olevat tutkimusnäytteet sisältäisivät teoriassa saman plasmapitoisuuden tutkittavaa analyyttiä, sillä hemolysaatin sisältämä vesi ja punasoluista vapautuva sisältö myös laimensi näytteitä. Näin havaittujen mittausvirheiden voitiin olettaa johtuvan puhtaasti hemolysista ja hemolyttisiä tasoja voitiin verrata referenssinäytteiden tuloksiin. Tarvittavat hemolysaatin ja veden määrät laskettiin ja pipetointikaaviot laadittiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaa käyttäen. Hemolysaatin laimennuskaava on kuviossa 10. Veden määrä laskettiin kullekin tasolle vähentämällä näytteen kokonaistilavuudesta käytettävän näytepoolin ja hemolysaatin määrät.

$$v_1 = \frac{(c_2 \times v_2)}{c_1}$$

Kuvio 10. Laimennuskaava, jossa v_1 on tarvittavan hemolysaatin määrä, c_1 on hemolysaatin pitoisuus, v_2 on näytteen lopullinen tilavuus ja c_2 on tavoiteltu hemoglobiinipitoisuus.

Näytepooleja 1–4 käytettiin 1 ml kuhunkin tasoon 0–6. Lisäksi jokaiseen näytteeseen lisättiin yhteensä 66 µl vettä tai hemolysaattia taulukon 2 mukaisesti. Siten näytesarjoissa 1–4 kunkin laimennoksen kokonaistilavuus oli 1,066 ml. Hepariniinäytesarjoissa tutkimusnäytteitä oli yhteensä 28.

Taulukko 2. Näytepoolien 1–4 laimennostaulukko.

Hemolyysitaso	Näytteen kokonaistilavuus	Lisätyn poolin määrä	Hemolysaatin määrä	Veden määrä
Taso 0: 0 g/l	1,066 ml	1000 µl	0 µl	66 µl
Taso 1: 1 g/l	1,066 ml	1000 µl	7 µl	59 µl
Taso 2: 2 g/l	1,066 ml	1000 µl	15 µl	51 µl
Taso 3: 3 g/l	1,066 ml	1000 µl	22 µl	44 µl
Taso 4: 5 g/l	1,066 ml	1000 µl	37 µl	29 µl
Taso 5: 7 g/l	1,066 ml	1000 µl	51 µl	15 µl
Taso 6: 9 g/l	1,066 ml	1000 µl	66 µl	0 µl

L-näytepoolia käytettiin kuhunkin tasoon 500 µl, minkä lisäksi jokaiseen näytteeseen lisättiin yhteensä 33 µl vettä tai hemolysaattia taulukon 3 mukaisesti. L-näytesarjan näytteiden kokonaistilavuus oli siten 533 µl. Tasolla 1 pipetoitava hemolysaatin määrä jouduttiin nostamaan 5 µl:aan, sillä pienemmän määrän pipetointi ei ollut mahdollista käytettävissä olevilla välineillä. L-näytesarjassa oli yhteensä seitsemän tutkimusnäytettä.

Taulukko 3. Näytepoolien L, A1 ja A2 laimennostaulukko.

Hemolyysitaso	Näytteen kokonaistilavuus	Lisätyn poolin määrä	Hemolysaatin määrä	Veden määrä
Taso 0: 0 g/l	0,533 ml	500 µl	0 µl	33 µl
Taso 1: 1 g/l	0,533 ml	500 µl	5 µl	28 µl
Taso 2: 2 g/l	0,533 ml	500 µl	7 µl	26 µl
Taso 3: 3 g/l	0,533 ml	500 µl	11 µl	22 µl
Taso 4: 5 g/l	0,533 ml	500 µl	18 µl	15 µl
Taso 5: 7 g/l	0,533 ml	500 µl	26 µl	7 µl
Taso 6: 9 g/l	0,533 ml	500 µl	33 µl	0 µl

Näytesarjat pipetoitiin siten, että sama henkilö pipetoi kokonaiset sarjat, jotta välttyttäisi pipetointikäsitteiden vaikutukselta. Näytesarjojen näytteet merkittiin viivakoodein laitteelle syöttämistä varten. Kaksiosaisissa merkinnöissä ensimmäinen numero tai kirjain tarkoitti näytepoolin numeroa ja toinen numero hemolyysitason numeroa. Esimerkiksi merkintä 1-1 tarkoitti 1-näytesarjan 1-tasoa. Ennen näytteiden analysointia kaikkien analyyttien kontrollitulokset tarkastettiin laitteilta. Laitteet eivät olleet vielä tuotannossa, joten kontrollien rajoja ei ollut vielä päivitetty laitteille. Rajojen puuttuessa tuloksista tarkistettiin, että ne olivat pysyneet riittävän samanlaisina pidemmällä aikavälillä. Plasman magnesiumin kontrollituloksissa oli hieman enemmän vaihtelua, joten sen kontrolli ajettiin vielä ennen analysoinnin aloittamista uudelleen ja tarkistettiin, että tulos saavuttaa sisäisen laadunohjauksen kriteerit.

Jokaisesta tutkimusnäytteestä mitattiin hemolyysi-indeksi ja kaikki näytetyypille soveltuvat kemian ja immunokemian analyytit kahtena rinnakkaisena mittauksena Atellica® Solution -laitteella. Hepariininäytteistä mitatut kemian analyytit olivat alkalinen fosfataasi (AFOS), alaniiniaminotransferaasi (ALAT), aspartaattiaminotransferaasi (ASAT), kreatiini (CK), C-reaktiivinen proteiini (CRP), haptoglobiini (Haptog), kalium (K) ja laktaattidehydrogenaasi (LD). Kemian analyytit analysoitiin CH11-laitteella. Lyhenne CH viittaa Siemens Healthineersin nimikointiin kemian moduulista ja numerointi on HUSLA-Bin antama järjestysnumero laitteille. Immunokemian moduulista käytetään vastaavasti IM-lyhennettä. Hepariininäytteistä mitatut immunokemian analyytit olivat kreatiiniin MB-alayksikkö (CK-MBm) ja myoglobiini (Myogl). Immunokemian mittauksiin käytettiin IM9-laitetta. Näiden opinnäytetyössä tarkasteltavien analyyttien lisäksi hepariininäytteistä analysoitiin kemian analyytit bilirubiini (Bil), konjugoitu bilirubiini (Bil-Kj), rauta (Fe), kreatiniini (Krea), magnesium (Mg), reumafaktori (RF), transferriniireseptori (TfR), uraatti (Uraat) ja urea (Urea) sekä immunokemian analyytit 25-OH-D-vitamiini (D-25), B-tyyppin natriureettinen peptidi (BNP), vapaa tyroksiini (T4-V) ja troponiini I (TnI). L-sarjan näytteistä analysoitiin laktaatti (Laktaat) CH11-laitteella. Kaikki tulokset tuotiin Siemens Healthineersin omalle muistikulle ja tulostiedosto purettiin sekä siirrettiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaan.

Kaikista näytteistä mitattiin lopuksi vapaan hemoglobiinin pitoisuus Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä. Ennen mittausten aloittamista spektrofotometrin toiminta varmistettiin ajamalla sisäisen laadunohjauksen kontrollinäyte. Tutkimusnäytteitä oli tässä

vaiheessa jäljellä pieni määrä, joten näytteitä laimennettiin 0,9 % natriumkloridiliuokseen, sillä spektrofotometrin näytekyvettiin tarvittava näytemäärä oli 800 µl. Laimentamisessa käytettiin 1:10, 1:20 ja 1:40 laimennossuhteita. Kutakin laimennosta valmistettiin 1 ml, joka siirrettiin mittauksen ajaksi kertakäyttöiseen näytekyvettiin. Tavoitteena oli päästä hemoglobiinipitoisuudessa lähelle tavoiteltua hemoglobiinipitoisuutta ja saada asteittain eri pitoisia näytteitä. Hepariniinäytesarjan 4 näytteet 4-5 ja 4-6 olivat loppuneet kokonaan ja ne jouduttiin valmistamaan uudelleen alkuperäisestä näytepoolista hemoglobiinimittausta varten.

Ammoniumioninäytteet analysoitiin kolmantena päivänä. Välissä olevan kahden viikon ajan hemolysaattia säilytettiin pakastimessa -80°C:n lämpötilassa. Hemolysaatti sulatettiin, sekoitettiin koeputkiravistelijalla, sentrifugoitiin Hettich™ ROTIXA 500 RS -lattiasentrifugilla ja ajettiin uudelleen hemoglobiinipitoisuuden selvittämiseksi Sysmex XE-5000 -virtaussytometrillä, sillä pitkäaikainen pakastus olisi saattanut hajottaa lisää soluja ja sitä kautta muuttaa hemolysaatin hemoglobiinipitoisuutta. Hemolysaatin hemoglobiinipitoisuudeksi saatiin kuitenkin edelleen 146 g/l, joten hemolysaattilaimennossarjojen valmistuksessa saatettiin käyttää samoja pipetointimääriä kuin laktaattinäytteiden kanssa. Näytepooleja A1 ja A2 käytettiin kuhunkin tasoon 500 µl, minkä lisäksi jokaiseen näytteeseen lisättiin yhteensä 33 µl vettä tai hemolysaattia taulukon 3 mukaisesti. A1- ja A2-näytesarjojen näytteiden kokonaistilavuus oli siten 533 µl. Näihin kahteen näytesarjaan viitataan työssä myös yhteisesti A-näytesarjoina. A-näytesarjoissa oli yhteensä 14 tutkimusnäytettä.

Näytesarjat pipetoitiin siten, että sama henkilö pipetoi samat tilavuudet, jotta pipetointikäsiälä ei aiheuttaisi eroavaisuuksia sarjojen sisällä. Näytesarjojen näytteet merkittiin viivakoodein laitteelle syöttämistä varten. Ennen näytteiden analysointia Atellica® Solution -laitteella CH5, laitteelle tehtiin ammoniumionin vakiointi ja sille ajettiin kontrollit. Analysointiin valittiin uudempi reagenssipakkaus, jonka kontrollit asettuivat paremmin tavoiteväleille. Kaikista A-näytesarjojen näytteistä analysoitiin hemolyyysi-indeksi sekä ammoniumioni (NH₄⁺-ioni) kahtena rinnakkaisena mittauksena. Tulokset tuotiin muistitikulle ja käsiteltiin samoin kuin aiemmatkin tulokset.

A-sarjojen näytteistä mitattiin vielä hemoglobiinipitoisuudet Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä. Näytteet laimennettiin 0,9 % natriumkloridiliuokseen mittausta varten käyttäen 1:10 laimennossuhdetta. Kutakin laimennosta valmistettiin 1 ml, joka siirrettiin mittauksen ajaksi kertakäyttöiseen näytekyvettiin.

7.4 Tulosten analysointimenetelmät

HUSLAB käyttää verifiointissa analyttikohtaisia laatutavoitteita sarjan sisäiselle variaatiokertoimelle. Näitä käytetään saman näytteen rinnakkaisille mittauksille, jotka eivät saa poiketa toisistaan enempää kuin laatutavoitteen verran. Tulokset eivät saaneet poiketa enempää myöskään hemolyysin seurauksena, jotta voitiin todeta, että kyseessä olevalla tasolla hemolyysillä ei ollut kliinistä vaikutusta pitoisuuksiin. Laatutavoitetta käyttämällä pyrittiin löytämään se hemolyysitaso, joka ylittää analyttikohtaisen laatutavoitteen ja näin muodostaa kliinisesti merkittävän hemolyysihäiriön rajan. Sen vuoksi referenssitason ja hemolyyttisen tason vertailussa käytettiin sarjan sisäistä variaatiokerrointa ja sille määritettyä rajaa. Laskeminen toteutettiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmalla.

Ensin tarkastettiin rinnakkaismittausten välinen toistettavuus laskemalla kahden rinnakkaisen mittauksen välinen keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s) ja variaatiokerroin (CV%). Keskiarvo kuvaa havaintoarvojen keskimääräistä suuruutta. Keskihajonta kuvaa havaintoarvojen keskimääräistä hajontaa eli sitä, kuinka kaukana havaintoarvot ovat keskimäärin jakauman keskiarvosta. Variaatiokerroin on keskihajonnan ja keskiarvon välinen suhde, joka ilmaistaan prosentteina. Se ilmaisee sitä, kuinka monta prosenttia muuttujan arvot keskimäärin poikkeavat keskiarvosta. (Nummenmaa – Holopainen – Pulkkinen 2014: 75, 82–84; Vilka 2007: 122–125.)

Keskiarvon ja keskihajonnan laskemisessa käytettiin Microsoft Excelin valmiita kaavoja keskiarvolle ja otoskeskihajonnalle. Variaatiokerroin laskettiin keskihajonnan prosenttiosuutena keskiarvosta. Variaatiokertoimiin yli HUSLABin tavoitteiden reagoitiin. Tämän jälkeisissä laskuissa käytettiin rinnakkaismittausten keskiarvoa tai edustavampaa mitaustulosta. Joissakin tapauksissa oli käytettävissä ainoastaan yksi tulos kahden rinnakkaisen mitaustuloksen sijaan, jolloin sitä käytettiin laskuissa.

Sarjan sisäisen variaatiokertoimen laskemisessa käytettiin Dahlbergin menetelmää, joka ottaa huomioon kaikki näytesarjat ja niiden sisältämät pitoisuuserot hajonnan ja variaatiokertoimen laskemisessa. Laskemisessa käytettiin parittaisia mittauksia, referenssitason rinnakkain hemolyyttisen tason kanssa. Referenssitason ja hemolyyttisen tason keskiarvoista nähtiin, kuinka paljon näytteen pitoisuus keskimäärin muuttui. Dahlbergin hajontaluvun ($s(d)$) laskennassa käytettiin kunkin näytteen referenssitason ja hemolyysitason erotusten summaa sekä näytteiden lukumäärää (kuvio 11). Suuri hajontaluku kertoo,

että arvot poikkeavat enemmän toisistaan, mutta koska kaavassa käytetään toista potenssia, tieto muutoksen suunnasta häviää.

$$s(d) = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

Kuvio 11. Kaavassa $s(d)$ kuvaa Dahlbergin hajontaa, jossa Σ on summa, d^2 on kahden mittauksen välinen erotuksen neliö ja n on näytteiden lukumäärä kerrottuna kahdella (mukaillen Springate 2012: 158–159).

Dahlbergin hajonnan ja näytteiden keskiarvojen keskiarvon avulla laskettiin Dahlbergin variaatiokertoimet (CV%) kullekin hemolyysitasolle. Näytteiden keskiarvojen keskiarvolla tarkoitetaan parittaisten mittausten keskiarvojen välistä keskiarvoa, eli kaikkien laskussa mukana olevien näytteiden keskiarvoa. Dahlbergin variaatiokertoimen kaava on esitetty kuviossa 12. Dahlbergin variaatiokerrointa verrattiin HUSLABin sisäisen variaatiokertoimen laatutavoitteeseen.

$$CV\% = \frac{s(d)}{ka} \times 100 \%$$

Kuvio 12. Dahlbergin variaatiokertoimen (CV%) kaava. Kaavassa $s(d)$ on Dahlbergin hajonta ja ka mittausten keskiarvojen keskiarvo.

Tuloksena saadut variaatiokertoimet kuvattiin kaaviossa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvaajasta määritettiin hemoglobiinipitoisuus, jolla HUSLABin laatutavoite ylittyi. Muuntokuvion ja taulukon perusteella määritettiin, mitä hemolyysi-indeksiä ja laitteen mittaamaa tarkkaa arvoa määritetty raja vastasi. Näin saatiin kullekin analyytillle raja laitteen mittaamalle tarkalle hemolyysi-indeksille, joka tässä työssä on muunnettu yksiköön g/l, jotta se olisi vertailukelpoinen spektrofotometrillä mitattujen hemoglobiinipitoisuuksien kanssa.

Näytesarjojen rinnakkaistulosten keskiarvot kuvailtiin myös kaaviona, jossa kunkin näytesarjan tulokset esitetään erikseen hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvaajasta tarkasteltiin sitä, mihin suuntaan ja kuinka paljon analyytin pitoisuus muuttui hemolyysin seurauksena. Lisäksi kuvaajasta arvioitiin, oliko analyytin pitoisuustasolla merkitystä siihen, kuinka paljon tulos muuttui hemolyysin seurauksena.

Näytesarjojen sisällä laskettiin lisäksi kullekin hemolyysitasolle erotus ja eroprosentti referenssitason tulos hemolyyttisen tason tuloksesta. Erotus laskettiin vähentämällä referenssitason tulos hemolyyttisen tason tuloksesta. Eroprosentti laskettiin erotuksen prosenttiosuutena referenssitason tuloksesta. Tuloksista tarkasteltiin hemolyysin aiheuttamaa absoluuttista ja prosentuaalista muutosta ja arvoitiin, oliko tutkittavan analyytin pitoisuustasolla vaikutusta hemolyysin aiheuttamaan mittausvirheeseen.

8 Tulokset ja tulosten tulkintaa

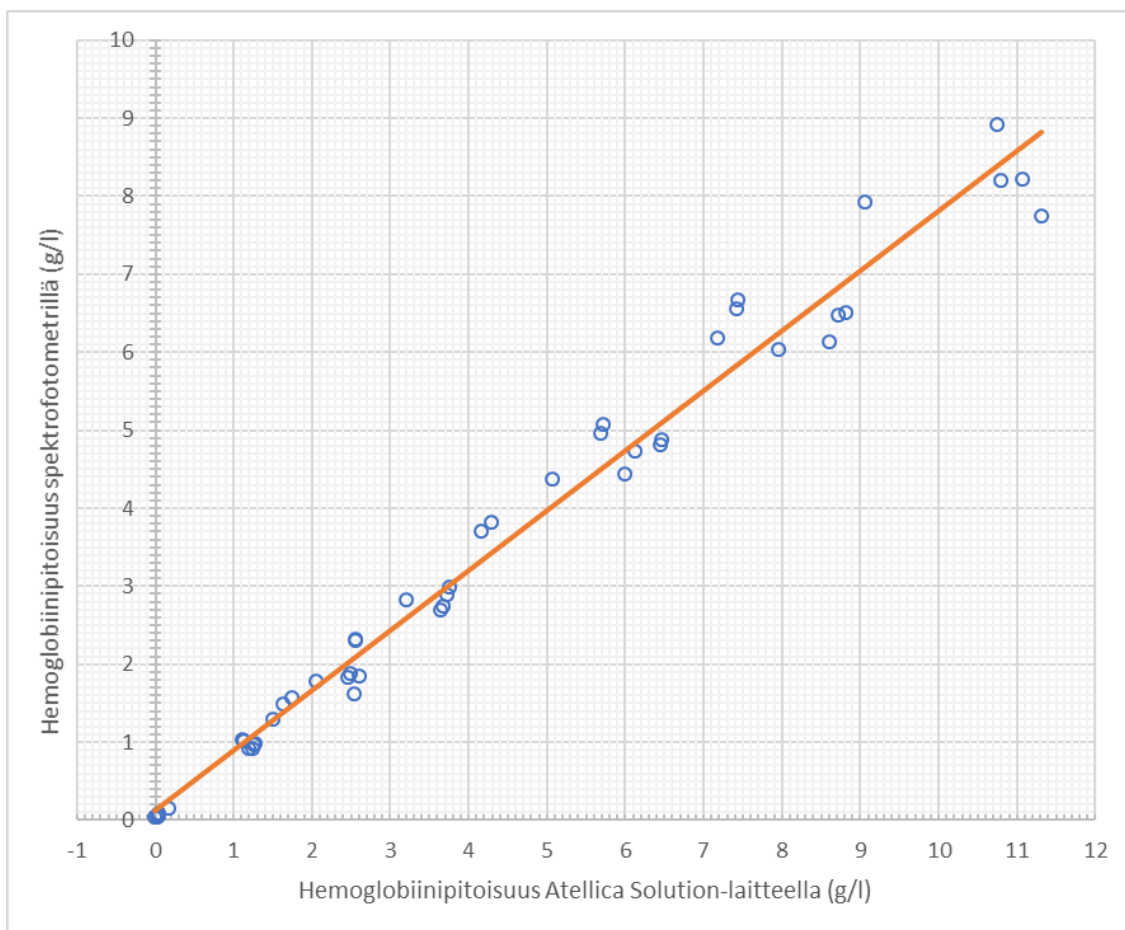
Kunkin analyytin tulokset esitellään tässä kappaleessa erikseen omissa alakappaleissaan. Tulostaulukossa esitellään tiivistetysti analyyttikohtaiset tulokset. Kunkin hemolyysitason keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio spektrofotometrillä ja laitteella mitattuna sekä hemolyysi-indeksi on ilmoitettu niistä näytteistä, joista kyseinen analyytti on analysoitu. Taulukossa ilmaistaan kunkin tason mitattujen analyyttipitoisuuksien keskiarvo. Todellisena näytteen pitoisuutena pidetään 0-tasoa, sillä hemolyysin aiheuttama pitoisuuden kasvu voi kertoa mittausvirheestä, eikä jokaisen analyytin kohdalla ole kyse todellisesta analyytin pitoisuuden muutoksesta. Tätä pohditaan tarkemmin tulosten tarkastelussa. Taulukossa kerrotaan hemolyyttisten näytteiden kohdalla Dahlbergin menetelmällä lasketut tunnusluvut: hajontaluku ja variaatiokerroin. Nämä on laskettu vertaamalla hemolyyttisiä näytteitä 0-tason näytteeseen, kuten Tulosten analysointimenetelmät -kappaleessa on kuvattu. Kunkin analyytin kohdalla on oma tulostaulukko vastaavilla tiedoilla.

Taulukossa 4 on kuvattu hemolyysi-indeksien ja hemoglobiinipitoisuuksien vastaavuudet Siemens Healthineersin materiaalin mukaan. Taulukon hemoglobiinikonsentraatiot ovat Atellica® Solution -laitteen antamien tulosten mukaiset, muunnettuna yksikköön g/l.

Taulukko 4. Hemolyysi-indeksien ja hemoglobiinipitoisuuksien vastaavuudet Siemens Healthineersin (2019) mukaan.

Hemolyysi-indeksi	Hemoglobiinikonsentraatio (g/l)
0	$\leq 0,10$
1	0,11–1,30
2	1,31–2,49
3	2,50–4,99
4	5,00–7,49
5	7,50–9,99
6	$\geq 10,00$

Kuviossa 13 on esitetty Atellica® Solution -laitteella mitattujen hemoglobiinipitoisuuksien ja Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattujen hemoglobiinipitoisuuksien vastaavuudet. Molemmat tulokset on muunnettu yksikköön g/l. Kuviosta nähdään, että Atellica® Solution -laitteen antamat tulokset olivat hieman spektrofotometrillä mitattuja korkeammat, noin pitoisuudesta 0,6 g/l ylöspäin. Pitoisuuden ollessa yli noin 0,6 g/l spektrofotometrillä mitatut pitoisuudet olivat hieman korkeammat, sillä Atellica® Solution -laite antaa hemoglobiinipitoisuuksille myös negatiivisia arvoja.



Kuvio 13. Atellica® Solution -laitteella ja Varian® Cary 100 Conc -spektrofotometrillä mitattujen hemoglobiinipitoisuuksien vastaavuudet. Jokainen kuvion piste vastaa yhtä opinnäytetyössä käytettyä näytettä. Jos samasta näytteestä oli useita tuloksia, kuviossa käytettiin näiden keskiarvoa.

Opinnäytetyön kuvaajissa käytetään Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuja hemoglobiinipitoisuuksia. Vaikka tuloksissa kerrotaan hemoglobiinipitoisuuden vaikutuksesta analyysin tulokseen, on huomattava, että näytteisiin lisättyssä hemolysaatissa on muitakin komponentteja hemoglobiinin lisäksi, jotka vaikuttavat analyysin mittaustulokseen. Myös näihin paneudutaan tarkemmin Pohdinta-osiossa.

8.1 Alaniiniaminotransferaasi

HUSLABin laatutavoite ALAT-määrityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. ALAT-tuloksista kaikki olivat analysointikelpoisia, joten näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin 28 tutkimusnäytteen tulokset. Tutkimusnäytteiden ALAT-pitoisuus vaihteli välillä 25–215 U/l ja keskimääräinen ALAT-pitoisuus oli 128 U/l. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0–3,49 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,84 %. Ainoastaan

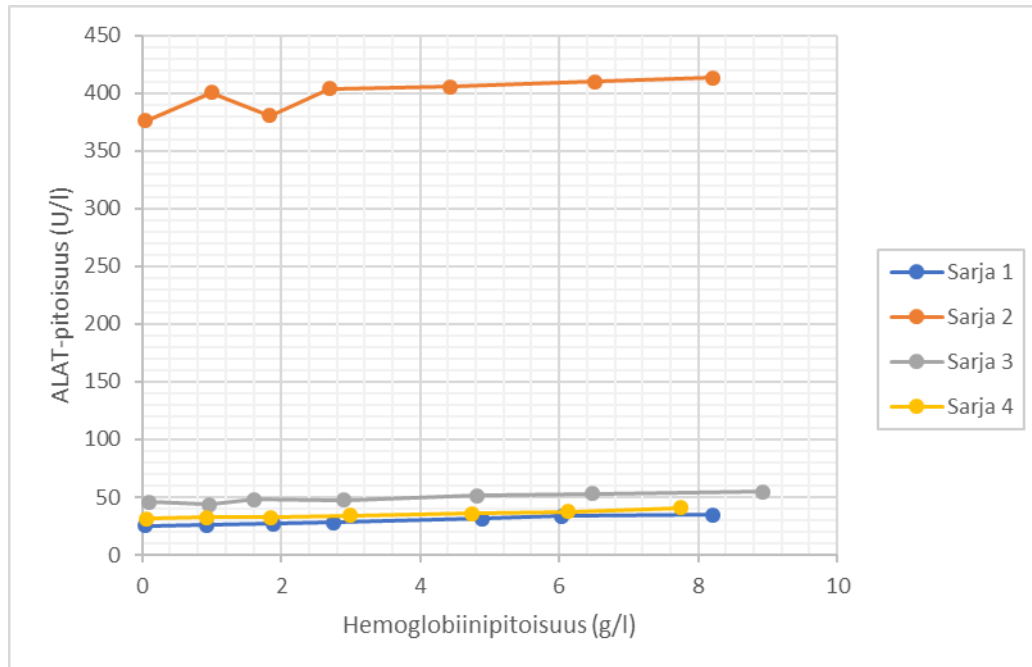
näytesarjan 4 näyte 4-3 ylitti tavoitellun variaatiokertoimen (CV% = 3,49 %). Näytteen tulosten keskiarvo oli kuitenkin looginen 2- ja 4-tasojen välillä, joten sitä päätettiin käyttää laskelmissa. Muiden tutkimusnäytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0–1,99 %.

ALAT-entsyymien tulostaulukosta (taulukko 5) nähdään, että ALAT-pitoisuuden keskiarvot kasvoivat muutoin loogisesti, mutta tasolla 2 keskiarvo laski verrattuna edelliseen tasoon 1. Vastaava kasvu näkyy myös Dahlbergin hajonnassa ja variaatiokerroimessa. Variaatiokerroin ylitti sisäiselle variaatiokertoimelle määritetyn 3 % rajan tasoilla 1 (CV% = 7,14 %) ja 3 (CV% = 7,98 %), mutta tasolla 2 raja alittui (CV% = 1,53 %). Tasolla 1 näytesarjojen 1–4 keskimääräinen hemoglobiinipitoisuus oli 0,95 g/l ja hemolyyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,24 g/l. Tällöin ALAT-pitoisuus oli keskimäärin 126 U/l, erotus 0-tasosta oli keskimäärin 6 U/l (vaihteluväli oli -2–25 U/l) ja eroprosentti 0-tasosta oli keskimäärin 1,7 % (vaihteluväli oli -4,5–6,6 %). Tasolla 3 näytesarjojen 1–4 keskimääräinen hemoglobiinipitoisuus oli 2,83 g/l ja hemolyyysi-indeksi oli 3. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 3,70 g/l. Tällöin ALAT-pitoisuus oli keskimäärin 128 U/l, erotus 0-tasosta oli 9 U/l (vaihteluväli oli 3–28 U/l) ja eroprosentti 0-tasosta oli 8,0 % (vaihteluväli oli 4–10,4 %).

Taulukko 5. Tuloskooste ALAT-entsyymille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

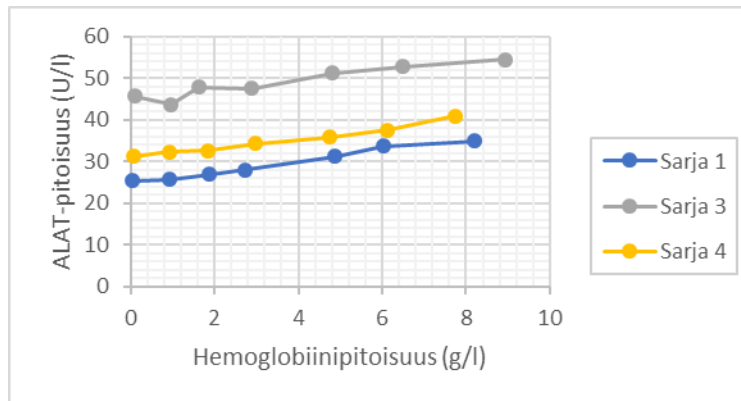
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	120		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	126	8,755	7,14
Taso 2	1,80	2,52	2–3	122	1,846	1,53
Taso 3	2,83	3,70	3	128	9,890	7,98
Taso 4	4,72	6,26	4	131	10,97	8,76
Taso 5	6,29	8,52	4–5	134	12,876	10,17
Taso 6	8,27	10,98	5–6	136	14,424	11,29

Kaikkien näytesarjojen ALAT-pitoisuudet esitellään kuviossa 14 hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioista nähdään, että näytesarjan 2 pitoisuudet olivat selkeästi muita näytesarjoja suuremmat, kuten näytesarjojen valmistuksessa oli tarkoituskin.



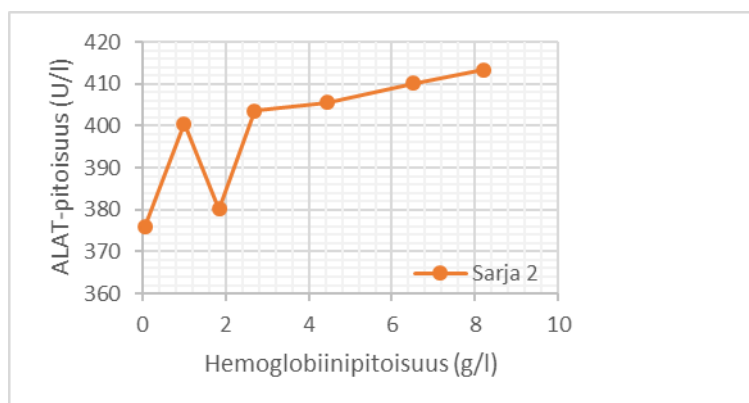
Kuvio 14. ALAT-pitoisuus sarjoissa 1–4.

Kuviossa 15 esitellään matalat ALAT-pitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Näytesarjan 3 pitoisuus oli suurin ja pienillä hemoglobiinitasoilla pitoisuudessa tapahtui heilahtelua. Tasolla 1 näytesarjan 3 ALAT-pitoisuus oli laskenut 0-tasoon verrattuna, kun taas tasolla 2 se oli korkeampi verrattuna 0-tasoon. Suuremmilla hemoglobiinitasoilla ALAT-pitoisuus kasvoi merkittävästi. Kaikissa näytesarjoissa tapahtui selkeä pitoisuuden kasvu suuremmilla hemoglobiinipitoisuuksilla.



Kuvio 15. Matalat ALAT-pitoisuudet (näytesarjat 1, 3 ja 4).

Kuviossa 16 esitellään näytesarjan 2 ALAT-pitoisuudet, jotka olivat huomattavasti muita näytesarjoja korkeammat. Myös korkeilla pitoisuuksilla ALAT-pitoisuus kasvoi merkittävästi suuremmilla hemolyysitasoilla. Kuvion ruutuväli on kutakuinkin sama, kuin kuviossa 15, joten suurilla ALAT-pitoisuuksilla muutos oli määrällisesti suurempi korkeilla hemoglobiinipitoisuuksilla, kuin vastaavasti matalammilla ALAT-pitoisuuksilla. Tasolla 2 tapahtui selittämätön heilahdus, jonka vuoksi hemolyysin vaikutusta oli hankala arvioida pienemmillä hemolyysitasoilla. Tämän heilahduksen vaikutus näkyy myös variaatiokertoimissa taulukossa 5.



Kuvio 16. Korkeat ALAT-pitoisuudet (näytesarja 2).

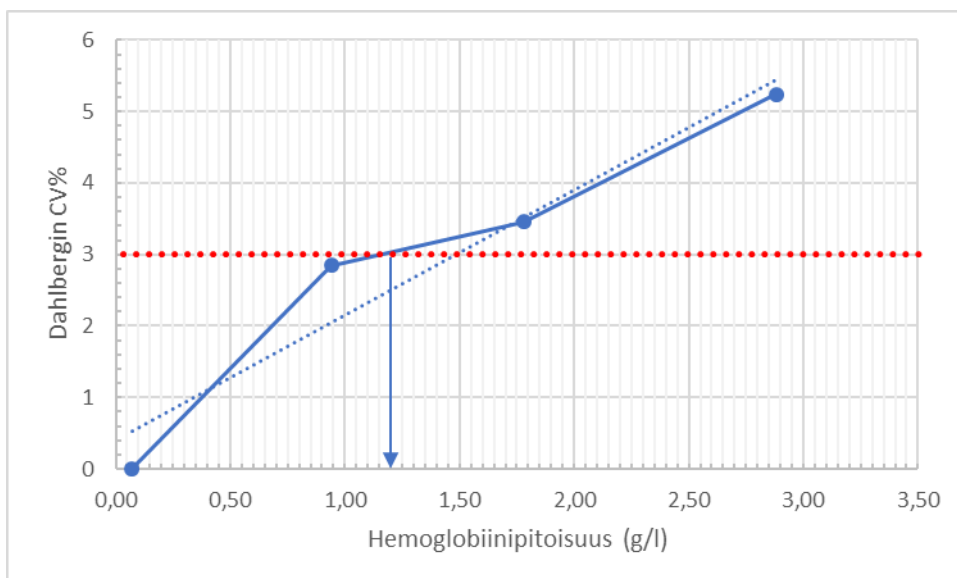
Hemolyysi häiritsi ALAT-pitoisuuden määrittystä. ALAT-pitoisuus nousi merkittävästi voimakkaan hemolyytisissä tutkimusnäytteissä. Matalilla hemoglobiinipitoisuuksilla esiintyi voimakasta arvojen heilahtelua erityisesti korkeammilla ALAT-pitoisuuksilla, minkä vuoksi hemolyysi-indeksin alarajaa ei voitu luotettavasti määrittää kaikkien tulosten perusteella.

Jättämällä Dahlbergin menetelmästä pois näytesarjan 2 tulokset, jotka sisälsivät eniten tuloksiin vaikuttavaa heilahtelua, saatiin ALAT-entsyymille taulukon 6 mukaiset tulokset. Tulosten keskiarvot kasvoivat loogisesti hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa ja Dahlbergin tunnusluvut kasvoivat vastaavasti häiriövaikutuksen lisääntyessä. Variaatiokerroin ylitti tavoiterajan tasolla 2 (CV% = 3,46 %), jolloin näytesarjojen 1, 3 ja 4 keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 1,78 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 2–3. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 2,54 g/l. Tällöin kyseisten tutkimusnäytteiden ALAT-pitoisuus oli keskimäärin 36 U/l, erotus 0-tasosta oli keskimäärin 2 U/l ja eroprosentti 0-tasosta oli keskimäärin 5 %.

Taulukko 6. Tuloskooste matalien ALAT-tulosten vertailulle (näytesarjat 1, 3 ja 4, joiden ALAT-pitoisuus on alle 50 U/l). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1, 3 ja 4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,07	0,04	0	34		
Taso 1	0,94	1,23	1–2	34	0,967	2,84
Taso 2	1,78	2,54	2–3	36	1,208	3,46
Taso 3	2,88	3,71	3	37	1,857	5,24
Taso 4	4,81	6,35	4	40	3,80	10,32
Taso 5	6,21	8,43	4–5	41	5,109	13,54
Taso 6	8,29	10,95	5–6	44	6,607	17,03

Kuviossa 17 esitetään ALAT-entsyymin kolme alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa on käytetty jälkimmäisen laskun mukaisia variaatiokertoimia, joissa oli mukana ainoastaan näytesarjojen 1, 3 ja 4 tulokset. Kuviossa HUSLABin laatutavoite variaatiokertoimelle on esitetty punaisella katkoviivalla. Käyrän avulla interpoloitiin hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella se oli noin 1,20 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution laitteen hemoglobiinitulosta 1,4 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 2 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 1,31–2,49 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 17. ALAT-entsyymien hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti ALAT-entsyymille määritetyn 3 % rajan (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 1,20 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Taulukossa 7 näytesarjat on järjestetty kasvavan ALAT-pitoisuuden mukaisesti. Taulukossa on esitetty näytesarjojen erotukset ja eroprosentit 0-tasosta kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Taulukosta nähdään, että korkeimman tason näytesarjassa ALAT-pitoisuuden absoluuttinen muutos oli suurempi kuin pienillä pitoisuuksilla, mikä nähdään myös kuvioista 15 ja 16. Prosentuaalinen muutos jäi siitä huolimatta pienemmäksi korkean tason näytesarjoissa. Tasolla 6 matalimman näytesarjan eroprosentti 0-tasoon nähden oli 37 % ja korkeimman tason eroprosentti oli 10 %. Hemolyysin aiheuttama häiriö oli siis suhteellisesti pienempi korkeilla ALAT-pitoisuuksilla.

Taulukko 7. ALAT-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (U/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 1	25	3	9	10 %	37 %
Näytesarja 4	31	3	10	10 %	31 %
Näytesarja 3	46	2	9	4 %	19 %
Näytesarja 2	376	28	37	7 %	10 %

Matalilla ALAT-pitoisuuksilla (ALAT-pitoisuuden ollessa noin alle 50 U/l) hemolyysi häiritse ALAT-määrittystä. ALAT-pitoisuus nousi merkittävästi, kun hemoglobiinipitoisuus oli yli 1,20 g/l, laitteen hemoglobiinitulos oli yli 1,4 g/l tai hemolyysi-indeksi oli yli 2. Tällöin ALAT-tutkimukselle määritetty variaatiokertoimen tavoiteraja ylittyi. Hemolyysin aiheuttama häiriö oli suhteellisesti pienempi korkeilla ALAT-pitoisuuksilla.

8.2 Alkalinen fosfataasi

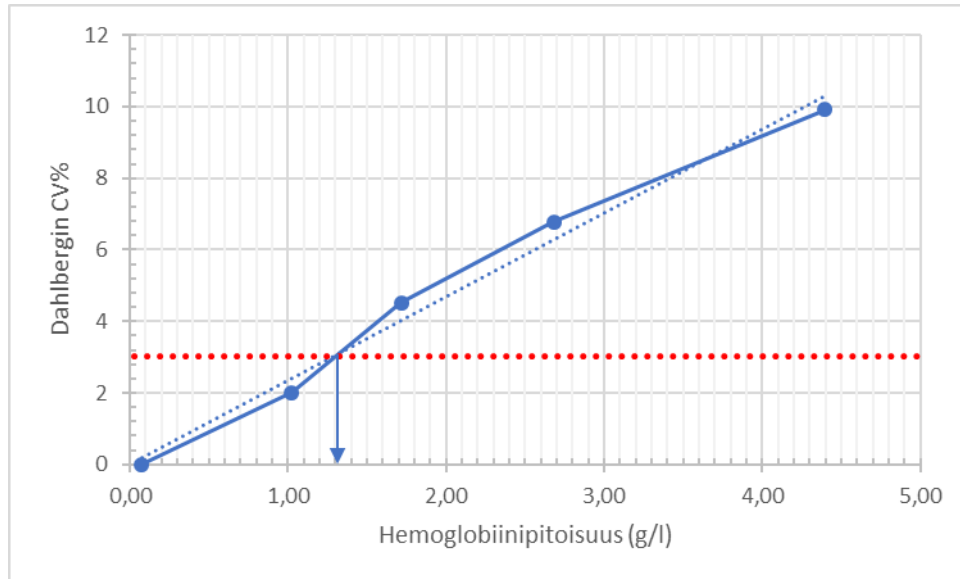
HUSLABin laatutavoite AFOS-määrittelyn sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. Kaikista 28 tutkimusnäytteestä saatiin rinnakkaiset AFOS-tulokset, joiden välinen variaatiokerroin oli tavoitetason sisällä. Variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0–2,38 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,27 %. Kaikki rinnakkaistulosten keskiarvot otettiin mukaan tutkimukseen. Tutkimusnäytteiden AFOS-pitoisuus vaihteli välillä 53–159 U/l ja keskimääräinen AFOS-pitoisuus oli 116 U/l.

Tuloskoostetaulukossa 8 kuvataan Dahlbergin menetelmällä saadut tulokset. AFOS-tulokset laskevat hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Dahlbergin hajontaluku sekä variaatiokerroin suurenevät häiriövaikutuksen lisääntyessä hemoglobiinipitoisuuden kasvun myötä. Variaatiokerroin alitti HUSLABin tavoitteen (CV% = 2 %) vielä tasolla 1 näytesarjan hemoglobiinipitoisuuden ollessa 0,95 g/l kun hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,24 g/l. Tasolla 2 variaatiokertoimen tavoiteraja ylittyi (CV% = 4,52 %) hemoglobiinipitoisuuden ollessa keskimäärin 1,80 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 2–3. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 2,52 g/l. Tällöin AFOS-pitoisuus oli keskimäärin 120 U/l, keskimääräinen erotus 0-tasoon verrattuna oli -8 U/l ja keskimääräinen eroprosentti 0-tasoon verrattuna oli -6,7 %.

Taulukko 8. Tuloskooste AFOS-entsyymille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

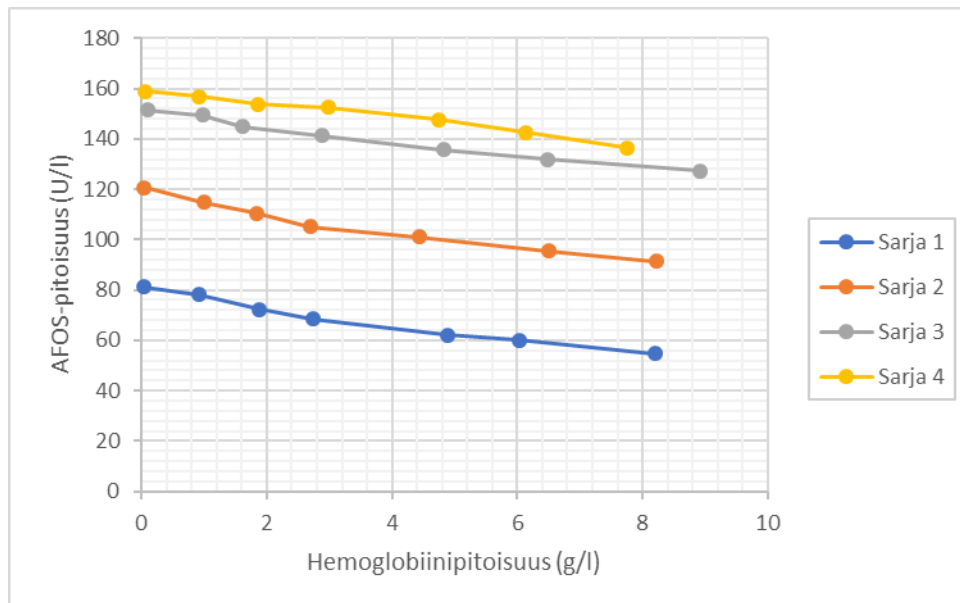
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	128		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	125	2,533	2,00
Taso 2	1,80	2,52	2–3	120	5,618	4,52
Taso 3	2,83	3,70	3	117	8,296	6,77
Taso 4	4,72	6,26	4	112	11,88	9,92
Taso 5	6,29	8,52	4–5	108	14,755	12,53
Taso 6	8,27	10,98	5–6	103	18,155	15,74

Kuviossa 18 esitetään AFOS-entsyymin neljä alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa HUSLABin laatutavoite variaatiokertoimelle on esitetty punaisella katkoviivalla. Käyrän perusteella interpoloitu hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyy, oli noin 1,30 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution laitteen hemoglobiinitulosta 1,5 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 2 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 1,31–2,49 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 18. AFOS-entsyymin hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti AFOS-entsyymille määritetyn 3 % rajan (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 1,30 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuvio 19 näyttää AFOS-pitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Näytesarjat edustivat karkeasti kolmea pitoisuustasoa: 80, 120 ja 160 U/l. AFOS-pitoisuus laski tasaisesti hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa kaikilla pitoisuustasoilla.



Kuvio 19. AFOS-pitoisuudet sarjoissa 1–4.

Taulukossa 9 on esitetty näytesarjojen eroprocentit 0-tasosta tasoilla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Taulukosta nähdään, että korkeamman AFOS-pitoisuuden omaavissa näytesarjoissa prosentuaalinen pitoisuuden muutos hemolyyysin seurauksena oli pienempi, kuin matalan tason näytesarjoissa. Myös absoluuttinen erotus oli pienempi korkean tason näytesarjoissa. Hemolyyysin vaikutus oli siis pienempi korkean tason näytesarjoissa sekä absoluuttisesti, että suhteellisesti.

Taulukko 9. AFOS-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (U/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 1	81	-13	-27	-16 %	-33 %
Näytesarja 2	121	-16	-29	-13 %	-24 %
Näytesarja 3	152	-10	-24	-7 %	-16 %
Näytesarja 4	159	-6	-22	-4 %	-14 %

Hemolyyysi häiritsi AFOS-entsyymien pitoisuusmittausta. Hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa tutkimusnäytteiden AFOS-pitoisuus laski. Hemolyyysin vaikutus oli merkittävä, kun hemoglobiinipitoisuus oli yli 1,30 g/l, laitteen hemoglobiinitulos oli yli 1,5 g/l tai hemolyyysi-indeksi ylitti tason 2. Tällöin tutkimukselle määritetty variaatiokertoimen tavoiteraja ylittyi. Hemolyyysin aiheuttama mittausvirhe oli pienempi korkeilla AFOS-pitoisuuksilla.

8.3 Ammoniumioni

HUSLABin laatuavoite ammoniumionimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 2 %, kun NH_4^+ -ionin pitoisuus näytteessä on 50 $\mu\text{mol/l}$ tai enemmän. Sisäisenä variaatiokertoimena käytetään 4 %, kun NH_4^+ -ionin pitoisuus näytteessä on alle 50 $\mu\text{mol/l}$. Kaikki A-sarjan tutkimusnäytteet olivat NH_4^+ -ionipitoisuudeltaan yli 50 $\mu\text{mol/l}$, joten tulosten tarkastelussa käytettiin pienempää variaatiokerrointa. Tutkimusnäytteiden NH_4^+ -ionipitoisuus vaihteli välillä 91,2–330,9 $\mu\text{mol/l}$ ja rinnakkaistulosten keskimääräinen NH_4^+ -ionipitoisuus oli 200,2 $\mu\text{mol/l}$.

Kaikki tulokset olivat analysointikelpoisia, joten näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin 14 tutkimusnäytteen tulokset. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokerroimet vaihtelivat välillä 0,34–6,27 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 1,67 %. A1-sarjan tutkimusnäytteet 2 (CV% = 2,57 %), 5 (CV% = 6,27 %) ja 6 (CV% = 3,61 %) ylittivät sallitun variaatiokerroimen. Korkeasta variaatiokerroimesta huolimatta tulokset hyväksyttiin tarkasteluun.

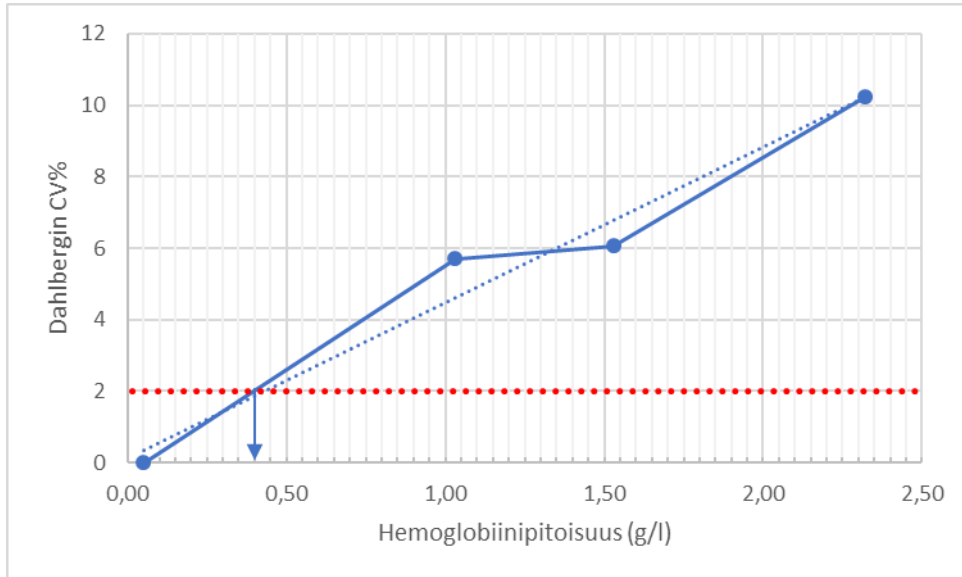
Tuloskoostetaulukossa 10 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokerroimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Tulosten keskiarvo ja hemolyysin aiheuttama häiriön määrä kasvoivat loogisesti hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Tämä heijastui kasvaviin Dahlbergin hajontalukuihin ja variaatiokerroimiin. Kun ammoniumionin variaatiokerroin oli 5,69 %, se ylitti tavoitteellisen variaatiokerroimen tasolla 1, kun A-näytesarjojen keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 1,03 g/l ja hemolyysi-indeksi oli 1. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,12 g/l. NH_4^+ -ionipitoisuus oli tällöin keskimäärin 177,2 $\mu\text{mol/l}$, erotus 0-tasosta oli 12,2 $\mu\text{mol/l}$ ja eroprosentti 0-tasosta oli 10 %.

Taulukko 10. Tuloskooste ammoniumionille (A-sarja). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen A1 ja A2 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina.

Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo ($\mu\text{mol/l}$)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,05	0,01	0	163,5		
Taso 1	1,03	1,12	1	177,2	9,699	5,69
Taso 2	1,53	1,69	2	178,0	10,364	6,07
Taso 3	2,32	2,55	3	189,0	18,018	10,22
Taso 4	3,76	4,23	3	210,4	33,18	17,75
Taso 5	5,02	5,70	4	222,7	41,848	21,67
Taso 6	6,61	7,43	4	248,7	60,272	29,25

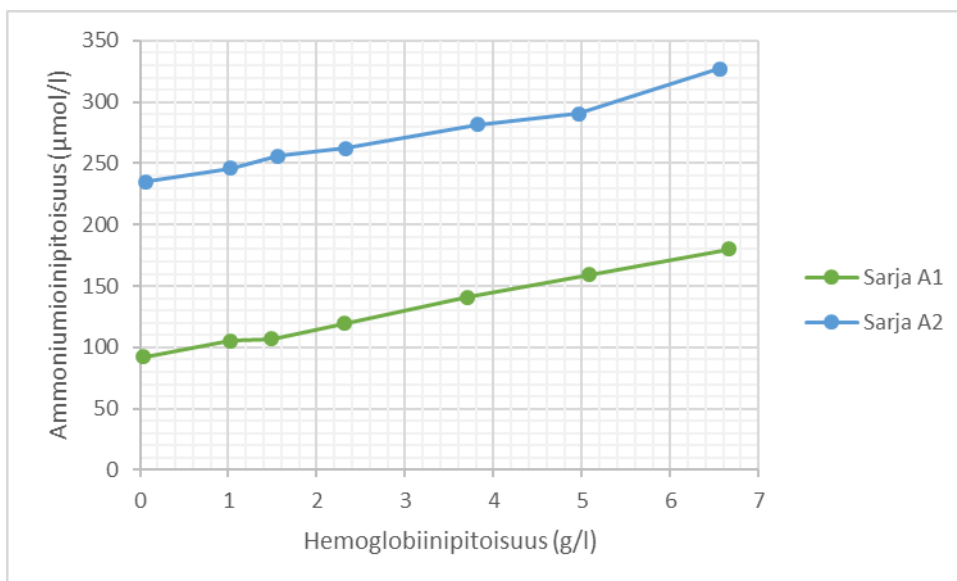
Kuviossa 20 on esitettyä NH_4^+ -ionin kolme alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatuvaatetta, joka NH_4^+ -ionimäärityksen sisäiselle variaatiokerroimelle on 2 %, kun NH_4^+ -ionin pitoisuus tutkimusnäytteessä on 50 $\mu\text{mol/l}$ tai enemmän. Käyrän avulla voitiin

interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella raja oli noin 0,40 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution laitteen hemoglobiinitulosta 0,35 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 20. NH_4^+ -ionin hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti NH_4^+ -ionille määritetyn 2 % laatutavoitteen (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,40 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 21 esitellään NH_4^+ -ionipitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviosta nähdään, että näytesarjan A2 pitoisuudet olivat selkeästi näytesarjan A1 pitoisuuksia suuremmat. Molempien näytesarjojen NH_4^+ -ionipitoisuustaso nousi melko tasaisesti ja saman suuntaisesti hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa.



Kuvio 21. Ammoniumionipitoisuudet näytesarjoissa A1 ja A2.

Taulukossa 11 on esitetty pitoisuuksien erot ja ero prosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,32 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 6,61 g/l. Pitoisuuden absoluuttinen muutos kasvoi molemmissa näytesarjoissa hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa. Absoluuttinen muutos oli suunnilleen yhtä suurta näytesarjojen välillä kummallakin tasolla 3 ja 6. Näytesarjan A1 kohdalla ero prosentit olivat suurempia: tasolla 3 ero prosentti 0-tasosta oli 29 % ja tasolla 6 ero prosentti 0-tasosta oli 95 %. Vastaavasti näytesarjassa A2 tasolla 3 ero prosentti 0-tasosta oli 12 % ja tasolla 6 ero prosentti 0-tasosta oli 39 %. Ero prosentit siis kasvoivat enemmän matalammalla pitoisuustasolla. Tuloksista voitiin todeta, että hemolyysin aiheuttamalla häiriöllä oli enemmän vaikutusta matalilla NH_4^+ -ionipitoisuuksilla.

Taulukko 11. NH_4^+ -ionipitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjassa A. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (µmol/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (µmol/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (µmol/l)	Ero prosentti 0-tasosta tasolla 3	Ero prosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja A1	92,2	27,1	87,8	29 %	95 %
Näytesarja A2	234,8	27,3	92,6	12 %	39 %

Hemolyysillä oli häiritsevä vaikutus NH_4^+ -ionimääritykseen: hemoglobiinikonsentraation kasvaessa NH_4^+ -ionipitoisuus kasvoi. Matalilla NH_4^+ -ionipitoisuuksilla hemolyysin aiheuttama häiriö oli huomattavampaa, kuin korkeilla NH_4^+ -ionipitoisuuksilla. Hemolyysin vaikutus oli merkittävää, kun hemolyysi-indeksi oli 1 tai enemmän, kun hemoglobiinipitoisuus oli yli 0,40 g/l ja laitteen hemoglobiinitulos oli yli 0,35 g/l. Tällöin analyyttille määritetyn variaatiokertoimen yläraja ylittyi.

8.4 Aspartaattiaminotransferaasi

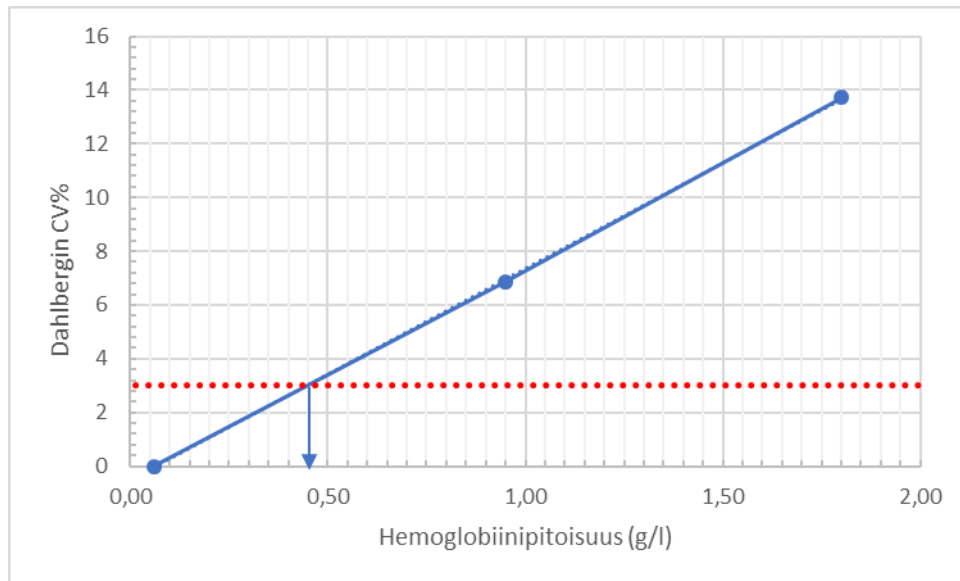
HUSLABin laatutavoite ASAT-määrityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. Tutkimusnäytteiden keskimääräinen ASAT-pitoisuus oli 135 U/l ja ASAT-pitoisuus vaihteli välillä 25–367 U/l. Kaikista tutkimusnäytteistä saatiin rinnakkaistulokset, joiden variaatiokertoimet alittivat tavoitetason. Variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0,03–1,23 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,43 %. Kaikkien 28 tutkimusnäytteen rinnakkaistulosten keskiarvot otettiin mukaan tulosten tarkasteluun.

Tuloskoostetaulukossa 12 esitetään kullekin näytetasolle keskimääräinen hemoglobiinipitoisuus, tulosten keskiarvo sekä Dahlbergin menetelmällä lasketut tunnusluvut. Tulosten keskiarvo kasvoi hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Tällöin hemolyysin aiheuttama virhe kasvoi, mikä nähdään Dahlbergin hajontaluvuista. Variaatiokerroin ylitti HUSLABin laatutavoitteen jo tasolla 1, jolloin variaatiokertoimeksi saatiin 6,88 %, näytesarjojen 1–4 keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 0,95 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,24 g/l. Tason 1 näytesarjojen keskimääräinen ASAT-pitoisuus oli 106 U/l, erotus 0-tasoon oli keskimäärin 10 U/l ja eroprosentti 0-tasoon oli keskimäärin 22,2 % (vaihteluväli oli 3,7–36 %).

Taulukko 12. Tuloskooste ASAT-entsyymille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelivat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

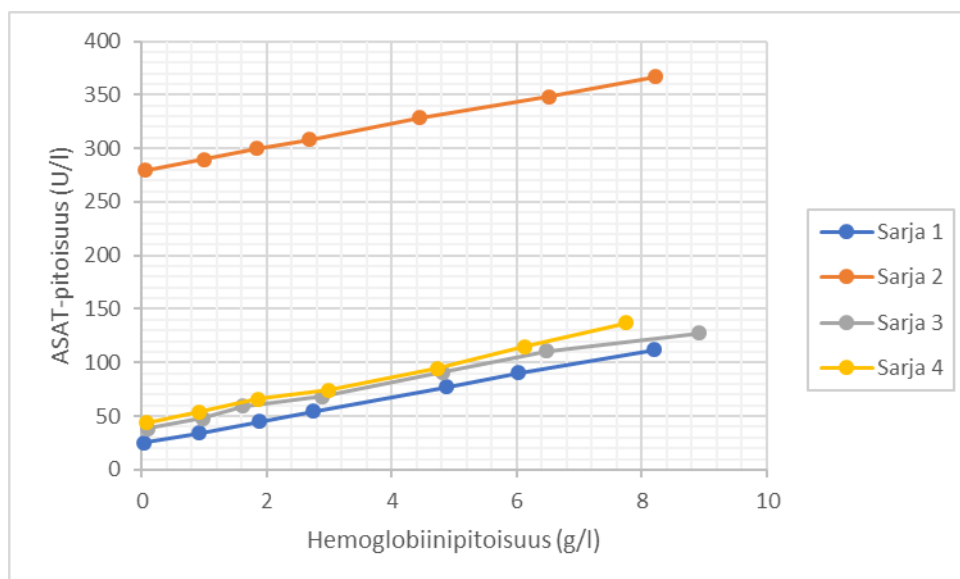
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	97		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	107	6,983	6,88
Taso 2	1,80	2,52	2–3	117	14,668	13,71
Taso 3	2,83	3,70	3	126	21,053	18,88
Taso 4	4,72	6,26	4	148	36,22	29,63
Taso 5	6,29	8,52	4–5	166	49,179	37,44
Taso 6	8,27	10,98	5–6	186	63,260	44,76

Kuviossa 22 on esitetty ASAT-tutkimusnäytteiden kahden ensimmäisen tason Dahlbergin variaatiokertoimet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kaavioon on piirretty apuviiva merkitsemään HUSLABin tavoiterajaa, joka on 3 %. Kaaviosta voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jonka kohdalla tavoiteraja ylittyi. Kaaviosta lukemalla tämä raja oli noin hemoglobiinipitoisuuden 0,45 g/l kohdalla spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulosta 0,45 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiininikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 22. ASAT-entsyymin hemolyysi-indeksin raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti ASAT-entsyymille määritetyn 3 % rajan (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,45 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

ASAT-pitoisuuksien muutosta eri näytesarjoissa havainnollistaa kuvio 23. Kuvioista nähdään, että näytesarjassa 2 oli merkittävästi suurimmat pitoisuudet, mutta pitoisuuden absoluuttisen muutoksen suuruus oli kutakuinkin yhtäläinen eri pitoisuustasoilla. Hemolyysin vaikutus ASAT-pitoisuuteen oli lähes lineaarinen näytesarjoissa 1, 2 ja 4. Prosentuaalinen muutos oli kuitenkin pienempi suurilla pitoisuuksilla. ASAT-pitoisuus suureni hemolyysin vaikutuksesta.



Kuvio 23. ASAT-pitoisuudet sarjoissa 1–4.

Taulukossa 13 on esitetty pitoisuuksien erot ja eroprosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Taulukosta nähdään, että ASAT-pitoisuuden absoluuttinen muutos oli yhtäläinen hemolyysitason sisällä. Tasolla 3 muutos oli noin 30 U/l ja tasolla 6 noin 90 U/l. Prosentuaalinen muutos taas oli huomattavasti korkeampi matalilla tasoilla, sillä saman suuruinen muutos oli matalaan lähtötasoon nähden moninkertainen.

Taulukko 13. ASAT-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (U/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 1	25	29	87	115 %	343 %
Näytesarja 4	44	31	94	70 %	214 %
Näytesarja 3	38	30	90	79 %	235 %
Näytesarja 2	279	29	88	10 %	31 %

Hemolyysi häiritsee ASAT-pitoisuuden mittausta. ASAT-pitoisuus kasvoi merkittävästi jo pienillä hemoglobiinipitoisuuksilla. Hemolyysi häiritsee ASAT-määrittystä merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,45 g/l tai laitteen hemoglobiinituloksen ollessa yli 0,45 g/l, mikä vastasi hemolyysi-indeksiä 1. Tällöin analyylille määritetyn variaatiokertoimen laatuvaatimus ei enää täyttynyt. Hemolyysi aiheutti kullakin pitoisuustasolla yhtäläisen absoluuttisen mittausvirheen ja siten suhteellinen muutos oli korkeilla ASAT-pitoisuuksilla pienempi.

8.5 C-reaktiivinen proteiini

CRP-tutkimuksessa normaalit arvot olivat niin matalia, että ne menivät alle menetelmän mittausalueen (<4 mg/l) (CRP. 2017). CRP-tutkimuksessa näytesarjojen 1 ja 2 kaikki tulokset olivat pitoisuudeltaan alle mittausalueen, minkä vuoksi näitä tuloksia ei käytetty työssä lainkaan. Näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin yhteensä 14 tutkimusnäytettä. Tutkimusnäytteiden CRP-pitoisuus vaihteli välillä 103,5–176,3 mg/l ja keskimääräinen CRP-pitoisuus oli 139,38 mg/l.

HUSLABin laatutavoite CRP-tutkimuksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 2 %. Kaikkien näytesarjojen 3 ja 4 näytteiden rinnakkaistulosten variaatiokertoimet alittivat tavoiterajan, joten niitä käytettiin tulosten tarkastelussa. Variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0–1,13 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,44 %. CRP-tutkimukselle voidaan käyttää myös yleistä tavoiterajaa, joka on 10 %, sillä tuloksen kliininen luokitus ei muutu, jos se pysyy tämän rajan sisällä (Sneck 2019c).

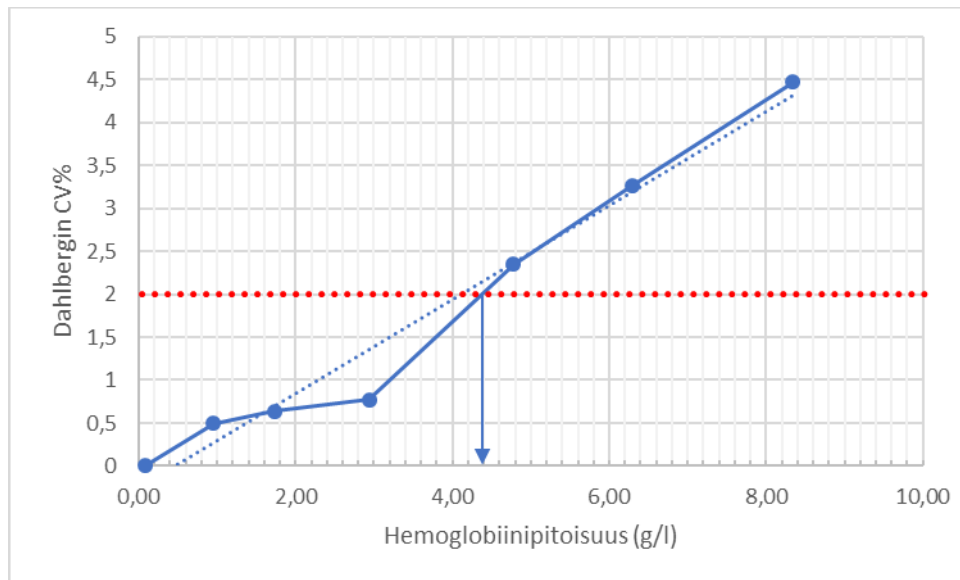
Tuloskoostetaulukossa 14 on huomioitu ainoastaan näytesarjojen 3 ja 4 näytteet. Hemoglobiinikonsentraatiosarakkeessa on näiden kahden näytesarjan hemoglobiinipitoisuuksien keskiarvot. CRP-tulosten keskiarvo laski hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Hemolyysin aiheuttaman häiriön määrä kasvoi loogisesti, mikä nähdään kasvavista Dahlbergin hajontaluvuista ja variaatiokertoimista. Variaatiokerroin ylitti 2 % rajan tasolla 4 (CV% = 2,35 %), jolloin hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 4,78 g/l ja hemolyysi-indeksi oli 4. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 6,28 g/l. Tällöin CRP-pitoisuus oli keskimäärin 139,0 mg/l, erotus 0-tasosta oli keskimäärin -2,3 mg/l ja eroprosentti 0-tasosta oli keskimäärin -1,8 %. Yleinen tavoiteraja 10 % ei ylittynyt millään hemolyysitasolla.

Taulukko 14. Tuloskooste C-reaktiiviselle proteiinille (näytesarjat 3 ja 4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 3 ja 4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelivat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (mg/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,08	0,04	0	141,3		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	140,3	0,700	0,50
Taso 2	1,73	2,57	2–3	140,1	0,901	0,64
Taso 3	2,94	3,74	3	139,9	1,087	0,77
Taso 4	4,78	6,28	4	139,0	1,64	2,35
Taso 5	6,30	8,67	5	138,1	2,285	3,27
Taso 6	8,34	11,03	5–6	137,0	3,109	4,47

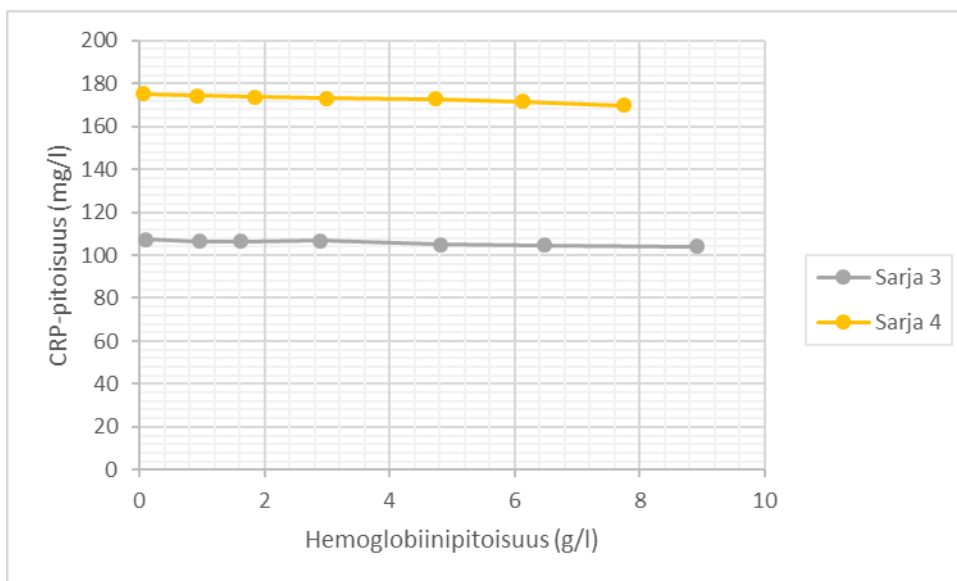
Kuviossa 24 esitetään variaatiokertoimet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa HUSLABin laatutavoite variaatiokertoimelle, joka CRP-tutkimukselle on 2 %, on esitetty

punaisella katkoviivalla. Käyrän perusteella interpoloitu hemoglobiinipitoisuus, jolla tavoiteraja ylittyi, oli noin 4,40 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution laitteen hemoglobiinitulosta 5,6 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 4 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 5,00–7,49 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna. Yleinen tavoiteraja 10 % on niin korkea, ettei se näy kuvassa lainkaan.



Kuvio 24. CRP:n hemolyysi-indeksin raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti CRP:lle määritetyn 2 % rajan (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 4,40 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 25 esitetään CRP-konsentraatio hemoglobiinikonsentraation funktiona. Näytesarjat edustivat kahta pitoisuustasoa, joista kummatkin olivat korkeita, kuten näytesarjojen valmistuksessa oli tarkoituskin. Normaalialta tai hieman matalampaa tasoa edustavaa näytesarjaa ei ollut. Kuvasta nähdään, ettei hemoglobiinikonsentraatiolla ollut juurikaan vaikutusta näytesarjan pitoisuuteen kummallakaan pitoisuustasolla. Näytesarjan 4 arvot olivat hieman näytesarjan 3 arvoja suuremmat. Näytesarjan 4 pitoisuudet laskivat hieman voimakkaammin korkeilla hemoglobiinipitoisuuksilla.



Kuvio 25. CRP-pitoisuudet sarjoissa 3–4.

Taulukosta 15 nähdään, että prosentuaalinen muutos oli yhtäläinen kummallakin pitoisuustasolla. Muutos oli kuitenkin pieni korkeimmallakin hemolyysitasolla. Hemolyysin aiheuttama muutos oli korkeimmillaankin niin pieni, ettei se vaikuta potilastyössä tehtävään kliiniseen päätöksentekoon.

Taulukko 15. CRP-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 3 ja 4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (mg/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (mg/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (mg/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 3	107	-1	-3	-1 %	-3 %
Näytesarja 4	175	-2	-5	-1 %	-3 %

Hemoglobiinipitoisuus ei vaikuttanut CRP-mittaukseen merkittävästi alhaisina pitoisuuksina. Hemolyysi aiheutti häiriötä CRP-mittaukseen korkeilla hemoglobiinipitoisuuksilla. CRP-tulos laski hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Hemolyysin aiheuttama interferenssi oli merkittävää hemolyysi-indeksin ollessa 4 tai enemmän, sillä tällöin variaatiokertoimen analyttikohtainen tavoiteraja ylittyi. Tämä ei kuitenkaan ollut kliinisesti merkittävää, sillä tulostaso pysyi samana, eikä hemolyysin aiheuttama muutos vaikuttaisi tutkimuksen kliinisessä käytössä (Sneck 2019c). Variaatiokertoimet eivät ylittäneet

yleistä 10 % tavoiterajaa. Hemolyysi ei siis vaikuttanut CRP-tulokseen kliinisesti merkittävästi, eikä vaikutuksessa ollut eroa kahden CRP-pitoisuustason välillä.

8.6 Haptoglobiini

HUSLABin laatutavoite haptoglobiinimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. Tulosten analysoinnista jätettiin pois näytesarjan 4 näytteet 4-1, 4-2 ja 4-3, sillä näiden näytteiden kohdalla haptoglobiinipitoisuus ylitti laitteiston mittausalueen ylärajan (>3,4 g/l) (Haptoglobiin. 2017). Jotta kaikilla tasoilla oli käsiteltävänä yhtä paljon tutkimusnäytteitä, jätettiin tulosten analysoinnista pois myös loput näytesarjan 4 näytteet 4-0, 4-4, 4-5 ja 4-6.

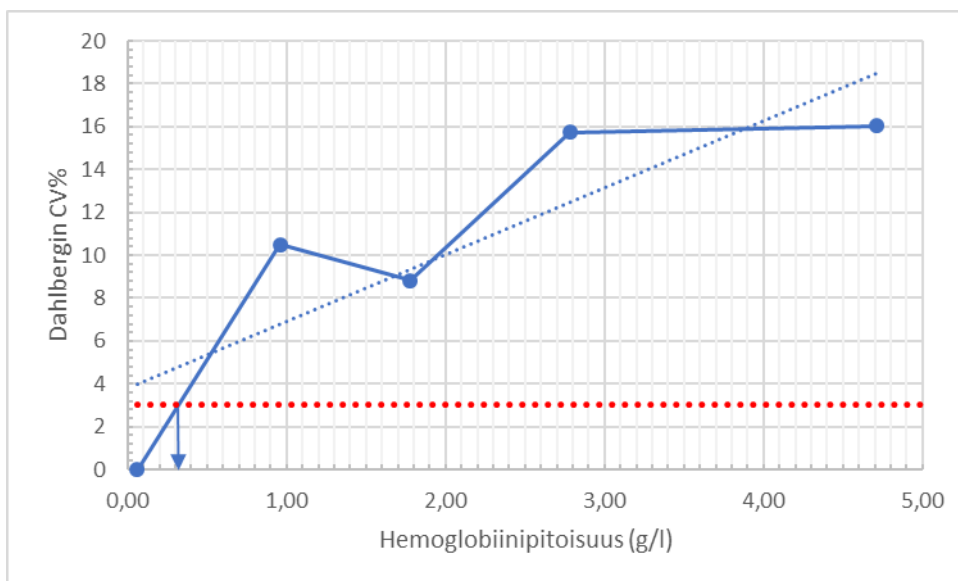
Näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin 21 tutkimusnäytteen tulokset. Tutkimusnäytteiden haptoglobiinipitoisuus vaihteli välillä 0,77–2,61 g/l ja rinnakkaistulosten keskimääräinen haptoglobiinipitoisuus oli 1,25 g/l. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0,01–2,03 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,56 %. Kaikkien tutkimusnäytteiden variaatiokertoimet alittivat tavoitetason.

Tuloskoostetaulukossa 16 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokertoimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Tulosten keskiarvot alenivat lähes kaikilla tasoilla hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Tasolla 4 keskiarvo oli yhtä suuri kuin tasolla 3. Dahlbergin hajontaluvut ja variaatiokertoimet kasvoivat verrattuna tasoon 1, paitsi tasolla 2, jonka kohdalla keskiarvo ja kyseiset luvut alenivat. Kun haptoglobiinin variaatiokerroin oli 10,49 %, se ylitti tavoitteellisen variaatiokertoimen tasolla 1, kun näytesarjojen 1–3 keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 0,96 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,24 g/l. Haptoglobiinipitoisuus oli tällöin keskimäärin 1,39 g/l, erotus 0-tasosta oli -0,04 g/l (vaihteluväli oli -0,18–0,25 g/l) ja eroprosentti 0-tasosta oli -9 % (vaihteluväli oli -20–11 %).

Taulukko 16. Tuloskooste haptoglobiinille (sarjat 1–3). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–3 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

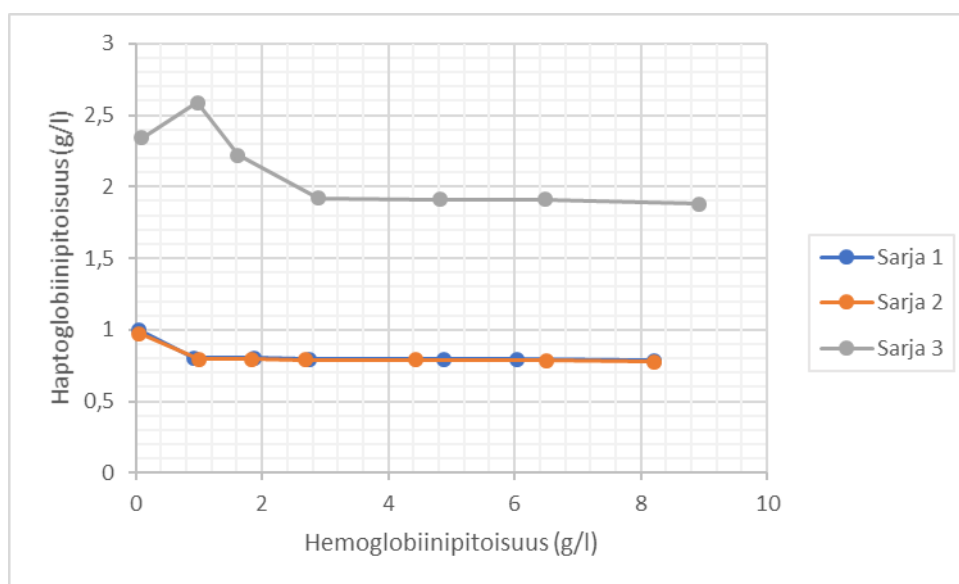
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (g/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	1,44		
Taso 1	0,96	1,24	1–2	1,39	0,149	10,49
Taso 2	1,78	2,50	2–3	1,27	0,120	8,83
Taso 3	2,78	3,68	3	1,17	0,205	15,74
Taso 4	4,71	6,30	4	1,17	0,209	16,04
Taso 5	6,34	8,50	4–5	1,16	0,209	16,03
Taso 6	8,45	10,87	5–6	1,15	0,223	17,22

Kuviossa 26 on esitettyä haptoglobiinin neljä alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatutavoitetta, joka haptoglobiinimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. Käyrän avulla voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella raja oli noin 0,30 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution laitteen hemoglobiinitulosta 0,2 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 26. Haptoglobiinin hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti haptoglobiinille määritetyn 3 % laatutavoitteen (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,30 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 27 esitellään haptoglobiinipitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa nähdään, että näytesarjan 3 pitoisuudet olivat korkeampia kuin näytesarjojen 1 ja 2 pitoisuudet. Näytesarjan 3 ensimmäisellä tasolla tapahtui pitoisuudessa jyrkkä, selittämättömän nousu, jonka jälkeen pitoisuus laski hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Näytesarjan 3 pitoisuudessa ei kuitenkaan tapahtunut suuria muutoksia suuremmilla hemolyysitasoilla hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, vaan pitoisuustaso säilyi suhteellisen muuttumattomana. Yhden korkeampaa pitoisuustasoa edustavan näytesarjan perusteella on haastavaa sanoa, oliko pitoisuuden nousu matalalla hemolyysitasolla todellista. Näytesarjojen 1 ja 2 pitoisuustasot olivat lähes yhtäläisiä. Näytesarjojen käyrät kulkevat kuvion asteikolla päällekkäin ja lähes vaakasuoraan, mutta pitoisuuksien muutos tapahtui selkeästi 0-tasoon verrattuna. Myös näytesarjojen 1 ja 2 pitoisuudet laskivat hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, eikä muutos ollut huomattava korkeilla hemolyysitasoilla verrattuna matalampiin tasoihin.



Kuvio 27. Haptoglobiiniipitoisuudet sarjoissa 1–3.

Taulukossa 17 on esitettyä pitoisuuksien erot ja eroprosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiiniipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Pitoisuuden absoluuttinen muutos laski maltillisesti kaikissa näytesarjoissa hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa, eikä niiden ero ollut suuri sarjojen välillä. Näytesarjassa 3 oli korkeampi lähtötason haptoglobiiniipitoisuus ja myös erotukset olivat suurempia verrattuna näytesarjoihin 1 ja 2. Eroprosentit säilyivät kuitenkin suhteellisen muuttumattomina näytesarjojen välillä. Näillä perusteluilla voitiin todeta, ettei haptoglobiinin pitoisuustasolla ollut juurikaan vaikutusta hemolyysin aiheuttamaan häiriöön.

Taulukko 17. Haptoglobiiniipitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–3. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (g/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (g/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (g/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 2	0,97	-0,18	-0,20	-19 %	-21 %
Näytesarja 1	1,00	-0,21	-0,22	-21 %	-22 %
Näytesarja 3	2,34	-0,42	-0,46	-18 %	-20 %

Hemolyysillä oli häiritsevä vaikutus haptoglobiinimääritykseen: hemoglobiinikonsentraation kasvaessa haptoglobiinipitoisuus pieneni. Haptoglobiinin pitoisuustasolla ei ollut vaikutusta hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen, sillä näytesarjojen eroprosentit olivat yhtäläisiä. Korkealla haptoglobiinipitoisuudella hemolyysin vaikutusta oli kuitenkin vaikea arvioida, sillä pitoisuustasossa tapahtunut heilahdus matalalla hemolyysitasolla saattoi olla virheellistä tulosta. Hemolyysin vaikutus oli merkittävää, kun hemolyysi-indeksi oli 1 tai enemmän, hemoglobiinipitoisuus oli yli 0,30 g/l ja laitteen hemoglobiinitulos oli yli 0,2 g/l. Tällöin analyysille määritetyn variaatiokerroimen yläraja ylittyi.

8.7 Kalium

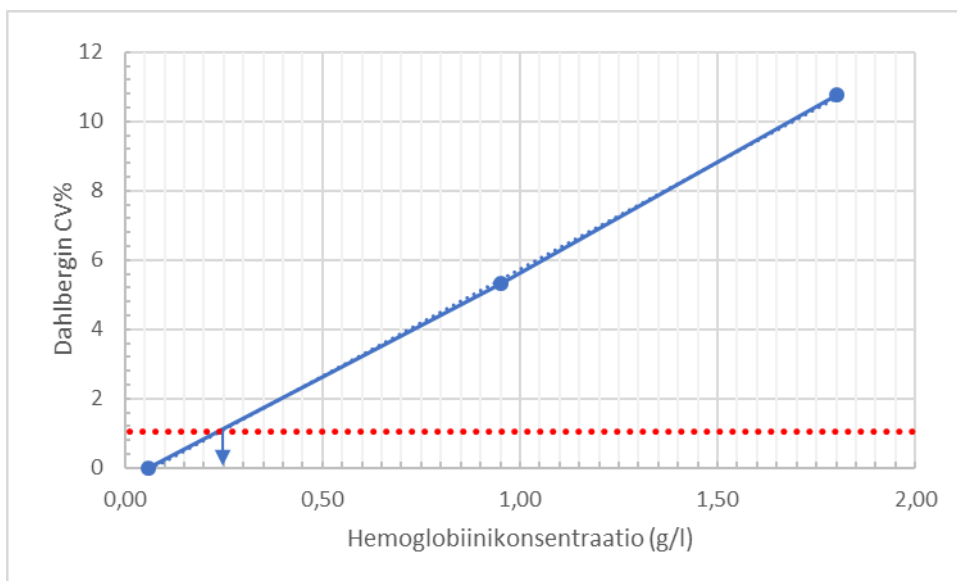
HUSLABin laatuavoite kaliummäärityksen sisäiselle variaatiokerroimelle on 1 %. Kaikki tulokset olivat analysointikelpoisia, joten näytekohdaiseen tarkasteluun otettiin 28 tutkimusnäytteen tulokset. Tutkimusnäytteiden K⁺-ionipitoisuus vaihteli välillä 3,63–6,58 mmol/l ja rinnakkaistulosten keskimääräinen K⁺-ionipitoisuus oli 4,93 mmol/l. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokerroimet vaihtelivat välillä 0–0,53 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,11 %. Kaikkien tutkimusnäytteiden variaatiokerroimet alittivat tavoitetasoa.

Tuloskoostetaulukossa 18 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokerroimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Tulosten keskiarvo ja hemolyysin aiheuttama häiriön määrä kasvoivat loogisesti hemoglobiinikonsentraation kasvaessa ja Dahlbergin tunnusluvut kasvoivat vastaavasti häiriövaikutuksen lisääntyessä. Kun kaliumin variaatiokerroin oli 5,31 % se ylitti tavoitteellisen variaatiokerroimen tasolla 1, kun näytesarjojen 1–4 keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 0,95 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli 1,24 g/l. K⁺-ionipitoisuus oli tällöin keskimäärin 4,0 mmol/l, erotus 0-tasosta oli 0,29 mmol/l (vaihteluväli oli 0,28–0,31 mmol/l) ja eroprosentti 0-tasosta oli 7,8 % (vaihteluväli oli 7,3–8,2 %).

Taulukko 18. Tuloskooste kaliumille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

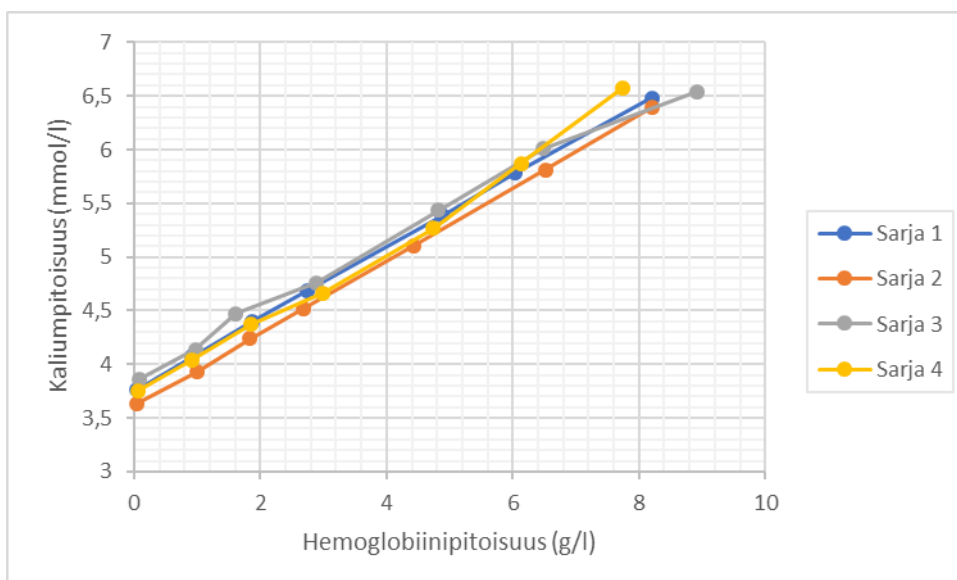
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (mmol/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	3,8		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	4,0	0,207	5,31
Taso 2	1,80	2,52	2–3	4,4	0,437	10,75
Taso 3	2,83	3,70	3	4,7	0,641	15,24
Taso 4	4,72	6,26	4	5,3	1,09	24,18
Taso 5	6,29	8,52	4–5	5,9	1,496	31,10
Taso 6	8,27	10,98	5–6	6,5	1,941	37,88

Kuviossa 28 on esitettynä K⁺-ionin kaksi alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatu-tavoitetta, joka K⁺-ionimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 1 %. Käyrän avulla voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella raja oli noin 0,25 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulosta 0,15 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 28. K^+ -ionin hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti K^+ -ionille määritetyn 1 % laatutavoitteen (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,25 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 29 esitellään K^+ -ionipitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa nähdään, että kaikkien näytesarjojen K^+ -ionipitoisuus nousi lineaarisesti hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa.



Kuvio 29. K^+ -ionipitoisuudet sarjoissa 1–4.

Taulukossa 19 on esitetty erot ja eroprosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin

8,27 g/l. Pitoisuuden absoluuttinen muutos kasvoi maltillisesti kaikissa näytesarjoissa hemolyyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa. Koska näytesarjojen tasot olivat lähellä toisiaan ja ne edustivat kaikki lähes samaa pitoisuustasoa, ei näytesarjojen välille syntynyt suurta eroa erotuksiin tai eroprosentteihin. Koska näytesarjoihin ei saatu aikaiseksi riittävää pitoisuustasojen vaihtelua, täsmällistä vastausta toiseen tutkimuskysymykseen ei saatu.

Taulukko 19. K⁺-ionipitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyytitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (mmol/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (mmol/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (mmol/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 2	3,64	0,89	2,76	24 %	76 %
Näytesarja 4	3,76	0,91	2,82	24 %	75 %
Näytesarja 1	3,76	0,93	2,72	25 %	72 %
Näytesarja 3	3,86	0,90	2,68	23 %	69 %

Hemolyyssillä oli häiritsevä vaikutus K⁺-ionimääritykseen: hemoglobiinikonsentraation kasvaessa K⁺-ionipitoisuus kasvoi. K⁺-ionipitoisuuden vaikutusta hemolyyysin aiheuttaman poikkeaman suuruuteen ei voitu osoittaa näytesarjojen lähes saman pitoisuustason vuoksi. Hemolyyysin vaikutus oli merkittävää, kun hemolyyssi-indeksi oli 1 tai enemmän, hemoglobiinipitoisuus oli yli 0,25 g/l ja laitteen hemoglobiinitulos oli yli 0,15 g/l. Tällöin analyylille määritetyn variaatiokertoimen yläraja ylittyi.

8.8 Kreatiiniinikinaasi

HUSLABin laatutavoite CK-määrityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 3 %. Tutkimusnäytteiden CK-pitoisuus vaihteli välillä 52–4233 U/l ja keskimääräinen CK-pitoisuus oli 153 U/l. Tulosten analysoinnista jätettiin pois näytesarjan 2 ensimmäisten rinnakkaismittausten tulokset, jotka ylittivät menetelmän mittausalueen ylärajan (>1300 U/l) (Creatine Kinase. 2018). Näytesarjan 2 näytteistä tarkasteluun valittiin toinen rinnakkaismitaus, joka oli numeerinen. Laitteisto oli konfiguroitu automaattisesti laimentamaan liian korkeat tulokset, jolloin lopullinen mittausalueen yläraja ulottui 7800 U/l saakka (Creatine Kinase. 2018). Näin ollen näytesarjasta 2 ei voitu laskea rinnakkaismittausten välisiä variaatio-

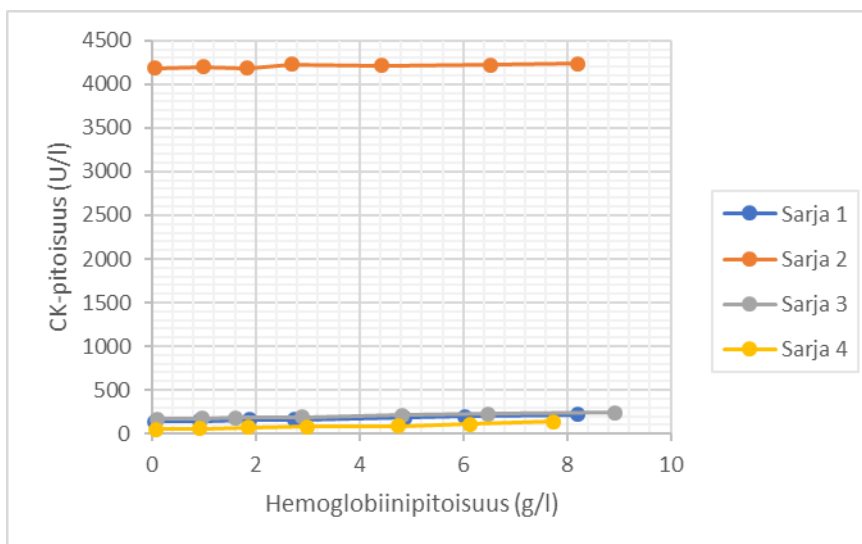
kertoimia ja tulosten tarkastelussa käytetyt tulokset oli saatu laimentamisen seurauksena. Näytesarjojen 1, 3 ja 4 näytteiden variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0–4,94 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,94 %. Ainoastaan näytesarjan 4 näytteen 4-3 variaatiokerroin ylitti 3 % rajan. Näytteen tulos oli kuitenkin looginen ja linjassa sarjan muiden näytteiden kanssa, joten työssä käytettiin rinnakkaismittausten keskiarvoa. Työhön otettiin kaikkiaan 28 tutkimusnäytteen tulokset.

Tuloskoostetaulukossa 20 esitetään tulosten keskiarvot ja Dahlbergin menetelmällä saadut tulokset rinnakkain hemoglobiinimääritysten keskiarvojen kanssa. CK-pitoisuus kasvoi loogisesti hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvusta kertoo Dahlbergin hajontaluku. Variaatiokerroin ylitti tavoitellun 3 % rajan tasolla 5, jossa se oli 3,29 %. Tällöin keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 6,29 g/l, CK-pitoisuus oli 1190 U/l, erotus 0-tasosta oli 53 U/l (vaihteluväli oli 37–60 U/l) ja eroprocentti 0-tasosta oli 47 % (vaihteluväli oli 1–108 %). Hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 4–5. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 8,52 g/l.

Taulukko 20. Tuloskooste CK-entsyymille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

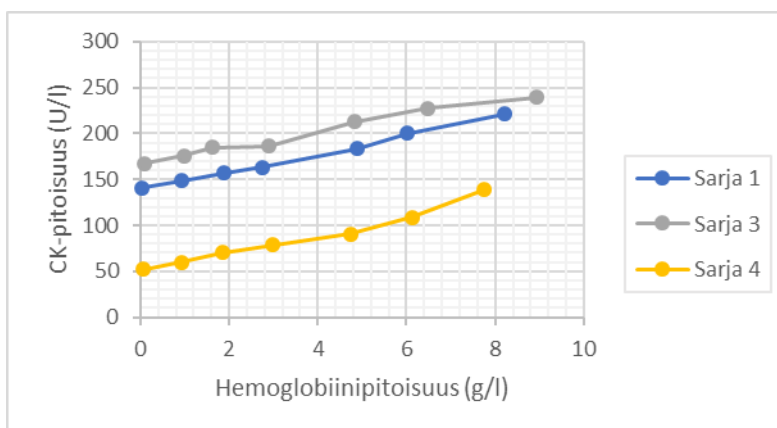
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	1137		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	1145	5,687	0,50
Taso 2	1,80	2,52	2–3	1150	10,617	0,93
Taso 3	2,83	3,70	3	1164	20,256	1,76
Taso 4	4,72	6,26	4	1174	27,08	2,34
Taso 5	6,29	8,52	4–5	1190	38,257	3,29
Taso 6	8,27	10,98	5–6	1208	51,514	4,39

Kuviosta 30 nähdään, että näytesarjan 2 pitoisuudet olivat selvästi muita näytesarjoja korkeammat. Tämän vuoksi käyrät kulkevat kuvion asteikolla lähes vaakasuoraan ja pitoisuuden muutoksen suuntaa on vaikea arvioida.



Kuvio 30. CK-pitoisuudet sarjoissa 1–4.

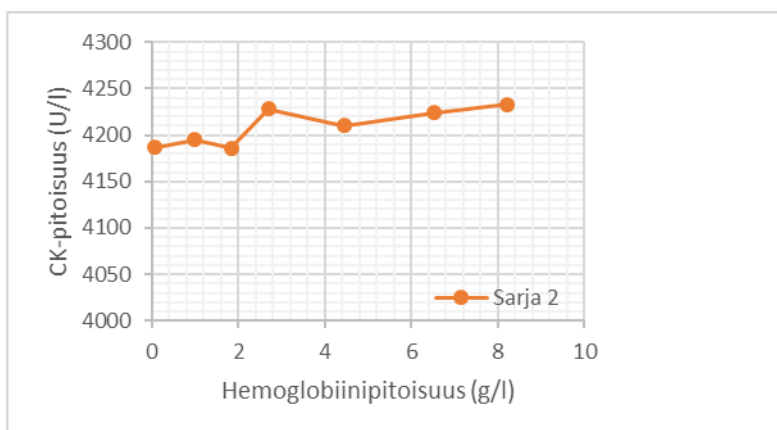
Kuviossa 31 esitetään matalat CK-tulokset hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioista erottuu paremmin, että kolme alimman tason näytesarjaa poikkesivat hieman toisistaan pitoisuudeltaan. Hemolyyysi nosti näytteen CK-pitoisuutta kutakuinkin yhtäläisesti kaikissa kolmessa näytesarjassa. Kuvion perusteella CK-pitoisuus muuttui merkittävästi jo alemmilla hemoglobiinipitoisuuksilla.



Kuvio 31. Matalat CK-pitoisuudet (näytesarjat 1, 3 ja 4).

Kuviossa 32 havainnollistetaan korkeiden CK-pitoisuuksien muutosta hemoglobiinikonentraation seurauksena. Ruutuvälit ovat kutakuinkin samat kuin kuviossa 31. Myös korkeilla pitoisuuksilla hemoglobiinilla oli nostava vaikutus CK-pitoisuuteen, mutta kuvion perusteella vaikutus näyttäisi olevan pienempi, kuin matalilla CK-pitoisuuksilla. Arvoissa

tapahtui myös huomattava määrä heittelyä, mikä voi johtua siitä, että laite oli laimentanut näytteitä.



Kuvio 32. Korkeat CK-pitoisuudet (näytesarja 2).

Taulukosta 21 nähdään, että CK-pitoisuus muuttui vähemmän korkeammilla pitoisuuksilla sekä absoluuttisesti, että prosentuaalisesti. Korkeinta tulosta näytesarjasta 2 pidettiin epäluotettavana, sillä se ei ollut linjassa muiden tulosten kanssa.

Taulukko 21. CK-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (U/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 4	52	27	86	51 %	165 %
Näytesarja 1	141	23	80	16 %	57 %
Näytesarja 3	167	19	72	11 %	43 %
Näytesarja 2	4187	41	47	1 %	1 %

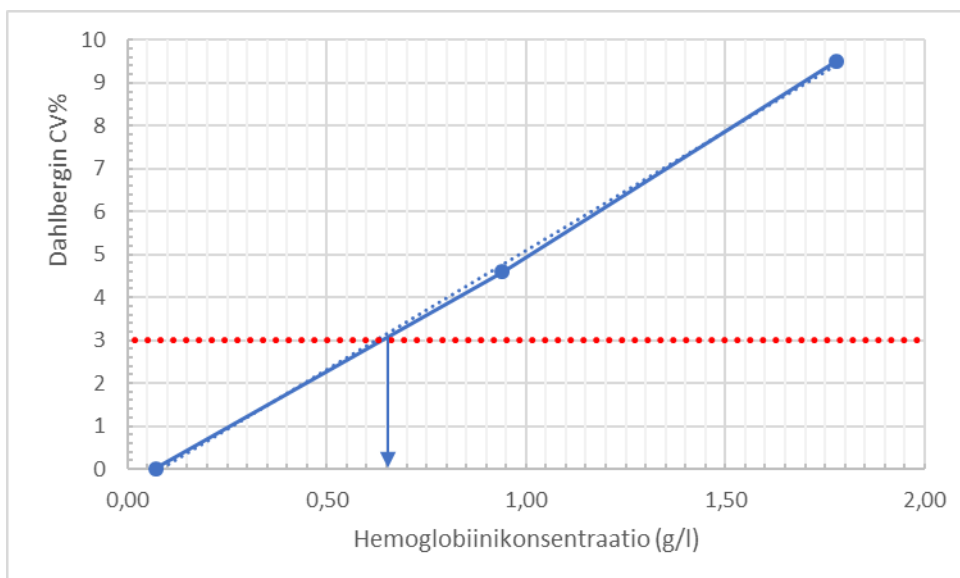
Hemolyysi häiritsi CK-määrittystä. CK-pitoisuus nousi voimakkaasti erityisesti matalan tason näytesarjoissa, joiden näytteitä laite ei ollut laimentanut. Näytesarjassa 2 hemoglobiinipitoisuuden vaikutus oli vähäisempi, mikä vaikutti kaikista tutkimusnäytteistä lasketuihin Dahlbergin tunnuslukuihin. Tämän vuoksi kaikista tutkimusnäytteistä laskettua tulosta ei voitu pitää luotettavana matalan tason CK-näytteille.

Taulukon 22 CK-tuloksista jätettiin kokonaan pois korkein näytesarja 2. Tulosten keskiarvo, Dahlbergin hajonta sekä variaatiokerroin kasvoivat edelleen loogisesti. Variaatiokerroin ylitti tavoiterajan jo tasolla 1 (CV% = 4,59 %), jolloin hemoglobiinipitoisuus oli 0,94 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,23 g/l. Tällöin keskimääräinen CK-pitoisuus oli 128 U/l, erotus 0-tasoon oli 8 U/l ja eroprosentti 0-tasoon oli 8 %.

Taulukko 22. Matalien näytteiden CK-tulosten kooste (näytesarjoista 1, 3 ja 4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1, 3 ja 4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,07	0,04	0	120		
Taso 1	0,94	1,23	1–2	128	5,697	4,59
Taso 2	1,78	2,54	2–3	137	12,257	9,52
Taso 3	2,88	3,71	3	143	16,253	12,36
Taso 4	4,81	6,35	4	162	29,80	21,12
Taso 5	6,21	8,43	4–5	179	41,513	27,78
Taso 6	8,29	10,95	5–6	200	56,359	35,26

Kuviossa 33 on esitetty CK-entsyymien kaksi alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa on käytetty jälkimmäisen laskun mukaisia variaatiokertoimia, joissa on mukana ainoastaan näytesarjojen 1, 3 ja 4 tulokset. Kaavioon on piirretty apuviiva merkitsemään HUSLABin variaatiokertoimen tavoiterajaa, joka on CK-entsyymille 3 %. Kaaviosta voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jonka kohdalla tavoiteraja ylittyi. Kaaviosta lukemalla tämä raja oli noin hemoglobiinipitoisuuden 0,65 g/l kohdalla spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulosta 0,65 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 33. CK-entsyymin hemolyysi-indeksin raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti CK-entsyymin määrittämiseen määrätyn 3 % rajan (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,65 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Matalilla CK-pitoisuuksilla (CK-pitoisuuden ollessa noin alle 170 U/l) hemolyysi häiritsee CK-määrittämistä. Hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa CK-pitoisuus kasvoi. Hemolyysi häiritsee CK-määrittämistä merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,65 g/l tai laitteen hemoglobiinituloksen ollessa yli 0,65 g/l, mikä vastasi hemolyysi-indeksiä 1. Tällöin analyysille määrätyn variaatiokerroimen laatuvaatimus ei enää täyttynyt. Todella korkeilla CK-pitoisuuksilla hemolyysin vaikutus tuloksiin oli vähäinen.

8.9 Kreatiinikinaasin MB-alayksikkö

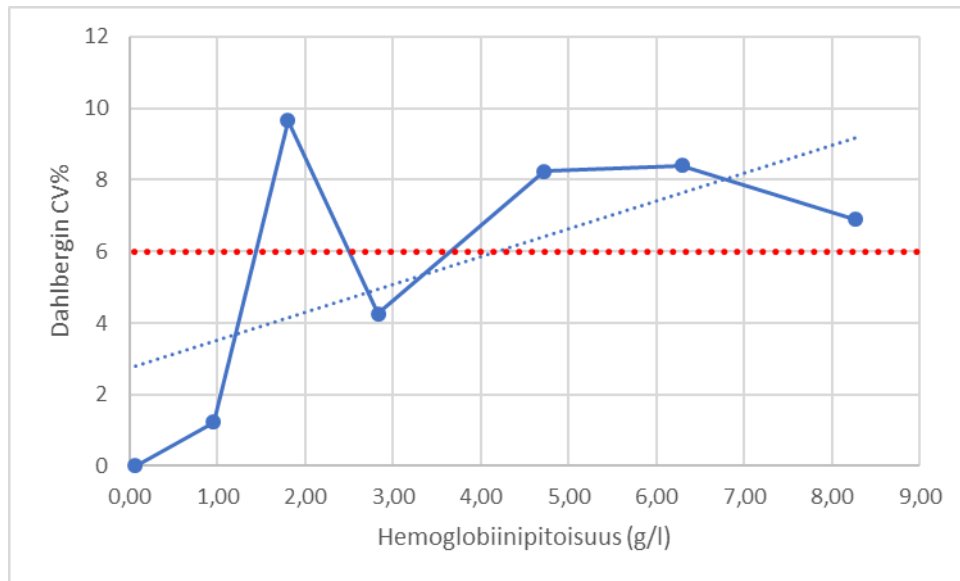
HUSLABin laatuvaatimus CK-MBm-tutkimuksen sisäiselle variaatiokerroimelle on 6 %. Tutkimusnäytteiden CK-MB-pitoisuus vaihteli välillä 0,60–2,90 ng/l ja keskimääräinen CK-MB-pitoisuus oli 1,54 ng/l. Rinnakkaisien määritysten tarkastelussa kahdeksan tutkimusnäytteen variaatiokerroin ylitti tavoitellun 6 % rajan. Rinnakkaismittausten väliset variaatiokerroimet vaihtelivat välillä 0–16 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 4,41 %. Kaikille rinnakkaismittauksille yhteisesti Dahlbergin menetelmällä laskettu variaatiokerroin ylitti 6 % tavoiterajan ollen 10,2 %. Näytesarjan 2 näytteeltä 2-2 puuttui rinnakkaisulos kokonaan, joten sitä ei huomioitu laskelmissa. Tuloksista oli mahdotonta karsia kaikki epäluotettavat tulokset hemolyysin vaikutuksen selvittämiseksi.

Tuloskoostetaulukosta 23 nähdään, että tulosten keskiarvot vaihtelivat hieman, samoin kuin Dahlbergin hajontaluvut sekä variaatiokerroimet. Variaatiokerroin ylitti 6 % rajan tasoilla 2 ja 4, mutta ei tasoilla 1 ja 3.

Taulukko 23. Tuloskooste CK-MBm-tutkimukselle (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelivat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

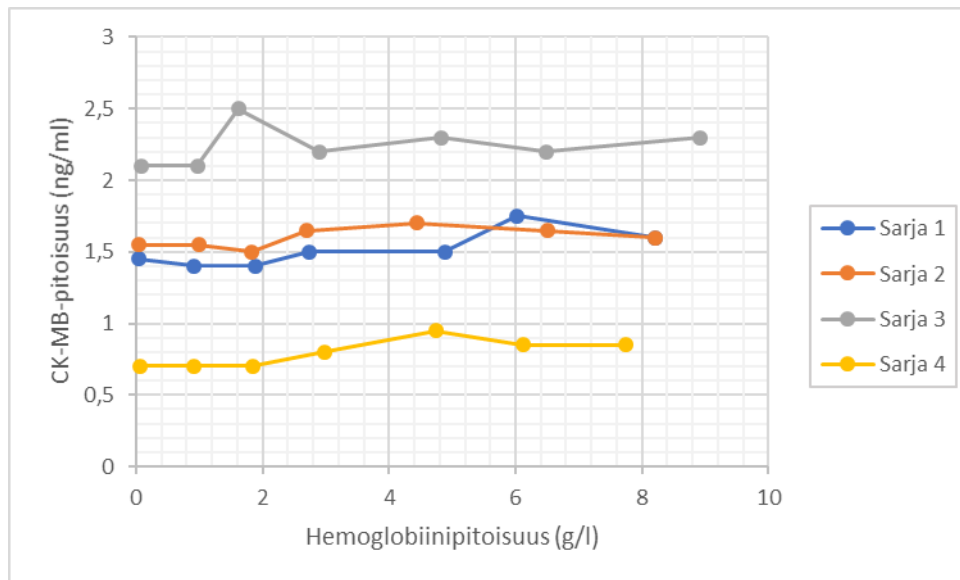
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (ng/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	1,45		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	1,44	0,018	1,22
Taso 2	1,80	2,52	2–3	1,53	0,144	9,65
Taso 3	2,83	3,70	3	1,54	0,064	4,27
Taso 4	4,72	6,26	4	1,61	0,13	8,24
Taso 5	6,29	8,52	4–5	1,61	0,129	8,40
Taso 6	8,27	10,98	5–6	1,59	0,105	6,89

Variaatiokertoimia havainnollistaa kuvio 34, jossa ne on esitetty hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Variaatiokerroimet vaihtelivat voimakkaasti HUSLABin laatutavoitteen ympäristössä, joka näytetään kuvassa punaisena katkoviivana.



Kuvio 34. CK-entsyymin MB-alayksikön variaatiokeroimet. Punaisella katkoviivalla on merkitty 6 % raja-arvo. Hemoglobiinipitoisuudet on ilmoitettu Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuina.

Kuviossa 35 on esitetty kaikkien rinnakaistulosten keskiarvot suhteessa hemoglobiinipitoisuuteen. Kuviossa käyrien suurin trendi oli ylöspäin, eli näyttää siltä, että CK-MB-pitoisuus olisi kasvanut hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Käyristä ei kuitenkaan voitu tehdä täsmällistä tulkintaa vaihtelevien arvojen vuoksi.



Kuvio 35. CK-MB-pitoisuus sarjoissa 1–4.

Hemolyysi saattoi vaikuttaa CK-MBm-tutkimukseen. CK-MB-pitoisuus mahdollisesti kasvoi hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Arvojen vaihtelevuuden takia selkeää linjausta hemolyysi-indeksin raja-arvosta oli mahdotonta tehdä.

8.10 Laktaatti

HUSLABin laatutavoite laktaattimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 1,5 %. Laktaattimittauksissa oli mukana vain yksi näytesarja L. Tulosten analysoinnista jätettiin pois näytteen L-3 jälkimmäinen tulos, sillä rinnakkaistulokset poikkesivat liikaa toisistaan: näytteen L-3 ensimmäinen mittaustulos oli 1,08 mmol/l ja toinen mittaustulos oli puolestaan 0,91 mmol/l. Ensimmäistä tulosta käytettiin laskuissa, koska se oli paremmin linjassa suhteessa muiden näytetasojen tuloksiin.

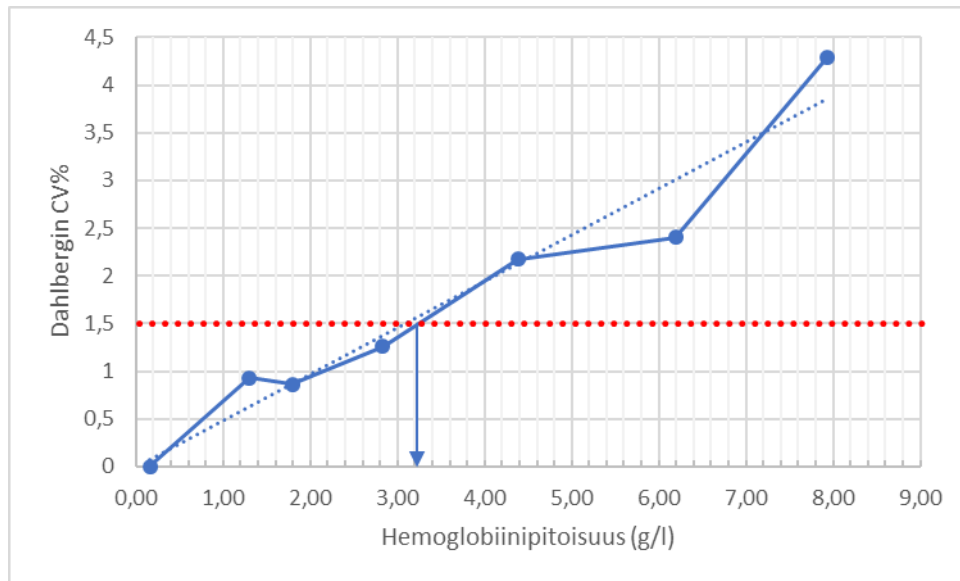
Näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin kuitenkin kaikki tulokset. Tutkimusnäytteiden laktaattipitoisuus vaihteli välillä 0,91–1,13 mmol/l ja rinnakkaistulosten keskimääräinen laktaattipitoisuus oli 1,07 mmol/l. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokerroimet vaihtelivat välillä 0,09–8,42 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 1,54 %. Ainoastaan näyte L-3 ylitti sallitun variaatiokertoimen ($CV\% = 8,42\%$), mutta korkeampi tulos hyväksyttiin tarkasteluun. Korkeaa variaatiokerrointa selitti edellä kuvattu rinnakkaistulosten kohtalaisen suuri ero.

Tuloskoostetaulukossa 24 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokertoimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Koska näytesarjoja oli vain yksi, tulostaulukon keskiarvosarakkeen arvo on kyseisen tason tutkimusnäytteen tulos. Tasolla 2 pyöristetty tulos oli yhtä suuri kuin tasolla 1, mutta Dahlbergin hajontaluku ja variaatiokerroin laskivat. Pääsääntöisesti kuitenkin tulokset, sekä Dahlbergin hajontaluvut ja variaatiokertoimet kasvoivat hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Kun laktaatin variaatiokerroin oli 2,18 % se ylitti tavoitteellisen variaatiokertoimen tasolla 4, kun hemoglobiinikonsentraatio oli 4,38 g/l ja hemolyysi-indeksi oli 4. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli 5,08 g/l. Laktaattipitoisuus oli tällöin 1,09 mmol/l, erotus 0-tasosta oli 0,033 mmol/l ja eroprosentti 0-tasosta oli 3 %.

Taulukko 24. Tuloskooste laktaatille (sarja L). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjan L pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina.

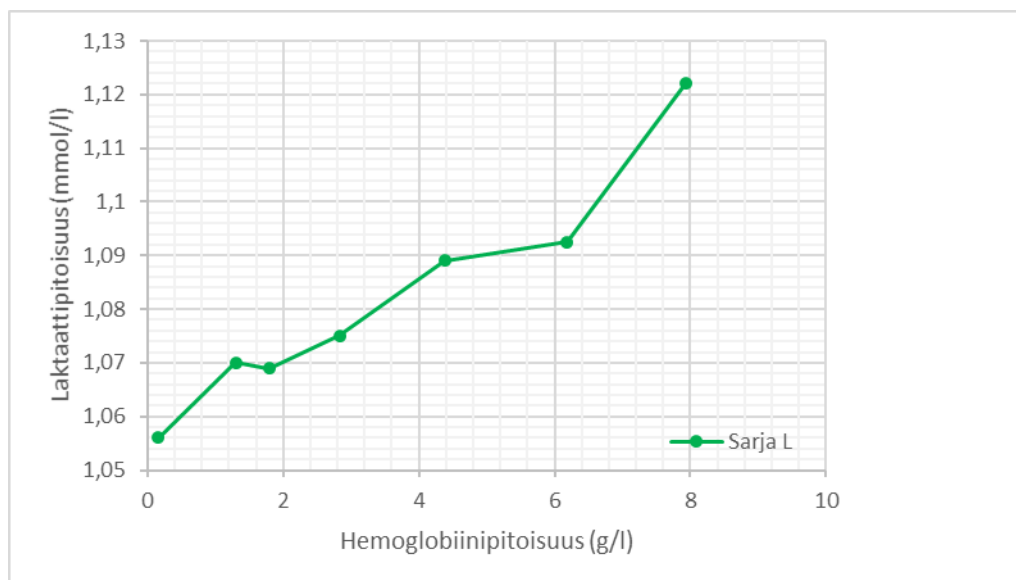
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (mmol/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,16	0,17	1	1,06		
Taso 1	1,30	1,50	2	1,07	0,010	0,93
Taso 2	1,79	2,05	2	1,07	0,009	0,87
Taso 3	2,83	3,21	3	1,08	0,013	1,26
Taso 4	4,38	5,08	4	1,09	0,023	2,18
Taso 5	6,19	7,18	4	1,09	0,026	2,40
Taso 6	7,93	9,06	5	1,12	0,047	4,29

Kuviossa 36 on esitettynä laktaatin variaatiokertoimet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatutavoitetta, joka laktaattimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 1,5 %. Käyrän avulla voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella raja oli noin 3,2 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulosta 4,0 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 3 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 2,50–4,99 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna.



Kuvio 36. Laktaatin hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti laktaatille määritetyn 1,5 % laatutavoitteen (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 3,2 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 37 esitellään yhden näytesarjan laktaattipitoisuus hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Laktaattipitoisuus nousi hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa 0-tasolta tasolle 1, mutta sen jälkeen kääntyi hieman laskuun tasolla 2. Tämän jälkeen pitoisuuden nousu jatkui tasolle 6 saakka.



Kuvio 37. Laktaattipitoisuudet sarjassa L.

Hemolyysillä oli häiritsevää vaikutus laktaattimääritykseen korkeilla hemolyysitasoilla. Vain yhden mittauksissa mukana olleen näytesarjan perusteella ei voitu osoittaa, vaikutiko laktaatin pitoisuustaso hemolyysin aiheuttamaan häiriöön. Hemolyysin vaikutus oli merkittävää, kun hemolyysi-indeksi oli 3 tai enemmän, hemoglobiinipitoisuus oli yli 3,2 g/l ja laitteen hemoglobiinitulos oli yli 4,0 g/l. Tällöin analyytille määritetyn variaatiokerroimen yläraja ylittyi.

8.11 Laktaattidehydrogenaasi

HUSLABin laatuavoite LD-määrityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 2 %. Tulosten analysoinnista jätettiin pois sellaiset tulokset, joiden kohdalla LD-pitoisuus ylitti laitteiston mittausalueen ylärajan (>750 U/l) (Lactate Dehydrogenase. 2018). Jos käytettävissä oli toinen rinnakkainen tulos, se valittiin tarkasteluun. Yli mittausalueen ylärajan anteita tuloksia olivat näytesarjan 1 näytteet 1-5 ja 1-6, näytesarjan 2 näytteet 2-4, 2-5 ja 2-6, näytesarjan 3 näytteet 3-4, 3-5 ja 3-6 sekä näytesarjan 4 näytteet 4-4, 4-5 ja 4-6. Kaikkien näiden näytteiden kohdalla ensimmäinen mittaustulos oli enemmän kuin 750 U/l. Laitteisto oli konfiguroitu automaattisesti laimentamaan liian korkeat tulokset, jolloin lopullinen mittausalueen yläraja ulottui 4500 U/l saakka (Lactate Dehydrogenase. 2018). Täten toinen mittaustulos vaihteli näytteen mukaan välillä 885–1541 U/l. Näytesarjan 1 näyte 1-4 hylättiin kokonaan, sillä molemmat mittaustulokset olivat yli 750 U/l.

Edellä mainittujen tulosten poissulkukriteerien mukaisesti näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin 16 tutkimusnäytteen tulokset. Tutkimusnäytteiden LD-pitoisuus vaihteli välillä 173–1541 U/l ja rinnakkaistulosten keskimääräinen LD-pitoisuus oli 438 U/l. Rinnakkais- tulosten väliset variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0,02–0,78 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 0,25 %. Kaikkien tutkimusnäytteiden variaatiokertoimet alittivat tavoitetason.

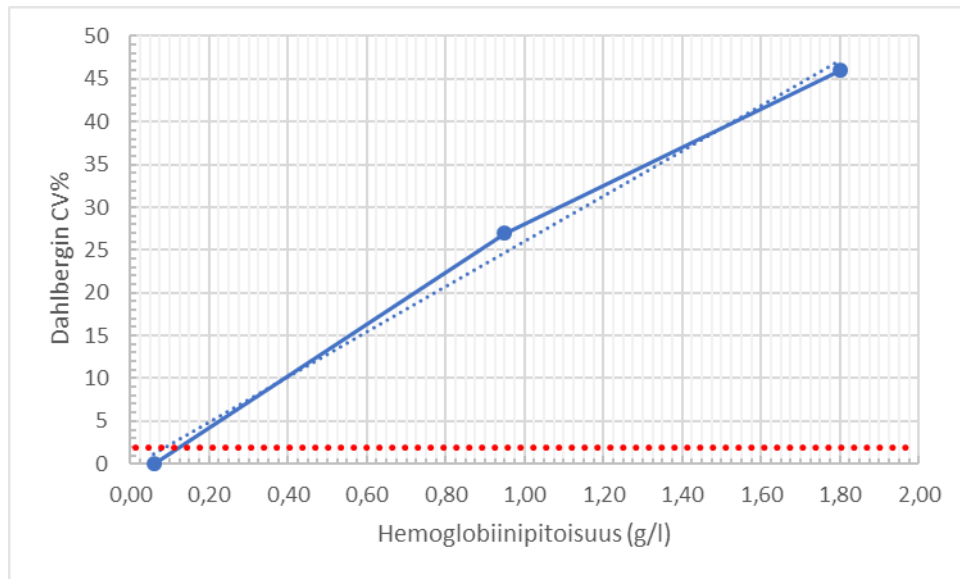
Tuloskoostetaulukossa 25 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokertoimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Tulosten keskiarvo ja hemolyysin aiheuttama häiriön määrä kasvoivat loogisesti hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Tämä heijastui kasvaviin Dahlbergin hajontalukuihin ja variaatiokertoimiin. Kun LD-entsyymien variaatiokerroin oli 26,97 % se ylitti tavoitteellisen variaatiokertoimen tasolla 1, kun näytesarjojen 1–4 keskimääräinen hemoglobiinikonsentraatio oli 0,95 g/l ja hemolyysi-indeksi vaihteli välillä 1–2. Kyseisellä tasolla laitteen vastaava hemoglobiinikonsentraatio oli keskimäärin 1,24 g/l. LD-pitoisuus oli tällöin keskimäärin 377 U/l, erotus 0-

tasosta oli 121 U/l (vaihteluväli oli 118–126 U/l) ja eroprosentti 0-tasosta oli 51 % (vaihteluväli oli 33–70 %).

Taulukko 25. Tuloskooste laktaattidehydrogenaasille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelivat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

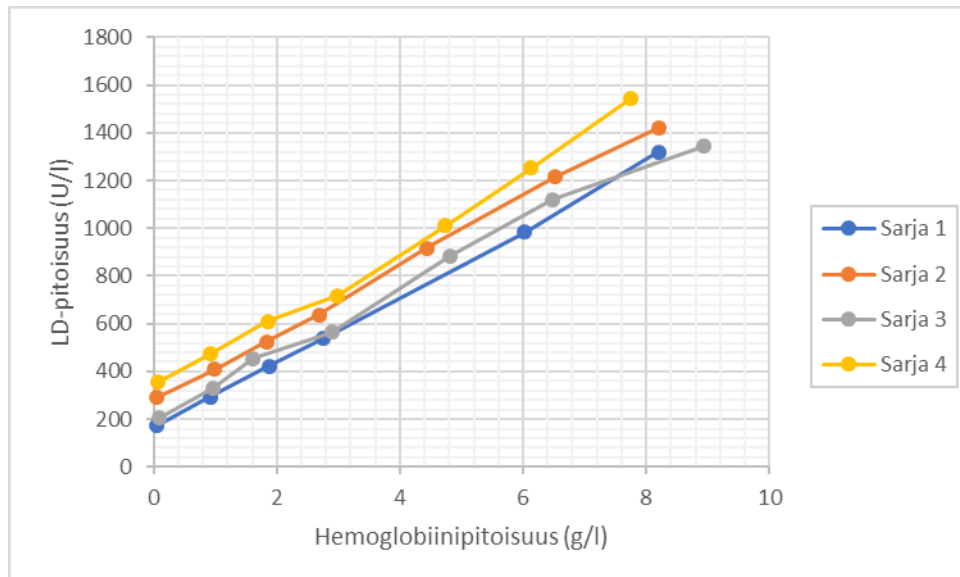
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Tulosten keskiarvo (U/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	256		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	377	85,418	26,97
Taso 2	1,80	2,52	2–3	503	174,672	45,99
Taso 3	2,83	3,70	3	615	253,331	58,17
Taso 4	4,72	6,26	4	937	462,21	75,69
Taso 5	6,29	8,52	4–5	1142	627,339	89,70
Taso 6	8,27	10,98	5–6	1406	813,212	97,82

Kuviossa 38 on esitetty LD-entsyymin kaksi alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatutavoitetta, joka LD-määrityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 2 %. Käyrän avulla voitiin interpoloida hemoglobiinipitoisuus, jolla raja ylittyi. Kuvion perusteella raja oli noin 0,12 g/l spektrofotometrillä mitattuna tuloksena. Muuntokuvion 13 perusteella tämä vastasi Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulosta 0,0 g/l. Siemens Healthineersin (2019) mukaan hemolyysi-indeksi 1 vastaa hemoglobiinikonsentraatiota välillä 0,11–1,30 g/l Atellica® Solution -laitteella mitattuna. Hemoglobiinipitoisuus alle 0,11 g/l vastaa hemolyysi-indeksiä 0 (Siemens Healthineers 2019).



Kuvio 38. LD-entsyymien hemoglobiinipitoisuuden raja-arvon määrittäminen. Variaatiokerroin ylitti LD-entsyymille määritetyn 2 % laatutavoitteen (merkitty punaisella katkoviivalla), kun hemoglobiinipitoisuus oli noin 0,12 g/l Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuna.

Kuviossa 39 esitellään LD-pitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviosta nähdään, että kaikkien näytesarjojen LD-pitoisuus nousi jyrkästi hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Näytesarjojen 1–4 lähtötason pitoisuus vaihteli keskimäärin välillä 170–350 U/l ja korkeimmalla hemolyytitasolla näytesarjojen pitoisuudet olivat yli 1300 U/l.



Kuvio 39. LD-pitoisuudet sarjoissa 1–4.

Taulukossa 26 on esitettyinä pitoisuuksien erot ja eroprosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Pitoisuuden absoluuttinen muutos kasvoi kaikissa näytesarjoissa hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa. Tasolla 3 absoluuttinen muutos 0-tasosta oli suurempaa matalamman tason näytesarjoissa. Tasolla 6 absoluuttinen muutos 0-tasosta oli kaikkien näytesarjojen kohdalla suunnilleen yhtä suurta. Taulukosta nähdään, että näytesarjan 1 kohdalla eroprosentit olivat suurimmillaan: tasolla 3 eroprosentti 0-tasosta oli 210 % ja tasolla 6 eroprosentti 0-tasosta oli 661 %. Näytesarjan 4 kohdalla eroprosentit olivat puolestaan pienimpiä: tasolla 3 eroprosentti 0-tasosta oli 102 % ja tasolla 6 eroprosentti 0-tasosta oli 333 %. Eroprosentit siis pienenivät, kun LD-pitoisuustaso nousi. Tuloksista voitiin todeta, että hemolyysin aiheuttamalla häiriöllä oli korkeilla LD-pitoisuuksilla vähemmän vaikutusta.

Taulukko 26. LD-pitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (U/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (U/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 1	173	364	1146	210 %	661 %
Näytesarja 3	206	360	1137	175 %	553 %
Näytesarja 2	290	348	1132	120 %	390 %
Näytesarja 4	356	362	1185	102 %	333 %

Hemolyysillä oli häiritsevä vaikutus LD-määrittelyyn: hemoglobiinikonsentraation kasvaessa LD-pitoisuus kasvoi. Kuitenkin suurilla LD-pitoisuuksilla hemolyysin aiheuttama häiriö oli lievempää, kuin matalilla LD-pitoisuuksilla. Hemolyysin vaikutus oli merkittävää, kun hemolyysi-indeksi oli 0 tai enemmän, hemoglobiinipitoisuus oli yli 0,12 g/l ja laitteen hemoglobiinitulos oli 0,0 g/l. Tällöin variaatiokertoimelle määritetty tavoiteraja ylittyi.

8.12 Myoglobiini

HUSLABin laatuavoite myoglobiinimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 4 %. Näytesarjan 4 näytteestä 4-6 oli saatavilla vain yksi tulos, sillä tuntemattomasta syystä analyyttori ei ollut mitannut analyysin pitoisuutta kahtena rinnakkaisena mittauksena. Tulosten analysointiin valittiin täten vain ensimmäinen kyseisen näytteen mittaustulos.

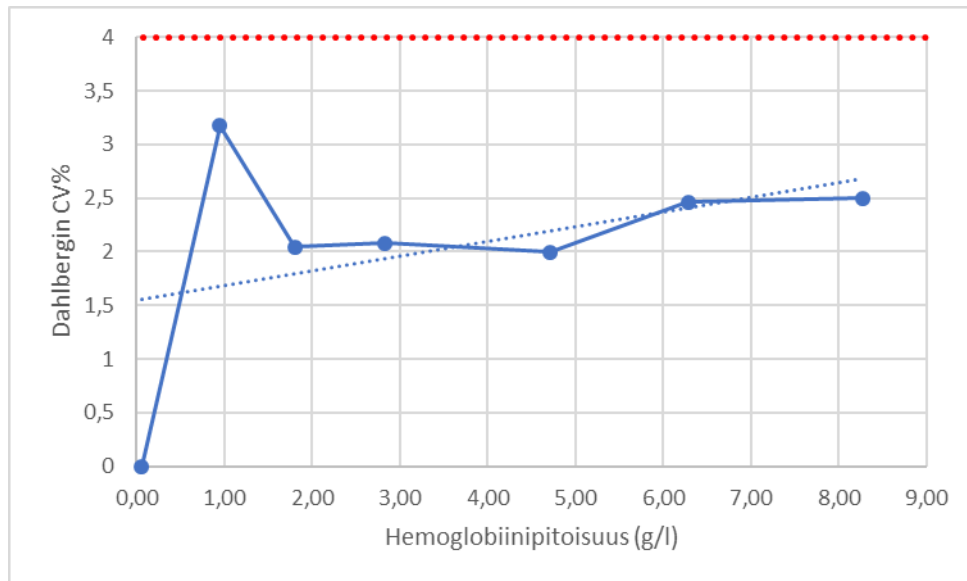
Näytekohtaiseen tarkasteluun otettiin 27 tutkimusnäytteen tulokset. Tutkimusnäytteiden myoglobiinipitoisuus vaihteli välillä 34,70–92,20 µg/l ja rinnakkaistulosten keskimääräinen myoglobiinipitoisuus oli 58,64 µg/l. Rinnakkaistulosten väliset variaatiokertoimet vaihtelivat välillä 0,13–4,95 % ja keskimääräinen variaatiokerroin oli 1,4 %. Ainoastaan näytesarjan 2 näyte 2-4 ylitti sallitun variaatiokertoimen (CV% = 4,03 %). Korkeasta variaatiokertoimesta huolimatta tulos hyväksyttiin.

Tuloskoostetaulukossa 27 on esitettyä Dahlbergin kaavalla tuotetut sisäiset variaatiokertoimet eri hemolyysitasoille, sekä Dahlbergin hajonnat. Tulosten keskiarvo oli suurimmillaan 0-tasolla ja tulosten keskiarvo laski lievästi hemoglobiinikonsentraation kasvaessa. Tasolla 3 keskiarvo kuitenkin nousi verrattuna tasoihin 1 ja 2, jonka jälkeen keskiarvo taas laski kohti tasoa 6. Dahlbergin hajontaluvut ja variaatiokertoimet laskivat kaikilla tasoilla verrattuna tasoon 1. Tuloksista nähdään, että myoglobiinin variaatiokerroin ei ylittänyt millään tasolla tavoitteellista variaatiokerrointa.

Taulukko 27. Tuloskooste myoglobiinille (sarjat 1–4). Hemoglobiinipitoisuudet ovat näytesarjojen 1–4 keskimääräiset pitoisuudet spektrofotometrillä mitattuina sekä laitteen antamina tuloksina. Hemolyysi-indeksin tulokset vaihtelevat, sillä ne mitattiin samoista näytteistä kahdella eri laitteella.

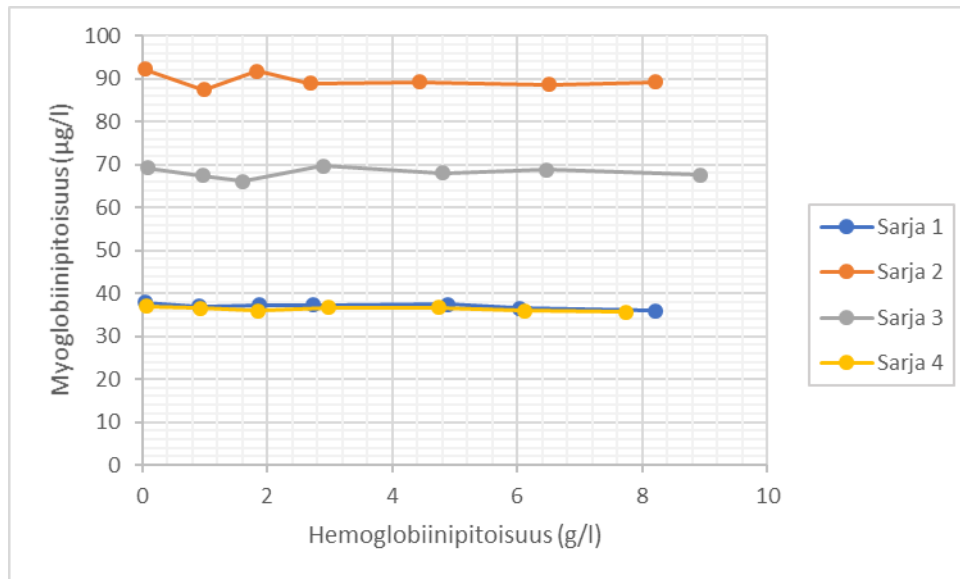
Taso	Hemoglobiinipitoisuus (g/l)	Hb-pitoisuus, laitteen tulos (g/l)	Hemolyysi-indeksi	Keskiarvo (µg/l)	Dahlbergin hajonta (s(d))	Dahlbergin CV%
Taso 0	0,06	0,04	0	59,1		
Taso 1	0,95	1,24	1–2	57,1	1,847	3,18
Taso 2	1,80	2,52	2–3	57,8	1,196	2,05
Taso 3	2,83	3,70	3	58,2	1,220	2,08
Taso 4	4,72	6,26	4	57,9	1,17	2,00
Taso 5	6,29	8,52	4–5	57,5	1,436	2,46
Taso 6	8,27	10,98	5–6	57,2	1,454	2,50

Kuviossa 40 on esitettyä myoglobiinin kuusi alinta variaatiokerrointa hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuvioon on piirretty punainen katkoviiva merkitsemään HUSLABin laatutavoitetta, joka myoglobiinimäärityksen sisäiselle variaatiokertoimelle on 4 %. Kuvion perusteella raja ei ylittänyt millään hemoglobiinipitoisuudella.



Kuvio 40. Myoglobiinin variaatiokertoimet. Variaatiokerroin ei ylittänyt myoglobiinille määritettyä 4 % laatutavoitetta (merkitty punaisella katkoviivalla) millään hemolyysitasolla. Hemoglobiinipitoisuudet on ilmoitettu Varian Cary® 100 Conc -spektrofotometrillä mitattuina.

Kuviossa 41 esitellään myoglobiinipitoisuudet hemoglobiinipitoisuuden funktiona. Kuviossa nähdään, että näytesarjojen 2 ja 3 pitoisuudet olivat selkeästi näytesarjojen 1 ja 4 pitoisuuksia suuremmat. Näytesarjan 2 pitoisuus oli korkeimmillaan tasolla 2, jonka jälkeen pitoisuus laski ja säilyi suhteellisen muuttumattomana hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Näytesarjan 3 pitoisuus oli korkeimmillaan tasolla 3, jonka jälkeen pitoisuus hieman laski ja säilyi tasaisena hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Näytesarjojen 1 ja 4 käyrät kulkevat kuvion asteikolla päällekkäin ja lähes vaakasuoraan, joten näytesarjojen tarkkaa pitoisuustasojen muutosta hemolyysitason kasvaessa oli vaikea arvioida. Näytesarjojen 1 ja 4 pitoisuuksien muutos oli lähes huomaamaton korkeilla hemolyysitasoilla verrattuna lähtötilanteen 0-tasoon.



Kuvio 41. Myoglobiinipitoisuudet sarjoissa 1–4.

Taulukossa 28 on esitettyä pitoisuuksien erot ja eroprosentit kahdella hemolyysitasolla 3 ja 6. Tasolla 3 hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin 2,83 g/l ja tasolla 6 keskimäärin 8,27 g/l. Pitoisuuden absoluuttinen muutos väheni näytesarjoissa hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa, mutta näytesarjan 3 absoluuttinen muutos kasvoi hieman tasolla 3 verrattuna 0-tasoon. Näytesarjojen eroprosentit olivat kuitenkin melko yhtäläisiä molemmilla tasoilla 3 ja 6, joten pitoisuustasolla ei ollut suoranaisesti vaikutusta hemolyysin aiheuttamaan häiriöön.

Taulukko 28. Myoglobiinipitoisuuden muutos referenssitason nähden näytesarjoissa 1–4. Esityskelpoisuuden takaamiseksi taulukossa on esitetty ainoastaan hemolyysitasot 3 ja 6.

Näytesarja	Pitoisuus 0-tasolla (µg/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 3 (µg/l)	Erotus 0-tasosta tasolla 6 (µg/l)	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 3	Eroprosentti 0-tasosta tasolla 6
Näytesarja 4	37,00	-0,35	-1,30	-1 %	-4 %
Näytesarja 1	37,95	-0,60	-1,95	-2 %	-5 %
Näytesarja 3	69,25	0,45	-1,65	1 %	-2 %
Näytesarja 2	92,30	-3,35	-2,95	-4 %	-3 %

Hemolyysillä oli häiritsevä vaikutus myoglobiinimääritykseen: hemoglobiinikonsentraation kasvaessa myoglobiinipitoisuus laski. Hemolyysin aiheuttama häiriö oli samaa luokkaa eri tasoissa näytesarjoissa, joissa oli eri myoglobiinipitoisuus. Tarkkaa hemolyysiindeksiä ja häiritsevää hemoglobiinipitoisuutta ei voitu osoittaa, sillä analyyttille määritetyn variaatiokertoimen yläraja ei ylittynyt millään hemolyysitasolla.

9 Pohdinta

Tulosten tarkastelussa opinnäytetyössä saatuja tuloksia reflektoidaan analyttikohtaisesti teoriaosuudessa esitettyihin tietoihin, sekä verrataan Siemens Healthineersin määrittämiin rajoihin. Johtopäätöksissä kiteytetään vastaukset opinnäytetyön tutkimuskysymyksiin. Opinnäytetyön eettisyyttä ja luotettavuutta pohdintaan omista kappaleistaan, jonka lisäksi tarkastellaan opinnäytetyöprosessin aikana syntyneitä kehittämisehdotuksia, sekä opinnäytetyön tekijöiden ammatillista kasvua.

9.1 Tulosten tarkastelu

Hemoglobiinipitoisuuksien ja hemolyysi-indeksien mittaustulokset loivat pohjan analyttikohtaiselle hemolyysihäiriön tarkastelulle. Tarkoituksena oli tuottaa hemolysaattilaimennossarjoihin näytteitä, joissa hemoglobiinipitoisuus on lähellä tavoitepitoisuutta ja kasvaa asteittain. Hemoglobiinipitoisuus mitattiin hemolysaatista eri laitteella kuin lopullisista näytteistä, joten laitekohtaiset erot voivat vaikuttaa lopputulokseen. Spektrofotometrillä mitattuina hemoglobiinitulokset jäivät yleisesti ottaen hieman alle tavoitellun pitoisuuden. Atellica® Solution -laitteen hemoglobiinitulokset taas olivat keskimäärin tavoitetasoja korkeammat. Näytteisiin saatiin kuitenkin kattavasti eri pitoisuuksia eri hemolyysi-indeksien alueilta.

Opinnäytetyössä havaitut hemolyysihäiriöt kuvaavat analyttistä interferenssiä, eli interferenssiä, joka aiheutuu verisolun komponenttien vapautumisesta näytteenoton jälkeen *in vitro* (Dolci – Panteghini 2014: 39). Pääsääntöisesti hemolyysin aiheuttama interferenssi opinnäytetyössä tutkituissa näytteissä johtui punasoluista vapautuneesta hemoglobiinista sekä muista intrasellulaarisista komponenteista (Lippi ym. 2012: 43). Hemoglobiinin lisäksi punasolut sisältävät erilaisia rakenneproteiineja, entsyymejä, lipidejä ja hiilihydraatteja, ja monet näistä komponenteista voivat reagoida tai kilpailla analyyseissä käytettävien reagenssien kanssa (Lippi ym. 2008: 766). Hemolyysistä aiheutui täten mi-

tattujen pitoisuuksien virheellinen nousu useimpien tutkittujen analytyttien kohdalla. Pitoisuus nousi ALAT-, ASAT-, CK- ja LD-entsyymien kohdalla. Myös laktaatti, NH_4^+ -ioni ja K^+ -ioni saivat kohonneita pitoisuuksia hemolyysistä johtuen. AFOS-entsyymiin kohdalla mitatut pitoisuudet laskivat virheellisen matalaksi hemolyysin aiheuttaman häiriövaikutuksen takia.

Opinnäytetyössä tutkimusnäytteiden ALAT-pitoisuudet nousivat virheellisen korkeiksi hemolyysin seurauksena. Näin oli erityisesti matalilla ALAT-pitoisuuksilla jo matalista hemoglobiinipitoisuuksista alkaen. Tämä selittyy sillä, että punasolut sisältävät 7-kertaisen ALAT-pitoisuuden plasmaan verrattuna (Sonntag 1986: 132), vaikka Esanin (2014: 17) mukaan punasolujen sisältämällä ALAT-entsyymillä ei ole häiritsevää vaikutusta mittaus tuloksiin. Myös korkeilla ALAT-pitoisuuksilla hemolyysillä oli selkeästi tuloksia nostava vaikutus. Korkea näytesarja jouduttiin kuitenkin jättämään pois lopullisesta tuloksesta, sillä matalilla hemoglobiinipitoisuuksilla tulokset vaihtelivat liikaa. Saatu hemoglobiinipitoisuuden raja onkin yleistettävissä matalille ALAT-tuloksille, joissa ALAT-pitoisuus on noin alle 50 U/l. Hemolyysin aiheuttama häiriö oli suhteellisesti pienempi korkeilla ALAT-pitoisuuksilla mataliin verrattuna, vaikka absoluuttinen mittausvirhe oli korkeilla pitoisuuksilla suurempi.

Tutkimusnäytteiden AFOS-pitoisuus laski hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, aiheuttaen virheellisen matalan hemoglobiinipitoisuuden hemolyysin seurauksena. Punasolut sisältävät noin 6-kertaisen AFOS-pitoisuuden plasmakonsentraatioon verrattuna, joten punasolujen hajoaminen nostaa plasman AFOS-pitoisuutta (Johnson-Davis 2013: 281; Sonntag 1986: 133). Lippin ym. (2008: 766) mukaan AFOS-entsyymi laimenisi punasolujen hajoamisen seurauksena, mutta mikäli punasolujen AFOS-pitoisuus on plasmaa korkeampi, tämä selitys ei tunnu uskottavalta. Lippin ym. (2006: 314) mukaan AFOS-entsyymien hemolyysihäiriö johtuu hemoglobiinin spektrisistä ominaisuuksista tai kemiallisista reaktioista hemolysaatin ja reaktiokomponenttien välillä. Tuloksen lasku selittyykin hemolyysissä punasoluista vapautuvilla Mg^{2+} - ja Zn^{2+} -ioneilla, joiden konsentraation kasvu plasmassa järkyttää mittausreaktion tarvitsemaa tasapainoa (Farah ym. 2012: 125, 127). Reaktio tarvitsee tietyn pitoisuuden näitä ioneja, ja niiden ylimäärä kääntää aktivaattorivaikutuksen inhibitoriseksi, jolloin tulos jää virheellisen matalaksi (Farah ym. 2012: 125, 127). Hemolyysi aiheutti suuremman häiriön matalilla AFOS-pitoisuuksilla kuin korkeilla pitoisuuksilla. AFOS-pitoisuustasolla oli selkeä vaikutus hemolyysin aiheuttamaan häiriöön sekä absoluuttisesti että prosentuaalisesti.

A-sarjan tutkimusnäytteiden NH_4^+ -ionipitoisuus nousi virheellisen korkeaksi hemoglobiini-konsentraation kasvaessa. Molemmissa näytesarjoissa A1 ja A2 pitoisuuden nousu oli tasaista. Punasolujen sisäinen NH_4^+ -ionipitoisuus on noin 2–3-kertainen plasmaan verrattuna, jolloin punasolujen hajotessa *in vitro* niistä vapautuvat NH_4^+ -ionit nostivat tutkimusnäytteiden pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Ammonia. 2017; Frank 2013: 258). Pitoisuustasolla oli merkitystä hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen: matalan tason näytesarjassa NH_4^+ -ionipitoisuus nousi enemmän hemolyysin aiheuttaman häiriövaikutuksen kasvaessa, kuin korkeamman tason näytesarjassa.

Tutkimusnäytteiden ASAT-pitoisuudet nousivat virheellisen korkeiksi hemolyysin seurauksena. Nousu oli tasaista ja lähes lineaarista hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Punasolujen sisältämä ASAT-pitoisuus on noin 40-kertainen plasmaan verrattuna (Sonntag 1986: 133). ASAT-pitoisuus nousikin ALAT-pitoisuutta voimakkaammin: kun entsyymiaktiivisuus oli 25 U/l, hemolyysitasolla 3 ALAT-pitoisuus nousi 10 % 0-tasoon verrattuna ja ASAT-pitoisuus nousi 115 %. Hemolyysi aiheutti eritasoiin näytteisiin yhtä suuren absoluuttisen muutoksen kunkin hemolyysitason sisällä. Siten muutos oli suhteellisesti suurempi matalilla pitoisuuksilla. Tutkimusnäytteen pitoisuustaso vaikutti siis siihen, kuinka suuren suhteellisen muutoksen hemolyysi aiheutti näytteessä.

Tutkimusnäytteiden CK-pitoisuus nousi virheellisen korkeaksi hemolyysin seurauksena. CK-pitoisuuden ollessa laitteen mittausalueen sisällä hemolyysin aiheuttama pitoisuuksien nousu oli voimakasta jo matalilla hemoglobiinipitoisuuksilla. Nousua tapahtui myös korkeimmalla pitoisuustasolla, mutta se oli lievempää. Pitoisuuden ylittäessä mittausalueen laite laimentaa näytettä automaattisesti. Laimennetuissa tuloksissa hemolyysin vaikutus voi vähentyä. Korkeimman näytesarjan tulokset olivat kuitenkin vaihtelevimpia, joten ei kenties ole viisasta luottaa laimentamisen vähentävän hemolyysin vaikutusta tasaisesti. Lopullisista tuloksista mittausalueen ylittävä näytesarja jätettiin kokonaan pois. Vaikka punasolut eivät sisällä CK-entsyymiä, niistä vapautuva adenylaattikinaasi ristireagoi mittausreaktiossa tuottamalla ATP:tä, joka nostaa virheellisesti CK-mittaustulosta (Johnson-Davis 2013: 275; Panteghini – Bais 2008: 318). Hemolyysin aiheuttamassa tuloksen vääristymässä ei siis kreatiini-kinaasin kohdalla ole kyse todellisesta pitoisuuden kasvusta, kuten monien muiden analyyttien kohdalla. Opinnäytetyössä ei ollut mahdollisuutta lisätä reaktioon adenosiinimonofosfaattia tai diadenosiinipentafosfaattia, joilla adenylaattikinaasin toimintaa voisi inhiboida (Koseoglu ym. 2011: 84). Hemolyysi aiheutti

suuremman häiriön matalilla CK-pitoisuuksilla kuin korkeilla pitoisuuksilla. CK-pitoisuustasolla oli siis vaikutusta hemolyysin aiheuttamaan häiriöön sekä absoluuttisesti että prosentuaalisesti.

Näytesarja L edusti opinnäytetyössä laktaattia. Tutkimusnäytteiden laktaattipitoisuus nousi virheellisen korkeaksi vasta suuremmilla hemolyysitasoilla, eli laktaattia voitiin pitää suhteellisen vakaana analyytinä hemolyysin aiheuttamalle häiriövaikutukselle ainakin matalammilla hemolyysitasoilla. Koska mittauksissa oli mukana vain yksi näytesarja, ei laktaatin pitoisuustason tarkkaa vaikutusta hemolyysin aiheuttamaan häiriöön voitu luotettavasti osoittaa. Laktaattipitoisuuden nousua selitti ainakin osittain menetelmää häiritsevä kemiallinen interferenssi (Lippi ym. 2012: 45). Punasoluista *in vitro* vapautuneiden hemoglobiinimolekyylien rauta-atomien peroksidaasiaktiivisuus reagoi substraattimenetelmässä käytetyn vetyperoksidin kanssa, jolloin mittausreaktio voimistui (Dolci – Panteghini 2013: 39). Tästä seurasi virheellisen korkea laktaattipitoisuus.

Tutkimusnäytteiden LD-pitoisuus nousi virheellisen korkeaksi hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. Kaikkien näytesarjojen kohdalla pitoisuus nousi jyrkästi ja lähestulkoon lineaarisesti hemolyysin aiheuttaman häiriövaikutuksen kasvaessa. Punasolujen sisäinen LD-pitoisuus on noin 100–150-kertainen plasmaan verrattuna, joten hemolyysissä punasoluista *in vitro* vapautunut LD-entsyymi aiheutti huomattavaa interferenssiä nostamalla tutkimusnäytteiden LD-pitoisuuden virheellisen korkeaksi (Johnson-Davis 2013: 277; Lactate Dehydrogenase. 2018). Punasolujen lisäksi myös verihitaleet sisältävät suurina pitoisuuksina LD-entsyymiä, jolloin häiriövaikutus kasvoi plasmanäytteistä analysoiduissa tuloksissa (Panteghini – Bais 2008: 322). Pitoisuustaso vaikutti hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen: hemolyysin aiheuttama häiriö oli lievempää suurilla LD-pitoisuuksilla, kuin matalilla LD-pitoisuuksilla.

Kalium valittiin edustamaan potentiometrisesti mitattavaa analyyttiä. Tutkimusnäytteiden K⁺-ionipitoisuus nousi virheellisen korkeaksi hemolyysin aiheuttaman häiriövaikutuksen takia. Pitoisuuden nousu oli lineaarista kaikkien näytesarjojen kohdalla, mutta absoluuttisesti näytteiden pitoisuus ei noussut paljoa. Toisaalta tutkimuksen viitealue on kapea, ja pienikin muutos voi siksi olla merkittävä. Punasolujen sisäinen K⁺-ionipitoisuus on noin 23-kertainen plasmaan verrattuna, joten hemolyysissä punasoluista *in vitro* vapautuneet K⁺-ionit aiheuttivat huomattavaa interferenssiä nostamalla tutkimusnäytteiden K⁺-ionipitoisuuden virheellisen korkeaksi (Delaney 2013: 1; Scott ym. 2008: 433). Pitoisuustason

vaikutusta hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen ei opinnäytetyössä voitu luotettavasti osoittaa, sillä näytesarjat edustivat lähes samaa K⁺-ionipitoisuustasoa.

CRP ja CK-MBm ovat tutkimuksia, joihin hemolyysillä ei pitäisi olla vaikutusta, ellei hemolyysi ole erittäin voimakasta (Roberts 2012: 2; Özcan ym. 2012: 382). Molemmat menetelmät perustuvat vasta-aineiden käyttöön ja hemolyysissä soluista vapautuvilla komponenteilla voi olla vaikutusta vasta-aine-antigeenireaktioihin (Lippi ym. 2012: 49).

Tutkimusnäytteiden CRP-tulokset laskivat hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, mutta lasku ei ollut kliinisesti merkittävää. CRP on akuutin faasin proteiini, jonka plasmapitoisuus nousee tulehduksissa nopeasti ja voimakkaasti (C-reaktiivinen proteiini, plasmasta. 2018). CRP-tuloksen suuruusluokalla on enemmän merkitystä kuin täsmällisellä pitoisuudella, minkä vuoksi sille voidaan sallia suurempaa vaihtelua hemolyysistä johtuen kuin muille analyyteille (Sneck 2019c). Hemolyysin vaikutus ei eronnut juurikaan opinnäytetyössä käytettyjen kahden pitoisuustason välillä.

Opinnäytetyön tulosten perusteella on mahdollista, että hemolyysi vaikuttaa merkittävästi CK-MBm-tutkimuksen tulokseen. Tutkimusnäytteiden pitoisuuksien keskiarvo oli korkeimmilla hemolyysitasoilla korkeampi kuin referenssitasolla. Tulosten perusteella ei kuitenkaan voitu tehdä luotettavaa johtopäätöstä siitä, milloin häiriövaikutus olisi merkittävää tulosten vaihtelevuuden takia. Myöskään siitä, poikkesiko häiriövaikutus eri pitoisuustasoilla, ei voitu tehdä päätelmiä.

Hemolyysille suhteellisen vakaata analyyttiä edusti haptoglobiini. Wan Azman ym. (2019: 95) esittivät, että *in vitro*-syntyisellä hemolyysillä ei olisi vaikutusta näytteen haptoglobiinipitoisuuteen, sillä punasolujen hajoamisen seurauksena muodostuneet haptoglobiini-hemoglobiinikompleksit eliminoituvat heti verenkierrosta RES-järjestelmän monosyyttien ja kudosten makrofagien toimesta. Shih ym. (2013: 445) olivat kuitenkin sitä mieltä, että näytteen haptoglobiinipitoisuus voi saada virheellisen matalan tuloksen preanalyttisten virhetekijöiden aiheuttaman *in vitro*-hemolyysin vaikutuksesta. Tämä tarkoittaisi sitä, että näyteputkessa *in vitro* hajoaneiden punasolujen hemoglobiini sitoutuisi näytteen haptoglobiiniin muodostaen komplekseja sen kanssa, jolloin näytteessä olevat monosyytit eliminoisivat ne. Tästä seuraisi näytteen haptoglobiinipitoisuuden lasku.

Opinnäytetyössä saaduissa tuloksissa haptoglobiinipitoisuus pääsääntöisesti laski hemoglobiinikonsentraation kasvaessa *in vitro*-hemolyysin seurauksena. Poikkeuksena oli

näytesarja 3, jossa oli lähtöasetelmassa näytesarjojen korkein haptoglobiinipitoisuus. Näytesarjan 3 osalta haptoglobiinipitoisuus ensin nousi hemolyysin vaikutuksesta, mutta laski suuremmilla hemoglobiinikonsentraatioilla ja tämän jälkeen säilyi suhteellisen muuttumattomana, vaikka hemolyysitaso kasvoi. Yhden korkean näytesarjan perusteella ei voitu luotettavasti osoittaa, oliko tulos todellinen vai esimerkiksi mittaustekninen virhe. Matalamman pitoisuuden näytesarjoissa haptoglobiinipitoisuudet laskivat hemoglobiinikonsentraation kasvaessa ja pitoisuudet säilyivät myös suhteellisen muuttumattomina korkeillakin hemolyysitasoilla verrattuna lähtötasoon. Tuloksista tehtiin kuitenkin yhteenvedo eroprosenttien perusteella, että haptoglobiinin pitoisuustasolla ei ollut juurikaan vaikutusta siihen, kuinka suuren häiriön hemolyysi aiheutti pitoisuuden mittauksessa.

Myoglobiini edusti hemolyysin suhteen stabiilia analyyttiä, johon hemolyysillä ei Özcanin ym. (2012: 384) mukaan ollut pitoisuutta häiritsevää vaikutusta. Opinnäytetyössä saaduissa tuloksissa myoglobiinipitoisuus laski näytesarjoissa hemolyysin aiheuttaman häiriön kasvaessa, mutta yksikään Dahlbergin variaatiokerroin ei ylittänyt myoglobiinille asetettua tavoitteellista variaatiokerrointa. Tällä perustelulla myoglobiinille ei opinnäytetyössä voitu tarkasti osoittaa häiritsevää hemoglobiinipitoisuutta ja siten verifioida hemolyysi-indeksiä. Siten opinnäytetyössä saadut tulokset eivät täysin puolla esitettyä argumenttia, sillä hemolyysi kuitenkin häiritsi mittaustuloksia, joskin häiriövaikutus jäi lieväksi. Pitoisuuden laskua saattoi selittää määrityksessä käytettyjen vasta-aineiden ristireagointi verisoluista vapautuneiden yhdisteiden kanssa (Lippi ym. 2012: 49). Tutkimusnäytteiden myoglobiinipitoisuudella ei ollut suurta vaikutusta hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen, sillä kaikissa tutkimusnäytteissä myoglobiinipitoisuus säilyi suhteellisen muuttumattomana, vaikka hemolyysitaso kasvoi.

Mittausteknisesti hemolyysi aiheutti spektrofotometrissä interferenssiä opinnäytetyössä tutkittujen analyyttien pitoisuuksiin. Hemoglobiinille ominaiset absorptiospektrit sijoittuvat aallonpituusalueille 340–440 nm ja 540–580 nm (Lippi ym. 2018: 434). Hemoglobiinille voidaan määrittää myös spesifit absorptiospektrin huiput, jotka esiintyvät aallonpituuksilla 415, 540 ja 575 nm. Hemolyysi aiheuttaa täten kasvua kyseisillä aallonpituuksilla mitattujen analyyttien pitoisuuksiin (Koseoglu ym. 2011: 83; Thomas 2002: 97). Hemolyysin aiheuttama spektrofotometrinen interferenssi on kutakuinkin lineaarista ja riippuvainen vapaan hemoglobiinin lopullisesta pitoisuudesta näytteessä (Lippi ym. 2012: 45).

Tutkittujen analyyttien kohdalla mitattiin fotometrisesti joko absorbanssin laskua tai kasvua, jolloin absorbanssin alenemis- tai kasvunopeus oli suoraan verrannollinen mitatun

analyytin pitoisuuteen näytteessä. Absorbanssin laskua mitattiin kahdella aallonpituudella ALAT-entsyymien (340/410 nm), NH_4^+ -ionin (340/694 nm) ja ASAT-entsyymien (340/410 nm) kohdalla (Alanine Aminotransferase. 2017; Ammonia. 2017; Aspartate Aminotransferase. 2017). Absorbanssin kasvua mitattiin kahdella aallonpituudella AFOS-entsyymien (410/478 nm), CK-entsyymien (340/596 nm), laktaatin (545/694 nm) ja LD-entsyymien (340/410 nm) kohdalla (Alkaline Phosphatase. 2018; Creatine Kinase. 2018; Lactate. 2017; Lactate Dehydrogenase. 2018). ALAT-, ASAT- ja LD-entsyymien kohdalla molemmat käytetyt aallonpituudet sijoittuivat aallonpituusalueille, joilla hemoglobiini absorboi voimakkaasti. AFOS- ja CK-entsyymien sekä laktaatin ja NH_4^+ -ionin kohdalla vain toinen käytetty aallonpituus sijoittui kyseisille aallonpituusalueille. Yhdenkään analyytin mittausaallonpituus ei osu hemoglobiinin absorptiohuippujen kohdalle, joten spektrofotometrisen interferenssin osuus hemolyysihäiriön synnyssä voi olla kaikkien analyyttien kohdalla melko vähäinen.

ALAT- ja ASAT-entsyymien mittausreaktiossa mitataan NADH:n hapettumista NAD^+ :ksi, jolloin absorbanssi alenee NADH:n absorptiohuippujen kohdalla (Alanine Aminotransferase. 2017; Aspartate Aminotransferase. 2017). Hemoglobiini absorboi merkittävästi kummallakin aallonpituusalueella. Hemoglobiini siten nostaa päätepistemittauksen absorbansseja, joten syntyy virheellisen vähäinen absorbanssin lasku. Tällöin mitatun entsyymiaktiivisuuden tulisi kasvaa hemoglobiinilisäyksen suhteessa. ALAT- ja ASAT-entsyymien pitoisuudet kasvoivat opinnäytetyössä hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, mutta tämä selittyy todennäköisemmin muilla hemolyysissä vaikuttavilla tekijöillä. NH_4^+ -ionin mittausreaktiossa mitataan vastaavasti NADPH:n absorbanssin laskua (Ammonia. 2017). Kahdesta mittausaallonpituudesta hemoglobiini absorboi merkittävästi vain toisella. Kahden mittausaallonpituuden käyttäminen voi vähentää hemoglobiinin aiheuttamaa interferenssiä (Sonntag 1986: 137). Myös NH_4^+ -ionin pitoisuudet kasvoivat hemoglobiinikonsentraation kasvaessa.

LD-entsyymien mittausreaktiossa mitataan puolestaan NADH:n muodostumista, jolloin absorbanssi kasvaa sen absorptiohuippujen kohdalla (Lactate Dehydrogenase. 2018). Mittauksissa käytettävät aallonpituudet olivat siten samat kuin ALAT- ja ASAT-entsyymien mittauksissa. CK-entsyymien määrityksessä mitataan NADPH:n määrän kasvua lähes samoilla aallonpituuksilla kuin NH_4^+ -ionin mittausreaktiossa (Creatine Kinase. 2018). Molemmissa mittauksissa hemoglobiinin absorbanssin tulisi mittausaallonpituuksilla kasvattaa loppumittauksen absorbanssia ja siten kasvattaa mittaustulosta. LD- ja CK-entsyymien tapauksessa entsyymien pitoisuudet kasvoivat näytteissä hemoglobiinipitoisuuden

kasvaessa, mutta pitoisuuden voimakas nousu selittyi myös muilla tekijöillä. CK-entsyymin kohdalla vain toinen mittausaallonpituus oli hemoglobiinin absorptioalueella, joten pelkän spektrofotometrisen interferenssin vaikutus tulokseen voi olla melko vähäinen.

Myös AFOS-entsyymin ja laktaatin mittauksissa mitataan absorbanssin kasvua kahdella aallonpituudella värillisen reaktiotuotteen avulla (Alkaline Phosphatase. 2018; Lactate. 2017). Myös näiden kohdalla spektrofotometrisen interferenssin tulisi nostaa mitattavan analyytin pitoisuutta. Opinnäytetyössä laktaatin pitoisuus nousi hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa. AFOS-pitoisuus kuitenkin laski tutkimusnäytteissä hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa, joten tämän on selityttävä muilla hemolysissä vaikuttavilla tekijöillä kuin spektrofotometrisellä interferenssillä.

Näytteen sameudesta johtuvaa valon voimakkuuden vähenemistä mitattiin spektrofotometrisesti C-reaktiivisen proteiinin ja haptoglobiinin kohdalla. Voimakkuus korreloi tutkitun analyytin pitoisuuteen näytteessä. (DiaSys 2004: 2.) C-reaktiivista proteiinia mitattiin yhdellä aallonpituudella (571 nm) ja haptoglobiinia kahdella aallonpituudella (340/694 nm) (CRP. 2017; Haptoglobiini. 2017). C-reaktiivisen proteiinin kohdalla molemmat käytetyt aallonpituudet ja haptoglobiinin toinen käytetty aallonpituus sijoittuivat hemoglobiinin kanssa samoille aallonpituusalueille.

CRP-määrittämisessä näytekyvetin läpäisevän valon intensiteetti mitataan kerran reagenssin lisäyksen jälkeen (CRP. 2017). Hemoglobiinin absorptio kyseisellä aallonpituudella voi siten vähentää mitattavan valon intensiteettiä ja nostaa CRP-tulosta. Opinnäytetyössä CRP-tulokset kuitenkin laskivat lievästi hemoglobiinin määrän kasvaessa. CRP-tulokset olivat molemmissa näytesarjoissa suhteellisen korkeita. Näytteen epätavallisen korkea CRP-pitoisuus voi saada määrittämisessä aikaan hook-vaikutuksen, jolloin mitattu tulos jää virheellisen alhaiseksi. Hook-vaikutus on kuitenkin relevanttia vain, jos näytteen CRP-pitoisuus on yli 1180 mg/l. (CRP. 2017.) Täten hook-efektin vaikutus CRP-määrittämiseen ei tuntunut sopivalta vaihtoehdolta pitoisuuden laskun kannalta. Jää siten epäselväksi, mikä aiheutti CRP-pitoisuuden laskun tutkimusnäytteissä. Jos punasolujen sisäinen CRP-pitoisuus on matala, voi kyse olla laimenemisvaikutuksesta punasolujen sisällön vapautuessa riittävässä määrin. Tämä selittäisi CRP-pitoisuuden laskun hitauden.

Myös haptoglobiinituloksen kohdalla on mahdollista, että hemoglobiinin absorptio vaikutti tulokseen toisella mittausaallonpituudella. Haptoglobiinin kohdalla vaikutus on kuitenkin melko merkityksetön, sillä menetelmä käyttää kahden mittausaallonpituuden lisäksi

kahta mittauspistettä, ennen ja jälkeen reagenssin lisäämisen (Haptoglobin. 2017). Menetelmä ottaa tällöin huomioon ainoastaan absorbanssissa tapahtuneen muutoksen. Tätä kutsutaan näytenollaukseksi, joka on yksi keino vähentää hemolyysin vaikutusta tulokseen (Sonntag 1986: 137).

Taulukossa 29 on esitetty opinnäytetyössä tuotetut hemoglobiinipitoisuuksien rajat Atellica® Solution -laitteella mitattuina pitoisuuksina, sekä niitä vastaavina hemolyysi-indekseinä. Taulukossa tuotetut rajat on esitetty rinnakkain Siemens Healthineersin (2019) ehdottamien rajojen kanssa. Taulukkoon on myös koottu hemolyysin aiheuttaman muutoksen suunta kullekin analyytillle. ASAT-entsyymille, CK-MB-alyksikölle, haptoglobiinille, LD-entsyymille, myoglobiinille ja NH_4^+ -ionille ei ollut valmiiksi ehdotettua rajaa, joten niiden osalta opinnäytetyössä saatiin täysin uutta tietoa. Valmiita rajoja ei myöskään ole määritetty laitteen antamien tarkkojen pitoisuuksien mukaisesti, vaan hemolyysi-indeksien perusteella. Koska tietyn hemolyysi-indeksin pitoisuusalue on laaja, voi hylätyiksi joutua paljon sellaisia näytteitä, joihin hemolyysi ei todellisuudessa vaikuta merkittävästi.

Taulukko 29. Siemens Healthineersin Atellica® Solution -laitteelle ehdottamien hemolyysi-indeksirajojen vertailu opinnäytetyössä tuotettuihin rajoihin. Hemoglobiinipitoisuuden raja on esitetty laitteen antamana tuloksena, minkä lisäksi on esitetty kyseistä tulosta vastaava hemolyysi-indeksi. Hemolyysin aiheuttaman muutoksen suuntaa havainnollistetaan nuolella ylös (pitoisuus kasvoi) tai alas (pitoisuus laski).

Analyytti	Analyytin pitoisuuden muutos	Siemens Healthineersin (2019) ehdotettava hemolyysi-indeksin raja	Hemoglobiinipitoisuus (g/l), jolla analyyttille määritelty variaatio-kertoimen laatuavoite ylittyi	Hemoglobiinipitoisuutta vastaava hemolyysi-indeksi
AFOS	↓	6	1,5	2
ALAT	↑	2	1,4	2
ASAT	↑	-	0,45	1
CK	↑	1	0,65	1
CK-MB	↑	-	-	-
CRP	↓	5	-	ei häiritse
Haptoglobiini	↓	-	0,2	1
Kalium	↑	1	0,15	1
Laktaatti	↑	3	4,0	3
LD	↑	-	0,0	0
Myoglobiini	-	-	-	ei häiritse
Ammoniumioni	↑	-	0,35	1

Taulukosta 29 nähdään, että niiden analyyttien osalta, joille oli olemassa valmiiksi ehdotettu raja, opinnäytetyössä määritetty raja vastasi suurelta osin ehdotettua. AFOS-entsyymien kohdalla ehdotettujen rajojen mukaan hemolyysi ei juurikaan vaikuttaisi AFOS-tulokseen. Opinnäytetyössä häiriö alkoi kuitenkin olla merkittävää, kun hemoglobiinipitoisuus ylitti 1,5 g/l, mikä vastaa hemolyysi-indeksiä 2, kun ehdotettu raja olisi 6. Ehdotetun rajan kohdalla on kenties käytetty toisenlaista kriteeriä, ja on mahdollista, että AFOS-entsyymille voitaisi sallia hieman suurempikin poikkeama. Näin voi olla myös muiden analyyttien kohdalla, sillä työssä rajoiksi saadut hemoglobiinipitoisuudet ovat kauttaaltaan hyvin matalat, vaikka tarkoituksena oli tuottaa rajat siten, että kiinni jäisi mahdollisimman vähän näytteitä.

Laktaattidehydrogenaasin variaatiokerroin ylitti laatutavoitteen jo hemoglobiinipitoisuuden ollessa 0,0 g/l. Vaikka laite mittaakin myös negatiivisia hemoglobiinipitoisuuksia, ei tällaisen rajan käyttäminen ole automaatiolaboratoriossa mahdollista, sillä lähes kaikki tulokset jäisivät kiinni. LD-entsyymien tulokselle on sallittava suurempi vaihtelu ja käytettävä toisella tapaa määritettyä hemolyysirajaa. Samoin kaliumille, haptoglobiinille, NH_4^+ -ionille ja ASAT-entsyymille määritetyt rajat ovat hyvin matalat, alle 0,5 g/l. LD-, kalium- ja haptoglobiiniarvot muuttuvat merkittävästi jo ennen kuin hemolyysi on silmännähdessä havaittavissa punaisena värinä (Lippi ym. 2009: 935; World Health Organization 2002: 13). Voi olla tarpeen sallia näille analyyteille suurempi vaihtelu, jotta rajat olisivat todellisessa tilanteessa käyttökelpoiset.

Koska taulukossa ilmaistulla hemolyysi-indeksillä näytteeseen vasta alkaa tulla kliinisesti merkittävää muutosta hemolyysin seurauksena, voi olla myös perusteltua asettaa laitteelle autovalidointikriteeriksi yhtä korkeampi hemolyysi-indeksi. Tällöin suurin osa opinnäytetyössä tuotetuista rajoista jättäisi kiinni vähemmän näytteitä, kuin Siemens Healthineersin ehdottamat rajat. Thomaksen (2002: 95–96) mukaan hemolysoitumattomassa näytteessä hemoglobiinipitoisuuden ylärajana pidetään 0,2 g/l plasmassa. Vaikka hemolyysiä ei olisi visuaalisesti havaittavissa, intrasellulaaristen komponenttien vapautuminen plasmaan tai seerumiin on mahdollista ja jo pelkästään verihiutaleiden tai valkosolujen hajoaminen voi vaikuttaa laboratoriotutkimustuloksiin (Lippi ym. 2006: 312; Lippi ym. 2009: 935; Thomas 2002: 95–96.) Siksi minkään raja-arvon valinnalla ei voida täysin poissulkea hemolyysin vaikutusta.

Opinnäytetyössä hemolyysin aiheuttaman häiriön kliinisen merkitsevyyden arvioinnissa käytettiin HUSLABin laatutavoitteita rinnakkaismittausten väliselle, sisäiselle variaatio-kertoimelle. Laatutavoitteet olivat analyyttikohtaisia ja ne vaihtelivat välillä 1–6 %. Yleinen laatutavoite on 10 % ja sitä voidaan soveltaa sellaiselle analyyttille, jonka suuruusluokalla on tarkkaa pitoisuutta enemmän merkitystä kliinisessä päätöksenteossa (Sneck 2019c). Tätä rajaa käytettiin opinnäytetyössä CRP-tutkimukselle. Koska osa analyyteistä antoi käytetyllä raja-arvolla hyvin matalia rajoja hemoglobiinipitoisuudelle, voi olla tarpeen soveltaa muihinkin tutkimuksiin korkeampaa rajaa. Laatutavoitteita voidaan myös päivittää uusien menetelmien myötä.

9.2 Johtopäätökset

Hemolyysi ei aiheuttanut kliinisesti merkitsevää poikkeamaa myoglobiini- ja CRP-tuloksiin, kun hemoglobiinipitoisuus oli keskimäärin alle 8,30 g/l spektrofotometrillä mitattuna ja Atellica® Solution -laitteen tuloksena keskimäärin alle 11,0 g/l. ALAT-, ASAT-, NH_4^+ -ioni-, kalium-, CK-, laktaatti- ja LD-tuloksiin hemolyysi aiheutti kliinisesti merkitsevän nousun. AFOS- ja haptoglobiinitulokset taas laskivat virheellisen mataliksi hemolyysin seurauksena.

LD-entsyymi oli opinnäytetyössä hemolyysille herkin analyytti. Hemolyysin aiheuttama LD-pitoisuuden kasvu oli merkittävää jo laitteen mittaaman hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,0 g/l. Tasolla 1 LD-pitoisuus kasvoi hemolyysin vaikutuksesta keskimäärin 51 %. Hemolyysi nosti merkittävästi kaliumpitoisuutta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,15 g/l, ammoniumionipitoisuutta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,35 g/l, ASAT-pitoisuutta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,45 g/l ja CK-pitoisuutta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,65 g/l. Nämä analyytit olivat erittäin herkkiä hemolyysille. Tasolla 1 näiden analyyttien pitoisuudet kasvoivat hemolyysin vaikutuksesta noin 6–22 %. ALAT-pitoisuutta hemolyysi nosti merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 1,4 g/l ja laktaattipitoisuutta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 4,0 g/l. Tasolla 1 ALAT-pitoisuus nousi keskimäärin 1,7 % ja laktaattipitoisuus 1,3 %.

Haptoglobiinitulos laski merkittävästi hemolyysin vaikutuksesta hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 0,2 g/l laitteen mittaamana tuloksena. AFOS-pitoisuus laski merkittävästi hemoglobiinipitoisuuden ollessa yli 1,5 g/l. Tasolla 1 haptoglobiinipitoisuus laski keskimäärin 9 % ja AFOS-pitoisuus keskimäärin 3 %.

Haptoglobiini-, CRP- ja myoglobiinitutkimuksissa analyytin pitoisuustasolla ei ollut vaikutusta hemolyysin aiheuttaman häiriön suuruuteen. Myoglobiinin kohdalla tulos pysyi melko muuttumattomana kaikilla pitoisuustasoilla. Myös CRP-pitoisuuteen hemolyysillä oli erittäin vähän vaikutusta. ALAT-, AFOS-, ASAT-, CK- ja LD-tutkimuksissa hemolyysi aiheutti suhteellisesti suuremman muutoksen matalilla analyyttipitoisuuksilla korkeisiin verrattuna. AFOS- ja CK-tutkimuksissa hemolyysin aiheuttama häiriö oli myös absoluuttisesti suurempi matalilla analyyttipitoisuuksilla. ALAT-tutkimuksessa absoluuttinen erotus referenssitason verrattuna oli korkeissa näytesarjoissa suurempi kuin matalissa, mutta prosentuaalinen ero jäi siitä huolimatta alemmaksi. Ammoniumionin, ASAT-ent-

syymin, LD-entsyymien kohdalla hemolyysi aiheutti eri tasoissa näytesarjoissa yhtäläisen absoluuttisen muutoksen, ja siten prosentuaalinen muutos oli matalan tason näytteissä suurempi. ASAT- ja LD-näytteiden pitoisuudet kasvoivat moninkertaisiksi hemolyysin vaikutuksesta.

Laktaattitutkimuksessa oli mukana vain yksi näytesarja, joten laktaatin pitoisuustason vaikutusta hemolyysihäiriön suuruuteen ei voitu todeta. Samoin kaliumin kohdalla kaikki näytesarjat olivat pitoisuudeltaan samaa luokkaa, joten tulkintaa ei voitu tehdä luotettavasti. CK-MBm-tutkimuksen tulokset olivat niin vaihtelevia, että sen osalta vastauksia tutkimuskysymyksiin ei saatu lainkaan.

9.3 Eettisyys

Opinnäytetyön eri vaiheissa noudatettiin tutkimusetiikan näkökulmasta hyvää tieteellistä käytäntöä: opinnäytetyön suunnittelu-, toteutus- ja raportointivaiheessa sekä tulosten tallentamisessa, esittämisessä ja arvioinnissa toimittiin rehellisesti, huolellisesti ja tarkasti. Käytetyt tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmät olivat tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisesti kestäviä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012: 6.)

Kaikkea opinnäytetyön toteutusvaiheen aikana tutkittavaa biologista näytemateriaalia käsiteltiin näytteen luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen, sekä salassapitovelvollisuutta noudattaen. Tietosuojasta ja tietoturvasta huolehdittiin koko opinnäytetyöprosessin ajan (Arene 2018: 4). Näytemateriaalina käytettiin vanhentuneita, hävitettäväksi joutuvia potilasnäytteitä, joista potilastulokset oli jo analysoitu. Näytteitä käsiteltiin nimettöminä sekä niistä poistettiin potilaiden tunnistamiseen johtavat tiedot. Tehtäviä laboratoriotutkimuksia varten hankittiin vain niiden suorittamisen kannalta välttämätön tieto. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017: 2–3.)

Tulokset esitettiin avoimesti ja vastuullisesti, kuten tieteellisen tiedon luonteeseen kuuluu. Tulokset esitettiin sellaisenaan eikä niitä anastettu, tekaistu tai tarkoituksellisesti muokattu tai esitetty siten, että havaintoihin perustuneet tulokset olisivat vääristyneet. Aikaisempiin julkaisuihin ja kirjallisuuteen viittaaminen tapahtui asianmukaisella tavalla alkuperäisiä tekijöitä kunnioittaen. Opinnäytetyö tarkistettiin suunnittelu- ja raportointivaiheiden aikana Turnitin-plagiaatintunnistusjärjestelmässä. Opinnäytetyön suunnittelu-, toteutus- ja raportointivaiheiden aikana syntyneet tietoaineistot tallennettiin tieteelliselle

tiedolle asetettujen vaatimusten mukaisesti. (Arene 2018: 1; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012: 6, 8–9.)

Opinnäytetyön toteutusta varten haettiin tutkimuslupa yhteistyöorganisaatiolta HUSilta, jonka määritelmän mukaan tieteellinen tutkimus perustuu tutkimussuunnitelmaan, noudattaa hyviä tieteellisiä käytäntöjä ja tuottaa julkaistavaksi tarkoitettuja tuloksia (HUS 2019a). Tutkimuslupa myönnettiin HUSLABiin ajalle 1. elokuuta–31. joulukuuta 2019 ja lupa saatiin 11. huhtikuuta 2019. Tutkimuslupa myönnettiin sillä edellytyksellä, että opinnäytetyön tekijät toimittavat opinnäytetyön valmistuttua raportin tutkimusluvun myöntäjälle. Myöskään esteitä opinnäytetyön julkistamiselle avoimeen Theseus-julkaisuarkistoon ei ollut, sillä opinnäytetyöhön ei sisällytetty lain mukaan salassa pidettäviä tietoja eikä yhteistyöorganisaatiota koskevia liike- tai ammattisalaisuuksia. Tutkimusluvun ohella työn toimeksiantajan kanssa laadittiin kirjallinen sopimus, jossa määriteltiin opinnäytetyötä koskevat oikeudet, aikataulut, tekijyyttä koskevat periaatteet, vastuut ja velvollisuudet sekä aineistojen säilyttämistä ja käyttöoikeuksia koskevat seikat. (Arene 2018: 6, 8, 12; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012: 6.) Opinnäytetyön aikana syntyneet aineistot ja materiaalit, sekä valmis opinnäytetyön raportti luovutettiin työn toimeksiantajan käyttöön opinnäytetyöprosessin päätyttyä.

9.4 Luotettavuus

Määrällisen tutkimuksen luotettavuutta arvioidaan tarkastelemalla tutkimuksen validiteettia eli pätevyyttä ja reliabiliteettia eli luotettavuutta. Validiteetti ja reliabiliteetti muodostavat yhdessä tutkimuksen kokonaisluotettavuuden, jota arvioidaan käytettävissä olevien tietojen perusteella. Validiteetilla tarkoitetaan tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä on tarkoituskin mitata. Validiteetin arvioinnissa kiinnitetään huomiota siihen, kuinka hyvin tutkimusote ja siinä käytetyt menetelmät vastaavat tutkittavaa ilmiötä. (Heikkilä 2014: 177–178; Hiltunen 2009: 3; Vilkkä 2015: 193–194.)

Opinnäytetyössä hemolyysin vaikutuksen toteamisessa käytettiin Dahlbergin menetelmää, joka on tarkoitettu sarjan sisäisen variaation tarkasteluun. Tämä tarkastelunäkökulma sopi myös hemolyysin aiheuttaman mittausvirheen arviointiin, sillä hemolyysille haluttiin sellaiset rajat, ettei sen aiheuttama muutos ylittäisi rinnakkaistuloksille muutenkin sallittua vaihtelua. Tällä menetelmällä voitiin siis luotettavasti osoittaa, milloin hemolyysin aiheuttama muutos ylitti normaalille variaatiolle asetetun rajan.

Hemolysaattilaimennossarjojen valmistuksessa otettiin huomioon se, että näytteet laimenivat hemolysaattia lisättäessä ja hemolysaattiin pyrittiin saamaan mahdollisimman vähän vierasta plasmaa, joka voisi vaikuttaa tulokseen. Näytteiden mittaustulokset vastasivat mahdollisimman luotettavasti hemolyysin vaikutusta, jota näytteissä tapahtuu punasolujen hajotessa.

Lippi (2012: 352) suosittelee käyttämään kokoverta pestyjen punasolujen sijaan hemolysaatin valmistuksessa, sillä myös valkosolujen ja verihiutaleiden hajotessa vapautuvalla solunsisällöllä voi olla vaikutusta hemolyysin aiheuttamissa häiriöissä. Punasolujen hajoaminen on tehokasta, kun niitä pakastaa -10°C – -40°C :n lämpötilassa 30 minuutin ajan, mutta valkosolujen ja verihiutaleiden hajoaminen vaatii pidemmän ajan tai alhaisemman lämpötilan (Lippi 2012: 352–353). Opinnäytetyössä ei käytetty kokoverta, vaan pelkkää punasoluosaa, mutta käytettiin pakastusta -80°C :n lämpötilassa 15 tunnin ajan. Jos näytteistä ei olisi poistettu buffy coat -kerrosta, olisi hemolysaatissa myös valkosoluista ja verihiutaleista vapautunutta sisältöä, mikä kuvaisi vielä paremmin todellista hemolyysiä. Lippin (2012: 352–353) mukaan hemolysaatin punasolujen pitäisi kuitenkin olla täysin hajonneita.

Analyytin pitoisuustason vaikutus hemolyysihäiriöön voitiin luotettavasti osoittaa vertailemalla erotuksia ja eroprosentteja. Samoja tuloksia pääteltiin myös analyyttien kuvaajista, jolloin menetelmälle saatiin kaksoisvarmistus.

Reliabiliteetilla tarkoitetaan tulosten tarkkuutta ja pysyvyyttä, eli mittauksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia ja mittaustulosten toistettavuutta. Luotettavuuden edellytyksenä on tutkimuksen teko tutkimukselle asetettujen kriteerien mukaisesti (Heikkilä 2014: 176). Sisäinen reliabiliteetti varmistetaan mittaamalla sama tilastoyksikkö useampaan kertaan. Kun mittaukset ovat toistettavissa myös muissa tutkimuksissa, tutkimus on ulkoisesti reliabeli. Luotettavuutta arvioidaan tilastollisilla menettelytavoilla (Hirsjärvi 2009: 231). (Heikkilä 2014: 178; Vilka 2015: 194.)

Opinnäytetyössä kaikki analyytit mitattiin kaikista näytteistä kahtena rinnakkaisena mittauksena. Näin voitiin osoittaa, että tutkimuksen lähtökohdat ovat kunnossa; että menetelmän sisäinen variaatio on riittävän hyvällä tasolla, jotta tutkimus voidaan tehdä. Jos rinnakkaismittaukset poikkesivat liikaa toisistaan, valittiin tutkimukseen joko luotettavimpana pidetty tulos tai tulosten keskiarvo. Kaikki työn vaiheet raportoitiin selkeästi, joten koejärjestely on toistettavissa samanlaisena.

Opinnäytetyöstä saadut tulokset ovat yleistettävissä vain niille pitoisuusväleille, joita työssä käytettiin. Jos tuloksia jätettiin pois, se huomioitiin tulosten tulkinnassa. Myös kokonaistulokseen vaikuttavia epäluotettavia näytetuloksia jätettiin pois, jotta saataisi luotettava tulos muiden näytteiden osalta. Analysaattorin antamiin poikkeaviin tuloksiin reagoitiin tai niitä kommentoitiin luotettavuuteen vaikuttavana seikkana.

Kaikista näytteistä ei saatu luotettavia tuloksia opinnäytetyötä varten. Monista näytteistä saatiin kahden rinnakkaisen tuloksen sijaan vain yksi tulos. Lisäksi laitteen tekemät automaattilaimennokset häiritsivät tulosten analysointia. Kaksi näytettä, näytesarjan 4 näytteet 4-5 ja 4-6 loppuivat kesken analysoinnin aikana, minkä takia nämä näytteet jouduttiin valmistamaan uudelleen hemoglobiinin mittausta varten. Näistä näytteistä mitatut hemoglobiinipitoisuudet voivat poiketa niiden näytteiden pitoisuuksista, joista analyysit on tehty, vaikka uudelleen valmistus pyrittiin toteuttamaan täsmälleen samoin kuin ensimmäinen. Hemolysaatin mittauksessa käytettiin eri analysaattoria kuin lopullisten näytteiden mittauksessa, mikä saattoi vaikuttaa siihen, ettei lopullisissa tuloksissa päästy täysin tavoiteltuihin hemoglobiinipitoisuuksiin.

Opinnäytetyöstä saatiin järkeviä ja loogisia tuloksia muutamasta luotettavuutta vähentävästä seikasta huolimatta. Nämä tulokset ovat hyödynnettävissä laboratorioissa, jota varten ne on tuotettu. Työskentelyn ja dokumentoinnin tarkkuudella ja huolellisuudella pyrittiin välttämään satunnaisvirheiden syntymistä sekä varmistettiin, että tulokset esitettiin sellaisina kuin ne ovat.

9.5 Kehittämisehdotukset

Opinnäytetyön suunnitteluvaiheessa ei ollut vielä riittävän suurta käsitystä siitä, mitä työssä tulee tapahtumaan. Suunnitteluvaiheessa yhtenä tutkimuskysymyksenä oli, miten hemolysin vaikutusta voidaan vähentää esimerkiksi laimentamalla. Kysymykseen haettiin vastausta kirjallisuudesta ja löydetyistä tiedosta on maininta työn teoriapohjassa. Koejärjestelyyn ei kuitenkaan aikataulusyistä suunniteltu sellaista osaa, joka mahdollistaisi johtopäätösten tekemisen siitä, parantaako laimentaminen hemolyyttisen näytteen tuloksen luotettavuutta. Siispä kysymys päädyttiin lopulta poistamaan opinnäytetyöstä.

Menetelmän selektiivisyyttä voidaan tutkia lisäämällä näytematriisiin systemaattisen virheen aiheuttamaa taustatekijää standardinlisäyssarjana. Tämän jälkeen selektiivisyyttä

tarkastellaan laimennossarjojen lineaarisuuden avulla. (Hägg 2016: 29.) Opinnäytetyössä ei tehty laimennossarjoja näytteistä, joihin hemolysaattia lisättiin. Näin toimien olisi voitu tehdä johtopäätöksiä menetelmän selektiivisyydestä ja siitä, voiko laimentamalla saada luotettavampia tuloksia hemolyyttisestä näytteestä. Jatkotutkimuksena selektiivisyyskoe olisi hyvä tehdä.

Ongelmallista opinnäytetyön tulosten tulkinnassa oli se, että hemolyyttiset tasot kattoivat huonosti matalia hemolysitasoja. Hemolysitasojen tulisi kattaa kaikki hemolyyssi-indeksit välillä 0–6. Eri laitteilta saatiin erilaisia hemolyyssi-indeksin tuloksia, minkä vuoksi tämä toteutui työssä vain osittain. Matalien tasojen lisääminen parantaisi raja-arvon määrittämisen luotettavuutta niille analyyteille, joilla hemolyyssi vaikuttaa merkittävästi jo matalilla hemoglobiinipitoisuuksilla. Lisäksi tulisi olla tarkemmin tiedossa laitteen tarvitsema näytteen hukkatilavuus ja varautua siihen, että analyysejä joudutaan toistamaan useampaan kertaan. Joidenkin näytteiden kohdalla näytemäärä osoittautui turhan niukaksi ja tämä saattaa olla syynä siihen, että joistakin näytteistä ei saatu kahta rinnakkaista tulosta.

Opinnäytetyössä ei saatu kunnollisia tuloksia CK-MB-tutkimuksesta. Rinnakkaismittausten välillä oli suuria eroja. Jatkotutkimusehdotuksena on CK-MB-tutkimuksen verifiointin tarkastaminen ja testin toistaminen tämän jälkeen tarvittaessa uudelleen. On mahdollista, että hemolyyssi vaikuttaa merkitsevästi tuloksiin, ja tämä olisi hyvä vielä osoittaa luotettavasti.

Haptoglobiinin kohdalla korkeasta näytesarjasta saadut tulokset ensin nousivat matalilla hemoglobiinipitoisuuksilla ja sen jälkeen laskivat korkeammilla tasoilla. Koska tulosten analysoinnista jätettiin kokonaan pois toinen korkeamman pitoisuuden omaava näytesarja 4, on haastavaa sanoa vain yhden korkean näytesarjan perusteella, kuinka korkea haptoglobiinipitoisuus todellisuudessa käyttäytyy hemolysin vaikutuksesta. Kannattavin vaihtoehto olisi luoda kokonaan uusi koeasetelma, jossa olisi käytössä vain korkean haptoglobiinipitoisuuden omaavia näytteitä. Näin voitaisiin luotettavasti osoittaa, kuinka hemolyyssi vaikuttaa korkeisiin haptoglobiinipitoisuuksiin.

Kaliumin ja laktaatin osalta opinnäytetyössä ei saatu tarpeeksi luotettavia vastauksia siihen, kuinka kyseisten analyyttien pitoisuustaso vaikutti hemolysin aiheuttaman häiriön suuruuteen. Jatkotutkimusehdotuksena näistä analyyteistä kannattaisi valmistaa mahdollisimman laajaskaalaiset näytesarjat, jotka kattaisivat analyyttien pitoisuuksia sekä

matalilla että korkeilla tasoilla. Tällöin voitaisi osoittaa, onko pitoisuustasolla vaikutusta siihen, kuinka suuren häiriön hemolyysi aiheuttaa pitoisuuden mittauksessa.

9.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön tekeminen sujui hyvin. Opinnäytetyön tekijöiden välinen työnjako toimi ja kumpikin pääsi hyödyntämään omia vahvuuksiaan ja kehittymään paremmaksi epävarmemmilla osa-alueilla.

Opinnäytetyön prosessissa opinnäytetyön tekijät kehittyivät ison kokonaisuuden hallinnassa ja aiheen rajaamisessa. Jokaisen tapaamisen jälkeen kokonaisuus selkiytyi paremmin. Ohjaustapaamisissa ja seminaarissa opinnäytetyötä opittiin sanoittamaan ja oma asiantuntijuus aiheesta syveni. Aiheen rajaus kehittyi lopulliseen muotoonsa analyyttejä valitessa. Suunnitteluvaiheessa kyse oli muutamasta analyytistä, ja tutkimuskysymyksiä oli enemmän. Analyyttejä valikoitui kuitenkin lopulta enemmän. Työskentelyn aikataulutus onnistui kohtuullisesti, joskin työskentelypäivät olivat pitkät ja tekemistä oli paljon. Tulosten käsittelyyn kului paljon aikaa, mutta kahden tekijän resurssit riittivät työn tekemiseen aikataulussa.

Opinnäytetyön aiheen kautta syventyminen tutkittaviin analyytteihin sekä hemolyysiin ja sen syihin on syventänyt omaa osaamista ja tuonut lisää valmiuksia parantaa analyysien laatua omassa työssä. Tiedon kerääminen on valaissut entistä paremmin preanalytiikan merkitystä ja lisännyt motivaatiota myös näytteenottotyön tekemiseen. Aiheeseen perehtyminen paransi tiedonhaun taitoja ja lähdekriittisyyttä. Aihetta on tutkittu jo hyvin kauan ja lähteiksi valikoitui uudempien tutkimusten ohella myös varhaisia tutkimuksia, joista oli osattava tunnistaa, mikä tieto on säilynyt muuttumattomana tähän päivään.

Opinnäytetyön tutkimusosuutta suunnitellessa ja toteuttaessa opinnäytetyön tekijät saivat käytännön kokemusta tutkimuksen tekemisestä. Asiantuntijuus kehittyi huomatessa, mitä asioita tulee ottaa huomioon koejärjestelyssä, jotta saadut tulokset kertovat luotettavasti tutkittavasta ilmiöstä. Rutiininomaisen analytiikan järjestely vaatii valtavan määrän valmistelua ennen kuin päästään potilastulosten analysointivaiheeseen. Opinnäytetyön tekijöille on ollut hienoa päästä seuraamaan ja olemaan osana tätä prosessia. Kokemus on lisännyt kiinnostusta ja arvostusta analysointoreilla tehtäviä tutkimuksia kohtaan.

Lähteet

Alaniiniaminotransferaasi, plasmasta. 2019. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.2.2019. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1024.html>>. Luettu 8.6.2019.

Alanine Aminotransferase. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097638. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-06.

Alkaline Phosphatase. 2018. Siemens Healthineers. REF 11097600. Menetelmäohje. 2., tarkistettu painos, 2018-05.

Alkalinen fosfataasi, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.10.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4587.html>>. Luettu 4.6.2019.

A-LYTE Integrated Multisensor. 2018. Siemens Healthineers. REF 11099315. Menetelmäohje. 2., tarkistettu painos, 2018-06.

Ammonia. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097529. Menetelmäohje. 2., tarkistettu painos, 2017-05.

Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.10.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1071.html>>. Luettu 26.6.2019.

Andersen, Lars W. – Mackenhauer, Julie – Roberts, Jonathan C. – Berg, Katherine M. – Cocchi, Michael N. – Donnino, Michael W. 2014. Etiology and Therapeutic Approach to Elevated Lactate Levels. Mayo Clinic Proceedings 88 (10). 1127–1140.

Arene 2018. Opinnäytetyöprosessin eettiset suositukset - muistilista opiskelijalle ja ohjaajalle. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.tenk.fi/fi/muut-ohjeet-ja-suositukset>>.

Aspartaattiaminotransferaasi, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.10.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4591.html>>. Luettu 29.5.2019.

Aspartate Aminotransferase. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097639. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-06.

Carraro, Paolo – Servidio, Giuseppe – Plebani, Mario 2000. Hemolyzed Specimens: A Reason for Rejection or a Clinical Challenge? Clinical Chemistry 46 (2). 306–307.

CD Creative Diagnostics® 2019. Chemiluminescence Immunoassay Guide. Verkkodokumentti. <<https://www.creative-diagnostics.com/Chemiluminescence-Immunoassay-guide.htm>>. Luettu 1.7.2019.

C-reaktiivinen proteiini, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4594.html>>. Luettu 23.7.2019.

Creatine Kinase. 2018. Siemens Healthineers. REF 11097640. Menetelmäohje. 2., tarkistettu painos, 2018-02.

Creatine Kinase MB. 2017. Siemens Healthineers. REF 10995531. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-06.

CRP. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097631. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-05.

Delaney, Hannah 2013. Potassium (serum, plasma, blood). The Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/AMALC.aspx>>.

DiaSys 2004. Immunoturbidimetric Tests. Verkkodokumentti. <<https://www.diasys-diagnostics.com/products/reagents/immunoturbidimetry/>>. Luettu 25.7.2019.

D’Orazio, Paul – Meyerhoff, Mark E. 2008. Electrochemistry and Chemical Sensors. Teoksessa Burtis, Carl A. – Ashwood, Edward R. – Bruns, David E. – Sawyer, Barbara G. (toim.): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6., painos. St. Louis: Saunders Elsevier. 84–101.

Dolci, Alberto – Panteghini, Mauro 2014. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Clinica Chimica Acta 432. 38–43.

Drees, Julia C. – Petrie, Matthew S. – Wu, Alan H.B. 2013. Analytic Techniques. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 100–121.

Ehder, Tapio (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. MIKES Julkaisu J6/2005. Helsinki: Mittatekniikan keskus. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.mikes.fi/julkaisut/>>.

Ehrmeyer, Sharon S. – Ancy, John J. 2013. Blood Gases, pH, and Buffer Systems. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 375–394.

Esani, Muneza A. 2014. The Physiological Sources of, Clinical Significance of, and Laboratory-Testing Methods for Determining Enzyme Levels. Laboratory Medicine 45 (1). 16–18.

EQAnord 2014. Nordic Hemolysis Project 2014. Effects of hemoglobin on some common serum analysis. The Nordic cooperation in External Quality Assurance.

- Farah, Husni S. – Al-Atoom, Ali A. – Shehab, Gaber M. 2012. Explanation of the Decrease in Alkaline phosphatase (ALP) Activity in Hemolysed Blood Samples from the Clinical Point of View: In vitro study. *Jordan Journal of Biological Sciences* 5 (2). 125–128.
- Favresse, Julien – Despas, Noémie – Boland, Lidvine – Gruson, Damien – Laterre, Pierre-Françoise – Nassogne, Marie-Cécile – Vincent, Marie-Françoise – Fillée, Catherine 2017. Preanalytics of ammonia: stability, transport and temperature of centrifugation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 56 (3). 65–68.
- Frank, Elizabeth L. 2013. Nonprotein Nitrogen Compounds. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): *Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations*. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 246–261.
- Ferrier, Denise R. 2017. *Biochemistry: Lippincott's illustrated reviews*. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gifford, Jessica L. – Nguyen, William N.T. – de Koning, Lawrence – Seiden-Long, Isolde 2018. Stabilizing specimens for routine ammonia testing in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 478. 37–43.
- Gossman, William – Foris, Lisa A. – Richards, John R. 2019. Serum Myoglobin. StatPearls Publishing LLC. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2019. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470441/>>. Luettu 11.7.2019.
- Guder, Walter Georg 1986. Haemolysis as an Influence and Interference Factor in Clinical Chemistry. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 24 (2). 125–126.
- Gupta, Shilpi – Ahern, Kathleen – Nakhl, Fadi – Forte, Frank 2011. Clinical Usefulness of Haptoglobin Levels to Evaluate Hemolysis in Recently Transfused Patients. *Advances in Hematology* 2011. 1–4.
- Halonen, Toivo 2004. Menetelmäperiaatteet ja kliinisen kemian tutkimukset: Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1., painos. Helsinki: WSOY. 66–76.
- Haptoglobini. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097643. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-05.
- Haptoglobiini, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/20476.html>>. Luettu 22.8.2019.
- Hartmann, Alfred E. 2000. Nitrogen Metabolites and Renal Function. Teoksessa McClatchey, Kenneth D. – Alkan, Serhan – Hackel, Emanuel (toim.): *Clinical Laboratory Medicine*. 2., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 378–391.

Harwell, George A. 2013. Electrolytes. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 346–374.

Hashim, Ibrahim A. – Cuthbert, Jennifer A. 2014. Elevated ammonia concentrations: Potential for pre-analytical and analytical contributing factors. *Clinical Biochemistry* 47. 233–236.

Hawke, Louise 2012. Ammonia (plasma, blood). The Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/AMALC.aspx>>.

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

Higgins, Chris 2018. Pseudohyperkalemia. Acute Care Testing. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.9.2018. <<https://acutecaretesting.org/en/articles/pseudohyperkalemia>>. Luettu 2.7.2019.

Hiltunen, Leena 2009. Validiteetti ja reliabiliteetti. Jyväskylän yliopisto. Saatavilla myös sähköisesti <http://www.mit.jyu.fi/ope/kurssit/Graduryhma/PDFt/validius_ja_reliabiliteetti.pdf>.

Hiltunen, Erkki – Linko, Linnéa – Hemminki, Sari – Hägg, Margareta – Järvenpää, Eila – Saarinen, Pertti – Simonen, Seppo – Kärhä, Petri (toim.) 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. MIKES Julkaisu J4/2011. Espoo: Mittatekniikan keskus. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.mikes.fi/julkaisut>>.

Hirsjärvi, Sirkka 2009. Tutkimusprosessi: Tutkimuksen reliabiliteetti ja validiteetti. Teoksessa Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula: Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi. 231–233.

HUS 2019a. Tutkimusluvan hakeminen. HUS, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://www.hus.fi/tutkijalle/tutkimuslupa/Sivut/default.aspx>>. Luettu 12.2.2019.

HUS 2019b. Valtuusto päätti HUS Diagnostiikkakeskuksen perustamisesta. HUS, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 13.6.2019. <<https://www.hus.fi/hus-tietoa/ uutishuone/Sivut/Valtuusto-p%C3%A4%C3%A4tti-HUS-Diagnostiikkakeskuksen-perustamisesta.aspx>>. Luettu 26.6.2019.

Hägg, Margareta (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. VTT Technology 276. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>>.

Immunochemical Techniques. 2017. National Institute of Open Schooling. Verkkodokumentti. <<https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/Biochemistry/Lesson-24.pdf>>. Luettu 13.9.2019.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Johnson-Davis, Kamisha L. 2013. Enzymes. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations. 7. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 262–291.

Kalium, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1999.html>>. Luettu 12.6.2019.

Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri 2015. Tutkimus hoitotieteessä. 3.–4. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Kardalas, Efstratios – Paschou, Stavroula A. – Anagnostis, Panagiotis – Muscogiuri, Giovanna – Siasos, Gerasimos – Vryonidou, Andromachi 2018. Hypokalemia: a clinical update. Endocrine Connections 7 (4). 135–146.

Keil, Deborah E. 2013. Amino Acids and Proteins. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 202–245.

Koseoglu, Mehmet – Hur, Aysel – Atay, Aysenur – Çuhadar, Serap 2011. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. Biochemia Medica 21 (1). 79–85.

Kratz, Alexander – Lee-Lewandrowski, Elizabeth – Lewandrowski, Kent B. 2000. The Plasma Proteins. Teoksessa McClatchey, Kenneth D. – Alkan, Serhan – Hackel, Emanuel (toim.): Clinical Laboratory Medicine. 2., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 263–280.

Kreatiinikinaasi, MB-alayksikkö, massa, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4525.html>>. Luettu 1.7.2019.

Kreatiinikinaasi, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4517.html>>. Luettu 2.6.2019.

Lactate. 2017. Siemens Healthineers. REF 11097614. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-05.

Lactate Dehydrogenase. 2018. Siemens Healthineers. REF 11097594. Menetelmäohje. 3., tarkistettu painos, 2018-11.

Laktaatti, plasmasta, paastotilassa. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/2184.html>>. Luettu 10.9.2019.

Laktaattidehydrogenaasi, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.6.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4526.html>>. Luettu 29.5.2019.

Lawrence, Louann W. – Broussard, Larry A. 2013. Porphyrins and Hemoglobin. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): *Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations*. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 415–435.

Lee-Lewandrowski, Elizabeth – Burnett, Robert W. – Lewandrowski, Kent. 2000. Electrolytes and Acid-Base Balance. Teoksessa McClatchey, Kenneth D. – Alkan, Serhan – Hackel, Emanuel (toim.): *Clinical Laboratory Medicine*. 2., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 347–365.

Liew, Soo Chin 2001. Electromagnetic Waves. Centre for Remote Imaging, Sensing & Processing. Verkkodokumentti. Päivitetty 16.12.2003. <<https://crisp.nus.edu.sg/~research/tutorial/em.htm>>. Luettu 15.2.2019.

Lippi, Giuseppe 2012. Interference Studies: Focus on Blood Cell Lysates Preparation and Testing. *Clinical Laboratory* 58 (3–4). 351–355.

Lippi, Giuseppe 2015. Systematic Assessment of the Hemolysis Index: Pros and Cons. *Advances in Clinical Chemistry* 71. 157–170.

Lippi, Giuseppe – Blanckaert, Norbert – Bonini, Pierangelo – Green, Sol – Kitchen, Steve – Palicka, Vladimir – Vassault, Anne J. – Plebani, Mario 2008. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46 (6). 764–772.

Lippi, Giuseppe – Cadamuro, Janne – von Meyer, Alexander – Simundic, Ana-Maria 2018. Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. Julkaistu yhteistyössä the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM):n Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE):n kanssa. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 56 (5). 1–10.

Lippi, Giuseppe – Cervellin, Gianfranco – Favaloro, Emmanuel J. – Plebani, Mario 2012. In Vitro and In Vivo Hemolysis. An Unresolved Dispute in Laboratory Medicine. Teoksessa Sonntag, Oswald – Plebani, Mario (toim.): *Patient Safety*. Volume 4. 1., painos. Berliini: De Gruyter. 1–110.

Lippi, Giuseppe – Favaloro, Emmanuel J. – Franchini, Massimo 2018. Haemolysis index for the screening of intravascular haemolysis: a novel diagnostic opportunity? *Blood Transfusion* 16 (5). 433–437.

Lippi, Giuseppe – Plebani, Mario 2012. Continuous-Flow Automation and Hemolysis Index: A Crucial Combination. *Journal of Laboratory Automation* 18 (2). 184–188.

Lippi, Giuseppe – Salvagno, Gian Luca – Blanckaert, Norbert – Giavarina, Davide – Green, Sol – Kitchen, Steve – Palicka, Vladimir – Vassault, Anne J. – Plebani, Mario

2009. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47 (8). 934–939.

Lippi, Giuseppe – Salvagno, Gian Luca – Montagnana, Martina – Brocco, Giorgio – Guidi, Gian Cesare 2006. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 44 (3). 311–316.

Marshall, William 2013a. Alanine aminotransferase (serum, plasma). The Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/AMALC.aspx>>.

Marshall, William 2013b. Aspartate aminotransferase (serum, plasma). The Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/AMALC.aspx>>.

McCudden, Christopher R. – Willis, Monte S. *Circulating Tumor Markers: Basic Concepts and Clinical Applications*. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): *Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations*. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 664–679.

Moore, Robert E. 2000. *Immunochemical Methods*. Teoksessa McClatchey, Kenneth D. – Alkan, Serhan – Hackel, Emanuel (toim.): *Clinical Laboratory Medicine*. 2., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 241–262.

Myoglobin. 2017. Siemens Healthineers. REF 10995649. Menetelmäohje. 1., tarkistettu painos, 2017-09.

Myoglobiini, plasmasta. 2018. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. Päivitetty 10.7.2018. <<https://huslab.fi/ohjekirja/4602.html>>. Luettu 11.7.2019.

Nikolac, Nora – Omazic, Jelena – Simundic, Ana-Maria 2014. The evidence based practice for optimal sample quality for ammonia measurement. *Clinical Biochemistry* 47. 991–995.

Nummenmaa, Lauri – Holopainen, Martti – Pulkkinen, Pekka 2014. *Tilastollisten menetelmien perusteet*. 1., painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Opetushallitus 2010. *Potentiometria. Laboratorioanalyysit*. Verkkodokumentti. Päivitetty 27.3.2010. <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_6-2_potentiometria.html>. Luettu 18.6.2019.

Panteghini, Mauro – Bais, Renze 2008. *Enzymes*. Teoksessa Burtis, Carl A. – Ashwood, Edward R. – Bruns, David E. – Sawyer, Barbara G. (toim.): *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6., painos. St. Louis: Saunders Elsevier. 317–336.

Rifai, Nader – Warnick, Russell – Remaley, Alan T. 2018. Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. Teoksessa Burtis, Carl A. – Ashwood, Edward R. – Bruns, David E. – Sawyer, Barbara G. (toim.): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6., painos. St. Louis: Saunders Elsevier. 402–430.

Roberts, Brona 2012. C-reactive protein (serum, plasma). The Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.acb.org.uk/whatwedo/science/AMALC.aspx>>.

Salmenkivi, Kaisa 2018. HUSLAB 2010–2018. HUS:n tulosityksiköiden esitysmateriaalit. Saatavilla myös sähköisesti <https://www.hus.fi/hus-tietoa/materiaalipankki/esitysmateriaalit/hus_2010-2018/tulosityksikot/Sivut/default.aspx>.

Scott, Mitchell G. – LeGrys, Vicky A. – Klutts, J. Stacey 2008. Electrolytes and Blood Gases. Teoksessa Burtis, Carl A. – Ashwood, Edward R. – Bruns, David E. – Sawyer, Barbara G. (toim.): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6., painos. St. Louis: Saunders Elsevier. 431–449.

Sharma, Ujjawal – Pal, Deeksha – Prasad, Rajendra 2014. Alkaline Phosphatase: An Overview. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 29 (3). 269–278.

Shih, Andrew W.Y. – McFarlane, Andrew – Verhovsek, Madeleine 2013. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. American Journal of Hematology 89 (4). 443–447.

Siemens Healthineers 2019. HIL-Guide. HIL Alert and Worklist Results Flags. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 11419890, Rev. A, 2019-4. 1–7.

Sneck, Mia 2019a. Sairaalakemisti. HUSLAB, Meilahden automaatiolaboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 30.1.

Sneck, Mia 2019b. Sairaalakemisti. HUSLAB, Meilahden automaatiolaboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 18.6.

Sneck, Mia 2019c. Sairaalakemisti. HUSLAB, Meilahden automaatiolaboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 28.9.

Sneck, Mia 2019d. Sairaalakemisti. HUSLAB, Meilahden automaatiolaboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 26.10.

Sonntag, Oswald 1986. Haemolysis as an Interference Factor in Clinical Chemistry. Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry 24 (2). 127–139.

Springate, S.D. 2012. The effect of sample size and bias on the reliability of estimates of error: a comparative study of Dahlberg's formula. European Journal of Orthodontics 34. 158–163.

Sproston, Nicola R. – Ashworth, Jason J. Role of C-Reactive Protein at Sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology* 9. 1–11.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalytikko/bioanalyytikon-koulutus/bioanalyytikon-lupaus-ja-eettise/>>.

SYNCHRON® Systems 2011. Potassium. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.8.2011. <<http://labmed.ucsf.edu/labmanual/db/resource/proc-K.pdf>>. Luettu 18.6.2019.

Thomas, Laura 2002. Haemolysis as influence & interference factor. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 13 (4). 95–98.

Tiensuu, Sampo 2000. Bioluminesenssi: Elävän valon salaperäinen maailma. Seepia. Verkkodokumentti. <<https://www.seepia.org/pdf/seepia3/bioluminesenssi.pdf>>. Luettu 1.7.2019.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.tenk.fi/fi/tenkin-ohjeistot>>.

Vilka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.

Vilka, Hanna 2015. Tutki ja kehitä. 4., uudistettu painos. Jyväskylä: PS-kustannus.

Wan Azman, Wan Norlina – Omar, Julia – Koon, Tan Say – Tuan Ismail, Tuan Salwani 2019. Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman Medical Journal* 34 (2). 94–98.

Wikimedia Commons 2010. Hemoglobin Extinction. Verkkodokumentti. Päivitetty 3.3.2010. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hemoglobin_extinction.png>. Luettu 27.2.2019.

World Health Organization 2002. Diagnostic Imaging and Laboratory Technology. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Geneve: World Health Organization.

Wu, Alan H.B. 2013. Immunochemical Techniques. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): *Clinical chemistry. Techniques, principles, correlations*. 7., painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 160–177.

Åkerman, Kari – Jokela, Hannu 2014. Laboratorion perusmenetelmät: Fotometria. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): *Laboratoriolääketeiede – kliininen kemia ja hematologia*. 3.–4. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 54–58.

Åkerman, Kari – Jokela, Hannu 2010. Laboratorion perusmenetelmät: Entsymaattiset menetelmät. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. 3., uudistettu painos. 67–70.

Özcan, Oğuzhan – Karakaş, Alparslan – Yücel, Doğan 2012. Effects of hemolysis on the assays of serum CK, CK-MB activities and CK-MB (mass), troponin and myoglobin measurements. Turkish Journal of Biochemistry 37 (4). 375–385.