



SAVONIA

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

GASTROSKOPIANÄYTTEIDEN GIEMSA-VÄRJÄYKSEN OPTIMOINTI JA NÄYTELASIEN SKANNAUS

TEKIJÄ/T: Jennamari Heikkinen
Heidi Rutanen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Jennamari Heikkinen ja Heidi Rutanen	
Työn nimi Gastroskopianäytteiden Giemsa-värjäyksen optimointi ja näytelasien skannaus	
Päiväys	11.3.2016
Sivumäärä/Liitteet	68/4
Ohjaaja(t) Marko Björn	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Keski-Suomen sairaanhoitopiiri, patologian yksikkö	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Yksi bioanalytiikan erikoisaloista on kliininen histologia ja sytologia. Tämän opinnäytetyön aiheena on "Gastroskopianäytteiden Giemsa-värjäyksen optimointi ja näytelasien skannaus". Histologiassa tarkoitetaan kudospäitä ja histologisessa prosessissa kudospäitä käsitellään eri työvaiheiden avulla valomikroskooppista tutkimusta varten. Gastroskopian yhteydessä otetuista koepaloista voidaan etsiä helikobakteereita, jotka elävät mahalaukun limakalvolla. Giemsa-värjäys on yleisimmin käytetty värjäys helikobakteereiden toteamisessa gastroskopianäytteistä. Yksi digitaalisen patologian sovelluksista on lasiskanneri, jolla kudospäitä voidaan skannata näytelasilta digitaaliseen muotoon.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli eri Giemsa-värjäyksen variaatioita vertailemalla löytää optimaalisin värjäysvariaatio helikobakteereiden osoittamiseen gastroskopianäytteistä. Vertailussa mukana oli Merckin ja Reagenan Giemsa-värjäysreagenssit. Työn lähtökohdaksi oli vertailla neljää eri Giemsa-värjäyksen variaatiota, jotka nimettiin A-D -värjäyksiksi sekä kehittää niiden pohjalta optimaalinen Giemsa-värjäysohje helikobakteereille. Tavoitteena oli optimoidun Giemsa-värjäyksen avulla parantaa helikobakteereiden löytymistä gastroskopianäytteistä ja sen myötä helpottaa patologioiden työtä. Lisäksi tavoitteena oli kehittää omaa ammatillista osaamista.</p> <p>Värjäyksiä vertailtiin kolmella värjäyskierroksella. Alustava arvio värjäyksistä tehtiin yhdessä sairaalasolubiologin kanssa, mutta tarkempi arvio värjäysten onnistumisesta pyydettiin kirjallisen kyselylomakkeen muodossa patologeilta ja sairaalasolubiologeilta. Kyselylomakkeessa arvioijat pisteyttivät värjäykset yleisen värjäytyvyyden ja helikobakteereiden värjäytyvyyden perusteella. Lisäksi heillä oli mahdollisuus antaa sanalliset arviot värjäyksistä. Pisteytysten keskiarvoihin ja sanallisiin arvioihin perustuen valittiin paras eli optimaalisin Giemsa-värjäys helikobakteereille. Parhaaksi värjäykseksi valikoitui toisen värjäyskierroksen A-värjäys, joka toteutettiin Merckin Giemsa -värjäysreagenssilla.</p> <p>Opinnäytetyö on toiminnallinen kehittämistyö, jonka toimeksiantajana on Keski-Suomen sairaanhoitopiirin patologian yksikkö. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksena patologian yksikkö saa käyttöönsä optimoidun Giemsa-värjäysohjeen helikobakteereiden osoittamiseksi. Jatkotutkimuksena opinnäytetyölle voisi olla Reagenan Giemsa-värjäysreagenssin optimointi helikobakteereille.</p>	
Avainsanat Giemsa-värjäys, gastroskopia, helikobakteeri, digitaalinen patologia, optimointi	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Jennamari Heikkinen and Heidi Rutanen			
Title of Thesis Optimization of Giemsa Staining for Gastroscopy Tissue Samples and Slide Scanning			
Date	11th March 2016	Pages/Appendices	68/4
Supervisor(s) Marko Björn			
Client Organisation /Partners Central Finland Health Care District, Department of Pathology			
<p>Abstract</p> <p>One of the special fields in biomedical laboratory science is clinical histology and cytology. The subject of this thesis is optimization of Giemsa staining for gastroscopy tissue samples and slide scanning. In the histological process the biopsy is prepared for optical microscope research by different work stages. Biopsies taken during gastroscopy can be searched for helicobacter that live on the mucosa of stomach. Giemsa staining is the most commonly used staining method for diagnosing helicobacter from gastroscopy tissue samples. One of the applications of digital pathology is slide scanner by which the tissue sample can be scanned into digital form.</p> <p>The purpose of this thesis was to compare different variations of Giemsa staining for diagnosing helicobacter in gastroscopy tissue samples. The staining reagents of Merck and Reagen were compared and the objective was to find the optimal Giemsa staining for diagnosing helicobacter and putting that into use at the Department of Pathology. The baseline of this thesis was to compare four different variations of Giemsa staining that were named A-D stainings and from that basis to create an optimized Giemsa staining guideline for helicobacter. The aim was also to facilitate the work of pathologists and develop our own professional skills.</p> <p>The stainings were compared on three different staining rounds. The preliminary estimate of the stainings was done together with cellular biologist but the more precise assessment of the success of the stainings was done by a questionnaire that the pathologists and cellular biologists answered. In the questionnaire the critics evaluated the stainings by the general staining and the staining of helicobacter. They also had a chance to give oral assessments of the stainings. Based on the mean of the evaluation points and oral assessments the best and so the most optimal way to stain the helicobacter was chosen which was the Giemsa staining. The best staining was the A staining of the second staining round that was executed by the Merck's Giemsa staining reagent.</p> <p>This thesis is a practice-based development paper commissioned by the Department of Pathology of Central Finland Health Care District. The outcome of this practice-based thesis is an optimized Giemsa staining guideline for diagnosing helicobacter for the Department of Pathology. An extended research regarding this thesis could be optimizing the Reagen's Giemsa staining reagent for the helicobacter.</p>			
Keywords Giemsa-staining, gastroscopy, helicobacter, digital pathology, optimization			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	HISTOLOGINEN PROSESSI	8
2.1	Histologiset näytteet	8
2.2	Näytteen saapuminen ja kirjaaminen laboratoriotietokantaan	9
2.3	Näytteen kiinnittäminen	10
2.4	Näytteen esikäsittely	10
2.5	Kudoskuljetus	11
2.6	Parafiiniin valu	12
2.7	Parafiiniin valettujen näytteiden leikkaaminen	12
2.8	Värvääminen ja päällystäminen	14
3	GASTROSKOPIANÄYTTEET	16
3.1	Mahalaukun anatomia	16
3.2	Gastroskopiatuskimus	17
4	HELIKOKAKTEERIT	19
4.1	Bakteerin yleinen rakenne	19
4.2	Mahasuolikanavan mikrobisto	20
4.3	Helicobacter pylori	20
4.4	Helikobakteeri infektion aiheuttajana	21
4.5	Helikobakteerin toteaminen	21
5	VÄRJÄYKSET	23
5.1	Modifioitu Giemsa-värväys	23
5.2	Muut värväykset helikobakteereille	24
5.3	Leica ST5020 -värväysautomaatti	25
6	DIGITAALINEN PATOLOGIA	26
6.1	Näytelasien skannaaminen digitaaliseen muotoon	26
6.2	Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri	26
7	TUTKIMUSKYSYMYKSET	28
8	TUTKIMUKSEN ETENEMINEN	29
8.1	Näyttemateriaalin valinta	29
8.2	Leikkeiden valmistaminen	29
8.3	Alkuperäinen Giemsa-värväys ja ensimmäinen värväyskierros	30

8.4	Toinen värjäyskierrros.....	34
8.5	Kolmas värjäyskierrros	35
8.6	Näytelasien skannaus	35
9	VÄRJÄYKSEN TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA	37
9.1	Värjäystulosten arviointi.....	37
9.2	Värjäysohjelmista saadut pisteytykset ja sanalliset arviot	38
9.3	Parhaan värjäysohjelman valinta	49
9.4	Värjäystulosten yhteenveto	51
10	TUTKIMUKSEN ONNISTUMINEN JA LUOTETTAVUUS	53
11	POHDINTA.....	55
	LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT.....	58
	LIITE 1: GASTROSKOPIANÄYTTEIDEN GIEMSA-VÄRJÄYKSEN OPTIMOINNIN ARVIOINTI.....	65
	LIITE 2: KSSHP:N OPTIMOITU GIEMSA-VÄRJÄYSOHJE	66

1 JOHDANTO

Kliininen patologia jakautuu erikoisalana histologiaan ja sytologiaan. Histologia tutkii kudoksenäytteitä ja sytologia kehon erilaisia nesteitä. Kudoksenäytteet voivat olla esimerkiksi tähystysten yhteydessä otettuja koepaloja ja leikkauspreparaatteja. Kudoskäsittely- ja värjäysprosessien avulla kudoksenäytteet käsitellään niin, että patologi pystyy tekemään niistä diagnoosin. Tätä kokonaisuutta kutsutaan histologiseksi prosessiksi. Nykyisin histologian laboratorioissa tapahtuva työskentely on osittain automatisoitua erityisesti kudoskäsittelyn ja värjäysten osalta. Suuri osa työskentelystä on kuitenkin edelleen käsityötä, joka vaatii hyviä kädentaitoja. (Suomen Bioanalyttikoliitto ry 2016.)

Helikobakteeri on gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka aiheuttaa mahalaukun limakalvon tulehduksen eli gastriitin. Ureaasiaktiivisuutensa avulla helikobakteeri kykenee pitämään elinalueensa neutraalina muuten happaman limakalvon pinnalla. Helikobakteerin laboratoriodiagnostiikka jaetaan invasiiviseen ja ei-invasiiviseen. Invasiivisia menetelmiä ovat gastrokopian eli mahalaukun tähystyksen yhteydessä otetut koepalat, mikrobiologinen viljely ja ureaasipikatesti. Ei-invasiivisia menetelmiä ovat seerumi vasta-ainekoe, ureahengitystesti ja ulosteantigeenitesti. (Heikkilä, Hellstén, Koukila-Kähkölä, Kurkinen, Meurman, Nummelin, Pastila, Richardson ja Ylönen 2005, 46, 152.)

Giemsa-värjäys on paljon käytetty värjäysmenetelmä helikobakteereiden toteamisessa. Muita käytössä olevia värjäysmenetelmiä ovat Warthin-Starry-, toluidiinisini-, Gimenez- ja kresyyli-violettiase-taattivärjäys. Giemsa-värjäys on kehittäjänsä Gustav Giemsan mukaan nimetty värjäys, jota käytetään histopatologiassa kudoksenäytteen eri rakenteiden laadukkaan värjäytyvyyden vuoksi (Barcia 2007, 292). Se on myös hyödyllinen värjäys erilaisten mikro-organismien toteamisessa ja bakteerien morfologisten ominaisuuksien tunnistamisessa (Saxena 2010, 102).

Digitaalinen patologia on kliinisen patologian laboratorion nykyaikaa ja sen hyödyntäminen laboratoriossa on yleistynyt koko ajan perinteisten menetelmien rinnalla (Daniel, Macary, Rojo, Klossa, Laurnavičius, Beckwith ja Mea 2010, 1–2). Yksi digitaalisen patologian sovelluksista on lasiskanneri, jolla voidaan skannata histologiset kudoksenäytteet objektilasilta digitaaliseen muotoon. Tämä mahdollistaa kudoksenäytteiden tarkastelun tietokoneen näytöltä samalla tyylillä kuin niitä tarkasteltaisiin perinteisesti valomikroskoopissa. (Pantanowitz, Sinard, Henricks, Fatheree, Carter, Contis, Beckwith, Evans, Otis, Lal ja Parwani 2013, 1710.)

Opinnäytetyön aiheena on gastrokopianäytteiden Giemsa-värjäyksen optimointi ja näytelasien skannaus. Optimointi on parhaan ratkaisun, vaihtoehdon tai määrän hakemista tai tuottamista (Nurmi, Rekiaro ja Rekiaro 2009, 348). Opinnäytetyön tilaajana toimii Keski-Suomen sairaanhoitopiirin patologian yksikkö Jyväskylässä. Idea opinnäytetyöhön tuli sairaalalubiologi Marjukka Frimanilta ja bioanalyttikko Sari Lamminaholta keväällä 2015. Gastrokopianäytteiden Giemsa-värjäyksen optimointi oli patologian yksikölle hyvin ajankohtainen ja tarpeellinen. Aihe sopi laajuudeltaan ja haastavuudeltaan meille hyvin opinnäytetyöksi. Olemme molemmat kiinnostuneita kliinisen patologian erikoisalasta ja halusimme opinnäytetyön aiheen kautta syventää omaa ammattitaitoamme sekä kehittää kädentaitojamme. Lisäksi opinnäytetyön todellinen tarve motivoi meitä. Halusimme myös tuo-

da digitaalista patologiaa esille opinnäytetyössämme ja tästä syystä laajensimme aihetta näytelasien skannaamiseen lasiskannerilla.

Opinnäytetyössä vertailemme Giemsa-värjäyksen eri variaatioita gastroskopianäytteille, joissa epäilään olevan helikobakteereita. Toteutamme vertailun kahden eri valmistajan Giemsa-värjäysreagensseilla. Työn lähtökohtana on verrata neljää Giemsa-värjäyksen variaatiota ja lähteä kehittämään niistä optimaalisinta helikobakteereille. Opinnäytetyön tarkoituksena on värjäysvariaatioita vertailemalla ja kehittämällä löytää optimaalisin Giemsa-värjäysohje helikobakteereiden toteamiseen gastroskopianäytteistä. Tavoitteena on optimoidun Giemsa-värjäyksen kautta parantaa helikobakteereiden löytymistä gastroskopianäytteistä ja helpottaa sen myötä patologioiden työtä. Lisäksi opinnäytetyön tavoitteena on kehittää omaa ammatillista osaamistamme. Optimoidun Giemsa-värjäysohjeen käyttöönotto nykyisellä värjäysautomaatilla jää patologian yksikön toteutettavaksi. Arvioimme värjäysvariaatioita alustavasti yhdessä meitä ohjanneen sairaalasolubiologin kanssa ja pyydämme värjäyksistä tarkemman arvion kyselylomakkeen muodossa patologeilta ja sairaalasolubiologeilta. Valitsimme parhaan värjäysvariaation sairaalasolubiologien ja patologioiden visuaalisten arvioiden ja pisteytyksien perusteella.

Patologian yksiköllä oli nykyistä värjäysautomaattia ennen käytössä toinen värjäysautomaatti, jossa modifioitu Giemsa-värjäys toimi moitteettomasti. Nykyinen värjäysautomaatti ei anna yhtä hyviä värjäystuloksia samalla värjäysohjelmalla. Tästä syystä Giemsa-värjäyksen optimointi on patologian yksikölle tarpeellinen. Opinnäytetyön tutkimusongelma muodostuu toimimattomasta Giemsa-värjäysohjelmasta nykyisellä värjäysautomaatilla. Tutkimusongelmasta johdattelemme tutkimuskysymykset, joihin etsimme opinnäytetyön avulla vastausta. Mikä Giemsa-värjäyksen variaatioista on optimaalisin helikobakteereille? Onko Reagenan Giemsa-värjäysreagenssi yhtä sovelias helikobakteerien osoittamiseen kuin Merckin Giemsa-värjäysreagenssi?

Opinnäytetyömme on toiminnallinen kehittämistutkimus. Työn avulla pyritään kehittämään yhtä patologian yksikön käytössä olevista värjäysmenetelmistä vertailemalla Giemsa-värjäyksen variaatioita ja etsimällä niistä optimaalisinta menetelmää helikobakteereiden toteamiseen. Toimintatutkimus voi olla työelämän näkökulmasta esimerkiksi ihmisten oman työn tutkimista sekä sen kehittämistä. Tutkimuksen tarkoituksena on ratkaista käytännön ongelmia sekä parantaa toimintaa jatkuvasti. Toiminnallinen kehittämistutkimus rakentuu suunnittelusta, toteutuksesta ja seurannasta sekä arvioinnista. Opinnäytetyönä tehdyssä toiminnallisessa kehittämistutkimuksessa on oltava tutkimuksellinen lähestymistapa. Tutkimusongelman määrittäminen ja sen muuttaminen tutkimuskysymykseksi on erittäin tärkeää toiminnallisessa kehittämistutkimuksessa. Perinteinen tutkimus jää usein toteavalle tasolle ja se ei tee muutosta tai poista ongelmaa. Toiminnallinen kehittämistutkimus pyrkii sen sijaan kohdeilmion ongelman muuttamiseen tai poistamiseen valittujen muuttujien osalta. (Kananen 2014, 11, 36, 55–56.)

2 HISTOLOGINEN PROSESSI

Histologialla tarkoitetaan kudospia ja histologian laboratoriossa tutkitaan erilaisia kudospäyhteitä. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2016.) Yksi histologian tärkeimmistä ja käytetyimmistä tutkimusmenetelmistä on valomikroskooppinen tutkimus. Sitä hyödyntämällä on mahdollista tehdä patologian anatominen diagnoosi (PAD), joka on perusta hyvän- ja pahanlaatuisten muutosten toteamisessa. Kudospäyhteistä voidaan todeta myös syövän erilaiset esiastemuutokset. Lisäksi kudospäyhteistä tutkitaan ja luokitellaan erilaisia hyvänlaatuisia kasvaimia, infektioita, rappeumasairauksia sekä aineenvaihdunnan tauteja. (Karttunen, Soini ja Vuopala 2005, 288.) Histologinen prosessi rakentuu eri työvaiheista. Näytteen saavuttua fiksaatiivissa eli kiinnitysliuoksessa laboratorioon se kirjataan ensin laboratorion tietokantaan, jonka jälkeen sille tehdään tarvittava esikäsittely. Näytteiden oltua kudospäyhteiskäsittelyssä ne valetaan parafiiniin ja lopuksi näytteistä leikataan leikkeitä näytelaseille, jotka värjätään. (Mäkinen 2012, 1127.) Taulukossa 1 on havainnollistettu kudospäyhteen histologinen prosessi ja esimerkki sen kestosta patologian laboratoriossa.

2.1 Histologiset näytteet

Kudospäyhteet ovat biopsioita eli koepaloja sekä kookkaampia erilaisten toimenpiteiden yhteydessä poistettuja kudospaloja tai kokonaisia elimiä. Koepaloja voidaan yleensä ottaa näkyvistä muutoksista ja tarvittaessa myös normaalin näköiseltä alueelta. Kudospäyhteen koko voi olla parista millimetristä kymmeneen senttimetriin. Biopsiat voivat olla alle millimetrin läpimittaisia ja isot leikkauspreparaatit saattavat painaa useita kilogrammoja. Kudospäyhteet käsitellään histologisen prosessin avulla ennen valomikroskooppista tutkimusta. Histologisen prosessin tarkoituksena on käsitellä kudospäyhteitä siten, että sen alkuperäiset rakenteet säilyvät mahdollisimman hyvin ja siitä pystytään leikkaamaan ohuita, valoa läpäiseviä leikkeitä valomikroskooppista tutkimusta varten. (Karttunen ym. 2005, 288.) Valomikroskooppinen tutkimus on nopea ja kustannusvaikuttava diagnostinen tutkimus. Mikroskooppisen löydöksen perusteella patologi pystyy tekemään diagnoosin potilaan kliinisestä tilasta ja arvioimaan patogeenisiä muutoksia. (Katila 2004, 346.)

Kaikissa suomalaisissa patologian laboratorioissa on käytössä samantyyppiset histologisten näytteiden tutkimuslyhenteet. Ts-PAD-1 -tutkimus on kudospäyhteen histologinen tutkimus, jossa on samaan kokonaisuuteen kuuluvia eriteltyjä pieniä kudospaloja 1–3 kappaletta. Ts-PAD-2 -tutkimuksessa kudospaloja on neljä kappaletta tai enemmän. Ts-PAD-3 -tutkimuslyhennettä käytetään suppeissa leikkauspreparaateissa, kun taas Ts-PAD-4 -tutkimusta laajoissa leikkauspreparaateissa. Näitä tutkimuslyhenteitä käytetään silloin, kun diagnosoitaville kudospäyhteille ei ole omaa itsenäistä tutkimuslyhennettä. Esimerkiksi gastrokopianäytteiden histologisesta tutkimuksesta käytetään tutkimuslyhennettä Ts-PADGast. (Fimlab 2013.)

Histologiseen prosessiin liittyy lukuisia virhelähteitä. Virheet liittyvät yleensä näytteenottoon ja patologian laboratorion henkilökunnan tai laitteiden toimintaan. Näytteenottoon liittyviä virhelähteitä ovat esimerkiksi niukka tai epäedustava näyte, puutteelliset esitiedot ja väärä tai huono fiksaatio. Laboratorion henkilökunnan toiminnasta aiheutuvia virheitä voivat olla esimerkiksi sekaannukset

näytteiden ja niihin liittyvien tunnistetietojen välillä ja näytteen katoaminen. Laitteista johtuvia virheitä ovat esimerkiksi häiriö kuduskuljetuksessa. Lisäksi patologin työstä aiheutuneita virhelähteitä ovat yleensä puutteellinen tai virheellinen näytteen tulkinta. (Mäkinen 2012, 1127.)

TAULUKKO 1. Kudosnäytteen histologinen prosessi patologian laboratoriossa (Mäkinen 2012, 1127.)

Vaihe	Kesto
1. Näytteen saapuminen ja kirjaaminen laboratoriotietokantaan	Saapumispäivä
2. Fiksaatio (Näytteen kiinnittäminen)	Yön yli
3. Näytteen esikäsittely <ul style="list-style-type: none"> • Pienet näytteet: orientointi suoraan kasetille • Suuret näytteet: dissektio eli pieniminen 	2. päivä
4. Kuduskuljetus	Yön yli
5. Parafiiniin valu	3. päivä
6. Parafiiniin valettujen näytteiden leikkaaminen	3.-4. päivä
7. Leikkeiden värjäys, päällystys ja tarkistus	3.-5. päivä

2.2 Näytteen saapuminen ja kirjaaminen laboratoriotietokantaan

Jokaisen patologian laboratorioon saapuvan kudosnäytteen mukana on oltava hoitavan tai näytteen ottaneen lääkärin lähete. Läheteellä on hyvin tärkeä merkitys, koska sen tietojen perusteella patologi valitsee näytteen tutkimustavan ja sen kliiniset taustatiedot vaikuttavat myös näytteestä tehtäviin johtopäätöksiin. Läheteessä on yleensä esitetty näytteeseen liittyviä kysymyksiä, joihin patologi pyrkii tutkimusprosessin aikana vastaamaan. Tarvittaessa hän ottaa myös kantaa muihin asioihin, joilla on merkitystä potilaan hoidossa tai sairauden diagnosoinnissa. Tuoreena laboratorioon saapuneet näytteet, kuten jääleikenäytteet, ovat koko tutkimusprosessin ajan tartuntavaarallisia. Laboratoriohenkilökunnan on huomioitava tämä työskentelyssään. (Karttunen ym. 2005, 292.)

Läheteestä tulisi aina löytyä tietyt tiedot. Perustietoja ovat potilaan nimi, henkilötunnus ja sukupuoli sekä lähettävän lääkärin nimi ja yhteystiedot. Näytteestä tulee mainita muutoksen kliinisen historian keskeiset kohdat ja sen kliininen kuvaus, joka sisältää esimerkiksi muutoksen sijainnin, koon ja muodon. Seurantanäytteestä täytyy olla maininta läheteessä, jotta patologi voi hoitovasteen toteamiseksi tarvittaessa verrata uutta näytettä potilaan aiempiin näytteisiin. Läheteessä tulee aina lukea, mistä elimestä näyte on otettu tai onko kyseessä koepala vai resekaatti. Myös muista mahdollisista oireista, altistuksista sekä todetuista tai epäillyistä taudeista pitää olla merkintä läheteessä. Mikäli epäillään kasvainta, läheteessä täytyy aina olla maininta aiemmista kasvaintaudeista sekä niiden diagnoosista ja hoidosta. Lähettävän lääkärin tekemä kysymyksenasettelu on tärkeässä roolissa diagnoosia tehdessä. (Karttunen ym. 2005, 292.)

Näytteet saapuvat patologian laboratorioon erillisissä näytepurkeissa, jotka on valittu kudoksenäytteen koon mukaan. Muut kuin tuorenäytteet tulevat laboratorioon näytepurkeissa, joissa on jo valmiiksi kiinnitysliuosta. Näytepurkkien ja lähetteen saapuessa patologian laboratorioon, jokainen näyte saa laboratoriolle ominaisen koodin. Tämä koodi sisältää laboratorion yksilöivän tunnusteen, näytetyypin, vuosiluvun, juoksevan näytenumeron sekä alanumeron, joka kertoo, monesko näyteblokki on kyseessä. (Mäkinen 2012, 1127.)

2.3 Näytteen kiinnittäminen

Fiksaatiolla tarkoitetaan kudoksen kiinnittämistä ja kaikki näytteet, joita ei ole tarkoitus tutkia tuoreeltaan, täytyy laittaa kiinnitysliuokseen. Näytteen kiinnittämisessä kudoksen proteiinit denaturoituvat ja kudoksen entsyymeistä ja pieneliöistä aiheutuva autolyysi eli hajoaminen estyy. Kudoksen muuttuu kiinnittyessään myös kiinteämmäksi. (Karttunen ym. 2005, 291.) Yleisin patologian laboratoriossa käytössä oleva kiinnitysliuos on 10 % neutraalia puskuroitua formaliinia, mutta jotkin harvinaisemmat näytteet vaativat muita kiinnitysliuoksia. Näitä ovat esimerkiksi etanoli, asetoni ja glutaraldehydi. Näytteen kiinnittymiseen vaikuttavat lämpötila, puskuri ja pH, fiksaatioaika sekä kiinnitysliuoksen osmolaarisuus ja konsentraatio. (Rhodes 2013, 69–82.) Kiinnitysliuoksen tilavuuden tulee olla 10-kertainen kudoksenäytteen tilavuuteen nähden ja suurten kudoksenäytteiden kohdalla vähintään näytteen tilavuuden verran (Tuokko, Rautajoki ja Lehto 2008, 72).

10 % formaliini on normaalia, puskuroitua noin 4 % formaldehydiä. Puhdas formaldehydi on höyry, joka esiintyy täysin liuenneena veteen 37–40 % formaldehydinä. Tämä vesipohjainen liuos tunnetaan myös formaliinina. Fiksaatiossa tapahtuvia formaliinin ja kudoksen välisiä reaktioita on lukuisia ja ne ovat monimutkaisia. (Rhodes 2013, 73.) Formaldehydi on kaasuna ja väkevänä liuoksena myrkyllistä hengittää, niellä ja ihokosketuksen yhteydessä. Se herkistää ihoa ja saattaa aiheuttaa allergista ihottumaa. Patologian laboratorioissa formaldehydiä käytetään päivittäisessä työskentelyssä ja tästä syystä työntekijät altistuvat sille väistämättä. Formaldehydiä käsiteltäessä työntekijän täytyy olla asianmukaisesti suojautunut ja työskentely tapahtuu vetokaapissa. (Työterveyslaitos 2011.)

2.4 Näytteen esikäsittely

Pienet näytepalat siirretään kokonaisuudessaan tai tarvittaessa suodatetaan tunnisteellisiin näytekasetteihin. Tällaisia näytteitä ovat esimerkiksi pienet koepalat, stanssibiopsiat, gynekologiset kaa-vintanäytteet ja eturauhasen höyläysnäytteet. (Mäkinen 2012, 1128.) Kuvassa 1 on havainnollistettu pienten kudoksenäytteiden esikäsittely.

Suuret kudoksenäytteet dissekoidaan eli paloittellaan näytteiden jatkokäsittelyä varten. Patologi tai dissekointiin perehtynyt laboratoriohoitaja ottaa edustavista kohdista näytteet, jotka laitetaan tunnisteellisiin näytekasetteihin. Dissekoinnin yhteydessä näyte valokuvataan tai piirretään sekä kuvaillaan tekstissä niin tarkkaan, että näytteeseen on tarvittaessa mahdollista perehtyä vielä myöhemminkin. Tämän käytännön avulla patologi voi selvittää esimerkiksi syöpänäytteestä kasvaimen koon, levinneisyyden ja poiston marginaalit eri suuntiin. Näytekasettien määrä vaihtelee näytteestä riippuen,

esimerkiksi haastavissa syöpäresekaateissa näytekasetteja voi olla jopa useita kymmeniä. (Mäkinen 2012, 1128.)



KUVA 1. Pienten näytteiden esikäsittely (Heikkinen ja Rutanen 2015-11-24.)

2.5 Kudoskuljetus

Näytteiden esikäsittelyn jälkeen näytekasetit laitetaan automatisoituun kudoskuljettimeen. Kudoskuljetuksen tarkoituksena on poistaa kudoksenäytteistä vesi ja rasva sekä kiinnittää kudokset. Käsittelyn avulla näytemateriaalin kudoserakenteet kovettuvat ja näytteet säilyvät pidempään. (Mäkinen 2012, 1128.) Kudoskuljetus muodostuu dehydraatiosta eli veden ja fiksaatiivin poistamisesta, kirkastuksesta sekä infiltraatiosta eli imeytyksestä (Bancroft ja Spencer 2013, 107–109).

Dehydraatiossa kudoksenäytteistä poistetaan ylimääräinen vesi ja fiksaatiivi. Useat dehydraatiossa käytettävät reagenssit ovat poolisia ja hydrofiilisiä eli ne liukenevat helposti veteen. Hydrofiiliset reagenssit reagoivat vesimolekyylien kanssa kudoksenäytteessä vetysidosten avulla. Dehydraatio toteutetaan nousevan alkoholisarjan avulla: sarja aloitetaan 70 %:lla etanolilla, jota seuraa 95 % etanoli ja lopuksi 100 % eli absoluuttinen etanoli. Liiallinen dehydraatio kovettaa ja kutistaa kudosta ja liian vähäinen dehydraatio puolestaan jättää kudokset liian pehmeiksi. (Bancroft ja Spencer 2013, 107–108.)

Kudoksenäytteiden kirkastamisessa käytetään ksyleeniä ja siinä poistetaan kudoksesta alkoholi. Sen poistaminen on tärkeää, koska parafiini ja etanoli eivät liukene toisiinsa (Bancroft ja Spencer 2013, 108–109). Ksyleeni on väritön neste, jolla on hyvin bentseeninkaltainen haju. Ksyleeni on helposti syttyvä ja se reagoi hapettavien aineiden kanssa, joten sitä käytettäessä on noudatettava erityistä huolellisuutta. (Työterveyslaitos 2014.) Infiltraatiossa eli imeytyksessä käytetään yleensä parafiinia.

Kudosnäyte kyllästetään sulalla parafiinilla, jolloin ksyleeni poistuu näytteestä. (Bancroft ja Spencer 2013, 109–110.)

2.6 Parafiiniin valu

Kudoskuljetuksen jälkeen kudosnäyte valetaan parafiiniin, joka on yleisin käytetty valuaine. Jäähtyessään parafiini kovettuu kudosnäytteen sisään ja sen ympärille. Tämä mahdollistaa näytteestä tehtävien noin 2–5 µm:n paksuisten leikkeiden leikkaamisen. Valettaessa näytteet sijoitetaan muotteihin siten, että näytteistä saadaan leikattua pinnan suhteen kohtisuoria leikkeitä. Lisäksi näytteet pyritään kääntämään niin, että leikatessa mikrotomin terä aiheuttaisi mahdollisimman vähän kudosten erilaisesta konsistenssista johtuvia artefakteja. (Mäkinen 2012, 1128.) Kuvassa 2 on esitetty kudosnäytteen valaminen sulaan parafiiniin.

Valamisessa käytetään valukonetta, jossa parafiini sijaitsee erillisessä säiliössä. Kudoskuljetuksesta tulleille näytekaseteille on oma lämmitetty säilytyslokero. Kudosnäytteelle valitaan sopivan kokoinen valumuotti, jonka pohjalle lasketaan hieman sulaa parafiinia lämpölevyllä. Tämän jälkeen kudosnäyte asetetaan leikkauspinta alaspäin muotin pohjalle, jonka jälkeen se käytetään välittömästi kylmälevylle. Näytekasetin kansi, jossa on näytteen tunnistamiseen liittyvät tiedot, asetetaan muotin päälle. Sulaa parafiinia lasketaan kannen päälle niin, että koko muotti täyttyy parafinista. Muotti siirretään kylmälevylle, jossa näyteblokki jäähtyy ja parafiini kovettuu näytteen ympärille. (Bancroft ja Spencer 2013, 109–110.)



KUVA 2. Näytteiden valu parafiiniin (Heikkinen ja Rutanen 2015-11-23.)

2.7 Parafiiniin valettujen näytteiden leikkaaminen

Mikrotomi on histologisessa prosessissa käytetty laite, jolla voidaan leikata ohuita leikkeitä kudosnäytteistä valomikroskooppista tutkimusta varten. Käsite mikrotomi on johdettu kreikan kielen sanoista *mikros*, joka tarkoittaa pientä ja *temnein*, joka tarkoittaa leikkaamista. Mikrotomeissa käytetään teräs-, lasi- tai timanttiteriä riippuen leikattavasta näytemateriaalista ja leikkeiden paksuudesta.

Mikrotomilla voidaan leikata 0,05–100 µm:n paksuisia leikkeitä. Yleisimmin käytetty leikepaksuus on patologian laboratorioissa 2–5 µm. Leike suoristetaan kylmävesialtaassa, minkä jälkeen se siirretään lämminvesialtaaseen ja poimitaan sieltä objektilasille. (Chandak, Chaudhary ja Chandak 2012, 4.) Tämän jälkeen objektilasit asetetaan kiinnittymään erilliselle lämpölevylle, jonka lämpötila säädetään parafiinin sulamislämpötilan mukaan. Kiinnitysaika vaihtelee kudoksen laadun sekä leikkeiden koon ja lukumäärän mukaan. (Bancroft ja Spencer 2013, 126–127.)

Mikrotomissa on kolme pääosaa. Blokinpidikkeen tehtävä on pitää kudosplokki leikatessa paikoillaan. Terä pysyy paikoillaan erillisen kannattimen avulla. Kolmas tärkeä mikrotomin osa ovat säätöruuvit, joilla voidaan säätää haluttua leikkauskulmaa ja leikepaksuutta. Mikrotomeja on kahdenlaisia: liuku- ja rotaatiomikrotomit. Mikrotomi valitaan käyttökohteen tai työntekijän tottumuksen mukaan. Liukumikrotomissa näyteblokki asetetaan leikkauspinta ylöspäin kiinteään pidikkeeseen ja terää liikutetaan vaakatasossa näyteblokin yläpuolella sitä lähestyen. Rotaatiomikrotomissa terä on paikoillaan ja vaakatasossa. Näyteblokki asetetaan pystysuunnassa olevaan blokinpidikkeeseen, joka lähestyy leikatessa terää. Näyteblokki liikkuu eteenpäin terää kohti pyörítettävän käsikammen avulla. (Chandak ym. 2012, 14–17.)

Patologian laboratorioissa on otettu käyttöön vesiliukumikrotomi perinteisten liuku- ja rotaatiomikrotomien rinnalle. Vesiliukumikrotomi on rotaatiomikrotomi, johon on yhdistetty vesiliukuominaisuus. Haastavienkin kudoksen näytteiden leikkaaminen on helppoa ja tehokasta vesiliukumikromia ja integroitua lämminvesiallasta käyttämällä. Vesiliukumikrotomissa kudosplokki asetetaan blokinpidikkeeseen. Se liikkuu pystysuunnassa kohti paikallaan pysyvää terää käsikampea pyörittämällä. Blokinpidikkeessä on jäädytintä, joka pitää näyteblokin kylmänä leikkaamisen aikana. Mikrotomissa on jäteallas leikkaamisesta aiheutuvaa jätettä varten. Terän alla on kylmävesiliuku, jota pitkin leike siirtyy lämminvesialtaaseen. Suoristunut leike poimitaan lämminvesialtaasta objektilasille. (Thermo Scientific 2011, 12–16.) Kuvissa 3 ja 4 havainnollistetaan vesiliukumikrotomin käyttöä ja leikkeiden poimimista näytelasille lämminvesialtaasta.



KUVA 3. Blokkien leikkaaminen vesiliukumikrotomilla (Heikkinen ja Rutanen 2015-11-23.)

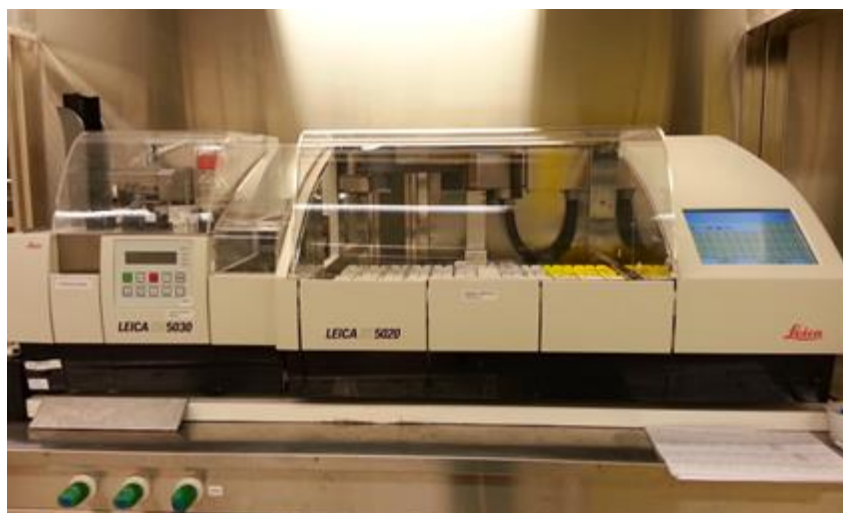


KUVA 4. Leikkeiden poimiminen näytelasille (Heikkinen ja Rutanen 2015-11-23.)

2.8 Värjääminen ja päällystäminen

Näytelasit värjätään automatisoidusti tai käsin. Yleisin Suomessa käytössä oleva histopatologinen värjäys on hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE-värjäys), joka koostuu kahdesta väriaineesta. Hematoksyliini toimii pääasiassa tumavärinä. Tuman väri vaihtelee sinisen eri sävyistä lähes mustaan. Se värjää myös jonkin verran sytoplasmassa esiintyvää RNA:ta. Eosiini värjää sytoplasmän sekä solunsisäisiä ja ulkoisia proteiineja, kuten sidekudosta punaisen ja pinkin eri sävyillä. (Mäkinen ym. 2012, 1129; Bancroft ja Layton 2013, 173–174.) Lima-aineet ja glykogeeni eivät värjäydy. HE-värjäys säi-

lyy näytteissä hyvin ja värjää tumat selkeästi, joka voi olla apuna tuma-atypian astetta arvioidessa. Toinen yleinen perusvärjäys on van Gieson -värjäys, jossa kollageeni värjättyy punaiseksi ja muut kudokset erilaisilla kellanruskean sävyillä. Erikoisvärjäykset ovat käytössä yleisesti maksa-, munuais- ja luuydinbiopsioiden diagnostiikassa sekä varmistuksena perusvärjäyksessä havaittuun löydökseen. (Mäkinen ym. 2012, 1129.) Lopuksi näytelasit päällystetään peitinlaseilla käsin tai automatisoidusti. Yleisimmiten käytössä oleva päällystysaine on veteen liukenematonta, mutta joihinkin erikoisvärjäyksiin tarvitaan myös vesiliukoisia päällystysaineita. (Moon 2013, 601.) Kuvassa 5 on patologian laboratoriossa käytössä oleva värjäys- ja päällystysautomaatti.



KUVA 5. Leica CV5030 -päällystysautomaatti ja Leica ST5020 -värjäysautomaatti (Heikkinen ja Rutanen 2015-11-13.)

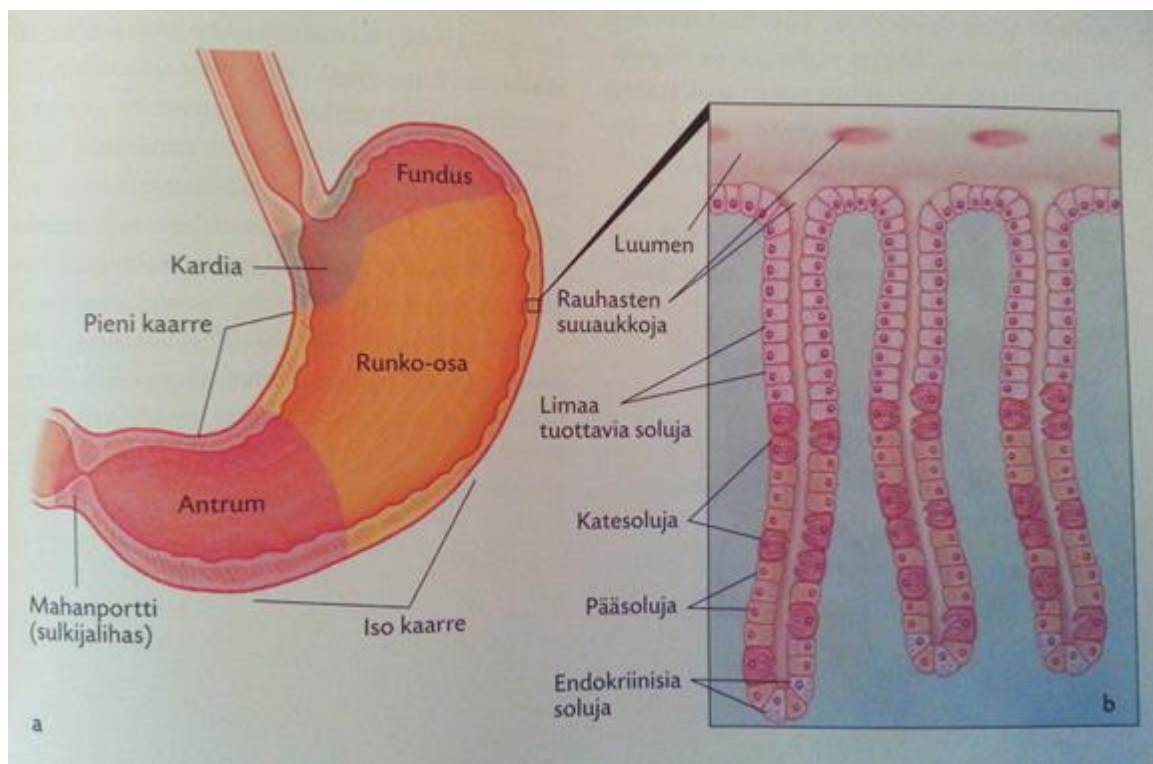
3 GASTROSKOPIANÄYTTEET

Gastroskopia tarkoittaa mahalaukun tähystystutkimusta. Useimmiten gastroskopiatus on potilaalle hieman epämiellyttävä ja siksi lääkärin on harkittava sen tekemistä aina potilaskohtaisesti. Gastroskopiaa käytetään diagnostisena tutkimuksena, seurantatutkimuksena ja erilaisten toimenpiteiden yhteydessä. Tutkimus on tarpeellinen aina, mikäli potilaalla esiintyy hälyttäviä oireita kuten toistuvaa oksentelua, merkittävää laihtumista tai nielemiseen liittyviä vaikeuksia ja kipuja. Gastroskopiaa käytetään seurantatutkimuksena esimerkiksi Barretin ruokatorven seurannassa. Tutkimuksen aikana mahalaukun tietyiltä alueilta otetut koepalat eli biopsiat tukevat diagnostiikkaa esimerkiksi helikobakteeri-infektion osoittamisessa. Gastroskopian avulla voidaan diagnosoida muun muassa erilaisia mahan limakalvon tulehduksia ja syövän esiasteita. (Kunnamo 2009.)

3.1 Mahalaukun anatomia

Mahalaukku (*gaster, ventriculus*) on pallean alapuolella, vasemmalla puolella kylkikaaren suojassa. Sen tilavuus on noin 1,5 litraa, tosin tyhjänä ollessaan se vetäytyy pienemmäksi. Mahalaukun tehtävä on toimia ruokavarastona, säädellä ruoan pääsyä ohutsuoleen, pilkkoa isompia paloja ruokaa ja huolehtia ruoan entsyymaattisesta pilkkomisesta mahanesteen avulla. (Vierimaa ja Laurila 2014, 154.) Mahalaukussa osa proteiineista ja tärkkelyksestä pilkkoutuu ja mahalaukun erittämä suolahappo tuhoaa ruoassa olevia bakteereita (Sand, Sjaastad, Haug, Bjålie ja Toverud 2012, 397).

Mahalaukku on muodoltaan papumainen. Sen lyhyt oikea sivu eli pieni kaarre (*curvatura minor*) kaartuu oikealle ylöspäin palleaa ja maksaa kohti. Vasemman puolen pitkä sivu on puolestaan iso kaarre (*curvatura major*). Mahalaukku jaetaan neljään osaan sen eri tehtävien mukaan. Mahansuu (*cardia*) on mahalaukun osa, johon ruokatorvi liittyy. Mahansuulta hiukan vasemmalle siirryttäessä on mahanpohjukka (*fundus*), jonka tehtävä on vastaanottaa ja varastoida ruokaa. Sen alapuolella mahalaukun suurimmassa osassa, runko-osassa (*corpus*) ruoka sekoittuu mahanesteeseen. Alimpana mahalaukussa on mahanportin soppi (*antrum*). Mahalaukun seinämän lihaskerros on paksuinta antrumien alueella ja sen lihassupistukset sekoittavat tehokkaasti mahalaukun sisällön. Ohutsuolen suulla sijaitseva rengasta muistuttava lihaskerros muuttuu mahanportin sulkijalihakseksi (*musculus sphincter pylori*), joka koostuu lihaskerroksesta ja sidekudoksesta. Sen tehtävä on säädellä mahansisällön pääsyä ohutsuoleen. Kuva 6 havainnollistaa mahalaukun anatomiaa. (Sand ym. 2012, 397.)



KUVA 6. Maha-laukun osat ja rauhaset (Sand ym. 2012, 397.)

Mahan limakalvon uloin kerros on yhdenkertainen lieriöepiteelisolukko, jonka tehtävänä on maha-laukulle ominaisen liman tuottaminen. Lima muodostaa hyytelömäisen kerroksen epiteelisolujen pinnalle, ja näin suojaa mahalaukkuja mekaanisilta vaurioilta sekä hapon vaikutuksilta. Liman muodostuksen väheneminen altistaa mahahaavalle. Mahan limakalvossa on miljoonittain putkimaisia ja haarottuneita rauhasia. Niitä esiintyy kaikissa mahalaukun osissa, mutta erityisesti funduksen ja corpusin alueilla, joiden rauhasissa esiintyy kolmea eri solutyyppiä. Rauhasten suuaukkojen lähistöllä on soluja, jotka tuottavat limaa. Alempana olevat katesolut erittävät muun muassa suolahappoa. Rauhasesassa alimpana olevat pääsolut erittävät pepsinogeenia, joka on proteiini. Maha-laukussa pepsinogeeni muuttuu proteiineja hajottavaksi pepsinientsyymiksi. Lisäksi mahalaukun rauhasissa on erilaisia hormoneja. (Sand ym. 2012, 398.)

3.2 Gastroskopia tutkimus

Endoskopia eli tähystys on hyvä perustutkimus, kun tutkitaan ruokatorven, mahan ja pohjukaissuolen rakennetta. Gastroskopia on endoskopian yksi tutkimusmuoto. Gastroskopian indikaatioita ovat muun muassa nielemisvaikeus, toistuva närästys, regurgitaatio eli takaisinvirtaus ja rintakipu, jolle ei ole löytynyt sydänperäistä syytä. Ruokatorvesta tarkastellaan limakalvon väriä ja myötäilevyyttä sekä havainnoidaan ruokatorven peristalttista liikettä. (Färkkilä, Isoniemi, Kaukinen ja Puolakainen 2013, 151.) Vatsa- ja rintakipujen oireiden syytä voivat olla esimerkiksi maha- ja pohjukaissuolen haava sekä ruokatorven tai mahalaukun tulehdus. Keliakia voidaan diagnosoida pohjukaissuolesta otetusta näytepalasta. Yksi syy gastroskopiaalle voi olla myös poikkeavat laboratoriotulokset. Esimerkiksi matala hemoglobiini voi viitata verenvuotoon mahan tai suoliston alueella. (Mustajoki ja Kaukua 2008.)

Ennen gastroskopiaa potilaan mahalaukun tulee olla tyhjä. Valmistautumisohjeiden mukaan potilaan tulee olla syömättä vähintään kuusi tuntia ja juomatta kaksi tuntia ennen tutkimuksen suorittamista. Tutkimuksessa potilas makaa vasemmalla kyljellään tutkimuspöydällä ja lääkäri vie tähystimen suun kautta ruokatorveen. Alkuvaiheessa potilas nieleskelee muutaman kerran, jotta tähystin kulkeutuu ruokatorveen paremmin. Tarvittaessa nielu puudutetaan ennen toimenpidettä. Kun tähystin on mahalaukussa, sinne puhalletaan ilmaa, minkä tarkoituksena on saada mahalaukku pullistumaan ja parantaa näkyvyyttä mahalaukun sisäpinnan limakalvolle. Mahalaukusta tähystin viedään vielä pohjukaissuoleen parinkymmenen sentin pituudelta. (Mustajoki ja Kaukua 2008.)

Gastroskopiaturkimuksen yhteydessä lääkäri ottaa mahalaukusta koepaloja eli biopsioita. Keliakian poissulkemiseksi otetaan yleensä rutiinomaisesti kaksi biopsiaa laskevasta duodenumista eli pohjukaissuolesta. Jos tutkimuksen indikaationa on nimenomaan keliakiaepäily, suositellaan otettavaksi neljä biopsiaa laskevasta duodenumista. Gastriitin eli mahalaukun limakalvon tulehduksen laadun selvittämiseksi sekä mahalaukun antrumista että korpuksesta otetaan kaksi biopsiaa. Duodenumista ja korpuksesta otetut biopsiat laitetaan samaan 10 % formaliinipurkkiin ja antrumista otetut biopsiat omaan 10 % formaliinipurkkiin. Mahalaukun haavojen reunoista suositellaan ottamaan vähintään kuusi biopsiaa mahdollisen syövän poissulkemiseksi. (KSSHP 2013.)

Ulkus- eli mahahaavapotilailta otetaan yksi biopsia antrumista ja toinen korpuksesta helikobakteerinfektion osoittamiseksi. Mikäli helikobakteeri-infektio todetaan, voidaan potilaalle aloittaa helikobakteerin häätöhoito. Helikobakteerien aiheuttamien infektioiden diagnostiikassa on tärkeää huomioida, että potilaan käyttämä antibioottihoito tai haponeritystä alentava lääkitys vaikeuttavat helikobakteerin toteamista sekä histologisesti että muilla menetelmillä. Jos edellä mainittuja lääkityksiä ei voida lopettaa 2–3 viikon ajaksi ennen gastroskopiaturkimusta, lääkärin on hyvä harkita helikobakteeritodenttien määrittämistä. (KSSHP 2013.)

Rutiinomaisten biopsioiden ottamista ei suositella bulbuksesta ja kardiasta. Bulbuksesta otetut biopsiat eivät anna lääkärille lisäinformaatiota, jolla olisi potilaan hoidon kannalta merkitystä. Kardiasta limakalvossa krooninen tulehdus ja suolistoon liittyvä metaplasia ovat melko yleisiä, mutta niihin liittyy harvoin dysplasiaa ja riski kardiasta adenokarsinomaan on pieni. Biopsioita tulee kuitenkin ottaa kaikista poikkeavan näköisistä muutoksista, kuten väriltään poikkeavista limakalvoalueista ja erilaisista kohoumista sekä kuoppamaisista muutoksista. (KSSHP 2013.)

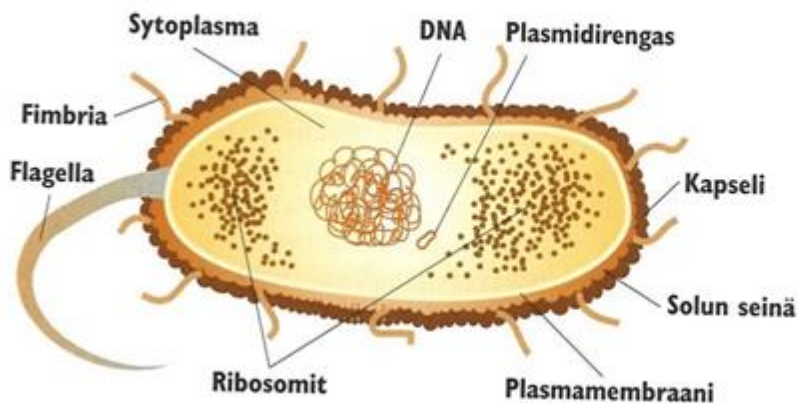
4 HELIKOBAKTEERIT

Helikobakteeri on gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka elää mahalaukun limakerroksen alla suoja-
sa matalalta pH:lta (Rautelin ja Färkkilä 2010, 223). Mahalaukun limakalvolla helikobakteeri aiheut-
taa gastriitin eli mahalaukun limakalvon tulehduksen. Helikobakteeri voidaan todeta erilaisilla tutki-
muksilla kuten veren vasta-ainemäärityksillä, hengitystestillä, ulostenäytteestä tai gastrokopian yh-
teydessä otetuista koepaloista. (Mustajoki 2013.) Yleisimmät tunnetut helikobakteerilajit ovat *H. py-
lori* ja *H. heilmannii*. Niiden lisäksi muita tunnettuja helikobakteerilajeja ovat esimerkiksi ripulia aihe-
uttavat *H. fennellia* ja *H. cinaedi*. Eläimistä eristetyt *H. pullorum*, *H. hepaticus*, *H. bilis* ja *H. rappini*
saattavat olla myös ihmiselle merkittäviä helikobakteerilajeja. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 222.)

4.1 Bakterin yleinen rakenne

Bakteeri on yksisolainen organismi ja se kykenee lisääntymään kahtia jakaantumalla. Bakteereita
elää kaikkialla luonnossa, myös ihmisessä. Bakteereita elää normaalifloorana ihmisen elimistössä
esimerkiksi iholla, suolistossa ja limakalvoilla. Bakteereiden joutuessa niille kuulumattomille alueille
elimistössä, ne voivat toimia taudinaiheuttajina eli patogeeneinä. Lisääntyäkseen bakteerit tarvitse-
vat niille ominaiset olosuhteet, kuten oikeanlaiset ravinteet, lämpötilan ja kosteuden. Kliinisesti tär-
keät bakteerilajit voidaan jakaa soluseinän rakenteen mukaan grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin
bakteereihin. Gramvärjäytyvyyden lisäksi kliinisesti tärkeät bakteerit voidaan jaotella ryhmiin niiden
muodon, rakenteen ja esimerkiksi fysiologisten ja geneettisten ominaisuuksien perusteella. Yleisim-
piä kliinisten infektioiden aiheuttajia ovat pyöreät kokkibakteerit ja pitkänomaiset sauvabakteerit.
Kokkibakteerit voivat esiintyä yksittäin, pareittain eli diplokokkeina, ryhminä tai erimittaisina ketju-
ina. Myös sauvabakteereiden on mahdollista liittyä toisiinsa muodostaen lyhyitä ketjuja. Bakteerisolun
koko kliinissä infektioiden on yleensä 1–5 µm. (Heikkilä ym. 2005, 31–33.)

Useimmilla grampositiivisilla ja gramnegatiivisilla bakteerilajeilla on solun ulkopinnalla paksu kapseli,
jonka tehtävänä on suojata bakteeria elimistön luontaisilta puolustusmekanismeilta, kuten fagoso-
ytoosilta ja komplementilta. Kapseli rakentuu pääasiassa polysakkaridista. Kapselirakenteet toimivat
myös antigeeneinä, eli elimistö muodostaa niitä vastaan vasta-aineita, jotka suojaavat ihmistä tule-
vaisuudessa uusilta infektioidelta. Useat bakteerit liikkuvat flagellojen, eli värekarvojen avulla. Lisäksi
useilla gramnegatiivisilla bakteereilla on fimbrioita, eli tarttumiskarvoja, joilla bakteeri voi tarttua
esimerkiksi limakalvon soluihin. Bakteereiden luokittelussa käytettävä Gramvärjäys perustuu baktee-
rien soluseinämän rakenne-eroihin. Gramnegatiivisilla bakteereilla on ulkomembraani, joka on mer-
kittävin rakenteellinen ero grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteereiden välillä. Gramvärjäyk-
sessä grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinisiksi ja gramnegatiiviset bakteerit punaisiksi. Baktee-
rin genomi esiintyy rengasmaisena kromosomina solulimassa ja se on yksittäisen bakteerisolun tär-
kein osa. Lisäksi bakteerisolun sisällä voi olla plasmideja eli pienempiä erillisiä DNA:n osia. Plasmidi-
en toiminnan seurauksena bakteerin taudinaiheuttamiskyky ja vastustuskyky, eli resistenssi eri mik-
robilääkkeille voi lisääntyä. Kuva 7 selventää bakteerisolun yleisrakennetta tarkemmin. (Heikkilä ym.
2005, 31–35.)



KUVA 7. Bakteerisolun rakenne (Heikkilä ym. 2005, 31.)

4.2 Mahasuolikanavan mikrobisto

Normaalifloora on terveelle organismille, eli isännälle luonnollisessa ympäristössä syntyvä ja kehittyvä mikrobisto. Iso osa mikrobeista kasvaa hyvin niiden luonnollisessa ympäristössä, kuten ihmisen mahasuolikanavassa. Mahalaukkua pidetään yleisesti bakteereille epäedullisena elinympäristönä alhaisen pH:n ja bakteerien pintaproteiineja hajottavien proteaasien vuoksi. Helikobakteerit ovat yksi niistä bakteerilajeista, jotka ovat pystyneet kehittämään itselleen kyvyn selviytyä mahalaukun olosuhteissa. Ihmisen suoliston bakteerit ovat pääasiassa obligatorisia, eli ehdottomia anaerobeja, joiden osuus on suurin paksusuoleessa. Elimistön mikrobisto on kehittynyt ylläpitämään tasapainoista toimintaa ja sillä on suuri merkitys ihmisen terveydelle. Se myös suojaa elimistöä ympäristön patogeeneiltä eli taudinaiheuttajilta. (Jalava 2010, 76–81.)

4.3 *Helicobacter pylori*

Yleisin helikobakteerilaji on *Helicobacter pylori*, jonka ainoa tiedossa oleva luonnollinen isäntä on ihminen. Joutuessaan mahalaukun limakalvolle *H. pylori* aiheuttaa gastriitin. Toinen ihmisillä esiintyvä gastriittia aiheuttava helikobakteerilaji on *Helicobacter heilmannii*, joka on länsimaissa *H. pyloria* harvinaisempi ja aiheuttaa vain alle 1 % gastriittitapauksista. Sen aiheuttama gastriitti on myös *H. pylorin* aiheuttamaa gastriittia lievempi. *H. heilmannii* on kookas ja voimakkaasti kierremäinen gramnegatiivinen sauvabakteeri, joka on helposti tunnistettavissa mikroskoopissa. (Färkkilä 2013, 250.)

Helicobacter pylori on 2,5–4,0 µm pitkä gramnegatiivinen ja lievästi kierremäinen mikroaerofiilinen sauvabakteeri. Sen toisessa päässä on 2–6 siimaa. *H. pylori* elää mahalaukun limakalvon limakerroksessa kiinnittyneenä epiteelisoluihin sekä epiteelin pinnalla sijaitsevan liman sisällä. Mahalaukun epiteelisolujen sokerirakenteet toimivat reseptoreina bakteereille. *H. pylorin* kyky levittäytyä mahalaukun limakalvolle perustuu sen flagelloihin, joilla se pystyy tarttumaan ja liikkumaan limakalvon pinnalla. Lisäksi *H. pylorilla* on voimakas ureaasiaktiiviteetti, sekä kyky kiinnittyä epiteelisolujen pinnalle ja aiheuttaa vaurio kudoksessa. Ureaasiaktiivisuutensa vuoksi *H. pylori* pystyy elämään mahalaukun limakerroksen alla suojassa happamalta pH:lta. *H. pylori* hajottaa urean hiilidioksidiksi ja

ammoniakiksi, jotka luovat bakteerin ympärille happoa neutraloivan vaippakerroksen. Myös ammoniakki ja ammoniumionit pystyvät vaurioittamaan soluja ja epiteeliä toksisen mekanismin avulla. Ureaasiaktiivisuuden sekä ammoniakin ja hapon neutralisaation avulla syntyvä tasapainotilanne antaa suotuisat elinolosuhteet *H. pylorille*. (Färkkilä 2013, 250–251.)

4.4 Helikobakteeri infektion aiheuttajana

Helikobakteeri aiheuttaa infektion mahalaukun limakalvolla. Suurin osa infektion saaneista on oireetomia, mutta osalla voi ilmetä ylävatsavaivoja. Akuutissa infektiossa esiintyy granulosityttivaltainen tulehdusreaktio. Akuutin gastriitin seurauksena syntyy voimakas immuunivaste, joka ei kuitenkaan estä tulehdusreaktion etenemistä. Tulehdusreaktio voi hoitamattomana johtaa krooniseen gastriittiin, jonka tulehdustilassa esiintyy lymfosyyttejä, plasmasoluja sekä tyypillisesti myös neutrofiilejä. Osalla krooninen gastriitti voi edetä edelleen atrofiseksi gastriitiksi, jossa mahalaukun limakalvo surkastuu ja helikobakteerin kasvumahdollisuudet heikkenevät vähitellen. Atrofinen gastriitti altistaa mahasyövälle ja helikobakteerin aiheuttama infektio onkin tärkein mahasyövän riskitekijöistä. Osalla helikobakteerin kantajista esiintyy infektiioon liittyviä jälkiseuraamuksia, kuten pohjukaissuolihaavaa, mahahaavaa, mahasyöpää tai niin sanottua mahalaukun limakalvon MALT-lymfoomaa. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 222–223.)

Lähes kaikilla *H. pylori* -infektion saaneista voidaan osoittaa esiintyvän kiertäviä IgG-luokan vasta-aineita sekä yli puolella myös IgA-luokan vasta-aineita. Parilla prosentilla infektion saaneista voidaan tavata ainoastaan IgA-luokan vasta-aineita. Vasta-aineita esiintyy myös paikallisesti mahanesteessä. Vaikka vasta-aineita muodostuu paljon, ne eivät kuitenkaan suojaa elimistöä vaan krooninen infektio voi jatkua vuosikausia. Ympäristöstä ei tähän mennessä ole löytynyt *H. pylorin* lähdeä, joten voidaan periaatteessa olettaa, että ihminen on ainoa *H. pylori* -infektion lähde. Myöskään *H. pylorin* tartuntatavoista ei ole varmaa tietoa, mutta bakteerin leviäminen infektoituneen mahanesteen välityksellä gastro-oraalisesti on mahdollista. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 223–224.)

4.5 Helikobakteerin toteaminen

Helikobakteeri voidaan todeta invasiivisilla ja ei-invasiivisilla diagnostisilla menetelmillä. Invasiivisella menetelmällä tarkoitetaan lääketieteessä potilaaseen kajoavaa menetelmää. Bakteerimäärän ollessa pieni infektiota voi olla vaikeampi todeta invasiivisilla menetelmillä. Potilaan mahalaukun haponeritykseen vaikuttavat protonipumpun estäjät lisäävät huomattavasti väärin negatiivisten tulosten määrää lähes kaikkia testimenetelmiä käytettäessä. Invasiivisia menetelmiä ovat histologinen tutkimus, mikrobiologinen viljely ja ureaasipikatesti. Ei-invasiivisiin menetelmiin kuuluvat seerumin vasta-aineiden osoitus, ureahengitystesti ja ulosteantigeenitesti. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 224.)

Helikobakteeri voidaan luotettavasti osoittaa gastrokopiassa otetuista näytepaloista. Histologisen prosessin avulla helikobakteeri voidaan todeta antrumien ja korpuksen alueilta otetuista koepaloista. Helikobakteerien osoittamiseen käytetään histologiassa useimmiten Giemsa-värijäystä. Diagnoosin tekemisen patologin kokemus vaikuttaa testin luotettavuuteen. Mikrobiologinen viljely on diagnostisista

menetelmistä spesifisin, mutta potilasaineistosta ja kuljetuksesta riippuen muita diagnostisia menetelmiä huonompi sensitiivisyydeltään. Viljelyä varten otetut näytepalat laitetaan erityiskuljetusputkeen tai Stuartputkeen. Mikrobiologisen viljelyn helikobakteerikannan osoittamisen jälkeen voidaan määrittää mikrobilääkeherkkyydet, joilla on suuri merkitys potilaan hoitoa suunniteltaessa ja valittaessa. Ureaasipikatesti voidaan tehdä gastroskopian yhteydessä ja se on yksinkertainen tapa todeta nopeasti helikobakteeri-infektio. Mahalaukusta otettu näytepala laitetaan välittömästi ureaa sisältävään liuokseen, jossa helikobakteerin ureaasiaktiivisuudesta johtuen ureasta syntyvä ammoniakki aiheuttaa värimuutoksen indikaattorissa. Positiivinen tulos voidaan lukea useimmiten jo tunnin kuluessa testin aloittamisesta. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 224.)

Seerumin vasta-aineiden osoitus on yleisesti käytössä helikobakteeri-infektion osoittamisessa (Rautelin ja Färkkilä 2010, 225). Helikobakteeri aiheuttaa elimistössä paikallisen ja humoraalisen B-soluvasteen. Tämän seurauksena elimistössä muodostuu IgA- ja IgG-luokan vasta-aineita, jotka voidaan osoittaa serologisesti veren seerumista. (Färkkilä 2013, 252.) Pieniäkin helikobakteerimääriä löytävät seerumin vasta-ainetestit perustuvat entsyymi-immunologisiin menetelmiin. Jos infektiota ei hoideta, vasta-ainepitoisuudet pysyvät lähes muuttumattomina vuosia. Hoidon onnistumista voidaan seurata ottamalla potilaasta seeruminäyte ennen mikrobilääkehoitoa ja sen jälkeen. Vasta-ainepitoisuudet pysyvät usein viitearvojen yläpuolella pitkään onnistuneesta hoidosta huolimatta, mutta ne vähenevät merkittävästi alkuperäisestä. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 225.)

Helikobakteeriantigeeni on mahdollista osoittaa ulosteesta bakteriologisessa laboratoriossa. Ulostean antigenitestiä voidaan hyödyntää myös häätohoidon seurannassa, mutta sitä voidaan käyttää vasta neljän viikon kuluttua hoidon päättymisestä. Testi perustuu entsyymi-immunologisiin menetelmiin ja monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Ureahengitystesti perustuu helikobakteerin ureaasiaktiivisuuteen. Testin aikana potilas saa oraalisesti yleensä hiili-13 leimattua ureaa. Jos potilaalla on helikobakteeri-infektio, suun kautta annettu urea hajoaa hiilidioksidiksi ja ammoniakiksi. Tällöin uloshengitysilman leimatun hiilidioksidin määrä lisääntyy. Ureahengitystestissä urea leviää koko mahalaukun limakalvolle, joten infektoitunutta aluetta ei voida paikantaa. Väärä negatiivinen tulos voi johtua esimerkiksi aterioinnista tai mahan nopeasta tyhjenemisestä. Hengitystestiä voidaan käyttää myös häätohoidon onnistumisen arvioinnissa. (Rautelin ja Färkkilä 2010, 225.)

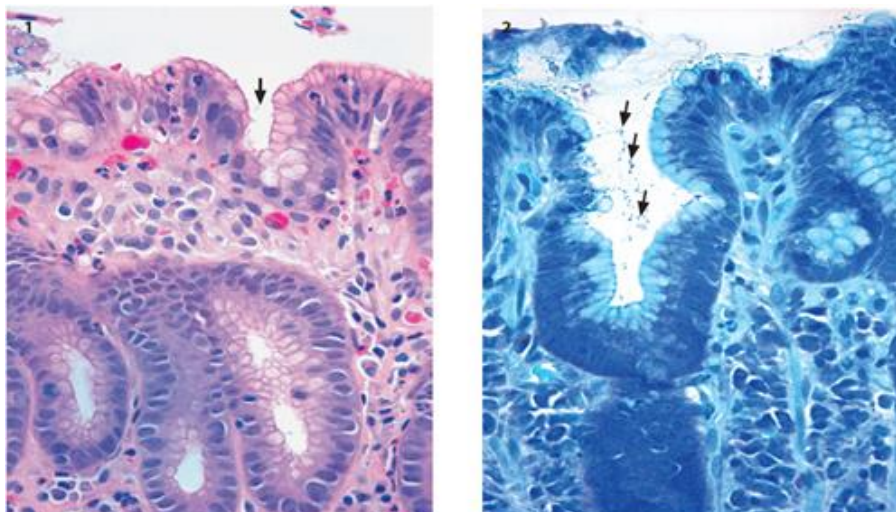
5 VÄRJÄYKSET

Erilaisten histologisten värjäysten tehtävänä on tuoda esiin kudoksen eri rakenteet ja osat. Värjäyksessä kudoksen eri rakenteet ja osat eivät värjydy sattumanvaraisesti. Värjäytyvyys riippuu käytetyistä värireagensseista, jotka reagoivat kemiallisesti ja valikoidusti kudoksen eri osien kanssa värjäyksen aikana. Käyttämällä kahta tai useampaa värireagenssia on mahdollista saada kudoksen eri rakenteet erottumaan paremmin toisistaan eri sävyillä. Värjäyksissä käytetään yleensä laskevaa ja nousevaa alkoholisarjaa tuomaan ja poistamaan vettä kudoksenäytteestä. Ksyleeni puolestaan poistaa parafiinin värjäyksen alussa ja etanolin lopussa. Värjäysmenetelmä valitaan näytemateriaalin ja tutkimuksen indikaation mukaan. Yleisin patologiassa käytetty värjäysmenetelmä on HE-värjäys. (Cook 1998, 64–65, 93–95.)

5.1 Modifioitu Giemsa-värjäys

Giemsa-värjäys on nimetty kehittäjänsä kemisti Gustav Giemsan mukaan. Värjäys kehitettiin alun perin malariassa esiintyvien parasiittien osoittamiseen, mutta sitä alettiin pian käyttää myös histologiassa solun eri osien laadukkaan värjäytyvyyden vuoksi. (Barcia 2007, 292.) Giemsa värjää solujen tumat sinisen ja liilan eri sävyillä. Kollageenit eli tukikudokset ja proteiinit värjäytyvät vaaleanpunaiseksi. Punasolut värjäytyvät punaiseksi ja valkosolut tummansinisiksi. Giemsa-värjäyksessä bakteerit värjäytyvät sinisen ja liilan eri sävyillä. (Kiernan 2008, 181.)

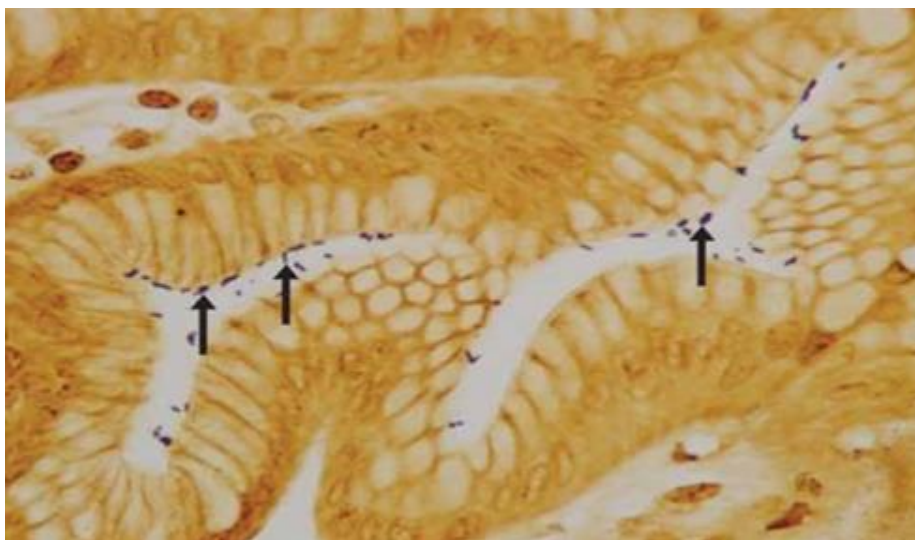
Giemsa-värjäystä käytetään histopatologiassa erilaisten mikro-organismien, kuten bakteereiden ja alkueläinten toteamiseen. Värjäyksen avulla voidaan tunnistaa myös bakteerin morfologisia ominaisuuksia. Giemsa-värjäystä ei voi kuitenkaan käyttää gramnegatiivisten ja grampositiivisten bakteereiden luokittelussa. (Saxena 2010, 102.) Helikobakteerien toteamisessa yleisimmin käytetty värjäys on modifioitu Giemsa-värjäys. Se on erikoisvärjäys, jolla helikobakteerit voidaan osoittaa koepaloista luotettavasti. Alla olevassa kuvassa 8 on esitelty, kuinka helikobakteerit värjäytyvät HE-värjäyksessä ja modifioidussa Giemsa-värjäyksessä. (Karttunen 2012.)



KUVA 8. Helikobakteerit HE-värjäyksessä vasemmalla ja modifioidussa Giemsa-värjäyksessä oikealla (Karttunen 2012.)

5.2 Muut värjäykset helikobakteereille

Warthin Starry -värjäys on yksi käytetyistä värjäysmenetelmistä helikobakteerien osoittamiseen. Se on yksi hopeavärjäyksistä, jotka ovat hyvin herkkiä bakteerien värjämisessä. Hopeavärjäyksiä käytetään sellaisille bakteereille, jotka värjäytyvät heikosti Gram- ja Giemsa-värjäyksillä. Värjäysten suorittaminen on kuitenkin haastavaa, ja tästä syystä niitä käytetään vain tiettyjen bakteerilajien toteamisessa. Bakteerit värjäytyvät tummanruskeasta mustaan ja muu näyte keltaiseksi. Kuvassa 9 näyte on värjätty Warthin Starry -värjäyksellä ja helikobakteerit ovat värjäytyneet mustiksi. (Saxena 2010, 102.)



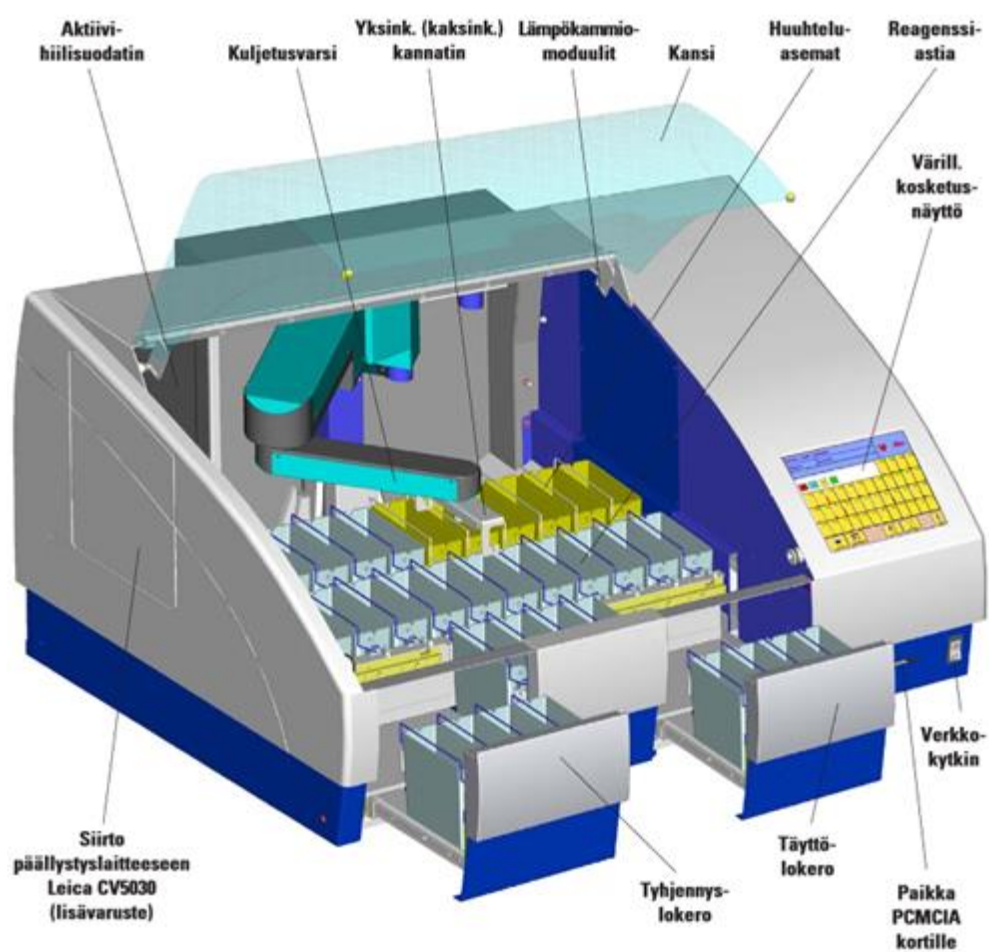
KUVA 9. Helikobakteerin osoittaminen Warthin Starry -värjäyksellä (Saxena 2010, 102.)

Toinen helikobakteereiden osoittamiseen käytetyistä värjäysmenetelmistä on toluidiinisinivärjäys. Apuna värjäyksessä käytetään fosfaattista puskuriliuosta. Toluidiinisinivärjäyksessä helikobakteeri värjäytyy tummansiniseksi sinisävytteistä taustaa vasten. (Bartlett 2013, 299.) Tumat ja muut solujen eri komponentit värjäytyvät sinisen eri sävyiksi (Kiernan 2008, 143–144).

Kaksi muuta yleistä helikobakteerin osoittamiseen käytettyä värjäystä ovat Gimenez ja kresyylivioletti-asetaattiväri. Gimenez-värjäyksessä helikobakteerit värjäytyvät magentan punaisiksi ja muu tausta värjäytyy sinivihreäksi. Värjäyksen ongelma on malakiitin vihreän värin ylivärjäytyvyys tai sen vain osittain värjäytyvyys. Kresyylivioletti-asetaattiväri on yleinen kudosp väri ja sitä käytetään myös helikobakteerien toteamisessa. Kresyylivioletti-asetaattivärjäyksessä helikobakteerit värjäytyvät sinivioletiksi ja tausta sinisen ja violetin eri sävyiksi. Tämän värjäysmenetelmän avulla helikobakteerilajit on helppo erottaa muista eliöistä. (Bartlett 2013, 298–299.)

5.3 Leica ST5020 -värjäysautomaatti

Leica ST5020 on värjäysautomaatti, jota käytetään histologisissa ja sytologisissa rutiinivärjyksissä. Värjäysautomaatti on suunniteltu patologian laboratorion käyttöön ja sillä suoritetaan objektilaseihin kiinnitettyjen kudoksenäytteiden tai sytologisten näytteiden värjäys. Leica ST5020 -värjäysautomaattia saa käyttää vain laitteen käyttöön perehdytetty laboratoriohenkilökunta. Värjäysautomaatti on nopea ja se pystyy käsittelemään maksimissaan kahtatoista näytetelinettä samanaikaisesti. Automaatilla voi samanaikaisesti käsitellä useita eri värjäysohjelmia. Kuvassa 10 on avattu Leica ST5020 -värjäysautomaatin rakenne. (Leica 2009, 6, 10, 12.) Yleisimpiä värjäysautomaatilla tehtäviä rutiinivärjauksiä KSSHP:n patologian yksikössä ovat Giemsa, PAS, D-PAS, AB-PAS ja Berliinisivärjäys. (Friman 2016-02-16).



KUVA 10. Leica ST5020 -värjäysautomaatti (Leica 2009, 10.)

6 DIGITAALINEN PATOLOGIA

Digitaalinen patologia hyödyntää tietotekniikkaa klinisen patologian laboratorioprosessissa. Käsitteenä digitaalinen patologia on laaja ja sen yksi osa-alue on esimerkiksi laboratoriotietojärjestelmät. Digitaalisen patologian pääpaino on kuitenkin pitkälti virtuaalimikroskopiassa. Digitaalisen patologian avulla on mahdollista jakaa potilaan kliniseen tilaan liittyviä tietoja ja kuvia tehokkaasti potilaan hoitoon osallistuvien eri tahojen välillä. Sitä hyödyntämällä patologit voivat myös helposti tehdä konsultaatiopyyntöjä kollegoilleen. (Daniel ym. 2010, 1–2.)

6.1 Näytelasien skannaaminen digitaaliseen muotoon

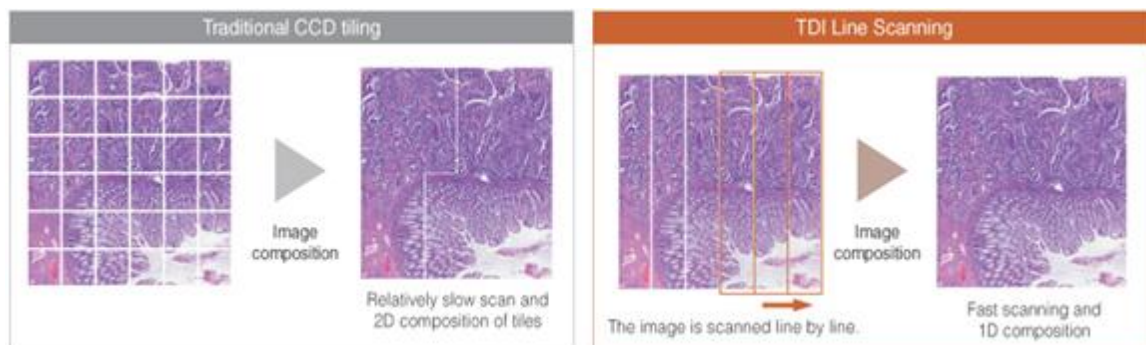
WSI-skannerilla (Whole Slide Imaging), eli lasiskannerilla pystytään skannaamaan objektilasilla olevat histologiset kudosleikkeet digitaaliseen muotoon. Skannattuja näytelaseja voidaan tarkastella tietokoneen näytöltä samalla tavalla, kuin niitä tarkastellaan normaalisti valomikroskooppisesti. Lasiskannerin validoinnissa on tärkeää varmistaa, että sen diagnostinen suorituskyky on vähintään yhtä hyvä kuin valomikroskoopilla tarkasteltaessa. (Pantanowitz ym. 2013, 1710.) Lasiskannerin käyttö histologisten näytelasien siirtämisessä digitaaliseen muotoon antaa mahdollisuudet tehokkaan telepatologian toteuttamiselle (Daniel ym. 2010, 1–2).

Lasiskanneri tunnistaa kudospäytteen lasilta automaattisesti, ja skannerin toiminnoista riippuen tunnistusta voidaan säädellä eri parametreilla. Lasiskanneri lukee objektilasin viiva- tai 2D-koodin perusteella. Suurten näytesarjojen skannaaminen edellyttää automaattista toimintaa, johon ei tarvita ihmistyövoimaa. Leikepaksuuden tulee olla tällöin standardoitu, koska eri paksuiset leikkeet hankaloittavat parametrien hakua optimaaliseksi. Skannaamiseen liittyvät asetukset on hyvä säätää heikoimminkin värjäytyneen kudospäytteen mukaan. Jos värjäyksessä esiintyy suuria intensiteettieroja, vaikeuttaa toisaalta myös se asetusten säätämistä. Leikkeiden tulee olla tasapaksuja ja sellaisia, että niistä pystyy erottamaan maksimissaan yhden solukerroksen. Lasiskanneri hakee objektilasilla olevasta kudospäyttestä automaattisesti tarkennuspisteet. On myös tärkeää, että objektilasit ovat puhtaat skannaamisen aikana. Lika objektilasilla voi harhauttaa tarkennuksen väärälle tasolle tai pahimmillaan skanneri voi skannata likaa osana kudosta. (Yli-Pyky 2014, 31–32.)

6.2 Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri

Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri on digitaalisen patologian laite, jolla on mahdollista skannata objektilasilla oleva kudospäyte ja muuttaa digitaaliseen muotoon. Lasiskanneri pystyy nopeasti käsittelemään suuria määriä objektileiseja, ja siinä on automaattitarkennus, joka analysoi tarkennuksen ennen kuvan ottamista ja havaitsee mahdolliset virheet. Objektileisien skannaamiseen on olemassa kaksi tekniikkaa, linjaskannaus ja alueskannaus, joista ensimmäinen on nopeampi skannaustapa. Linjaskannauksessa lasiskanneri jakaa objektilasilla olevan kudospäytteen suorakulmion muotoisiin osiin ja alueskannauksessa neliön muotoisiin osiin. Tämän jälkeen lasiskanneri ottaa kaikista osista kuvat ja yhdistää ne yhdeksi digitaaliseksi kuvaksi. Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri käyttää objektileisien skannaamisessa linjaskannausta. (Hamamatsu 2014, 3–4.) Kuva 11 havainnol-

listaa alue- ja linjaskannauksen periaatteet ja kuvassa 12 on esitelty patologian yksikön uusi lasiskanneri.



KUVA 11. Alueskannauksen (CCD) periaate vasemmalla ja linjaskannauksen (TDI) oikealla (Hamamatsu 2014.)



KUVA 12. Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri KSSH:n patologian yksikössä (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

7 TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena on löytää optimaalisin Giemsa-värjäyksen variaatio helikobakteereiden toteamiseen gastroskopianäytteistä. Vertailemme neljää eri Giemsa-värjäyksen variaatiota ja kahden eri valmistajan Giemsa-värjäysreagenssia. Patologian yksiköllä on käytössään tällä hetkellä Merckin Giemsa-värjäysreagenssi. Opinnäytetyössä on tarkoitus verrata, soveltuuko Reagenan Giemsa-värjäysreagenssi yhtä hyvin helikobakteereiden osoittamiseen kuin Merckin Giemsa-värjäysreagenssi. Pyydämme patologeilta ja sairaalasolubiologeilta arvion värjäyksistä kyselylomakkeen muodossa. Kyselylomakkeessa arvioijat antavat pisteetykset ja sanalliset arviot värjäysten onnistumisesta. Opinnäytetyön tavoitteena on optimoidun Giemsa-värjäyksen myötä helpottaa helikobakteereiden löytymistä gastroskopianäytteistä ja sen avulla auttaa patologeja heidän työssään. Lisäksi tavoitteena on kehittää omaa ammatillista osaamistamme. Patologian yksikön vastuulle jää värjäyksen käyttöönoton Leica ST5020 -värjäysautomaatilla KSSHP:ssä.

Opinnäytetyö on toiminnallinen kehittämistutkimus. Opinnäytetyömme tilaajalla oli ennen nykyistä Leica ST5020 -värjäysautomaattia käytössä Leica Jung -värjäysautomaatti. Tällä värjäysautomaatilla suoritettiin myös Giemsa-värjäys sellaisille gastroskopianäytteille, joissa epäiltiin olevan helikobakteereita. Värjäysautomaatin vaihtuessa uuteen, alkuperäinen Giemsa-värjäysohjelma ei tuntemattomasta syystä enää kuitenkaan toiminut uudella värjäysautomaatilla yhtä hyvin kuin vanhalla. Tämän takia Giemsa-värjäys tulee optimoida ja patologian yksikkö aikoo ottaa optimaalisimman värjäysohjeen käyttöön Leica ST5020 -värjäysautomaatilla. Varsinaisia opinnäytetyöhön liittyviä tutkimusongelmasta johdateltuja tutkimuskysymyksiä on kaksi, jotka on esitelty alla.

1. Mikä Giemsa-värjäyksen variaatioista on optimaalisin helikobakteereille?
2. Onko Reagenan Giemsa-värjäysreagenssi yhtä sovelias helikobakteerien osoittamiseen kuin Merckin Giemsa-värjäysreagenssi?

Opinnäytetyössä käytettävät gastroskopianäytteet ovat jo diagnosoituja ja vastattuja potilasnäytteitä, joissa tiedetään olevan runsaasti helikobakteereita. Lisäksi näytteet pysyvät koko tutkimusprosessin ajan anonyymeinä. Gastroskopianäytteiden diagnosoinnin ja potilaiden tietosuojan näkökulmasta ei siis nouse opinnäytetyöhön liittyviä eettisiä kysymyksiä. Tästä huolimatta on tärkeää tiedostaa gastroskopianäytteiden ainutlaatuisuus. Opinnäytetyöstä hyötyy moni taho. Patologian yksikkö saa käyttöönsä optimoidun Giemsa-värjäyksen helikobakteereiden toteamisessa gastroskopia-näytteistä. Myös sairaala ja potilaat hyötyvät opinnäytetyöstä, sillä värjäyksen optimoinnin myötä helikobakteeri-infektioiden diagnostiikka ja hoidon luotettavuus paranevat.

8 TUTKIMUKSEN ETENEMINEN

Tutkimuksen ensimmäinen vaihe oli näytemateriaalin valinta ja leikkeiden valmistaminen. Leikkasimme gastroskopianäytteet vesiliukumikrotomilla. Tutkimuksessa oli mukana neljä Giemsa-värjäyksen erilaista variaatiota. Nimesimme värjäykset A-D, joista A on alkuperäinen patologian yksikön värjäysohje. Värjäyskiirroksia oli yhteensä neljä. Ensimmäisellä värjäyskiirroksella oli mukana kaikki neljä värjäysvariaatiota, minkä jälkeen etenimme värjäyskiirrokselta toiselle tehden värjäykseen pieniä muutoksia tai jättämällä jonkin värjäysvariaation pois. Arvioimme värjäysten onnistumista alustavasti yhdessä sairaalasolubiologin kanssa, mutta pyysimme tarkemman arvion värjäyksistä patologeilta ja sairaalasolubiologeilta kyselylomakkeella. Saimme patologeilta ja sairaalasolubiologeilta pisteytykset ja sanalliset arviot värjäyksistä ja palautteiden pohjalta valitsimme optimaalisimman Giemsa-värjäyksen variaation helikobakteereiden toteamiseen gastroskopianäytteistä.

8.1 Näytemateriaalin valinta

Näytemateriaaliksi valittiin kolmen eri potilaan gastroskopianäytteet, jotka olivat jo diagnosoituja potilasnäytteitä ja joissa oli todettu olevan runsaasti helikobakteereita. Sairaa lasolubiologi kartoitti etukäteen meille työhömmme sopivia näytteitä. Potilaiden henkilötiedot eivät tulleet missään vaiheessa meille tietoon, vaan ne pysyivät anonyymeinä. Koska näytteet olivat jo diagnosoituja, gastroskopia-näytteet olivat valmiiksi valettu parafiiniin. Meidän työsuutemme alkoi leikkeiden leikkaamisella vesiliukumikrotomilla.

8.2 Leikkeiden valmistaminen

Päätimme yhteistyössä sairaalasolubiologin kanssa, että kaikista kolmesta potilasnäytteestä leikataan leikkeitä kahdeksalle näytelasille. Näytelaseja tuli siis yhteensä 24 kappaletta. Leikkasimme leikkeitä kerralla riittävästi, jotta ne riittäisivät eri värjäysvariaatioihin. Kullekin näytelasille tuli yksi leike.

Leikkasimme leikkeet vesiliukumikrotomilla, jota käytimme vuorotellen. Laitoimme ensin valitut kudokset kylmälevylle jäähtymään ja sillä aikaa laitoimme vesiliukumikrotomin valmiiksi leikkaamista varten. Koska viimeisimmästä mikrotomilla leikkaamisesta oli kulunut aikaa, harjoittelimme leikkaamista ensin opiskelijoille varatuilla kudoblokeilla. Kun leikkaaminen sujui, siirryimme leikkaamaan potilasnäytteitä. Leikkaamisesta teki haastavaa se, että leikattavat potilasnäytteet olivat luotimuotiiin valettuja gastroskopianäytteitä, jotka ovat usein pieniä ja vaikeita leikata. Koska gastroskopianäytteet ovat pieniä, ne ovat myös hyvin ainutkertaisia ja tämän vuoksi niitä leikatessa tulee olla hyvin huolellinen.

Asetimme kudoblokin vesiliukumikrotomin jäähdyttävään blokinpidikkeeseen ja säädimme mikrotomin leikepaksuudeksi 2 μm . Kudoblokeja ei tarvinnut trimmata lainkaan, koska niistä oli aiemmin leikattu leikkeitä varsinaista diagnoosia varten. Blokki siirtyi käsikampea pyörittämällä lähemmäs terää ja kun leikkeistä alkoi tulla tasapaksuja, pystyimme leikkaamaan varsinaisia leikkeitä näytelaseja varten. Laadukkaan leikkeen annettiin siirtyä vesiliukua pitkin lämminvesialtaaseen, jossa se suoris-

tui. Tämän jälkeen leike poimittiin siveltimen avulla varovasti näytelasille oikein päin. Valmiit näytelasit laitettiin lämpölevylle kiinnittymään, jotta ylimääräinen parafiini suli ja leike kiinnittyi lasille. Leikkaamisen jälkeen puhdistimme vesiliukumikrotomin asianmukaisesti.

8.3 Alkuperäinen Giemsa-värjäys ja ensimmäinen värjäyskierrös

Testattaviksi Giemsa-värjäyksen variaatioiksi valitsimme sairaalaselubiologin kanssa neljä värjäystä, joista yksi oli alkuperäinen ja tällä hetkellä käytössä oleva Giemsa-värjäys. Kolme muuta värjäysohjetta saimme muista sairaaloista. Nimesimme eri värjäysohjeet kirjaimilla A-D. Alkuperäinen ja tällä hetkellä käytössä oleva värjäysohje on A-värjäys. Muilta sairaaloilta saadut värjäysohjeet ovat B-D -värjäykset.

Värjäykset A-D perustuvat samaan värjäyksen peruskaavaan. Kaikki värjäykset alkavat ksyleenillä, jonka jälkeen tulee laskeva alkoholisarja ja värjäysreagenssi. Värjäyksen lopuksi tulee nouseva alkoholisarja ja viimeisenä ksyleeni. Värjäyksissä on kuitenkin paljon eroja Giemsa-värjäysreagenssien vahvuuksien ja joidenkin muiden käytettävien reagenssien suhteen. Värjäyksissä A, B ja D käytetään erivahvuisia etikkahappovesiä. Värjäyksissä A ja B käytetään isopropanolia nousevan alkoholisarjan yhteydessä. Värjäysajat vaihtelevat eri Giemsa-liuosten vahvuuksien perusteella ja erityisesti C-värjäys on kokonaisvärjäysajaltaan muita värjäyksiä reilusti lyhyempi. Alla olevissa taulukoissa 2–5 on esitelty värjäysohjeet Giemsa-värjäyksille A-D.

TAULUKKO 2. A-värjäys. Käytössä oleva Giemsa-värjäys KSSHP:ssä helicobakteerin toteamiseen (KSSHP 2013.)

Vaihe	Liuos	Aika
1.	Ksyleeni	5 min
2.	Ksyleeni	5 min
3.	Absoluuttinen etanoli	2 min
4.	Absoluuttinen etanoli	2 min
5.	96 % etanoli	3 min
6.	70 % etanoli	30 min
7.	Puhdistettu vesi	2 min
8.	10 % Giemsa-liuos	90 min
9.	Etikkahappovesi	3 sek
10.	96 % etanoli	3 sek
11.	Isopropanoli	3 min
12.	Isopropanoli	2 min
13.	Ksyleeni	2 min
14.	Ksyleeni	2 min
		= 2 h 28 min 6 s

TAULUKKO 3. B-värjäys. Giemsa-värjäysvariaatio helicobakteerin toteamiseen.

Vaihe	Liuos	Aika
1.	Ksyleeni	5 min
2.	Ksyleeni	5 min
3.	Absoluuttinen etanoli	2 min
4.	Absoluuttinen etanoli	2 min
5.	96 % etanoli	2 min
6.	96 % etanoli	2 min
7.	Aqua	5 sek
8.	4 % Giemsa-liuos	120 min
9.	Etikkahappovesi	13 – 15 sek
10.	96 % etanoli	13 sek
11.	Isopropanoli	2 min
12.	Isopropanoli	2 min
13.	Isopropanoli	2 min
14.	Ksyleeni	5 min
15.	Ksyleeni	5 min
		= 2 h 34 min 33 s

TAULUKKO 4. C-värjäys. Giemsa-värjäysvariaatio helikobakteerin toteamiseen.

Vaihe	Liuos	Aika
1.	Ksyleeni	4 min
2.	Ksyleeni	4 min
3.	Absoluuttinen etanoli	2 min
4.	Absoluuttinen etanoli	2 min
5.	96 % etanoli	2 min
6.	Aqua	1 min
7.	20 % Giemsa-liuos	5 min
8.	96 % etanoli	1 sek
9.	Absoluuttinen etanoli	1 sek
10.	Absoluuttinen etanoli	1 sek
11.	Ksyleeni	3 min
12.	Ksyleeni	3 min
13.	Ksyleeni	5 min
		= 31 min 3 s

TAULUKKO 5. D-värjäys. Giemsa-värjäysvariaatio helikobakteerin toteamiseen.

Vaihe	Liuos	Aika
1.	Ksyleeni	7 min
2.	Ksyleeni	7 min
3.	Absoluuttinen etanoli	2 min 30 sek
4.	Absoluuttinen etanoli	2 min 30 sek
5.	96 % etanoli	2 min
6.	Aqua	2 min
7.	Aqua	3 min
8.	10 % Giemsa-liuos	60 min
9.	Aqua	2 min
10.	0,13 % etikkahappo	6 sek
11.	Aqua	3 min
12.	96 % etanoli	1 min
13.	96 % etanoli	1 min
14.	Absoluuttinen etanoli	2 min
15.	Absoluuttinen etanoli	1 min
16.	Ksyleeni	3 min
17.	Ksyleeni	3 min
		= 1 h 42 min 6 s

Suoritimme A-värjäyksen Leica ST5020 -värjäysautomaatilla, koska värjäys oli valmiiksi ohjelmoitu värjäysautomaatille. Värjäykset B-D värjäsimme käsivärjäyksenä. Keräsimme aluksi tarvittavat väli-
neet värjäyksiä varten ja laskimme liuoslaskut eri värjäysohjeiden Giemsa-liuoksia ja etikkahappove-
siä varten. A-värjäyksen Giemsa-liuoksen pitoisuus oli 10 %, B-värjäyksen 4 %, C-värjäyksen 20 %
ja D-värjäyksen 10 %. Käytimme kaikissa värjäyksissä Merck Giemsa´s azur eosin methylene blue
solution -värjäysreagenssia. Nimesimme kaikki värjäysastiat ja kaadoimme niihin oikeat reagenssit.
Valmistimme liuoslaskujen pohjalta Giemsa-liuokset värjäyksille B-D ja etikkahappovedet värjäyksille
B ja D. Suoritimme värjäykset B-D samanaikaisesti. Ensimmäisen värjäyskierron värjäykset
teimme kaikilla kolmella potilasnäytteellä ja jokainen eri näytelasi värjättiin värjäyksillä A-D, jotta ne
olivat keskenään vertailukelpoiset. Teimme käsinvärjäykset ohjeiden mukaisesti ja ne onnistuivat
hyvin. Värjäyksen jälkeen päällystimmme näytelasit laboratorion päällystysautomaatilla.

Katsoimme A-D -värjäyksillä värjätyt näytelasit aluksi yhdessä sairaalasolubiologin kanssa. A-
värjäyksessä oli hyvä yleisrakenne ja tumat olivat värjäytyneet tummaksi kun taas sytoplasma haa-
leammaksi. B-värjäyksessä yleisrakenne oli värjäytynyt hyvin tummaksi, joka vaikeutti välillä solura-
kenteiden erottamista. C-värjäyksen yleisrakenne oli hyvin tummansininen. D-värjäyksessä yleisra-
kenne oli hyvä ja se muistutti paljon A-värjäyksen tulosta. Helikobakteerit erottuivat kaikissa värjä-

yksissä. B- ja C-värjäyksissä helikobakteerit värjäytyivät selvästi tummemmaksi kuin A-värjäyksessä. D-värjäyksessä helikobakteerit värjäytyivät hailakasti verrattuna muihin värjäyksiin. Näytelaseja tarkastellessa huomasimme, että yksi kolmesta potilasnäytteestä ei ollut kudospotilaaliltaan riittävä ja tämän vuoksi helikobakteereja ei ollut näytelaseilla paljoa nähtävillä. Tästä syystä päätimme jättää kyseisen potilasnäytteen pois seuraavilta värjäyskierroksilta. Sairaalasolubiologin mielipiteen ja patologien antamien arvioiden perusteella päätimme, että jatkamme värjäyksillä A-C. D-värjäyksen päättimme jättää pois, koska se oli yleisvaikutelmaltaan hyvin samankaltainen kuin A-värjäys ja koska helikobakteerit erottuivat näytteistä muita värjäyksiä heikommin.

8.4 Toinen värjäyskierros

Toinen värjäyskierros tehtiin värjäyksille A-C. Tällä värjäyskierroksella teimme kaikki värjäykset käsin, koska värjäyksiin tehtiin pieniä muutoksia. Sairaalasolubiologi laati värjäyksiin tehtävät muutokset omien havaintojensa ja patologien kommenttien perusteella. Värjäyksiin tehdyt muutokset on esitelty taulukossa 6. Värjäsimme koko värjäyskierroksen käyttäen edelleen Merck Giemsa's azur eosin methylene blue solution -värjäysreagenssia. Värjäsimme yhdestä potilasnäytteestä rinnakkaiset näytelasit, jotta A-C -värjäyksiä olisi helppo vertailla keskenään. Suoritimme A-C -värjäykset ohjeita ja värjäyksiin tehtyjä muutoksia noudattaen. Kaikki värjäykset sujuivat hyvin ilman ongelmia. Värjäyksen jälkeen päällystimme näytelasit päällystysautomaatilla.

TAULUKKO 6. Toisella värjäyskierroksella A-C -värjäyksiin tehdyt muutokset.

Värjäys	Värjäykseen tehdyt muutokset
A-värjäys	Vaihe 6. 70 % etanolin (30 min) tilalle 96 % etanoli (2 min) (Ks. taulukko 2) Vaihe 8. 10 % Giemsan (90 min) tilalle 15 % Giemsa (60 min) (Ks. taulukko 2)
B-värjäys	Vaihe 8. Giemsan vaikutusaika lyheni 120 minuutista 60 minuuttiin (Ks. taulukko 3)
C-värjäys	Vaihe 7. 20 % Giemsan tilalle 10 % Giemsa (Ks. taulukko 4)

Tarkastelimme värjäämiämme näytelaseja yhdessä sairaalasolubiologin kanssa. A-värjäyksessä yleisrakenne erottui hyvin ja erityisesti granulainen sytoplasma tuli esille. Myös B-värjäyksessä oli hyvä yleisrakenne ja kudoksen eri rakenteet erottuivat toisistaan hyvin. C-värjäyksen yleisrakenne oli edelleen hyvin tummansininen siitä huolimatta, että Giemsa-värjäysreagenssin pitoisuus puolitettiin toisella värjäyskierroksella. Helikobakteerit erottuivat kaikista värjäyksistä. A-värjäyksen Giemsa-värjäysreagenssin vahvuuden nostamisen 10 %:sta 15 %:iin ja vaikutusajan laskemisen seurauksena helikobakteerit näkyivät paremmin kuin ensimmäisellä värjäyskierroksella. Lisäksi helikobakteerien parempaan värjäytyvyyteen saattoi vaikuttaa 70 % etanolin vaihtaminen 96 % etanoliin, jonka vaikutusaika laski 30 minuutista kahteen minuuttiin. B- ja C-värjäykset olivat molemmat yleisvärjäytyvyydeltään hyvin tummia, joten teimme toista värjäyskierrosta varten molempiin värjäyksiin pieniä muutoksia. B-värjäyksessä laskimme Giemsa-värjäysreagenssin vaikutusaikaa puoleen. C-

värjäyksessä puolitimme Giemsa-värjäysreagenssin pitoisuuden. Näiden muutosten seurauksena B- ja C-värjäysten morfologia erottui paremmin eikä värjäysten yleisvaikutelma ollut enää niin sininen. A-, B- ja C -värjäykset olivat keskenään hyvin tasalaatuisia, joten päätimme jatkaa kolmannelle värjäyskierrokselle kaikilla kolmella värjäyksellä. Vaihdoimme kuitenkin Merck Giemsa's azur eosin methylene blue solution -värjäysreagenssin Reagenan Giemsa Staining Solution -värjäysreagenssiin.

8.5 Kolmas värjäyskierros

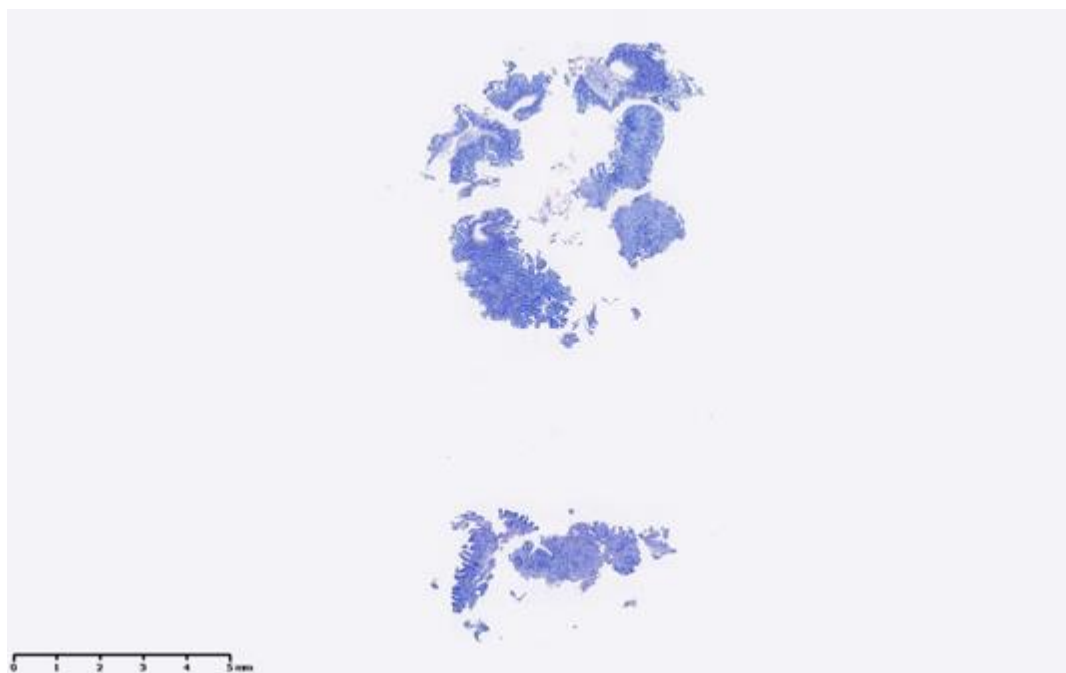
Kolmannen värjäyskierroksen suoritimme A-C -värjäyksille ja värjäysreagenssina käytimme Merckin sijaan Reagenan Giemsa-värjäysreagenssia. Suoritimme kaikki kolme värjäystä käsin. Värjäsimme yhdestä potilasnäytteestä rinnakkaiset näytelasit, jotta ne olisivat vertailukelpoiset keskenään. Suoritimme kaikki värjäykset käsin ja ne onnistuivat ongelmitta. Päälyystimme näytelasit jälleen päälylystysautomaatilla.

Tarkastelimme ja arvioimme kolmannen värjäyskierroksen näytelaseja yhdessä sairaasolubiologin kanssa. A-värjäyksen yleinen värjäytyvyys oli hyvin sininen, mutta helikobakteerit erottuivat näytteestä selkeästi. B-värjäyksessä solujen rakenteet erottuivat hyvin ja helikobakteerit nousivat näytteestä hyvin esille. C-värjäyksen yleinen värjäytyvyys oli mielestämme liian sininen ja rakenteet jäivät epäselvän näköisiksi. Helikobakteerit löytyivät näytteestä kuitenkin selvästi.

8.6 Näytelasien skannaus

Opinnäytetyömme tilaajan käyttöön tuli vuoden 2016 alussa uusi Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri. Opinnäytetyöhömmme kuului tutustuminen lasiskannerin toimintaan ja sen eri ominaisuuksiin. Kuvasimme lasiskannerilla gastrokopianäytteitä ja saimme laadukkaita kuvia opinnäytetyömme tulosten tarkastelua varten. Lasiskannerin käyttö oli helppoa ja vaivatonta. Se pystyi tunnistamaan näytelasit 2D-koodin perusteella ja samalla identifioimaan näytteet luotettavasti. Skannausaika oli riippuvainen näytteen koosta ja mahdollisista artefaktoista näytelasilla. Gastrokopianäytteet olivat pieniä, joten niiden linjaskannaus ei kestänyt kauaa. Skannattuja näytelaseja oli mahdollista tarkastella tietokoneen näytöltä erillisen ohjelman avulla. Skannatut näytetiedostot olivat todella suurikokoisia, joten päätimme ottaa vain erillisiä kuvia eri suurennoksilla skannaamistamme näytelaseista.

Skannattavat gastrokopianäytelasit asetettiin peräkkäin objektilasitelineeseen, joka laitettiin luukusta sisään skanneriin. Skannattavista näytteistä riippuen skannerilta oli mahdollista valita juuri sopiva skannausohjelma. Käytimme yleisintä skannausohjelmaa, joka oli käytössä patologian yksikössä HE-värjäytyille kudoksenäytteille. Yhden gastrokopianäytelasin skannaus vei aikaa noin kaksi minuuttia. Joissain näytelaseissa oli hieman värjäämistä aiheutunutta artefaktaa, jonka vuoksi skannaaminen kesti kauemmin. Tarkastelimme skannattujen näytelasien morfologiaa ja helikobakteerien näkyvyyttä näytteistä suoraan tietokoneen näytöltä. Skannauksen tarkkuus oli rinnastettavissa perinteiseen mikroskoopilla tarkasteluun. Kuvassa 13 on havainnollistettu, miltä skannattu näytelasi näyttää tietokoneen näytöllä pienimmällä 0,7-kertaisella suurennoksella.



KUVA 13. Skannattu gastroskopianäyte 0,7-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

9 VÄRJÄYKSEN TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Ennen patologioiden tekemää arviointia värjäyksistä, olimme jo yhdessä sairaalasolubiologin kanssa arvioineet alustavasti kunkin värjäyksen onnistumista. Sairaa lasolubiologi tarkasteli lisäksi laseja yhdessä toisen sairaalasolubiologin kanssa. Työn tarkoituksena oli kuitenkin arvioida värjäyksiä tarkemmin ja tätä kautta parantaa tulosten luotettavuutta. Patologioiden ja sairaalasolubiologioiden ammattitaito ja asiantuntijuus ovat perusta helikobakteereiden toteamiseen gastroskopianäytteistä. Tämän vuoksi he olivat luotettavin mittari arvioimaan työmme tuloksia.

9.1 Värjäystulosten arviointi

Kyselylomake on hyvin perinteinen tapa kerätä aineistoa tutkimukseen ja tavanomaisimmin se on paperinen kyselylomake. Nykyään paperisten kyselylomakkeiden rinnalle ovat nousseet sähköiset kyselyt, joita on helppo välittää eteenpäin esimerkiksi sähköpostin välityksellä. Kyselylomakkeen muoto vaihtelee sen tarkoituksen ja kohderyhmän mukaan. Kysymysten laatiminen vaatii huolellisuutta, koska ne luovat perustan tutkimuksen onnistumiselle. Hyvässä kyselylomakkeessa kysymykset ovat yksiselitteisiä, sanamuodot tarkkoja, eivätkä kysymykset saa olla tulkinnanvaraisia tai johdattelevia. Kyselylomake laaditaan tutkimuksen tavoitteiden ja tutkimusongelmien mukaan. Aineistoa on hyvä kerätä vasta kun tutkimusongelmat ovat selkiytyneet. Tällöin ollaan perillä siitä, minkälaista tietoa aineistonkeruulla halutaan löytää. (Valli 2015, 84–85.)

Laadimme opinnäytetyötä varten kyselylomakkeen, jonka avulla patologit ja sairaalasolubiologit arvioivat värjäystulosten onnistumista. Halusimme tehdä kyselylomakkeesta mahdollisimman selkeän ja loogisen. Kyselylomakkeen tarkoituksena oli arvioida gastroskopianäytteiden yleistä värjäytyvyyttä ja helikobakteereiden värjäytyvyyttä. Yleisellä värjäytyvyydellä halusimme tarkastella värjäyksen kokonaiskuvaa ja kudoksenäytteiden eri rakenteiden, kuten tumien ja sytoplasman erottumista toisistaan. Kyselylomakkeen tärkeimpänä arviointikriteerinä pidimme kuitenkin helikobakteereiden värjäytyvyyttä gastroskopianäytteissä. Päätimme asettaa värjäysten onnistumisen arvioinnin numeerisesti asteikolla 0–3 seuraavien kriteereiden mukaisesti.

- 0 = epäonnistunut värjäys
- 1 = välttävä värjäys
- 2 = hyvä värjäys
- 3 = erinomainen värjäys

Patologioiden ja sairaalasolubiologioiden tehtävänä oli valita heidän mielestään parhaiten värjäyksen onnistumista kuvaava numero arviointiasteikolta. Numeerisen arvioinnin lisäksi heillä oli mahdollisuus antaa myös sanallinen arvio värjäyksen onnistumisesta. Numeeriseen arviointiin perustuen laatimamme kyselylomake oli kvantitatiivinen, mutta mahdollisuus antaa myös sanallinen arvio värjäyksistä teki kyselylomakkeesta osittain myös kvalitatiivisen.

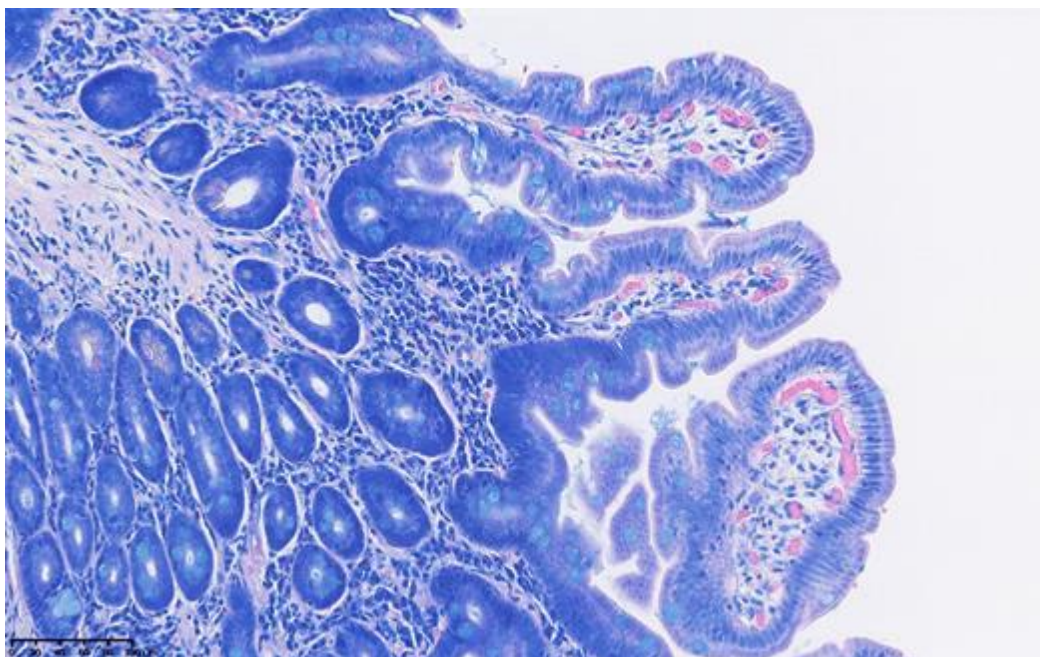
9.2 Värjäysohjelmista saadut pisteytykset ja sanalliset arviot

Laadimme jokaiselta värjäyskierrokselta erillisen taulukon, jossa näkyvät arvioitavat värjäysohjelmat ja arvioijina toimineiden patologioiden ja sairaalaselubiologioiden antamat pisteytykset. Kyselylomakkeessa arvioitiin näytteen yleistä värjäytyvyyttä ja helikobakteereiden värjäytyvyyttä. Arvioijien oli mahdollista antaa molemmista 0–3 pistettä. Nämä kohdat laskettiin yhteen, joista muodostui arvioijan antama kokonaispistemäärä arvioitavalle värjäysohjelmalle. Tällöin värjäysohjelman kokonaispistemäärä on 0–6 pistettä. Jokaisella värjäyskierroksella oli kolme arvioijaa, joiden antamat kokonaispistemäärät laskettiin yhteen. Yhteispisteistä laskettiin vielä kullekin värjäysohjelmalle keskiarvo asteikolla 0-6. Ensimmäisellä värjäyskierroksella arvioitavia näytteitä oli yhteensä kolme eri potilasnäytettä. Toisella ja kolmannella värjäyskierroksella arvioitavia näytelaseja oli yksi per värjäys ja ne olivat keskenään rinnakkaisia. Pisteytyksien lisäksi arvioijat antoivat värjäysohjelmista myös sanallista palautetta. Taulukoissa 7, 8 ja 9 olemme esitelleet värjäysohjelmien pisteytykset värjäyskierroksittain ja arvioijien antamaa sanallista palautetta taulukoiden alapuolella kuvien yhteydessä. Näytteen yleinen morfologia katsottiin ja kuvattiin mikroskoopissa 20-kertaisella suurennoksella ja helikobakteereiden erottuminen näytteestä 40-kertaisella suurennoksella. Tavoite oli, että helikobakteerit erottuvat näytteestä hyvin jo 20-kertaisella suurennoksella.

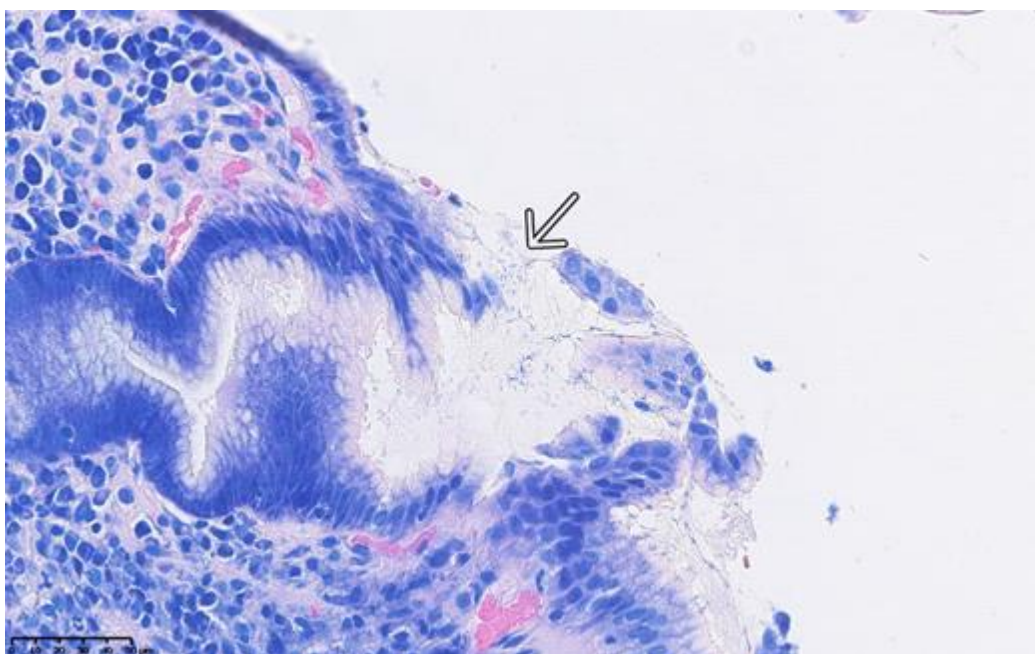
TAULUKKO 7. Ensimmäisen värjäyskierroksen pisteytykset.

Värjäysohjelma	Arvioijien määrä	Arvioitavien näytelasien määrä	Arvioijien antamat yhteispisteet	Pisteytysten keskiarvo
A	3	3	15	5
B	3	3	14	4,7
C	3	3	13,5	4,5
D	3	3	7	2,3

Ensimmäisellä värjäyskierroksella arvioijista kaksi oli patologeja ja yksi sairaalaselubiologi. A-värjäyksessä näytteen yleinen värjäytyvyys oli heidän mielestään hyvä ja selkeä. Kaikkien arvioijien mielestä näytteen morfologia oli onnistunut ja kudoksen näytteen eri rakenteet oli helppo erottaa toisistaan. Yksi arvioijista oli sitä mieltä, että näytteen yleinen värjäytyvyys oli osittain liian vaalea, mutta tumat erottuivat hyvin. Helikobakteerit erottuivat näytteestä hieman heikosti 20-kertaisella mikroskoopin suurennoksella. Kuvissa 14 ja 15 on esitelty ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereita.

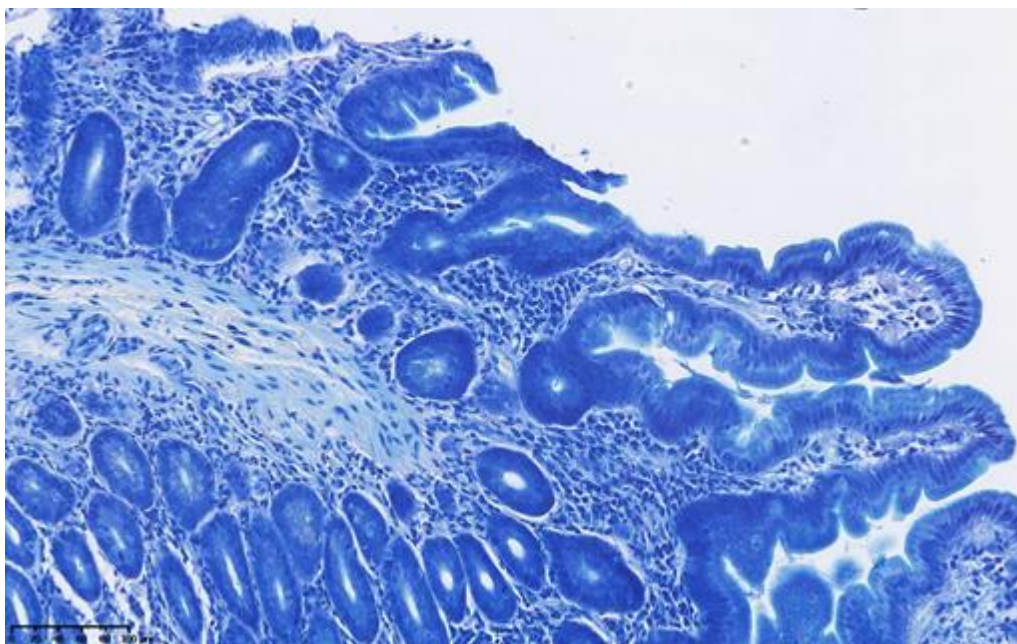


KUVA 14. Ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

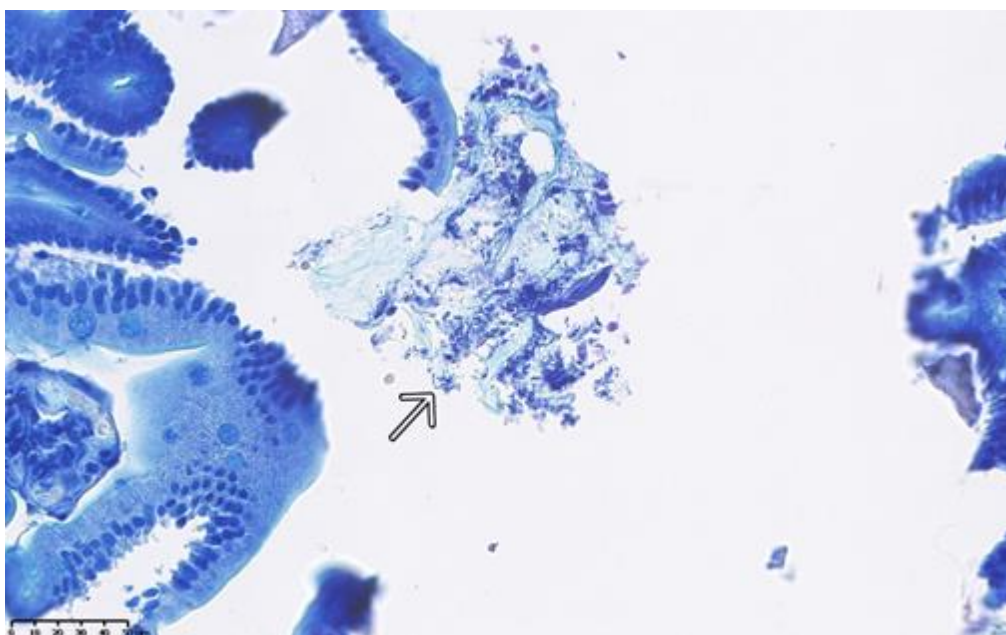


KUVA 15. Ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

Ensimmäisen värjäyskierroksen B-värjäyksen yleisvaikutelma oli kaikkien arvioijien mielestä liian tumma. Kudoksen eri rakenteet eivät erottuneet toisistaan kunnolla ja morfologia oli näytteen yleisen tumman värjäytyvyyden vuoksi osittain huono. Tumajyvät erottuivat yhden arvioijan mielestä näytteestä erityisen hyvin. Helikobakteerit värjäytyivät myös tummiksi, joten ne erottuivat näytteestä selkeästi. Kuvissa 16 ja 17 on havainnollistettu ensimmäisen värjäyskierroksen B-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereita.

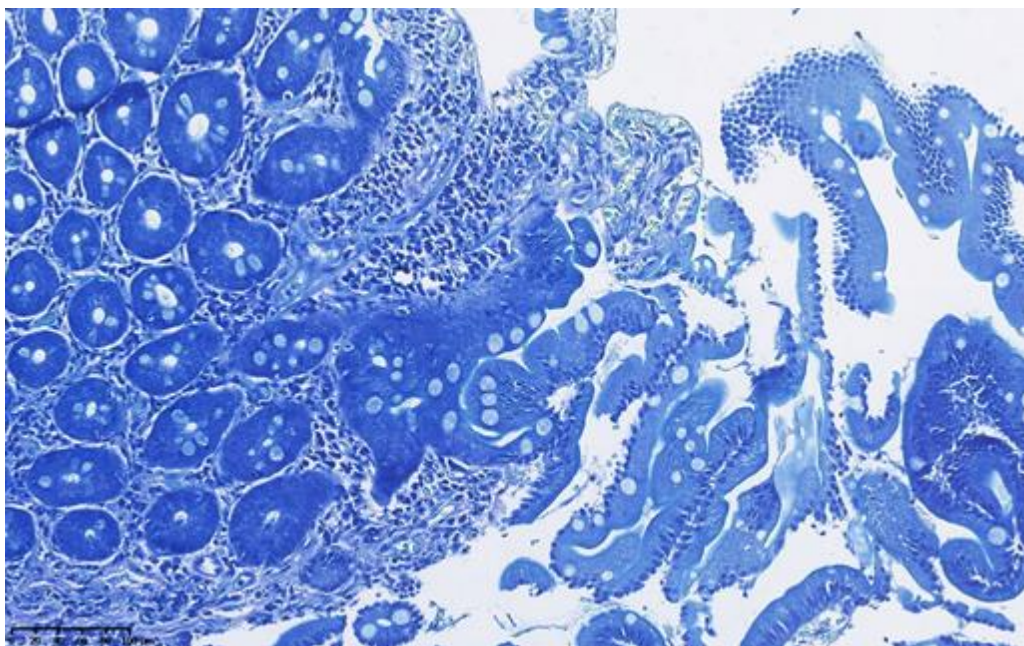


KUVA 16. Ensimmäisen värjäyskerroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

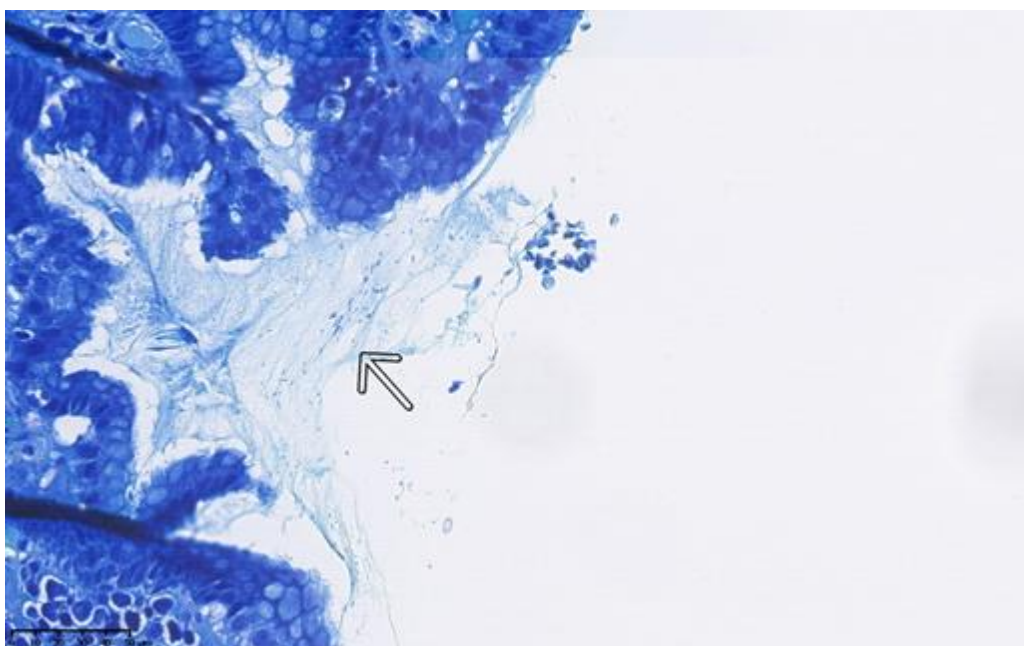


KUVA 17. Ensimmäisen värjäyskerroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

C-värjäyksen yleisvaikutelma oli ensimmäisellä värjäyskerroksella kaikkien arvioijien mielestä liian sininen ja tumma. Kudosnäytteen morfologia oli heikko näytteen tummuuden ja siniseksi värjäytyvyyden vuoksi. Helikobakteerit erottuivat näytteestä kaikkien arvioijien mielestä kuitenkin mainiosti. B- ja C-värjäyksissä helikobakteerit värjäytyivät paremmin kuin A-värjäyksessä, mutta A-värjäyksen yleinen värjäytyvyys oli onnistuneempi. Kuvat 18 ja 19 näyttävät ensimmäisen värjäyskerroksen C-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereita.



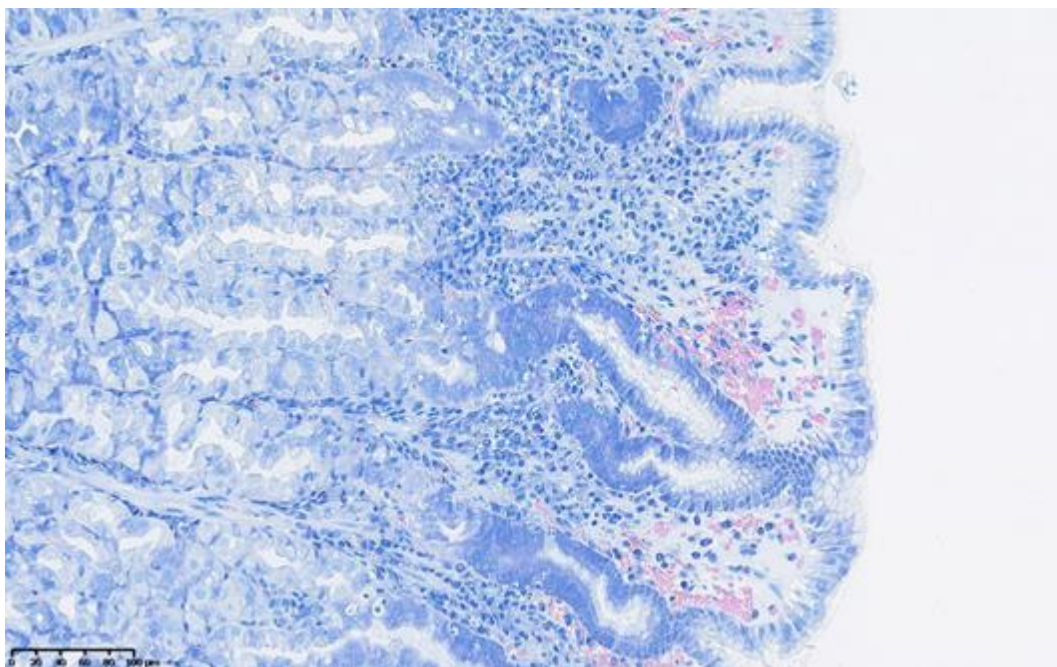
KUVA 18. Ensimmäisen värjäyskerroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)



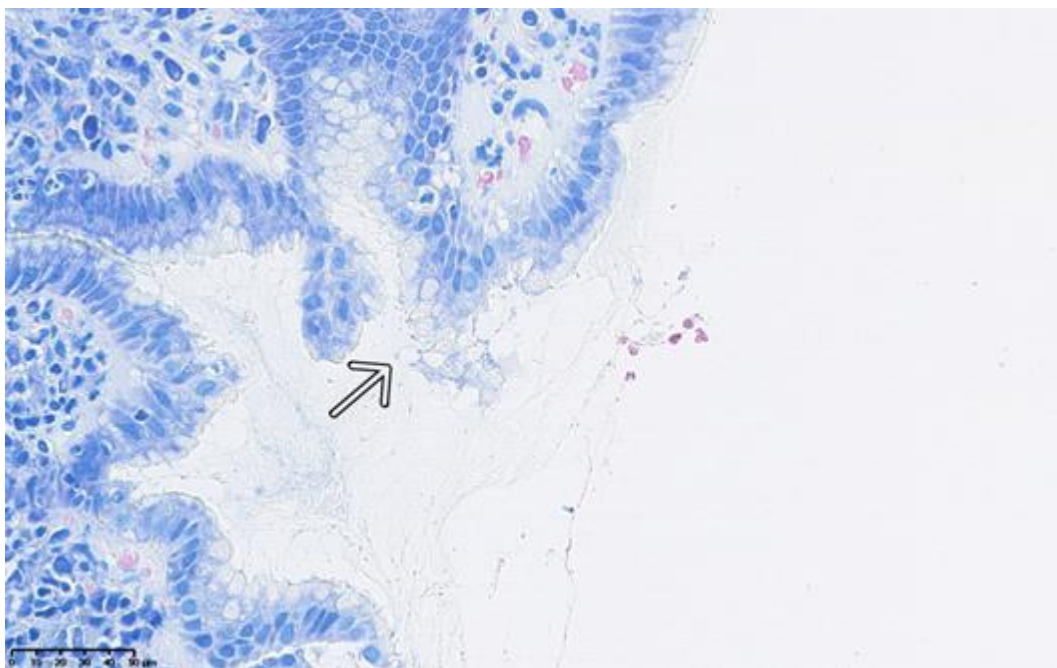
KUVA 19. Ensimmäisen värjäyskerroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

Kaikkien arvioijien mielestä ensimmäisen värjäyskerroksen D-värjäys oli kokonaisuudessaan liian vaaleasti värjäytynyt. Kudosnäytteen eri rakenteet oli vaikea erottaa näytteestä sen haalean värjäytyvyyden vuoksi, mikä vaikutti myös osaltaan morfologiaan. Värjäys kaipasi selkeästi lisää kontrastia. Myös helikobakteerit värjäytyivät liian vaaleiksi ja tämän vuoksi niitä oli vaikea erottaa näytteestä sekä 20-kertaisella että 40-kertaisella suurennoksella. D-värjäys sai arvioijilta selkeästi huonomman pisteytyksen keskiarvon A-, B- ja C-värjäyksiin verrattuna. Muihin värjäysohjelmiin verrattuna D-värjäys sai arvioijilta myös kehoitusta sanallisen palautteen, joten päätimme jättää sen pois seu-

raavilta värjäyskierroksilta. Ensimmäisen värjäyskierroksen D-värjäyksen yleinen rakenne ja helikobakteerit on esitetty kuvissa 20 ja 21.



KUVA 20. Ensimmäisen värjäyskierroksen D-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

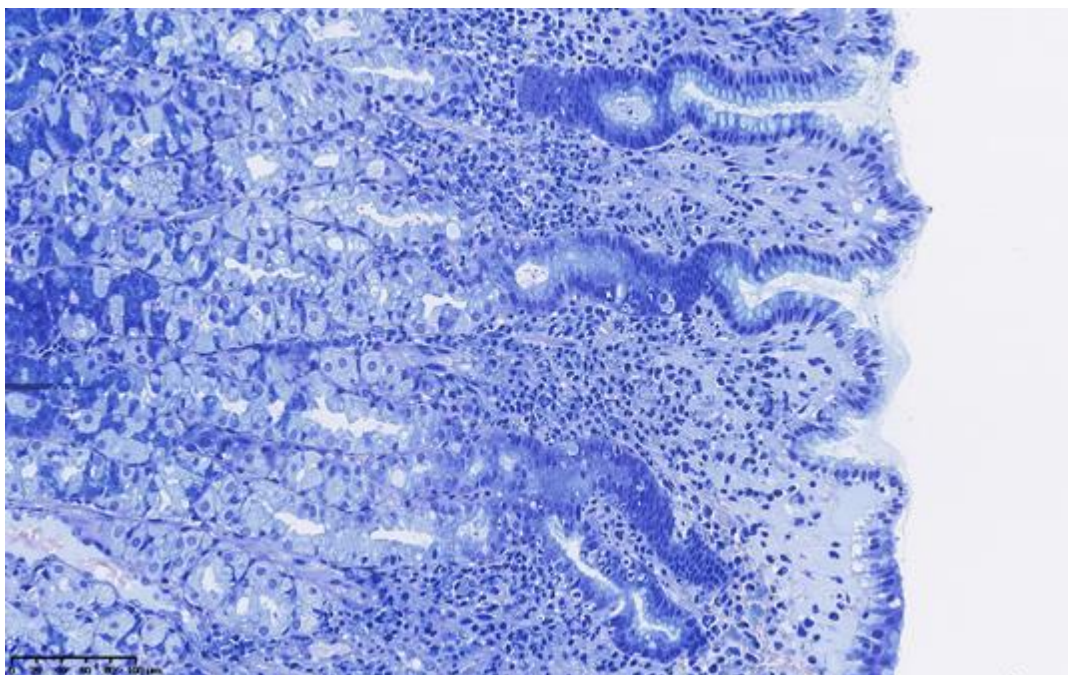


KUVA 21. Ensimmäisen värjäyskierroksen D-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

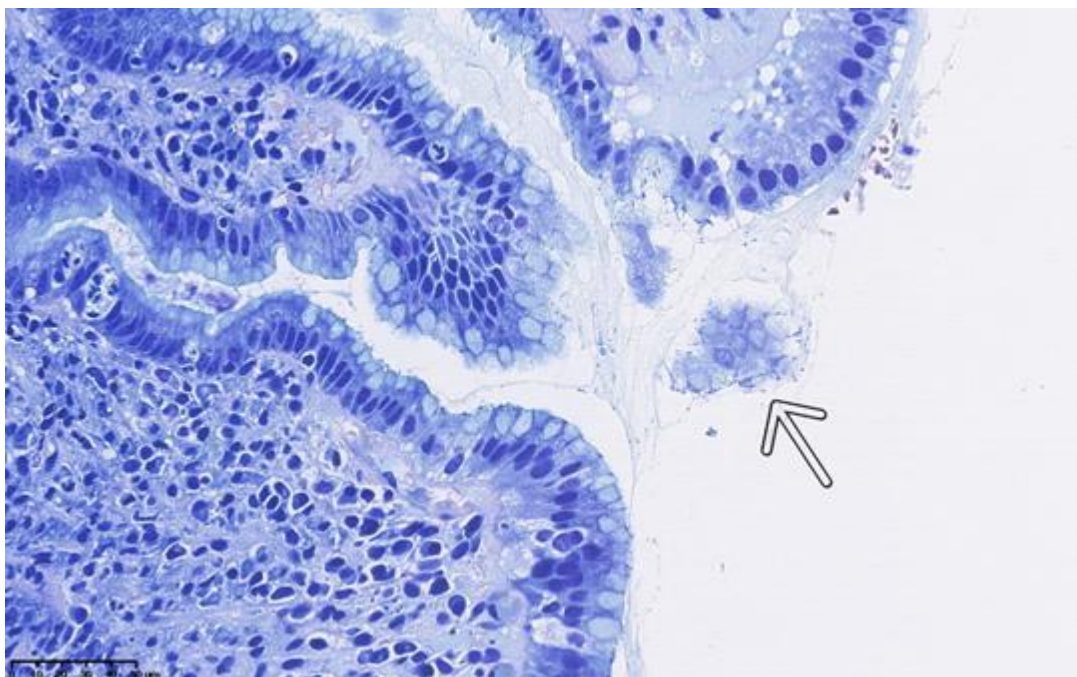
TAULUKKO 8. Toisen värjäyskierroksen pisteytykset.

Värjäysohjelma	Arvioijien määrä	Arvioitavien näytelasien määrä	Arvioijien antamat yhteispisteet	Pisteitysten keskiarvo
A	3	1	17	5,7
B	3	1	12	4
C	3	1	12	4

Toisella värjäyskierroksella kaksi arvioijista oli sairaalaselubiologeja ja yksi patologi. A-värjäyksen yleinen värjäytyvyys oli kaikkien arvioijien mielestä erittäin onnistunut. Näytteen morfologia oli selkeä ja helikobakteerit erottuivat kudosnäytteestä todella hyvin. Yksi arvioijista oli sitä mieltä, että värjäyksen onnistumista pystyi kuvailemaan oppikirjamaisen hyväksi. Kukaan arvioijista ei antanut värjäysohjelmasta mitään negatiivista palautetta. Kuvista 22 ja 23 voi tutkia toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereita.

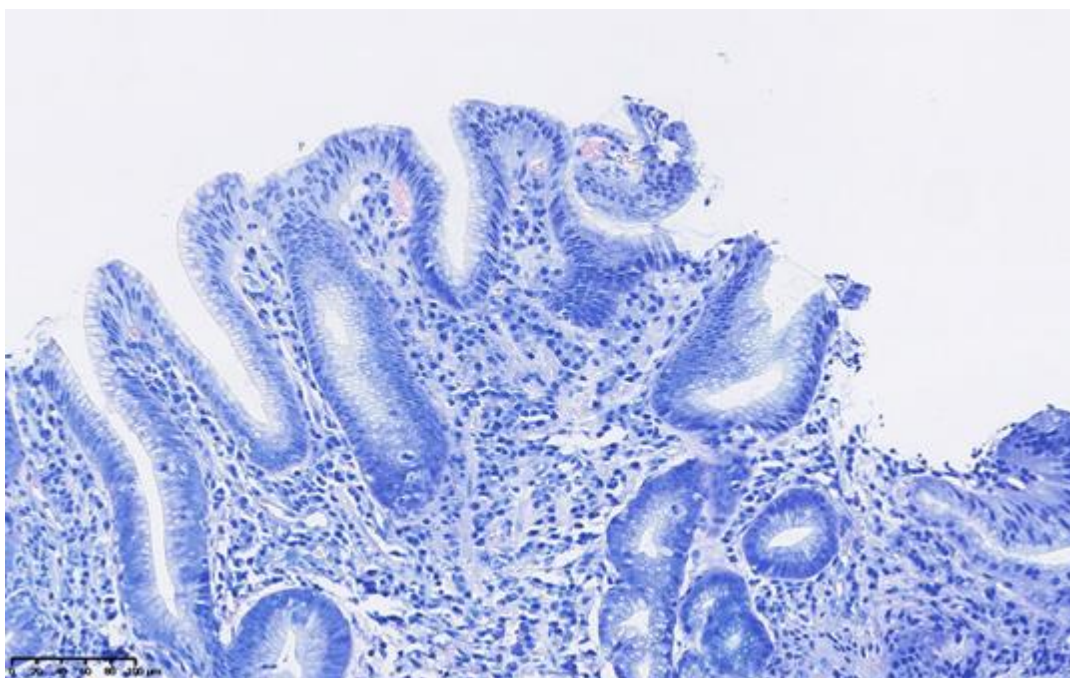


KUVA 22. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

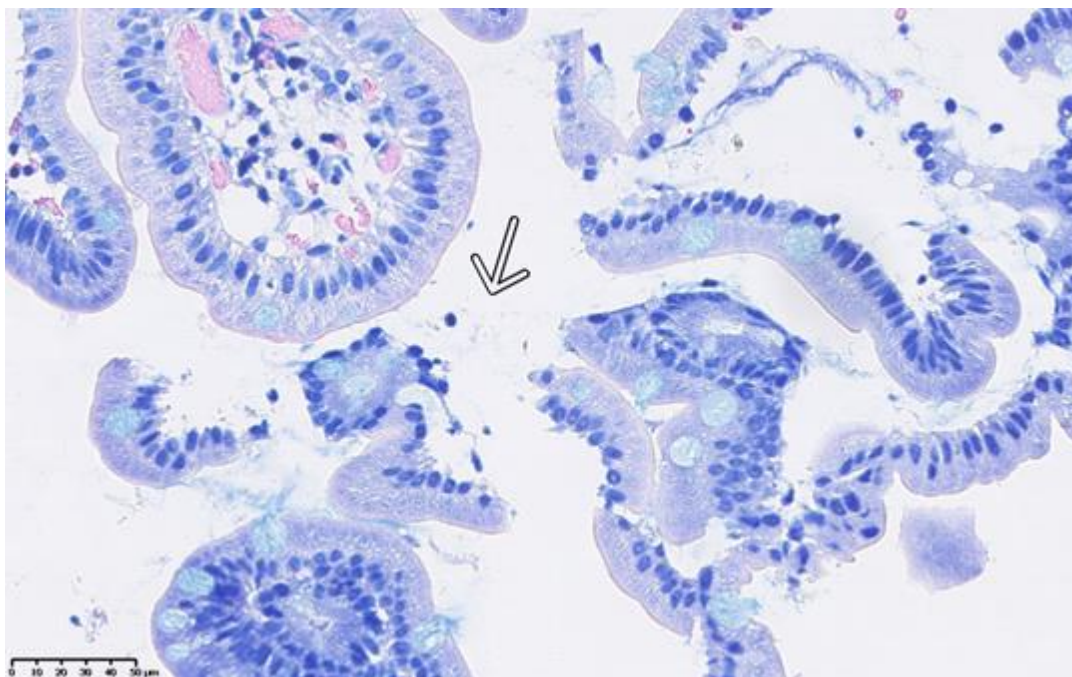


KUVA 23. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

B-värjäys oli toisella värjäyskierröksellä kaikkien mielestä vaaleahko. Rakenteet erottuivat, mutta ei niin selkeästi kuin olisi toivottu. Myös helikobakteerit värjäytyivät osittain liian vaaleiksi ja niitä oli vähällä haastava erottaa kudospäätteestä. Yksi arvioijista kuitenkin piti tästä värjäysohjelmasta kahta muuta arvioijaa enemmän. Hänen mielestään näytteen yleinen ja helikobakteereiden värjäytyvyys olivat kiitettävällä tasolla. Toisen värjäyskierroksen B-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereiden värjäytyvyyttä on havainnollistettu kuvissa 24 ja 25.

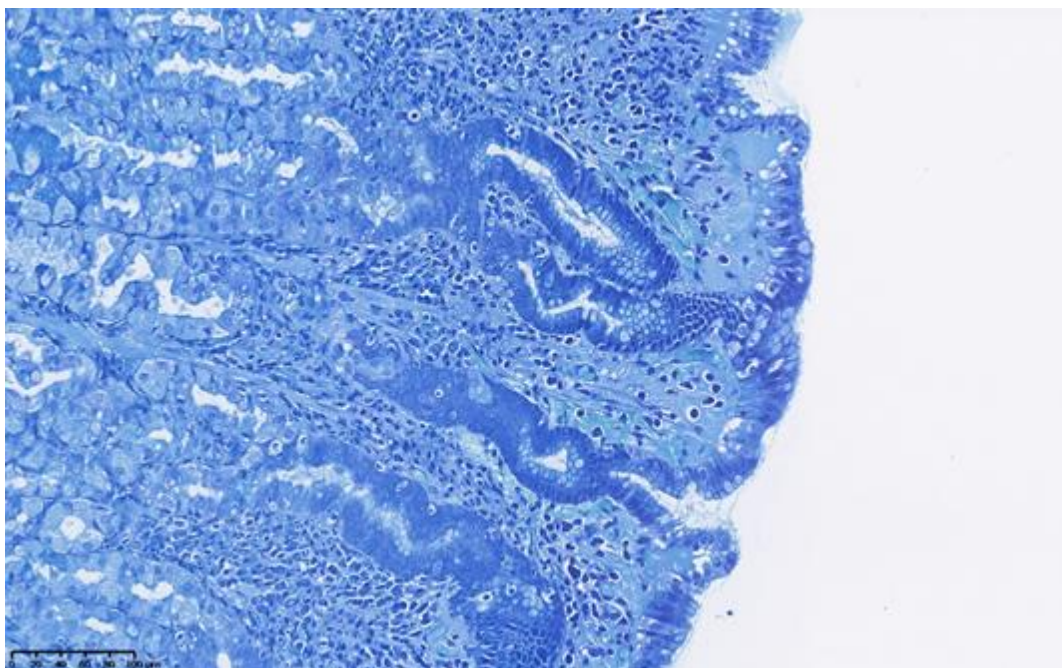


KUVA 24. Toisen värjäyskierroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

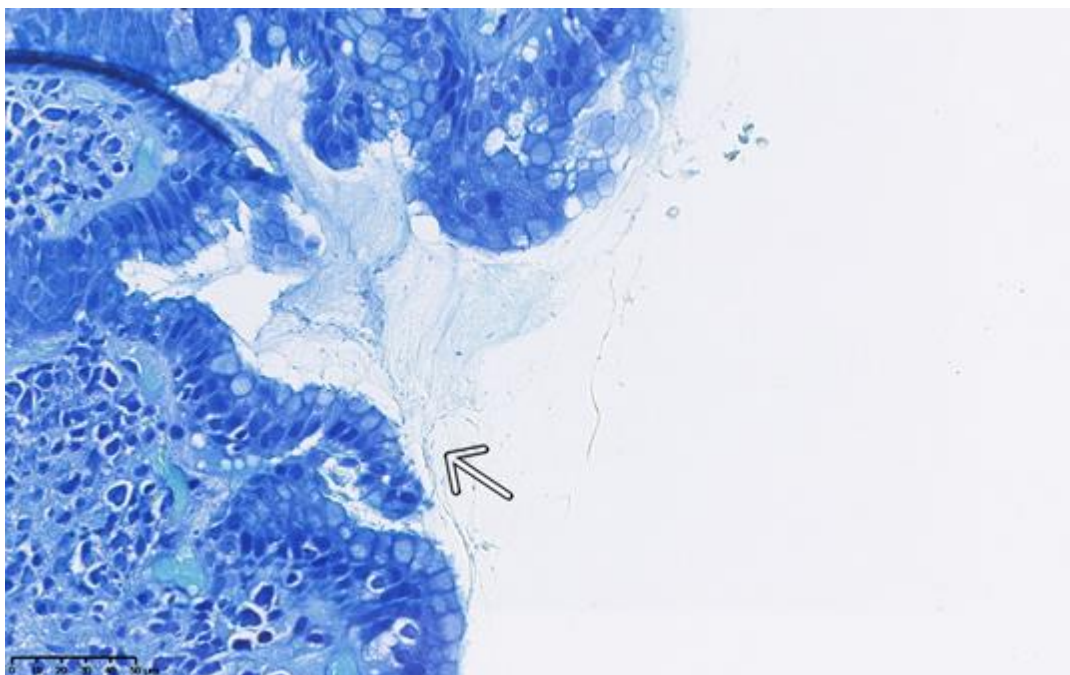


KUVA 25. Toisen värjäyskierroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

Toisella värjäyskierroksella C-värjäys ei ollut arvioijien mielestä yleisvaikutelmaltaan enää niin tumma kuin edellisellä värjäyskierroksella. Morfologia jäi jokseenkin tasapaksuksi ja kudosten eri rakenteet eivät tulleet esille selkeästi liian sinisen värjäytyvyyden vuoksi. Helikobakteerit erottuivat näytteestä hyvin. Kuvista 26 ja 27 voi nähdä toisen värjäyskierroksen C-värjäyksen yleisen rakenteen ja helikobakteerit.



KUVA 26. Toisen värjäyskierroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

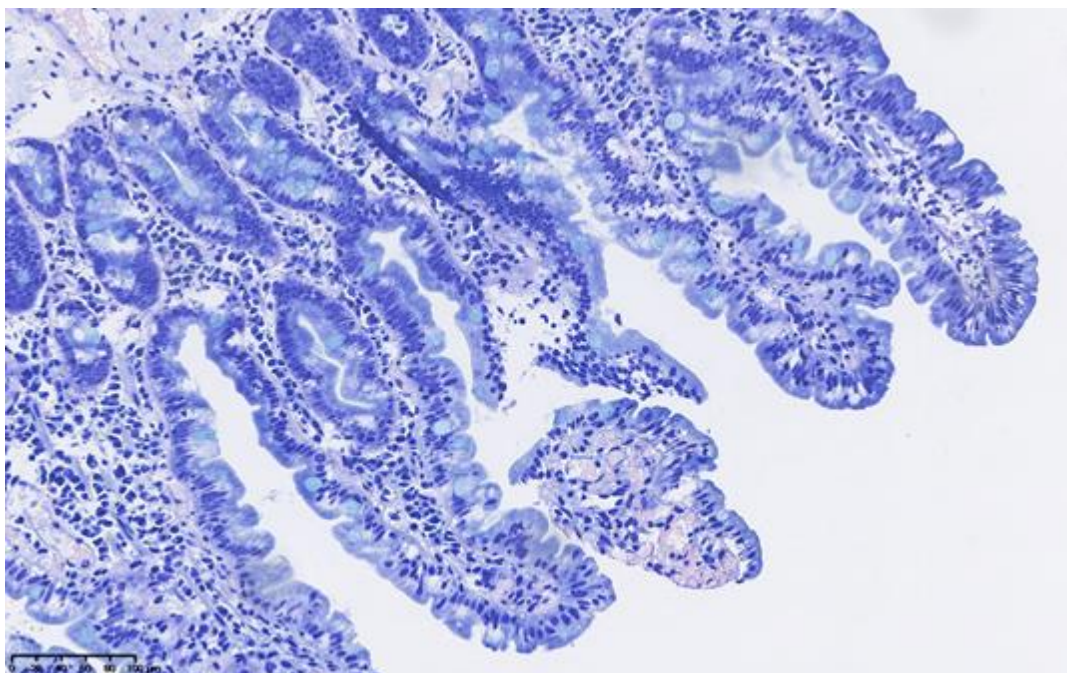


KUVA 27. Toisen värjäyskierroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

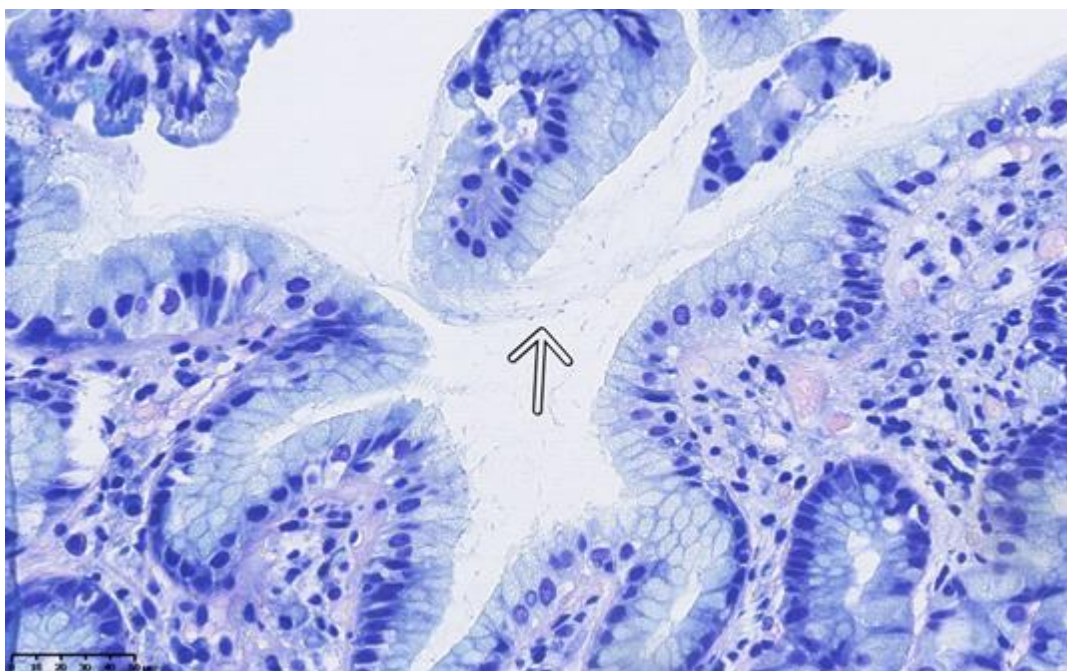
TAULUKKO 9. Kolmas värjäyskierros.

Värjäysohjelma	Arvioijien määrä	Arvioitavien näytelasien määrä	Arvioijien antamat yhteispisteet	Pisteytysten keskiarvo
A	3	1	14	4,7
B	3	1	12,5	4,2
C	3	1	10	3,3

Kolmannella värjäyskierroksella arvioijista kaksi oli sairaalasolubiologeja ja yksi patologi. A-värjäyksen yleisvaikutelma oli heidän mielestään hieman tumma ja Reagenan Giemsa-värjäysreagenssissa oli havaittavissa selkeä sävyero Merckin Giemsa-värjäysreagenssiin verrattuna. Helikobakteerit värjäytyivät melko hyvin. Kaikkien arvioijien mielestä Merckin Giemsa-värjäysreagenssi oli selkeästi Reagenaa parempi. Kuvissa 28 ja 29 on nähtävillä kolmannen värjäyskierroksen A-värjäyksen yleinen rakenne ja helikobakteereiden värjäytyvyys.

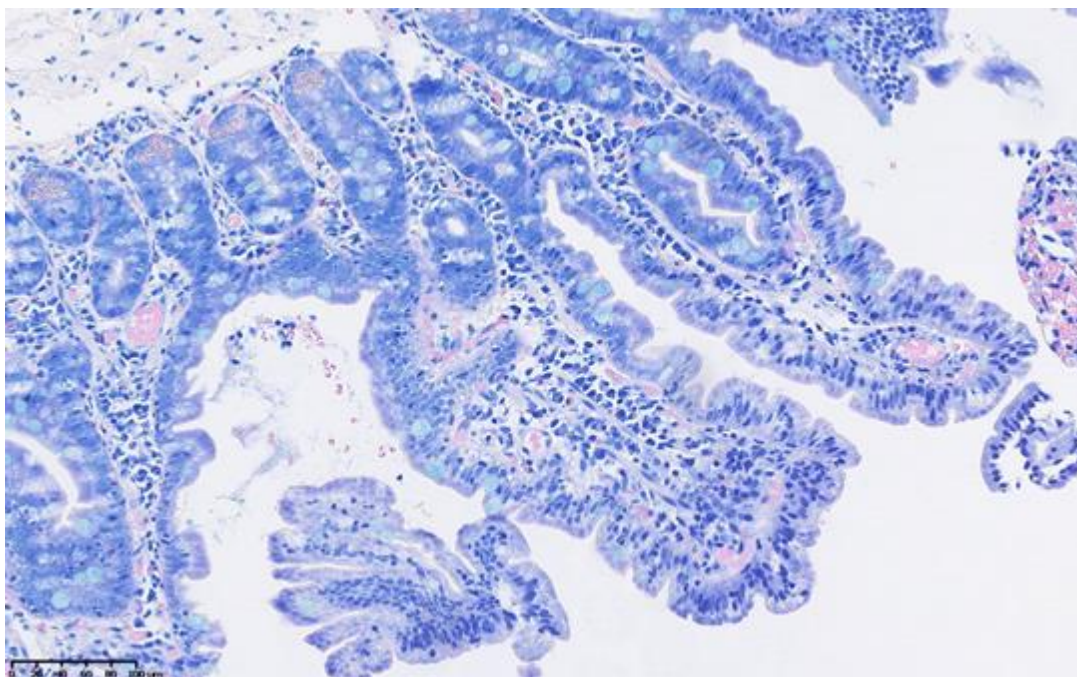


KUVA 28. Kolmannen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

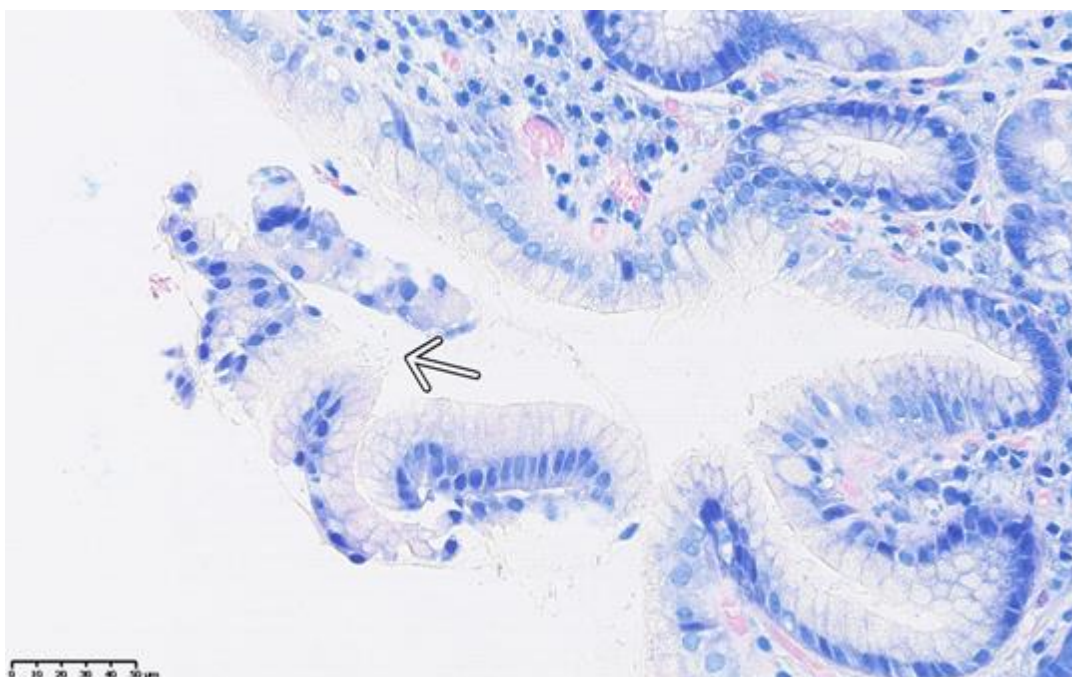


KUVA 29. Kolmannen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

B-värjäyksen yleinen värjäytyvyys jäi kolmannella värjäyskierröksellä arvioijien mielestä osittain liian vaaleaksi verrattuna A-värjäykseen. Morfologia oli kelvollinen, mutta helikobakteerit erottuivat näytteestä kehnosti vaalean värjäytyvyytensä vuoksi. Kuvissa 30 ja 31 on esitetty kolmannen värjäyskierroksen B-värjäyksen yleinen rakenne ja helikobakteerit.

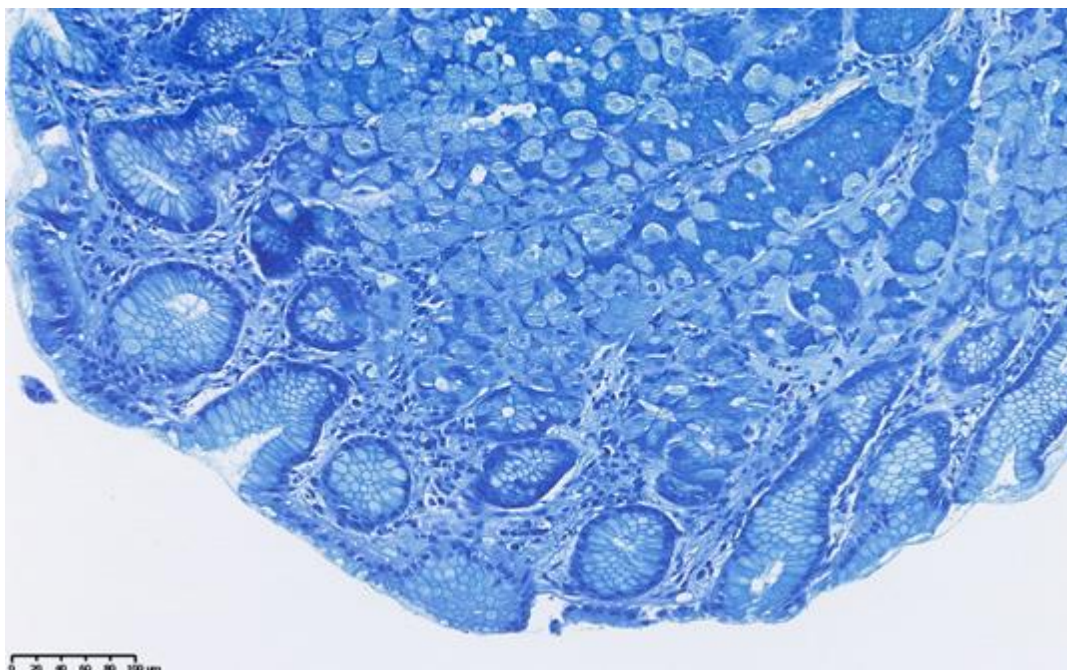


KUVA 30. Kolmannen värjäyskierroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

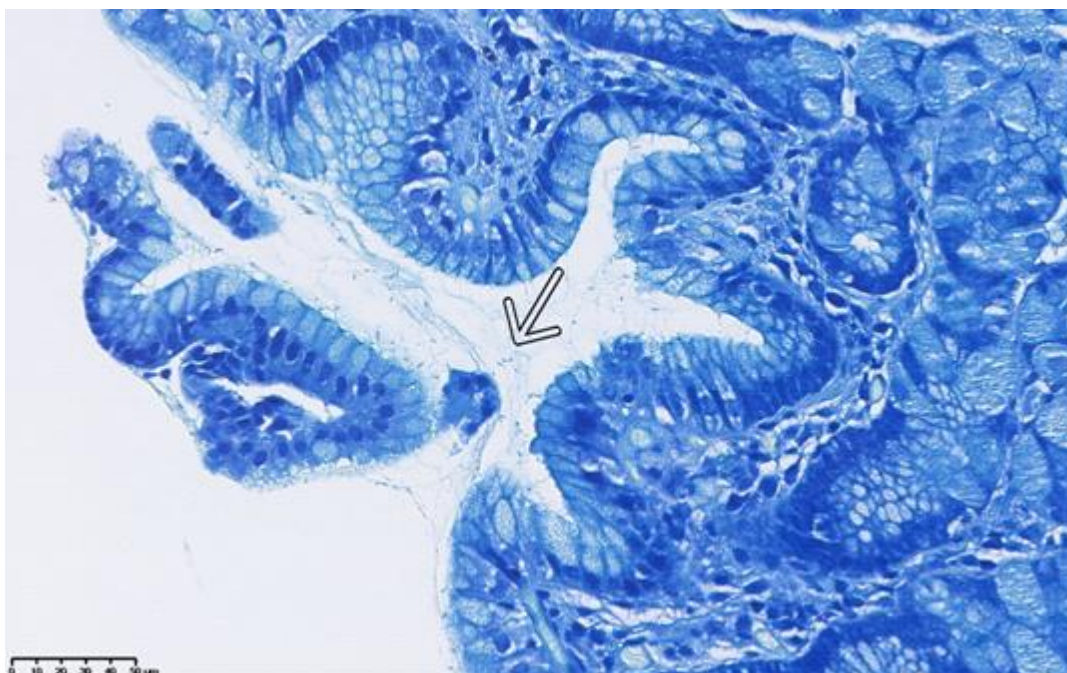


KUVA 31. Kolmannen värjäyskierroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäys oli edelleen arvioijien mielestä liian tumma ja yleisvaikutelma oli suttuisen oloinen. Kudosnäytteen eri rakenteita oli hankala erottaa toisistaan, koska rakenteet värjäytyivät niin tukkoon sinisyytensä vuoksi. Helikobakteerit näkyivät näytteestä erittäin hyvin jo 20-kertaisella suurennoksella. Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäyksen yleistä rakennetta ja helikobakteereiden värjäytyvyyttä on mahdollista tutkia kuvista 32 ja 33.



KUVA 32. Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)



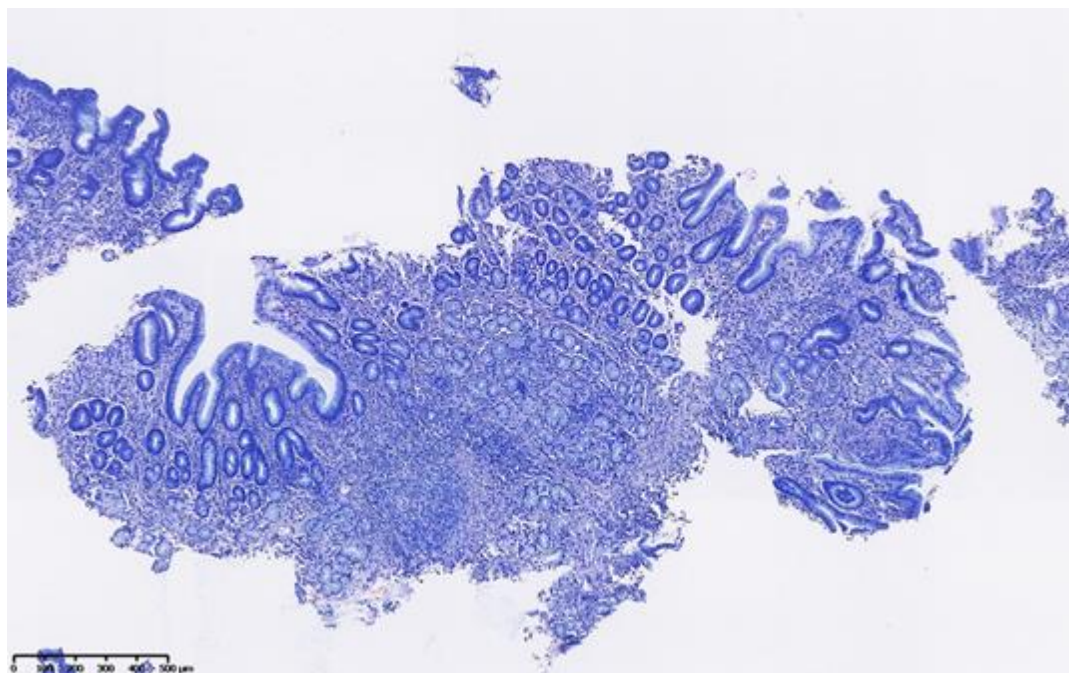
KUVA 33. Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

9.3 Parhaan värjäysohjelman valinta

Optimaalisimmaksi värjäysohjelmaksi valikoitui arvioijien kesken yksimielisesti toisen värjäyskierroksen A-värjäys. Kuvissa 34, 35 ja 36 olemme esitelleet parasta värjäysohjelmaa, joka sai arvioijilta parhaimman keskiarvon 5,7 asteikolla 0–6. Värjäys sai myös selkeästi parhaimman sanallisen arvion. Kaikki kolme arvioijaa olivat yksimielisesti sitä mieltä, että helikobakteerien värjäytyvyys oli erinomaisella tasolla (3+3+3). Kaksi arvioijista antoi näytteen yleisestä värjäytyvyydestä arvioksi erinomaisen ja yksi arvioi yleisen värjäytyvyyden hyvälle tasolle (3+3+2). Värjäys sai siis kokonaispis-

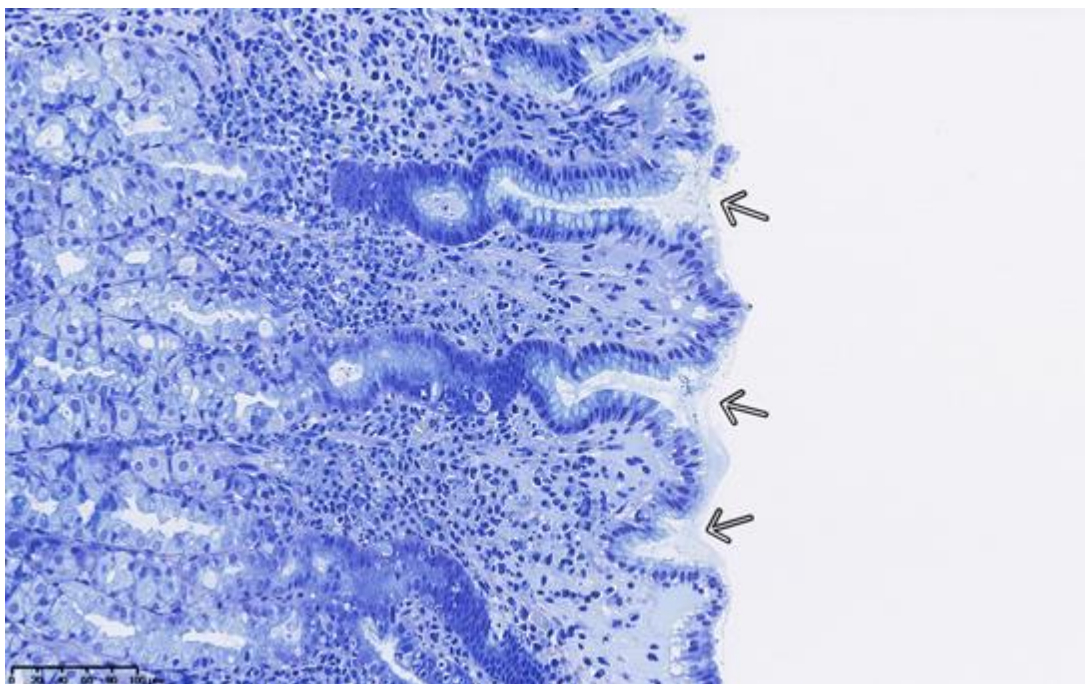
temääräksi 17, joista kolmen arvioijan kesken pisteytyksien keskiarvoksi muodostui 5,7. A-värjäys sai myös parhaan keskiarvon ensimmäisellä ja kolmannella värjäyskierroksella muihin värjäyksiin verrattuna. Ensimmäisellä värjäyskierroksella pisteytyksien keskiarvo A-värjäykselle oli 5 ja kolmannella värjäyskierroksella 4,7. Arvioijien subjektiivisen näkemyksen mukaan Merckin Giemsa-värjäysreagenssi oli parempi kuin Reagenan. Tähän vaikutti suurelta osin se, että arvioijat olivat tottuneet Merckin Giemsa-värjäysreagenssilla värjättyihin näytteisiin, joten värisävy on tutumpi kuin Reagenalla värjättyissä näytteissä.

Merckin Giemsa-värjäysreagenssilla tehty toisen värjäyskierroksen A-värjäys oli arvioijien mielestä optimaalisin, koska yleinen värjäytyvyys oli oppikirjamaisen hyvä ja morfologia oli selkeästi erotettavissa. Kudosnäytteen eri rakenteet värjäytyivät optimaalisesti ja ne eivät värjäytyneet liian voimakkaasti tehden näytteestä epäselvän näköisen. Yleistä morfologiaa tarkastellessa arvioijat tekivät yleissilmäyksen kudoksen ja solujen eri rakenteiden, kuten tuman ja sytoplasman värjäytyvyydestä.

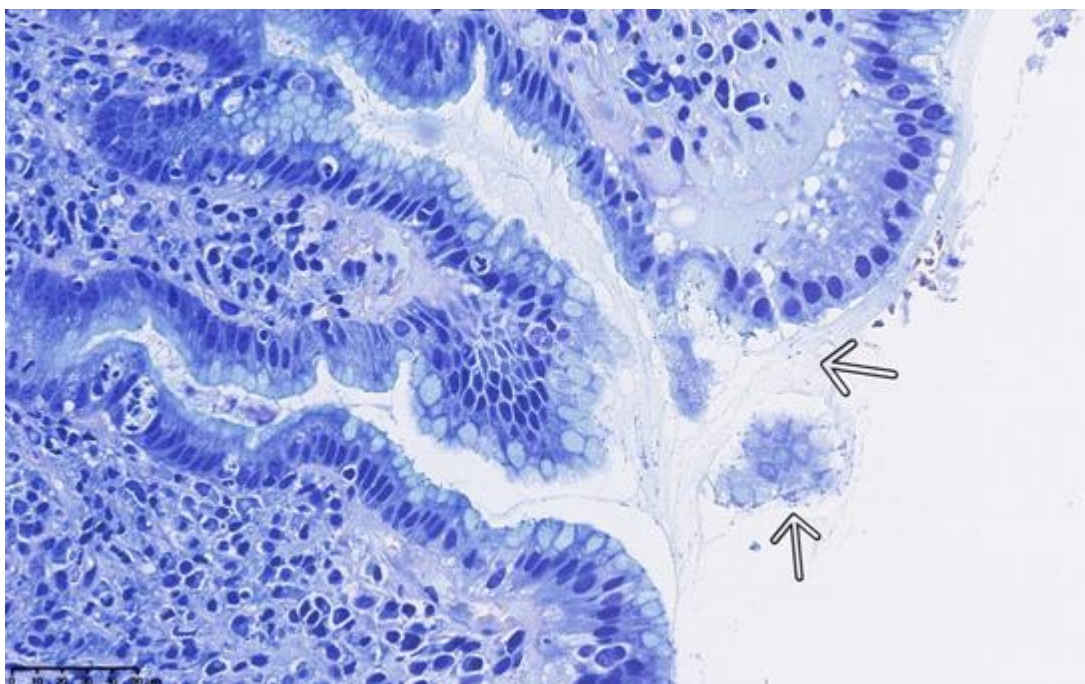


KUVA 34. Toisen värjäyskierroksen A-värjäys 5-kertaisella suurennoksella (Heikkinen ja Rutanen 2016-02-16.)

A-värjäyksessä helikobakteerit värjäytyivät arvioijien mielestä Merckin Giemsa-värjäysreagenssia käyttämällä optimaalisesti. Helikobakteerit värjäytyivät sinisiksi ja erottuivat kudosnäytteestä helposti jo 20-kertaisella suurennoksella. Koska helikobakteerit esiintyvät mahalaukun limakalvon pinnalla, mikroskopoitaessa niitä lähdetään etsimään yleensä kudosnäytteen reunoilta. 40-kertaisella suurennoksella helikobakteerit näkyivät näytteestä erityisen hyvin. Helikobakteerit tulivat esiin paremmin kuin alkuperäisessä Giemsa-värjäyksessä, joka johtui värjäysohjelmaan tehdyistä pienistä muutoksista.



KUVA 35. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 20-kertaisella suurennoksella (Heikinen ja Rutanen 2016-02-16.)



KUVA 36. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella (Heikinen ja Rutanen 2016-02-16.)

9.4 Värjäystulosten yhteenveto

Värjäyskierruksia toteuttiin yhteensä kolme. Ensimmäisellä värjäyskierröksellä lähdimme liikkeelle neljällä värjäysvariaatiolla, joista A-värjäys oli patologian yksikön alkuperäinen värjäysohjelma. Toisella värjäyskierröksellä jätimme yhden värjäysvariaatioista pois ja teimme kolmeen muuhun pieniä muutoksia. Kolmannen värjäyskierroksen teimme samoilla ohjeilla kuin toisen värjäyskierroksen, mutta Merckin sijasta käytimme Reagenan Giemsa-värjäysreagenssia.

Kaikilla värjäyskierroksilla A-värjäys sai arvioijilta parhaimman pisteytyksien keskiarvon asteikolla 0–6. Lisäksi A-värjäys sai selkeästi parhaimmat sanalliset arviot. Ensimmäisellä värjäyskierroksella D-värjäys sai selkeästi huonoimman pisteytyksien keskiarvon muihin värjäyksiin verrattuna, minkä takia päätimme pudottaa sen pois seuraavilta värjäyskierroksilta. D-värjäys oli yleisvaikutelmaltaan aivan liian vaalea eivätkä kudusrakenteet ja helikobakteerit erottuneet näytteestä hyvin. Alkuperäisessä A-värjäyksessä helikobakteerit värjäytyivät liian vaaleiksi, kun taas B- ja C-värjäyksissä yleinen värjäytyvyys oli todella tumma, mutta helikobakteerit näkyivät hyvin. Värjäyksiin tehtyjen pienten muutosten jälkeen jokaisen värjäyksen yleiskuva parani seuraavilla värjäyskierroksilla ja varsinkin A-värjäyksessä helikobakteerien värjäytyminen parani huomattavasti. Ensimmäisellä ja toisella värjäyskierroksella B- ja C-värjäykset olivat pisteytyksien keskiarvoiltaan keskenään hyvin tasavertaisia, mutta kolmannella värjäyskierroksella B-värjäys sai paremman keskiarvon kuin C-värjäys. A-värjäyksen pisteytyksien keskiarvo parani toisella värjäyskierroksella värjäykseen tehtyjen muutosten jälkeen.

Arvioijien subjektiivisen näkemyksen mukaan he pitivät enemmän Merckin Giemsa-värjäysreagenssin sävyistä kuin Reagenan. Reagena värjäsi heidän mielestään kudoksen rakenteet ja helikobakteerit hieman voimakkaammin Merckiin verrattuna. Patologit ja sairaalasolubiologit olivat tottuneet tarkastelemaan Merckin Giemsa-värjäysreagenssilla värjättyjä näytteitä, mikä saattoi osaltaan vaikuttaa saatuihin pisteytyksiin ja sanalliseen arvioon. Arvioijien subjektiivinen näkemys ja tottumus vaikuttivat ehkä myös osaltaan siihen, että he pitivät enemmän A-värjäyksestä. Reagenalla olisi varmasti mahdollista saada aikaan hyviä värjäystuloksia, mutta se vaatisi lisää optimointia sekä Giemsa-pitoisuuden ja vaikutusaikojen testaamista. Lisäksi Reagena olisi edullisempi vaihtoehto kuin Merck.

Optimaalisimman A-värjäyksen käyttöönottoaminen nykyisellä värjäysautomaatilla tulee jäämään patologian yksikön vastuulle. Patologian yksikkö siirtää optimoidun värjäysohjelman värjäysautomaatille ja värjää ohjelmalla isomman erän valittuja gastroskopianäytteitä, joissa tiedetään olevan helikobakteereita. Isompi erä voi sisältää esimerkiksi kymmenen jo diagnosoitua gastroskopianäytettä ja sen avulla pyritään todistamaan, että uusi värjäysohjelma toimii entistä ohjelmaa paremmin värjäysautomaatilla.

10 TUTKIMUKSEN ONNISTUMINEN JA LUOTETTAVUUS

Opinnäytetyön tutkimusosuudesta saatujen tulosten tulee olla luotettavia, oikeita ja uskottavia. Yksi opinnäytetyön onnistumisen mittareista on luotettavuus, joka mittaa myös työn laatua. Luotettavuus rakentuu kahdesta käsitteestä, reliabiliteetistä ja validiteetista. Reliabiliteetillä tarkoitetaan tutkimustulosten pysyvyyttä ja validiteetilla oikeiden asioiden tutkimista. Luotettavuus perustuu yleensä siihen, miten tutkimusprosessin eri vaiheita ja tuloksia dokumentoidaan. Sen avulla on tarkoitus osoittaa, mitä ja miten on toimittu. Kun opinnäytetyö on kirjoitettu, ei työn luotettavuutta voida oikeastaan enää parantaa. Vääriä johtopäätöksiä on kuitenkin mahdollista vielä korjata. Jälkikäteen voidaan vain todeta, kuinka luotettavia tutkimustuloksia kyseisessä työssä saatiin. (Kananen 2012, 161–162.) Opinnäytetyössämme yhdistyivät toiminnallisuus ja kehittämistyö. Meillä oli työssämme kohde, jota halusimme kehittää. Opinnäytetyömme onnistumiseen vaikutti oma mielenkiintomme aiheetta kohtaan ja saamamme asiantunteva ohjaus. Yksi onnistumiseen vaikuttava tekijä oli myös se, että koko opinnäytetyöprosessi sujui vaivattomasti ja ilman suurempia ongelmia.

Laadimme kehittämistyötämme varten kyselylomakkeen, jossa oli sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia piirteitä. Aineistonkeruumenetelmä oli meillä siis osittain kvantitatiivinen ja osittain kvalitatiivinen. Kvantitatiivisen kyselylomakkeesta teki arvioijilta pyytämämme pisteytys yleisestä ja helikobakteereiden värjäytyvyydestä. Vapaan sanallisen arvion antamisen mahdollisuus teki kyselylomakkeesta myös osittain kvalitatiivisen. Pisteytys oli mielestämme hyvä ja selkeä tapa arvioida, mikä värjäyksestä oli paras. Arvioijien antamista pisteytyksistä pystyi laskemaan keskiarvon asteikolla 0-6, minkä avulla värjäykset oli helppo laittaa paremmuusjärjestykseen. Tärkeää oli mielestämme myös se, että arvioijilla oli mahdollisuus antaa värjäyksestä sanallinen arvio. Tämä toi arvokasta lisäinformaatiota värjäysten onnistumisesta pisteytysten rinnalle. Diagnoosivaiheessa patologit tarkastelevat gastroskopianäytteistä helikobakteereiden lisäksi myös kudoksenäytteen yleistä rakennetta. Kyselylomakkeessa arvioinnin kohteita oli siis kaksi, joiden pisteytyksistä muodostui arvioijan antama kokonaispistemäärä ja joista muodostui värjäyksen keskiarvo.

Yksi tärkeä opinnäytetyömme luotettavuuteen vaikuttava tekijä oli arvioijien subjektiivinen näkökulma. Kyselylomakkeen täyttäneillä patologeilla ja sairaalalubiologeilla oli kaikilla oma subjektiivinen mielipide värjäysten onnistumisesta ja mieltymys siitä, millaisia värjäysten tulisi olla. Tähän vaikutti suurelta osin myös arvioijien tottumus tietynlaisiin värjäyksiin. Ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäys oli patologian yksikön oma alkuperäinen värjäysohjelma. A-värjäys sai parhaan pisteytysten keskiarvon ja sanallisen arvion kaikilla värjäyskierröksillä. Merckin Giemsa-värjäysreagenssi on ollut pitkään patologian yksiköllä käytössä Giemsa-värjäyksissä ja myös se miellytti arvioijia Reagenan Giemsa-värjäysreagenssia enemmän. Molempiin edellä mainittuihin vaikutti siis hyvin pitkälti se, että arvioijat ovat tottuneet ja mieltyneet alkuperäiseen värjäysohjelmaan ja Merckin Giemsa-värjäysreagenssiin.

Opinnäytetyömme luotettavuuskriteereihin kuului myös arvioijilta vaadittava riittävä osaaminen, pätevyys ja akateeminen koulutus. Laboratoriohoitajalla tai bioanalytikolla ei ole ammattinsa puolesta valmiuksia tutkia gastroskopianäytteiden morfologiaa tai tehdä siitä diagnooseja esimerkiksi heliko-

bakteereita koskien. Tästä syystä meidän oli pyydettyä värjäyksien arvioijiksi patologeja ja sairaalalubiologeja, joilla on pidempi akateeminen koulutus ja valmiudet tarkastella näytteitä. Lisäksi patologeilla on vaadittava diagnostinen osaaminen.

Mielestämme opinnäytetyö oli luotettavuuden näkökulmasta onnistunut. Saimme toteuttaa opinnäytetyön työosuuden patologian yksikössä ja käyttää oikeita toimitiloja ja välineitä. Koko opinnäytetyöprosessin ajan saimme asiantuntevaa ohjausta ja palautetta sairaalalubiologilta ja muulta patologian yksikön henkilökunnalta. Lähtökohtana toimineet alkuperäinen Giemsa-värjäys ja kolme muuta värjäysvariaatiota olivat keskenään melko erilaisia, joten laajuutensa puolesta niillä oli hyvä lähteä liikkeelle optimoimaan Giemsa-värjäystä helikobakteereiden toteamisessa gastroskopianäytteistä. Kyselylomake ja pisteytykset toimivat värjäysten arvioinnissa mielestämme hyvin ja koimme tämän aineistonkeruumenetelmän luotettavaksi. Saimme arvioijilta heidän subjektiivisen mielipiteensä värjäyksistä ja niiden onnistumisesta.

Koko opinnäytetyöprosessi ja käytännön työosuus sujuivat hyvin ja ongelmitta, mikä lisäsi myös osaltaan opinnäytetyömme luotettavuutta ja onnistumista. Aina on kuitenkin mahdollista parantaa opinnäytetyön luotettavuutta ja onnistumista. Mikäli arvioijia olisi ollut jokaisella värjäyskierroksella enemmän, olisimme saaneet suuremman otoskoon ja näin ollen luotettavammat tulokset. Värjäyskierroksia varten olisi voitu valita useampia eri potilasnäytteitä, jolloin värjäyskierroksilla olisi ollut enemmän vertailuvaraa eri värjäysten ja gastroskopianäytteiden kesken. Vaikka saimme kaikilta arvioijilta pisteytykset ja sanalliset arviot värjäyksistä, olisimme ehkä toivoneet sanallista palautetta vielä hieman enemmän. Myös tämä olisi lisännyt luotettavuutta entisestään.

11 POHDINTA

Arvioimme opinnäytetyömme onnistumista ja omaa oppimistamme SWOT-analyysin eli nelikenttä-analyysin muodossa. SWOT-analyysi rakentuu vahvuuksista (Strengths), heikkouksista (Weaknesses), mahdollisuuksista (Opportunities) ja uhista (Threats). Vahvuudet ja heikkoudet ovat sisäisiä tekijöitä, kun taas mahdollisuudet ja uhat ulkoisia tekijöitä. (Opetushallitus 2016.) Opinnäytetyöhömmme liittyy erilaisia sisäisiä tekijöitä vahvuuksien ja heikkouksien muodossa. Yksi vahvuuksista on ehdottomasti se, että saimme aiheen suoraan työelämästä ja se on tilaajalle todella tarpeellinen. Kiinnostuksemme kliinistä patologiaa kohtaan on myös vahvuus, koska se on lisännyt mielenkiintoa ja motivaatiota opinnäytetyötä tehdessä. Asiantunteva ohjaus tilaajan ja koulun taholta on ollut myös yksi vahvuuksistamme. Yksi heikkouksistamme on vähäinen kokemuksemme kliinisestä patologiasta, mutta toisaalta opinnäytetyö on mahdollistanut tietotaitomme kehittymisen. Toinen heikkous opinnäytetyössämme on ollut välillä aiheesta riippuen vähäinen lähdemateriaalin löytyminen. Esimerkiksi helikobakteereista löysimme yllättävän vähän tuoretta teoriaan pohjautuvaa materiaalia.

Opinnäytetyömme ulkoisia tekijöitä on helppo arvioida mahdollisuuksien ja uhkien näkökulmasta. Tilaaajan on opinnäytetyön kautta mahdollista saada optimoitu värjäysmenetelmä. Myös patologian erikoisalana on mahdollista saada uutta tietoa Giemsa-värjäyksen eri variaatioista. Opinnäytetyössämme on katsaus digitaaliseen patologiaan, joka on patologian alan nykypäivää ja tulee lisääntymään varmasti tulevaisuudessa vielä entisestään. Opinnäytetyömme kannalta suurin uhka on, että uusi optimoitu värjäysohjelma ei toimikaan toivotusti nykyisellä värjäysautomaatilla.

Terveydenhuollolla on olemassa yhteiset eettiset periaatteet. Potilaalla on oikeus hyvään hoitoon ja hänen ihmisarvoaan sekä itsemääräämisoikeuttaan tulee kunnioittaa. Kaikilla on oikeus luotettaviin terveystalouteihin sisältäen laboratoriopalvelut sekä henkilökunnan asiantuntevan ammattitaidon. Terveydenhuollon henkilökunta toimii potilaan hoidossa moniammatillisessa yhteistyössä ja kunnioittaa toistensa ammattitaitoa. Bioanalytikolle kuuluvia eettisiä periaatteita ovat velvollisuudet potilaalle, ammattikunnalle ja yhteiskunnalle. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006.) Opinnäytetyöhömmme liittyy eettisiä kysymyksiä. Värjäykseen käyttämämme gastrokopianäytteet olivat jo diagnosoituja potilasnäytteitä, joten emme omalla toiminnallamme vaikuttaneet potilasnäytteiden diagnosointiin ja tätä kautta potilasturvallisuuteen. Potilasnäytteet pysyvät koko prosessin ajan meille anonyymeinä, joten potilaiden tietosuoja pysyi salassa. Opinnäytetyömme hyödynsaajia ovat meidän lisäksi patologian yksikkö, sairaala, potilaat ja toisaalta myös koko yhteiskunta. Patologian yksikkö saa käyttöönsä uuden optimoidun Giemsa-värjäyksen helikobakteereille, mikä parantaa diagnoosin luotettavuutta ja onnistumista. Parhaimmillaan tällöin vältytään turhilta lääkärikäynneiltä ja sillä ei rasiteta yhteiskuntaa taloudellisesti liikaa.

Valitsimme tämän aiheen opinnäytetyöksi, koska patologia kiinnostaa meitä molempia erikoisalana ja halusimme kehittää omia kädentaitojamme käytännön työssä. Halusimme, että aihe on käytännönläheinen ja suoraan työelämästä. Työn tarpeellisuus myös motivoi meitä valitsemaan juuri tämän aiheen opinnäytetyöksi. Opinnäytetyön aihe oli paras toteuttaa toiminnallisena kehittämistyönä, koska työssä ei toteutettu uutta tutkimustietoa, vaan haluttiin parantaa ja kehittää vanhaa käytössä

olevaa tietoa ja menetelmää. Työtä ei voinut toteuttaa pelkkänä kirjallisuuskatsauksena, vaan se vaati käytännön toteutusta. Tämän vuoksi yhdistimme toiminnallisen osuuden kehittämistyöhön. Aineistonkeruumenetelmäksi valitsimme osittain kvantitatiivisen ja osittain kvalitatiivisen kyselylomakkeen. Yhdistimme opinnäytetyön kirjallisessa osuudessa teorian ja käytännön. Halusimme tuoda aiheesta esille ensin teoriaan pohjautuvaa tietoa ja sitten yhdistää teorian omaan työosuuteemme. Käytännön työosuutta havainnollistimme kuvilla ja tarkalla dokumentoinnilla. Erityisesti tulosten tarkastelussa halusimme esittää lukijalle kuvia värjäämistämme näytelaseista aivan kuin lukija itse voisi tarkastella niitä mikroskoopissa. Kuvat auttavat lukijaa ymmärtämään arvioijilta värjäyksistä saatua palautetta ja pisteytyksiä. Esimerkiksi myös histologinen prosessi on helpompi hahmottaa kuvien avulla.

Yhteistyö opinnäytetyön tilaajan kanssa sujui koko opinnäytetyöprosessin ajan hyvin. Saimme asiantuntevaa ohjausta ja apua meitä ohjanneelta sairaalasolubiologilta ja koko patologian yksikön henkilökunnalta. Pyysimme ja saimme säännöllisin väliajoin palautetta opinnäytetyöstämme ja hyviä vinkkejä, kuinka sitä voisi kehittää. Laadimme opinnäytetyöprosessin alussa aikataulun, jossa pysyimme pääosin hyvin. Työosuuden aikataulujen yhteensovittaminen sujui vaivattomasti tilaajan kanssa. Ainoastaan kaksi viimeistä työpäivää venähtivät suunniteltua pidemmälle patologian yksikön alkuvuoden kiireiden ja lasiskannerin myöhäisen käyttöönoton vuoksi. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut mitenkään työmme lopputulokseen ja pysyimme aikataulussa siitä huolimatta. Opinnäytetyön tekeminen oli aikaavievä prosessi, joka vaati ajankäytön suunnittelua ja motivoitunutta asennetta. Saimme keskenämme helposti sovittua aikataulut yhteen ja järjestettyä riittävästi aikaa opinnäytetyön kirjoittamiseen.

Opinnäytetyön tekeminen on tuntunut isolta loppuharppaukselta ammattikorkeakouluopinnoissa. Sen tekeminen on ollut työlästä ja aikaavievää, mutta toisaalta myös erittäin antoisaa. Olemme oppineet paljon uutta aiheeseen liittyen ja kädentaitomme ovat kehittyneet selvästi. Motivaatiotamme on lisännyt opinnäytetyön tekemisen sopiva tauotus. Ammatillinen ajattelumme on kehittynyt suuresti opinnäytetyön myötä. Olemme oppineet arvioimaan menetelmien luotettavuutta ja eettinen ajattelu on kehittynyt. Toisaalta olemme myös oppineet ajattelemaan kriittisemmin kuin esimerkiksi opintojen alkuvaiheessa. Valitsimme opinnäytetyötä varten erilaisia lähteitä. Lähdemateriaali oli suurilta osin alan kirjallisuutta ja artikkeleja. Iso osa lähdemateriaaleista oli kansainvälisiä, koska aiheestamme löytyi niin vähän tietoa suomenkielellä. Hankimme lähdemateriaalia Savonia-ammattikorkeakoulun kirjaston ja tiedonhakuportaalien välityksellä sekä Kuopion yliopistollisen sairaalan, Itä-Suomen yliopiston ja Kuopion kaupunginkirjastoista. Noudatimme lähteiden valinnassa lähdekriittisyyttä ja pyrimme siihen, että käyttämämme lähteet olivat luotettavia ja mahdollisimman tuoreita.

Toivomme, että optimoimamme Giemsa-värjäyksen variaatio toimii nykyisellä värjäysautomaatilla ja jää käyttöön patologian yksikössä. Odotuksena on myös, että helikobakteerit löytyvät tulevaisuudessa gastrokopianäytteistä optimoitua värjäystä käyttämällä entistä helpommin. Mahdollinen jatkotutkimuksen aihe opinnäytetyöllemme voisi olla Reagenan Giemsa-värjäysreagenssin optimointi gastro-

skopianäytteille helikobakteeriepäilyissä. Reagenan värjäysreagenssi on edullisempi kuin Merckin värjäysreagenssi, joten se voisi optimoituna olla kustannusvaikuttavampi.

LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT

BANCROFT, J. D. ja LAYTON, C. 2013. Microtomy: Paraffin and frozen. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.painos. Elsevier limited.

BANCROFT, J. D. ja LAYTON, C. 2013. The hematoxylin and eosin. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.painos. Elsevier limited.

BANCROFT, J. D. ja SPENCER, L. T. 2013. Tissue processing. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.painos. Elsevier limited.

BARCIA, J. J. 2007. The Giemsa Stain: Its History and Applications. International Journal of Surgical Pathology. July 2007, Vol. 15, Issue 3. [Viitattu 2016-01-08.]

BARTLETT J. H. 2013. Microorganisms. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.painos. Elsevier limited.

CHANDAK, T., CHAUDHARY, M. ja CHANDAK, V. 2012. Microtomy: Microtome and its applications. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing.

COOK, D. J. ja PALLISTER, C. J. 1998. Biomedical Sciences Explained. Cellular Pathology. Oxford: Butterworth-Heinemann.

DANIEL, C., MACARY, F., ROJO, M. G., KLOSSA, J., LAURINAVIČIUS, A., BECKWITH, B. A. ja MEA, V. D. 2010. Recent advances in standards for collaborative Digital Anatomic Pathology. The 10th European Congress on Telepathology and 4th International Congress on Virtual Microscopy Vilnius, Lithuania. 1 – 3 July 2010. [Viitattu 2016-01-06.]

FIMLAB LABORATORIOT OY 2012. Gastroskopianäytteiden histologinen tutkimus. Ammatilliselle. Ohjekirja. Tutkimusluettelo. [Viitattu 2015-09-21.] Saatavissa: http://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6573;id=9149

FIMLAB LABORATORIOT OY 2013. Kudosnäytteen histologinen tutkimus, 1-3 eriteltyä pientä näytettä, samaan kokonaisuuteen kuuluvia. Ohjekirja. Tutkimusluettelo. [Viitattu 2015-11-04.] Saatavissa: http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6764;id=10903

FIMLAB LABORATORIOT OY 2012. Kudosnäytteen histologinen tutkimus, 4 tai useampia eriteltyjä pieniä näytteitä. Ohjekirja. Tutkimusluettelo. [Viitattu 2015-11-04.] Saatavissa: http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6589;id=8463

FIMLAB LABORATORIO OY 2013. Kudosnäytteen histologinen tutkimus, laaja leikkauspreparaatti. Ohjekirja. Tutkimusluettelo. [Viitattu 2015-11-04.] Saatavissa:
http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6587;id=10403

FIMLAB LABORATORIOT OY 2013. Kudosnäytteen histologinen tutkimus, suppea leikkauspreparaatti. Ohjekirja. Tutkimusluettelo. [Viitattu 2015-11-04.] Saatavissa:
http://www.laboratorio.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6628;id=10908

FRIMAN, M. 2016-02-16. Sairaalasolubiologi. [Haastattelu] Jyväskylä: KSSH. P.

FÄRKKILÄ, M., ISONIEMI, H., KAUKINEN, K. ja PUOLAKKAINEN, P. (toim.) 2013. Gastroenterologia ja hepatologia. 2., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

HAMAMATSU 2014. High-speed, high-resolution digital slide scanner with network features NanoZoomer series. [Viitattu 2015-01-08.] Saatavissa:
http://www.hamamatsu.com/resources/pdf/sys/SBIS0043E_NanoZoomers.pdf

HAMAMATSU 2014. NanoZoomer-XR Digital slide scanner C12000. All products. Search by product categories. Measurement/Analysis systems. Digital slide scanners. [Viitattu 2015-01-08.] Saatavissa:
<http://www.hamamatsu.com/jp/en/C12000.html>

HEIKKILÄ, R., HELLSTÉN, S., KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P., KURKINEN, T., MEURMAN, O., NUMMELIN, R., PASTILA, S., RICHARDSON, M. ja YLÖNEN, H. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Suomen Kuntaliitto.

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2015. Blokkien leikkaaminen vesiliukumikrotomilla [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen D-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Ensimmäisen värjäyskierroksen D-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Hamamatsu NanoZoomer-XR -lasiskanneri KSSH:n patologian yksikössä [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Kolmannen värjäyskierroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2015. Leica CV5030 -päällystysautomaatti ja Leica ST5020 -värjäysautomaatti [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2015. Leikkeiden poimiminen näytelasille [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2015. Näytteiden valu parafiniin [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2015. Pienten näytteiden esikäsittely [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Skannattu gastroskopianäyte 0,7-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen A-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen A-värjäys 5-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen B-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen B-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen C-värjäyksen helikobakteerit 40-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

HEIKKINEN, J. ja RUTANEN, H. 2016. Toisen värjäyskierroksen C-värjäyksen morfologia 20-kertaisella suurennoksella [valokuva.]

JALAVA, J. 2010. Ihmisen normaali mikrobisto ja sen merkitys. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. (toim) 2010. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.

KANANEN, J. 2012. Kehittämistutkimus opinnäytetyönä. Kehittämistutkimuksen kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

KANANEN, J. 2014. Toimintatutkimus kehittämistutkimuksen muotona. Miten kirjoitan toimintatutkimuksen opinnäytetyönä? Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

KARTTUNEN, T., SOINI, Y. ja VUOPALA, K. 2005. Tautioppi. 1. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

KARTTUNEN, T. 2012. Helikobakteerigastriitti. Terveysportti. [Viitattu 2015-10-12.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia.fi/dtk/oppi/avaa?p_artikkeli=pat00425&p_haku=giemsa

KARTTUNEN, T. 2012. Helikobakteereita kudoksenäytteessä. Patologia-kuvat. Terveysportti. [Viitattu 2016-02-04.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=pat00425&p_haku=giemsa

KATILA, M. 2004. Tavallisimmat menetelmät bakteriologian, mykologian ja parasitologian tutkimuksissa. Julkaisussa: PENTTILÄ, I. (toim.) 2004. Kliinisen laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY.

KIERNAN, J. A. 2008. Histological and Histochemical methods. Theory and Practice. 4. painos. Oxfordshire: Scion Publishing Limited.

KSSH 2013. Gastroskopianäytteiden histologinen tutkimus 4043 Ts-PADGast. Tutkimusohje. Patologia. [Viitattu 2015-12-02.]

KSSH 2013. Patologia. GIEMSA (JUNG). 6. Värjäyksen suoritus. Ohjekirja. [Viitattu 2015-11-17.]

KUNNAMMO, I. 2009. Gastroskopia. Lääkärin käsikirja. Terveysportti. [Viitattu 2016-01-05.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00227&p_haku=gastroskopia

LEICA MICROSYSTEMS 2009. Leica ST 5020 Multistainer. Käyttöä koskevat ohjeet. [Viitattu 2016-01-06.] Saatavissa: http://www.mikrol.ru/fileadmin/downloads/Leica%20ST5020/User%20Manuals/Leica_ST5020_Manual_1v7_fi.pdf

MOON, A. M. 2013. Mounting media and slide coatings. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7. painos. Elsevier limited.

MUSTAJOKI, P. 2013. Helikobakteeri. Lääkärikirja Duodecim. [Viitattu 2015-10-12.] Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00019

MUSTAJOKI, P. ja KAUKUA, J. 2008. Ruokatorven, mahalaukun ja pohjukaissuolen tähytys (gastroskopia). Senkka ja 100 muuta tutkimusta. Terveyskirjasto. Duodecim. [Viitattu 2015-10-12.] Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk05020

MÄKINEN, M., CARPÉN, O., KOSMA, V., LEHTO, V., PAAVONEN, T. ja STENBÄCK, F. 2012. Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

NURMI, T., REKIARO I. ja REKIARO, P. 2009. Gummeruksen suuri sivistyssanakirja. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

OPETUSHALLITUS 2016. SWOT-analyysi. Säädökset ja ohjeet. [Viitattu 2016-02-08.] Saatavissa: http://www.oph.fi/saadokset_ja_ohjeet/laadunhallinnan_tuki/wbl-toi/menetelmia_ja_tyovalineita/swot-analyysi

PANTANOWITZ, L., SINARD, J. H., HENRICKS, W. H., FATHEREE, L. A., CARTER, A. B., CONTIS. L., BECKWITH, B. A., EVANS, A. J., OTIS, C. N., LAL, A. ja PARWANI, A. V. 2013. Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology. Arch Pathol Lab Med – Vol 137, December 2013.

SAND, O., SJAASTAD Ø. V., HAUG. E., BJÅLIE J. G. ja TOVERUD K. C. 2012. Ihminen fysiologia ja anatomia. 8.-9. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

SAXENA, R. 2010. Role of Special Histochemical Stains in Staining Microorganisms. Education Guide. Special Stains and H & E. Second Edition. Dako. [Viitattu 2016-01-08.] Saatavissa: http://www.dako.com/08066_guide_to_special_stains.pdf

SUOMEN BIOANALYYTIKKOLIITTO RY 2006. Bioanalyytikon, laboratoriohitoajan eettiset ohjeet. [Viitattu 2016-02-08.] Saatavissa: [http://www.bioanalyytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+suomi+2011+\(1\).pdf](http://www.bioanalyytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+suomi+2011+(1).pdf)

SUOMEN BIOANALYYTIKKOLIITTO RY 2016. Kliininen histologia ja sytologia. Erikoisalat. Bioanalyytikon ammatti. [Viitattu 2016-01-08.] Saatavissa: http://www.bioanalyytikkoliitto.fi/bioanalyytikon_ammatti/erikoisalat/kliininen_histologia_ja_sytologi/

RAUTELIN, H. ja FÄRKKILÄ, M. 2010. Helikobakteerit. Julkaisussa: HEDMAN, K., HEIKKINEN T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. (toim) 2010. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.

RHODES, A. 2013. Fixation of tissues. Julkaisussa: SUVARNA, S. K., LAYTON, C., BANCROFT, J. D. 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7.painos. Elsevier limited.

THERMO SCIENTIFIC 2011. Microm HM340E Rotary Microtome. Operation Manual – English. [Viitattu 2016-01-07.] Saatavissa: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/SDG/APD/APD%20Documents/Product%20Manuals%20&%20Specifications/Histology%20Equipment%20and%20Supplies/HM%20340%20Rotary%20Microtome%20387863.pdf>

TUOKKO, S., RAUTAJOKI, A. ja LEHTO, L. 2008. Kliinisen laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

TYÖTERVEYSLAITOS 2011. Formaldehydin terveyshaitat ja altistuminen. [Viitattu 2016-01-07.] Saatavissa: http://www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista_kemikaalitietoa/formaldehydi/formaldehydin_terveysahaitat_ja_altistuminen/Sivut/default.aspx

TYÖTERVEYSLAITOS 2014. Ksyleeni. [Viitattu 2015-11-28.] Saatavissa:
<https://www.ttl.fi/ova/ksyleeni.html>

VALLI, R. ja AALTOLA, J. (toim) 2015. Ikkunoita tutkimusmetodeihin 1. Metodien valinta ja aineiston keruu: virikkeitä aloittelevalle tutkijalle. 4., uudistettu ja täydennetty painos. Juva: PS-kustannus.

VIERIMAA, H. ja LAURILA, M. 2014. Kehon anatomia ja fysiologia. 1.-4. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

YLI-PYKY, M. 2014. Kudospalasta digitaaliseksi kuvaksi. Patologia. Bioanalytiikka 1/2014.

LIITE 1: GASTROSKOPIANÄYTTEIDEN GIEMSA-VÄRJÄYKSEN OPTIMOINNIN ARVIOINTI

Arvioi värjäysten onnistumista asteikolla 0-3 ja ympyröi mielestäsi paras vaihtoehto.

0 = epäonnistunut värjäys

1 = välttävä värjäys

2 = hyvä värjäys

3 = erinomainen värjäys

Näytelasi: _____

Näytelasi: _____

1. Näytteen yleinen värjäytyvyys? **0 1 2 3**

1. Näytteen yleinen värjäytyvyys? **0 1 2 3**

2. Helikobakteerien värjäytyvyys? **0 1 2 3**

2. Helikobakteerien värjäytyvyys? **0 1 2 3**

Näytelasi: _____

1. Näytteen yleinen värjäytyvyys? **0 1 2 3**

2. Helikobakteerien värjäytyvyys? **0 1 2 3**

Vapaat kommentit?

Kiitos vastauksestasi!

Jennamari Heikkinen ja Heidi Rutanen, Savonia-ammattikorkeakoulu

LIITE 2: KSSHP:N OPTIMOITU GIEMSA-VÄRJÄYSOHJE

GIEMSA -VÄRJÄYS (Helicobacter pylorin toteamiseksi)

1. NÄYTTEEN LAATU

Värijäysmenetelmä on tarkoitettu parafiinileikkeille.

2. HISTOKEMIALLINEN PERIAATE

3. VÄRJÄYKSEN MERKITYS PATOLOGIASSA

Giemsa-värijäystä käytetään kroonisen gastriitin ja mahahaavan diagnostiikassa Helicobacter pylorin toteamiseksi. Giemsa-menetelmää voidaan käyttää myös muiden mikro-organismien tunnistamiseen, esim. Giardia lamblia (Flagellata) ja Leishmania (Protozoa).

4. LAITTEET JA VÄLINEET

Vetokaappi, värijäysautomaatti, sekuntikello, värijäysmaljoja, kuljetuskelkkoja, objektilaseja, peitinlaseja, pinsetit, suojakäsineet, värijäysautomaatti, päällystysautomaatti.

5. VAROTOIMENPITEET

Suorita värijäys vetokaapissa, käytettävä suojakäsineitä. Tutustu Giemsan, ksyleenin ja isopropaanolin käyttöturvallisuustiedotteisiin sekä hävittämisohjeisiin.

6. VÄRJÄYKSEN SUORITUS

Värjäys tehdään Leican ST5020 -värjäysautomaatilla. Värjäys kestää noin 1,5 tuntia.

- | | |
|---|----------------------|
| 1. <u>Ksyleeni</u> | 5 min |
| 2. <u>Ksyleeni</u> | 5 min |
| 3. <u>Abs.alkoholi</u> | 2 min |
| 4. <u>Abs.alkoholi</u> | 2 min |
| 5. <u>96% alkoholi</u> | 3 min |
| 7. <u>96% alkoholi</u> | 2 min |
| 8. <u>Puhdistettu vesi</u> | 2 min |
| 9. 15 % <u>Giemsa</u> -liuos | 60 min |
| 10. Etikkahappovesi | 3 s |
| 11. 96 % etanoli | 3 s |
| 12. Isopropanoli (= 2-propanol, isopropyylialkoholi) | 3 min |
| 13. Isopropanoli | 2 min |
| 14. <u>Ksyleeni</u> | 2 min |
| 15. <u>Ksyleeni</u> | 2min (<u>exit</u>) |
| 16. Päälystys objektilasit joko käsin tai päälystysautomaatilla | |

Huom! Kohdan 12-13 isopropanolit voi poikkeustilanteessa korvata 96% etanolilla.

7. TULOS JA TULKINTA

HP-giemsa -värjäys: Bakteerit näkyvät sinisinä sytoplasmassa.

8. REAGENSIT

15 % <u>Giems</u> a-liuos:	60ml 340 ml	<u>Giems</u> a Merck 1.09204.2500 Puhdistettu vesi Säilyvyys: +20 °C, 1 vk
Etikkahappovesi:	16 tippaa 400 ml	Väkevä etikkahappo <u>Acetic acid glacial</u> Merck 1.00063) Puhdistettu vesi

Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
96% etanoli
Isopropanoli = 2-propanol = isopropyylialkoholi

9. VIRHELÄHTEET

10. KIRJALLISUUTTA