



Mette Koivukangas

ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattorin käyttöönotto vainajatutkimukseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

09.11.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Mette Koivukangas
Otsikko:	ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattorin käyttöönotto vainajatutkimuksiin
Sivumäärä:	34 sivua + 5 liitettä
Aika:	09.11.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Oikeuskemisti, Jari Nokua Laboratoriopäällikkö, Raimo Ketola Lehtori, Mia Ruismäki

Häkämyrkytyksestä aiheutuva karboksihemoglobiinin (COHb) korkea pitoisuus veressä on yksi yleisimmistä kuolemaan johtavista myrkytyksen aiheuttajista. Karboksihemoglobiinin pitoisuus määritetään kokoverinäytteestä oksimetrisesti, usean aallonpituuden absorptioon perustuvaa spektroskopiaa hyödyntäen. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida THL:n oikeuskemianyksikön käyttöön ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori korvaamaan käytöstä poistuva vanha oksimetrialaitte.

Laboratio-oksimetria tarvitaan oikeuslääketieteellisen kuolemansyynselvityksen COHb-mittauksia varten, joiden avulla poissuljetaan häkämyrkytys vainajan kuolinsyynä. ABL90 Flex Plus -laitte on automatisoitu analysaattori, ja sitä käytetään myös muissa Pohjoismaissa vainajista tehtäviin COHb-määrittäisiin. Kliiniseen potilastyöhön tarkoitetuille laitteille vainajanäytteet ovat haastavia matriiseja niiden huonon laadun ja vaihtelevan koostumuksen vuoksi. Myös säilöntäaineet tuottavat ABL90 Flex Plus -laitteelle ongelmia. Kaikista toimivimmaksi matriisiksi validoinnin aikana osoitautui säilöntäaineettoman verinäytteen vesilaimennos, jossa on puolet näytettä ja puolet laboratoriovettä. Muillekin tarkastelun kohteena olleille matriiseille kehitettiin niille soveltuvat näytteenkäsittelymenetelmät ja ne hyväksyttiin toissijaisiksi näyttematriiseiksi.

Menetelmän oikeellisuus määritettiin biasprosenttina, joka oli -9,3 %. Määrittelyn sisäinen toistotarkkuus sekä välitason toistotarkkuus tutkittiin suhteellisena keskihajontana, ja ne olivat kaikki tutkitut matriisit mukaan luettuina 2,7 % ja 3,4 %. Alemmaksi raportointirajaksi vainajanäytteille valittiin lähdetietojen perusteella 5 % ja ylemmäksi 75 % COHb:n suhteen, vaikka ABL90 Flex Plus -laitte toimii valmistajan mukaan suuremmallakin mittausalueella. Menetelmän laajennettu mittauserävarmuus 95 %:n luottamustasolla 0–10 % karboksihemoglobiinia sisältävillä näytteillä on 49 % ja 10–75 % sisältävillä näytteillä 19 %. Validoinnin aikana tehtiin kuitenkin havainto, että verinäytteen COHb-pitoisuus laskee, mikäli näyte on suorassa kosketuksessa ilman kanssa ja tämä täytyy jatkossa huomioida analyysin näytteenkäsittelyssä. Havainto myös selittää menetelmän suuren epävarmuusalueen sekä biasprosentin. ABL90 Flex Plus -laitte soveltuu vainajien verinäytteistä tehtäviin häkämäärityksiin hyvin ja täyttää sille asetetut vaatimukset oikeuskemian yksikössä.

Avainsanat: häkä, COHb, oksimetria, vainajanäyte

Abstract

Author: Mette Koivukangas
Title: ABL90 Flex Plus Blood Gas Analyzer Validation to Postmortem Analysis
Number of Pages: 34 pages + 5 appendices
Date: 9 October 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Instructors: Jari Nokua, Forensic toxicologist
Raimo Ketola, Laboratory manager
Mia Ruismäki, Senior lecturer

Carbon monoxide is one of the most common causes of fatal poisoning. The poisoning is caused by carboxyhemoglobin, and it is determined oximetrically from a whole blood sample, using absorption spectroscopy. The purpose of this thesis work was to validate the ABL90 Flex Plus blood gas analyzer to replace the old CO-oximeter at THL's forensic chemistry laboratory.

The ABL90 Flex Plus is an automatic analyzer, which is also used in other Nordic countries to exclude CO-poisoning as the cause of death. For many devices, postmortem samples are challenging matrices due to their poor quality and variable composition. Preservatives cause problems for the ABL90 Flex Plus device and the most effective matrix turned out to be a water dilution of a preservative-free blood sample with one half of the sample and the other half of water. Alternative postmortem blood matrices were tested and accepted to be used as secondary sample material.

The correctness was determined as a bias percentage, which was -9.3 %. The intra-assay repeatability and inter-assay repeatability were examined as relative standard deviations and were 2.7 % and 3.4 % including all examined matrices. 5 % and 75 % were chosen to be the reporting limits for COHb, based on source data. The extended measurement uncertainty of the method at a 95 % confidence level with a carboxyhemoglobin concentration of 0–10 % is 49 % and at the concentration level from 10 % to 75 % of COHb it is 19 %. During the validation it was observed that the COHb concentration of the blood sample decreases if the sample is in direct contact with air and this must be considered in the sample processing during the analysis. This observation also explains the large uncertainty range and the bias percentage of the method.

In summary, it can be concluded that the ABL90 Flex Plus device is well suited for carbon monoxide determinations made from blood samples in the postmortem analysis and meets the requirements set by the forensic chemistry unit.

Keywords: carbon monoxide, oximetry, postmortem analysis

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Häkämääritys	3
2.1	Hiilimonoksidin vaikutukset elimistössä	3
2.2	Häkämäärityksen periaate	5
2.3	Vainajan kudokset näytematriiseina	7
3	ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori	9
4	Menetelmänkehitys oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa otetuille verinäytteille	13
5	ABL90 Flex Plus -laitteen validointi	16
5.1	Tarkkuus	17
5.1.1	Oikeellisuus	17
5.1.2	Määrityksen toistotarkkuus	21
5.2	Mittausalue	28
5.3	Analyytin stabiilius näytteenkäsittelyn ja mittauksen aikana	28
5.4	Vertailu vanhan laitteen kanssa	30
5.5	Mittausepävarmuus	32
6	Päätelmät	32

Liitteet

Liite 1: Validointiparametrit

Liite 2: ABL90 Flex Plus -laitteen mittaustuloksen vertaaminen laaduntarkkailunäytteen tunnettuun pitoisuuteen

Liite 3: Veripullo- ja veriputkimatriisien vertailu

Liite 4: Laitteiden vastaavuuden tutkiminen t-testillä

Liite 5: Mukit-tulosraportit

Lyhenteet

AM-näyte	<i>Ante mortem-näyte.</i> Ennen kuolemaa kerätty potilasnäyte, jota käytetään kuolemansyynselvityksessä.
COHb	<i>Carboxyhemoglobin. Karboksihemoglobiini.</i> Hemoglobiini, jossa happimolekyylin tilalle on sitoutunut hiilimonoksidi.
IR	<i>Infra-red, infrapunainen.</i> Näkyvän valon aallonpituutta suuremmalla aallonpituudella säteilevä valo.
tHb	<i>Total hemoglobin. Kokonaishemoglobiini.</i> Veren kaikkien hemoglobiinityyppien yhteenlaskettu pitoisuus.
THL	<i>Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.</i> Sosiaali- ja terveysministeriön alainen tutkimuslaitos, joka tutkii ja seuraa väestön hyvinvointia ja terveyttä, sekä kehittää toimenpiteitä niiden edistämiseksi.
MethHb	<i>Methemoglobiini, ferrihemoglobiini.</i> Harvinainen hemoglobiinityppi, jossa raudan hapetusluku on +II sijaan +III. MethHb ei osallistu hapen kuljettamiseen veressä, ja on siksi haitallista elimistössä.
PM-näyte	<i>Post mortem-näyte.</i> Kuoleman jälkeen oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen aikana kerätty näyte.
RSD	<i>Relative standard deviation, suhteellinen keskihajonta.</i> Ilmaistaan prosentteina ja kuvaa ryhmän keskimääräistä hajontaa.
Vpl	<i>Veri, pullossa.</i> Pulloveri, eli halkaisijaltaan normaalia näyteputkea suurempaan muoviseen näyteputkeen kerättävä säilöntäaineeton verinäyte. Yksi oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa kerätyistä matriiseista.

Vpt *Veri, putkessa.* Putkiveri, muoviseen näyteputkeen oikeuslääketeellisessä ruumiinavauksessa kerättävä säilöntäaineena natriumfluoridia sisältävä verinäyte.

1 Johdanto

Häkä on yksi yleisimmistä kuolemaan johtavista myrkytyksen aiheuttajista niin Suomessa kuin muuallakin maailmassa. Palokaasu- ja häkämyrkytys on välitön kuolinsyy lähes puolella tulipalon uhreista [1], ja esimerkiksi vuonna 2019 tulipaloihin kuoli Suomessa 48 ihmistä [2]. Tulipalokuolemista yksi oikeuslääketieteellisessä kuolemansyynselvityksessä tutkittavista analyyteistä on veren karboksihemoglobiini (COHb) -pitoisuus, mikäli on aiheellista olettaa henkilön menehtyneen häkämyrkytyksen seurauksena. Veren COHb-pitoisuus tutkitaan myös, mikäli palaneesta rakennuksesta löytyneen vainajan epäillään menehtyneen jo ennen tulipaloa. Tällaisessa tilanteessa veren häkäpitoisuuden määrittäminen on tärkeää etenkin, jos asiassa on syytä epäillä rikosta. Vainajan veren COHb tutkitaan lisäksi aina, mikäli häkämyrkytys on olosuhteet huomioiden muulla tavoin mahdollinen kuolinsyy.

Oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen tehdään silloin, kun kuoleman syy ei ole täysin selvä. Tällainen tilanne on esimerkiksi, kun kyseessä on kuolemaan johtanut tapaturma, itsemurha, hoitovirhe, kun henkilö löydetään kotoaan menehtyneenä, tai kun kuolema on ollut muulla tavoin yllättävä. [3.] Vainajan kuolinsyy selvitetään oikeuslääketieteellisen menettelyn mukaisesti, ja tarvittaessa vainajalle tehdään oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus. Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaustoiminta kuuluu Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokselle (THL), joka myös valvoo ja ohjaa oikeuslääketieteellistä kuolemansyyn selvittämistä. [4.] Ruumiinavauksen suorittaa oikeuslääkäri, jolle THL:n alaisuudessa toimiva oikeuskemialyksikkö tuottaa ruumiinavauksessa saatujen näytteiden laboratoriotulokset kuolemansyynselvitystä varten. Oikeuskemiallinen tutkimus tehdään noin 12 %:lle kaikista kuolleista [5].

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida THL:n käyttöön vainajien verinäytteiden karboksihemoglobiinipitoisuuden määrittämistä varten Radiometerin ABL90 Flex Plus -verikaasuanalyysilaitteita sekä kehittää näytteenkäsittelymenetelmät usealle eri verimatriisille. Laite hankittiin oikeuskemialyksikköön ensisijaisesti korvaamaan käytöstä poistuva vanha oksimetrialaitte. Validointi tehtiin

THL:n sisäisen ohjeen ”Kemiallisten menetelmien validointiopas” ja sitä täydentävän oikeustoksikologiayksikön ”Validointiohje (TO-008)” mukaan. Validointisuunnitelmassa oleva taulukko validointiparametreista on esitetty liitteessä 1. Validointisuunnitelma arkistoitii kokonaisuudessaan THL:n sähköisiin järjestelmiin.

Opinnäytetyön aikana pyrittiin luomaan näytematriiseille sopivat näytteenkäsittelymenetelmät, joilla olisi mahdollista saada mahdollisimman luotettavia ja tasalaatuisia tuloksia, vaikka eri tapausten ruumiinavauksesta saatujen näytteiden, sekä näytteiden laadun välillä on huomattavia eroja. Kuvassa 1 on esitetty tarkastelun kohteena oleva verikaasuanalysaattori.



Kuva 1. ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori [6, kansilehti]

2 Häkämääritys

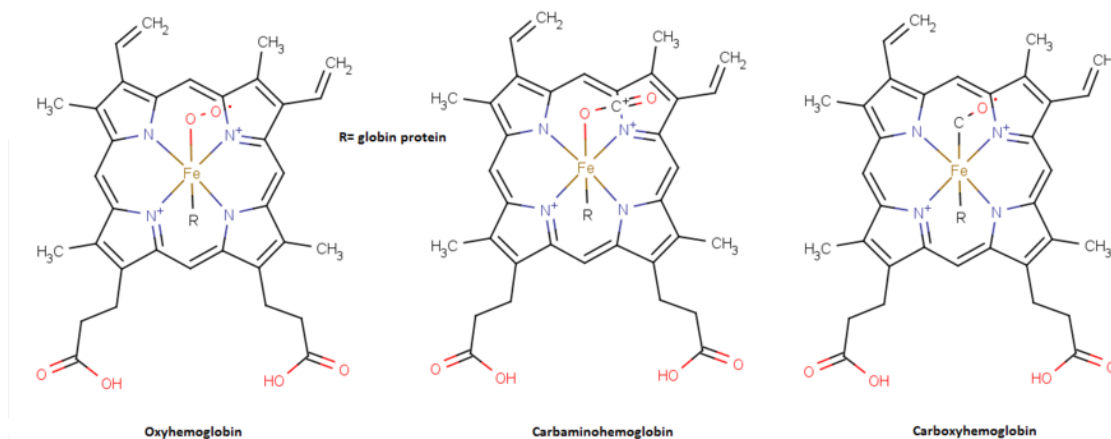
Oikeuskemian yksikössä vainajien häkämyrkytyksen toteamisessa käytettävä menetelmä perustuu oksimetriaan. Häkämääritykseen käytettävän näytteen täytyy sisältää elimistön punasoluja, sillä punasolujen pinnan rakenneaine hemoglobiini on se veren osa, johon hiilimonoksidi sitoutuu. Tämän takia kokoveri on ainoa häkämääritykseen soveltuva matriisi. Näytteen on oltava homogeeninen ja tasalaatuinen, eikä se saa sisältää huomattavia määriä spektrometrissa määrittä haittaavia komponentteja, kuten rasvaa.

2.1 Hiilimonoksidin vaikutukset elimistössä

Hiilimonoksidi eli häkä sitoutuu happeen verrattuna punasolujen hemoglobiiniin noin 240-kertaisella affiniteetilla muodostaen karboksihemoglobiinia. Karboksihemoglobiini ei itsessään ole myrkyllistä, mutta se vähentää veren hapenkuljetuskapasiteettia radikaalisti. Soluhengityksen salpautuminen alkaa, kun COHb-pitoisuus veressä kasvaa 40 %:iin, ja 70-prosenttinen veren karboksihemoglobiinipitoisuus aiheuttaa välittömän kuoleman. Kuitenkin jo 15 %:n COHb-pitoisuus aiheuttaa oireita, kuten päänsärkyä, pahoinvointia, huimausta, näköhäiriöitä ja sekavuutta. [1.]

Hengitysilmassa oleva hiilimonoksidi aiheuttaa myrkytystilan ja tajuttomuuden jo melko pieninä pitoisuuksina. Turvaraja hiilimonoksidin suhteen hengitysilmassa on vain 0,0025–0,005 %, ja jo 0,2 %:n häkäpitoisuus aiheuttaa nopeasti tajunnanmenetyksen ja kuoleman. Häkää ei ole mahdollista aistinvaraisesti tunnistaa, sillä se on hajuton, mauton ja väritön kaasu, joka ei myöskään ärsytä hengitysteitä. Mikäli palaminen tapahtuu niukkahappisissa olosuhteissa, hiilimonoksidin muodostuminen moninkertaistuu, ja jo muutama hengenveto palokaasuja sisältävää ilmaa aiheuttaa tajunnanmenetyksen. [1.] Tämän vuoksi huoneilman häkäpitoisuuden pysymistä kriittisen tason alapuolella on aiheellista seurata häkävaroitimella, mikäli tilassa on mahdollisia hiilimonoksidin lähteitä, kuten tulisi- sija. Karboksihemoglobiinin rakenne-ero hapen ja hemoglobiinin

muodostamaan oksihemoglobiiniin, sekä hemoglobiinin ja hiilidioksidimolekyylin muodostamaan karbaminohemoglobiiniin on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Oksihemoglobiinin, karbaminohemoglobiinin ja karboksihemoglobiinin rakennekaavat. [7.]

Hiilimonoksidi syntyy palamistuotteena kaikilla fossiilisilla polttoaineilla. Se sekoittuu hengitysilmaan vaivattomasti, jolloin hään inhalaatiota alkaa tapahtua välittömästi. Hiilimonoksidi siirtyy helposti keuhkorakkuloista vereen aiheuttaen hapenpuutteen eli hypoksemian, ja se liikkuu hemoglobiinin kuljettamana edelleen kudoksiin, joissa se aiheuttaa kudosten happikadon eli kudoshypoksian. Häkämyrkytys vaikuttaa pääasiassa runsaasti happea kuluttaviin solukoihin, kuten esimerkiksi aivo- ja sydänkudoksen soluihin. Aivohypoksian kanssa samanaikaisesti potilaalle voi ilmaantua sydämen happivajeen aiheuttamia EKG-muutoksia, kammioperäisiä rytmihäiriöitä sekä pumppaushäiriö. Karboksihemoglobiinin ongelmallisuutta elimistössä lisää sen allosteerinen vaikutus, jolloin hemoglobiiniin sitoutunut happi irtoaa solujen käyttöön normaalia heikommin. [1.] Lisäksi hiilimonoksidin sitoutuminen hemoglobiiniin estää soluja siirtämästä aineenvaihduntansa lopputuotetta hiilidioksidia hemoglobiinin kuljetettavaksi pois elimistöstä [8, s. 515].

Etenkin kaupunkiympäristössä moottoriliikenne on merkittävä hengitysilman hiilimonoksidin lähde, jonka vuoksi asukkailla voi olla jatkuva häkäaltistus. Tupakoimattomilla aikuisilla häkämyrkytyksen rajana pidetään 5 %:sta veren COHb-

pitoisuutta, ja tupakoivilla 10-prosenttista veren COHb-pitoisuutta. [1.] Yli 50 %:sta veren karboksihemoglobiinipitoisuutta pidetään yleisesti letaalina, mutta esimerkiksi henkilön ikä ja terveydentila voivat aiheuttaa kuoleman alhaisemmilakin veren karboksihemoglobiinipitoisuuksilla. [8 s. 515]. Karboksihemoglobiini on melko stabiili yhdiste, ja se poistuu elimistöstä hitaasti. Normaaliallakin hengitettäessä hemoglobiiniin sitoutuneesta hiilimonoksidista poistuu noin 15 % tunnissa, ja 100-prosenttista happea hengitettäessä noin 50 % tunnissa. [1.]

Kehossa muodostuu luonnostaan pieniä pitoisuuksia hiilimonoksidia aineenvaihdunnan seurauksena, ja se toimii todennäköisesti välittäjäaineena elimistössä. Hiilimonoksidin on todettu eläinkokeiden perusteella olevan myös anesteetti, ja pienet häkäpitoisuudet aiheuttavat keskushermoston elektrofysiologista vasteettomuutta, vaikka aivohypoksiaa ei vielä esiinny. On siis mahdollista, että myrkytystilanteessa syntyvä hypoksia johtuu merkittävältä osin hallitsemattomaan anestesia-tilaan liittyvästä riittämättömästä hengityksestä ja hengitystien tukkeutumisesta. [1.]

2.2 Häkämäärityksen periaate

Häkämääritys tutkitaan oksimetrisesti potilaan veren karboksihemoglobiinipitoisuutena. Oksimetriassa näyte analysoidaan spektrofotometrisesti absorptioon perustuvaa spektroskopiaa käyttäen. Verinäytteestä mittauksen tekevä laboratorio-oksimetri (engl. CO-oximeter) on sormenpäähän sijoitettavaa pulssioksimetriä (engl. pulse oximeter) monipuolisempi analyysiväline veren hemoglobiinin tyypitystä sekä niiden pitoisuuksien analysointia varten. Määritys perustuu kokonaishemoglobiinin (tHB) ja karboksihemoglobiinin suhteeseen, ja pitoisuus prosenttiosuutena lasketaan kaavan 1 [9, s. 2, merkintöjä muutettu] mukaisesti.

$$\% COHb = \frac{[COHb] \cdot 100}{[O_2Hb] + [HHb] + [MetHB] + [COHb]}$$

jossa (1)

O₂Hb on veren oksihemoglobiinin osuus
HHb on veren deoksihemoglobiinin osuus
MetHb on veren methemoglobiinin osuus
COHb on veren karboksihemoglobiinin osuus.

Laskenta perustuu siihen, että mitattujen absorbanssien arvot eri aallonpituuksilla kerrotaan laitteen muistissa olevilla vakioilla, jotka on saatu analysoimalla kunkin hemoglobiini muodon suhteen 100-prosenttinen näytematriisi. Siten saadaan lasketuksi kunkin hemoglobiinityypin pitoisuus veressä ja kokonaishemoglobiini on näiden pitoisuuksien summa. [10, s.1.]

Pulssioksimetri ei tarvitse erillistä verinäytettä, vaan sen toiminta perustuu kudokset läpi vereen emittoitavaan kahteen aallonpituuteen: punainen valo noin 660 nm:n aallonpituudella sekä lähellä infrapunaisten (Infra-red, IR) aallonpituuksia oleva valo noin 940 nm:n aallonpituudella. Happipitoisen veren oksihemoglobiini absorboi paremmin IR-aallonpituuksia ja huonommin punaisen aallonpituuksia kuin vähähappisen veren deoksihemoglobiini. Tämä on mahdollista huomata myös silmämääräisesti, sillä hapekas valtimoveri on sävyltään kirkkaamman punaista, kuin hiilidioksidipitoinen laskimoveri. [11.] Tähän eroavaisuuteen perustuen pulssioksimetrillä on mahdollista seurata reaaliajassa veren happisaturaatiota, mutta se ei anna yksityiskohtaisempaa informaatiota eri hemoglobiinityypien osuuksista veressä, eikä sillä ole mahdollista esimerkiksi todeta potilaalla olevaa häikämyrkytystä. Pulssioksimetrillä tehty määrittäminen on myös epätarkka, sillä epätavalliset hemoglobiinityypit, kuten karboksihemoglobiini sekä kolmenarvoista rautaa (Fe³⁺) kahdenarvoisen (Fe²⁺) sijaan sisältävä methemoglobiini (MetHb) [12], absorboivat myös jonkin verran valoa mitatuilla aallonpituuksilla. [13.] Laboratorio-oksimetri mittaa verinäytteestä kaikki veren hemoglobiinityypit useampaa valon aallonpituutta hyödyntäen kuin pulssioksimetri, ja se ilmoittaa tulokset prosenttiosuuksina. Mikäli liuoksessa on useita eri aallonpituuksilla valoa absorboivia yhdisteitä, Lambert-Beerin lain mukaan

jokaisen yhdisteen pitoisuus on suoraan verrannollinen kyseiselle yhdisteelle ominaisen aallonpituuden absorbanssiin, sekä näytteen läpi kulkevan valotien pituuteen [14]. Näin eri hemoglobiinityyppien osuudet on mahdollista määrittää verinäytteestä tarkasti.

2.3 Vainajan kudokset näytematriiseina

Karboksihemoglobiinin on todettu olevan melko pysyvä yhdiste. Sen pitoisuus on mahdollista analysoida myrkytystapauksien todentamiseksi useaa valon aallonpituutta hyödyntävällä oksimetrisellä menetelmällä luotettavasti pitkänkin ajan kuluttua kuolemasta, vaikka kehon kuolemanjälkeiset reaktiot olisivat käynnistyneet. [8, s. 516.] Koska analyysin tarkoituksena on poissulkea häikämyrkytyksen aiheuttama kuolema, menetelmän voidaan todeta olevan tarpeeksi tarkka kliinisille näytteille tarkoitettujen menetelmien mittaasepävarmuutta suuremmallakin mittaasepävarmuusalueella. Lisäksi koska määrittämisellä tutkitaan vain COHb:n osuutta kokonaihemoglobiinista, vainajaverinäytteiden usein hyvinkin vaihteleva konsentraatio ei vaikuta mittaustulokseen. Koska verinäytteen tiheys on merkityksetön tekijä mittaustuloksen kannalta, näytteen esikäsittelylle asetettavat vaatimukset eivät ole yhtä kriittisiä kuin useimmissa analyysimenetelmissä.

Vainajanäytteet ovat haastavia matriiseja luotettavaan laboratoriotutkimukseen niiden epätasaisen laadun vuoksi. Vainajanäytteet eroavat kliinisistä eläviltä ihmisiltä otetuista näytteistä usein laadultaan merkittävästi, sillä kuoleman jälkeen kerätyissä näytteissä esiintyy aina säilytyksestä aiheutuneita muutoksia kuten jonkinasteista hemolyysiä, sekä usein myös kehossa tapahtuvien kuolemanjälkeisten prosessien aiheuttamia muutoksia. Näihin lukeutuu muun muassa erilaiset hajottajien toiminnan hallitsemattomasta lisääntymisestä johtuvat muutokset kudoksissa, sekä verisolujen sedimentaatio, hyytymien muodostuminen, kudostenestekontaminaatio ja mätänemisprosessin tai bakteerikasvun aiheuttamat muutokset. Näytteeksi kerätty veri voi olla olosuhteista riippuen lisäksi konsentroitunut ruumiin kuivumisen seurauksena tai laimentunut osmoosin vaikutuksesta, mikäli vainaja on löytynyt vesistöistä. [15, s. 40.]

Myös näytteenkeräystapa on tärkeä, sillä väärin kerätty kudus voi aiheuttaa lisäkontaminaatioita jo ennestäänkin heikkolaatuiseen näytteeseen ja vääristää tulosta. Esimerkiksi rasva muuttuu kuolemanjälkeisissä reaktioissa juoksevaksi ja öljymäiseksi [16, s. 114], jolloin se voi kulkeutua muiden kudosten alueelle ja liata kuolemansyynselvitystä varten kerättävät näytteet. On tavallista, että ruumiinavauksen yhteydessä näytteenkeräystavat vaihtelevat vainajan ruumiin kunnan mukaan, jolloin hajoamistilassa olevista vainajista kerättyjen näytteiden kontaminaatoriski on suurentunut ja mahdollinen tulosten vääristymä täytyy ottaa huomioon [15, s. 39] kuolemansyynselvitystä laadittaessa. Verinäyte kerätään vainajilta reisilaskimosta käsivarren laskimon sijaan, eikä sitä oteta pistämällä ihon lävitse, vaan vatsaontelon sisäpuolelta. [16, s.144] Näytteenottopaikan ei ole todettu vaikuttavan analyysin lopputulokseen.

Post mortem -näytteet (PM-näytteet, kuoleman jälkeen kerätyt näytteet) saattavat tuottaa tuloksia, jotka eivät ole verrannollisia kuoleman hetkellä elimistössä esiintyneisiin pitoisuuksiin, sillä keho jatkaa haitallisten yhdisteiden käsittelyä ja poistoa niin kauan kuin elimistö jatkaa mekaanisesti toimintaansa, vaikka aivo-kuolema olisikin jo tapahtunut hypoglysemian tai hypoksian seurauksena [15, s. 36]. Esimerkiksi ihosolut pysyvät elossa jopa muutaman päivän ajan [16, s.106]. Välillä vainajista on saatavilla myös antemortem-näytteitä (AM-näytteet, ennen kuolemaa kerätyt näytteet), mikä saattaa joissain tapauksissa auttaa selvittämään, onko kuolema aiheutunut kyseiselle henkilölle letaalista häikäpitoisuudesta [15, s. 39] vai onko veressä olevan karboksihemoglobiinin aiheuttama tajunnantason aleneminen vain kuolemaan myötävaikuttanut tekijä. Kuolemaan johtaneen häikämyrkytyksen toteamisessa veren karboksihemoglobiinipitoisuuden mahdollisella muuttumisella kuolemanjälkeisten reaktioiden seurauksena ei todennäköisesti ole merkittävää vaikutusta, joten vainajan veren karboksihemoglobiinipitoisuuden on mielekästä ajatella korreloivan kuolinhetken karboksihemoglobiinipitoisuuteen.

3 ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori

Oikeuskemiyksikössä aiemmin käytössä olleen Gem OPL -oksimetrialaitteen valmistajan tarjoama laitetuki lopetettiin, jolloin uuden analyysilaitteen hankkiminen tuli ajankohtaiseksi. Muissa Pohjoismaissa saatujen positiivisten käyttäjäkokemusten vuoksi myös Suomessa päädyttiin valitsemaan häkämääritystä varten Radiometerin ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori. Koska laite on alun perin suunniteltu eläviltä ihmisiltä kerättyjen kliinisten näytteiden tutkimiseen, käyttöönottoa varten tarvittiin validointi suppeamman verifiointiprosessin sijaan. ABL90 Flex Plus on automatisoitu analyysilaitte, ja sen toiminnassa sovelletaan neljää eri mittausperiaatetta, potentiometriä, amperometriä, optista pO₂-määritystä sekä spektrofotometriä [6, s. 327]. Osa sen tuottamista 19 parametrin tuloksista on johdettuja, mutta COHb-fraktio on suoraan mitattava suure. Lisäksi analyyseissa on huomioitu automaattisesti tärkeimmät mittausta häiritsevät aineet eli intralipidit sekä sulfhemoglobiini [6, s. 358].

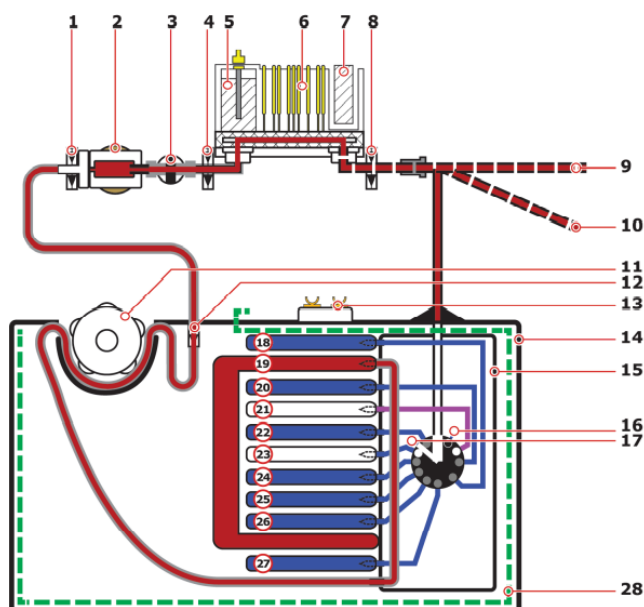
Tutkittaviksi näytematriiseiksi valittiin kaikki verinäytetyypit, joita oikeuslääketieteelliseen ruumiinavaukseen päätyneistä vainajista voidaan kerätä. Nämä näytetyypit ovat säilöntäaineena natriumfluoridia sisältävä putkiveri (vpt), EDTA-veri, sekä säilöntäaineeton pulloveri (vpl). Lisäksi tutkittiin AM-veri (säilöntäaineesta ei tietoa), Gem OPL-laitteen kontrollinäytteitä kolmella eri pitoisuustasolla, sekä vanhojen vertailumittauskierrosten ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä. Kaikille valituille näytematriiseille kehitettiin sopiva esikäsittelymenetelmä ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattorilla tehtäviä mittauksia varten.

Sensorikasetti

Sensorikasetti on ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattorissa käytettävä useita parametreja samanaikaisesti mittaava anturi, joka luo analyysin raakadatan. Sensorikasetti on kuluva osa, joka täytyy vaihtaa säännöllisesti.

Reagenssipakkaus

Reagenssipakkaus sisältää liuokset ja kaasuseokset, joilla sensorit kalibroidaan, suoritetaan laaduntarkkailu, sekä mittausjärjestelmän huuhtelu. Lisäksi näytejäte ohjataan reagenssipakkauksessa sijaitseviin jätepusseihin. [6, s. 374] Reagenssipakkaus on myös vaihdettava säännöllisesti. Laite suorittaa kontrollimittaukset ja kalibroinnit itsenäisesti siihen asetetun aikataulun mukaisesti reagenssipakkauksen liuoksilla. Ainoastaan oksimetri täytyy kalibroida manuaalisesti erillisellä kalibrintiliuoksella. Kuvassa 3 on esitetty reagenssipakkauksen ja sensorikasetin läpileikkaus kaaviokuvana.



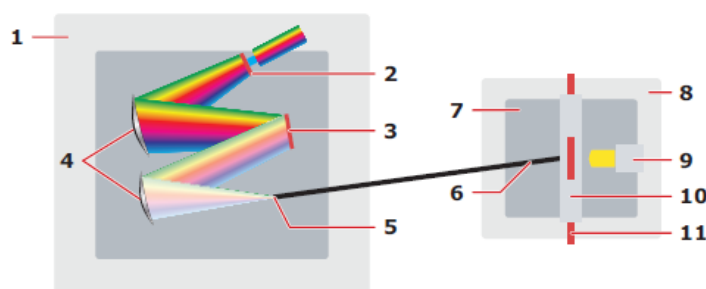
Kuva 3. Kaaviokuva ABL90 Flex Plus -laitteen mittauslaitteistosta ja reagenssipakkauksen nesteiden kulkureiteistä. Numerot 1—8 ovat mittausapahtuman kannalta oleellisia komponentteja, numerot 9—27 nesteiden siirtymiseen ja säilytykseen liittyviä rakenneosia ja numero 28 reagenssipakkauksen ympärillä oleva sähköinen suoja. [6, s. 329]

Oksimetri

Karboksihemoglobiinin pitoisuus mitataan oksimetrisesti hemolysaattoriyksikön yhteydessä olevalla optisella järjestelmällä. Hemolysaattori sijaitsee kuvan 3 numeromerkin 2 kohdalla.

Mittausprosessissa näytteen kulkureitti on näytteestä riippumatta aina sama, ja merkitty punaisella kuvassa 3. Ensin näyte (potilasnäyte, laaduntarkkailunäyte tai kalibrointiliuos) aspiroidaan sensorin mittauskammioon ja oksimetriakammioon, joissa mittaus tapahtuu välittömästi. Nestesensorit ohjaavat prosessia ja havaitsevat mahdolliset ilmakuplat, näytteen homogeenisuuden tai liian pienen näytetilavuuden, ja ongelmatilanteessa mittaus keskeytyy. Lopuksi suoritetaan huuhtelu ja kaikille parametreille oksimetriaparametreja lukuun ottamatta [6, s. 61] tehdään tilakalibrointi. [6, s. 330]. Näytteen aspirointi analysaattoriin tapahtuu punaisia linjoja yhdeksän ja kymmenen pitkin. Aspiroinnin jälkeen näyte kulkee sensorikasetin sekä oksimetriamoduulin läpi reagenssipakkauksessa sijaitsevaan jätepussiin, joka on merkitty kuvassa 3 numerolla 19. Siniset linjat ovat reagenssipakkauksen sisällä olevien nesteiden ja kaasujen kulkureittejä.

Optinen järjestelmä kykenee mittaamaan kahdeksan parametria ja se toimii hyödyntäen absorptioon perustuvaa spektroskopiaa [6, s. 354]. Laitteen oksimetriamoduulissa on näkyvän valon aallonpituudella toimiva spektrofotometri, jonka mittausalue on 467—672 nanometriä. Spektrofotometri liitetään yhdistettyyn hemolysaattoriin ja mittauskammioon optisella kaapelilla. [6, s. 353] Kuvassa 4. on esitetty ABL90 Flex Plus -laitteen optisen järjestelmän rakenne.



- | | | | |
|---|------------------|----|-----------------------|
| 1 | Spektrofotometri | 7 | Hemolysaattori |
| 2 | Valodiodirivi | 8 | Hemolysaattoriyksikkö |
| 3 | Hila | 9 | LED-valo |
| 4 | Peilit | 10 | Kyvetti |
| 5 | Rako | 11 | Näyte |
| 6 | Optinen kaapeli | | |

Kuva 4. ABL90 Flex Plus -laitteen optisen järjestelmän kaaviokuva. [6, s. 354]

Laitteella tapahtuva mittausjakso sisältää useita vaiheita. Se alkaa, kun verinäyte kulkeutuu hemolysaattoriyksikön (kuva 3 numeromerkki 2, sekä kuva 4 numeromerkki 8) kyvetiin jonka lämpötila on 37 °C. Näytteeseen kohdistetaan vastapaine, sillä yhden ilmakehän ylipaine poistaa näytteestä ilmakuplat sekä tehostaa hemolysaatioprosessia. Ylipaine ylläpidetään koko hemolysaatio- ja mittausjakson ajan. Kyvetissä (kuva 4, numeromerkki 10) oleva 1 µl:n näyte hemolysoidaan noin 30 kHz:n taajuisella ultraäänellä. Hemolysointi aiheuttaa punasolujen seinämien repeytymisen, jolloin punasolujen sisältö sekoittuu tasaisesti plasmaan ja syntyy optisesti kirkas neste. Seuraavaksi kyvetin läpi kohdistetaan valkoista valoa, joka johdetaan optista kuitua (kuva 4, numeromerkki 6) pitkin spektrofotometriin. Valo kulkee spektrometrin sisällä kapeasta raosta, jolloin se suuntautuu peilien ja hilan muodostamaa kokoonpanoa kohti (kuva 4, numeromerkit 3, 4 ja 5). Hila erottelee valon aallonpituuksien mukaan, minkä jälkeen peili suuntaa sen mitattavaksi sähkövirtana valodiodirivistön 256 diodista (kuva 4, numeromerkki 2). Muodostunut absorptiospektri lähetetään analysaattoriin oksimetriaparametrien arvojen laskemista varten. [6, s. 354]

Käytännössä absorbanssimittauksessa on kyse valon alkuperäisen intensiteetin ja yhdisteen läpäisseen valon intensiteetin suhteen logaritmisesta. Näytteestä mitatussa spektrissä näytteen sisältämät yhdisteet vaikuttavat absorptioon eri aallonpituuksilla. Vaikutuksien suuruudet mitataan ja niiden perusteella voidaan määrittää näytteessä olevien yhdisteiden pitoisuudet Lambert-Beerin lain mukaisesti. Koska absorbanssi on additiivinen suure, useampia optisesti aktiivisia yhdisteitä sisältävien näytteiden kokonaisabsorbanssi on yksittäisten yhdisteiden absorbanssien summa. Tähän additiivisuuteen perustuu myös karboksihemoglobiinifraktion määrittäminen kokonaishemoglobiinista.

4 Menetelmänkehitys oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa otetuille verinäytteille

Laitevalmistajat eivät tarjoa erillisiä sairaalanäytteitä heikkolaatuisempien vainajanäytteiden analysointiin tarkoitettuja välineistöjä, vaan vainajanäytteitä käsittelevät laboratoriot joutuvat soveltamaan hyvälaatuisten kliinisten sairaalanäytteiden mittaamiseen tarkoitettuja laitteita ja luomaan näytteilleen esikäsittelymenetelmät, joilla niistä saadaan mittauskelpoisia. Valmistaja on määrittänyt ABL90 Flex Plus -laitteella mitattaville näytteille ohjeistuksen mitattavan näytteen laadusta [6, s. 18 ja s. 24], jotta analyysin tulos olisi varmasti luotettava, mutta vainajanäytteet eivät lähtökohtaisesti täytä laitevalmistajan asettamia hyvälaatuisen näytteen kriteereitä. Koska THL:n oikeuskemiyksikön tarjoamat laboratoriotutkimukset kuolemansyyselvitystä varten ovat ainutlaatuiset Suomen mittakaavassa, käyttöön otetun verikaasuanalysointilaitteen maahantuojaan edustajalla ei ollut kokemusta laitteen soveltuvuudesta haluttuun käyttötarkoitukseen. [17.] Soveltuvuuden testaus sekä näytteenkäsittelyn kehittäminen jäivät näin ollen laboratorion vastuulle. Ennen varsinaista validointia laitteella suoritettiin esitestaus, jonka aikana kehitettiin valituille näytetyypeille soveltuvat esikäsittelymenetelmät, perehdyttiin laitteen toimintaan ja mittaustapoihin, sekä valittiin rutiinimittauksille soveltuva toimintamalli.

Vanhentuneella menetelmällä karboksihemoglobiinimittauksen näytematriisi on natriumfluoridia antikoagulanttina sisältävä putkiveri, joka esikäsitellään natriumditioniitilla. Menetelmässä valon aallonpituudet johdetaan kertakäyttöisessä muovikyvetissä olevan ohuen näytteseinämän läpi. Putkiverinäytteet esikäsitellään laboratoriossa ja annostellaan mittausta varten kyvetiin käsin, lääkeruiskua apuna käyttäen. Myös mittaus ja kontrollimittaus tapahtuu asettamalla jokainen kyveti yksitellen mittauskuoppaan. Korvattavaa menetelmää mukaillen ensimmäiseksi uudella laitteella testattiin putkiveriä. Putkiveri aiheuttaa kuitenkin sellaisenaan sekä vesilaimennoksena aspiroituna virheen sensoreissa, eikä valtaosa mittauksista tuota tulosta lainkaan. Mikäli laite onnistuu mittaamaan putkiveren karboksihemoglobiinipitoisuuden, näyte aiheuttaa sensoriongelman,

jonka seurauksena laitteen automaattinen kalibraatio häiriintyy, ja laite siirtyy puhdistamaan sensoreita epämääräiseksi ajaksi.

Putkiveren todettiin olevan sellaisenaan toimimaton matriisi, mutta natriumditioniitilla käsiteltynä ja tarvittaessa 10 %:sella Triton-X-liuoksella puoleen laimennettuna laite pystyy mittaamaan karboksihemoglobiinipitoisuuden myös putkiverestä. Natriumditioniitti on voimakas pelkistin, joka pelkistää jopa jalometalleja. Siitä on pääteltävissä, että näytteessä tapahtuu voimakkaita pelkistysreaktioita, jotka vähentävät matriisin taustaa, jolloin mittaus onnistuu [18]. Natriumditioniitikäsittely alentaa näytteessä ainakin MetHb-, sekä oksihemoglobiinipitoisuuksia [8, s. 516]. Putkiveri on silti epäsopeva ensisijaiseksi näytematriisiksi, sillä se aiheuttaa esikäsiteltynäkin jokaisen mittauksen jälkeen laitteelle 2—4 minuutin huuhtelun ja puhdistuksen, joka hidastaa rutiinimittausta merkittävästi. Toissijaisena näytematriisina putkiveri on kuitenkin toimiva.

Laite on suunniteltu kliinisten näytteiden välittömään ja nopeaan analysointiin, jolloin voimakkaiden antikoagulanttien käyttö on käytännössä tarpeetonta. Valmistajan ohjeen mukaan laitteella saa analysoida vain heparinoituja ja elektrolyyttitasapainotettuja ihmisen kokoverinäytteitä, laaduntarkkailuliukuksia ja -kaasuja. Muunlaisten näytteiden analysointi voi vaurioittaa analysaattoria ja aiheuttaa virheellisiä tuloksia myöhemmin analysoitavien näytteiden kohdalla. [6, s. 2] Tämän takia päätettiin keskittyä testaamaan seuraavana matriisina pulloverta, joka on vainajan reisilaskimosta otettu kokoverinäyte ilman säilöntäaineita.

Pulloveri ei aiheuttanut samalla tavalla sensoriongelmia kuin putkiveri, mutta säilöntäaineiden puuttumisen vuoksi se on rakenteeltaan usein paksua ja lisäksi heterogeenistä, jolloin laite ei saa aspiroitua näytettä oikein ja tukosriski on korkea. Muiden Pohjoismaiden esimerkin mukaisesti päädyttiin laimentamaan näyte veteen, jolloin aspiointiongelma poistui. Pulloverta testattiin vielä samalla natriumditioniitti-Triton-X-käsittelyllä, mikä todettiin putkiverelle toimivaksi, mutta sekä Triton-X että natriumditioniitti häiritsivät sensoreita niin, että laite siirtyi automaattiseen huuhteluun ja puhdistukseen mittauksen jälkeen. Ensisijaiseksi

näytematriisiksi valittiin pulloveren vesilaimennos, jossa on puolet näytettä ja puolet laboratoriovettä.

Vaihtoehtoisiksi näytematriiseiksi päätettiin kokeilla vielä EDTA-verta, sekä ennen kuolemaa kerättyä AM-verta. Molemmat käsiteltiin pulloveren tavoin laimentamalla näyte veteen. Laittevalmistaja ei suosittele EDTA:n käyttöä laitteella mitattavien näytteiden antikoagulanttina, sillä se vääristää tuloksia useilla parametreilla (mm. hiilidioksidisaturaatio) ja lyhentää kalsiumsensorin käyttöikä. [6, s. 18.] Suppean otannan perusteella voidaan päätellä, että karboksihemoglobiinimittaukseen se kuitenkin soveltuu häikämyrkytyksen poissulkemiseen tarvittavan määrittystarkkuuden rajoissa. EDTA-verinäyte otetaan vainajalta vain satunnaisesti, joten se ei sen vuoksi sovellu ensisijaiseksi matriisiksi. Myös testattu AM-veri antoi oikean suuruusluokan tuloksen. Vain harvoilta vainajilta pyydetään tutkittavaksi AM-verinäyte.

Lisäksi testattiin vielä kolme oikeuskemiyksikköön toimitettua elävältä ihmiseltä otettua verinäytettä (s-näyte). S-näytteiden häikäpitoisuudet ovat käytännössä aina pieniä, ja vanhentuneella menetelmällä ei ole mahdollista saada luotettavasti alle 10 %:sia COHb-tuloksia. Uudella laitteella saatiin samaa suuruusluokkaa olevat tulokset kuin vanhalla.

5 ABL90 Flex Plus -laitteen validointi

Validointi toteutettiin aiemmin laaditun ja THL:n sähköisiin järjestelmiin tallennetun validointisuunnitelman mukaisesti. Liitteessä 1 validointisuunnitelma on esitetty tiivistetysti taulukkomuodossa.

Validoinnissa käytettiin seuraavia laitteita ja välineitä:

- ABL90 FLEX PLUS –verikaasuanalysaattori
sarjanumero: 092R0269N0050
- sensorikasetti C90 BG, LYT, Met 1, OXI + QC
ABL90 Sensor Cassette 100
- reagenssipakkaus ABL90 FLEX Solution pack
- oksimetrin kalibrointiliuos, S7770 ctHb-kalibrointiliuos
- Gem OPL -laitteen kontrollinäytteet:
Critical Care QC Multi-4™ CO-Oximeter Control,
valmistaja: Instrumentation Laboratory.

Jokaisen kuolemansyynselvitystapauksen putkiverinäytteet mitattiin kahtena rinnakkaisena vanhalla laitteella, sekä pullo- ja putkiveret viitenä rinnakkaisena uudella laitteella. EDTA-verinäytteet mitattiin pääsääntöisesti viitenä rinnakkaisena uudella laitteella, samoin AM-kokoverinäyte. Ulkoiset laaduntarkkailunäytteet mitattiin uudella laitteella kahtena tai kolmena rinnakkaisena riippuen siitä, paljonko näytettä oli käytössä. Gem OPL -laitteen kontrollinäytteitä mitattiin uudella laitteella viiden rinnakkaisen sarjoissa jokaisella mittauskerralla, käyttäen vaihtelevasti eri pitoisuustason kontrolleja. Mittausten välillä näyteputki suljettiin tiiviisti, ja tulokset kirjattiin muistiin välittömästi. Tutkittavien suureiden arvot laskettiin tilastollisia menetelmiä hyödyntäen tai selvitettiin muilla keinoin. Mittausdata ja datankäsittely arkistoitiin Excel-tiedostona THL:n sähköisiin järjestelmiin. Yksityisyysuojalain mukaisesti kaikki potilasdata on anonymisoitu.

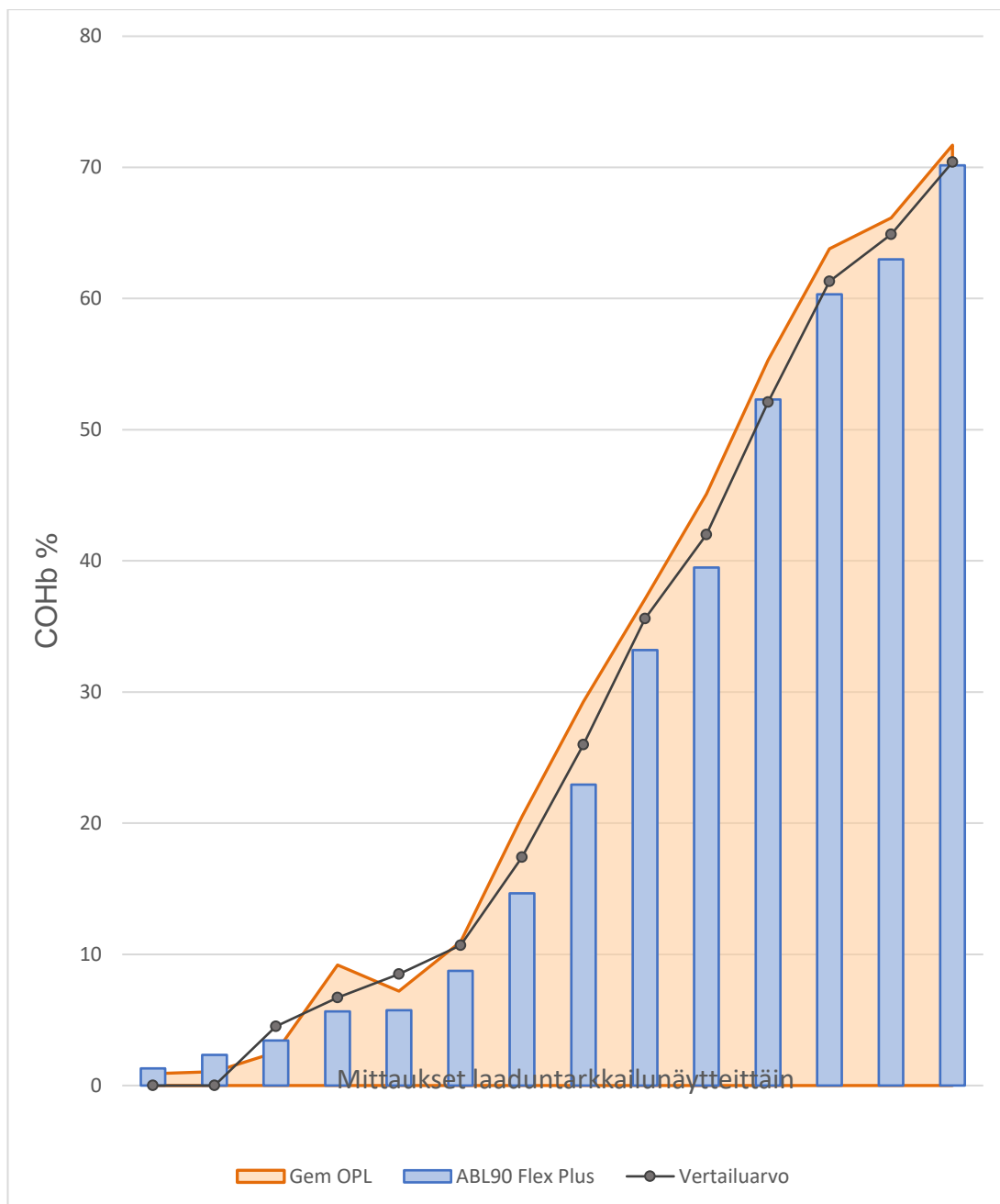
5.1 Tarkkuus

Uudelta laitteelta saatuja tuloksia verrattiin vanhan laitteen tuloksiin, sekä ulkoi-
siin laaduntarkkailunäytteisiin, joiden tarkka COHb-pitoisuus on tiedossa. Li-
säksi tutkittiin toistettavuus ja uusittavuus mittaamalla päivän sisällä viisi rinnak-
kaista näytettä (yhteensä 166 rinnakkaisten sarjaa), sekä viitenä päivänä yksi
rinnakkainen näyte (yhteensä 19 näytesarjaa). Veripullo- ja veriputkimatriisia
verrattiin myös keskenään.

5.1.1 Oikeellisuus

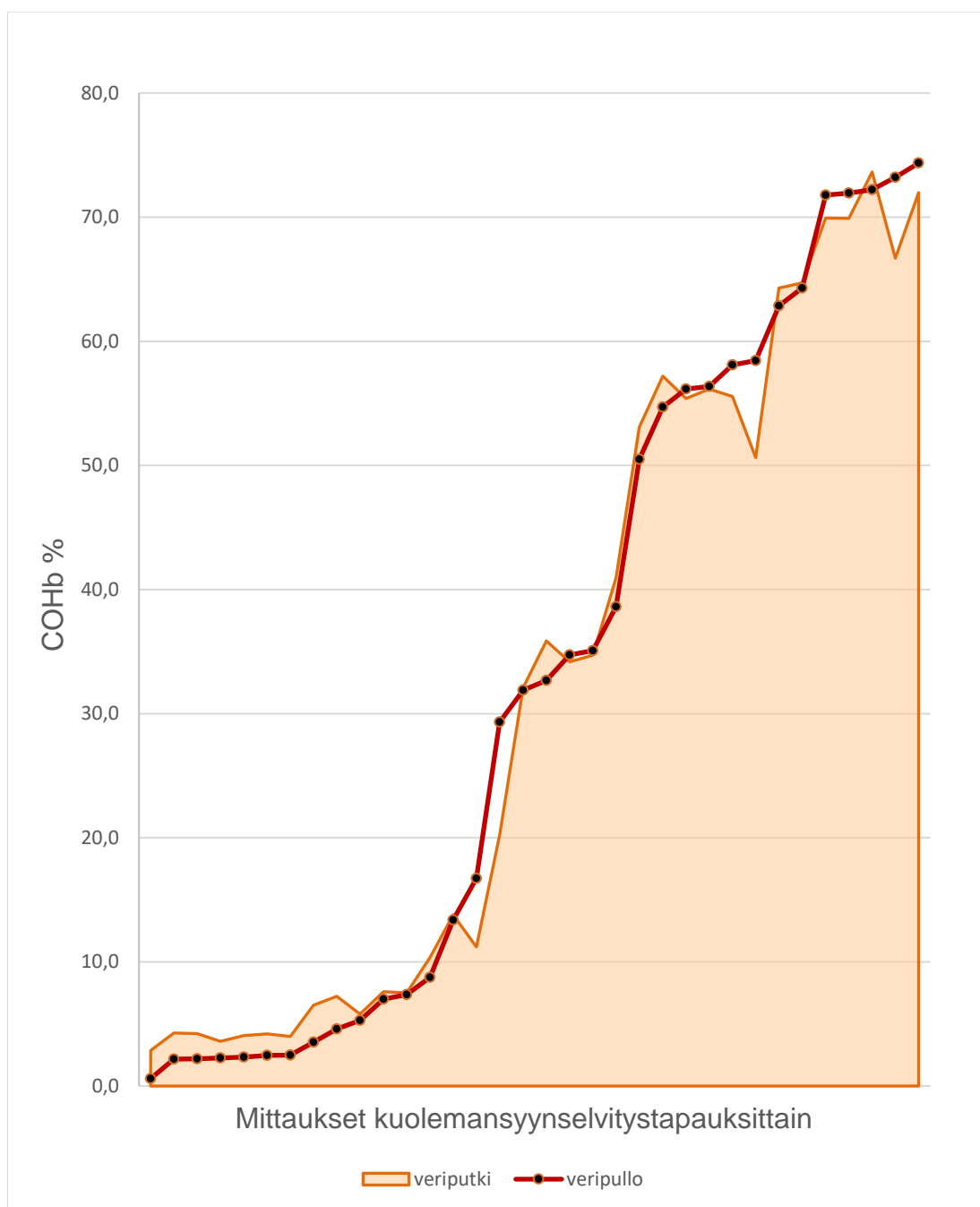
Oikeellisuus tutkittiin suhteellisena poikkeamana keskiarvosta (systemaattinen
virhe, bias). Se arvioitiin varmennetuista vertailunäytteistä tehdyistä mittauk-
sista. Validoinnin perusteella ABL90 Flex Plus -laite tuottaa jonkin verran syste-
maattista virhettä tulokseen. Suurimmassa osassa yksittäin tarkastelluista laa-
duntarkkailunäytteistä ABL90 Flex Plus -laitteella mitattujen pitoisuuksien ero
vertailuarvoon ei ollut t-testin perusteella 95 %:n luottamustasolla tilastollisesti
merkittävä, mutta parittaisen t-testin perusteella ABL90 Flex Plus -laitteen tu-
lokset eroavat vertailuarvoista 95 %:n luottamustasolla. Todennäköinen selitys
eroavaisuuksille on esitelty kohdassa 5.3. Käytetyt testit ja niiden tulokset ovat
liitteessä 2. Mitatuille laaduntarkkailunäytteille (14 kpl) keskimääräinen syste-
maattinen virhe oli -9,3 % vertailuarvosta.

Mittaustuloksista koostettiin kuvaaja, joka on esitetty kuvassa 5. Kuvaajasta on
myös huomattavissa trendi, jossa ABL90 Flex Plus -laite antaa hieman vertai-
luarvoa matalampia, ja Gem OPL -laite hieman vertailuarvoa korkeampia tulok-
sia. Tähän havaintoon on perehdytty tarkemmin kohdassa 5.4.



Kuva 5. Kuvaaja ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden mittauksista molemmilla laitteilla. Vaaka-akselin suhteen saman pisteen tasolla oleva kuvaajan arvo tarkoittaa samaa laaduntarkkailunäytettä. Kuvaaja on koostettu molempien laitteiden osalta laaduntarkkailunäytteiden kahden rinnakkaismittauksen tuloksien keskiarvoista. Mittausten tulokset on asetettu tulkinnan helpottamiseksi suuruusjärjestykseen vertailuarvon suhteen.

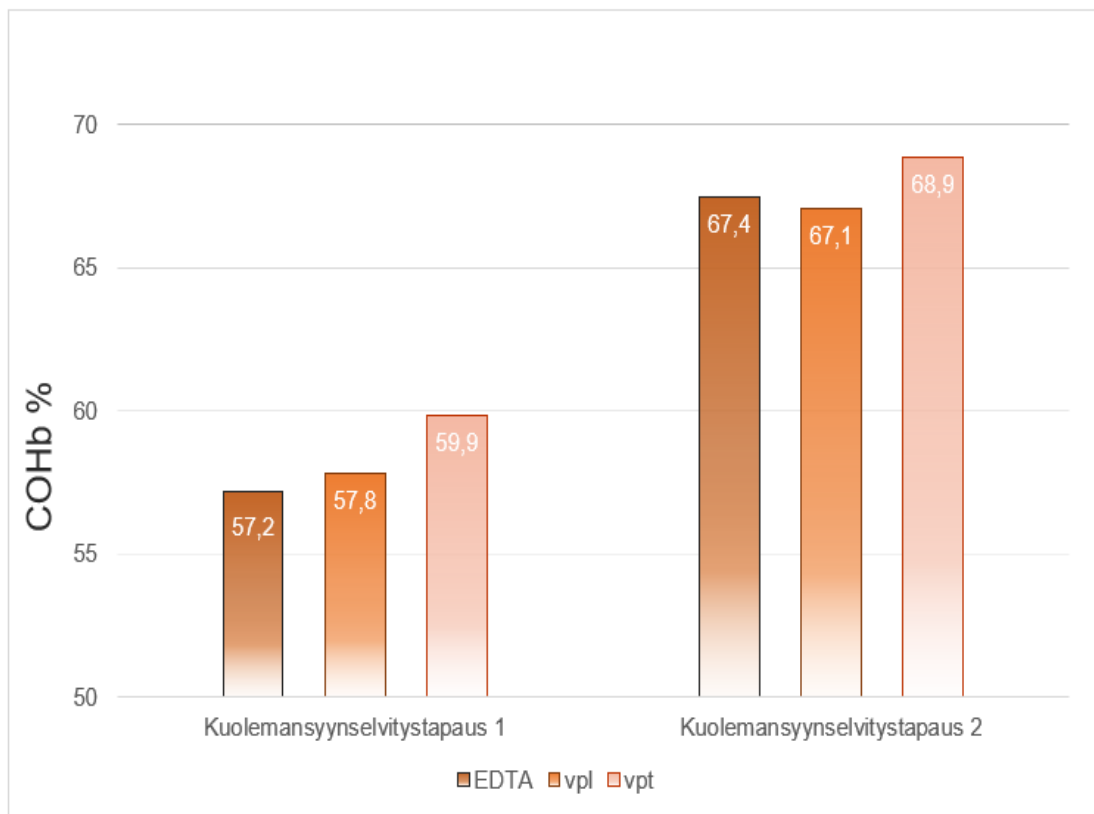
Validoinnin aikana tutkittiin myös, onko veripullo- ja veriputkimatriisien välillä eroa. Samasta kuolemansyynselvitystapauksesta mitattiin ABL90 Flex Plus -laitteella sekä veripullo uudella näytteenkäsittelyllä että veriputki vanhalla näytteenkäsittelyllä. Kuvaaja tilanteesta on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Veripullo- ja veriputkimatriisien 34 kuolemansyynselvitystapauksen rinnakkaismittaustulokset. Tapauksista mitattiin aina viisi rinnakkaismäärittystä kummallakin matriisilla. Vaaka-akselin suhteen saman pisteen tasolla oleva kuvaajan arvo tarkoittaa samaa kuolemansyynselvitystapausta. Tulokset on asetettu suuruusjärjestykseen veripullomatriisin tuloksen mukaan tulkinnan helpottamiseksi.

Parittaisen kaksisuuntaisen t-testin perusteella 95 %:n luottamustasolla tarkasteltuna veripullo- ja -putkimatriisien mittaustulokset eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Tehty testi on liitteessä 3.

ABL90 Flex Plus -laitteelle haluttiin vielä toinen toissijainen näytematriisi, mikäli veripulloa, eikä veriputkea voida käyttää häkämääritykseen. EDTA-veren soveltuvuus häkämäärityksen matriisiksi arvioitiin mittaamalla samana päivänä veriputkinäyte vanhalla laitteella, sekä veripullo- ja EDTA-näytteet uudella laitteella. Kuvaaja tilanteesta on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Kahden kuolemansyynselvitystapauksen häkämääritystulokset näytematriiseittain.

EDTA-verinäytteiden tulokset tutkituilla kahdella kuolemansyynselvitystapauksella olivat selkeästi samaa suuruusluokkaa veripullo- ja veriputkimatriisien kanssa, joten EDTA-veri voidaan hyväksyä määrittelylle toissijaiseksi näytematriisiksi.

5.1.2 Määrittelyn toistotarkkuus

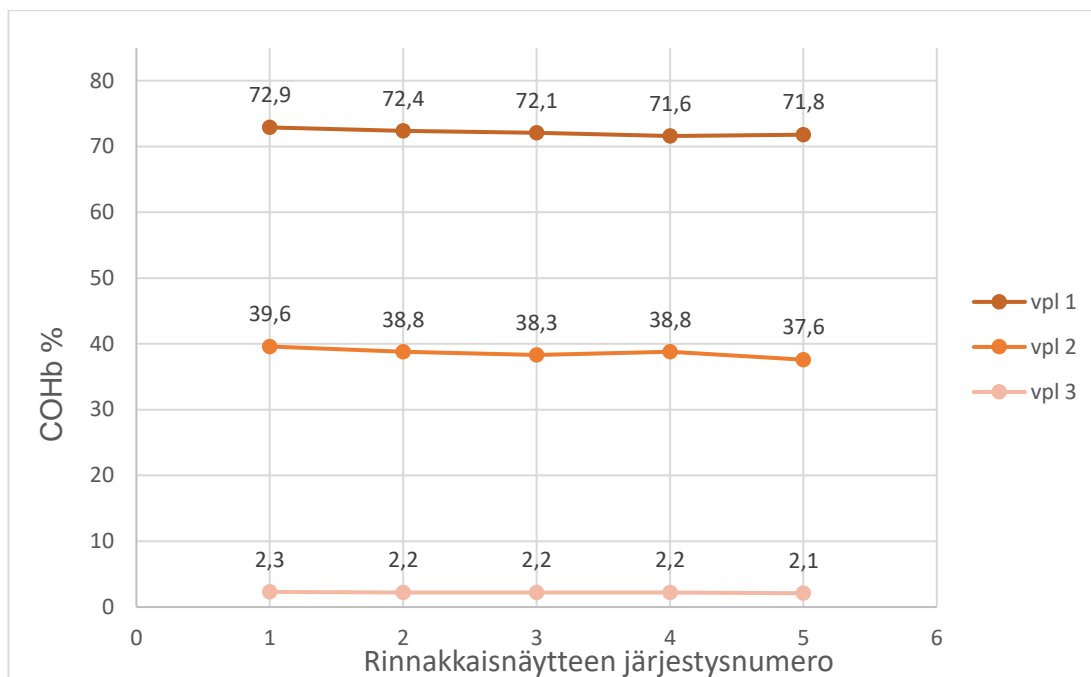
Toistotarkkuus tutkittiin laskemalla eri näytetyypeille suhteelliset keskihajonta-prosentit (relative standard deviation, RSD). Näytteille määritettiin sekä laboratorion sisäinen toistotarkkuus, että välitason toistotarkkuus.

Määrittelyn sisäinen toistotarkkuus tutkittiin mittaamalla näytteistä useampi rinnakkainen saman päivän aikana, ja laskemalla mittauksille suhteelliset keskihajonnat. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Päivien sisäiset suhteelliset keskihajonnat esitettynä näytematriiseittain. N tarkoittaa näytetapausten lukumäärää.

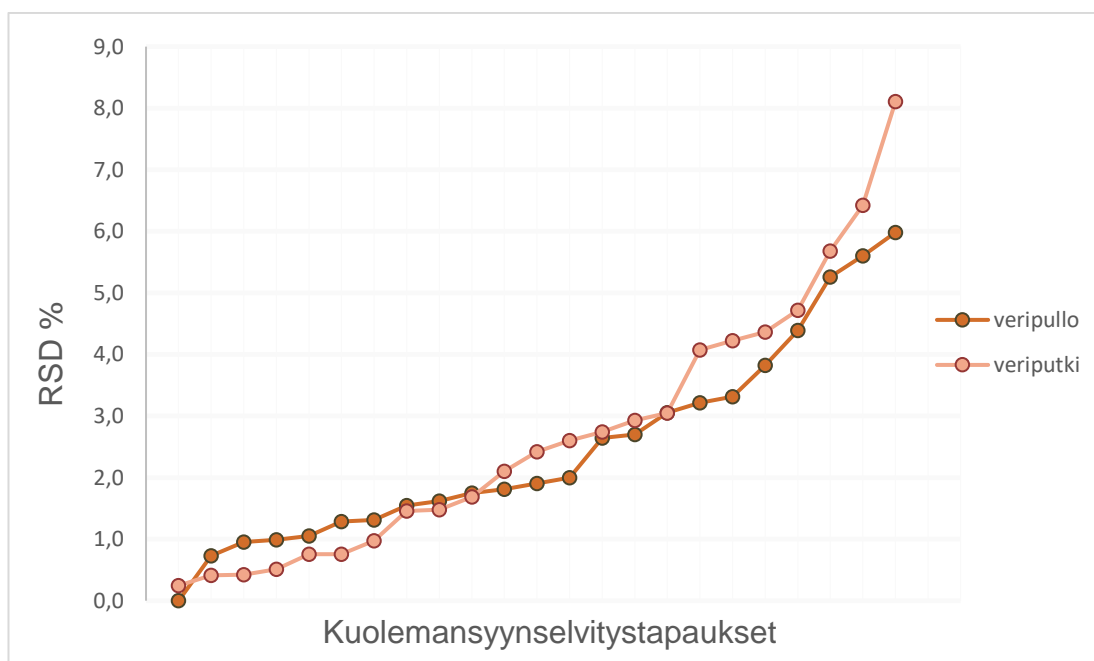
Matriisi	RSD %	n
Pulloveri	3,2	83
Putkiveri	2,6	34
Kontrolli	2,6	38
L1	2,6	13
L2	1,5	12
L3	3,8	11
EDTA	4,6	4
elävien näyte	7,7	3
AM-näyte	5,7	1
LGC TOX	4,8	16
Kaikki matriisit	2,7	166

Kaikkien matriisien suhteellinen keskihajonta oli tavoitteen mukainen, alle 15 %. Saman päivän aikana mitatuista näytteistä koostettiin vielä kuvaaja, jossa sisäisen toistotarkkuuden mittaustulokset on esitetty kolmella eri pitoisuustason veripullolla. Kuvaaja on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Kolmen näytteen karboksihemoglobiinipitoisuuden muutos saman päivän aikana mitatuilla rinnakkaisnäytteillä.

Veripulloista ja -putkista mitattujen näytteiden suhteellisista keskihajonnoista muodostettiin myös kuvaaja. Kuvassa 9 on esitetty kuolemansyynselvitystapauksittain pullo- ja putkiverestä ABL90 Flex Plus laitteella tehtyjen mittausten RSD %:t.



Kuva 9. Suhteellisten keskihajontojen vertailu pullo- ja putkiveren välillä.

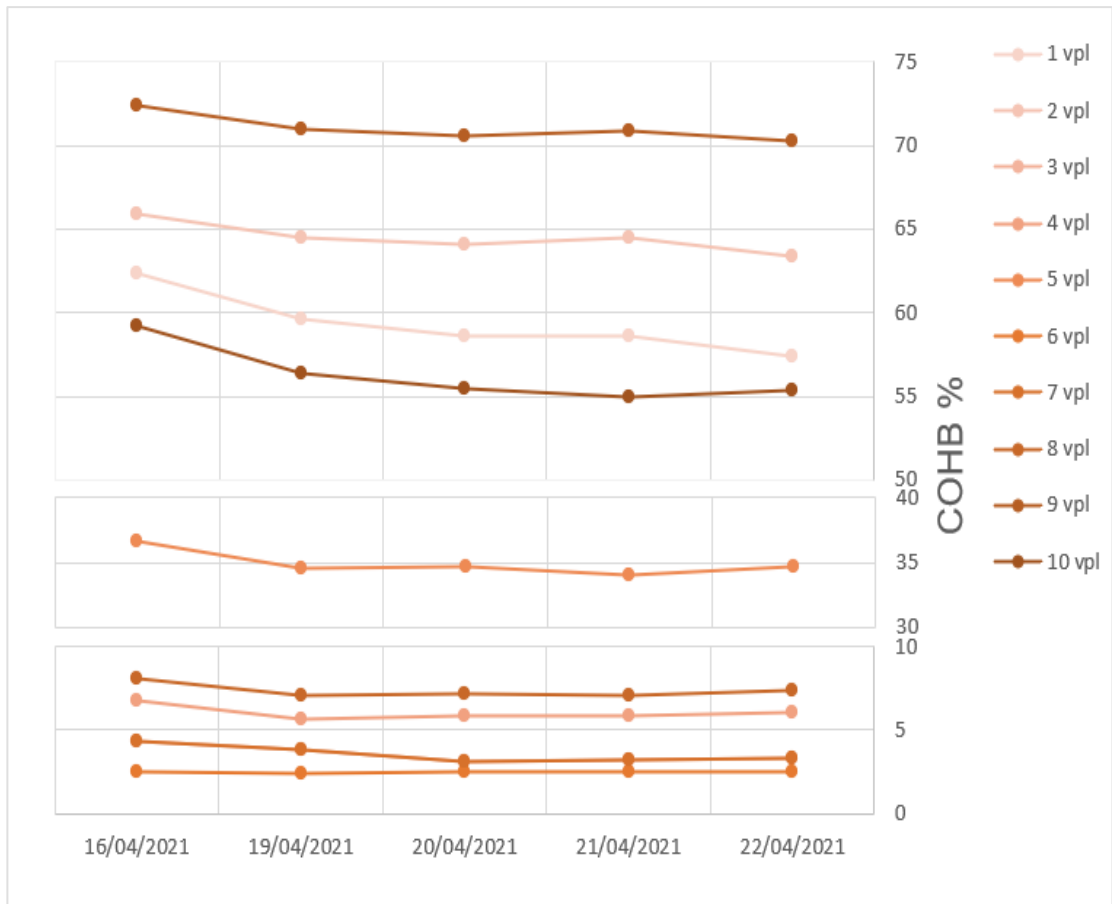
Kuva 9 on koostettu kummankin matriisin osalta rinnakkaismittausten keskiarvoista. Vaaka-akselin suhteen samalla tasolla olevat pisteet tarkoittavat samaa tapausta. Kuolemansyynselvitystapaukset on asetettu suuruusjärjestykseen suhteellisen keskihajonnan mukaan tarkastelun helpottamiseksi. Mittausten perusteella voidaan päätellä, että mittausten suhteelliset keskihajonnat eivät eroa merkittävästi näiden kahden matriisin välillä.

Välitason toistotarkkuus tutkittiin mittaamalla samoja näytteitä useana päivänä siten, että jokaiselle päivälle valmistettiin mittausta varten aina uusi näyte analyysin tekijän säilyessä samana. Veripullonäytteitä mitattiin viitenä erillisenä päivänä ja veriputkinäytteet, sekä EDTA-verinäytteet mitattiin kolmena tai neljänä eri päivänä. Keskimääräiset päivien väliset suhteelliset keskihajonnat on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Päivien väliset suhteelliset keskihajonnat esitettynä näytematriiseittain. N tarkoittaa näytetapausten lukumäärää.

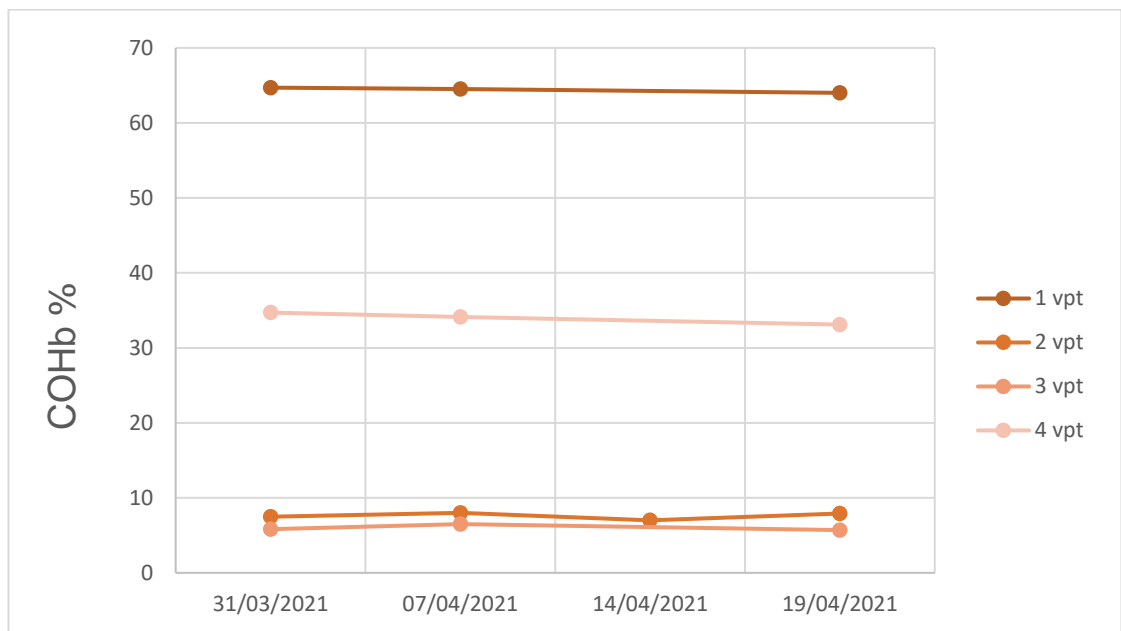
Matriisi	RSD %	n
Pulloveri	4,2	10
Putkiveri	4,0	4
Kontrolli	1,9	3
L1	0,4	
L2	3,3	
L3	2,1	
EDTA	0,3	2
Kaikki matriisit	3,4	19

Kaikkien matriisien suhteellinen keskihajonta oli tavoitteen mukainen, alle 15 %. Mittaustuloksista koostettiin kuvaajat jokaiselle matriisille erikseen, jotta yksittäisten näytteiden näytesarjojen aikana tapahtuva COHb-pitoisuuden muutos oli helpompi havaita. Kuvassa 10 on esitetty veripulloille tehdyssä päivien välisessä vertailussa mitatut COHb-pitoisuudet.



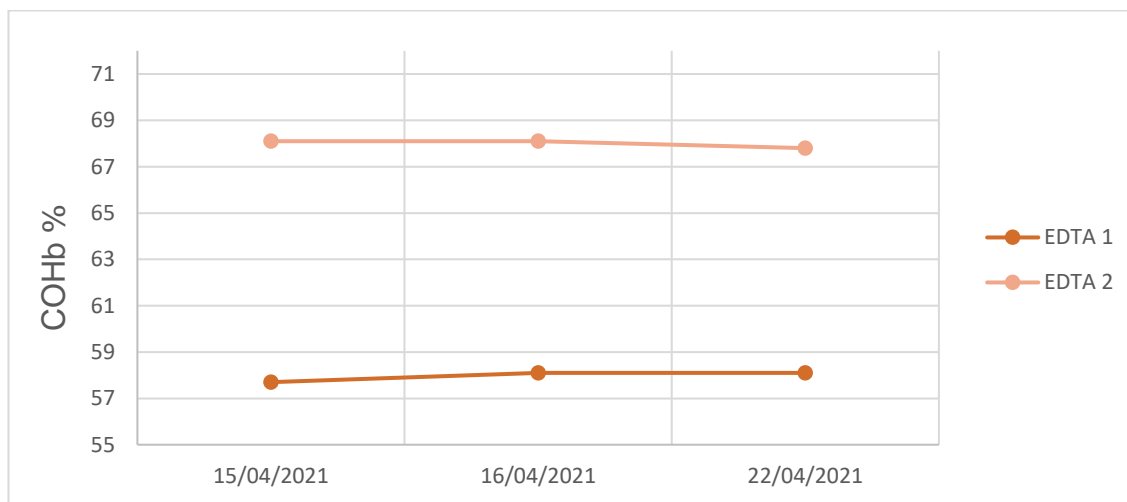
Kuva 10. Veripullojen COHb-pitoisuuksien mittaustulokset eri päivinä.

Veriputkien päivien välisen toistettavuuden mittaustulokset ovat kuvassa 11.



Kuva 11. Veriputkien COHb-pitoisuuksien mittaustulokset eri päivinä.

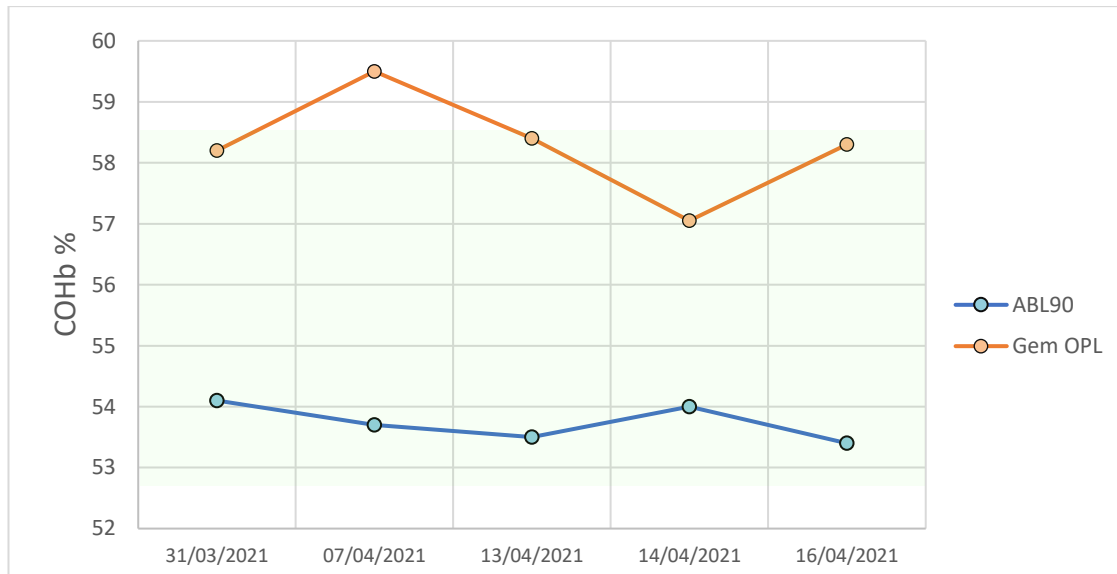
Sekä veripullojen, että -putkien mittaustuloksissa päivien välillä on huomattavissa pientä heittelyä, mutta erot ovat niin pieniä, että ne jäävät mittausepävarmuusalueelle. Päivien välinen toistotarkkuus tutkittiin myös EDTA-verinäytteillä ja kontrollinäytteiden kaikilla kolmella eri pitoisuustasolla. EDTA-verinäytteille tehdyn päivien välisen vertailun mittaustuloksista koostettu kuvaaja on esitetty kuvassa 12.



Kuva 12. Kahden eri kuolemansyynselvitystapauksen EDTA-verinäytteiden pitoisuudet mitattuna kolmena eri päivänä.

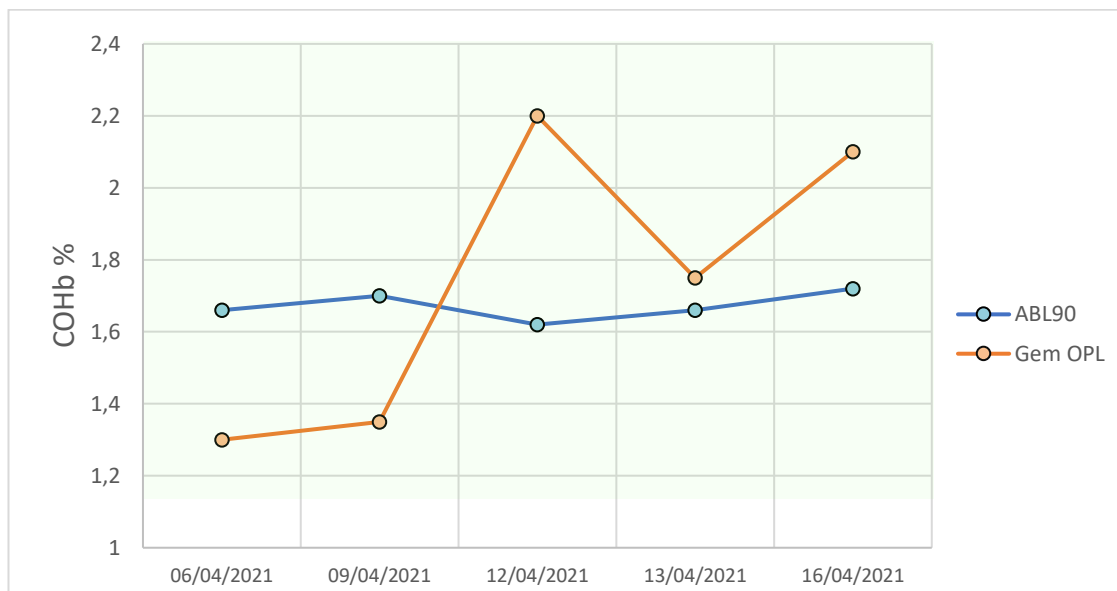
EDTA-verinäytteiden karboksihemoglobiinipitoisuudet eivät mittausten perusteella muuttuneet merkittävästi päivien välillä. Näytteillä havaittu pieni tulosten vaihtelu jää mittausepävarmuusalueelle. EDTA on säilöntäaine, joten se todennäköisesti edesauttaa karboksihemoglobiinipitoisuuden pysymistä tasaisena näytteessä.

Kontrollinäytteille tehtyjen päivien välisen vertailun mittaustulosten kuvaajat on esitetty kuvissa 13, 14 ja 15. Kontrolli L1 on COHb-pitoisuudeltaan korkein, ja sen karboksihemoglobiinipitoisuus on selvästi ihmiselle tappavalla pitoisuusalueella. Kontrolli L1:n päivien välisen vertailun kuvaaja on esitetty kuvassa 13.



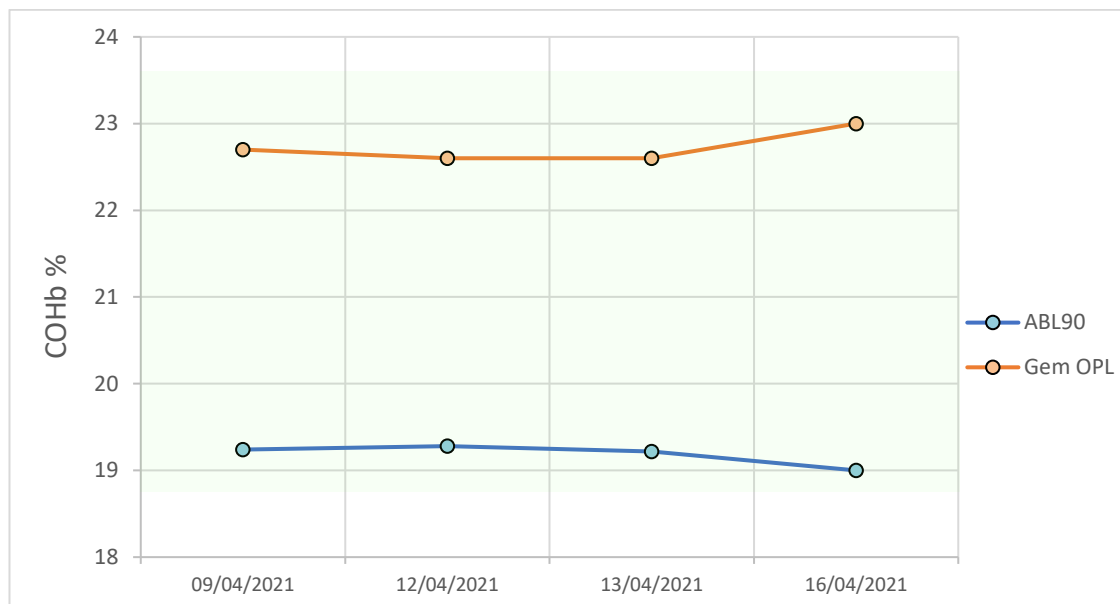
Kuva 13. Kontrolli L1 mitattuna eri päivinä. Kontrollinäytteen hyväksytty pitoisuusalue on esitetty kuvassa vihreällä ja sen tavoitearvo 55,4 %.

Kontrolli L2 on pitoisuusalueeltaan matalin, se edustaa kohonnutta, mutta oireettomalla alueella olevaa veren COHb-pitoisuutta. L2-kontrollin päivien välisen vertailun kuvaaja on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. Kontrolli L2 mitattuna eri päivinä. Kontrollinäytteen hyväksyttyä pitoisuusalueetta on esitetty kuvassa vihreällä ja tavoitearvo on 3,1 %.

Kontrolli L3 edustaa haitallista COHb-pitoisuutta, joka aiheuttaa jo huomattavia oireita, mutta ei ole vielä hyväkuntoiselle aikuiselle letaali. L3-kontrollin päivien välisen vertailun tuloksista muodostettu kuvaaja on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Kontrolli L3 mitattuna eri päivinä. Kontrollinäytteen hyväksytty pitoisuusalue on esitetty kuvassa vihreällä ja tavoitearvo 21,2 %.

Kuvaajista on nähtävissä myös silmämääräisesti, että ABL90 Flex Plus -laitteen mittaustulokset eivät myöskään kontrollimittausnäytteillä tehtynä muutu merkittävästi päivien välillä. Etenkin pienen karboksihemoglobiinipitoisuuden näytteillä, joille laite on suunniteltu, ABL90 Flex Plus -laite antaa tasalaatuisia mittaustuloksia.

Pulloverinäytteillä päivien välisessä vertailussa havaittiin vähäinen COHb-pitoisuuden pienentyminen mittaussarjan loppua kohti. Asia on selitettävissä kohdan 5.3 havainnolla. Näytteenvalmistusta varten verinäytteen säilytysastia jouduttiin avaamaan useita kertoja, jolloin näyte pääsi tekemisiin hengitysilman kanssa, mikä vaikutti näytteen karboksihemoglobiinipitoisuuteen säilöntäaineen puuttuessa. Putkiverinäytteillä ja kontrollinäytteillä vastaavaa ongelmaa ei ollut, sillä mittausta varten avattiin aina uusi kontrollinäyteampulli samasta valmistuserästä ja ruumiinavauksessa kerättyihin veriputkiin on lisätty säilöntäaine stabilisoimaan näytteessä olevien aineiden pitoisuuksia.

5.2 Mittausalue

Valmistaja ilmoittaa laitteen mittausalueeksi 0—100 % COHb:a.

Alempi raportointiraja

Validoinnin perusteella vainajaverinäytteen alemmaksi raportointirajaksi valittiin 5 %, sillä tupakoivilla ihmisillä veren COHb-pitoisuus voi hetkittäin olla yli 5 % ilman myrkytystilaa. Validoinnin aikana laaduntarkkailunäytteillä tehdyillä mittauksilla mittausepävarmuus alle 10 % karboksihemoglobiinia sisältävillä näytteillä asettui hyväksyttävissä olevan maksimiarvon 30 % yläpuolelle, mutta varsinaisten validointimittausten jälkeen menetelmällä on osallistuttu vertailumittauskierroksille, joissa ABL90 Flex Plus -laite on saanut erinomaisia tuloksia myös pienillä pitoisuuksilla.

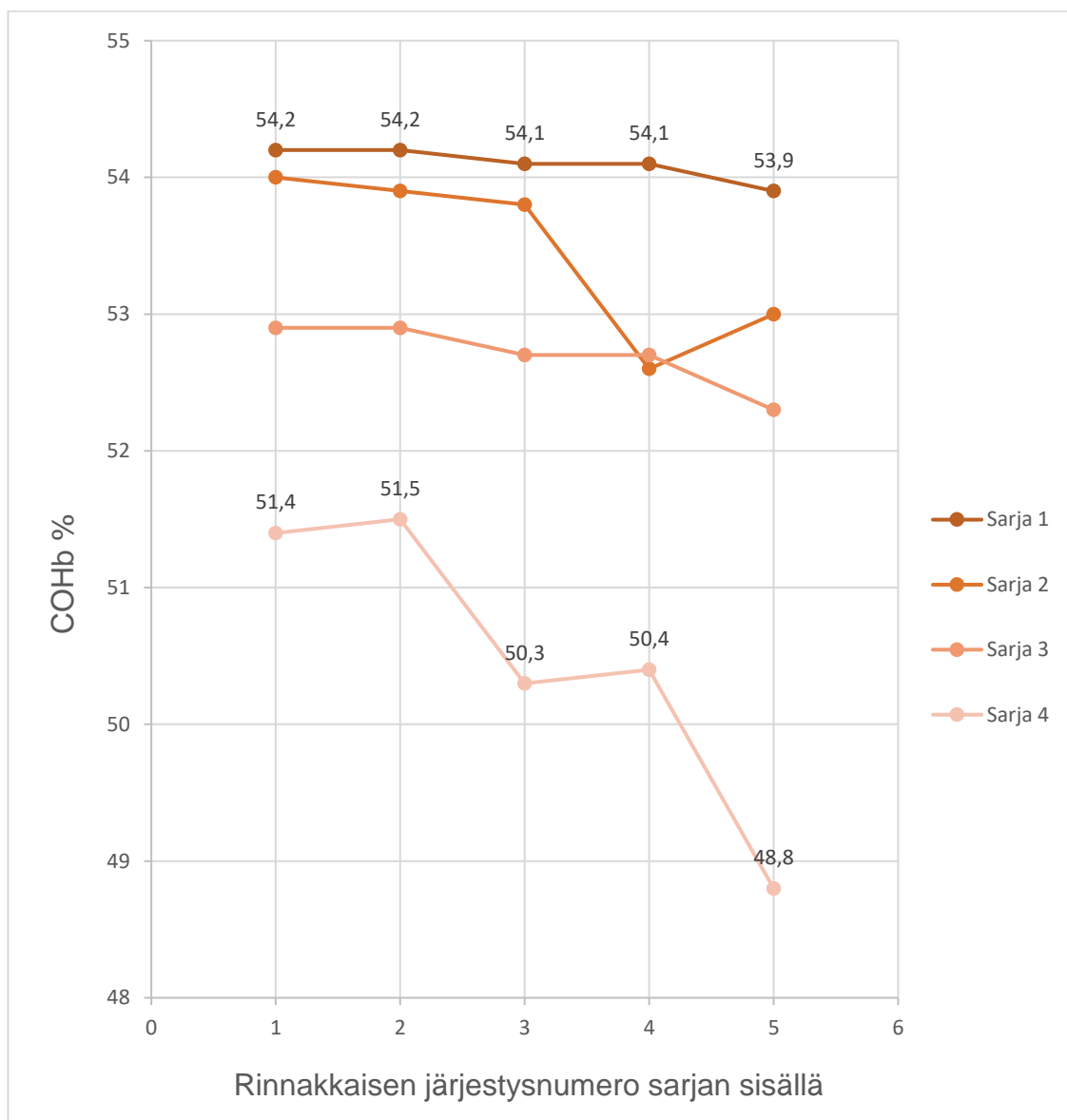
Ylempi raportointiraja

Validoinnin perusteella vainajaverinäytteiden ylemmäksi raportointirajaksi valittiin 75 %, joka vastaa Gem OPL -laitteen mittausalueen ylärajaa. Tässä pitoisuudessa on kyse jo selvästä myrkytyskuolemasta, joten tulosten tulkinta on selkeää eikä korkeampi raportointiraja tuottaisi tulokselle lisäarvoa.

5.3 Analyytin stabiilius näytteenkäsittelyn ja mittauksen aikana

Validoinnin aikana huomattiin, että verinäytteen COHb- pitoisuus laskee sitä mukaa, mitä useampia rinnakkaismäärytyksiä siitä tehdään. Tästä tehtiin johtopäätös, että mikäli ilma pääsee vuorovaikutukseen verinäytteen kanssa, se muuttaa näytteen hemoglobiinityyppien suhteita. Havainto varmistettiin tekemällä mittaussarja, jossa samasta näytteestä mitattiin peräkkäin neljä viiden rinnakkaismittauksen sarjaa. Mittaukset on tehty L1 -kontrollinäytteellä, jonka tavoitepitoisuus on 55,4 % COHb:n suhteen ja sallittu vaihteluväli valmistajan mukaan 52,4—58,4 %:a. Huomattiin, että kahden ensimmäisen sarjan jälkeen näytteen karboksihemoglobiinipitoisuus alkaa laskea huomattavasti, vaikka näyteputki suljettiin tiiviisti aina mittausten välillä. Kuvaaja L1-kontrollinäytteen

COHb-pitoisuuden pienentymisestä rinnakkaissarjojen edetessä on esitetty kuvassa 16.



Kuva 16. Saman näytteen karboksihemoglobiinipitoisuuden muutos mittaussarjojen edetessä. Valmistajan mukaan alin hyväksytty tulos on 52,4 % COHb:a.

Tämä havainto todennäköisesti selittää vanhojen ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden mittauksissa havaitun vaihtelevuuden sen suhteen, eroaako yksittäinen ABL90 Flex Plus -laitteen saama tulos vertailuarvosta tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla vai ei. Lisäksi se on todennäköisin syy, miksi parittaisen t-testin mukaan ABL90 Flex Plus -laitteen tulokset eroavat varmennetuista vertailuarvoista tilastollisesti merkitsevästi kyseisellä luottamustasolla.

Tapauksissa, joissa ero oli tilastollisesti merkitsevä (nolla-vertailuarvoa lukuun ottamatta) kaikissa ABL90 Flex Plus -laitteella mitattu tulos jäi vertailuarvoa alhaisemmaksi. Samoja vertailunäytteitä oli analysoitu eri tilanteissa tässä validoinnissa käytetyistä näyteputkista monesti aiemminkin, joten todennäköisesti putkien näytteet olivat olleet kosketuksissa ilman kanssa useaan kertaan. Vuorovaikutus hengitysilman kanssa oli siis luultavasti ehtinyt muuttamaan karboksihemoglobiinipitoisuuksia osassa tutkituista laaduntarkkailunäytteistä.

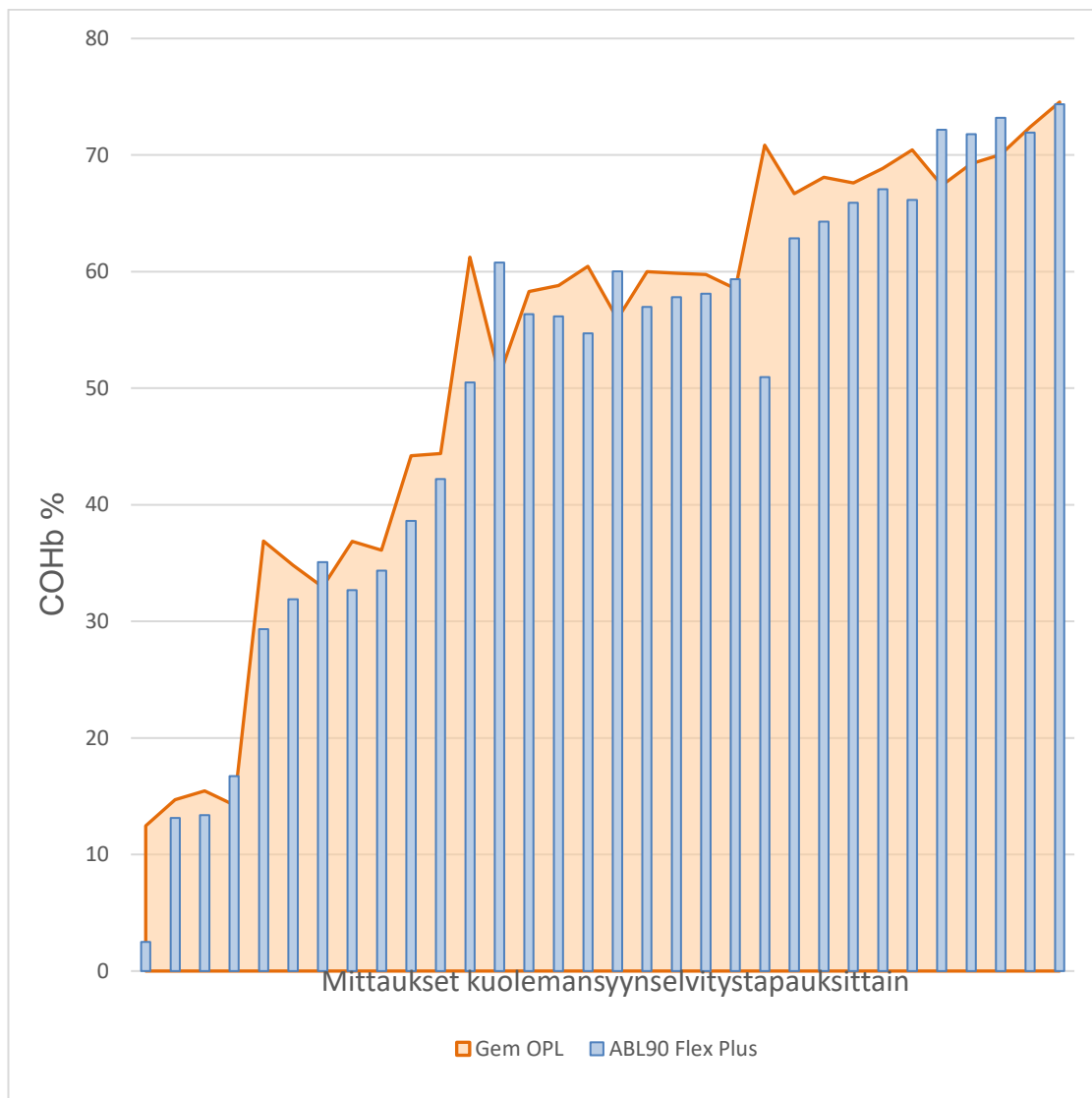
Putken avaamisen aiheuttama vaikutus karboksihemoglobiinipitoisuuteen huomioitiin sisällyttämällä uuteen työohjeeseen kohta, jossa kehoitetaan mittauksen suorittajaa riipeyteen ja huolellisuuteen mittauksista tehdessä, jotta verinäyte olisi kosketuksissa hengitysilman kanssa mahdollisimman vähän aikaa.

5.4 Vertailu vanhan laitteen kanssa

Validointia varten valitut kuolemansyynselvitystapaukset mitattiin aina myös vanhalla laitteella tulosten oikeellisuuden ja matriisiefektin tarkastelemiseksi. Laitteiden mittaamia tuloksia vertailtaessa otettiin huomioon vain Gem OPL -laitteen tuloksen mukaan yli 10 % ja alle 75 % COHb:a sisältävät näytteet, jotta vanhan laitteen tulosta voidaan pitää luotettavana. Laitteiden ero ei ollut parittaisen t-testin perusteella tilastollisesti merkitsevä 95 %:n luottamustasolla. Suoritettu testi on esitetty liitteessä 4. Verrattaessa uuden laitteen tuloksia vanhan laitteen tuloksiin ABL90 Flex Plus-laitteen systemaattinen virhe oli 4,3 %. Ulkoisilla laaduntarkkailunäytteillä ABL90 Flex Plus -laite antoi lähes systemaattisesti vertailuarvoa pienempiä, ja Gem OPL -laite vertailuarvoa suurempia lukemia. Gem OPL -laite muodostaa tulokset pienemmällä määrällä tarkasteltavia aallonpituuksia [14], kuin ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysaattori.

Osassa tuloksista oleva ero laitteiden välillä selittyy mahdollisesti mittauksissa käytetyillä eri matriiseilla (Gem OPL -laitteella putkiveri ja ABL90 Flex Plus -laitteella pulloveri), sekä yleisesti vainajanäytematriisien heterogeenisuudella: mm. näytteessä oleva rasva ja muut partikkelit häiritsevät mittauksista. Tämän huomion takia uuteen työohjeeseen sisällytettiin kohta, jossa analyysin suorittajaa

ohjeistetaan poistamaan sentrifugoinnin aikana näytteen pinnalle kertynyt rasva huolellisesti ennen näytteen aspiroimista laitteeseen. Kuvaaja laitteiden vastaavuudesta 32 näytteen satunnaisotoksessa on esitetty kuvassa 17.



Kuva 17. Laitteiden vastaavuus. Vaaka-akselin suhteen samalla tasolla olevat arvot tarkoittavat samaa kuolemansyynselvitystapausta. Tulokset on asetettu suuruusjärjestykseen laitteiden keskiarvoisten tulosten mukaisesti tarkastelun helpottamiseksi.

Kuvaajasta on huomattavissa, että pääsääntöisesti kummankin laitteen tulokset noudattavat ennalta-arvattavaa trendiä ja Gem OPL:n mittaustulokset ovat hieman ABL Flex Plus -laitteen mittaustuloksia suurempia. Seitsemässä tapauksessa mitatuista 22:a, eli noin viidesosassa, Gem OPL:n tulos jää kuitenkin pienemmäksi.

5.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus tutkittiin Mukit-ohjelmistoa hyödyntäen kahdella eri pitoisuustasolla. Tuloksien muodostamisessa otettiin huomioon toistettavuus, sekä ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla selvitetty biasprosentti. Laajennettu mittausepävarmuus 95 %:n luottamustasolla pitoisuusalueella 0—10 prosenttiyksikköä COHb:a sisältävillä näytteillä on 49 %:a ja pitoisuusalueella 10—100 prosenttiyksikköä COHb:a 19 %:a. Mukit-tulosraportit on esitetty liitteessä 5.

6 Päätelmät

Validoinnin perusteella ABL90 Flex Plus -verikaasuanalysointilaite soveltuu vainajista otettujen verinäytteiden COHb-määrittämiseen, joiden tavoitteena on vahvistaa tai poissulkea häikämyrkytys kuoleman aiheuttaneena tai siihen myötävaikuttaneena tekijänä. Häikämäärittämisen tarkoituksena ei ole ainoastaan tuottaa analyysituloksia karboksihemoglobiinin määrästä veressä, vaan viime kädessä toimia oikeuslääkärin työkaluna määrittäessä, aiheuttiko hiilimonoksidi kyseisen vainajan elimistössä kuolemaan johtavia tai siihen myötävaikuttaneita tapahtumia. Oireiden ilmaantuminen on yksilökohtaista, joten pitoisuusalueet, joilla ne ilmenevät, ovat jopa kymmeniä prosentteja. Tulosten tulkinta tapahtuu vertaamalla saatua tulosta pitoisuusalueiden rajoihin, joten mittauksen tarkkuus päädyttiin toteamaan riittäväksi, vaikka ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset erosi vertailuarvoista merkittävästi. Päädyttiin myös pitäytymään nykyisissä vertailunäytteiden mittauksissa, vaikka uudempien vertailumittauskierrosten näytteillä olisi mahdollisesti saavutettu paremmat systemaattisen virheen ja mittausepävarmuuden tulokset, kun näytteiden käsittelyyn osattiin kiinnittää huomiota ja siten minimoida huoneilman vaikutus karboksihemoglobiinipitoisuuteen.

Tulosten perusteella kaikki testatut matriisit soveltuvat rutiinikäyttöön; anti-koagulanttia sisältämätön pulloveri ensisijaisena matriisina. Näytematriisi vaikuttaa mittauksen lopputulokseen hieman, mutta koska tavoitteena ei ole ainoastaan karboksihemoglobiinipitoisuuden selvittäminen, vaan ensisijaisesti

myrkytystapauksen poissulkeminen, ero ei ole niin merkittävä, että se voisi vaikuttaa ratkaisevasti tulosten tulkintaan, jolloin jokin matriiseista jouduttaisiin hylätä.

Validoinnin aikana menetelmän akkreditoinnista päätettiin luopua, sillä häkämääritys on melko harvoin oikeuslääketieteellisen kuolemansyynselvityksen yhteydessä pyydetty analyysi. Menetelmällä osallistutaan kuitenkin myös jatkossa ulkoiseen vertailututkimukseen kerran kuukaudessa, jolloin se on säännöllisesti ulkoisen laaduntarkkailun kohteena. Tämä nähtiin tärkeänä, sillä uudella menetelmällä tehtyjen potilasmittausten yhteydessä ei suoriteta erillisiä kontrollimitauksia, vaan laite huolehtii suoritettavista kontrollimitauksista automaattisesti.

Validoinnin aikana ei tutkittu sikiöverenpunaa sisältävien häkämyrkytysnäytteiden tulosten asettumista menetelmän mittausepävarmuusalueelle, sillä sikiötöypin hemoglobiinia sisältäviä häkämyrkytysnäytteitä tulee analysoidavaksi erittäin harvoin eikä niitä ollut opinnäytetyön puitteissa saatavilla. Laitteeseen on kuitenkin mahdollista asettaa automaattinen korjaus, mikäli se nähdään tarpeelliseksi, jolloin alle 20 %:n karboksihemoglobiinipitoisuuksissa laite suorittaa laskennallisen korjauksen mittaustulokseen, mikäli kokonaishemoglobiinista yli 20 % on sikiöverenpunaa. Yli 20 %:n karboksihemoglobiinipitoisuuksilla kyseessä voidaan tulkita olevan jo myrkytystila, eikä hemoglobiinityyppien erosta johtuva mittauksen epätarkkuus todennäköisesti muuta tuloksen tulkintaa ratkaisevasti.

Uuden ABL90 Flex Plus -laitteen käyttöönotto helpottaa ja nopeuttaa vainajinäytteistä tehtävää häkämääritystä huomattavasti aiempaan menetelmään verrattuna, kun työläs näytteiden esikäsittelyprosessi korvataan yksinkertaisella vesilaimennoksella. Myös vertailumittauksissa uudella menetelmällä on saatu hyviä tuloksia. ABL90 Flex Plus -laite voidaan ottaa käyttöön oikeuskemianyksikössä tehtäviä vainajien häkämyrkytysmäärityksiä varten, ja sen voidaan todeta täyttävän sille asetetut vaatimukset erinomaisesti.

Lähteet

- 1 Salmenperä, Markku & Kuisma, Markku. Häkä- ja palokaasumyrkytys. 2004. Verkkoaineisto. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. 4/2004 vsk 120 s.457—453 <duodecimlehti.fi/duo94117> Luettu: 1.4.2021
- 2 Liitetaulukko 2. Tapaturmissa kuolleet ulkoisen syyn ja päihtymyksen mukaan 2019. Verkkoaineisto. Tilastokeskus. <https://www.stat.fi/til/ksyyt/2019/ksyyt_2019_2020-12-14_tau_004_fi.html> Päivitetty viimeksi 14.12.2020. Luettu: 30.3.2021.
- 3 Vainajan omaisille ja läheisille. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta/vainajan-omaisille-ja-laheisille#Kuolinsyy_ ja_kuolinaika> Luettu: 29.3.2021
- 4 Laki kuolemansyyn selvittämisestä. 1973. 459/1.6.1973.
- 5 Alkoholimyrkytyskuolemat ovat vähentyneet, huumekuolemat eivät. Verkkoaineisto. 17.1.2020. 3/2020 vsk 75 s. 126—134 <<https://www.laakarilehti.fi/tieteessa/alkuperaistutkimukset/alkoholimyrkytyskuolemat-ovat-vahentyneet-huumekuolemat-eivat/>> Luettu 23.4.2021
- 6 ABL90 Flex Plus Käyttöohjeet Ohjelmistoversiosta 3.4 alkaen. 2018. Radiometer Medical ApS.
- 7 How is carboxyhemoglobin formed? Verkkoaineisto. <<https://www.quora.com/How-is-carboxyhemoglobin-formed>> Luettu: 28.4.2021
- 8 Olson, Karen N.; Hillyer, Melissa A.; Kloss, Julie S.; Geiselhart, Roberta J. & Apple, Fred S. Clinical Chemistry. 2010. Clinical Case Study. Accident or Arson: Is CO-Oximetry Reliable for Carboxyhemoglobin Measurement Postmortem?
- 9 Pappagianopoulos, Paul. 2005. GEM OPL Procedure.
- 10 Karboksihemoglobiinin mittaaminen verinäytteistä (MO-020) (COHb). 2021. Laboratorion sisäinen dokumentti. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, oikeuskemistiyksikkö.
- 11 Pulse oximetry: Understanding its basic principles facilitates appreciation of its limitations. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095461111300053X>> Luettu: 16.5.2021

- 12 Kinoshita, H. ym. Application of CO-oximeter for Forensic Samples. 20.12.2017 Verkkoaineisto. <<https://www.intechopen.com/books/post-mortem-examination-and-autopsy-current-issues-from-death-to-laboratory-analysis/application-of-co-oximeter-for-forensic-samples>> Luettu 10.5.2021.
- 13 CO-oximeter. ScienceDirect. Verkkoaineisto. <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/co-oximeter>> Luettu: 10.5.2021.
- 14 GEM OPL Oxygenation Portable Laboratory, Operator's Manual. Dec 2003: Laboratorion sisäinen dokumentti. Käyttömanuaali.
- 15 Baselt, Randall. 2020. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 12th ed. California: Biomedical Publication.
- 16 Vala, Ursula & Into Kustannus. 2002. Kuoleman monet kasvot. E-kirja. Into Kustannus Oy.
- 17 Koppinen, Kimmo. 2021. Myyntiedustaja, Triolab Finland Oy, Turku. Keskustelu 16.3.2021.
- 18 Ketola, Raimo. 2022. Laboratoriopäällikkö ja oikeuskemisti, Terveystieteiden tutkimuskeskus, Helsinki. Sähköpostikeskustelu 13.9.2022.

Validointiparametrit

Taulukko 1. Validointisuunnitelman mukaiset parametrien tavoitearvot

Parametri	Tavoitearvo tai vastaava
Toistettavuus	RSD % <15 %
Uusittavuus	RSD % <15 %
Toteamisraja (Cut-off)	Ei määritetä.
Määrittäysraja ja mittausalue	Laitteen mukaiset arvot.
Kalibroinnin tarkkuus ja oikeellisuus	COHb kalibroidaan kerran 3 kuukaudessa, ei muuta validointia. Muut parametrit laite kalibroi automaattisesti kitin avulla, joten niitä ei voi testata.
Menetelmän lineaarisuus	Ei voida validoida.
Spesifisyys ja selektiivisyys	Ei voida validoida.
Saanto	Ei näytteenkäsittelyä, ei validoida.
Häiriöalttius	Ei näytteenkäsittelyä, ei validoida.
Tulosten oikeellisuus ja matriisiefekti	Verrataan vanhojen laitteiden kanssa, ME %:n rajoissa.
Ulkoisen näyttö tulosten oikeellisuudesta	Ulkoiset laadunvalvontakierrokset, LGC TOX BLD.
Mittausepävarmuus (ME%)	≤ 30 %
Raportointiraja	1 % (COHb), muille parametreille laitteen mukaan tai tarvittavien laimennosten mukaan.
Näytteiden/laimennosten säilyvyys	Laimennosten säilyvyys 5 päivää, ME %:n rajoissa

ABL90 Flex Plus -laitteen mittaustuloksen vertaaminen laaduntarkkailunäytteen tunnettuun pitoisuuteen

Testin valinta:						
Keskiarvon vertaaminen tunnettuun arvoon: t-testi						
Merkitsevyystaso=riskitaso			Vapausasteet:			
alfa=0,05			n-1			
Hypoteesit:			Yksi- vai kaksisuuntainen:			
H_0: μ=vertailuarvo			kaksisuuntainen			
H_1: $\mu \neq$vertailuarvo						
Testisuure: (t.lask)	$t_{laskettu} = \frac{ \bar{x} - \mu_0 }{s/\sqrt{n}}$					
Kriittinen arvo:						
(t.krit)	=T.INV(1-alfa/2;n-1)					
Vertailuarvo	x (rinnakk.)	s (rinnakk.)	n	t. lask	t. krit	t.lask>t.krit
4,5	3,4	0,21	3	8,9	4,3	kyllä
61,3	60,3	0,99	3	1,7	4,3	ei
6,7	5,7	0,21	2	7,0	12,7	ei
42	39,5	0,99	2	3,6	12,7	ei
0	1,1	0,32	2	5,0	12,7	ei
10,7	8,8	0,35	2	7,8	12,7	ei
8,5	5,8	0,21	2	18,3	12,7	kyllä
17,4	14,7	0,21	2	18,3	12,7	kyllä
35,6	33,2	0,14	2	24,0	12,7	kyllä
64,9	63,0	0,42	2	6,3	12,7	ei
70,4	70,2	0,07	2	5,0	12,7	ei
0	2,3	0,61	3	6,6	4,3	kyllä
0	1,3	0,28	2	6,5	12,7	ei
26	23,0	0,78	2	5,5	12,7	ei
Johtopäätökset kriittisen arvon perusteella						
Jos t.lask > t.krit, niin H_0 hylätään.						
Saatu keskiarvo eroaa tilastollisesti merkitsevästi tunnetusta arvosta luottamustasolla 95 %.						
Jos t.lask ≤ t.krit, niin H_0:aa ei hylätä.						
Saatu keskiarvo ei eroa tilastollisesti merkitsevästi tunnetusta arvosta luottamustasolla 95 %.						
5/14 = 0,357 =						
n. 36 % yksittäisistä ABL90 Flex Plus mittaustuloksista eroaa tilastollisesti merkitsevästi vertailuarvosta						

Parittainen kahden otoksen t-testi				Tapaus	(1) Vertailuarvo	(2) ABL90 Flex Plus	Erotus d = (1) - (2)
	alfa = 0,05						
	kaksisuuntainen			1	4,5	3,4	1,07
				2	61,3	60,3	0,97
Hypoteesit				3	6,7	5,7	1,05
	H ₀ : μd=0			4	42	39,5	2,50
	H ₁ : μd≠0			5	0	1,1	-1,13
				6	10,7	8,8	1,95
Testisuure				7	8,5	5,8	2,75
	$t_{laskettu} = \frac{ \bar{d} }{s_d/\sqrt{n}} = 2,407651$			8	17,4	14,7	2,75
				9	35,6	33,2	2,40
				10	64,9	63,0	1,90
Vapausasteet				11	70,4	70,2	0,25
	df = näytteiden lukumäärä-1 = 13			12	0	2,3	-2,33
				13	0	1,3	-1,30
Kriittinen arvo				14	26	23,0	3,05
	t.krit = T.INV.2T(0,05;13) = 2,160369						
Johtopäätökset							
	t.lask = 2,4077 > 2,1604 = t.krit,				Keskiarvo	1,134	(d)
	joten H ₀ hylätään.				Otoskeskih.	1,698	(sd)
					n	13	
ABL90 Flex Plus -laitteella saadut tulokset eroavat vertailuarvoista tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %							

Veripullo- ja veriputkimatriisien vertailu

Parittainen kahden otoksen t-testi				Tapaus	vpl tulos	vpt tulos	Erotus d = vpl - vpt
	alfa=0,05			1	0,6	2,86	-2,26
	kaksisuuntainen			2	2,18	4,28	-2,1
				3	2,2	4,22	-2,02
Hypoteesit				4	2,26	3,6	-1,34
	H ₀ : μd=0			5	2,34	4,06	-1,72
	H ₁ : μd≠0			6	2,48	4,2	-1,72
				7	2,5	4	-1,5
Testisuure				8	3,54	6,52	-2,98
t.lask =	$t_{laskettu} = \frac{ \bar{d} }{s_d/\sqrt{n}} =$	0,2263		9	4,6	7,24	-2,64
				10	5,28	5,8	-0,52
				11	7	7,6	-0,6
Vapausasteet				12	7,36	7,5	-0,14
	df = näytteiden lukumäärä-1 = 33			13	8,76	10,34	-1,58
				14	13,38	13,8	-0,42
Kriittinen arvo				15	16,72	11,2	5,52
	t.krit = T.INV.2T(0,05;33) =	2,0345		16	29,32	20,22	9,1
				17	31,9	32,1	-0,2
Johtopäätökset				18	32,68	35,86	-3,18
	t.lask = 0,2263 < 2,0345 = t.krit,			19	34,74	34,18	0,56
	joten H ₀ ei hylätä.			20	35,08	34,7	0,38
				21	38,62	40,94	-2,32
Veriputki- ja veripullomatriiseista saadut tulokset eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %				22	50,5	53,08	-2,58
				23	54,7	57,2	-2,5
				24	56,16	55,4	0,76
				25	56,36	56,16	0,2
				26	58,1	55,56	2,54
				27	58,44	50,62	7,82
				28	62,86	64,3	-1,44
				29	64,3	64,7	-0,4
	keskiarvo	0,119	(d)	30	71,78	69,94	1,84
	otoskeskih.	3,0766	(sd)	31	71,94	69,9	2,04
	n	34		32	72,22	73,64	-1,42
				33	73,2	66,7	6,5
				34	74,36	71,98	2,38

Laitteiden vastaavuuden tutkiminen t-testillä

				Tapaus	(1) ABL90 Flex Plus	(2) Gem OPL	Erotus d = (1) - (2)
Parittainen kahden otoksen t-testi							
	alfa=0,05			1	56,16	58,8	-2,64
	kaksisuuntainen			2	35,08	32,95	2,13
				3	2,5	12,45	-9,95
Hypoteesit				4	73,2	70,05	3,15
	H_0: $\mu d=0$			5	64,3	68,1	-3,8
	H_1: $\mu d \neq 0$			6	54,7	60,45	-5,75
				7	58,1	59,75	-1,65
Testisuure				8	58,44	53,25	5,19
t.lask =	$t_{iaskettu} = \frac{ \bar{d} }{s_d/\sqrt{n}} =$	0,3045		9	16,72	14,25	2,47
				10	74,36	74,55	-0,19
				11	38,62	44,2	-5,58
Vapausasteet				12	71,78	69,25	2,53
	df = näytteiden lukumäärä-1 = 37			13	62,86	66,7	-3,84
				14	50,5	61,25	-10,75
Kriittinen arvo				15	32,68	36,85	-4,17
t.krit	=T.INV.2T(0,05;37) = 2,0262			16	75,18	36,25	38,93
				17	13,14	14,7	-1,56
Johtopäätökset				18	42,2	44,4	-2,2
	t.lask = 0,30465 < 2,0262 = t.krit,			19	46,4	19,75	26,65
	joten H_0 ei hylätä.			20	60,78	51,05	9,73
				21	50,96	70,85	-19,89
Gem OPL ja ABL90 Flex Plus -laitteilla saadut tulokset eivät eroa tilastollisesti merkittävästi luottamustasolla 95 %				22	29,32	36,9	-7,58
				23	31,9	34,8	-2,9
				24	13,38	15,45	-2,07
				25	42,35	19,8	22,55
				26	56,34	58,3	-1,96
				27	34,36	36,1	-1,74
				28	71,92	72,4	-0,48
				29	66,14	70,45	-4,31
				30	57,18	60	-2,82
				31	56,96	60	-3,04
				32	59,36	58,55	0,81
				33	36,46	36,1	0,36
	keskiarvo	0,499	(d)	34	72,16	67,4	4,76
	otoskeskih.	10,100	(sd)	35	65,9	67,6	-1,7
	n	38		36	60,02	55,95	4,07
				37	67,08	68,85	-1,77
				38	57,82	59,85	-2,03

Mukit-tulosraportit

Taulukko 1. Mukit-tulosraportti pitoisuusalueelle 0—10 % COHb:a

Nordtest Report

Page 1 of 2

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	COHb 0-10	3.8.2021																																																																											
1	Specify Measurand	Measurand: COHb Concentration range: 0-10 % Sample Type (Matrix): Blood Analysis Principle (Analyzer etc.): ABL90 Flex Plus																																																																												
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	A: Control samples Number of control samples: 13 Average concentration: 1,65692 % Standard deviation, S_{Rw} : 2,65 % B: Routine replicate samples Number of routine replicate series: 50 Number of parallel measurements: 5 Concentration range: 0,48-8,76 % Pooled standard deviation, S_r : 7,55 % $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2}$: 8,00 %																																																																												
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	Method and laboratory bias from interlaboratory comparisons Interlaboratory comparison count, N : 4 <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Assigned concentration, $c_{ref,i}$</td> <td>4,5 %</td> <td>6,7 %</td> <td>8,5 %</td> <td>5,9 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>3,4 %</td> <td>5,7 %</td> <td>5,8 %</td> <td>5 %</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$</td> <td>-24,44 %</td> <td>-14,93 %</td> <td>-31,76 %</td> <td>-15,25 %</td> </tr> <tr> <td>Between laboratories standard deviation, S_{Ri}</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> </tr> <tr> <td>Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{Ri}$</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td>Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> </tr> <tr> <td>Number of participating laboratories, n_i</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>$u(c_{ref,i})$</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> </tr> <tr> <td>Assigned Value Estimation Method</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Analyte</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sample Type (Matrix)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>PT provider</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Not using the proficiency test provider's uncertainty value, $U(Cref)$, but calculating the uncertainty in the following way: $u(c_{ref,i}) = \frac{S_{R(fixed)}}{\sqrt{n_i}}$</p>		i	1	2	3	4	Assigned concentration, $c_{ref,i}$	4,5 %	6,7 %	8,5 %	5,9 %	Measured concentration, c_i	3,4 %	5,7 %	5,8 %	5 %	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$	-24,44 %	-14,93 %	-31,76 %	-15,25 %	Between laboratories standard deviation, S_{Ri}	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{Ri}$	No	No	No	No	Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	Number of participating laboratories, n_i	50	50	50	50	$u(c_{ref,i})$	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	Assigned Value Estimation Method					Analyte					Sample Type (Matrix)					Date					PT provider					Additional information				
i	1	2	3	4																																																																										
Assigned concentration, $c_{ref,i}$	4,5 %	6,7 %	8,5 %	5,9 %																																																																										
Measured concentration, c_i	3,4 %	5,7 %	5,8 %	5 %																																																																										
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$	-24,44 %	-14,93 %	-31,76 %	-15,25 %																																																																										
Between laboratories standard deviation, S_{Ri}	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %																																																																										
Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{Ri}$	No	No	No	No																																																																										
Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %																																																																										
Number of participating laboratories, n_i	50	50	50	50																																																																										
$u(c_{ref,i})$	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*																																																																										
Assigned Value Estimation Method																																																																														
Analyte																																																																														
Sample Type (Matrix)																																																																														
Date																																																																														
PT provider																																																																														
Additional information																																																																														

		$u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref\ i})}{N} : 0,71 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} : 22,70 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2} : 22,72 \%$ <p>Notice! According to the Nordtest TR537 report, uncertainty evaluation requires at least six interlaboratory comparisons.</p>
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 8,00 \%$ $u(bias) = 22,72 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 24,08 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 49 \%$

Taulukko 2. Mukit-tulosraportti pitoisuusalueelle 10—100 % COHb:a

Nordtest Report

Page 1 of 2

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	COHb 10-100	3.8.2021																																																																																																																																							
1	Specify Measurand	Measurand: COHb Concentration range: 10-100 % Sample Type (Matrix): Blood Analysis Principle (Analyzer etc.): ABL90																																																																																																																																								
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	A: Control samples Number of control samples: 14 Average concentration: 53,22643 % Standard deviation, S_{RW} : 2,03 % B: Routine replicate samples Number of routine replicate series: 88 Number of parallel measurements: 4-5 Concentration range: 10,34-75,18 % Pooled standard deviation, S_r : 2,48 % $u(R_w) = \sqrt{S_{RW}^2 + S_r^2} : 3,21 \%$																																																																																																																																								
		Method and laboratory bias from interlaboratory comparisons Interlaboratory comparison count, N : 12 <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Assigned concentration, $c_{ref,i}$</td> <td>61,3 %</td> <td>42 %</td> <td>10,7 %</td> <td>17,4 %</td> <td>35,6 %</td> <td>64,9 %</td> <td>70,4 %</td> <td>26 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>60,3 %</td> <td>39,5 %</td> <td>8,8 %</td> <td>14,7 %</td> <td>33,2 %</td> <td>63 %</td> <td>70,2 %</td> <td>23 %</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$</td> <td>-1,63 %</td> <td>-5,95 %</td> <td>-17,76 %</td> <td>-15,52 %</td> <td>-6,74 %</td> <td>-2,93 %</td> <td>-0,28 %</td> <td>-11,54 %</td> </tr> <tr> <td>Between laboratories standard deviation, $S_{R,i}$</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> </tr> <tr> <td>Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{R,i}$</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td>Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> <td>5,00 %</td> </tr> <tr> <td>Number of participating laboratories, n_i</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>$u(c_{ref,i})$</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> <td>0,71 %*</td> </tr> <tr> <td>Assigned Value Estimation Method</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Analyte</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sample Type (Matrix)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>PT provider</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		i	1	2	3	4	5	6	7	8	Assigned concentration, $c_{ref,i}$	61,3 %	42 %	10,7 %	17,4 %	35,6 %	64,9 %	70,4 %	26 %	Measured concentration, c_i	60,3 %	39,5 %	8,8 %	14,7 %	33,2 %	63 %	70,2 %	23 %	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$	-1,63 %	-5,95 %	-17,76 %	-15,52 %	-6,74 %	-2,93 %	-0,28 %	-11,54 %	Between laboratories standard deviation, $S_{R,i}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{R,i}$	No	No	No	No	No	No	No	No	Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	Number of participating laboratories, n_i	50	50	50	50	50	50	50	50	$u(c_{ref,i})$	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	Assigned Value Estimation Method									Analyte									Sample Type (Matrix)									Date									PT provider									Additional information								
i	1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																																																																		
Assigned concentration, $c_{ref,i}$	61,3 %	42 %	10,7 %	17,4 %	35,6 %	64,9 %	70,4 %	26 %																																																																																																																																		
Measured concentration, c_i	60,3 %	39,5 %	8,8 %	14,7 %	33,2 %	63 %	70,2 %	23 %																																																																																																																																		
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$	-1,63 %	-5,95 %	-17,76 %	-15,52 %	-6,74 %	-2,93 %	-0,28 %	-11,54 %																																																																																																																																		
Between laboratories standard deviation, $S_{R,i}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %																																																																																																																																		
Consensus value robust mean or median, $S_{R(fixed)} = 1,25 \cdot S_{R,i}$	No	No	No	No	No	No	No	No																																																																																																																																		
Fixed standard deviation, $S_{R(fixed)}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %																																																																																																																																		
Number of participating laboratories, n_i	50	50	50	50	50	50	50	50																																																																																																																																		
$u(c_{ref,i})$	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*																																																																																																																																		
Assigned Value Estimation Method																																																																																																																																										
Analyte																																																																																																																																										
Sample Type (Matrix)																																																																																																																																										
Date																																																																																																																																										
PT provider																																																																																																																																										
Additional information																																																																																																																																										

		9	10	11	12	
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	Assigned concentration, $c_{ref,i}$	52,1 %	20,6 %	58,8 %	15,6 %
		Measured concentration, c_i	52,3 %	19 %	58,7 %	14,3 %
		$bias_i = \frac{c_i - c_{ref,i}}{c_{ref,i}} \cdot 100\%$	0,38 %	-7,77 %	-0,17 %	-8,33 %
		Between laboratories standard deviation, $s_{R,i}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %
		Consensus value robust mean or median, $s_{R(fixed),i} = 1.25 \cdot s_{R,i}$	No	No	No	No
		Fixed standard deviation, $s_{R(fixed),i}$	5,00 %	5,00 %	5,00 %	5,00 %
		Number of participating laboratories, n_i	50	50	50	50
		$u(c_{ref,i})$	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*	0,71 %*
		Assigned Value Estimation Method				
		Analyte				
		Sample Type (Matrix)				
		Date				
		PT provider				
		Additional information				
<p>* Not using the proficiency test provider's uncertainty value, U(Cref), but calculating the uncertainty in the following way: $u(c_{ref,i}) = \frac{s_{R(fixed),i}}{\sqrt{n_i}}$</p> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref,i})}{N} : 0,71 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} : 8,71 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2} : 8,74 \%$						
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 3,21 \%$ $u(bias) = 8,74 \%$				
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 9,31 \%$				
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 19 \%$				