

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

2017

Timo Erkkilä ja Abdirashid Warsame

RETIKULOSYTOOSI VÄÄRIEN  
POSITIIVISTEN TULOSTEN  
LÄHTEENÄ  
FETAALIHEMOGLOBIINI-  
VÄRJÄYKSESSÄ

Timo Erkkilä ja Abdirashid Warsame

# RETIKULOSYTOOSI VÄÄRIEN POSITIIVISTEN TULOSTEN LÄHTEENÄ FETAALIHEMOGLOBIINIVÄRJÄYKSESSÄ

Fetaalihemoglobiiniväryystä käytetään pääasiassa fetomaternaalivuodon selvittelyyn. Fetomaternaalivuoto on raskauskomplikaatio, jossa sikiön verta vuotaa äidin verenkiertoon. Koska sikiön veritilavuus on hyvin pieni, vuoto voi johtaa sikiön henkeä uhkaaviin tilanteisiin. Väryyksen avulla saadaan semikvantitatiivinen arvio vuodon määrästä.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, kuinka korkeat retikulosyyttitasot johtavat fetaalihemoglobiiniväryyksessä väriin positiivisiin tuloksiin. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen hematologian erikoislaboratoriolle. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa laboratoriolle lisätietoa fetaalihemoglobiiniväryyksen heikkouksista mahdollista menetelmänvaihtoa varten.

Tutkimus toteutettiin syksyllä 2017 Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen hematologian erikoislaboratorion tiloissa. Tutkimusaineistoksi kerättiin potilasnäytteitä, joiden retikulosyyttitaso oli korkea ja jotka eivät sisältäneet fetaalihemoglobiinia. Näytteistä valmistettiin sivelyvalmisteet, jotka väryttiin ja mikroskoipoitiin. Solulaskennassa havaittujen väriiden positiivisten löydösten määrää verrattiin näytteen retikulosyyttitasoon.

Tutkimustulosten mukaan retikulosytoosin ja fetaalihemoglobiiniväryyksessä esiintyvien väriiden positiivisten löydösten välillä löydettiin vahva korrelaatio, mutta tulokset eivät olleet tilastollisesti merkityksellisiä ( $r=0,89$ ;  $n=9$ ;  $p$ -arvo  $0,13$ ) vähäisen näytemäärän vuoksi.

## ASIASANAT:

Fetaalihemoglobiini, retikulosytoosi, hematologia, fetaalihemoglobiiniväryys, väärät positiiviset

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science

2017 | 49 + 7

Timo Erkkilä & Abdirashid Warsame

## RETICULOCYTOSIS AS THE SOURCE OF FALSE POSITIVES IN THE KLEIHauer-BETKE TEST

The Kleihauer-Betke test is primarily used to diagnose fetal-maternal haemorrhage. Fetal-maternal haemorrhage is a complication during pregnancy where fetal blood leaks into the maternal circulation. This may lead to life-threatening consequences for the fetus due to the extremely small total fetoplacental blood volume. Utilizing the Kleihauer-Betke test it's possible to semiquantitatively measure the amount of fetal blood in the maternal circulation.

The purpose of this bachelor's thesis was to find out the level of reticulocytosis that leads to false positive results in the Kleihauer-Betke test. This thesis was commissioned by the clinical hematology laboratory of the Turku University Hospital. The goal of this thesis was to produce more information about the weaknesses of the Kleihauer-Betke test.

The study was carried out during fall 2017 in the premises of the Turku University Hospital. The specimen material contained blood samples with high amounts of reticulocytes and no fetal hemoglobin. Slides were prepared from the samples, they were stained and finally the cells were counted under microscope. The number of false positives found during microscopy were compared to the level of reticulocytes.

The results show that there is strong correlation between the level of reticulocytes and the number of false positives in the Kleihauer-Betke stain ( $r=0,89$ ;  $n=9$ ;  $p=0,13$ ). However, the results were of no statistical significance due to the low number of specimens.

### KEYWORDS:

Fetal hemoglobin, reticulocytosis, hematology, Kleihauer-Betke test, false positives

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 HEMOGLOBIINI JA FETAALIHEMOGLOBIINI</b>	<b>9</b>
2.1 Fetaalihemoglobiinin kliininen merkitys	10
2.2 Fetaalihemoglobiinin määritysmenetelmät	11
2.2.1 Fetaalihemoglobiinivärjäys	11
2.2.2 Virtaussytometria	17
<b>3 RETIKULOSYYTIT</b>	<b>21</b>
3.1 Retikulosyyttien määrittäminen	22
3.1.1 Käsinlaskenta	23
3.2 Retikulosytoosi ja sen aiheuttajat	24
3.2.1 Raskausajan raudanpuuteanemian hoito	24
3.2.2 Hemolyytiset anemiat	25
3.2.3 Talassemiat eli kvantitatiiviset hemoglobiinopatiat	26
3.2.4 Kvalitatiiviset hemoglobiinopatiat	27
<b>4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYS</b>	<b>29</b>
<b>5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS</b>	<b>30</b>
5.1 Käytännön toteutus	30
5.2 Metodologiset lähtökohdat	31
5.3 Eettiset näkökulmat	31
<b>6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>33</b>
6.1 Mikroskopointitulokset	33
6.2 Tilastollinen tarkastelu	40
6.3 Loppupäätelmät	41
<b>7 POHDINTA JA JATKOTUTKIMUSAIHEET</b>	<b>42</b>
7.1 Luotettavuus	43
7.2 Eettisyys	44
7.3 Ammatillinen kasvu	44
7.4 Jatkotutkimusaiheet	45

## LÄHTEET

46

## LIITTEET

- Liite 1. Opinnäytetyön toimeksiantosopimus.  
Liite 2. Emoprojektin tutkimuslupa.

## KAAVAT

- Kaava 1. Värjäyksen tulosten laskukaava (Vanharanta 2013). 16  
Kaava 2. Retikulosyyttien osuuden laskeminen (Vanharanta 2010). 24

## KUVAT

- Kuva 1. Globiiniketjujen pariutumisyhdistelmät. 9  
Kuva 2. Veripisara objektilasilla. 13  
Kuva 3. Veto objektilasille. 14  
Kuva 4. Vedetty sivelyvalmiste. 14  
Kuva 5. Fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja ja haamumaisia eluoituneita punasoluja kontrollilasilla. 16  
Kuva 6. Virtausytometrin toimintaperiaate. 17  
Kuva 7. Leimaustyypit. 18  
Kuva 8. Valon sironnan mittaus virtausytometriassa. 19  
Kuva 9. Valkosolujen erittelylaskennan hajontakuviokuva (Sysmex Europe 2017a). 20  
Kuva 10. Solupopulaatioiden sijainnit retikulosyyttikanavan hajontakuviokuva (Sysmex Europe 2017a). 22  
Kuva 11. Negatiivinen värjäystulos. 35  
Kuva 12. Vääriä positiivisia löydöksiä. 36  
Kuva 13. Rinnakkaisvertailu: Oikea löydös ja väärä positiivinen löydös. 42

## KUVIOT

- Kuvio 1. Mikroskopointitulokset: Lasketut punasolut. 34  
Kuvio 2. Mikroskopointitulokset: Värjäytyneet solut. 34  
Kuvio 3. Rinnakkaistulokset väärin positiivisten osuuksista. 37  
Kuvio 4. Eroprosentti rinnakkaistuloksissa. 38  
Kuvio 5. Regressiosuora. 40

# TAULUKOT

Taulukko 1. Fetaalihemoglobiinia sisältävien punasolujen osuus eri ikävaiheissa (Means & Glader 2014).	9
Taulukko 2. Näyttemateriaali.	33
Taulukko 3. Mikroskopointitulokset.	33
Taulukko 4. Rinnakkaistulokset väärin positiivisten osuuksista.	36
Taulukko 5. Erot rinnakkaistulosten välillä.	37
Taulukko 6. Väärin positiivisten tulosten keskiarvot näytteittäin.	38
Taulukko 7. Väärin positiivisten löydösten keskiarvot verrattuna näytteiden retikulosyyttitasoon.	39

# 1 JOHDANTO

Fetaalihemoglobiinivärjäys on sytokemiallinen menetelmä, jonka avulla pystytään semikvantitatiivisesti määrittämään fetaalihemoglobiinia sisältävien punasolujen osuus veressä. Tutkimusta käytetään Suomessa pääasiassa fetomaternaalivuodon selvittelyyn ja se tehdään rutiininomaisesti aina, kun epäillään sikiölle tapahtuneen vahinkoa. Fetomaternaalivuoto on raskauskomplikaatio, jossa sikiön verta vuotaa istukan läpi äidin verenkiertoon. Vuotoa voi tapahtua joko raskauden aikana, luonnollisista tai traumaattisista syistä, tai synnytyksessä. Vähäistä vuotoa esiintyy lähes kaikissa raskauksissa, mutta valtaosassa tapauksista määrät ovat kliinisesti merkityksettömiä. Suuremmat vuodot voivat kuitenkin johtaa vakaviin komplikaatioihin, kuten vastasyntyneen anemiaan, neurologisiin oireisiin tai pahimmassa tapauksessa sikiön kuolemaan. (Ulander ym. 2002; Wiley & D'Alton 2010; Stefanovic 2016.)

Laboratoriotutkimusprosessin aikana tapahtuu auttamatta virheitä ja virheellisiä tuloksia saadaan päivittäin. Yleisimmin virheiden taustalla ovat inhimilliset tekijät, ja niistä suuri osa olisi täysin ehkäistävissä. Kaikista prosessin aikana tapahtuneista virheistä noin neljännes vaikuttaa negatiivisesti potilaan hoitoon. Vaikutusten vakavuus vaihtelee viivästyneistä testituloksista hengenvaarallisiin tilanteisiin ja tarpeettoman hoidon tai lääkityksen aloittamiseen. Myös psykologiset vaikutukset tulee ottaa huomioon – väärin positiivisten tulosten takia potilas voi virheellisesti luulla olevansa vakavasti sairas. Yleisesti voidaan kuitenkin todeta, että virheet johtavat potilasturvallisuuden heikkenemiseen. (Turgeon 2007; Wallin 2008.)

Fetaalihemoglobiinivärjäys on vaativa ja aikaa vievä menetelmä, joka vaatii tekijältään vankkaa ammattitaitoa ja kärsivällisyyttä. Menetelmän huonoja puolia ovat sen heikko toistettavuus ja taipumus yliarvioida vuodon määrää. Koska sikiön veritilavuus on hyvin pieni, jo pienetkin virheet soluja laskiessa voivat johtaa virheellisiin tuloksiin. Fetomaternaalivuodon diagnostiikassa virheelliset tulokset voivat ääritapauksissa johtaa vakaviin seurauksiin, kuten ennenaikaiseen synnytyksen käynnistämiseen tai tarpeettomiin sikiöön kohdistuviin invasiivisiin toimenpiteisiin. Kirjallisuuden mukaan on selvää, että korkeat retikulosyyttitasot johtavat väärin positiivisiin värjäystuloksiin, mutta asiaa ei tähän mennessä ole tarkemmin tutkittu. (Kleihauer & Betke 1969; Arias 1984; Wiley & D'Alton 2010.)

Suomessa yhä useammat laboratoriot ovat jo lopettaneet tai ovat lopettamassa fetaalihemoglobiinivärjäyksien tekemisen, viimeisimpänä Nordlab maaliskuussa 2017 (Nordlab 2017). Kirjoittamishetkellä ainoastaan Tykslab ja Islab käyttävät värjäysmenetelmää. Värjäyksiä korvataan tarkemmalla ja herkemällä virtausytometrisellä menetelmällä ja myös Tykslab harkitsee menetelmävaihtoa. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, minkä tasoiset retikulosyyttimäärät aiheuttavat väärää positiivisia tuloksia fetaalihemoglobiinivärjäyksessä. Tavoitteena on saada selville lisätietoa fetaalihemoglobiinivärjäyksen heikkouksista ja tuottaa materiaalia tukemaan mahdollisesti tulevaa menetelmävaihtoa.



## 2 HEMOGLOBIINI JA FETAALIHEMOGLOBIINI

Punasolujen tärkein tehtävä elimistössä on kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin ja hiidioksidia takaisin kudoksista keuhkoihin. Happea kuljettava osa on hemoglobiini, joka muodostaa n. 30 % punasolujen tilavuudesta ja n. 90 % niiden massasta. Se koostuu kahdesta parista globiiniketjua, joihin on kiinnittynyt prosteettinen hemi-ryhmä. Ketjut voivat pariuua kuvan 1 mukaisesti.  $\zeta$  (zeta)-ketjua esiintyy vain alkiovaiheen hemoglobiinissa (Hb<sub>s</sub>), joka muodostuu kahdesta  $\zeta$ -ketjusta ja kahdesta  $\epsilon$  (epsilon)-ketjusta ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) tai kahdesta  $\gamma$  (gamma)-ketjusta ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Sikiön kehityksen edetessä erytropoieesi siirtyy ruskuaispussista sikiön maksaan ja fetaalihemoglobiini (HbF) korvaa alkiovaiheen hemoglobiinin. Fetaalihemoglobiini koostuu kahdesta  $\alpha$  (alfa)-ketjusta ja kahdesta  $\gamma$ -ketjusta ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Seuraavassa muutoksessa erytropoieesi siirtyy maksasta edelleen luuytimeen. Tämän seurauksena jo ennen syntymää, mutta pääasiassa syntymän jälkeen, HbF-tuotanto vähenee tasaisesti korvautuen aikuistyyppin hemoglobiinin tuotannolla (HbA), joka koostuu kahdesta  $\alpha$ -ketjusta ja kahdesta  $\beta$  (beta)-ketjusta ( $\alpha_2\beta_2$ ). Fetaalihemoglobiinitason kehitys nähdään taulukossa 1. (Ehsan 2014; Quigley ym. 2014; Thom ym. 2015.)



Kuva 1. Globiiniketjujen pariutumisyhdistelmät.

Taulukko 1. Fetaalihemoglobiinia sisältävien punasolujen osuus eri ikävaiheissa (Means & Glader 2014).

Ikä	HbF (%)
<b>Vastasyntynyt</b>	55-90
<b>2 kuukautta</b>	30-55
<b>3-6 kuukautta</b>	5-25
<b>6-12 kuukautta</b>	<5
<b>1+ vuotta</b>	<2

## 2.1 Fetaalihemoglobiinin kliininen merkitys

Tärkein käyttötarkoitus fetaalihemoglobiinin määrittämiselle on fetomaternaalivuodon diagnostiikka. Fetomaternaalivuodossa sikiön verta vuotaa istukan kautta äidin verenkiertoon. Vuotoa esiintyy käytännössä jokaisen raskauden aikana, mutta 75 %:ssa tapauksista vuoto on kooltaan alle 0.025 ml ja 96 %:ssa tapauksista alle 0.5 ml. Näin vähäiset määrät ovat kuitenkin kliinisesti merkityksettömiä. Koska sikiön veritilavuus on hyvin pieni, noin 80-90 ml/kg, suuremmat vuotomäärät ovat erittäin vaarallisia sikiön terveydelle. Yleisesti yli 80 ml:n vuoto luokitellaan suureksi ja yli 150 ml:n vuoto massiiviseksi fetomaternaalivuodoksi. Vuodon määrä tutkitaan rutiininomaisesti aina, jos epäillään sikiöön kohdistunutta traumaa. Tällaisia tilanteita ovat mm. kaatumiset ja muut onnettomuudet. Toinen merkittävä syy tutkimuksen tekemiselle on sikiön liikehännän vähentyminen tai loppuminen, ja niitä tehdään myös keskenmenon jälkeen sen syiden selvittelyä varten. (Ulander ym. 2002; Wiley & D'Alton 2010; Stefanovic 2016.)

Fetomaternaalivuodon tarkkaa syntymekanismia ei tiedetä. Pohjimmaisena syynä on jostain syystä istukan trofoblastisolukoon muodostunut leesio, jota kautta sikiön punasolut pääsevät istukan intervilloositilaan, josta ne kulkeutuvat edelleen äidin verenkiertoon. Intervilloositila on täynnä äidin valtimoverta, ja sen kautta tapahtuu ravintoaineiden ja hapen kuljetus sikiölle. Fetomaternaalivuodolle altistavia tekijöitä uskotaan olevan mm. vatsan alueen trauma, raskausmyrkytys, istukan kasvaimet ja lapsivesipunktiot. Kuitenkin yli 80 %:ssa vuototapauksista tarkka syntysyy jää tuntemattomaksi. Vuotoa voidaan hoitaa raskauden alkuvaiheessa kohdunsisäisellä verensiirrolla, mutta useimmiten suuri vuoto johtaa synnytyksen ennenaikaiseen käynnistämiseen sikiön pelastamiseksi. (Wiley & D'Alton 2010; Karikoski 2011.)

Fetaalihemoglobiinin määrittästä käytetään myös perinnöllisen fetaalihemoglobiinin persistenssin (HPFH, hereditary persistence of fetal hemoglobin) selvittelyyn. HPFH on ryhmä beeta-talassemin variantteja, jotka aiheuttavat fetaalihemoglobiinituotannon jatkumisen aikuisiällä. Syynä on globiinin  $\beta$ -ketjujen synteesiä ohjaavien geenien deleetio tai inaktivaatio. Koska  $\beta$ -ketjujen määrä on normaalia pienempi tai ne puuttuvat kokonaan, aikuistyyppin hemoglobiinia ( $\alpha_2\beta_2$ ) muodostuu taudin tyypistä riippuen tavallista vähemmän tai ei ollenkaan. Sen sijaan muodostuu fetaalihemoglobiinia ( $\alpha_2\gamma_2$ ), koska  $\gamma$ -ketjujen synteesi kasvaa kompensoiden  $\beta$ -ketjujen puutetta. HPFH on yleensä täysin oireeton ja havaitaan sattumalöydöksenä. (Thein & Wood 2009; Randolph 2014.)

## 2.2 Fetaalihemoglobiinin määrittymenetelmät

Fetaalihemoglobiinin määrittymenetelmiä on aikojen saatossa kehitetty useita. Niitä ovat mm. korkeapainenestekromatografia, kapillaarielektroforeesi, isoelektrinen fokuointi, fetaalihemoglobiinivärjäys, virtaussytometria, radiaalinen immunodiffuusio ja emäsdenaturointi (Stephens 2012). Tässä opinnäytetyössä keskitymme määrittymenetelmistä fetaalihemoglobiinivärjäykseen ja virtaussytometriaan.

Määrittymiä voidaan tehdä myös verikaasuanalysointilaitteilla, kuten Tykslabissa yleisessä käytössä olevilla Radiometerin ABL -sarjan laitteilla. Fetaalihemoglobiini määritetään spektrofotometrisesti, käyttäen apuna fetaalioksihemoglobiinin ja aikuisten oksihemoglobiinin spektrien eroja. Laitteiden tarkkuus ei kuitenkaan riitä niiden käyttöön fetomaterinaalivuodon selvittelyssä. Ongelmana on myös näyttemateriaalin säilyvyys, koska analysointi pitää suorittaa 30 minuutin kuluessa näytteenotosta. (Radiometer 2008; Turkia 2017.)

### 2.2.1 Fetaalihemoglobiinivärjäys

Fetaalihemoglobiinivärjäyksessä käytetty sytokemiallinen Kleihauer-Betke -happoelutiomenetelmä perustuu HbA:n ja HbF:n välisiin rakenne-eroihin. Sen kehittivät Kleihauer, Braun ja Betke vuonna 1957. Menetelmässä perifeerisen veren sivelyvalmiste upotetaan happamaan esilämmitettyyn sitraattifosfaattipuskuriin. Käsittelyn aikana HbA liukenee puskuriin ja poistuu punasoluista, kun taas happamaa ympäristöä paremmin kestävä HbF säilyy soluissa. Sivelyvalmiste värjätään hematoksyliinilla ja eosiinilla, ja siitä laskeaan mikroskoopin avulla värjäytyneiden ja kaikkien punasolujen määrä. Fetaalihemoglobiinia sisältävät punasolut näkyvät lasilla punaisina, kun taas muut punasolut ovat haamumaisia ja värittömiä. Näin saadaan laskettua kvantitatiivinen arvio fetaalihemoglobiinia sisältävien solujen määrästä verenkierrossa. Laskukaavoja on useita erilaisia, ja niissä voidaan ottaa huomioon mm. äidin ja sikiön hematokriitti, ja äidin veritilavuus. Tykslabissa tulos ilmoitetaan prosenttiosuutena. Fetaalihemoglobiinivärjäyksellä ei kuitenkaan pystytä erottamaan sikiön ja äidin punasoluja toisistaan. Menetelmä ei vaadi erikoislaitteita, vaan on tehtävissä missä tahansa tavallisessa hematologian laboratoriossa. Vuonna 2010 96 % yhdysvaltalaisista laboratorioista käytti värjäysmenetelmää fetaalihemoglobiinin määrittämiseen, kun taas Suomessa värjäyksiä tehdään ainoastaan

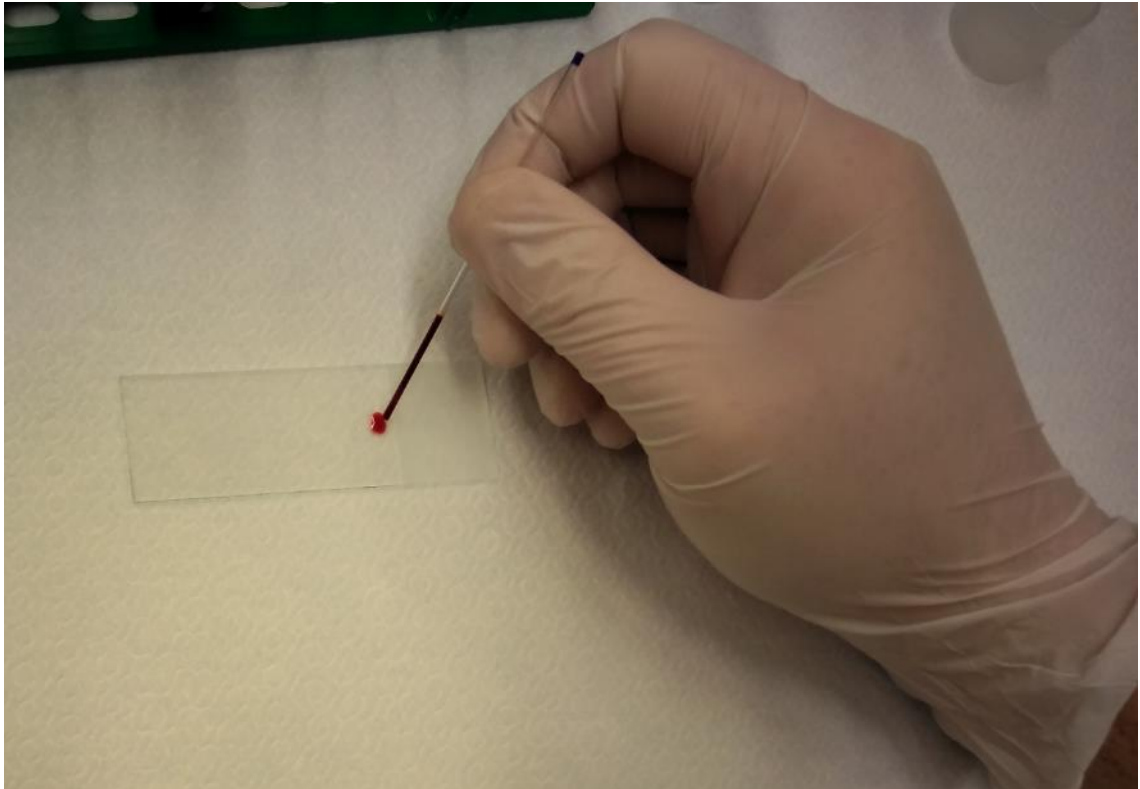
Tykslabissa ja Islabissa. (Fabry & Old 2009; Wiley & D'Alton 2010; Vanharanta 2013; Quinn ym. 2014.)

Värjäyksen onnistumisen ja värjäystuloksen laadun tarkasteluun käytetään kontrollilaseja, jotka värjätään aina tutkittavien näytteiden mukana. Kontrollina käytetään verisekoitusta, joka valmistetaan yhdistämällä vastasyntyneen verta aikuisen miehen vereen. Näin saadaan valmiste, jossa on sekoitus fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja, mutta myös tavallisia aikuistyyppin hemoglobiinia sisältäviä punasoluja. Positiivinen ja negatiivinen kontrolli ovat siten samalla lasilla. Tarvittaessa sekoitusta voidaan laimentaa 0,9 % fysiologisella keittosuolalla, jotta kontrollilaseista saadaan tarpeeksi ohuet. Värjäyksen jälkeen kontrollilasit tarkastetaan mikroskoopilla ja varmistetaan, että lasilla näkyy sekä värjäytyneitä että eluoituneita punasoluja. (Vanharanta 2013.)

### **Värjäyksen kulku:**

Värjäykseen tarvittavaa perifeerisen veren sivelyvalmistetta varten verinäyte otetaan laskimosta tai EDTA-antikoagulanttiputkeen. Myös kapillaariverinäyte soveltuu, jos laskimoverinäytettä ei saada otettua. EDTA-näyte soveltuu tarkoitukseen parhaimmin, koska se säilyttää solumorfologian mahdollisimman alkuperäisenä. Valkosolujen erittelylaskentaa varten sivelyvalmisteet tulisi tehdä korkeintaan kolmen tunnin sisällä näytteenoton jälkeen solumorfologian säilyttämiseksi, mutta fetaalihemoglobiinivärjäystä varten tehtävät valmisteet voidaan tehdä vielä 24 tunnin päässä näytteenotosta. Näyte säilytetään huoneenlämmössä valmisteiden tekoon asti. Värjäykset tulisi suorittaa mahdollisimman nopeasti, mutta koska Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin laboratorioissa fetaalihemoglobiinivärjäys ei ole päivystysaikaan tehtävä tutkimus, esim. perjantai-iltana saapuneen näytteen värjäys viivästyy viikonlopun yli maanantaille. Näin pisin mahdollinen viive lasien tekemisen ja värjäyksen välillä on noin kolme vuorokautta. (Vanharanta 2013; Savolainen & Tienhaara 2015.)

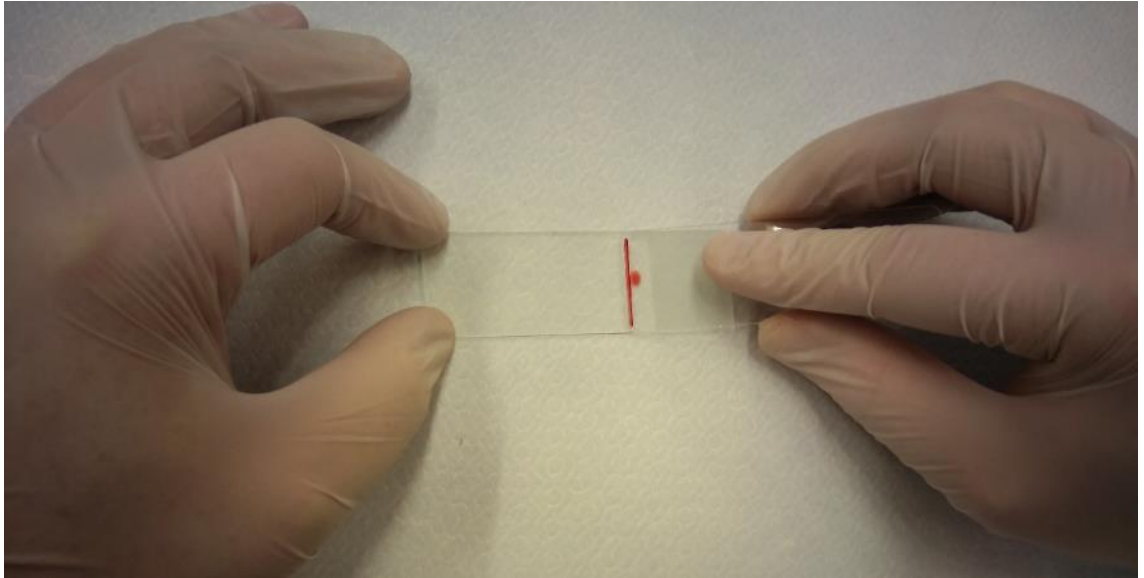
Näytteestä valmistetaan 10 kappaletta sivelyvalmisteita seuraavalla tavalla: Aluksi näyte sekoitetaan huolellisesti. Puhtaalle objektilasille siirretään hiospäähän kuvan 2 mukaisesti n. 2-3 µl pisara verta käyttäen ilmamäntäpipettiä tai kapillaaria. Tavanomaisella siirtoadapterilla pisarasta tulisi liian iso. Pisaran koon avulla saadaan säädeltyä valmisteen paksuutta. Objektilasin puhtaus on tärkeää, koska rasvainen tai muuten likainen lasi voi johtaa solujen kasaantumiseen tai reikiin vedetyssä valmisteessa. Myös lasille hengityksen mukana kulkeutunut syljen amylaasi voi aiheuttaa solujen hajoamista. (Kemi 2013; Smock & Perkins 2014.)



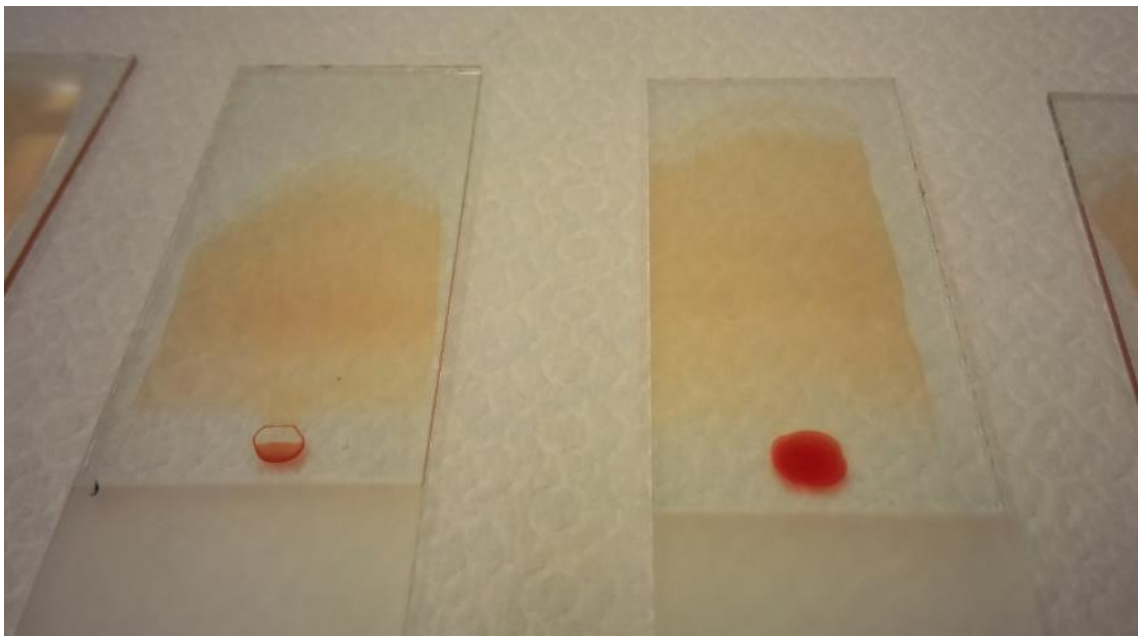
Kuva 2. Veripisara objektilasilla.

Veripisara vedetään objektilasille käyttämällä puhdasta ja ehjäreunaista vetolasia. Jos vetolasin reuna on epätasainen, muodostuu vedettäessä valmisteeseen päähän pitkiä häntiä, joihin solut kasaantuvat. Vetolasin tulisi myös olla objektilasia kapeampi. Vetolasi asetetaan veripisaran eteen vetosuunnan puolelle. Lasia pidetään n. 30°-45° kulmassa riippuen pisaran koosta ja halutusta vedon pituudesta. Loivemmalla kulmalla saadaan pidempi veto ja ohuempi valmiste, kun taas vastaavasti jyrkemmällä kulmalla veto on lyhyempi ja valmisteesta tulee paksumpi. Vetolasi vedetään taaksepäin pisaran päälle, jolloin pisara leviää lasin reunalle kuvan 3 mukaisesti. Tämän jälkeen pisara levitetään objektilasille työntämällä vetolasi tasaisella vauhdilla objektilasin päähän asti. Myös vetonopeus vaikuttaa valmisteeseen paksuuteen ja pituuteen. Nopealla vedolla saadaan lyhyempi ja paksumpi, kun taas hitaalla vedolla tuloksena on pidempi ja ohuempi valmiste. Onnistunut, laadukas sivelyvalmiste ulottuu noin 1 cm päähän objektilasin reunasta ja sen pää on tasainen ja pyöreähkö. Valmisteessa ei ole reikiä ja se ohenee tasaisesti vedon loppua kohden ilman epätasaisesta vetonopeudesta johtuvia aaltokuvioita. Verrattuna valkosolujen erittelylaskennassa käytettyihin sivelyvalmisteisiin fetaalihemoglobiinivärijäyksen sivelyvalmisteeseen tulisi olla huomattavasti ohuempi, jotta punasolut ovat

lasilla selvästi erillään. Tämä helpottaa niiden laskemista. Myöskään valmisteen häntäminen ei ole ongelma, sillä häntiin pakkautuvat lähinnä valkosolut. Kuvassa 4 nähdään onnistunut vedetty objektilasi. Lasit valmistetaan myös kontrollista. (Kemi 2013; Vanharanta 2013; Smock & Perkins 2014.)



Kuva 3. Veto objektilasille.



Kuva 4. Vedetty sivelyvalmiste.

Seuraavaksi vedettyjen objektilasien annetaan kuivua rauhassa noin kymmenen minuutin ajan. Kuivumisen nopeuttamiseksi laseja voidaan pitää laminaarivirtauskaapissa. Objektilasien hiospäihin kirjoitetaan lyijykynällä potilaan ja tutkimuksen tiedot. Kuivatuksen jälkeen lasit kiinnitetään välittömästi upottamalla ne 5 minuutin ajaksi 80 % etanoliin. Kiinnityksen jälkeen lasit huuhdellaan hanavedellä ja annetaan jälleen kuivua. Kiinnitys on kriittinen vaihe värjäyksessä, sillä jos valmiste on liian paksu, siitä voi huuhteluvaiheessa irrota suuriakin palasia. Tämän vuoksi kiinnitystä varten valmistetaan ylimääräisiä laseja, jotta saadaan värjäystä varten tarvittava määrä onnistuneita laseja. (Vanharanta 2013; Sigma-Aldrich 2014.)

Happoeluutio tehdään upottamalla kiinnitetyt objektilasit lämpöhauteessa +37 °C:een lämmitettyyn sitraattipuskuriliuokseen. Eluointi tehdään Coplin-astiassa. Eluointiliuos valmistetaan laimentamalla puskurikantaliuosta 1:10 tislatulla vedellä ja se säilyy jääkaapissa kahden viikon ajan. Normaalityöntilanteessa sitä ei kuitenkaan säilytetä fetalihemoglobiinivärjäyksen harvinaisuuden takia, vaan joka värjäystä varten valmistetaan uusi liuos. Sitraattipuskuri sisältää kloroformia, joten sitä käsitellessä työskennellään laminaarivirtauskaapissa ja käytetään suojakäsineitä. Laseja inkuboidaan puskurissa 5 minuutin ajan ja niitä heilutetaan kevyesti yhden ja kolmen minuutin inkuboinnin jälkeen. Eluution jälkeen lasit huuhdellaan tislatulla vedellä ja annetaan kuivua rauhassa artefaktien muodostumisen välttämiseksi. (Vanharanta 2013; Sigma-Aldrich 2014.)

Lopuksi lasit värjätään. Hematoksyliini-eosiinivärjäys eli HE-värjäys on histologiassa yleinen, mutta hematologiassa harvemmin käytetty värjäysmenetelmä. Sitä käytetään pääasiassa fetalihemoglobiinivärjäyksessä ja tietyissä luuydintutkimuksissa. Hematoksyliiniä tuotetaan *Hematoxylon campechianum* -lajin puusta. Niitä kutsutaan sinipuiksi tai kampešepuiksi ja ne elävät luonnonvaraisina Meksikossa ja Keski-Amerikassa. Nykyään sinipuita kasvatetaan hematoksyliinin tuottoa varten lähinnä Karibianmeren saarilla. Hematoksyliini erotetaan puusta kuumalla vedellä, jonka jälkeen se saostetaan vesiliuoksesta urean avulla. Se ei itsessään ole väriaine, vaan värinä toimii sen hapetus tuote hemateiini. Hapettaminen voidaan tehdä joko kypsyttämällä hematoksyliiniä valossa ja ilmassa usean kuukauden ajan (Ehrlichin ja Delafieldin hematoksyliini) tai kemiallisesti natriumjodaatilla (Mayerin hematoksyliini) tai elohopeaoksidilla (Harrisin hematoksyliini). Kemiallisesti hapetetut hematoksyliinit säilyvät selvästi ilmakypsytettyjä huonommin, mutta ne ovat käyttövalmiita välittömästi valmistuksen jälkeen. Tykslabissa värjäykseen käytetään Mayerin hematoksyliiniä, jossa laseja pidetään 3 minuutin ajan. Hematoksyliini värjää regressiivisesti, eli lasi ylivärjätään ja ylimääräinen väri poistetaan

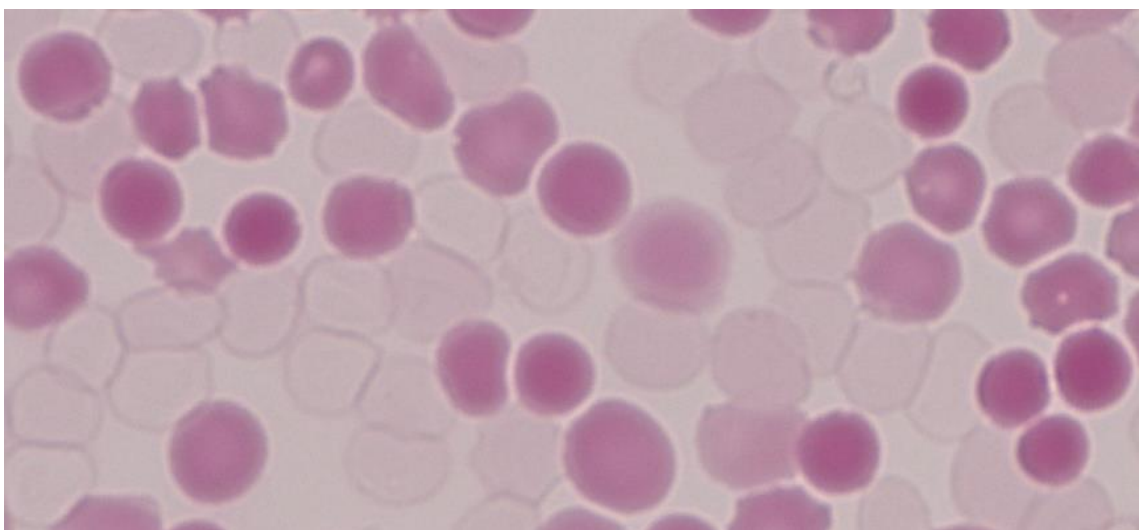
differentoimalla, käytännössä huuhtelemalla lasia tislatulla vedellä. Se on emäksinen tumaväri, joka värjää happamat osat, kuten tuman sisältämät nukleiinihapot, sinisiksi. (Bancroft & Layton 2013; Vanharanta 2013; Ehsan 2014.)

Eosiini on hapan sytoplasmaväri, jonka avulla värjätään tausta ja emäksiset osat punaisen sävyillä. Eosiini värjää progressiivisesti, eli värjäystulos ja sen intensiteetti riippuvat täysin värjäysajasta. Tästä syystä on tärkeää noudattaa työohjeen ajoituksia ja keskeyttää värjäysreaktio tarkalleen oikeaan aikaan. Tykslabissa käytetään eosini B:tä, jossa värjättäviä laseja pidetään 4 minuutin ajan. Lopuksi lasit huuhdellaan hyvin tislatulla vedellä ja annetaan kuivua. (Bancroft & Layton 2013; Vanharanta 2013.)

Värjätyt lasit tarkastellaan mikroskoopilla. Ensin tarkastetaan kontrollilaseilta värjäyksen onnistuminen. Jos näkyvissä on sekä haamumaisia, eluoituneita punasoluja, että värjäytyneitä, punaisia punasoluja, värjäys todetaan onnistuneeksi. Kuvassa 5 nähdään esimerkki värjäytyneistä ja eluoituneista punasoluista kontrollilasilla. Näytteet mikroskopoidaan 100x öljyimmersio-objektiivia käyttäen, ja niistä lasketaan 30 näkökentästä kaikki fetaalihemoglobiinia sisältävät solut ja kolmesta näkökentästä kaikki punasolut. Tulos lasketaan kaavalla 1, jossa  $x$  on fetaalihemoglobiinia sisältäviä solujen määrä ja  $y$  on punasolujen kokonaismäärä. Tuloksena saadaan prosenttiosuus fetaalihemoglobiinia sisältävistä punasoluista verenkierrossa. (Vanharanta 2013.)

$$HbF (\%) = \frac{x}{10y} \cdot 100$$

Kaava 1. Värjäyksen tulosten laskukaava (Vanharanta 2013).

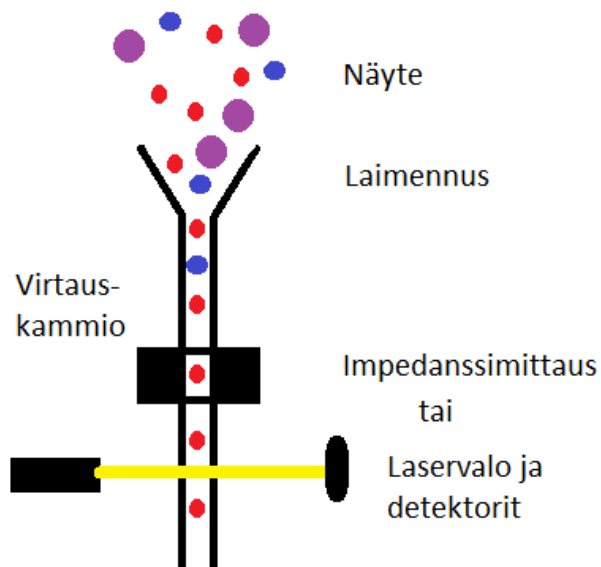


Kuva 5. Fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja ja haamumaisia eluoituneita punasoluja kontrollilasilla.



### 2.2.2 Virtausytometria

Virtausytometria tarkoittaa määritelmän mukaan laservalon läpi nesteen mukana kulkevasta partikkelivirrasta syntyvien signaalien mittausta ja analysointia. Sen yleisimmät käyttötarkoitukset sairaaladiagnostiikassa ovat perusveren kuvan ja virtsan partikkeleiden analysointi, mutta virtausytometriä käytetään rutiinomaisesti myös esim. kantasolujen määrän mittaamiseen perifeerisessä veressä ja valkosolujen immunofenotyyppitykseen. Virtausytometriä voidaan myös käyttää solujen lajitteluun niiden ominaisuuksiensa perusteella. Tästä käytetään yleisnimeä FACS eli fluorescence-activated cell sorting. Virtausytometri koostuu kuvan 6 mukaisesti yksinkertaistettuna viidestä osasta: Näytteen syöttöjärjestelmästä, laservalonlähteestä, virtauskammioista, valon sirontaa tai impedanssia mittaavista sensoreista ja tulokset tulkitsevasta tietokoneesta. Menetelmän paras ominaisuus on sen kyky laskea kymmeniä tuhansia soluja, siten mahdollistaen tulosten suuren tarkkuuden. (Givan 2001; Macey, 2007.)



Kuva 6. Virtausytometrin toimintaperiaate.

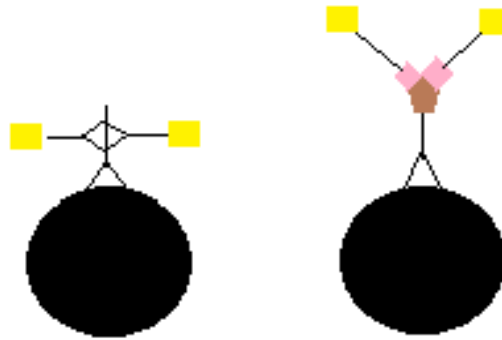
Analyysia varten näytettä laimennetaan niin paljon, että tutkittavat solut kulkevat virtauskammion läpi yksitellen. Solulaskenta perustuu impedanssin mittaamiseen. Kun yksittäiset solut kulkevat virtauskammion läpi, kahden elektrodin välillä kulkeva sähkövirta muuttuu. Muodostuu pulsseja, joista mittaamalla saadaan selville solujen määrä ja koko. Tätä menetelmää käytetään mm. virtsan partikkelilaskennassa ja perusveren kuvan eri

solupopulaatioiden mittauksissa. Menetelmä on yksinkertainen, ja sen avulla saadaan vain karkea kuva solujen ominaisuuksista. (Givan, 2001; Macey, 2007.)

### Suora leimaus

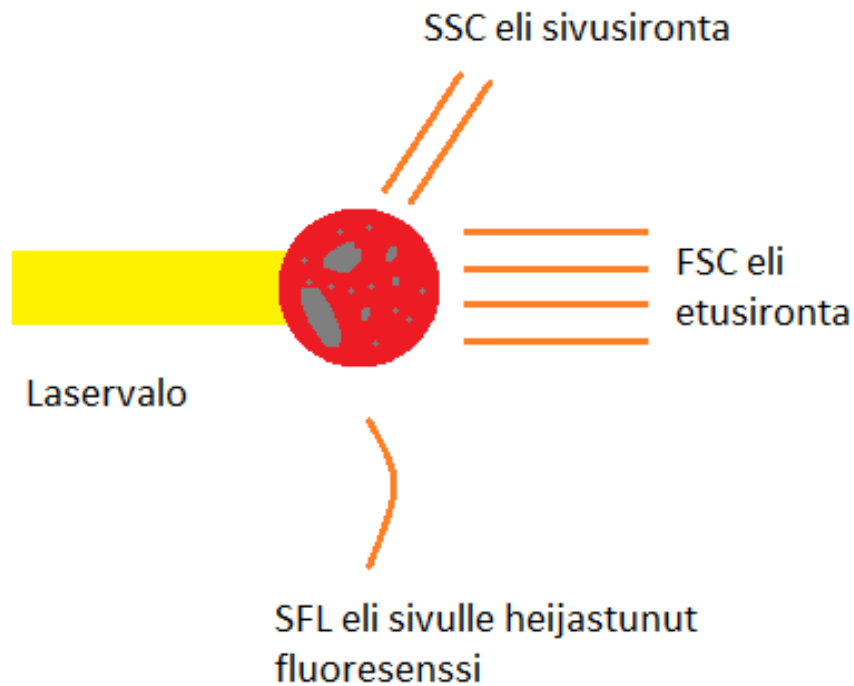


### Epäsuora leimaus



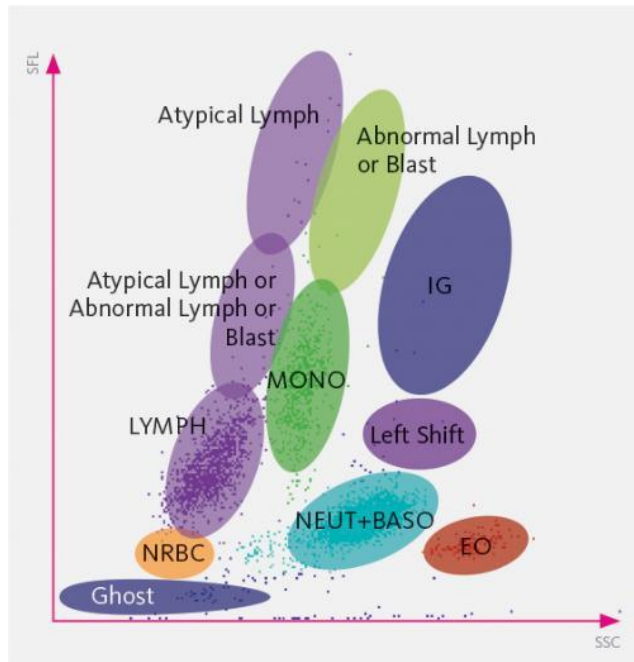
Kuva 7. Leimaustyytit.

Kun tarvitaan tarkempaa tietoa solujen ominaisuuksista tai solupopulaatioista, käytetään valon sirontaan perustuvia mittauksia. Näin tehdään esimerkiksi edellä mainitut immunofenotypitykset ja retikulosyyttilaskenta. Valon sirontaan perustuvissa mittauksissa solut leimataan tutkimukseen sopivilla fluoresoivilla väreillä eli fluorokromeilla. Leimaus voidaan tehdä suorasti tai epäsuorasti. Suorassa leimauksessa (kuvassa 7 vasemmalla) fluorokromeilla konjugoidut vasta-aineet kiinnittyvät suoraan tutkittavien solujen pinta-antigeeneihin. Epäsuora leimaus voidaan tehdä kahdella eri tavalla. Ensimmäinen on kuvassa 7 keskellä nähtävä kaksoisvasta-aine -tekniikka. Pinta-antigeeniin kiinnitetään ensin leimaamaton primaarinen vasta-aine, jonka jälkeen lisätään sekundaarinen, fluorokromilla leimattu, primaarisen vasta-aineen vasta-aine. Toinen tapa on käyttää solun pinta-antigeeniin kiinnittyvää biotinyloitua vasta-ainetta ja siihen kiinnittyvää streptavidini-fluorokromi-konjugaattia (kuva 7, oikealla). Näytteen leimaus voidaan tehdä tutkimuksesta ja käytetystä laitteistosta riippuen joko ennen sen syöttämistä virtaussytometriin tai laitteen sisällä. (Givan, 2001; Macey, 2007.)



Kuva 8. Valon sironnan mittaus virtausytometriassa.

Leimauksen jälkeen näyte siirretään virtauskammioon. Kun solut kulkevat yksi kerrallaan virtauskammion läpi, laservalon avulla saadaan mitattua kuvan 8 mukaisesti solujen aiheuttama etu- ja sivusironta ja niistä heijastunut valo. Mittauskanavat ovat FSC (forward-scattered light), joka mittaa etusirontaa; SSC (side-scattered light), joka mittaa sivusirontaa; ja SFL (side-fluorescence light), joka mittaa sivulle heijastuvaa fluoresenssivaloa. Etusironnan voimakkuus kuvaa solun tilavuutta, sivusironnan voimakkuudesta saadaan tietoa solun granulaarisuudesta, ja sivulle heijastuneen valon määrä kertoo solun sisältämien nukleiinihappojen määrästä. Näiden perusteella tietokone jakaa solut ominaisuuksiensa perusteella solupopulaatioihin ja muodostaa kuvan 9 kaltaisen hajontaku-  
vion. (Givan, 2001; Macey, 2007; Burns 2014; Sysmex Europe 2017a; Sysmex Europe 2017b.)



Kuva 9. Valkosolujen erittelylaskennan hajontakuvio (Sysmex Europe 2017a).

Fetaalihemoglobiinin virtausytometrisessä määrittämisessä käytetään kahta erillistä vasta-ainetta. Ensimmäinen on monoklonaalinen anti-HbF-vasta-aine, joka kiinnittyy kaikkiin fetaalihemoglobiinia sisältäviin punasoluihin. Tämä populaatio kuitenkin sisältää myös äidin fetaalihemoglobiinia sisältävät punasolut, joten tarkempi erottelu tehdään käyttämällä eri fluorokromilla konjugoitua polyklonaalista hiilihappoanhydraasiin kiinnittyvää vasta-ainetta. Tyypin I ja II hiilihappoanhydraaseja esiintyy vain aikuisten punasoluissa, joten menetelmällä saadaan tarkasti eroteltua sikiön ja äidin solupopulaatiot toisistaan. Näin menetelmä sopii myös sellaisille henkilöille, joilla on luonnostaan verenkierrössään suuria määriä fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja. Menetelmän etuja verrattuna värjäykseen ovat parempi tarkkuus ja herkkyys, laskettujen solujen suurempi määrä ja suhteellinen vaivattomuus. Verrattuna HPLC-menetelmään virtausytometrisen menetelmän herkkyys on kymmeniä kertoja parempi. Huonoja puolia ovat kalliit analysilaitteet ja vaadittu henkilöstön erikoisammattitaito. (Porra ym. 2007; Burns & Ehsan 2014; Porwit 2014; HUSLAB 2016.)

### 3 RETIKULOSYYTIT

Retikulosyytti kuvailtiin kirjallisuudessa ensimmäisen kerran vuonna 1865, kun saksalainen neurologi Wilhelm Erb havaitsi granuloita aneemisten ihmisten ja eläinten punasoluissa ja julkaisi löydöksensä. Seuraava virstanpylväs oli, kun vuonna 1891 amerikkalainen patologi ja epidemiologi Theobald Smith tunnisti retikulosyytit epäkypsiksi punasoluiksi. Virallinen määritelmä retikulosyyteille saatiin kuitenkin vasta vuonna 1986, kun National Committee for Clinical Laboratory Standards määritteli retikulosyytin seuraavasti: "Any non-nucleated red cell which contains two or more particles of blue-stained material corresponding to ribosomal RNA." eli "Mikä tahansa tumaton punasolu, joka sisältää vähintään kaksi siniseksi värjäytyneitä partikkelia ribosomaalista RNA:ta.", kun tarkastellaan supravitaalivärjättyjä punasoluja. Myöhemmin määritelmää laajennettiin ottamaan huomioon myös uudemmat virtausytometriaan perustuvat tutkimusmenetelmät. Toisen nykymääritelmän mukaan retikulosyytti on tumallisen punasolun, eli erytroblastin, ja kypsän punasolun välimuoto. (Köpke & Köpke 1986; WHO 1992; CLSI 2004.)

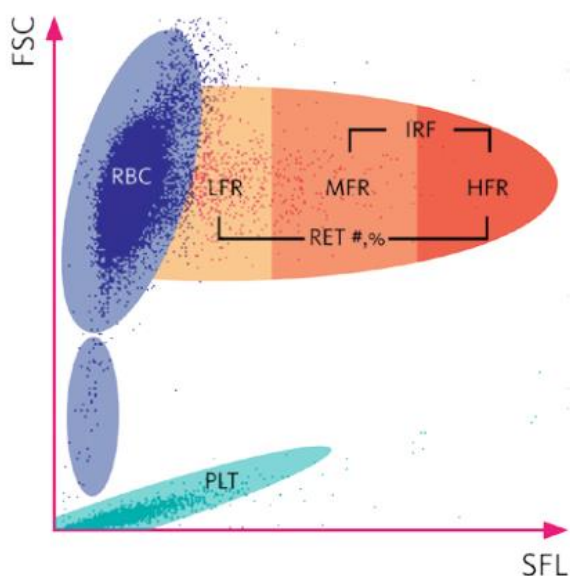
Retikulosyytti on siis erytropoieesissa punasolun viimeinen varhaismuoto ennen kypsää punasolua. Se muodostuu, kun ortokromaattinen erytroblasti ejektoi tumansa. Retikulosyyttien sytoplasmaan jää kuitenkin jäännös-RNA:ta ja jäänteitä soluorganelleista. Retikulosyytit kypsyvät ensin luuytimessä 1-3 vuorokauden ajan, jonka jälkeen ne siirtyvät perifeeriseen verenkiertoon. Ne ovatkin ainoita punasolun varhaismuotoja, jotka kuuluvat normaalilöydöksiin terveiden ihmisten verenkierrossa. Kypsyessään retikulosyytti syntetisoi lisää hemoglobiinia ja sitä mukaa ejektoi loput soluorganellinsa ja jäännös-RNA:n. Kypsymisaika verenkierrossa riippuu myös hematokriitistä. Jos hematokriitti on yli 40 %, retikulosyytit kypsyvät noin vuorokaudessa, kun taas hematokriitin ollessa alle 20 %, kestää kypsyminen n. kaksi ja puoli vuorokautta. Lopputuloksena on kypsä punasolu. (Köpke & Köpke 1986; Hubbard 2014; Means & Glader 2014.)

Retikulosyyttejä kutsutaan myös polykromaattisiksi punasoluiksi, koska tutkittaessa MGG- tai supravitaalivärjättyä veren sivelyvalmistetta mikroskoopilla retikulosyytit näkyvät sinisävyisinä. Väritys johtuu niiden sisältämästä jäännös-RNA:sta ja soluorganelleista. Retikulosyytit ovat kooltaan hieman kypsiä punasoluja pienempiä. Koska punasolun elinikä on noin 100-120 vuorokautta ja normaalisti toimiva erytropoieesi tuottaa tasaisesti korvaavia retikulosyyttejä, terveen aikuisen punasolujen retikulosyyttiosuus on

n. 1 %. Vastasyntyneillä retikulosyyttejä on 4-7 %, mutta taso laskee muutamassa vuorokaudessa aikuisten tasolle. Retikulosyyttien määrä kuvaa siis suoraan erythropoieesin aktiiviteettia. (Quigley ym. 2013; Christensen & Ohls 2014; Means & Glader 2014; Rodak & Carr 2017.)

### 3.1 Retikulosyyttien määrittäminen

Retikulosyyttien määrittäminen tehdään Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin alueella pääosin automaattisella solulaskennalla. Käytössä on toimipaikasta riippuen Sysmexin XN-1000- tai XN-2000-sarjan verenkuvan-analysaattoreita ja arkipäivisin retikulosyyttimäärittämiä tehdään 40-60 kappaletta. Näyttemateriaalina käytetään EDTA-kokoverta, joka säilyy analyysikelpoisena huoneenlämmössä vuorokauden ja +4 °C:ssa kolme vuorokautta. Laitteet käyttävät verenkuvan analysoimiseen yhdistelmää impedanssimittauksista, spektrofotometriasta ja virtausytometriasta. Impedanssimittauksilla määritetään erytrosyytit ja trombosyytit, spektrofotometrialla hemoglobiini ja virtausytometrisesti tehdään valkosolujen ja retikulosyyttien laskenta. (Tykslab 2014; Burns 2014.)



Kuva 10. Solupopulaatioiden sijainnit retikulosyyttikanavan hajontakuviassa (Sysmex Europe 2017a).

Virtausytometrin mittaustuloksista muodostetaan hajontakuviot, jossa solut esitetään fyysisten ominaisuuksiensa mukaisesti populaatioina. Kuvassa 9 nähdään retikulosyyttikanavan hajontakuviot, jossa solun nukleiinihapposisältö on esitetty solun tilavuuden

funktiona. Kuvaan on merkitty eri solupopulaatioiden sijainnit hajontakuviassa. Retikulosyytit jaotellaan kuviossa kypsyysasteensa mukaan. LFR eli low fluorescence ratio kuvaa miltei kypsien retikulosyyttien määrää, MFR eli medium-fluorescence ratio puolikypsien retikulosyyttien määrää ja HFR eli high-fluorescence ratio epäkypsiä retikulosyyttejä. Hajontakuvaajassa nähdään myös kypsät punasolut (RBC) ja trombosyytit (PLT). Laite ilmoittaa tulokset myös numeerisessa muodossa. (Sysmex 2016; Sysmex Europe 2017a; Sysmex Europe 2017b.)

### 3.1.1 Käsinlaskenta

Ennen automaattilaitteiden yleistymistä ja kehittymistä retikulosyytit laskettiin käsin mikroskoopin avulla. Käsinlaskentaan joudutaan turvautumaan vielä nykyäänkin, jos analysaattori antaa ajon jälkeen varoituksen ”RET Abn Scattergram”. Se tarkoittaa, että retikulosyyttikanavan hajontakuvio on epänormaali ja laite ei pysty sitä luotettavasti tulkitsemaan. Varoituksia voi tulla mm. näytteen sisältäessä runsaasti erythroblasteja, polykromasiaa, tai punasoluja, joissa on Howell-Jollyn kappaleita tai basofiilistä pilkutusta. (Sysmex 2008.)

Käsinlaskentaa varten tutkittava verinäyte värjätään New Methylene Blue N -supravitaalivärillä. Supravitaalivärjyksellä tarkoitetaan elävien solujen värjäämistä ilman niiden kiinnitystä. Tästä syystä supravitaalivärjätetyt valmisteet eivät säily hyvin, vaan ne pitää mikroskopoida välittömästi valmistamisen jälkeen. New Methylene Blue N värjää retikulosyyttien sisältämän jäännös-RNA:n tummansiniseksi. Kypsät punasolut eivät värjäydy ja näkyvät lasilla haamumaisina. (Schwind 1950; Vanharanta 2010; Smock & Perkins 2014.)

Värjäystä varten pipetoidaan 20 µl hyvin sekoitettua kokoverinäytettä ja 20 µl väriainetta Eppendorf-putkeen, sekoitetaan ja annetaan inkuboitua 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen värjätystä näytteestä tehdään sivelyvalmiste kuten kohdassa 2.2.1. Sivelyvalmisteesta lasketaan 100x öljymmersio-objektiveja käyttäen 30 näkökentästä pelkät retikulosyytit ja joka 10. näkökentästä kaikki punasolut. Joissain laboratorioissa käytetään laskemisen apuna hemosytometriä eli Bürkerin kammiota. Laskemista helpottaa, että sivelyvalmiste on tarpeeksi ohut ja punasolut ovat tasaisesti jakautuneet lasilla. Tulos lasketaan kaavalla 2, jossa x on laskettujen retikulosyyttien määrä ja y on laskettujen punasolujen määrä. (Vanharanta 2010; Smock & Perkins 2014.)

$$E - Retik (\%) = \frac{x}{10y} \cdot 100$$

Kaava 2. Retikulosyyttien osuuden laskeminen (Vanharanta 2010).

Käsinlaskenta on työläs tutkimusmenetelmä ja sen toistettavuus on heikko. Retikulosyyttien tunnistus voi olla vaikeaa, koska myös punasoluinkluusiot, kuten Pappenheimerin, Howell-Jollyn ja Heinzin kappaleet, värjäytyvät supravitaalivärillä. Niiden erottaminen retikulosyyteistä vaatii mikroskopoinnin tekijältä kokemusta ja tarkkuutta. Etenkin Pappenheimerin kappaleita sisältäviä punasoluja voi olla lähes mahdotonta erottaa retikulosyyteistä. Jos näytteen epäillään sisältävän Pappenheimerin kappaleita, voidaan niiden olemassaolo varmistaa käyttämällä rautavärjäystä. Käsinlaskennassa ei myöskään saada tietoa retikulosyyttien kypsyysasteesta. (Burns & Ehsan 2014; Smock & Perkins 2014.)

### 3.2 Retikulosytoosi ja sen aiheuttajat

Retikulosytoosia eli kohonneita retikulosyyttitasoja esiintyy tilanteissa, joissa erytropoieesin toiminta on tehostunut. Yksinkertaisimmillaan syynä voi olla akuutti tai krooninen verenvuoto – erytropoieesi kiihtyy, pyrkii korvaamaan menetetyn veritilavuuden ja seurauksena retikulosyyttien määrä veressä kasvaa. Vuototapauksissa retikulosytoosi on huomattavissa 2-5 vuorokauden viiveellä ja suurin taso saavutetaan 6-11 vuorokauden jälkeen. Toinen syy on intra- tai ekstravaskulaarinen hemolyysi, jossa punasoluja hajoaa tasaista tahtia, ja erytropoieesi kiihtyy vastaavasti. (Means & Glader 2014.)

Koska tämä opinnäytetyö keskittyy fetaalihemoglobiinivärjäyksen käyttöön fetomater-naalivuodon diagnostiikassa, seuraavaksi tarkastellaan muutamia sellaisia retikulosytoosia aiheuttavia tiloja, joita raskaana olevilla naisilla voi todennäköisimmin esiintyä.

#### 3.2.1 Raskausajan raudanpuuteanemian hoito

Odottavan äidin plasmatilavuus kasvaa raskauden aikana n. puolella, mikä johtaa veren laimenemiseen, anemian oireisiin ja erytropoieesin tehostumiseen. Erytropoieesi kuluttaa tavallista enemmän elimistön varastorautaa ja varsinkin raskauden loppupuolella sitä kuluu myös sikiön erytropoieesin tarpeisiin. Viimeisellä raskauskolmanneksella raudankulutus kasvaa jo niin suureksi, että sitä ei pystytä korvaamaan ravinnosta heikosti imeytyvällä raudalla. Raudan lisääntynyt kulutus voi johtaa raudanpuuteanemiaan. Jos äidin



hemoglobiinitaso laskee alle 110 g/l ja laboratoriotutkimukset indikoivat raudanpuutetta, aloitetaan yleensä peroraalinen rautahoito. Hoidon seurauksena erytropoieesi kiihtyy nopeasti saavuttaen maksimitason n. viikon kuluttua aloituksesta, jolloin punasolujen retikulosyyttiosuus kohoaa jopa 5-10 %:iin. Suomessa raskausajan raudanpuuteanemiasta kärsii n. 10-20 % odottavista äideistä. (Goodnough & Nemeth 2014; Tiitinen 2016.)

### 3.2.2 Hemolyyttiset anemiat

Hemolyyttisiä anemioita on montaa tyyppiä, mutta niille kaikille on yhteistä punasolujen ennenaikainen hajoaminen. Hemolyysin seurauksena erytropoieesi kiihtyy luuytimen yrittäessä korvata menetettyjä punasoluja, johtaen retikulosytoosiin. Hemolyysi voi olla niin voimakasta, että punasolujen elinikä ääritapauksissa laskee jopa muutamiin minuutteihin. Retikulosytoosin suuruus kuvaa suoraan taudin vakavuusastetta. Hemolyyttiset anemiat jaetaan hemolyysin aiheuttajan mukaan synnynnäisiin ja hankittuihin. Synnynnäisissä hemolyyttisissä anemioissa aiheuttajana ovat perinnölliset punasolujen rakenteen tai metabolian poikkeavuudet, kun taas hankituissa anemioissa aiheuttajana on jokin ulkopuolinen tekijä, kuten lääkkeiden vaikutus tai punasoluja vastaan syntyneet vasta-aineet. Jako tehdään myös punasolujen hajoamissijainnin mukaan joko intravaskulaariseen tai ekstravaskulaariseen hemolyysiin. (Juvonen & Savolainen 2011; McKenzie 2014b.)

#### **Sferosytoosi:**

Pohjois-Euroopassa yleisin synnynnäinen ja ekstravaskulaarinen hemolyyttinen anemia on sferosytoosi. Se on punasolujen rakenteellinen poikkeavuus, jonka aiheuttaa spektriiniin ja ankyriiniin puute. Spektriini ja ankyriini ovat kalvoproteiineja, joita tarvitaan punasolun sisäisen tukirangan ja solukalvon välisten sidosten muodostamisessa. Niiden puutoksen seurauksena punasolujen morfologia muuttuu. Solut pyöristyvät, niiden pinta-ala/tilavuussuhde pienenee ja ne eivät enää kestä verenkierroa aiheuttamaa mekaanista räsytystä. Tästä johtuen sferosyytit hajoavat pernan imukudoksessa. Erytropoieesi kiihtyy pyrkien kompensoimaan menetettyä veritilavuutta, joten sferosytoosia sairastavien retikulosyyttitaso on taudin vakavuudesta riippuen n. 3-10 %. (Cochrane-Black 2014; Gallagher & Glader 2014.)

### **Autoimmuunit hemolyttiset anemiat:**

Autoimmuuni hemolyttinen anemia eli AIHA on Suomen yleisin hankittu hemolyttinen anemia. Autoimmuunianemioissa muodostuu autovasta-aineita punasolujen pinta-antigeenejä vastaan ja ne jaetaan kahteen tyyppiin: kylmään AIHA:n ja lämpimään AIHA:n. Kylmässä AIHA:ssa autovasta-aineet ovat yleensä IgM-luokkaa ja hemolyysi tapahtuu intravaskulaarisesti. Sitä kutsutaan kylmäksi, koska sen vasta-aineet reagoivat parhaiten alle +30 °C lämpötilassa. Vastaavasti lämpimässä AIHA:ssa vasta-aineet reagoivat parhaiten ruumiinlämmössä. Lämpimän AIHA:n vasta-aineet ovat useimmiten IgG-luokkaa ja hemolyysi tapahtuu ekstravaskulaarisesti pernassa tai maksassa. 70 % autoimmuuneista hemolyttisistä anemioista on lämmintä tyyppiä. Hemolyysi perustuu vasta-aineiden kiinnittymiseen punasoluun tai sen aiheuttamaan komplementin osittaiseen tai täydelliseen aktivaatioon. AIHA:n syntymekanismia ei tunneta tarkkaan, mutta sen voi laukaista mm. bakteeri- ja virustulehdukset, lymfoproliferatiiviset taudit, tietyt lääkkeet ja muut autoimmuunitaudit. Joissain tapauksissa paras AIHA:n hoito onkin hoitaa sitä aiheuttanutta tautia. Myös perinnölliset tekijät, kuten tiettyjen HLA-antigeenien puuttuminen, vaikuttavat AIHA:n saamiseen. Autoimmuunianemioiden diagnostiikkaan käytetään Coombsin testiä, jolla saadaan tunnistettua punasoluihin kiinnittyneet vasta-aineet ja komplementin osat. Retikulosyyttitaso kuvastaa hemolyysin vakavuutta, ja on selvästi koholla. (Smith 2014; Salonen 2015.)

### **3.2.3 Talassemiat eli kvantitatiiviset hemoglobinopatit**

Talassemiot ovat synnynnäisiä ja perinnöllisiä hemolyttisiä anemioita, joissa tiettyjen globiiniketjujen synteesi on häiriintynyt. Niitä kutsutaan myös kvantitatiivisiksi hemoglobinopatioiksi, koska hemoglobiinia ei syntetisoidu normaaleja määriä. Hemoglobiinisynteesiä ohjaa kaksi erillistä geeniryöstä: kromosomissa 16 sijaitseva lokus  $\alpha$ , joka sisältää  $\alpha$ - ja  $\zeta$ -geenit, ja kromosomissa 11 sijaitseva lokus  $\beta$ , joka sisältää  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - ja  $\epsilon$ -geenit. Mutaatiot tai deleetiot globiinisynteesiä ohjaavassa geenissä johtavat sen tyyppin globiinien vajavaiseen tai kokonaan puuttuvaan synteisiin. Talassemiat jaotellaankin vioittuneiden globiinigeenien mukaisesti  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - ja  $\zeta$ -talassemioihin, mutta myös niiden yhdistelmät, kuten  $\delta\beta$ -talassemiat, ovat mahdollisia. Jaottelua tarkennetaan vielä ottamalla huomioon geenivirheen laajuus. Koska aikuistyyppin hemoglobiini koostuu  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjuista,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -talassemiat ovat kliinisesti merkityksellisimpiä. Talassemiat ovat harvinaisia kantasuomalaisten parissa eivätkä juurikaan kuulu suomalaisen tautiperimään.

Muualla maailmassa ne ovat huomattavasti yleisempiä, ja maahanmuuton seurauksena ne ovat yleistymässä myös Suomessa. (Borgna-Pignatti & Galanello 2014; Randolph 2014; Jahnukainen ym. 2016.)

### **HbH-tauti:**

HbH-tauti on  $\alpha$ -talassemian muoto, josta kärsivällä on vain yksi toimiva  $\alpha$ -globiinin synteesiä ohjaava geeni. Se on genotyypiltään  $--/\alpha$ , normaalin genotyypin ollessa  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . Tämä tarkoittaa sitä, että toisessa vastinkromosomissa ei ole ollenkaan synteesiä ohjaavia geenejä ja toisessa vastinkromosomissa on niitä vain yksi. Deleetioiden takia vajavainen  $\alpha$ -ketjujen synteesi johtaa  $\beta$ -ketjujen ylimäärään ja epänormaalien  $\beta_4$ -tetrameerien, joita kutsutaan hemoglobiini H:ksi, rakentumiseen. HbH-taudin seurauksena muodostuu keskivaikea krooninen hemolyyttinen anemia, joka yleensä vielä pahenee raskauden aikana. Hemolyysin takia erytropoiesi kiihtyy huomattavasti ja retikulosyyttien osuus punasoluista on n. 7-10 %. HbH-taudin esiintyminen on yleisintä Kaakkois-Aasian ja Lähi-Idän väestön keskuudessa. (Borgna-Pignatti & Galanello 2014; Randolph 2014.)

### **$\alpha$ -talassemia minor:**

$\alpha$ -talassemia minorista kärsivällä on kaksi toimivaa  $\alpha$ -globiinin synteesiä ohjaavaa geeniä, joten genotyyppi voi olla joko  $-\alpha/-\alpha$  tai  $--/\alpha\alpha$ . Deleetioiden seurauksena  $\alpha$ -globiiniketjujen synteesi vähenee, mutta vähemmän kuin HbH-taudissa. Taudinkuva vaihtelee lähes oireettomasta keskivaikeaan hemolyyttiseen anemiaan. Vaikeimmissa tapauksissa retikulosyyttien osuus punasoluista on n. 5-10 %. (Lehtinen 1998; Randolph 2014.)

### 3.2.4 Kvalitatiiviset hemoglobiнопатiat

Hemoglobiinin rakenteellisia vikoja kutsutaan kvalitatiivisiksi hemoglobiнопатioiksi. Ne johtuvat globiinisynteesiä ohjaavien geenien mutaatioista, joiden seurauksena hemoglobiinin rakenne muuttuu. Rakenteen muuttuessa samalla muuttuvat hemoglobiinin ominaisuudet, kuten esim. happiaffiniteetti, muoto, liukoisuus tai stabiilius. Liukoisuuteen vaikuttaa esim. poolisen animohapon korvautuminen hemoglobiinin rakenteessa poolittomalla hapolla, joka voi johtaa hemoglobiinimolekyylien aggregoitumiseen. Happiaffiniteetin muutokset voivat johtaa korkean affiniteetin tapauksissa krooniseen erytroosyyttiin, ja matalan affiniteetin tapauksissa pseudoanemiaan ja syanoosiin. Epästabiliinien hemoglobiinivarianttien aiheuttamia tiloja kutsutaan synnynnäisiksi Heinzin kappale-anemi-

oiksi, koska niissä muodostuu runsaasti punasoluinkluusioita. Kaikille yhteistä on kuitenkin hemolyysi ja siitä johtuva retikuloosytoosi. Vuoteen 2014 mennessä oli eritelty yli 900 erilaista epänormaalia hemoglobiinityyppejä. Niiden diagnostiikka perustuu hemoglobiinielektroforeesiin ja molekyylibiologisiin tutkimuksiin. (Laudicina 2014.)

### **Sirppisoluanemia ja hemoglobiini S:**

Sirppisoluanemia on maailman yleisin kvalitatiivinen hemoglobinopatia, ja se myös löydettiin ensimmäisenä. Taudille on ominaista puolikuun tai sirpin muotoiset punasolut, ja se johtuu  $\beta$ -ketjun synteesiä ohjaavassa geenissä tapahtuneesta aminohapposubstitutiosta. Sirppisoluanemian kliiniseen kuvaan kuuluu keskivaikea hemolyyttinen anemia, pernan suurentuminen ja ajoittaiset verisuonitukoskriisit. Anemian syynä sirppisolutau-deissa on ekstravaskulaarinen hemolyysi, kun epänormaalit punasolut tuhoutuvat pernan imukudoksessa. Sirppisolujen elinikä voi vaikeimmissa tapauksissa olla vain 14 vuorokautta. Tästä johtuen retikuloosytoosi on yleensä luokkaa 10-20 %, mutta se voi kohota jopa yli 30 %:iin. Sirppisolutaudit ovat yleisimpiä afrikkalaista syntyperää olevien keskuudessa, mutta niitä esiintyy huomattavasti myös intialaisilla, arabialaisilla ja kreikkalaisilla. On ehdotettu, että sirppisolutaudit ovat yleistyneet em. alueilla, koska sirppisolut osittain suojaavat hengenvaarallisilta malariatartunnoilta. (Aidoo ym. 2002; Laudicina 2014.)

## 4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYS

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää eri retikulosyyttitasojen vaikutusta niiden värjäytyvyyteen fetaalihemoglobiinivärjyksessä. Tutkimus tehtiin värjäämällä verinäytteitä, joiden ei pitäisi sisältää fetaalihemoglobiinia ja joiden retikulosyyttitasot ovat korkeat, ja tutkimalla niistä mikroskoopilla värjäytyneiden solujen määrä. Kaikki värjäytyneet solut olivat vääriä positiivisia. Tuloksista pyrittiin löytämään korrelaatio väärien positiivisten määrän ja retikulosyyttitason välillä.

Tavoitteena oli tuottaa lisätietoa Tykslabin kliinisen hematologian erikoislaboratoriolle mahdollista fetaalihemoglobiinin määrittämisen menetelmävaihdosta varten. Opinnäytetyön aihe oli ajankohtainen myös siksi, että talassemiat ja hemoglobiнопатiat ovat yleisyydessä lisääntyneen maahanmuuton seurauksena. Sairaudet ovat hyvin harvinaisia suomalaisessa geeniperimässä, mutta huomattavasti yleisempiä mm. päiväntasaajan alapuolisessa Afrikassa ja Kaakkois-Aasiassa. Terveystieteiden toiminnan kannalta on tärkeää, että aiheeseen liittyvää koulutusta lisätään ja sairauksiin osataan varautua paremmin. (Jahnukainen ym. 2016.)

Tutkimuskysymys:

Miten retikulosyyttitason suuruus vaikuttaa väärien positiivisten tulosten esiintyvyyteen?

## 5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

### 5.1 Käytännön toteutus

Tämän opinnäytetyön aihe saatiin Turun yliopistollisen keskussairaalan klinisen hematologian erikoislaboratoriosta syksyllä 2016.

Opinnäytetyön tutkimusaineistoksi tarvittiin potilasnäytteitä, joiden retikulosyyttitasot olivat koholla. Kirjallisuuden mukaan terveen henkilön normaalitaso (n. 1 %) ei vielä aiheuta vääriä tuloksia, joten aineistoksi toivottiin näytteitä tasoilla 3-10 % (Kleihauer & Betke 1969). Alustavaksi näytemääräksi sovittiin 20 kpl, mutta lopullinen näytemäärä oli 9 kpl. Näyteaineisto kerättiin syyskuun aikana Turun yliopistollisen keskussairaalan automaatti- ja päivystyslaboratorion hematologian linjastolta. Multilabista tarkistettiin päivän retikulosyyttipyyntöjen tulokset ja valittiin niiden joukosta sopivat näytteet. Tutkimukseen sopivista näytteistä tulostettiin analysaattorilta perusveren kuvan ja retikulosyytilaskennan tulokset. Näytteiden keräys tehtiin iltapäivällä, jolloin ei aiheutettu häiriötä linjaston normaalille toiminnalle.

Tulosteet ja näyteputket merkittiin juoksevalla numerolla ja lähetettiin putkipostilla tai kuljetettiin itse klinisen hematologian erikoislaboratorioon. Lasit vedettiin ja kiinnitettiin klinisen hematologian erikoislaboratoriossa. Jokaisesta näytteestä valmistettiin 10 kpl sivelyvalmisteita, jotka kaikki kiinnitettiin ja happokäsiteltiin. Värjäykseen valittiin jokaisesta näytteestä 2-3 kpl edustavinta objektilasia, kiinnittäen erityishuomiota vedon paksuuteen ja tasaisuuteen. Fetaalihemoglobiinivärjäykset tehtiin työohjeen mukaisesti pienissä erissä pyrkien mahdollisimman tasalaatuisiin värjäystuloksiin. Kiinnitettyjä näytteitä säilytettiin ennen värjäystä korkeintaan kolmen päivän ajan, jotta käsittelytapa olisi yhtenäinen varsinaisten potilasnäytteiden kanssa. Värjäyksen parametrit pyrittiin vakioimaan värjäyskertojen kesken. Jokaisessa värjäyksessä oli mukana myös positiivinen ja negatiivinen kontrolli, joiden avulla arvioitiin värjäyksen onnistumista. Värjätyt lasit päällystettiin myöhempää mikroskopiointia varten.

Sivelyvalmisteiden mikroskopiointi tehtiin työohjeen mukaisesti Turun ammattikorkeakoulun hematologian luokassa ja solut laskettiin itsenäisesti kummankin opinnäytetyön tekijän toimesta. Tuloksia ei vertailtu mikroskopiointin aikana, jotta yhden tekijän saamat tulokset eivät vaikuttaisi toisen tekijän laskutuloksiin. Näin saatiin vähennettyä laskiessa

tehtyjen inhimillisten virheiden vaikutusta. Tulokset laskettiin työohjeen kaavalla ja merkittiin ylös Excel-taulukkoon perusveren kuvan tulosten kanssa tilastollista tarkastelua varten. Saaduista tuloksista tarkasteltiin, löytyykö korrelaatiota retikulosyyttitason ja väärin positiivisten värjäystulosten välillä.

## 5.2 Metodologiset lähtökohdat

Tutkimuksellisen opinnäytetyön tarkoituksena on tuottaa uutta tietoa liittyen valittuun tutkimusongelmaan. Kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus perustuu aiempien tutkimusten tulosten soveltamiseen, tutkimuskysymysten rajaamiseen, otoksen valintaan, koejärjestelyjen vakioimiseen, muuttujien muodostamiseen ja niiden tilastolliseen analysointiin. Kokeellisen tutkimuksen ominaispiirteenä on pyrkimys selvittää syy-seuraussuhteita kahden tai useamman muuttujan välillä pyrkien eliminoimaan häiritsevät tekijät ja vakioimaan olosuhteet. (Hirsjärvi ym. 2001; Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.)

Tämä opinnäytetyö oli tyypiltään tutkimuksellinen ja kvantitatiivinen, ja käytännön toteutustapa oli kokeellinen tutkimus. Tässä opinnäytetyössä tutkittavina muuttujina olivat retikulosyyttitaso ja fetaalihemoglobiinivärjäyksen tulos.

## 5.3 Eettiset näkökulmat

Lääke- ja hoitotieteellisessä tutkimuksessa eettiset kysymykset nousevat tärkeään asemaan. Voidaan sanoa, että jo aiheen valinta on eettinen ratkaisu. Aiheen on oltava merkittävä ja hyödyllinen, mutta tutkijan velvollisuutena on myös varmistaa, ettei tutkimuksesta aiheudu haittoja niin tutkimuksen kohteelle kuin tutkimusorganisaatiollekaan. (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2009; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjeiden mukaisesti huomioimalla hyvät tieteelliset käytännöt. Tutkimus tehtiin rehellisesti, eli tuloksia ei väärennetty tai muokattu, tekstiä ei plagioitu, lähteet merkittiin asianmukaisesti ja kaikki opinnäytetyön vaiheet suoritettiin huolellisesti ohjeiden mukaan. Tutkimuksen suorittaminen ei aiheuttanut tutkittavien näytteiden lähteille minkäänlaista haittaa. Kustannuksia syntyi Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen hematologian erikoislaboratoriolle fetaalihemoglobiinivärjäykseen tarvittavista reagensseista ja välineistä, kuten objektilaseista

ja pipetin kärjistä. Tutkimusta tehdessä toimittiin työohjeiden ja terveysalan yleisten eettisten sääntöjen mukaan ja näin varmistettiin tulosten oikeellisuus ja luotettavuus. Näytteiden keräystä ei aloitettu ennen opinnäytetyön toimeksiantosopimuksen hyväksymistä. Tietosuojakysymykset otettiin huomioon tuhoamalla näytteitä kerätessä henkilötiedot ja käyttämällä näytteiden käsittelyssä juoksevaa numerointia. Opinnäytetyön valmistuttua kaikki tutkimusmateriaali tuhottiin voimassaolevien jätteenkäsittelyohjeiden mukaisesti. Värjätyt objektilasit siirrettiin kliinisen hematologian erikoislaboratorion niille tarkoitettuun erityisjäteastiaan ja kirjallinen materiaali laitettiin tietosuoja-astiaan.



## 6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Opinnäytetyön aineisto koostuu yhdeksästä näytteestä (n=9), joiden retikulosyyttitaso vaihteli välillä 1.63 – 13.22 %. Näytteet ja niiden retikulosyyttitasot nähdään taulukossa 2.

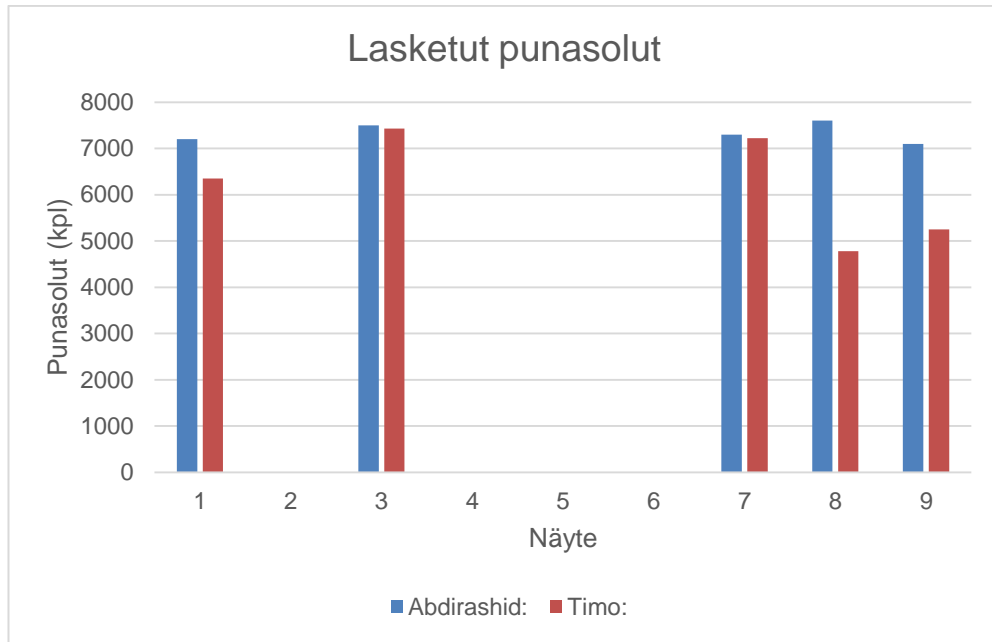
Taulukko 2. Näyttemateriaali.

Näyte:	Retikulosyyttitaso:
1	4.51 %
2	3.86 %
3	7.80 %
4	3.20 %
5	1.81 %
6	1.63 %
7	13.22 %
8	7.54 %
9	5.84 %

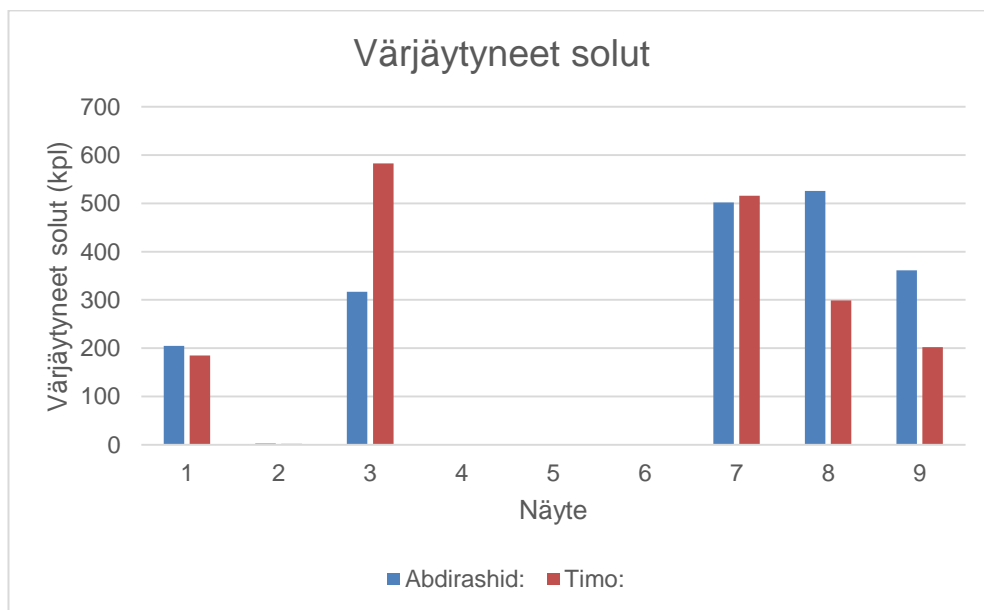
### 6.1 Mikroskopointitulokset

Taulukko 3. Mikroskopointitulokset.

Näyte:	Punasolut:		Värjäytyneet:	
	Abdirashid:	Timo:	Abdirashid:	Timo:
1	7200	6350	205	185
2			3	2
3	7500	7430	317	583
4			0	0
5			0	0
6			0	0
7	7300	7220	502	516
8	7600	4780	526	299
9	7100	5250	361	202



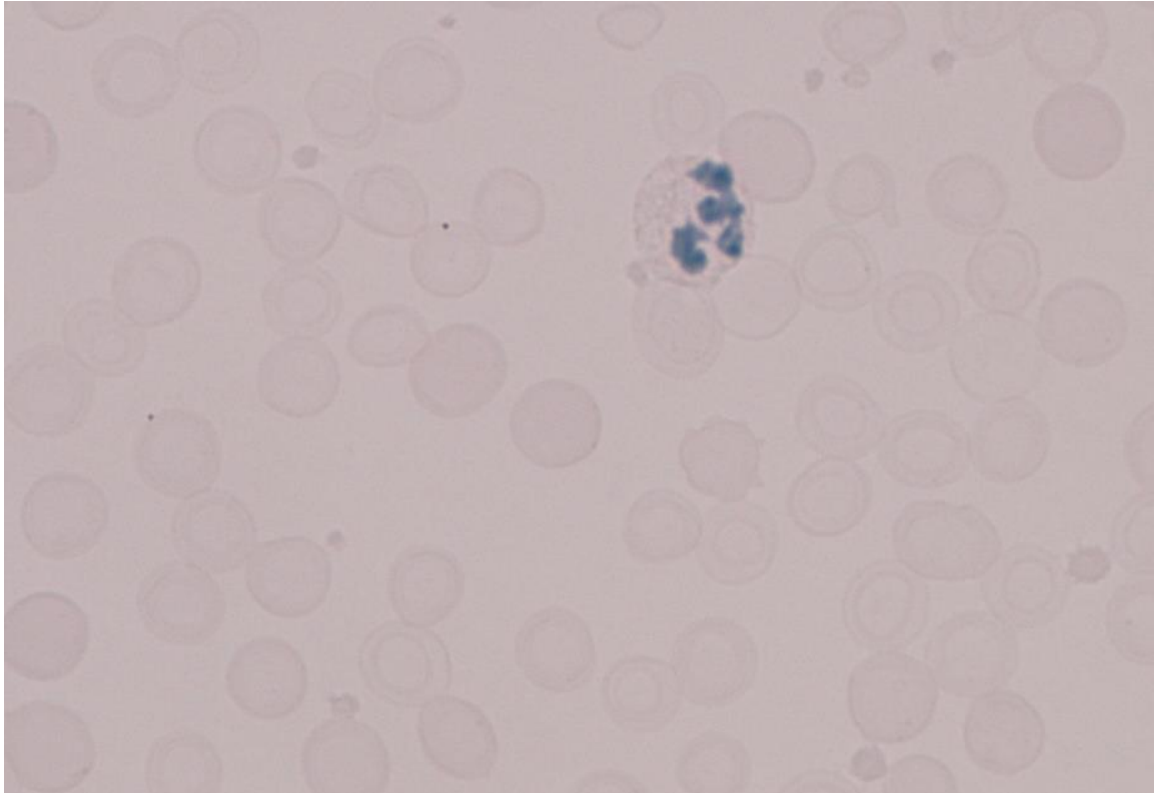
Kuvio 1. Mikroskopointitulokset: Lasketut punasolut.



Kuvio 2. Mikroskopointitulokset: Värjäytyneet solut.

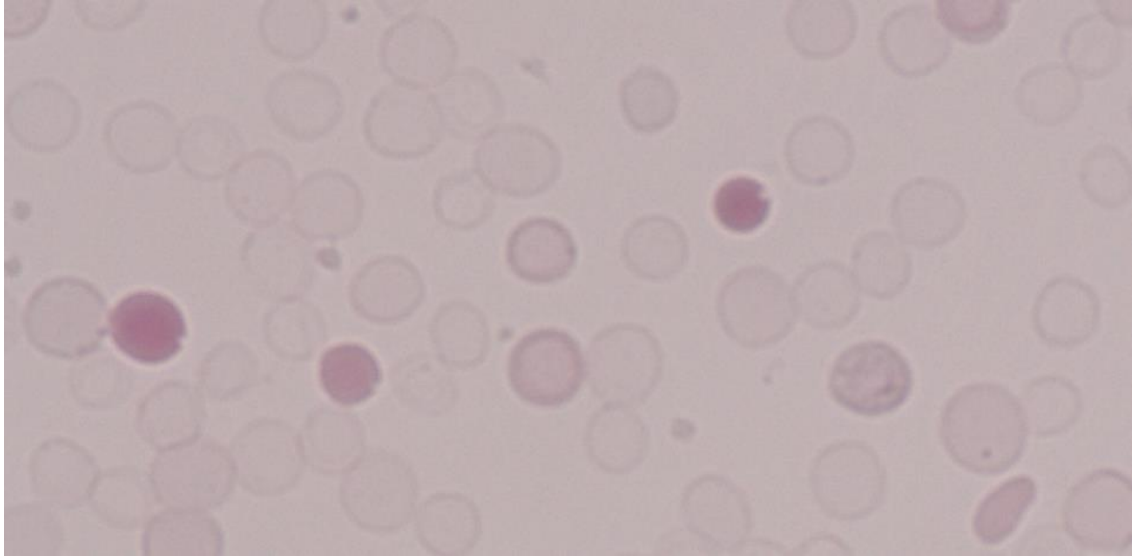
Taulukossa 3 ja kuvioissa 1 ja 2 on esitetty saadut mikroskopointitulokset ja rinnakkais- tulosten eriäväisyydet. Näytteessä 2 värjäytyneiden solujen määrä oli niin pieni, että koko objektilasi käytiin läpi työhohjeen (Vanharanta 2012.) mukaisesti. Soluja löydettiin vain yksittäisiä, joten punasolujen laskeminen ei ollut tarpeellista. Näytteistä 4, 5 ja 6 ei löy- detty koko valmisteen tarkastelun jälkeen yhtään värjäytynyttä solua. Objektilasin kaikki

punasolut olivat kuvan 11 mukaisesti haamumaisia. Tulokset ovat odotusten mukaisia, sillä näytteiden 2 ja 4 retikulosyyttitasot olivat suhteellisen matalat. Kleihauerin ja Betken (1969) mukaan matalilla retikulosyyttitasoilla solut eivät värjäynty fetaalihemoglobiini-värjäyksessä eikä siten vääriä positiivisia esiinny. Näytteet 5 ja 6 olivat mukana negatiivisina kontrolleina.



Kuva 11. Negatiivinen värjäystulos.

Rinnakkaistuloksia (taulukko 3) tarkastelemalla nähdään, että näytteissä 8 ja 9 on huomattavia eroja laskettujen punasolujen määrissä. Toisaalta myös värjäytyneiden solujen määrä on lähes samassa suhteessa matalampi. Eroja laskettujen punasolujen määrissä voidaan selittää mikroskopoitujen sivelyvalmisteiden vaihtelevalla paksuudella. Ohuessa sivelyvalmisteessa on näkökenttää kohden vähemmän soluja, joten myös kokonaismäärä jää matalammaksi. Näytteessä 3 nähdään selvä ero värjäytyneiden solujen määrässä, vaikka laskettujen punasolujen määrä oli miltei identtinen. Varsinaista syytä tähän ei löydetty, sillä kokonaissolutiheys oli sama, ja sivelyvalmisteet pipetoitiin, kiinnitettiin ja värjättiin samalla kertaa. Mahdollisesti syynä oli erot värjäytyneiden solujen tulokinnassa mikroskopioiden välillä. Havainto korostaa solulaskennan tekijän kokemuksen tärkeyttä.

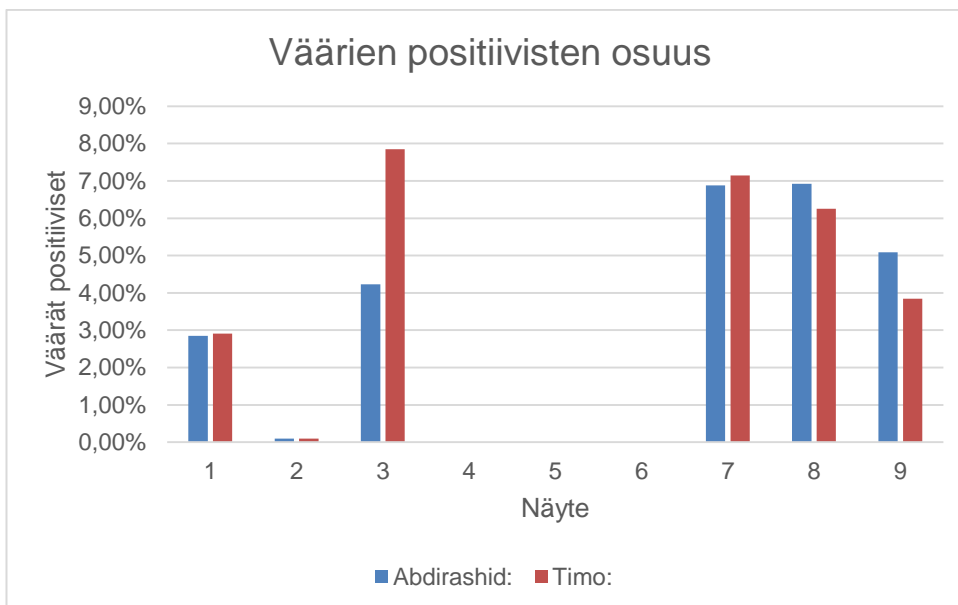


Kuva 12. Vääriä positiivisia löydöksiä.

Seuraavaksi laskettiin näytteiden sisältämän fetaalihemoglobiinin prosenttiosuudet työohjeen (Vanharanta 2012.) kaavalla. Koska näytteet eivät tosiasiasa sisältäneet fetaalihemoglobiinia, kutsutaan värjäytyneitä soluja tästedes vääriksi positiivisiksi. Kuvassa 12 on näkymä näytteestä 8. Huomataan, että osa soluista ovat selvästi värjäytyneet, vaikka näyte ei sisältänyt fetaalihemoglobiinia.

Taulukko 4. Rinnakkaistulokset väärin positiivisten osuuksista.

Abdirashid:		Timo:		Retikulosyyttitaso:
Näyte:	Osuus %	Näyte:	Osuus %	
1	2.85 %	1	2.91 %	4.51 %
2	0.10 %	2	0.10 %	3.86 %
3	4.23 %	3	7.85 %	7.80 %
4	0.00 %	4	0.00 %	3.20 %
5	0.00 %	5	0.00 %	1.81 %
6	0.00 %	6	0.00 %	1.63 %
7	6.88 %	7	7.15 %	13.22 %
8	6.92 %	8	6.26 %	7.54 %
9	5.08 %	9	3.85 %	5.84 %

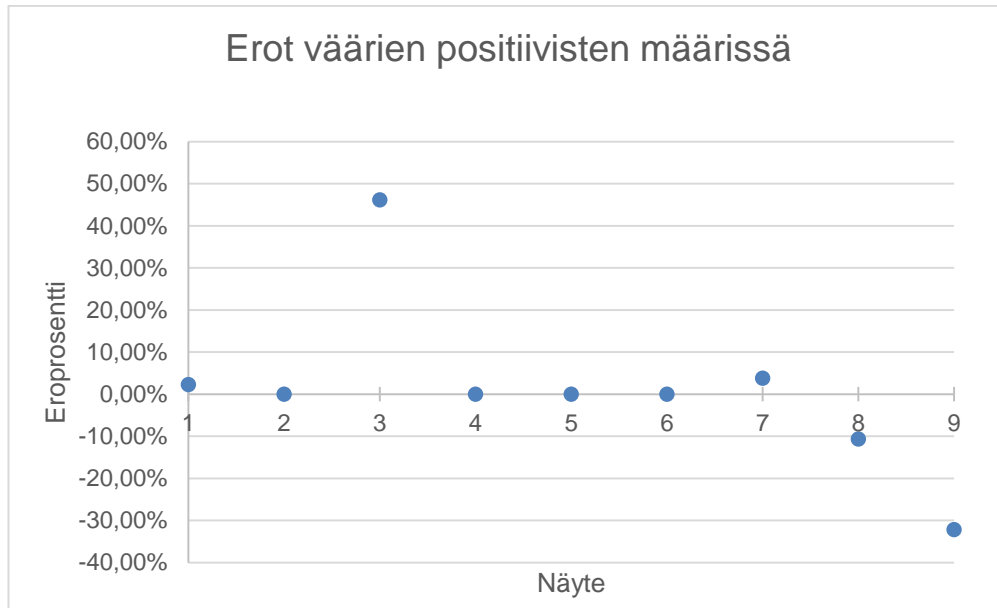


Kuvio 3. Rinnakaistulokset väriiden positiivisten osuuksista.

Taulukossa 4 ja kuviossa 3 on esitetty lasketut rinnakaistulokset. Kuvioista nähdään, että rinnakaistuloksissa ei ole suuria eroja, pois lukien näyte 3. Minkäänlaista systemaattista virhettä, missä toinen tekijöistä olisi laskenut joka näytteestä enemmän värjäytyneitä soluja, ei havaita. Tarkastellaan eroprosentteja ja absoluuttista eroa rinnakaistulosten välillä.

Taulukko 5. Erot rinnakaistulosten välillä.

Näyte:	Abdirashid:	Timo:	Ero (%):	Ero (absoluuttinen):
1	2.85 %	2.91 %	2.27 %	0.07 %
2	0.10 %	0.10 %	0.00 %	0.00 %
3	4.23 %	7.85 %	46.13 %	3.62 %
4	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
5	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
6	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
7	6.88 %	7.15 %	3.78 %	0.27 %
8	6.92 %	6.26 %	10.64 %	0.67 %
9	5.08 %	3.85 %	32.15 %	1.24 %



Kuvio 4. Eroprosentti rinnakkaistuloksissa.

Rinnakkaistulosten ero prosentit on esitetty taulukossa 5 ja graafisesti kuviossa 4. Kuten aikaisemmin todettiin, näytteessä 3 rinnakkaistulosten ero on huomattava, miltei 50%. Vaikka taulukon 3 perusteella näytteissä 8 ja 9 ei todettu olevan suuria eroja, ero prosentteja tarkastelemalla tämä väite huomataan vääräksi.

Taulukko 6. Väärien positiivisten tulosten keskiarvot näytteittäin.

Näyte:	Abdirashid:	Timo:	Keskiarvo:
1	2.85 %	2.91 %	2.88 %
2	0.10 %	0.10 %	0.10 %
3	4.23 %	7.85 %	6.04 %
4	0.00 %	0.00 %	0.00 %
5	0.00 %	0.00 %	0.00 %
6	0.00 %	0.00 %	0.00 %
7	6.88 %	7.15 %	7.01 %
8	6.92 %	6.26 %	6.59 %
9	5.08 %	3.85 %	4.47 %

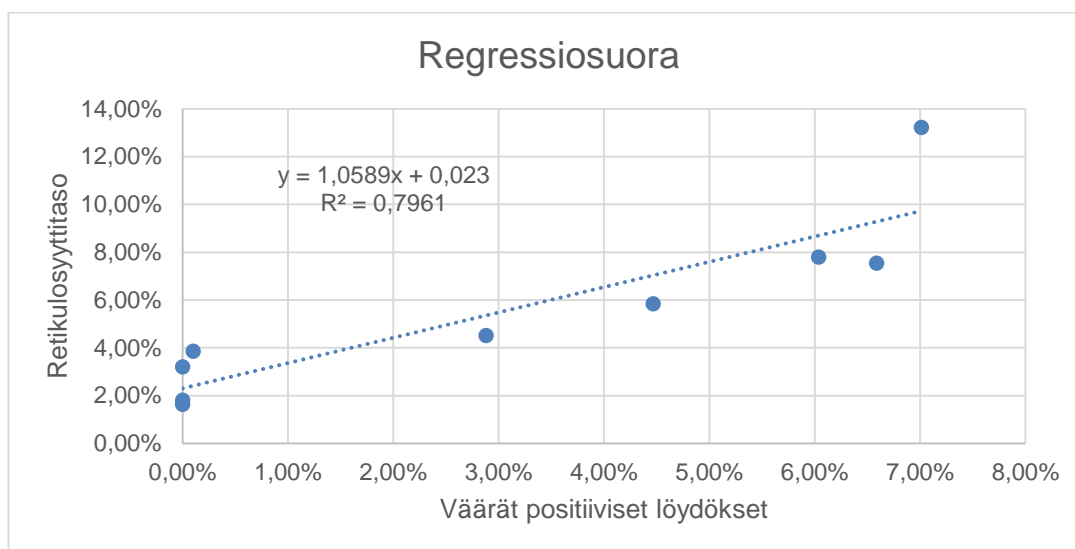
Seuraavaksi laskettiin keskiarvot rinnakkaistuloksista lopullisten tulosten vertailua varten. Saadut keskiarvot on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 7. Väärin positiivisten löydösten keskiarvot verrattuna näytteiden retikulosyyttitasoon.

Näyte:	Keskiarvo:	Retikulosyyttitaso:
1	2.88 %	4.51 %
2	0.10 %	3.86 %
3	6.04 %	7.80 %
4	0.00 %	3.20 %
5	0.00 %	1.81 %
6	0.00 %	1.63 %
7	7.01 %	13.22 %
8	6.59 %	7.54 %
9	4.47 %	5.84 %

Taulukossa 7 on esitetty lasketut keskiarvot verrattuna näytteiden retikulosyyttitasoon. Nähdään selvästi, että matalilla retikulosyyttitasoilla ei esiinny väriä positiivisia. Tulosten perusteella retikulosyyttitason cutoff-arvo väärin positiivisten esiintymiselle on välillä 3-4 %. Vähäisen näytemäärän takia ei kuitenkaan voida tehdä merkittävämpiä johtopäätöksiä.

## 6.2 Tilastollinen tarkastelu



Kuvio 5. Regressiosuora.

Lineaarisen regressioanalyysin tarkoituksena on löytää syy-seuraussuhde kahden tutkitavan muuttujan välillä, ja pyrkiä esittämään suhde matemaattisesti. Toista muuttujaa kutsutaan selittäväksi ja toista selitettäväksi muuttujaksi. (Holopainen & Pulkkinen 2002.) Tämän opinnäytetyön tapauksessa selittävä muuttuja on retikulosyyttitaso, ja selitettävä muuttuja on väärin positiivisten löydösten prosentiosuus. Hypoteesinamme on, että väärin löydösten osuus riippuu retikulosyyttitason suuruudesta. Tämän takia taso kuvataan osuuden funktiona.

Kuviossa 5 regressiosuoran kaavaksi saadaan  $y = 1.0589x + 0.023$  ja suoran selityssasteeksi 0,7961.  $R^2$  eli selityssaste kuvaa mallin sopivuutta annettuun dataan. Se kertoo, montako prosenttia selitettävän muuttujan arvoista on selitettävässä selittävän muuttujan arvoilla ja kuvaa suoraan muuttujien välistä lineaarista riippuvuutta. Mitä korkeampi selityssaste on, sitä paremmin matemaattinen malli toimii. (Holopainen & Pulkkinen 2002.) Saamamme selityssaste 0,7961 tarkoittaa, että 79,6 % vääristä positiivisista löydöksistä voidaan selittää retikulosyyttitason suuruudella.

Toinen tärkeä tilastollinen tunnusluku muuttujien välisen lineaarisen riippuvuuden kuvaamisessa on korrelaatiokerroin. Se mittaa riippuvuuden voimakkuutta ja vaihtelee välillä  $-1 \dots 1$ . Kertoimen ollessa  $-1$  muuttujien välillä on täydellinen käänteinen riippuvuus, kun taas sen ollessa  $1$  riippuvuus on täydellisesti positiivinen. Jos kerroin on  $0$ , lineaarista



riippuvuutta muuttujien välillä ei ole. Korrelaatiota kutsutaan voimakkaaksi, jos korrelaatiokerroin oli yli 0,7 tai alle -0,7. (Holopainen & Pulkkinen 2002.) Saimme korrelaatiokerroimeksi 0,89, mikä kuvaa voimakasta positiivista korrelaatiota.

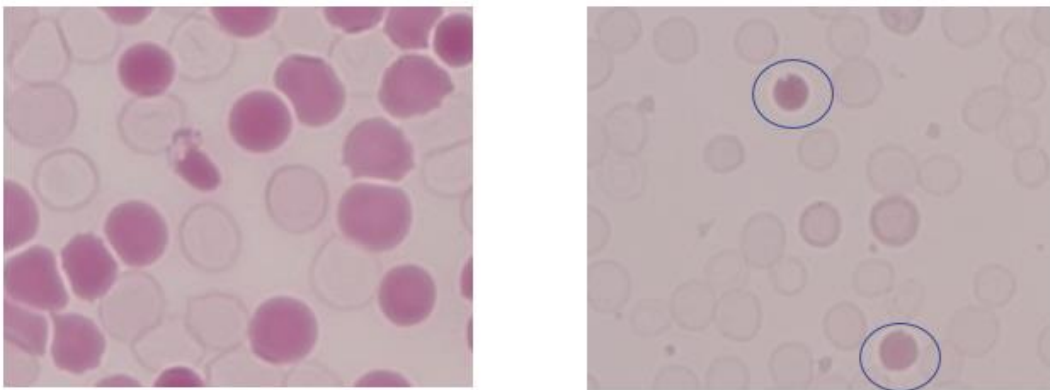
Tilastollisen analyysin merkitsevyyttä kuvataan p-arvon avulla. Sen avulla kuvataan, johduvatko muuttujien väliset riippuvuudet sattumasta vai todellisesta korrelaatiosta. Yleisesti ottaen suurin p-arvo, jota voidaan kutsua tilastollisesti merkittäväksi, on 0,05. Tässä tilanteessa 5 % löydöksistä voidaan selittää sattumalla. Mitä pienempi p-arvo on, sitä merkitsevämpi saatu tulos on. (Holopainen & Pulkkinen 2002.) P-arvoksi (kaksisuuntainen, erisuuret varianssit) saimme 0.13. Tulokset eivät siis ole tilastollisesti merkityksellisiä.

### 6.3 Loppupäätelmät

Retikulosyyttitason ja fetaalihemoglobiinivärjäyksessä havaittujen väärien positiivisten löydösten välillä on vahva positiivinen korrelaatio, mutta tulos ei ole tilastollisesti merkitsevä (r=0,89; n=9; p-arvo 0,13), pääosin näytemäärän pienuuden vuoksi. Tulokset vastaavat aikaisemmassa kirjallisuudessa esitettyjä väitteitä ja havaintoja. Tästä syystä ehdotamme, että fetaalihemoglobiinivärjäyspyynnön yhteydessä tutkittaisiin aina myös potilaan retikulosyyttitaso. Näin mikroskopioija pystyisi varautumaan mahdollisiin vääriin positiivisiin löydöksiin ja olemaan kenties kriittisempi soluja laskiessa.

## 7 POHDINTA JA JATKOTUTKIMUSAIHEET

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa lisätietoa klinisen hematologian erikoislaboratoriolle fetaalihemoglobiinin määrittämisen mahdollista menetelmänvaihtoa varten. Opinnäytetyön katalyyttinä oli vuonna 2016 sattunut tapaus, missä potilaan fetomater-naalivuoto oli arvioitu väärin. Saimme osoitettua, että korkeat retikulosyyttitasot todella-kin voivat johtaa väärin positiivisiin löydöksiin fetaalihemoglobiinivärjäyksessä. Tulos vastaa aikaisemman kirjallisuuden havaintoja.



Kuva 13. Rinnakkaisvertailu: Oikea löydös ja väärä positiivinen löydös.

Kuvassa 13 vasemmalla on kontrollilasilta otettu kuva, jossa on sikiön verestä peräisin olevia fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja. Oikealla on kuva saamistamme vääristä positiivisista löydöksistä. Kuvan kontrollilasi ja näytelasi ovat samalta värjäysker-ralta, joten niiden pitäisi olla täysin vertailukelpoisia. Kuvia vertailemalla nähdään sel-västi, että retikulosyytit voivat värjäytyä hyvinkin samannäköisesti kuin oikeat löydökset. Näiden erottaminen vaatii mikroskopoinnin tekijältä vankkaa ammattitaitoa. Jos värjäys-ten tekemistä jatketaan, voisi ennakkotieto näytteen retikulosyyttitasosta olla avuksi te-  
kijälle. Lisäksi koska korkeita retikulosyyttitasoja havaitaan värjäyksen yhteydessä hyvin harvoin, mahdollisesti tällaiset näytteet voitaisiin myös lähettää Huslabiin tarkistetta-vaksi. Siitä syntyisi lisäkustannuksia, mutta vuositasolla ne eivät olisi ylitsepääsemättö-mät.

Valtaosa muista Suomen laboratorioista on jo ulkoistanut tutkimuksen Huslabiin. Tutki-mus on kuitenkin niin harvinainen, että sen tekeminen omilla laitteilla ei luultavasti olisi

käynnistys-, validointi- ja reagenssikustannusten takia järkevää. Fetaalihemoglobiinivärystä ei nytkään tehdä päivystystutkimuksena, joten 1-2 päivän viive näytteen Helsinkiin analysoitavaksi lähettämisestä ei muuttaisi nykytilannetta merkittävästi.

## 7.1 Luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuuden arviointi voidaan jakaa kahteen osa-alueeseen: reliabiliteettiin ja validiteettiin. Reliabiliteetilla mitataan tutkimustulosten toistettavuutta. Se kuvaa tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Käytännössä kvantitatiivisissa tutkimuksissa, kuten tässä opinnäytetyössä, reliabiliteettia arvioidaan tilastollisten tunnuslukujen kautta. Validiteetilla eli pätevyydellä tarkoitetaan sitä, mittaako tutkimus niitä asioita, joita sen on tarkoitus mitata. (Hirsjärvi ym. 2001.)

Tässä opinnäytetyössä toistettavuus otettiin huomioon vakioimalla näytteiden käsittelyolosuhteet, soveltamalla potilasnäytteiden käsittelykriteerejä omaan työhömmä ja suorittamalla solulaskennat sokkona rinnakkain. Myös tutkimusprosessi kuvattiin niin, että se pystytään toistamaan kuvauksen perusteella tulevaisuudessa. Validiteetti huomioitiin käytännössä näytevalinnassa. Valitsimme näytteitä, joiden retikulosyyttitaso oli korkea mutta eivät sisältäneet fetaalihemoglobiinia. Näin varmistettiin, että kaikki värjäytyneet solut olivat todellakin vääriä positiivisia löydöksiä.

Fetaalihemoglobiinivärjäyksiä harjoittelimme klinisen hematologian erikoislaboratorion henkilökunnan kanssa ja värjäyksissä pyrittiin vakioimaan olosuhteet. Käytimme tuoreita väriaineita ja reagenssit valmistettiin työohjeen mukaisesti joka värjäyskerralle erikseen. Jokaisessa värjäyksessä värjäsimme myös kontrollilasin, jonka perusteella arvioimme värjäyksen onnistumista. Jos kontrollilasi ei värjäytynyt odotetulla tavalla, värjäys toistettiin uusilla lasilla. Kontrolleja käyttämällä saimme varmistettua myös näytelasien värjäyksen onnistumisen.

Tutkimuksemme luotettavuutta heikentää se, että aikataulullisista syistä johtuen näytteiden keräämistä ei päästy aloittamaan alkuperäisen suunnitelman mukaan kesällä 2017. Tästä syystä näytemäärä jäi puoleen suunnitellusta. Tavoitteena oli saada kerättyä rinnakkaisnäytteet samansuuruisilta retikulosyyttitasoilta luotettavuuden lisäämiseksi. Jo etukäteen oli tiedossa, että korkeampien tasojen saaminen mukaan näyteaineistoon tulisi olemaan käytännössä onnenkauppaa. Retikulosyyttien määrittäminen ei ole yleisesti tilattu tutkimus, ja korkeisiin tasoihin johtavat tilat ja sairaudet ovat nekin harvinaisia. Suurin

osa näytteistämme oli peräisin hematologian osaston potilailta. Olisimme voineet kerätä näyteaineistoa kasvattaaksemme useita päivittäin esiintyviä 3-4 % -tason näytteitä, mutta koska aikaisemman kirjallisuuden perusteella niissä tuskin olisi esiintynyt haluamiamme vääriä positiivisia löydöksiä, emme näin tehneet.

Koska näytemäärä jäi pieneksi (n=9) ja mukana oli useita normaalin retikulosyyttitason näytteitä, myös tulosten tilastollinen merkitsevyys jäi vajaaksi. Tekemiämme tilastollisia analyysejä ei yleensä edes tehdä näin pienellä otoksella, koska saadut tulokset eivät ole luotettavia eivätkä vertailukelpoisia.

Jälkikäteen ajateltuna olisimme pystyneet parantamaan opinnäytetyömme luotettavuutta monin pienin keinoin. Mikroskoipoimme molemmat omat lasimme, joka johti suuriin eroihin mm. laskettujen punasolujen kokonaismäärässä. Parempi metodi olisi ollut valita edustavin objektilasi joka näytteelle ja laskea niistä solut kahteen kertaan kummankin tekijän toimesta. Samoin näytteen retikulosyyttitaso oli tiedossamme ennen solulaskentaa, mikä saattoi alitajuisesti vaikuttaa laskennan tuloksiin. Olisimme voineet käyttää apuna kolmatta osapuolta, joka olisi vielä kerran anonymisoinut objektilasit ennen laskentaa. Tärkein ja yksinkertaisin keino olisi ollut näytemäärän kasvattaminen.

## 7.2 Eettisyys

Bioanalyytikon jokapäiväiseen työhön kuuluu henkilötietojen, salaisten potilastietojen ja analyysitulosten käsittely. Tästä syystä salassapitovelvollisuus on ehdoton ja pidimme yllä tätä periaatetta opinnäytetyötämme tehdessä. Tietosuojamateriaalia käsitellessä siitä poistettiin yksilöivät henkilötiedot ja näytteet numeroitiin. Analyyseistä ei aiheutunut laboratoriolle lisäkustannuksia, koska opinnäytetyössämme käytettiin vain sellaisia näytteitä, joista retikulosyyttimääritys oli hoitoyksikön puolesta jo pyydetty. Tämän takia ei myöskään tarvittu näytteenottoa pelkästään opinnäytetyötä varten eikä siten opinnäytetyön tekemisestä aiheutunut ylimääräistä kärsimystä potilaille. Mikroskopointituloksia ei muuteltu, vaikka niissä esiintyi suuriakin eroja.

## 7.3 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyöprosessi oli opettavainen kokemus. Opinnäytetyön aihe oli ennen prosessin aloittamista suurimmaksi osin täysin vieras, joten tutustuminen pintaa syvemmillä

aiheeseen oli mielenkiintoista ja palkitsevaa. Tiedonhakuprosessi oli haastava, mutta päädyimme keskittymään muutamaan hematologian alan laajaan englanninkieliseen perusteokseen vertaisarvioitujen artikkelien lisäksi. Lähdemateriaalin teksti oli haastavaa, mutta sen siihen perehtyminen laajensi myös englanninkielisen ammattisanaston hallintaa. Suurimpia ongelmia aiheutti aikataulutuksen ja varsinkin opinnäytetyön toteutusvaiheiden välissä ollut kesäloma, jonka takia aikataulujen yhteensovittaminen oli hankalaa. Opponenttimme olivat huolissaan opinnäytetyön laajuudesta ja näytteiden keräämisen vaikeudesta jo suunnitteluvaiheessa, ja jälkepäin tarkasteltuna kritiikki oli osuvaa. Opinnäytetyöprosessi toi esiin aikataulutuksen ja suunnittelun merkityksen.

#### 7.4 Jatkotutkimusaiheet

Doshi ym. (2016) ehdottavat, että retikulosyyttitasoa voitaisiin käyttää korjauskertoimena värjäystulosten laskennassa. Heidän laskukaavansa ottaa huomioon äidin hematokriitin ja retikulosyyttitason. Voitaisiin tutkia fetomaternaali- ja sikiön veren määrän erilaisten laskukaavojen soveltumista ja todenmukaisuutta verrattuna nykyisiin Tykslabissa käytettyyn kaavaan. Toiseksi Kleihauer ja Betke (1969) esittävät, että retikulosyyttien aiheuttamat väärät positiiviset saadaan poistettua käsittelemällä verinäyte supravitaalivärillä ennen fetaalihemoglobiinivärjäystä. Voitaisiin valmistaa ”hybridinäytteitä” korkean retikulosyyttitason verinäytteistä lisäämällä niihin pieni määrä sikiön verta, käsittelemällä ne supravitaalivärillä ja suorittamalla fetaalihemoglobiinivärjäys. Verrokkina voitaisiin käyttää näyttettä, johon ei oltu lisätty sikiön verta, ja verrata lasien värjäystuloksia. Lopuksi tutkimus voitaisiin toistaa suuremmalla näytemäärällä paremman tilastollisen tarkkuuden saavuttamiseksi tai jos talon sisäiseen menetelmämuutokseen päädytään, opinnäytetyön voisi tehdä virtausytometrisen menetelmän validoinnista.

## LÄHTEET

Aidoo, M.; Terlouw, D.; Kolczak, M.; McElroy, P.; O ter Kulle, F.; Kariuki, S.; Nahlen, B.; A Lal, A. & Venkatachalam, U. 2002. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 359, 1311-1312.

Arias, F. 1984. High-risk pregnancy and delivery. Missouri: Mosby.

Bancroft, J. & Layton, C. 2013. The hematoxylin and eosin. Teoksessa: K. Suvarna; C. Layton & J. Bancroft (toim.). 2013. Bancroft's theory and practice of histological techniques. Lontoo: Churchill Livingstone, 173-186.

Burns, C. 2014. Automation in hematology and hemostasis. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 928-954.

Burns, C. & Ehsan, A. 2014. Hematology procedures. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 876-921.

Borgna-Pignatti, C. & Galanello, R. Thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 862-913.

Christensen, R. & Ohls, R. 2014. Anemias unique to the fetus and neonate. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1018-1031.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2004. Methods for Reticulocyte Counting. Viitattu 12.9.2017. <http://demo.nextlab.ir/getattachment/37cc5b50-33c7-401c-9ce9-92435c598163/CLSI-H44-A2.aspx>

Cochrane-Black, D. 2014. Hemolytic anemia: Membrane defects. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 372-392.

Ehsan, A. 2014. Bone marrow examination. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 913-928.

Doshi K.; Shastry, S.; Shivhare, A. & Raturi, M. 2016. Cellular mimicry in Kleihauer-Betke assay. *Global Journal of Transfusion Medicine* 1, 85-87. Viitattu 28.3.2017. <http://www.gjtonline.com/article.asp?issn=2455-8893;year=2016;volume=1;issue=2;spage=85;epage=87;aulast=Doshi>

Fabry, M. & Old, J. 2009. Laboratory methods for diagnosis and evaluation of hemoglobin disorders. Teoksessa M. Steinberg; B. Forget; D. Higgs. & D. Weatherall (toim.) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge: Cambridge University Press, 658-686.

Gallagher, P. & Glader, B. 2014. Hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis, and other disorders associated with abnormalities of the erythrocyte membrane. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 707-727.

Givan, A. 2001. Flow Cytometry – First principles. New York: Wiley-Liss.

Goodnough, L. & Nemeth, E. 2014. Iron deficiency and related disorders. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 617-642.

- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2001. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.
- Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2002. Tilastolliset menetelmät. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit.
- Hubbard, J. 2014. The Erythrocyte. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 98-122.
- HUSLAB 2016. Tutkimustiedote 2016:15. Uusi, herkkä tutkimus fetomaternaalivuodon havaitsemiseksi (6335 B -HbF-Fc). Viitattu 10.9.2017. [https://huslab.fi/ohjekirjan\\_liitteet/tutkimustiedotteet/tutkimustiedotteet\\_2016/2016\\_15\\_uusi\\_herkka\\_tutkimus\\_fetomaternaalivuodon\\_havaitsemiseksi.pdf](https://huslab.fi/ohjekirjan_liitteet/tutkimustiedotteet/tutkimustiedotteet_2016/2016_15_uusi_herkka_tutkimus_fetomaternaalivuodon_havaitsemiseksi.pdf)
- Jahnukainen, K.; Helminen-Pacius, P.; Anttonen, A.; Matinlauri, I.; Mustanoja, S.; Sirkiä, K. & Wartiovaara-Kautto, U. 2016. Maahanmuuttajien perinnölliset hemoglobiinipoikkeavuudet. Lääkärilehti 12-13, 901-905.
- Juvonen, E. & Savolainen, E. 2011. Hemolyttinen anemia. Teoksessa: J. Jousimaa, H. Alenius, S. Atula, A. Kattainen, I. Kunnamo & M. Teikari (toim.). Lääkärin käsikirja, 532-533. Hämeenlinna: Karisto.
- Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2009. Tutkimus hoitotieteessä. Helsinki: WSOYpro.
- Karikoski, R. 2011. Istukan histopatologisen tutkimuksen merkitys. Duodecim 127(5), 464-72. Viitattu 14.9.2017. <http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2011/5/duo99382>
- Kemi, S. 2013. Sivelyvalmisteen tekeminen. 7073070 Kliininen hematologia ja immunoematologia, opintojakson oppimateriaali. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Kleihauer, E.; Braun, H. & Betke, K. 1957. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs. Klinische Wochenschrift 35, 637-638.
- Kleihauer, E. & Betke K. 1969. The acid elution technique and the question of the influence of membrane qualities on its results. Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale 49, 151-156. Viitattu 28.3.2017. <http://lib.itg.be/open/asbmt/1969/1969asbm0151.pdf>
- Köpke, J. & Köpke J. 1986. Reticulocytes. Clinical Laboratory Hematology 8, 169-179. Viitattu 9.9.2017. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2257.1986.tb00093.x/epdf>
- Laudicina, R. 2014. Hemoglobinopathies: Qualitative defects. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 259-281.
- Lehtinen, M. 1998. Maahanmuuttajan hematologiaa. Duodecim 114 (12), 1210-1217. Viitattu 22.3.2017. <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo80265.pdf>
- Macey, M. 2007. Flow Cytometry – Principles and applications. Totowa: Humana Press.
- McKenzie, S. 2014a. Hemoglobin. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 123-142.
- McKenzie, S. 2014b. Introduction to hemolytic anemia. Teoksessa S. McKenzie (toim.) Clinical Laboratory Hematology. Harlow: Pearson, 360-370.
- Means, R. & Glader, B. 2014. Anemia: General considerations. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F., Paraskevas & G. Rodgers (toim.) Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 587-616.
- Nordlab 2017. Fetomaternaalisen vuodon arviointi: Muutoksia laboratoriotutkimuksissa. Viitattu 4.4.2017. [http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf\\_uploads/21\\_2017.pdf](http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/21_2017.pdf)

- Porra, V.; Bernaud, J.; Gueret, P.; Bricca, P.; Rigal, D.; Follea, G. & Blanchard, D. 2007. Identification and quantitation of fetal red blood cells in maternal blood by dual-color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. *Transfusion* 47, 1281-1289.
- Porwit, A. 2014. Clinical flow cytometry. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F., Paraskevas & G. Rodgers (toim.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 19-45.
- Quigley, J.; Means, R. & Glader, B. 2014. The birth, life and death of red blood cells: Erythropoiesis, the mature blood cell, and cell destruction. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F., Paraskevas & G. Rodgers (toim.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 83-124.
- Quinn, C.; Eder, A. & Manno, C. 2014. Hemolytic disease of the fetus and newborn. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 766-784.
- Radiometer 2008. Radiometer ABL800 FLEX Reference manual. Viitattu 12.9.2017. <http://www3.hscni.net/stlabs/webhb/poct/documents/poct%20abl800%20man.pdf>
- Randolph, T. 2014. Thalassemia. Teoksessa S. McKenzie (toim.) *Clinical Laboratory Hematology*. Harlow: Pearson, 283-310.
- Rodak, B. & Carr, J. 2017. *Clinical Hematology Atlas*. St Louis: Elsevier.
- Salonen, J. 2015. Punasolujen kiihtynyt hajoaminen (hemolyttinen anemia). Viitattu 8.9.2017. [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00923](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00923)
- Savolainen, E-R. & Tienhaara, A. 2015. Verinäytteet ja morfologiset tutkimukset. Teoksessa: *Veritaudit*. Helsinki: Duodecim.
- Schwind, J. 1950. The supravital method in the study of the cytology of blood and marrow cells. *Blood* 5, 597-622. Viitattu 13.9.2017. <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/5/7/597.full.pdf>
- Sigma-Aldrich 2014. Procedure No. 285: Fetal hemoglobin. Viitattu 10.9.2017. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General\\_Information/1/285.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/285.pdf)
- Smith, L. 2014. Hemolytic anemia: Immune anemias. Teoksessa S. McKenzie (toim.) *Clinical Laboratory Hematology*. Harlow: Pearson, 409-439.
- Smock, K. & Perkins, S. 2014. Examination of the blood and bone marrow. Teoksessa J. Greer, D. Arber, B. Glader, R. Means, F. Paraskevas & G. Rodgers (toim.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1-18.
- Stefanovic, V. 2016. Fetomaternal hemorrhage complicated pregnancy: Risks, identification, and management. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 28, 86–94.
- Stephens, A.; Angastiniotis, M.; Baysal, E.; Chan, V.; Davis, B.; Fucharoen, S.; Giordano, P.; Hoyer, J.; Mosca, A. & Wild, B. 2012. International Council for Standardization in Haematology: ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin F. *International Journal of Laboratory Hematology* 34(1):14-20. Viitattu 12.9.2017. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-553X.2011.01367.x/pdf>
- Sysmex 2008. Flagging Interpretation Guide. Viitattu 12.9.2017. [http://www.sysmexeducation.com/content/uploaded\\_resources/05%20XE-Series%20Flagging%20Guide%2012-2008%20complete-20110708-114552.pdf](http://www.sysmexeducation.com/content/uploaded_resources/05%20XE-Series%20Flagging%20Guide%2012-2008%20complete-20110708-114552.pdf)



Sysmex 2016. Sysmex educational enhancement and development: The importance of reticulocyte detection. Viitattu 9.9.2017. [https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/SEED/Sysmex\\_SEED\\_The\\_importance\\_of\\_reticulocyte\\_detection.pdf](https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/SEED/Sysmex_SEED_The_importance_of_reticulocyte_detection.pdf)

Sysmex Europe 2017a. Sysmex Academy: Fluorescence flow cytometry. Viitattu 11.9.2017. <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>

Sysmex Europe 2017b. Sysmex Academy: RET channel. Viitattu 11.9.2017. <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.html>

Thein, S. & Wood, W. 2009. The molecular basis of  $\beta$  thalassemia,  $\beta\delta$  thalassemia, and hereditary persistence of fetal hemoglobin. Teoksessa M. Steinberg; B. Forget; D. Higgs. & D. Weatherall (toim.) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge: Cambridge University Press, 323-356.

Thom, C.; Dickson, C.; Olson, J.; Gell, D. & Weiss, M. 2015. Normal and abnormal hemoglobins. Teoksessa S. Orkin, E. Fisher, D. Ginsburg, T. Look, S. Lux & D. Nathan (toim.) Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. Philadelphia: Elsevier, 630-672.

Turgeon, M. 2007. Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: Concepts, procedures, and clinical applications. St. Louis: Elsevier Mosby.

Tiitinen, A. 2016. Raskaus ja anemia. Viitattu 21.3.2017. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00882](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00882)

Turkia, H. 2017. Erikoistuva sairaalakemisti Turun yliopistollisessa keskussairaalassa. Haastattelu 9.3.2017.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Viitattu 4.4.2017. [http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)

Tykslab 2014. E-retikulosyytit. Viitattu 13.9.2017. <https://webohjekerja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=2582>

Ulander, V-M.; Ämmälä, P.; Sjöberg, J. & Lehtovirta, P. 2002. Massiivinen fetomaternalivuoto – salakavala ja vakava raskauskomplikaatio. Duodecim 118 (6), 621-624. Viitattu 3.3.2017. <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo92850.pdf>

Vanharanta, R. 2010. Työohje: E-Retikulosyytit, (vitaalivärjäys), %. Tykslab laatukäsikirja.

Vanharanta, R. 2013. Työohje: Fetaalihemoglobiini, värjäys. Tykslab laatukäsikirja.

Wallin, O. 2008. Preanalytical errors in hospitals: Implications for quality improvement of blood sample collection. Väitöskirja. Uumajan yliopisto. Viitattu 21.3.2017. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:141788/FULLTEXT01.pdf>

Wylie, B. & D'Alton, M. 2010. Fetomaternal Hemorrhage. Obstetrics & Gynecology 115, 1039-1051.

World Health Organization 1992. ICSH guidelines for reticulocyte counting by microscopy on supravitaly stained preparations. Viitattu 12.9.2017. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/61756>

# Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

**TURKU AMK**  
TURKU UNIVERSITY OF  
APPLIED SCIENCES

1

## OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

### 1. Osapuolet

#### Opiskelija

Nimi: Abdirashid Warsame	S-posti: abdirashid.warsame@edu.turkuamk.fi
[REDACTED]	
Koulutus: Bioanalyttikko	

Nimi: Timo Erkkilä	S-posti: timo.l.erkkila@edu.turkuamk.fi
[REDACTED]	
Koulutus:	

Nimi:	S-posti:
Osoite:	Puhelin:
Koulutus:	

#### Toimeksiantaja

Yhteyshenkilön nimi: Riitta-Liisa Karjalainen	Organisaatio: Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri
Osoite: Kiinamyyllykatu 4-8 PL 52, 20521 Turku	
S-posti: riitta-liisa.karjalainen@tyks.fi	Puhelin: 02 313 0000

Turun ammattikorkeakoulu Oy  
Joukahaisenkatu 3 A  
20520 Turku  
puh. (02) 263 350  
www.turkuamk.fi

Y-tunnus  
2528160-3

**TURKU AMK**  
TURKU UNIVERSITY OF  
APPLIED SCIENCES

**TURKU AMK**  
TURKU UNIVERSITY OF  
APPLIED SCIENCES

2

#### Turun ammattikorkeakoulu Oy

Yhteyshenkilö/ohjaaja: Marko Björn	Puhelin: [REDACTED]
S-posti: marko.bjorn@turkuamk.fi	

#### 2. Ohjaus ja vastuut

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta ja arvioinnista oppimistehtävänä. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemiseen tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

#### 3. Oikeudet

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu sen tekijälle eli opiskelijalle. Jos ohjaajan osuus opinnäytetyön tulosten aikaansaamiseksi on ollut poikkeuksellisesti niin luova ja omaperäinen, että se on tekijänoikeudellisesti suojattu muodostamatta kuitenkaan opiskelijan työstä erotettavissa olevaa itsenäistä osaa, on opiskelijalla ja ohjaajalla teokseen yhteinen tekijänoikeus, jonka ehtoista asianomaiset sopivat tarvittaessa erikseen. Muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa, kyseistä oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

#### 4. Työsuhde ja kustannukset

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkkiosta ja työstä (opinnäytetyöstä) mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja, opinnäytetyön tekijä ja ammattikorkeakoulu sopivat erikseen.

#### 5. Tulosten julkistaminen ja luottamuksellisuus

Opiskelija laatii Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukaisen dokumentaation opinnäytetyöstä, jonka hän luovuttaa toimeksiantajalle ja toimittaa kansitettuna kirjaston lainakokoelmaan tai Open Access -julkaisuna Theseus-tietokantaan.

Opiskelija laatii opinnäytetyön julkistettavan aineiston siten, ettei se sisällä toimeksiantajan liike- tai ammattisalaisuuksia eikä mahdollisia muita salassa pidettäväksi sovitteja tietoja tai aineistoja, eikä myöskään julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta 621/1999) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja. Edellä tarkoitetut tiedot ja aineisto jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkistettava että salassa pidettävä osa.

Tämän sopimuksen osana noudatetaan Turun AMK:n opinnäytetyön toimeksiantosopimuksen salassapitoehtoja. ( Rasti nuutuun, mikäli salassapitoehtojen noudattamisesta sovitaan.) Salassapitoehtoja sovellettaessa on niiden edellyttämä salassapitovelvollisuus voimassa viisi (5) vuotta toimeksiantosopimuksen voimaan astumisesta.

Opiskelija toimittaa toimeksiantajan yhteyshenkilölle julkistettavan opinnäytetyön tutustumista ja lausunnon antamista varten viimeistään 14 päivää ennen aiottua työn julkistamisajankohtaa. Toimeksiantaja toimittaa opiskelijalle lausunnon opinnäytetyöstä ennen sen ilmoitettua

**TURKU AMK**TURKU UNIVERSITY OF  
APPLIED SCIENCES

3

julkistamisajankohtaa ja määrittelee lausunnossaan tarvittaessa työhön mahdollisesti sisältyvät julkistamatta jätettävät tiedot ja aineistot.

Ellei toimeksiantaja toimita opiskelijalle lausuntoa ennen ilmoitettua julkistamisajankohtaa tai ei lausunnossaan esitä luottamuksellisuuden vuoksi poistettavaksi tietoja opinnäytetyön julkistettavaksi aiotusta aineistosta, katsotaan toimeksiantajan hyväksyneen opinnäytetyön julkistamisen opiskelijan sille toimittamassa muodossa.

Opinnäytetyö on julkistettavissa kokonaisuudessaan. Se ei sisällä luottamuksellista tietoa. (Rasti ruutuun, mikäli asia on tiedossa jo toimeksiantovaiheessa.)

Opinnäytetyön aihe: Retikulosyytien vaikutus fetaalihemoglobiinivärjäyksen tuloksiin

Seuraavia opinnäytetyön sisältämiä aineistoja ja tietoja ei julkisteta:

Turku CRC:n raportin nro 6/17

Tutkimusnumero T163/2017

Työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittämisen  
tutkimusryhmän -koulutuksessa

liite 1

## 6. Sopimuksen voimassaolo ja allekirjoitukset

Tämän sopimuksen osapuolina allekirjoittaneet hyväksyvät edellä esitetyt ehdot ja sitoutuvat toimimaan opinnäytetyön toteutuksessa niiden mukaisesti. Tämän sopimuksen allekirjoituksin Turun ammattikorkeakoulu Oy hyväksyy edellä yksilöidyn opinnäytetyön aiheen. Tämä sopimus astuu voimaan, kun kaikki osapuolet ovat sen allekirjoittaneet, ja voimassaolo lakkaa automaattisesti kolmen (3) vuoden kuluttua voimaan astumisesta tai sitä ennen opinnäytetyön valmistuttua.

Turku 8 19 17 (pp.kk.vvvv)  
(Paikka)  
Toimeksiantajaorganisaatio

*Susann Brunell* osastopäällikö  
Nimen selvennys/ titteli *os 933*  
*Susann Brunell*

1 1 (pp.kk.vvvv)  
(Paikka)  
Turun ammattikorkeakoulu Oy

*Mikko Rosen*  
Nimen selvennys, KT-päällikkö/KT-päällikön  
valtuuttamana

6 1 9 2017 (pp.kk.vvvv)  
(Paikka) Turku  
Opiskelija

*Timo Erkkilä*  
Nimen selvennys, opiskelija

6 1 9 2017 (pp.kk.vvvv)  
(Paikka) Turku

*Abdirashid Warsame*  
Nimen selvennys, opiskelija

1 1 (pp.kk.vvvv)  
(Paikka)

Nimen selvennys opiskelija

### LIITTEET

Opinnäytetyösuunnitelma   
Salassapitoehdot

# Emoprojektin tutkimuslupa

**TURKU AMK**  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

*Liite 1.*

## VARSINAIS-SUOMEN SAIRAANHOITOPIIRI

TUTKIMUSLUPAHAKEMUS

1 / 3

Tällä lomakkeella haetaan sairaanhoitopiirin tutkimuslupaa. Jos kyseessä on rekisteritutkimus tai aikaisemmin kerättyistä näytteistä tehtävä tutkimus käytetään lomaketta YHT 52a.

TurkuCRC täyttää

Lupapäätösnumero	Lupa myönnetty ajalle	Tutkimuksen projektinumero
6/17 TYKSLAB	2017 - 2019	_____

<p><b>1. Tutkimusnumero</b></p> <p>T163/2017 (Esim. T1/2015)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Uusi tutkimus <input type="checkbox"/> Muutos vanhaan tutkimuslupaan. Mitä muutos koskee?</p>
<p><b>2. Tutkimuksen nimi</b></p> <p>Työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittäminen bioanalytiikko-koulutuksissa</p> <p>Tutkimuksen lyhenne/koodi (pakollinen tieto)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Tutkijalähtöinen tutkimus <input type="checkbox"/> Toimeksiantajalähtöinen tutkimus, toimeksiantaja</p>
<p><b>3. VSSHP:n vastuullinen tutkija</b> (Nimi, toimialue, sähköposti, puhelinnumero)</p> <p>Marko Björn, TtM, Turun amk marko.bjorn@turkuamk.fi</p> <p><b>Yhteyshenkilö</b> (Nimi, sähköposti, puhelinnumero)</p> <p>Heidi Kalve, projektipäällikkö (Biodigi), lehtori, Turun amk heidi.kalve@turkuamk.fi, puh. [REDACTED]</p>
<p><b>4. Tutkimuksen aikataulu vuosina</b> (lupa myönnetään pääsääntöisesti enintään viideksi vuodeksi)</p> <p>2017 - 2019</p>
<p><b>5a. Tutkittavien arvioitu lukumäärä VSSHP:ssä</b></p> <p>-</p>
<p><b>5b. Normaalihoitoon kuulumattomien tutkimuskäyntien lukumäärä/tutkittava</b></p> <p>-</p>
<p><b>6. Sisäiset ostopalvelut</b></p>

YHT 50a VSSHP 10.2015

**VARSINAIS-SUOMEN  
SAIRAANHOITOPIIRI**

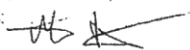
TUTKIMUSLUPAHAKEMUS

3 / 3

**Vastuullisen tutkijan allekirjoitus**

Allekirjoituksellani sitoudun noudattamaan VSSHP:n terveystieteellisen tutkimuksen ohjeistoa (www.turkucrc.fi) sekä hyvää tutkimustapaa ja tieteellistä käytäntöä. Mahdolliset epäilyt hyvän tieteellisen käytännön loukkaamisesta käsitellään noudattaen Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjetta "Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa (www.tenk.fi).

Päiväys: 30.5.2017

Allekirjoitus: 

Nimiselvennys: Marko Björn

Virka/toimi: päätoiminen tuntiopettaja/Turun amk

**Lomake toimitetaan liitteineen TurkuCRC:hen (rakennus 9, 2 kerros)**

TurkuCRC toimittaa lomakkeen puollettavaksi ja hyväksyttäväksi. Saatte lupapäätöksen sähköpostiinne.

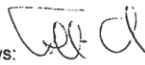
**Toimialueen, palvelualueen, tulosalueen tai liikelaitoksen  
TUTKIMUKSEN JA OPETUKSEN VASTUUHENKILÖN PUOLTO**


Päätösnumero:

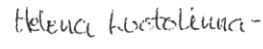
Päiväys: 11/6/17

Allekirjoitus

Nimiselvennys:

  
Eskki Eerola

  
Benita Paloheina

  
Helena Huotoniemi  
hybeck


**Toimialueen, palvelualueen, tulosalueen tai liikelaitoksen johtajan päätös  
tai johtajaylilääkärin päätös, VSSHP:n tutkimuslupa**

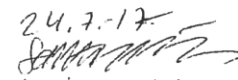
Päätösnumero:

Päiväys:

Allekirjoitus

Nimiselvennys:

  
Paula Grönroos

24.7.17  
  
 Satu Jääskeläinen

**Jakelu:**

- vastuullinen tutkija
- tutkimuksen puoltanut tutkimuksen ja opetuksen vastuuhenkilö
- tarjouksen antaneet palveluyksiköt
- taloushallinnon palvelukeskus
- yhteyshenkilö

**VARSINAIS-SUOMEN  
SAIRAANHOITOPIIRI**

TUTKIMUSLUPAHAKEMUS

2 / 3

<input type="checkbox"/> Tykslab	<input type="checkbox"/> Tyks mikrobiologia ja genetiikka
<input type="checkbox"/> Varsinais-Suomen kuvantamiskeskus	<input type="checkbox"/> Kliininen fysiologia
<input type="checkbox"/> Patologia	<input type="checkbox"/> PET-keskus
<input type="checkbox"/> VS lääkehuolto	<input type="checkbox"/> Kliininen tietopalvelu
<input type="checkbox"/> Kliininen neurofysiologia	<input type="checkbox"/> muu, mikä

**7. Kustannukset**

Kustannukset katetaan jo olemassa olevalta projektinumerolta \_\_\_\_\_ (esim. 17065 tai 13705).

Tutkimukselle perustetaan uusi projektinnumero.

Ei tutkimuksesta aiheutuvia kustannuksia, jotka laskutettaisiin VSSHP:n projektinumeron kautta

**8. Lyhyt selvitys toimialueen resurssien käytöstä (tarvittaessa liitteenä)**

Käytetään VSSHP:n tiloja tai laitteita. Mitä ja kenen kanssa asiasta on sovittu?

Tarvitaan tutkimukseen kuulumattoman henkilökunnan (esim. sihteerien) työpanosta.

Käytetään VSSHP:n muita resursseja.

Lisää selvitys kaikista valituista kohdista.  
Tutkimus suoritetaan VSSHP:n tiloissa, Tykslab ja kliininen neurofysiologia

**9. Muut tutkimukseen osallistuvat tutkijat**  
(Nimi, toimialue)

**10. Opinnäytetyön tai väitöskirjan suorittaja**  
(Nimi, sähköpostiosoite, puhelinnumero)

**Ohjaajat**

**11. Tutkimuksen/ opinnäytetyön ala**

lääketiede, erikoisala:

hammaslääketiede

hoitotiede/hoitotyö, Valitse painopistealue

olen ollut yhteydessä yksiköihin, jossa aion opinnäytetyön suorittaa

muu, mikä

**12. Onko tutkimus rekisteröity julkiseen tutkimusrekisteriin (ClinicalTrials.gov)?**

Kyllä, NCTnumero \_\_\_\_\_

Ei, miksi?  kyseessä ei ole interventiotutkimus

muu syy, mikä

**LIITTEET**

<input type="checkbox"/> kustannuserittely (valmis excel-pohja tai vapaamuotoinen)	<input type="checkbox"/> Valviran lupa
<input checked="" type="checkbox"/> tutkimussuunnitelma tai sen yhteenvedo	<input type="checkbox"/> THL:n lupa
<input type="checkbox"/> sisäiset ostopalvelusopimukset	<input type="checkbox"/> Muu viranomainen, mikä
<input type="checkbox"/> tutkimusopimus ja/tai muu rahoituspäätös	<input checked="" type="checkbox"/> tieteellisen tutkimuksen rekisteriseloste
<input type="checkbox"/> eettisen toimikunnan puoltava lausunto	
<input type="checkbox"/> Fimean käsittelyilmoitus	

YHT 50a VSSHP 10.2015