



Milka Tiljander, Tiia Mäkelä

ALAT- entsyyminäytteen säilyvyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

6.4.2022

Tekijä	Milka Tiljander, Tiia Mäkelä
Otsikko	ALAT- entsyyminäytteen säilyvyys
Sivumäärä	27 sivua + 1 liitettä
Aika	6.4.2022
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava Erikoistuva kemisti Pipsa Kulovesi
<p>Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on entsyymi, joka liittyy maksasolujen sisällä olevien entsyymien aineenvaihduntaan. Maksasolujen lisäksi entsyymiä esiintyy pieninä pitoisuuksina myös muissa kudoksissa kuten lihakset, keuhkot, sydän ja munuaiset. Maksavauriossa ALAT-entsyymit vapautuvat vaurioituneista maksasoluista verenkiertoon ja aiheuttaa aktiivisuuden nousun, joka voidaan mitata veren plasmasta. Tutkimusta käytetään ensisijaisesti maksasoluvaurion tai -tulehduksen diagnostiikassa.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) entsyymien säilyvyys pakkasessa -20°C ja -70°C eripituisia säilytysaikoja sekä verrata saatuja tuloksia toisiinsa.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin määrällistä eli kvantitatiivista tutkimusmenetelmää, jolla saatiin numeraalista tietoa tuloksista eri säilytysajoista sekä säilytyslämpötilojen vaikutuksesta ALAT-pitoisuuteen. Tilastointiohjelmia hyödyntäen tutkimustulokset tallennettiin ja niitä pystyttiin vertailemaan. Tuloksista pystyttiin havainnoimaan kuinka eroavaisuus tuli esille -20°C ja -70°C olevien näytteiden säilytyksessä.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin kokonaisuudessaan HUS diagnostiikkakeskuksen Meilahden automaatiolaboratoriossa. Opinnäytetyötä varten kerättiin HUS Helsingin ja Uudenmaan yliopistollisen sairaalan potilaista otettuja ylijäämäplasmanäytteitä litium-hepariiniputkiin. Otokseen valittiin korkeita sekä matalia ALAT-arvoja sisältäviä näytteitä, jotta tuloksia voitiin vertailla laajalla tulosasteikolla. Tutkimukseen kerättiin 62 ylijäämänäytettä, joista saatiin yhdistettyä 31 kappaletta eri tasoltaan olevia pooleja.</p>	
Avainsanat	Alaniiniaminotransferaasi (ALAT)

Author	Milka Tiljander, Tiia Mäkelä
Title	ALAT enzyme sample shelf-life
Number of Pages	27 pages + 1 appendices
Date	6 April 2022
Degree	Biomedical Laboratory Scientist
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Lecturer Pipsa Kulovesi, Specializing Clinical Chemist
<p>Alamine transaminase (ALAT) is an enzyme, which connects to the enzymes inside liver cells metabolism. In Addition to liver cells these enzymes are also present in small quantities in other tissues such as muscles, lungs, heart, and kidneys. In Liver damage ALAT-enzymes are released by damaged liver cells into blood circulation which can be measured in blood plasm. This project can be used primarily in liver cell damage or infection diagnosis.</p> <p>The purpose of this thesis is to find out whether the ALAT enzyme shelf-life while stored frozen at -20°C and -70°C differ from each other at different time points.</p> <p>Quantitative research method was used in this, in which numerical data on the results of different storage times and the effect of storage temperatures on the ALAT-quantity was obtained. Using statistical programs, the study results were saved, and they could be compared. The results were able to detect, how the difference emerged at -20°C and -70°C during sample storage</p> <p>The thesis was completed in its entirety at the Meilahti automation laboratory of the HUS diagnostic center. Surplus plasma samples taken into lithium heparin tubes were used for this study. 62 surplus samples were collected of which 31 pools of different levels were combined.</p>	
Keywords	Alamine transaminase (ALAT)

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Alaniiniaminotransferaasi-entsyymi (ALAT)	2
2.1	Näyte ALAT-entsyymin määrittämiseen	2
2.2	Määrittäminen	3
2.3	Viitealueet	4
3	Näytteen säilytys	5
4	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	7
5	Opinnäytetyön menetelmät	7
5.1	Menetelmälliset lähtökohdat	7
5.2	Aineiston keruu	7
5.3	Näytteiden analysointi	9
5.4	Aineiston analysointimenetelmät	10
6	Tulokset	10
6.1	Normaalilla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys	10
6.2	Korkealla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys	13
6.3	Erittäin korkealla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys.	15
6.4	Eroprosentin keskiarvo	18
7	Pohdinta	19
7.1	Tulosten tarkastelu	19
7.2	Eettisyys	21
7.3	Luotettavuus	22
7.4	Johtopäätökset	23
7.5	Kehittämissuhteet ja ammatillinen kasvu	23
	Lähteet	25

Liitteet

Liite 1. Tulokset

1 Johdanto

Terveydenhuollon rakenteelliset muutokset Suomessa ovat johtaneet myös laboratorio-toiminnan yhdistymiseen alueellisiksi keskuksiksi erillisten laboratorioyksiköiden sijaan. Yhdistämisellä haetaan säästöjä automaation, toiminnan ja massatuotannon tehostamisella ja kapasiteetin käytön parantamisella. Julkiset toimijat haluavat luoda isoja toimijoita kustannus syiden lisäksi vastatakseen kansainvälisten yhtiöiden luomaan kustannuspaineeseen. (Schönberg 2019.) Keskuslaboratoriot kuljettavat näytteitä pitkiä matkoja jopa Keski-Eurooppaan saakka. Suuri osa laboratorionäytteistä kestää hyvin kuljetamista ja sen aiheuttamaa viivettä analyysin aloittamisessa. Näytteiden kuljetukseen kuluva aika on vain osa ajasta, joka kuluu näytteenotosta analysointiin. Tärkeä osa ketjussa on myös aika, joka kuluu ennen kuin näyte lähtee kuljetukseen sekä kuinka nopeasti se analysoidaan keskuslaboratoriossa. (Aalto 2019.)

Kuljetuksen lisäksi näytteitä säilytetään erilaisiin tarkoituksiin. Säilytys voi olla lyhyt- tai pitkäkestoista. Laboratorio seuraa näytteiden säilytykseen sekä kuljetukseen ja sitä kautta näytteen tulostasoon vaikuttavia tärkeitä tekijöitä, kuten kuluva kuljetukseen aika ja kuljetus- ja säilytysolosuhteet kuten esimerkiksi lämpötila. Tutkimustiede kehittyy koko ajan uusien teknologioiden ja uusien standardien myötä. Usein näytteet kerätään ja niitä säilytetään pitkän ajan ennen käyttöä. Biopankkiin kerättyjä näytteitä käytetään mm. terveydenhuollon laadun parantamiseen ja viiterajojen rakentamiseen. (Grankvist & Gomez & Nybo & Lima-Oliveira & Von Meyer 2018; Tuck ym. 2010.)

Eri lämpötilojen vaikutusta säilyvyyteen on tehty monia tutkimuksia. Tutkimuksista saatu tieto ja tulokset alaniiniaminotransferaasi (ALAT) entsyymien säilyvyydestä ovat osittain ristiriitaisia. (Shimizu & Ichihara 2019.) Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää alaniiniaminotransferaasi (ALAT) entsyymien säilyvyys pakkasessa -20°C ja -70°C eripituisia säilytysaikoja sekä verrata saatuja tuloksia toisiinsa. Tutkimustulosten raportointi perustuu EFML (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) antamiin suosituksiin laboratorioiden ulkoiselle laadunarvioinnille. ALAT-mittauksien väliseksi eroiksi EFML suosittaa 10,1 % rajaa. (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)).

Tutkimus keskittyy ALAT-pitoisuuteen litium-hepariiniplasmassa, koska tutkimuksen tiilajana toimiva Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri HUSLAB käyttää tutkimusmateriaalina plasmaa eikä seerumia.

2 Alaniiniaminotransferaasi-entsyymi (ALAT)

Alaniiniaminotransferaasi (ALAT) on entsyymi, joka liittyy maksasolujen sisällä olevien entsyymien aineenvaihduntaan. Maksasolujen lisäksi entsyymiä esiintyy myös pieninä pitoisuuksina myös muissa kudoksissa kuten lihakset, keuhkot, sydän ja munuaiset. ALAT aktiivisuus maksasoluissa on noin 3000 kertaa korkeampi kuin veren seerumin ALAT aktiivisuus. (Liu & Que & Xu & Peng 2014.) Maksavauriossa ALAT-entsyymit vapautuvat vaurioituneista maksasoluista verenkiertoon ja aiheuttaa aktiivisuuden nousun, joka voidaan mitata veren plasmasta tai seerumista. Tutkimusta käytetään ensisijaisesti maksasoluvaurion tai -tulehduksen diagnostiikassa. (Alaniiniaminotransferaasi (P-ALAT). 2021.) Yleisiä syitä ALAT-pitoisuuden nousuun ovat lihavuus ja siitä johtuva rasvamaksa sekä jatkuva runsas alkoholin käyttö. Hepatiittivirukset voivat myös nostaa veren ALAT-pitoisuutta taudin eri vaiheissa. ALAT-pitoisuus voi nousta myös ilman maksavauriota. Nousun voi aiheuttaa esimerkiksi verenmyrkytys, keuhkoinfarkti, lihassairaudet, sydämen tai munuaisten vajaatoiminta. (Nykopp 2015.)

ALAT-pitoisuuden määrittäminen kuuluu sairaanhoidossa useimpiin rutiininomaisesti otettaviin laboratoriotutkimuksiin. Esimerkiksi Helsingin ja Uudenmaan Sairaanhoidopiirin laboratorio HUSLAB:ssa tehdään vuosittain noin 650 000 ALAT-määrittystä. (Jokelainen 2016.) Aikaisemmin laboratoriotutkimuksissa materiaalina käytettiin lähinnä veren seerumia, mutta nykyään automaation myötä tutkimuksista suurin osa määritetään plasmasta, koska se soveltuu muun muassa paremmin automaatiolaitteiden väylästöihin (Tapola 2004: 25; Veritutkimukset ja veren aineosat 2022).

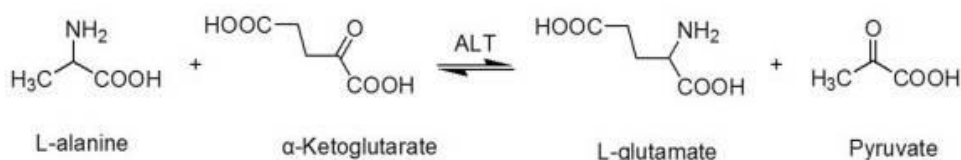
2.1 Näyte ALAT-entsyymin määrittämiseen

ALAT-entsyymin pitoisuus voidaan määrittää veren seerumista tai plasmasta (Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc)). Yleisesti laboratorioden käyttämä tutkimusmateriaali ALAT-entsyymin määrittämiseksi on litium-hepariiniplasma (Huslab ohjekirja 2021). Veren tilavuudesta 55 % on plasmaa. Plasma on veren nestemäinen osa ilman verisoluja (punasolut, valkosolut ja trombosyytit). Plasmasta sisältää 90 % vettä ja loppu 10 % mm. happea, hiilidioksidia, hormoneita, kuona-aineita ja plasmaproteiineja kuten fibrinogeeniä eli hyytymistekijöitä kun taas seerumissa ei ole verisolujen lisäksi hyytymistekijöitä (Mathew & Sankar & Varacallo 2021; Veri. Peda oppimateriaalit). Plasmanäyte otetaan ja sekoitetaan putkessa, joka sisältää antikoagulanttia eli hyytymisenestoainetta, joka ALAT-entsyymin määrittämiseksi on litiumhepariini. Näyteputki tulee täyttää näytteenotossa tarpeeksi täyteen ja sekoittaa hyvin, jotta veren ja antikoagulantin suhde on optimaalinen. (Tuck ym. 2010.)

Plasman hyötyjä seerumiin nähden on hyytymisen aiheuttamien häiriöiden ehkäisy sekä analyysiajan säästö. Plasmanäyte voidaan sentrifugoida eli erottaa verisolut plasmasta heti näytteenoton jälkeen, kun taas seeruminäytteen hyytymiselle tulee antaa 30–60 minuuttia aikaa ennen sentrifugointia. Seeruminäytteissä, joiden hyytymisenesto on huono, voi hyytymien muodostuminen jatkua sentrifugoinnin jälkeen tai riittämätön hyytymän muodostuminen fibriinijäännöksillä voi tukkia näytteenottopipetin. (Tuck ym. 2010).

2.2 Määritysmenetelmä

ALAT on entsyymi, joka koostuu 496 aminohaposta. ALAT-entsyymi katalysoi aminoryhmien siirtymistä L-alaniinista α -ketoglutaattiin. Tästä aineenvaihduntareaktiosta syntyy lopputuotteena L-glutamaattia ja pyruvaattia (Kuvio 1). Reaktiossa tarvitaan koentsyyminä pyridoksaalifosfaattia. (Liu & Que & Xu & Peng 2014.)



Kuvio 1. ALAT-entsyymin katalysoima aminohappoaineenvaihduntareaktio (Liu & Que & Xu & Peng 2014).

ALAT-entsyymin aktiivisuutta mitataan plasmasta entsyymiaktiivisuus määrittämisellä. Entsyymi reagoi aina tietyn rakenteen omaavan substraatin kanssa. Substraattia pitää olla suuri määrä, jotta reaktiossa voidaan mitata entsyymin määrää mittaamalla absorbanssin eli valon imeytymisen muutosta väliaineessa tietyllä aallonpituudella. (Åkerman & Jokela 2010: 47–48, 67–69.) Määritysmenetelmä on fotometrinen, IFCC:n (International Federation of Clinical Chemistry and laboratory Medicine) suosituksen mukaan (Huslab ohjekirja 2021).

Näytteen laatu on tärkeä osa luotettavan laboratoriotuloksen saamiseksi. Hemoglobiinin (H), bilirubiini (I) lipidien (L) korkeat pitoisuudet näytteessä voivat heikentää näytteen laatua, aiheuttaa analyttistä harhaa ja häiritä fotometristä mittausta. Näiden näytteen laatua häiritsevien aineiden pitoisuus eli HIL-indeksi voidaan mitata analysaattorin tekemällä määrittämisellä. Usein kuitenkin hemoglobiinin, bilirubiinin ja lipidien tunnistaminen seerumista tai plasmasta suoritetaan silmämääräisellä tarkistuksella. HIL indeksit ovat tärkeä osa laadunvarmistusta. (Lippi 2018.) Hemolyysi aiheuttaa näytteessä ALAT-pitoi-

suuden nousun, mutta-määrittystä ei häiritse hemolyysi (Hemoglobiini), ikteerisyys (bili-rubiini) tai lipemia (lipidit) jos HIL-indeksi on ≤ 10 %. (Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc); (Vita laboratorioskäsikirja 2021.)

2.3 Viitealueet

ALAT-pitoisuus on normaali, kun se on pienempi kuin viitealueen yläraja. ALAT-entsyymin viitealueet ovat lähes yhdenmukaiset eri laboratorio tutkimusohjekirjojen mukaan sekä seerumin että plasman kohdalla. Useimmissa laboratorioden tutkimusohjekirjoissa viitealueet ovat: Lapset, 0–16 v, alle 40, U/l, Miehet, alkaen 17 v, alle 50, U/l, Naiset, alkaen 17 v, alle 35, U/l. (Huslab ohjekirja 2021; Vita laboratorioskäsikirja 2021.) Nordlab laboratorioden 17-vuotiaiden tyttöjen viiteraja on hieman korkeampi 40 U/l (Nordlab 2017). Synlab laboratorioden tutkimusohjekirjassa lasten viitealueita ei ole määritetty (Synlab).

Taulukko 1. ALAT-entsyymin viitealueet eri laboratoriossa (Huslab ohjekirja 2021.) (Synlab.) (Vita laboratorioskäsikirja 2021.) (Nordlab 2017.)

Laboratorio	Alat- viitealue		
	Naiset, alkaen 17 v.	Miehet, alkaen 17 v.	Lapset 0–16 v.
Vita-laboratoriot	< 35 U/l	< 50 U/l	Alle 40 U/l
HUSlab	< 35 U/l	< 50 U/l	Alle 40 U/l
Nordlab	< 35 U/l	< 50 U/l	Lapset 0–16 v. alle 40 U/l Pojat 17 v. 10–50 U/l Tytöt 17 v. 10–40 U/l
Synlab	< 35 U/l	< 50 U/l	-

3 Näytteen säilytys

Laboratorio tutkimusprosessiin sisältyy kolme erilaista vaihetta. Preanalyttinen vaihe pitää sisällään tutkimuslähetteen, potilaan esivalmistelun ja näytteenoton, näytteen esikäsittelyn, kuljetuksen ja säilytyksen. Analyttinen vaihe sisältää näytteen analysoinnin ja siihen liittyvän laadun varmistuksen. Postanalyttiseen vaiheeseen kuuluu tulosten tarkastelu ja hyväksyminen. Yleisin syy virheellisiin laboratorioanalyysin tuloksiin johtuu virheistä preanalyttisessä vaiheessa. (Grankvist ym. 2018.) Ihmisen verinäyte on biologista ainetta, jossa tapahtuu aineenvaihduntareaktioita myös kehon ulkopuolella. Näytteessä tapahtuvat muutokset pyritään pysäyttämään ja minimoimaan käsittelemällä näyte oikein, säilyttämään ja kuljettamaan se sellaisena kuin se oli näytteenottohetkellä elimistössä näytteen analysoimiseen saakka. (Matikainen & Miettinen & Wasström 2016: 42–43.)

Laitevalmistaja Siemens healthineers Atellica® Solution –analysointimenetelmään mukaan ALAT-määrityksessä eroteltu plasma tai seerumi näyte voidaan säilyttää enintään 7 vuorokauden ajan 2–8° C lämpötilassa tai 30 päivää pakastettuna -20° C (Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc)).

Useat tutkimusraportit osoittavat ALAT-entsyymien säilyvyyden olevan epävakaata lyhytaikaisessa säilytyksessä huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa 4° C. Pitkäaikais-säilytyksestä -20° C:ssa, -25° C:ssa ja -30° C:ssa useimmat tutkimukset osoittivat ALAT-entsyymien asteittaisen laskun 28–90 päivän aikana. (Shimizu & Ichihara 2019.)

Shimizun ja Ichiharan (2019) tekemä tutkimus oli ensimmäinen, jossa arvioitiin seerumin biokemiallisten aineiden vakautta kuudessa eri lämpötilassa samanaikaisesti. Seitsemän seeruminäytettä säilytettiin 25° C, 4° C, 0° C, -10° C, -20° C ja -30° C lämpötilassa ja analysoitiin päivinä 1, 3, 7, 14, 28 ja 56. Tutkimuksen tuloksista selvisi, että ALAT-entsyymi oli erittäin epävakaata varsinkin seitsemänneistä päivästä eteenpäin, mutta sen stabiilisuus parani huomattavasti, kun näytettä säilytettiin -30° C:ssa. Tutkimuksessa kuitenkin huomattiin, että ALAT-aktiivisuus oli melko vakaa 4° C:ssa 14 päivään saakka. (Shimizu & Ichihara 2019.)

Turkkilaiset Cuhadar, Koseoglu, Atay ja Dirican (2013) tutkivat 15 potilaan seerumi näytteistä 17 eri kliinisen kemian analyyttejä, kun näytteet säilytettiin -20° C jaettuna A ja B ryhmään. Lähtötason mittauksen jälkeen näytteet säilytettiin -20° C kokeen ajan. A ryhmä pidettiin jäädytettynä yksi, kaksi ja kolme kuukautta, jonka jälkeen analysoitiin nii-

den stabiilisuus. Ryhmä B koostui yhdestä kymmeneen kertaan jäädytys- ja sulatusjaksoja. Tuloksia verrattiin lähtötilanteen pitoisuuksiin. Alaniiniaminotransferaasin (ALAT) tulokset olivat vakaat kaikissa olosuhteissa seerumissa 3 kuukauden jälkeen, jopa 10 kerran jäädytys-sulatusjakson. (Cuhadar & Koseoglu & Atay & Dirican 2013.)

Cray, Rodriguez, Zaias ja Altaman (2009) tutkivat varastointilämpötilan ja ajan vaikutuksia rottien seerumin kliinisiin biokemiallisiin analyysihin. Tässä tutkimuksessa arvioitiin 17 eri entsyymien pitoisuutta rotan seerumissa jäädytyksen aikana 4 ° C:ssa ja pitkäaikaisessa varastoinnissa -20° C:ssa ja -70° C:ssa. Näytteet analysoitiin ensimmäisen päivän 0-näytteen jälkeen 7 pv, 30 pv, 90 pv ja vuoden (360 pv) kohdalla. Tutkimuksen tuloksena oli seitsemän vuorokauden kuluttua jäädytyksestä, että useat pitoisuudet osoittivat pieniä muutoksia, mutta merkittäviä muutoksia ei havaittu näytteissä, jotka oli jäädytetty -20° C tai -70 asteessa. Rotan seerumi näytteiden pitkäaikainen yli seitsemän vuorokauden jäädyttäminen -20° C: n pakastimessa johti taas moniin muutoksiin pitoisuuksissa. Nämä muutokset voivat liittyä korkeampaan lämpötilaan (suhteessa -70° C). Alaniiniaminotransferaasi osoitti varhaisia merkittäviä laskuja 90 päivän kuluttua. 360 päivän kohdalla alaniiniaminotransferaasi aktiivisuus oli laskenut 54 % kun sitä oli säilytetty -20° C asteessa. Rotan seeruminäytteiden jäädyttäminen -70° C:ssa johti vain vähäisiin muutoksiin pitoisuuksissa, ja muutokset olivat alle 10 % jopa 360 päivän säilytyksen jälkeen. Tämä havainto on tutkimuksen mukaan yhdenmukainen ihmiskirjallisuuden kanssa. (Cray & Rodeiquez & Zaias & Altman 2009.)

Vuonna 2019 julkaistussa katsauksessa Stevens, Hoover, Wang ja Zanetti tekivät yhteenvedon Pubmed ja EMBASE tietokannoissa julkaistuista tutkimuksista, joissa tutkittiin erilaisten esianalyttisten tekijöiden vaikutuksia ihmisen plasman ja seerumin aineenvaihduntaan. Plasmanäytteet näyttävät sietävän paremmin lyhyitä viiveitä näytteen käsittelyssä kuin seeruminäytteet. Seeruminäytteet voivat tarjota suuremman herkkyyden. Useimpiin aineenvaihduntatuotteisiin eivät vaikuta viiveet, kun säilytysaika ennen analysointia on pienempi kuin 2 tuntia huoneenlämmössä ja jopa 24 tuntia 0–4° C:ssa. Säilytys pakastettuna -80° C:ssa enintään 30 kuukautta ei vaikuta aineenvaihduntatuotteisiin. Havainnot siitä, mikä näytemateriaali tarjoaa paremman toistettavuuden, ovat katsauksen mukaan ristiriitaisia. (Stevens & Hoover & Wang & Zanetti 2019.)

4 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia ja selvittää, onko säilytysajan pituudella ennen näytteen analysointia merkitystä saatuihin analyysituloksiin, kun näytteitä säilytetään pakastettuina -20°C ja -70°C eripituisia aikoja. Tutkimuksen tavoitteena on saada tuloksia, joita voidaan hyödyntää laboratorion toiminnassa, myöhemmissä tutkimuksissa ja ALAT- analyysiohjeissa sekä näytteiden säilyvyyden sekä kuljetuksen arvioinnissa. Tämän opinnäytetyön tilaajan mukaan epäilystä on, että pitkään säilytettyjen näytteiden tulokset eivät välttämättä ole luotettavia ja ALAT-entsyymi on osoittautunut tässä haastavaksi. Tutkimuksen tuloksia voidaan hyödyntää siihen, kuinka voidaan arvioida säilytettyjen näytteiden tulosten luotettavuutta.

Tutkimuskysymykset ovat:

Eroavatko -20°C ja -70°C asteessa säilytettyjen ALAT-näytteiden pitoisuudet vertailunäytteestä (nollanäyte, huoneenlämpö).

Millä tavalla litiumhepariiniplasman ALAT-pitoisuudet eroavat vertailunäytteestä saatuihin tuloksiin?

Milloin säilytetty näyte ei ole enää luotettavasti analysointikelpoinen? Vaikuttaako säilytysaika?

5 Opinnäytetyön menetelmät

5.1 Menetelmälliset lähtökohdat

Tutkimuksessa käytettiin määrällistä eli kvantitatiivista tutkimusmenetelmää, koska tavoitteena oli saada numeerisia tuloksia eri säilytysaikojen ja säilytyslämpötilojen vaikutuksesta ALAT- pitoisuuteen. Tutkimus kohdentui eri muuttujien mittaamiseen ja niiden välisten yhteyksien tarkasteluun ja raportointiin tilastollisia menetelmiä hyödyntäen.

5.2 Aineiston keruu

Tutkimus kohdistui maksan toimintaan liittyvän alaniiniaminotransferaasi (ALAT) entsyymin mittaamiseen. Muuttuuko analyysin tulostasoa, jos näytettä säilytetään eri lämpöti-

loissa eripituisia aikoja. Tutkimusaineistona käytettiin HUS Helsingin ja Uudenmaan yliopistollisen sairaalan potilaista litium-hepariiniputkiin otettuja ylijäämä plasmanäytteitä. Otokseen valittiin korkeita sekä matalia ALAT-pitoisuuksia sisältäviä näytteitä, jotta tuloksia voitiin vertailla laajalla tulosasteikolla.

Näytteiden kerääminen toteutui Meilahden HUSLAB kliinisen kemian laboratoriossa, jossa laboratorion henkilökunta käsitteli näytteet ennen analysointia. Näytteistä analysoitiin ensiksi pyydetyt potilastutkimukset. Potilastulosten valmistuttua kerättiin ylijäämä näytteet talteen opinnäytetyön ohjaajan erikoistuvan kemistin kanssa. Näytteiden kerääminen, analysointi ja pakastaminen aloitettiin maanantaina 28. Helmikuuta 2022. Näytteenotto oli tapahtunut edellisen illan / yön aikana laboratoriohoitajien ottamina.

Opinnäytetyötä varten valittiin 62 eritasoista ylijäämä näytettä litium-hepariiniplasmaa. Näytteiden ensimmäisenä analysointipäivänä plasmanäytteet yhdistettiin niin kutsutuiksi pooleiksi. Yhteen pooliin yhdistettiin kaksi suurin piirtein samantasoista ALAT-entsyymi-näytettä. Eri tulostasoisia pooleja tehtiin yhteensä 31 kappaletta. Minimi näytemäärä yhteen pooliin oli yhteensä 2,4 ml. Jokainen pooli jaettiin kahteentoista osaan. Kuusi eppendorf-putkea edusti -20°C ja toiset kuusi eppendorf-putkea edusti -70°C . Jokaiseen eppendorf-putkeen siirrettiin vähintään 200 ul plasmaa. Kaikkiin eppendorf-putkiin merkittiin tämän jälkeen poolin säilytysaste (-20, -70), aakkonen, joka edusti aikaa **A**, (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vko), **D** (2 vko), **E** (1 kuukausi), **F** (1 vuosi) sekä poolin numero 1-31.

Taulukko 2. Tutkimusasetelma.

Plasmojen yhdistäminen ----> Poolit numeroidaan 1–31
Eppendorf-putket ----> Numeroidaan 1–31, aakkostetaan A-F, aste -20°C & -70°C
Poolin plasma jaetaan eppendorf-putkiin ----> Näytettä 200 ul/putki
Pooli 1A: Analysoidaan näytteenkeräyspäivänä ----> 0-näyte (vertailunäyte)
Pooli 1B: Pakastetaan -20°C ----> Analysoidaan 24 h kuluttua

Pakastetaan -70° C ----> Analysoidaan 24 h kuluttua
Pooli 1C: Pakastetaan -20° C ----> Analysoidaan 1 viikon kuluttua Pakastetaan -70° C ----> Analysoidaan 1 viikon kuluttua
Pooli 1D: Pakastetaan -20° C ----> Analysoidaan 2 viikon kuluttua Pakastetaan -70° C ----> Analysoidaan 2 viikon kuluttua
Pooli 1E: Pakastetaan -20° C ----> Analysoidaan 1 kuukauden kuluttua Pakastetaan -70° C ----> Analysoidaan 1 kuukauden kuluttua
Pooli 1F: Pakastetaan -20° C ----> Analysoidaan 1 vuoden kuluttua Pakastetaan -70° C ----> Analysoidaan 1 vuoden kuluttua

5.3 Näytteiden analysointi

Näytteet analysoitiin HUSLAB Meilahden kliinisen kemian Siemens Atellica-analysaattorilla. Laitteen ALAT-entsyymin mittausalue on 9,0–1000 U/l. Tutkimuksen ensimmäisenä päivänä näytteiden käsittelyn ja eppendorf putkiin erottelun jälkeen analysoitiin ensimmäiset **A**-näytteet (0-näyte). Tämän jälkeen muut erotellut ja merkityt plasmanäytteet pakastettiin. Viisi eppendorf-putkea jokaista poolia pakastettiin – 20° C pakkaseen ja viisi eppendorf-putkea – 70° C pakkaseen. Seuraava analysointi tapahtui seuraavana päivänä, jolloin analysoitiin **B**-näytteet (24 h). **C**-näytteet (1 vko) analysoitiin viikon kuluttua, **D**-näytteet (2 vko) analysoitiin kahden viikon kuluttua ja **E**-näytteet (1 kk) analysoitiin yhden kuukauden kuluttua. **F**-näytteet (1 vuoden) jäivät pakastimeen säilytettäväksi ja ne analysoidaan vuoden kuluttua tutkimuksen toimeksiantajan tutkimusryhmän puolesta.

Analysointipäivinä näytteet otettiin säilytyksestä tunti aikaisemmin huoneenlämpöön sulamaan. Tämän jälkeen näytteet sekoitettiin vortex-sekoittajalla yksitellen ja siirrettiin eppendorf putkista Siemens Atellica laitteelle soveltuviin näyteputkiin, joihin tulostettiin viivakooditarrat. Näytteet sentrifugoitiin 2500 g x 10 minuuttia Megafuge 16R-sentrifugilla. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin välittömästi Siemens Atellica® Solution -analysaattorilla.

5.4 Aineiston analysointimenetelmät

Opinnäytetyössä mitattiin ALAT-entsyymin pitoisuutta 31 litium-hepariiniplasma näytepoolista. Analysoidessa näytteitä, niistä kerääntyi numeraalista tietoa, joka kerätiin talteen Siemens Atellica®-laitteen muistista. Tilastointiohjelmia hyödyntäen saadut tulokset tallennettiin taulukoiksi. Tutkimusaineisto analysoitiin Excel Microsoft taulukkolaskenta ohjelmalla. Tutkimustuloksista saatua tietoa esitetään tilastollisina tunnuslukuina, taulukoina, kuvioina ja kirjallisesti.

Suhteellinen eroprosentti kertoo, kuinka paljon prosentuaalisesti pitoisuuksien kesken esiintyy muutosta. Nämä muutokset ilmaistaan % lukuna. Näistä muutoksista lasketaan keskiarvo, jolla voidaan osoittaa suhteellisista muutoksista keskiarvo laskemalla % luvut yhteen ja jakamalla ne laskettavalle näytemäärälle.

Matalin ALAT-pitoisuuden määrä näytepoolissa oli 12 U/l ja korkein 829,6 U/l. Osassa tutkimusnäytteistä oli ALAT-pitoisuuden määrä laskenut säilytyksen jälkeen alle mittausalueen <9 U/l, jolloin ero % olisi todellisuudessa ollut hieman korkeampi.

6 Tulokset

Tutkimukseen valittiin korkeita sekä matalia ALAT-pitoisuukseltaan sisältäviä näytteitä, jotta tuloksia voitiin vertailla laajalla tulosasteikolla. Tutkimuksen litium-hepariiniplasma näytteistä yhdistetyt 31 poolia jaettiin kolmeen eri tulostasoluokkaan viitealueiden mukaan. Laboratorio tutkimusohjekirjojen normaalin viitealueen < 50 U/l sisällä olevia poolia oli yhteensä 10 kappaletta (Huslab ohjekirja 2021). Korkealla viitealueella 58,9–192 U/l olevia poolia 13 kappaletta ja erittäin korkealla viitealueella 235,1–829,6 U/l olevia poolia yhteensä 8 kappaletta.

6.1 Normaalilla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys

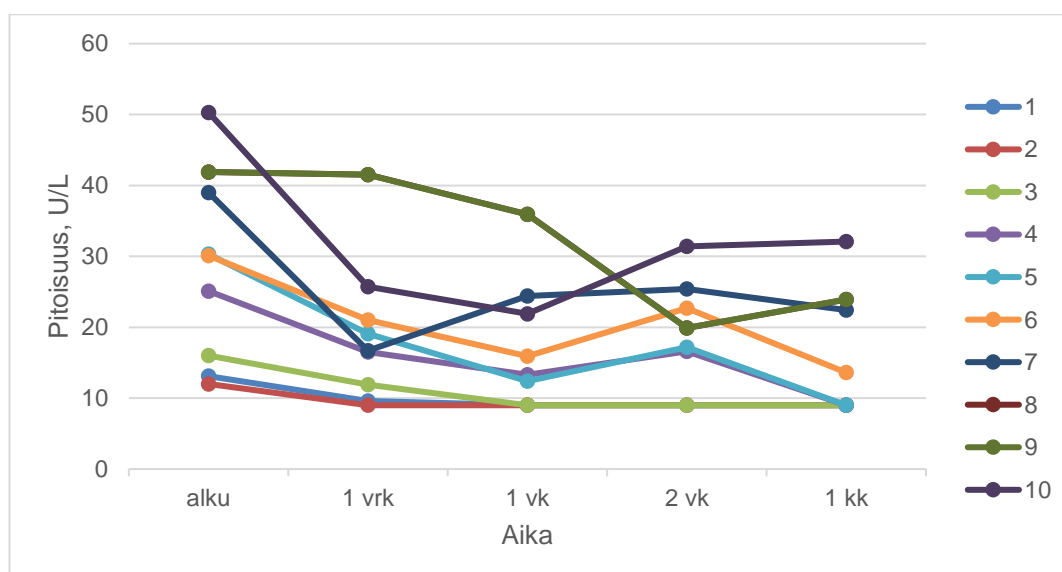
Taulukko 3 sisältää normaalilla viitealueella (<50 U/l) olevien 10 poolin analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -20° C eripituisia aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymin pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-entsyymin pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen **A** 0-näytteeseen. Tutkimustuloksissa havaitaan suurta ALAT-pi-

toisuuden laskua 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla (ero % 1–70,3). Pooleissa 1–3 havaitaan pitoisuuden laskevan alle mittausalueen 9 U/l vuorokauden (24 h) ja 1 vk kohdalla sekä pooleissa 4–5 yhden kuukauden (1 kk) kohdalla.

Taulukko 3. Normaalilla viitealueella olevat pitoisuusarvot sekä suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymien -20°C säilyvyydestä.

Pooli -20°C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
1	13,1	9,6	26,7 %	<9,0	31,3 %	<9,0	31,3 %	<9,0	31,3 %
2	12,0	<9,0	25,0 %	<9,0	25,0 %	<9,0	25,0 %	<9,0	25,0 %
3	16,0	11,9	25,6 %	<9,0	43,8 %	<9,0	43,8 %	<9,0	43,8 %
4	25,1	16,5	34,3 %	13,3	47,0 %	16,6	33,9 %	<9,0	64,1 %
5	30,3	19,1	37,0 %	12,4	59,1 %	17,2	43,2 %	<9,0	70,3 %
6	30,1	21,0	30,2 %	15,9	47,2 %	22,7	24,6 %	13,6	54,8 %
7	39,0	16,7	57,2 %	24,4	37,4 %	25,4	34,9 %	22,4	42,6 %
8	41,3	38,3	7,3 %	18,2	55,9 %	30,7	25,7 %	28,3	31,5 %
9	41,9	41,5	1,0 %	35,9	14,3 %	19,9	52,5 %	23,9	43,0 %
10	50,3	25,7	48,9 %	21,9	56,5 %	31,4	37,6 %	32,1	36,2 %

Pistediagrammi kuvaa taulukon 3 normaalilla viitealueella olevien poolien 1–10 ALAT-entsyymi pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -20°C (kuvio 2).



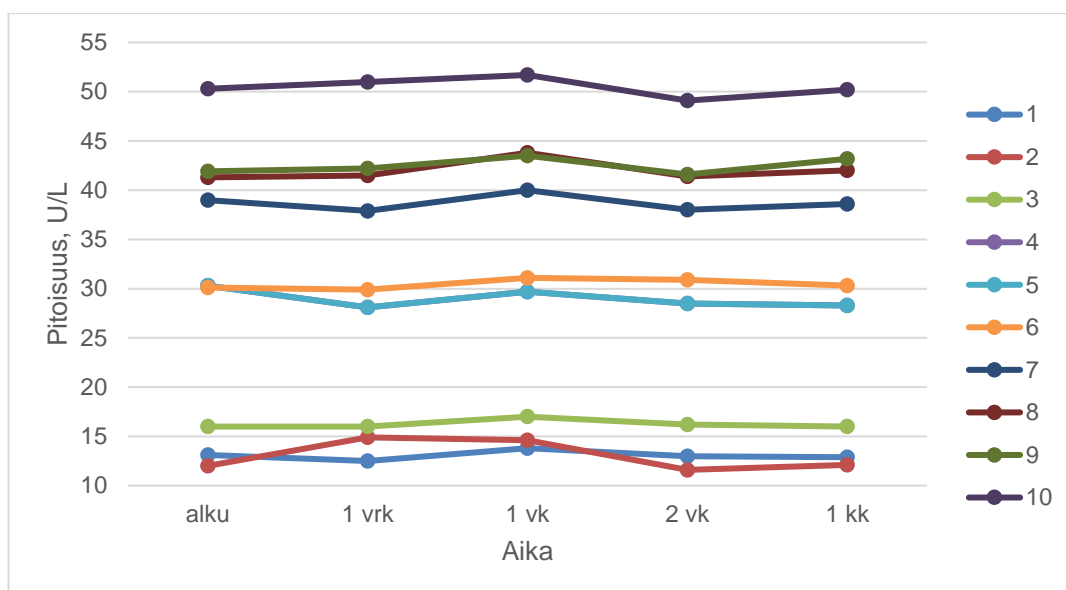
Kuvio 2. Normaalilla viitealueella (<50 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajankohtina mitattuina säilyttäessä näytteitä -20°C .

Taulukko 4 sisältää normaalilla viitealueella (<50 U/l) olevien 10 poolin analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -70° C eripituisia aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymin pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-entsyymin pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen **A** 0-näytteeseen. Tuloksista voidaan havaita pientä ALAT-pitoisuuden laskua ja nousua 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla. Poolissa 2 havaitaan selkeä poikkeama ero % tuloksissa 24 h ja 1 vk ajankohdassa.

Taulukko 4. Normaalilla viitealueella olevat pitoisuusarvot ja suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymin -70° C säilyvyydestä.

Pooli - 70° C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
1	13,1	12,5	4,6 %	13,8	-5,3 %	13,0	0,8 %	12,9	1,5 %
2	12,0	14,9	-24,2 %	14,6	-21,7 %	11,6	3,3 %	12,1	-0,8 %
3	16,0	16,0	0,0 %	17,0	-6,3 %	16,2	-1,3 %	16,0	0,0 %
4	25,1	25,0	0,4 %	25,6	-2,0 %	24,8	1,2 %	25,7	-2,4 %
5	30,3	28,1	7,3 %	29,7	2,0 %	28,5	5,9 %	28,3	6,6 %
6	30,1	29,9	0,7 %	31,1	-3,3 %	30,9	-2,7 %	30,3	-0,7 %
7	39,0	37,9	2,8 %	40,0	-2,6 %	38,0	2,6 %	38,6	1,0 %
8	41,3	41,5	-0,5 %	43,8	-6,1 %	41,4	-0,2 %	42,0	-1,7 %
9	41,9	42,2	-0,7 %	43,5	-3,8 %	41,6	0,7 %	43,2	-3,1 %
10	50,3	51,0	-1,4 %	51,7	-2,8 %	49,1	2,4 %	50,2	0,2 %

Pistediagrammi kuvaa taulukon 4 normaalilla viitealueella olevien poolien 1–10 ALAT-entsyymin pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -70° C (kuvio 3).



Kuvio 3. Normaalilla viitealueella (<50 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajan-kohtina mitattuina säilyttäessä näytteitä -70° C.

6.2 Korkealla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys

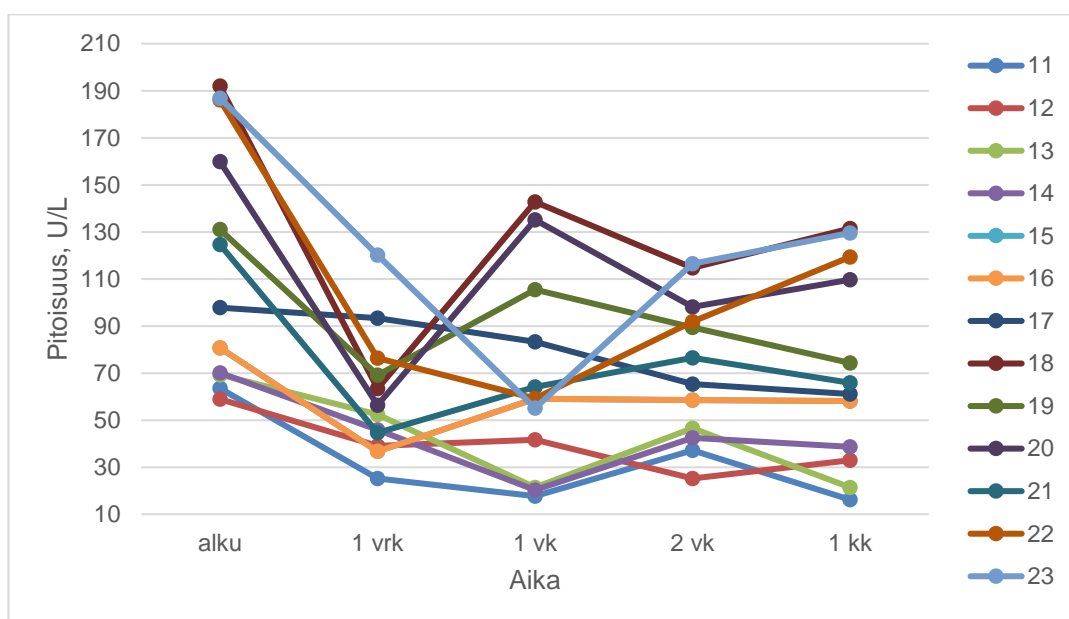
Taulukko 5 sisältää korkealla viitealueella (58,9–192 U/l) olevien ALAT-entsyymi poolien 11–23 analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -20° C eripituisia aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymien pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-entsyymien pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen **A** 0-näytteeseen. Tutkimustuloksissa havaitaan suurta ALAT-pitoisuuden laskua 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla (ero % 4,5–74,5).

Taulukko 5. Korkealla viitealueella olevat pitoisuusarvot ja suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymien -20° C säilyvyydestä.

Pooli -20° C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
11	63,5	25,2	60,3 %	17,7	72,1 %	37,2	41,4 %	16,2	74,5 %
12	58,9	39,0	33,8 %	41,6	29,4 %	25,2	57,2 %	33,0	44,0 %
13	69,3	52,4	24,4 %	21,4	69,1 %	46,5	32,9 %	21,4	69,1 %
14	70,1	45,9	34,5 %	20,3	71,0 %	42,4	39,5 %	38,6	44,9 %
15	74,3	29,7	60,0 %	58,6	21,1 %	46,0	38,1 %	35,9	51,7 %
16	80,7	36,7	54,5 %	59,1	26,8 %	58,5	27,5 %	58,1	28,0 %
17	97,8	93,4	4,5 %	83,3	14,8 %	65,3	33,2 %	61,1	37,5 %
18	192,0	63,4	67,0 %	142,7	25,7 %	114,7	40,3 %	131,5	31,5 %
19	131,0	69,1	47,3 %	105,4	19,5 %	89,4	31,8 %	74,3	43,3 %

20	159,9	56,4	64,7 %	135,1	15,5 %	98,1	38,6 %	109,7	31,4 %
21	124,6	44,6	64,2 %	64,1	48,6 %	76,5	38,6 %	65,8	47,2 %
22	186,1	76,4	58,9 %	59,2	68,2 %	91,9	50,6 %	119,4	35,8 %
23	186,9	120,2	35,7 %	55,1	70,5 %	116,5	37,7 %	129,5	30,7 %

Pistediagrammi kuvaa taulukko 5 korkealla viitealueella olevien poolien 11–23 ALAT-entsyymi pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -20° C (kuvio 4).



Kuvio 4. Korkealla viitealueella (58,9–192 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajankohtina mitattuina säilyttäessä näytteitä -20° C.

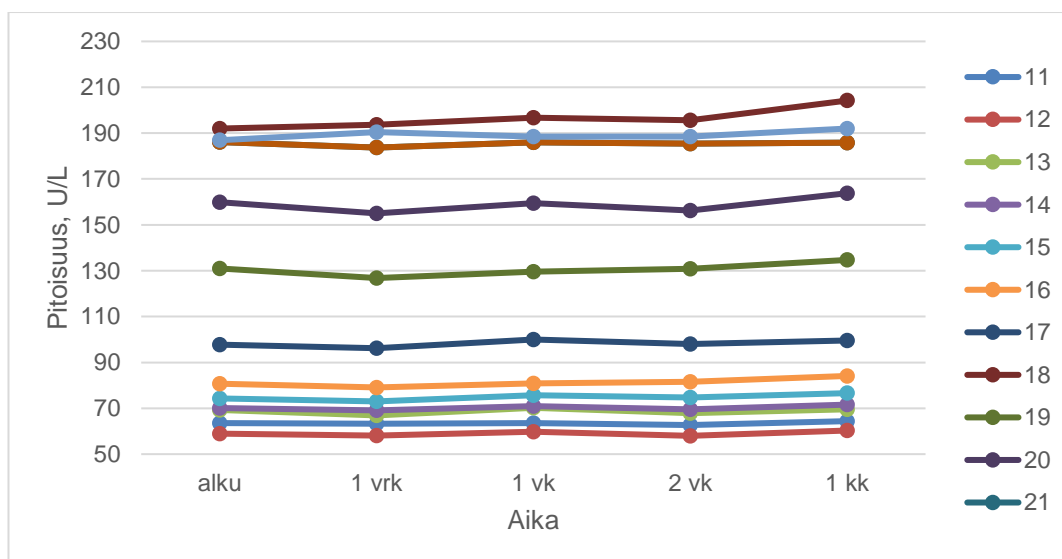
Taulukko 6 sisältää korkealla viitealueella (58,9–192 U/l) olevien ALAT-entsyymi poolien 11–23 analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -70° C eripituisia aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymien pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-entsyymien pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen **A** 0-näytteeseen. Tuloksista havaitaan vaihtelevasti pientä ALAT-pitoisuuden laskua sekä nousua 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla.

Taulukko 6. Korkealla viitealueella olevat pitoisuusarvot ja suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymien -70° C säilyvyydestä.

Pooli - 70 ° C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
-------------------	----------	-----------	---------	------------	---------	------------	---------	-----------	---------

11	63,5	63,3	0,3 %	63,5	0,0 %	62,7	1,3 %	64,4	-1,4 %
12	58,9	58,1	1,4 %	59,8	-1,5 %	58,0	1,5 %	60,3	-2,4 %
13	69,3	66,9	3,5 %	70,2	-1,3 %	67,9	2,0 %	69,5	-0,3 %
14	70,1	69,1	1,4 %	70,9	-1,1 %	69,6	0,7 %	71,6	-2,1 %
15	74,3	73,0	1,7 %	75,7	-1,9 %	74,7	-0,5 %	76,6	-3,1 %
16	80,7	79,1	2,0 %	80,9	-0,2 %	81,6	-1,1 %	84,1	-4,2 %
17	97,8	96,2	1,6 %	100,0	-2,2 %	98,0	-0,2 %	99,5	-1,7 %
18	192,0	193,7	-0,9 %	196,8	-2,5 %	195,6	-1,9 %	204,2	-6,4 %
19	131,0	126,8	3,2 %	129,6	1,1 %	130,9	0,1 %	134,7	-2,8 %
20	159,9	155,0	3,1 %	159,4	0,3 %	156,2	2,3 %	163,8	-2,4 %
21	124,6	121,4	2,6 %	129,0	-3,5 %	124,9	-0,2 %	124,2	0,3 %
22	186,1	183,7	1,3 %	186,0	0,1 %	185,4	0,4 %	185,9	0,1 %
23	186,9	190,5	-1,9 %	188,5	-0,9 %	188,5	-0,9 %	192,0	-2,7 %

Pistediagrammi kuvaa taulukko 6 korkealla viitealueella olevien poolien 11–23 ALAT-entsyymi pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -70° C (kuvio 5).



Kuvio 5. Korkealla viitealueella (58,9–192 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajankohtina mitattuna säilyttäessä näytteitä -70 ° C.

6.3 Erittäin korkealla viitealueella olevien ALAT-näytteiden säilyvyys.

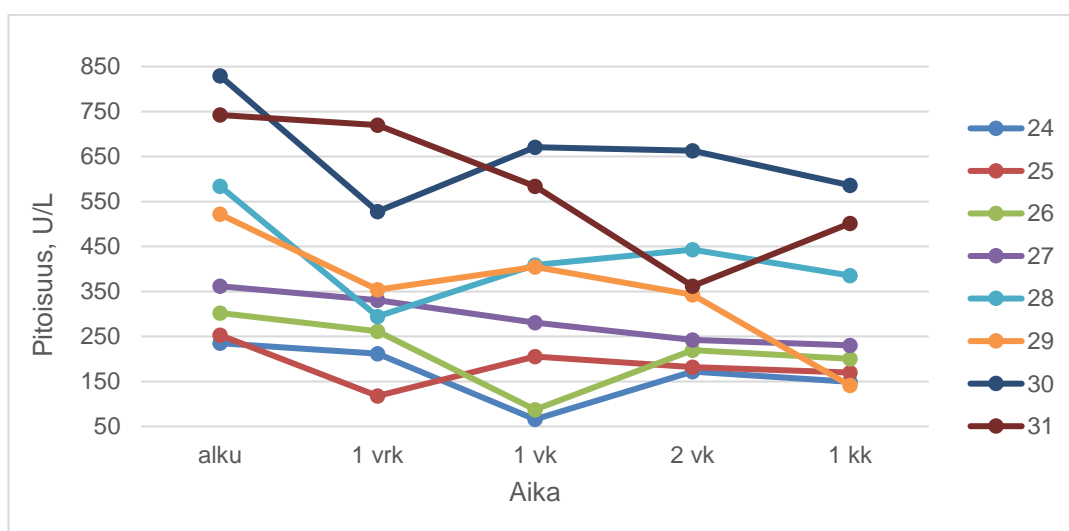
Taulukko 7 sisältää erittäin korkealla viitealueella (235,1–829,6 U/l) olevien ALAT-entsyymi poolien 24–31 analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -20° C eripituisia aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymien pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-

entsyymin pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen A 0-näytteeseen. Tuloksista havaitaan suurta ALAT-pitoisuuden laskua 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla. Pooli 31 B-näytteen (24 h) tulos on poikkeava, pitoisuus ei paljon laskenut, mutta 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla pitoisuus laskee huomattavasti. Tämä on yksittäinen tapaus.

Taulukko 7. Erittäin korkealla viitealueella olevat pitoisuusarvot ja suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymin -20° C säilyvyydestä.

Pooli - 20° C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
24	235,1	212,2	9,7 %	65,8	72,0 %	171,7	27,0 %	149,3	36,5 %
25	253,1	117,9	53,4 %	205,5	18,8 %	182,1	28,1 %	169,7	33,0 %
26	302,3	261,6	13,5 %	87,4	71,1 %	219,8	27,3 %	200,2	33,8 %
27	361,8	330,4	8,7 %	280,8	22,4 %	242,7	32,9 %	230,4	36,3 %
28	584,3	294,7	49,6 %	409,1	30,0 %	442,8	24,2 %	385,8	34,0 %
29	521,8	354,1	32,1 %	404,4	22,5 %	343,0	34,3 %	141,1	73,0 %
30	829,6	528,0	36,4 %	670,6	19,2 %	663,4	20,0 %	586,1	29,4 %
31	742,5	719,7	3,1 %	583,8	21,4 %	362,1	51,2 %	501,4	32,5 %

Pistediagrammi kuvaa taulukko 7 erittäin korkealla viitealueella olevien poolien 24–31 ALAT-entsyymi pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -20° C (kuvio 6).



Kuvio 6. Erittäin korkealla viitealueella (235,1–829,6 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajankohtina mitattuina säilyttäessä näytteitä -20° C.

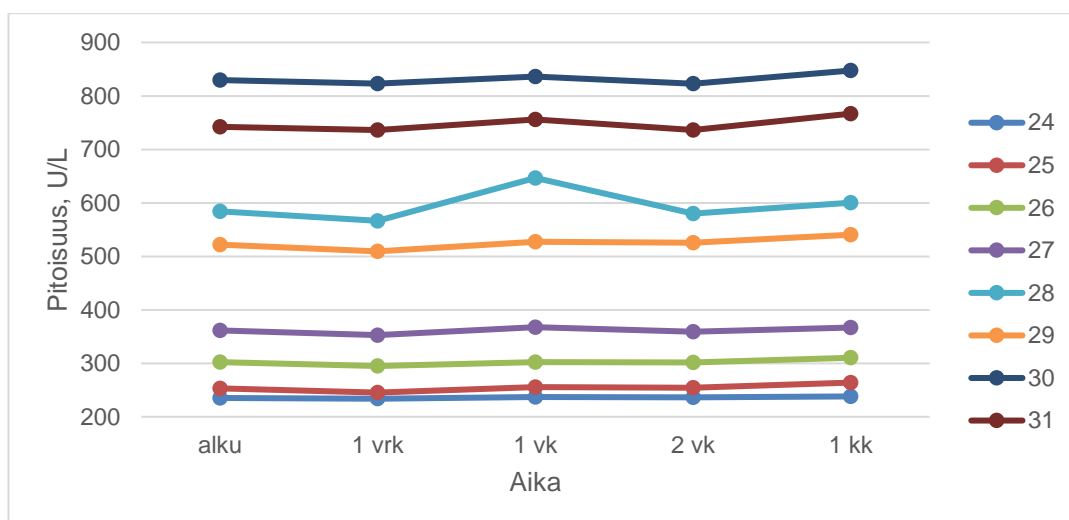
Taulukko 8 sisältää erittäin korkealla viitealueella (235,1–829,6 U/l) olevien ALAT-entsyymi poolien 24–31 analysoinnin tulokset, kun näytteitä on säilytetty -70° C eripituisia

aikoja. Pystysarake kertoo analysointi ajankohdan **A** (0-näyte), **B** (24 h), **C** (1 vk) **D** (2 vk) ja **E** (1 kk) sekä ALAT-entsyymin pitoisuuden. Ero % kertoo, kuinka paljon ALAT-entsyymin pitoisuus on muuttunut suhteessa alkuperäiseen **A** 0-näytteeseen. Tuloksista havaitaan pientä ALAT-pitoisuuden laskua sekä nousua vaihtelevasti 24 h, 1 vk, 2 vk ja 1 kk kohdalla. Yhden vuorokauden kohdalla pitoisuus on laskenut pooleissa hieman. Yhden ja kahden viikon kohdalla on pooleissa ALAT-pitoisuuden laskua ja nousua vaihtelevasti, nousua esiintyy kuitenkin enemmän yhden viikon kohdalla. Yhden kuukauden kohdalla kaikissa pooleissa esiintyy pitoisuuden nousua.

Taulukko 8. Erittäin korkealla viitealueella olevat pitoisuusarvot ja suhteellinen ero % saaduista tuloksista ALAT-entsyymin -70° C säilyvyydestä.

Pooli - 70° C	A 0 h	B 24 h	B ero %	C 1 vko	C ero %	D 2 vko	D ero %	E 1 kk	E ero %
24	235,1	233,8	0,6 %	236,8	-0,7 %	236,3	-0,5 %	238,1	-1,3 %
25	253,1	245,3	3,1 %	255,7	-1,0 %	254,2	-0,4 %	264	-4,3 %
26	302,3	295	2,4 %	302,1	0,1 %	301,6	0,2 %	310,4	-2,7 %
27	361,8	352,8	2,5 %	367,6	-1,6 %	359	0,8 %	367,2	-1,5 %
28	584,3	566,5	3,0 %	646,7	-10,7 %	580,3	0,7 %	600,2	-2,7 %
29	521,8	509,4	2,4 %	527,1	-1,0 %	525,8	-0,8 %	540,5	-3,6 %
30	829,6	823,2	0,8 %	836,1	-0,8 %	822,9	0,8 %	847,5	-2,2 %
31	742,5	736,4	0,8 %	755,8	-1,8 %	736,3	0,8 %	766,9	-3,3 %

Pistediagrammi kuvaa taulukko 8 erittäin korkealla viitealueella olevien poolien 24–31 ALAT-entsyymin pitoisuuden muutosta yhden kuukauden aikana säilyttäessä näytteitä -70° C (kuvio 7).



Kuvio 7. Erittäin korkealla viitealueella (235,1–829,6 U/l) olevien näytteiden ALAT-pitoisuudet eri tutkimusajankohtina mitattuina säilyttäessä näytteitä -70° C.

6.4 Eroprosentin keskiarvo

Seuraavassa tarkastellaan suhteellisen ero % keskiarvoja. Taulukoihin on koottu kaikkien eri viitealueella olevien näytteiden suhteellisen ero % tuloksista lasketut keskiarvot normaaleille, korkeille ja erittäin korkeille ALAT-entsyymi näytteille.

Taulukko 9 tulosten perusteella voidaan todeta, että ALAT-entsyymi pitoisuuden laskua oli vähiten normaalilla ja erittäin korkealla viitealueilla olevissa näytteissä ensimmäisen vuorokauden kohdalla, kun näytteitä on säilytetty -20° C. Suurinta ALAT-pitoisuuden laskua oli havaittavissa korkealla viitealueella olevissa näytteissä. Erittäin korkealla viitealueella olevissa näytteissä ALAT-pitoisuuksissa laskua esiintyi vähemmän verrattuna normaalilla tai korkealla viitealueella oleviin näytteisiin.

Taulukko 9. Ero % keskiarvo. ALAT-entsyymi -20° C

Viitealueet -20° C	Normaalit	Korkeat	Erittäin korkeat
B (24 h)	29,3 %	46,9 %	24,6 %
C (1 vko)	43,8 %	42,5 %	34,7 %
D (2 vko)	35,2 %	39,0 %	30,6 %
E (1 kk)	44,3 %	43,8 %	38,6 %

Taulukko 10 tulosten perusteella voidaan todeta, että ALAT-entsyymi pitoisuudet pysyivät vakaana EFML (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) suosituksen mukaisesti, kun näytteitä säilytettiin -70° C lämpötilassa. Tuloksista voidaan kuitenkin tehdä huomio, että matala -70° C lämpötila jopa hieman nostatti ALAT-entsyymin pitoisuutta erityisesti 1 viikon kohdalla kaikilla viitealueilla.

Taulukko 10. Ero % keskiarvo. ALAT-entsyymi -70° C

Viitealueet -70° C	Normaalit	Korkeat	Erittäin korkeat
B (24 h)	-1,5 %	1,5 %	2,0 %
C (1 vko)	-3,4 %	-0,8 %	-2,2 %
D (2 vko)	1,3 %	0,3 %	0,2 %
E (1 kk)	0,1 %	-2,2 %	2,7 %

7 Pohdinta

7.1 Tulosten tarkastelu

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada tutkimustuloksia lämpötilan ja ajan vaikutuksesta ALAT- näytteiden säilyvyyteen. Tutkimuksesta saatuja tuloksia verrattiin 0-näytteeseen sekä kaikkia tuloksia keskenään. Tutkimusnäyte poolit jaettiin analysoidun **A** (0-näyte) tulosten mukaan kolmeen eri viitealueeseen, jossa näytteiden pitoisuudet olivat normaalilla alueella (<50 U/l) korkealla alueella (58,9–192 U/l) sekä erittäin korkealla alueella (235,1–829,6 U/l), jotta saatuja tuloksia olisi helpompi tarkastella pienemmissä otoksissa. Pohdimme tuloksia ja seurasimme kuinka paljon suhteellinen ero % jokaisen näytteen kohdalla oli. Miten eri säilytyslämpötila ja aika vaikutti ALAT- entsyymien säilyvyyteen.

EFML (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) suosittaa ALAT-mittauksien väliseksi eroiksi 10,1 % rajaa (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)). Kaikki yli 10,1 % muutokset analyysituloksissa ero % tarkasteltaessa viittasivat siihen, että näyte ei ole enää luotettavasti analysointikelpoinen. ALAT-pitoisuus on silloin laskenut tai noussut yli sallitun määrän, jolloin tulosta ei voida pitää enää luotettavana.

Tutkimuksen aikana osassa näytemateriaalia esiintyi muutosta. Suuressa osassa näytepooleista, jotka oli säilytetty -20°C lämpötilassa esiintyi sakkaa sulatuksen jälkeen, kun taas -70°C lämpötilassa säilytetyissä näytteissä ei sakkaa esiintynyt.

Tutkimuskysymykseen eroavatko kaikki -20°C ja -70°C säilytettyjen ALAT-näytteiden pitoisuudet vertailunäytteestä (0-näyte, huoneenlämpö), tulokseksi saatiin, että pitoisuu- den eroavat. Eroavaisuutta oli eniten huomioitavissa -20°C säilytettyjen näytteiden kohdalla. -70°C pakkasessa säilytettyjen näytteiden kohdalla ero oli vähäinen.

Tutkimuksessa haluttiin selvittää millä tavalla litium-hepariiniplasman ALAT- pitoisuudet eroavat vertailunäytteestä (0-näyte, huoneenlämpö) saatuihin tuloksiin. Kaikissa näyt- teissä, jotka oli säilytetty -20°C lämpötilassa huomattiin normaalien, korkeiden ja erittäin korkeiden viitealueiden ALAT-entsyymien pitoisuuksissa suuri lasku, kun niitä oli säilytetty 24 h, 1 vko, 2 vko tai 1 kuukauden ajan. Suhteellinen ero % oli 13,5 % - 73 % välillä. Tästä tutkimuksesta saadut tulokset osoittavat, että ALAT-litiumhepariini plasmanäyte ei säily analysointikelpoisena -20°C lämpötilassa EFML (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) suositusten mukaisesti. Näin ollen tutkimuksen tu- loksien perusteella voidaan kyseenalaistaa laitevalmistaja Siemens healthineers Atel- lica® Solution –analysointimenetelmäohjeen mukainen säilytys 30 päivää -20°C . Vaikka tutkimustulos on prosentuaalisesti merkitsevä, niin se ei välttämättä ole kliinisesti merkitsevä.

Tutkimustuloksista voidaan osoittaa, että ALAT-entsyyminäytteiden pitoisuudet olivat säilyneet hyvin näytteissä, jotka säilytettiin -70°C lämpötilassa 24 h, 1 vko, 2 vko sekä 1 kuukauden ajan. Normaalien, korkeiden ja erittäin korkeiden viitealueiden suhteellinen ero % oli 7,3 % - -6,4 % välillä. Tämä tarkoittaa ALAT-entsyymien pitoisuus näytteessä on pienentynyt tai noussut prosentuaalisen määrän säilytyksen aikana verrattuna 0-näyt- teeseen. Tutkimuksesta saadut tulokset osoittavat, että ALAT-entsyymi litium-heparii- niplasma näyte säilyy vakaana ja analysointikelpoisena -70°C lämpötilassa EFML (Eu- ropean Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) suosituksen mukai- sesti, kun ero % ovat alle 10,1 %. Pooli 2 kohdalla (Taulukko 4.) nähdään ALAT-entsyy- min pitoisuudessa huomattava prosentuaalinen nousu 24 h (24,2 %) ja 1 vk (21,7 %) kohdalla. Näiden näytteiden tulosta ei voida pitää luotettavana. Epäilyksenä on kontami- naatio näytteissä.

Tutkimustuloksista haettiin myös vastausta tutkimuskysymykseen, milloin säilytetty näyte ei ole enää luotettavasti analysointikelpoinen. Vaikuttaako säilytysaika näytteen. Tämän tutkimuksen perusteella -20°C pakkasessa säilytetty ALAT-entsyymi litium-hepariiniplasma näyte ei ole luotettavasti analysointi kelpoinen. Säilytysajalla ei ollut merkitys -20°C lämpötilassa säilytettyyn tulokseen, koska kaikissa säilytysajoissa suhteellinen ero % oli suuri. Tutkimustulokset osoittivat -70°C lämpötilassa säilytettyjen ALAT-mittausten tulosten olevan luotettavia. Aika vaikutti 2 viikon ja 1 kuukauden säilytyksen jälkeen nostattamalla pitoisuuden arvoa hieman, mutta näyte säilyi silti luotettavasti analysointi kelpoisena.

Tuloksissa tarkasteltiin suhteellisen ero % keskiarvoja. Keskiarvojen tulosten perusteella nähdään sama lopputulos kuin suhteellisen ero % laskennassa. Keskiarvallisesti pitoisuuden lasku on suurinta -20°C lämpötilassa kaikilla viitealueilla eikä ALAT-entsyyminäytteen pitoisuus säily luotettavana -20°C lämpötilassa. Keskiarvallisesti -70°C lämpötilassa esiintyi hieman pitoisuuden laskua sekä nousua, mutta pysyi vakaana ja analysointikelpoisena -70°C lämpötilassa EFML (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) suosituksen mukaisesti. Poolin 2 **B** (24 h) ja **C** (1vk) -70°C näytteiden tuloksia ei ole laskettu mukaan keskiarvoihin, koska niiden tuloksia ei voi pitää luotettavina, joka vääristäisi kokonaistulosta.

7.2 Eettisyys

Eettisyys esiintyi koko opinnäytetyön prosessin ajan. Opinnäytetyötä työstettiin teemmällä itsenäistä työtä ja käyttäen itsenäistä tulkintaa omiin tuloksiin viitaten ja vertaillen laboratorio ohjekirjojen viitealueisiin sekä ulkoisen laadunvalvonnan suosituksiin. Bioanalyytikon eettisiä ohjeita noudattaen opinnäytetyöstä saatuja tutkimustuloksia tuotiin esille luotettavasti ja rehellisesti. Tutkimuksen pohjana oli bioanalyytikon lupauksen mukaisesti halu käyttää kliinistä laboratoriotiedettä ihmiskunnan hyväksi ja vaikuttaa kliinisen laboratorioalan kehittämiseen. (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017.) Opinnäytetyötä tehdessä huomioitiin tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TENK) ohjetta, ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden eettinen ennakoarviointi suomessa (ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden eettinen ennakoarviointi suomessa 2019).

Aineistonhallinta ja henkilötietojen käsittely opinnäytetyön aikana ja sen jälkeen toteutui täysin luottamuksellisesti ja aineiston käsittely ja hävittäminen tietosuojaa noudattaen

(Tietosuojalaki 2018). Tutkimukseen Kerättiin ihmisperäistä näytettä eli plasmaa ylijäämänäytteenä. Esikäsitteilyn jälkeen näyteputket hävitettiin tietosuojattuna biologisena jätteenä. Jokaisen analysointi kerran jälkeen näytteet hävitettiin asiallisesti ja oikeaoppisesti biologisena jätteenä.

Opinnäytetyöhön tarvittiin tutkimuslupa, jota haettiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiristä (Tutkimuslupa, opinnäytetyön tutkimuslupa ja tietolupa), sähköisellä hakemuksella. Tutkimusluvun saaminen opinnäytetyölle oli välttämätön, koska tutkimukseen tarvittiin HUSLAB:n ylijäämä plasmanäytteitä, analysaattoreita ja henkilökuntaa tueksi. Ennen tutkimuksen aloittamista solmittiin yhteinen sopimus opinnäytetyöntekijöiden, Metropolia Ammattikorkeakoulun ja yhteistyötahon HUSLAB:n kanssa.

Opinnäytetyön kirjallinen osuus tarkistettiin Turnitin-ohjelman kautta plagioinnin estämiseksi.

7.3 Luotettavuus

Tutkimuksen teoriatietoa koottiin luotettavista ja mahdollisimman tuoreista lähteistä. Lähdeviittaukset on merkitty tarkasti tekstiin ja lähdeluetteloon. Luotettavuuteen kiinnitettiin huomiota koko opinnäytetyön prosessin ajan. Näytteiden analysointi tapahtui koko tutkimuksen ajan samalla Siemens healthineers Atellica® Solution –analysaattorilla. Ennen jokaista analysointia varmistettiin, että analysaattorin ALAT-entsyymien mittaussuunnitelma on vakioitu ja tulostaso hyväksytty kontrolleilla, jotta saamamme tulokset ovat luotettavia. Tutkimuksessa käytettiin samaa LOT-erää reagensseissa koko prosessin ajan. Siemens healthineers Atellica® Solution –analysaattori käyttää laitevalmistajan valmiita liuoksia, mukaan lukien reagenssi, vakiointi ja kontrolliliuokset. Vakioliuos on mittanormaali, jonka tulos tiedetään ja johon analysoitavan näytteen tulos perustuu. Päivittäiskontrolleilla, joiden tulostaso tiedetään, varmistetaan vakioinnin onnistuminen ja laitteen toiminta. Laitevalmistajan suositus on käyttää vähintään kahta eri kontrollitasoa (matala ja korkea) laadunvalvontaan. (Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc); Åkerman & Jokela 2010: 47.) Tutkimukseen käytetty näytemateriaali, litiumhepariini plasmanäytteet eivät olleet silmämääräisesti hemolyyttisiä, lipeemisiä tai ikteerisiä. Tutkimuksen luotettavuutta heikensi pooli 2 **B** (24 h) ja **C** (1 vk) näytteiden tulokset, jotka viittaavat siihen, että näytteet olisivat kontaminoituneet.

Rinnakkaisnäytteitä ei tässä tutkimuksessa tehty. Yhteistyössä tutkimuksen tilaajan kanssa katsottiin, että se ei ole välttämätöntä, koska luotettavia tuloksia hyvälle otos

määrälle saatiin kuitenkin aikaiseksi. Muutamia poikkeava tulos nähdään tutkimustuloksissa, mutta ne olivat hyvin huomattavissa tulosten perusteella. Yksittäinen poikkeava tulos ei tässä tutkimuksessa vaikuta itse kokonaistulokseen.

Tutkimustuloksista selvisi, että osa näytteistä, jotka oli säilytetty -20°C lämpötilassa oli ALAT-entsyymien pitoisuus laskenut alle laitteen mittausalueen $< 9\text{ U/l}$. Näissä tuloksissa suhteellinen ero % laskelma ei ole täysin pitävä, koska tulos on laskettu 9 U/l mukaan, vaikka tulos oli tämän alle.

7.4 Johtopäätökset

Opinnäytetyössä tarkasteltiin lämpötilan vaikutusta ALAT-entsyymi litium-hepariiniplasma näytteiden säilyvyyteen -20°C ja -70°C . Tulosten perusteella pystyimme toteamaan, että tämän tutkimuksen perusteella -20°C lämpötilassa säilytetty ALAT-plasmanäyte ei ole luotettavasti analysointikelpoinen. Kaikissa säilytyslämpötiloissa ALAT-pitoisuus laski huomattavasti säilytyksen aikana ja ero % olivat yli $10,1\%$. Tutkimuksen perusteella voidaan todeta että -70°C lämpötilassa säilytetty ALAT-plasmanäyte pysyi luotettavasti analysointikelpoisena. Aika vaikutti kahden viikon sekä yhden kuukauden kohdalla nostamalla ALAT-pitoisuutta näytteessä hieman, mutta näyte säilyi tästä huolimatta luotettavasti analysointikelpoisena ja ero % alle $10,1\text{ U/l}$.

Tutkimustulokset ovat osittain ristiriidassa aikaisemman tutkimuskirjallisuuden kanssa, joissa osassa tutkimustuloksien perusteella ALAT-entsyymi säilyy seerumissa hyvin -20°C lämpötilassa pitkiäkin aikoja. Tutkimuksissa, joissa säilytyslämpötila on matala -70°C ovat tulokset samansuuntaisia tämän opinnäytetyön tutkimustulosten kanssa. Aikaisempia tutkimuksia ALAT-entsyymien säilytyksestä, jossa näytemateriaalina on plasma ei juuri löytynyt, joten vertailua ei tähän tutkimukseen pystytty tekemään. Jotta näille tutkimustuloksille saataisiin vahvistusta, tarvitaan lisää ja laajempia tutkimuksia aiheesta. Opinnäytetyön tutkimustulokset ovat tilastollisesti merkitseviä, mutta eivät välttämättä kliinisesti merkitseviä potilaan hoidon kannalta, varsinkaan jos ALAT-entsyymien pitoisuus on normaaliviiterajoissa.

7.5 Kehittämisehdotukset ja ammatillinen kasvu

Opinnäytetyössä tutkimme ja seurasimme, kuinka litium-hepariiniplasman ALAT-pitoisuuteen vaikutti säilytys kahdessa eri miinus lämpötilassa yhden kuukauden ajan. Tämä opinnäytetyön tutkimus jatkuu vielä tästä opinnäytetyöntekijöiden osuudesta eteenpäin vuoden päästä, jolloin toimeksiantajan tutkimusryhmä analysoi viimeiset F-näytteet (1

vuosi). Silloin saadaan pitkällä aikavälillä lisätietoa, kuinka ALAT-entsyymien pitoisuus säilyy näinkin pitkän ajan jakson -20°C ja -70°C lämpötilassa.

Laitevalmistaja Siemens healthineers Atellica® Solution –analysointimenetelmään mukaan ALAT-määrityksessä eroteltu plasma tai seerumi näyte voidaan säilyttää enintään 7 vuorokauden ajan $2-8^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa tai 30 päivää pakastettuna -20°C (Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLC)). Tämän tutkimuksen tulokset olivat ristiriidassa laitevalmistajan ohjeen kanssa, joten jatkotutkimuksena olisi mielenkiintoista tutkia säilyykö litiumhepariiniplasman ALAT-pitoisuus, kuinka kauan $2-8^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa, milloin ALAT-entsyymien pitoisuus laskee, niin ettei se ole enää luotettavasti analysointikelpoinen.

Tämän opinnäytetyön tutkimustulosten perusteella ALAT-entsyymien säilyvyys oli epävakaa -20°C litium-hepariiniplasmassa. Lisätutkimusehdotuksena on toistaa tämä tutkimus seeruminäytteistä, koska osassa aikaisempia tutkimuksia oli tulosten perusteella ALAT-entsyymi säilynyt hyvin seeruminäytteissä.

Meille opinnäytetyöntekijöille tämä opinnäytetyö oli kokonaisvaltainen kokemus ja iso projekti. Aloitimme opinnäytetyön laboratoriotyöskentelyn näytteiden käsittelystä, jossa hyvä suunnitelmallisuus tuli esille kuinka tärkeätä oli osata havainnoida näytteiden merkitseminen. Työskentelyn tarkkuus sekä huolellisuus niin monen näytteen käsittelyssä kerrallaan, loi myös omat paineensa. Tämä asia toistui jokaisena analysointi päivänä, mutta isoimman haasteen toi opinnäytetyön aloituspäivä, niin monen näytteen ja vaiheiden käsittelyiden vuoksi. Tämän lisäksi oman oppimisen kehitystä esiintyi itse kirjoitusosuudessa, jossa piti tuottaa tekstiä kielipöytäkirjoiksi oikein ja avata tutkimustuloksia sekä etsiä luotettavaa lähdetietoa, johon tutkimuksen tuloksia verrattiin. Excel Microsoft taulukkolaskenta ohjelma toi myös uutta kokemusta yrittää itsenäisesti toteuttaa koulussa opittua ja haastaa itsensä siinä. Opinnäytetyö projektina oli opettavainen ja merkityksellinen sekä tärkeä meidän tulevalle ammatilliselle kehitykselle.

Lähteet

Aalto, Nora 2019. Tiesitkö, että laboratorionäytteet ovat kovia reissaamaan? Synlab. <<https://www.synlab.fi/tiesitko-etta-laboratorionaytteet-ovat-kovia-reissaamaan/>>. Viitattu 28.9.2021.

Alaniiniaminotransferaasi (P-ALAT) 2021. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03071>>. Viitattu 27.9.2021.

Alanine Aminotransferase P5P (ALTPLc). Siemens Healthineers menetelmäohje.

Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017. Bioanalytikkoliitto. <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalytikko/bioanalyytikon-koulutus/bioanalyytikon-lupaus-ja-eettise/>>. Viitattu 5.4.2022.

Cray, Carolyn & Rodriguez, Marilyn & Zaias, Julia Altman, Norman H 2009. Effects of Storage Temperature and Time on Clinical Biochemical Parameters from Rat Serum. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2679668/>> Viitattu 19.9.2021.

Cuhadar, Serap & Koseoglu, Mehmet & Atay, Aysenur & Dirican, Ahmet 2013. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3900085/>>. Viitattu 19.9.2021.

European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). <https://biologicalvariation.eu/meta_calculations>. Viitattu 1.2.2022.

Grankvist, Kjell & Gomez, Ruben & Nybo, Mads & Lima-Oliveira, Gabriel & Von Meyer, Alexander 2018. Preanalytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma. <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dx-2018-0037/html>>. Viitattu 20.9.2021.

Huslab ohjekirja 2021. Alaniiniaminotransferaasi, plasmasta. Päivitetty 4.2.2021. <<https://huslab.fi/ohjekirja/1024.html>>. Viitattu 27.9.2021.

Ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden ennakoarviointi Suomessa <https://tenk.fi/sites/default/files/2021-01/Ihmistieteiden_eettisen_ennakoarvioinnin_ohje_2020.pdf>. Viitattu 26.9.2021.

Jokelainen, Kalle 2016. Suurentuneet maksa-arvot - mitä sitten? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo13315>>. Viitattu 31.1.2022

Kankkunen, Päivi & Vehviläinen-Julkunen, Katri 2013. Tutkimus hoitotieteessä. Sanoma Pro Oy.

Lippi, Giuseppe 2018. Internal quality assurance of HIL indices on Roche Cobas c702. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6034854/>>. Viitattu 1.2.2022.

Liu, Zhengtao & Que, Shuping & Xu, Jing & Peng, Tao 2014. Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept: A Review. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4081315/>>. Viitattu 30.3.2022.

Mathew, Joscilin & Sankar, Parvathy & Varacallo, Matthew 2021. Physiology, Blood Plasma. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>>. Viitattu 30.3.2022.

Matikainen, Anna-Mari & Miettinen, Marja & Wasström, Kalle 2016. Näytteenottajan käsikirja. Edita Publishing Oy.

Nordlab 2017. Alaniiniaminotransferaasi, plasmasta. Nordlab. Päivitetty 15.12.2017. <<http://oyslab.fi/ohjekirja/1024.html>>. Viitattu 19.10.2021.

Ny-kopp, Johanna 2015. ALAT kertoo, maksasi voinnista. Potilaan lääkärilehti. <<https://www.potilaanlaakarilehti.fi/uutiset/alat-kertoo-maksasi-voinnista/>>. Viitattu 19.10.2021

Schönberg, Kalle 2019. Keskussairaalat myyvät laboratorioitaan säästöjen toivossa – HUS ja maakuntien oma yhtiö kilpailevat reviiiristä. Yle. <<https://yle.fi/uutiset/3-10769605>>. Viitattu 28.9.2021.

Shimizu, Yoshihisa & Ichihara, Kiyoshi 2019. Elucidation of stability profiles of common chemistry analytes in serum stored at six graded temperatures. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30860975/>>. Viitattu 1.2.2022.

Stevens, Victoria L. & Hoover, Elise & Wang, Ying & Zanetti, Krista A. 2019. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. <<https://www.mdpi.com/2218-1989/9/8/156/htm#B17-metabolites-09-00156>>. Viitattu 30.3.2022.

Synlab. Alaniiniaminotransferaasi. <<https://www.synlab.fi/tietopankki/alaniiniaminotransferaasi-s-alat/>> Viitattu 27.9.2021.

Synlab laboratoriotutkimusohjekirja 2021. Alaniiniaminotransferaasi (S-ALAT, 2014 P-ALAT) <<https://www2.synlab.fi/laboratoriokasikirja/tutkimuskuvaukset/alaniiniami-noalat/>>. Viitattu 27.9.2021.

Tapola, Hilka 2004. Kliiniset Laboratoriotutkimukset. WSOY.

Tietosuojalaki 2018. Finlex. <<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2018/20181050>>. Viitattu 26.9.2021.

Tuck, Melissa K. & Chan, Daniel W. & Chia, David & Godwin, Andrew K. & Grizzle, William E. & Krueger, Karl E. & Rom, William & Sanda, Martin & Sorbara, Lynn, Stass, Stanford & Wang, Wendy & Brenner, Dean E. 2010. Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2655764/>>. Viitattu 30.3.2022

Tutkimuslupa, opinnäytetyön tutkimuslupa ja tietolupa. HUS. <<https://www.hus.fi/tutkimus-ja-opetus/tutkijan-ohjeet/tutkimuslupa-opinnaytetyon-tutkimuslupa-ja-tietolupa>>. Viitattu 25.9.2021.

Veri. Peda oppimateriaalit. <<https://peda.net/oppimateriaalit/e-oppi/peruskoulut/tampere/hatanp%C3%A4%C3%A4n-koulu/biologia/vuorinen/e9i/veri>>. Viitattu 30.3.2022.

Veritutkimukset ja veren aineosat 2022. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk02011>>. Viitattu 30.3.2022.

Vita laboratorioskikirja 2021. alaniiniaminotransferaasi. <<https://vita.fi/laboratorioskikirja/tutkimus/13>>. Viitattu 19.10.2021.

Åkerman, Kari & Jokela, Hannu 2010. Entsymaattiset menetelmät. Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia. 3.painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. Viitattu 1.2.2022

