

Vuokko Kamunen

Kuvallinen histologian värjäysohjekansio Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorioon

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

2.5.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Vuokko Kamunen Kuvallinen histologian värjäysohjekansio Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorioon. 47 sivua 2.5.2018
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Yliopettaja Riitta Lumme Laboratoriohoitaja Tarja Hakala
<p>Tämän tuotteellisen opinnäytetyön tuotoksena syntyi täydennetty histologian värjäysohjekansio Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorioon Kemiin. Värjäysohjekansio sisältää 29 histologian värjäyksen työohjetta, sekä niiden tulokset, periaatteet ja indikaatiot. Alkuperäisessä ohjekansiossa ei ollut lainkaan kuvia värjäyksistä ja käyttöturvallisuustiedot olivat saatavilla EcoOnline kemikaalidokumentaation hallintajärjestelmästä, ja osa tulosteina erillisessä kansiossa useamman sivun dokumentteina.</p> <p>Täydennys on tarpeellinen, jotta patologian laboratorion työntekijöillä on helppo hahmottaa värjäyksen onnistuminen ja näin patologeille päätyy laadukkaita kudosvärjäyksiä lausuttavaksi. Tässä opinnäytetyössä kansiota täydennettiin 21 onnistuneen kudosvärjäyksen kuvilla. Työ rajattiin työelämän toiveesta 21 värjäykseen, sillä osa värjäyksistä on harvoin käytössä tai paljon aikaa vieviä. Sekä jokaisen värjäyksen yhteyteen liitettiin tiivistetty reagenssien käyttöturvallisuustieto, sillä kemikaalien käsittelyyn ja hävittämiseen liittyvät seikat on hyvä olla helposti saatavilla ja nopeasti omaksuttavissa.</p> <p>Opinnäytetyötä varten tehtiin kirjallisuuskatsaus kansioon kuvattavista värjäyksistä, sekä kuvaus hyvän värjäysohjeen ominaisuuksista. Työn käytännön toteutuksessa leikattiin mikrotomilla kudosleikkeet, jotka värjättiin ja kuvattiin kansioon liitettäväksi. Tämän lisäksi värjäysohjekansion muotoilua yhtenäistettiin.</p> <p>Täydennetty värjäysohjekansio on ulkoasultaan yhtenäinen ja sisältää kuvat, joiden avulla voidaan arvioida värjäysten lopputulosten onnistumista. Työohje- ja käyttöturvallisuussivu voidaan pitää mukana värjäyksiä tehdessä ja kemikaalien käsittely ja hävitysohjeet nähdään siitä helposti. Täydennetty värjäysohjekansio jää Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorion käyttöön. Tarvittaessa kuvien vapauttamista laajempaan käyttöön voidaan harkita, esimerkiksi muihin työohjeisiin ja oppimateriaaleihin. Raporttiin koottua teorialtietoa voivat hyödyntää esimerkiksi bioanalyttikko-opiskelijat tutustuessaan histologian erikoisvärjäyksiin.</p>	
Avainsanat	histologia, kudosvärjäykset, erikoisvärjäykset, työohje

Author(s) Title Number of Pages Date	Vuokko Kamunen Illustrated Histological Staining Instructions for the Länsi-Pohja Health Care District Pathology Laboratory 47 pages 2 May 2018
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	
Instructor(s)	Riitta Lumme, Principal Lecturer Tarja Hakala, Biomedical Laboratory Scientist
<p>This thesis is a product creational project, which produced an improved histological staining instructions folder for the pathology laboratory of the Länsi-Pohja health care district, located in Kemi. The instructions folder contains instructions for 29 histological stains and their results, principles and indications. In the original folder, there were no pictures and the safety data was only available in the EcoOnline chemical documentation management system and in some cases as multi-page printouts in a separate folder.</p> <p>The complemented folder is necessary, so that the staff of the pathology laboratory can more easily identify if the staining results are successful or not, which ensures that the pathologists get good quality stains to examine. In this thesis, the folder was complemented with images of 21 successful tissue stains. The number of stains was limited to 21, as requested by the laboratory staff, because some of the stains are rarely used and very time consuming. Operational safety data sheets were also added for each stain, because information on the safe use and disposal of the needed chemicals should be easily accessible and quickly graspable.</p> <p>For this thesis, a literary review was conducted on the stains photographed for the folder. Also a description of good staining instructions was added. In the practical part of the project, tissue slides were cut with a microtome, dyed, and photographed to be added in the folder. In addition, the individual instructions were formatted to be uniform throughout the folder.</p> <p>The improved staining instructions folder is more uniform in its layout and includes images that can be used in evaluating the successfulness of the staining results. The safety data sheets are easy to carry along while one is performing the staining procedures, and information on the use and disposal of the chemicals is easily observable. The improved folder will remain in the use of the pathology laboratory of the Länsi-Pohja health care district. The images can be freed for wider use, for example other work instructions or as study material. The compiled theoretical information on the different histological stains can be used, for example, by biomedical laboratory science students as a resource in their studies.</p>	
Keywords	histology, tissue stains, special stains, work instructions

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	2
3	Histologinen prosessi patologian laboratoriossa	2
4	Histologiset värjäykset	4
4.1	Hematoksyliini-eosiini	5
4.2	Perjodihappo-Schiff	6
4.2.1	Alcian sininen-PAS	8
4.2.2	Diastaasi-PAS ja diastaasi-AB-PAS	9
4.3	Van Gieson	10
4.4	Herovici	11
4.5	Kongonpuna	12
4.6	Verhoeff	13
4.7	Giemsa	14
4.8	Ziehl-Neelsen	16
4.9	Hopeavärjäykset	17
4.9.1	Fontana Masson	17
4.9.2	Grimelius	18
4.9.3	Wartin-Starry	19
4.9.4	Gomorin retikuliinivärjäys	20
4.9.5	Bielschowsky	21
4.10	Berliininsini	22
4.11	Kuparin osoitus rodaniinilla	23
4.12	Leder	24
5	Värjäysreagenssien käyttöturvallisuus	25
6	Hyvä työohje	26
6.1	Ohjeistavan tekstin kirjoitus	27
6.2	Kuvien käyttö ohjeessa	27
6.3	Patologian laboratorion värjäystyöohje	28
7	Opinnäytetyön toteutus	29
7.1	Toimintaympäristö	29

7.2	Värjäysohjeiden tekoprosessi	30
8	Histologian värjäysohjekansion kuvaus	34
9	Pohdinta	39
9.1	Prosessin ja tuotteen arviointi	39
9.2	Luotettavuus ja eettisyys	41
9.3	Työn hyödynnettävyys	41
	Lähteet	43

1 Johdanto

Histologia tieteenalana tutkii solujen ja kudosten mikroskooppisia rakenteita. Tällöin tiettyjä solun ulkoisia ja sisäisiä rakenteita visualisoidaan mikroskooppisella tasolla käyttäen apuna värejä, jotka reagoivat tiettyjen kudskomponenttien kanssa. Histologisia värjäyksiä käytetään runsaasti patologiassa, koska ne ovat suhteellisen halpoja ja helposti toteutettavia. Niiden avulla voidaan tunnistaa useita eri solutyyppisiä, ja ne tuottavat korvaamatonta tietoa solurakenteista, kudosten morfologiasta ja tiettyihin sairauksiin liittyvistä rakenteellisista muutoksista. (Veuthey – Herrera – Doderio 2014:91-92.)

Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin (LPSHP) patologian laboratorio toimii Länsi-Pohjan keskussairaalan tiloissa, ja siellä tutkitaan patologian alan näytteitä niin sairaalan, kuin myös sairaanhoitopiirin muiden yksiköiden tarpeisiin. Näin se on mukana potilaan hoidossa, taudin määrittelyssä sekä hoidon seurannassa. (Patologian yksikkö 2017.) Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on täydentää patologian laboratoriossa käytössä olevaa histologian värjäysohjekansiota. Kansio sisältää erikoisvärjäysten ohjeet ja periaatteet. Kansioon lisätään käyttöturvallisuustiedotteiden pääkohtia ja liitetään onnistuneista erikoisvärjäyksistä kuvat. Täydennys tehdään, jotta patologian laboratorion työntekijöillä, töihin tulevilla uusilla työntekijöillä ja opiskelijoilla olisi helpompi hahmottaa, ovatko värjäykset onnistuneita. Näin myös patologeille päätyy lausuttavaksi laadukkaita kudolvärjäyksiä. Lisäksi täydennys auttaa ottamaan huomioon kemikaalien käsittelyyn ja hävittämiseen liittyviä seikkoja, sillä ne ovat helposti nähtävillä värjäysohjeen yhteydessä. Näin säästetään aikaa, kun ei tarvitse etsiä reagenssien oikeita käsittely- tai hävittämisohjeita muualta.

Värjäysohjekansion lisäksi on laadittu myös tämä opinnäytetyönraportti. Raportti sisältää patologian prosessin kuvauksen, sekä ohjekansioon kuvatuista erikoisvärjäyksistä teoriatietaa. Tämä osio on mukana siksi, että saadaan selkeä kuva värjättävien värjäysten periaatteesta ja indikaatiosta. Raportissa ei käsitellä värjäyksiä sen laajemmin, koska niitä on useita, ja kattavampi kuvaus kasvattaisi työn määrää suhteettomasti. Värjäysten lisäksi käydään läpi patologian laboratoriossa tarvittavien värjäysreagenssien käyttöturvallisuutta ja otetaan selvää, millainen on toimiva työohje patologian laboratorion käyttöön. Lopuksi kerrotaan, miten opinnäytetyö on edennyt suunnitteluvaiheesta toteutukseen ja valmiiseen työhön ja pohditaan työn jatkokäyttöä.

2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Tämä opinnäytetyön tarkoituksena on täydentää Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorion histologian värjäysohjekansiota. Patologian laboratorion histologian värjäysohjekansion täydennys on tärkeä, sillä aiempi ohjekansio on puutteellinen kuvien osalta. Tässä työssä värjäysohjeita ei ole tarkoitus muuttaa, mutta ohjeisiin toivottiin lisättäväksi kuvia onnistuneista värjäyksistä. Lisäksi jokaiseen ohjeeseen on tarkoitus liittää käyttöturvallisuustiedotteista työskentelyn kannalta olennaisimpia asioita ja kemikaalien hävitysohjeita. Tämän tyyppinen ohjeiden täydennys on tarpeen, jotta laboratorioon töihin tulevat uudet työntekijät sekä opiskelijat voivat nähdä heti värjäysohjetta lukiessaan, miltä värjäyksen kuuluu näyttää valmiina ja onnistuessaan, sillä kaikkien värjäysten lopputulokset eivät ole itsestään selviä patologian laboratoriossa ensimmäistä kertaa työskenteleville ja työtä opiskeleville bioanalytikoille. Lisäksi jokaisen värjäysohjeen yhteydessä työturvallisuuteen vaikuttavat kemikaalien käsittelyohjeet ovat helpommin löydettävissä, jotta suojautuminen oikealla tavalla tapahtuisi varmemmin. Myös se, että reagenssien hävittämisohjeet ovat värjäysohjeiden kanssa samassa paikassa, helpottaa niiden noudattamista ja säästää aikaa, kun niitä ei tarvitse erikseen etsiä.

Patologian laboratorion henkilökunnan lisäksi tämä työ on hyödyksi myös minulle, sillä pääsen syventämään tietojani histologisista erikoisvärjäyksistä teoriassa ja käytännössä. Pääsen myös tutustumaan reagenssien turvalliseen käsittelyyn tarkemmin, josta on varmasti hyötyä myös myöhemmin. Työstä on hyötyä myös muille opiskelijoille ja jo valmistuneille bioanalytikoille, jotka tarvitsevat koottua suomenkielistä tietoa eri histologisista värjäyksistä.

3 Histologinen prosessi patologian laboratoriossa

Patologian laboratorioon saapuneen näytteen käsittely kestää vähintään 3 vuorokautta, jonka jälkeen patologi vielä arvioi sen. Tämän jälkeen pyydetään tarvittaessa vielä lisätutkimuksia, joten vastaus valmistuu useimmiten aikaisintaan viikon kuluttua. (Mäkinen 2012:1127-1128.)

Näytteen käsittely patologian laboratoriossa alkaa, kun lähete ja formaliinifikoitu tai tuore näyte saapuvat laboratorioon. Aluksi tarkistetaan täsmäävätkö lähetteen ja näyteastian tiedot. Sen jälkeen näyte kirjataan tietojärjestelmään, jolloin sille annetaan

laboratorion oman käytänteen mukainen tutkimusnumero, jolla juuri kyseinen näyte voidaan myöhemmin tunnistaa. Näyttenumero kertoo yleensä, minkä tyyppinen näyte on kyseessä, näytteenottovuoden, sekä järjestysnumeron. Näytteen täytyy olla fiksatiivissa yön yli ennen jatkokäsittelyä. (Söderström 2015:19).

Tämän jälkeen pienet näytteet laitetaan kokonaisina numeroituihin näytekasetteihin (Söderström 2015:19). Suuremmat kudoksenäytteet käyntiin panee patologi, jolloin näytteestä otetaan tarvittava määrä edustavia paloja näytekasetteihin. Samalla näyte myös piirretään tai kuvataan, jotta myöhemmin voidaan nähdä, miten näyte on orientoitunut. Kun esikäsittely on tehty, näytteet siirretään kuduskuljettimeen, jossa kudoksista poistetaan vesi ja ne uutetaan parafiiniin, jolloin näyte saadaan säilymään. Lisäksi parafiini jähmettyy ja kovettaa kudoksen rakenteen niin, että siitä on helpompi leikata ohuita leikkeitä. (Mäkinen 2012:1127-1128.)

Ennen leikkeiden leikkaamista kudokset vielä valetaan parafiiniin, jonka jälkeen tästä blokissa olevasta kudospalasta leikataan mikrotomilla n. 5 µm:n paksuisia leikkeitä, jotka kiinnitetään näytelasille. Leikkausvaihe on tärkeä, sillä se on perusta histologisen värjäyksen laadulle. Onnistunut leike on ohut, tasainen ja rypytön. Ennen leikkeen värjäämistä poistetaan tukiaineena toiminut parafiini. (Naukkarinen 2000:153-158.) Värjäyksen jälkeen näytteestä poistetaan vesi nousevan alkoholisarjan avulla (Värjäysmenetelmät, färgningsmetoder, staining 2006). Näyte kirkastetaan xyleenissä ja peitataan peitinlasilla tai kalvolla (Kiernan 2010:36; Värjäysmenetelmät, färgningsmetoder, staining 2006). Ennen näytelasien jakamista patologeille bioanalyytikko tarkistaa, että leike ja värjäys ovat onnistuneet (Schroderus – Tiilikainen 2013:15).

Lausunnon antaa patologian erikoislääkäri tutkittuaan valmiit histologiset näytelasit (Terveyskeskuksen gastroskopianäytteiden histologinen tutkimus, 5 tai useampia näytteitä 2016). Patologin harkinnan mukaan voidaan käyttää apuna myös histokemiallisia tai immunohistokemiallisia menetelmiä (Yleisohje (Histologiset näytteet) 2012). Näytteiden tarkastelun lisäksi hän perehtyy esitietoihin (Terveyskeskuksen gastroskopia-äytteiden histologinen tutkimus, 5 tai useampia näytteitä 2016). Näytteiden tulkinta perustuu makroskooppisiin, sekä histologisiin arvioihin (Yleisohje (Histologiset näytteet) 2012). Tulkinta on aina subjektiivista ja se tehdään tunnistamalla tiettyjä kuvioita (Floyd 2013:539).

4 Histologiset värjäykset

Histologisia värjäysmenetelmiä voidaan käyttää apuna monien sairauksien tunnistamisessa. Leikkeet ovat yleensä värittömiä sen jälkeen, kun ne ovat leikattu ja kiinnitetty näytelasille. Jotta leikkeitä voidaan mikroskoopissa tarkastella, pitää ne vielä värjätä niin, että pystytään näkemään solukon eri osia eri värisinä. (Värjäysmenetelmät, färgningsmetoder, staining 2006.) Histologiset värjäykset ovat yleensä vesiliukoisia, joten ennen varsinaisen värjäysprosessin aloittamista tulee lasille kiinnitetyistä leikkeistä poistaa tukiaine parafiini, joka on veteen liukenematonta. Tämä on välttämätöntä, jotta värit pystyvät sitoutumaan leikkeeseen. Samalla kuduskuljetuksessa poistettu vesi palautetaan takaisin leikkeisiin. (Naukarinen 2000:153-158.)

Histologisissa värjäyksissä voidaan käyttää kahta erilaista värjäysmenetelmää, progressiivista ja regressiivistä. Progressiivisessa kudoksen annetaan olla väriliuoksessa, kunnes saavutetaan haluttu värikylläisyys. Regressiivisessä värjäyksessä taas annetaan kudoksen ensin värjäytyä intensiivisemmäksi kuin haluttu lopputulos. (Veuthey ym. 2014:97.) Ylimääräinen väri poistetaan emäksisestä väristä hapolla, ja happamasta väristä taas emäksellä (Värjäysmenetelmät, Färgningsmetoder, staining 2006). Tätä ylimääräisen värin poistamista kutsutaan differentaatioksi, eli diffaukseksi (Naukarinen 2000:154). Värjääminen voidaan tehdä lisäämällä tiettyjä rakenteita värjääviä väriaineita, joko yhtä aikaa tai peräkkäin yksi kerrallaan (Veuthey ym. 2014:92).

Eri laboratorioiden käyttämät perusvärjäykset ovat usein kiinni paikallisista käytänteistä, eli siitä, mitä värjäyksiä on totuttu käyttämään. Suuri osa suomalaisista laboratorioista käyttää nykyään hematoksyliini-eosiinivärjäystä. (Mäkinen 2012:1129.) Sen lisäksi voidaan käyttää erikoisvärjäyksiä. Erikoisvärjäysten valintaan vaikuttavat useissa tapauksissa potilaan esitiedot tai näytteen materiaali. Joissakin tapauksissa lisävärjäyksen tarve määräytyy HE-värjäyksen morfologian perusteella. (Floyd 2010:40.) Niiden avulla voidaan varmistua perusvärjäyksessä esiin tulleesta löydöksestä tai voidaan nähdä sellaisia kudskomponentteja, joita perusvärjäyksessä ei pystytä näkemään. Lisäksi erikoisvärjäyksillä voidaan erottaa toisistaan esimerkiksi kaksi morfologisesti samankaltaista syöpätyyppiä. (Anderson 2011; Mäkinen 2012:1129; Kumar – Gill 2010:1.)

Laadukkaan histologisen värjäyksen kriteereinä voidaan pitää värjäyksen riittävää intensiivisyyttä, jolloin kudosten eri osat voidaan erottaa helposti toisistaan. Myös tuman

kromatiinin ja tumajyvästen tulee olla selväpiirteisiä. Lisäksi värjäyksen tulee olla puhdas, jolloin värjäyksessä on tehty oikeanlaiset esikäsittelyt ja riittävät pesut, joiden avulla taustan värjäytyminen on minimoitu. (Naukkarinen 2000:158)

Tämän osion alaluvuissa esitellään tietoa niistä värjäyksistä, joista tehtiin värjäykset värjäysohjekansioon. Kunkin värjäyksen yhteydessä kerrotaan värjäyksen käyttötarkoituksesta, periaatteesta ja mahdollisista virhelähteistä. Taulukossa 1 on esitetty yksinkertaistettuna millaisten rakenteiden esiintuomiseen kutakin värjäystä käytetään. Hopeavärjäyksissä virhelähteet ovat kaikille pääpiirteittäin samat, joten niitä käsitellään yhteisesti hopeavärjäyksiä koskevan osion alussa.

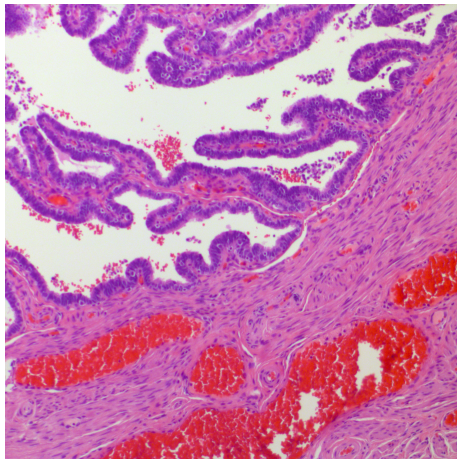
Taulukko 1. Erikoisvärjäysten käyttötarkoitus

Värjäytyvä kudoksenosa	Värjäys
Perusvärjäys, kaikille kudoksille	Hematoksyliini-eosiini (HE)
Hiilihydraatit (kuten lima-aineet ja glykogeeni)	Perjodihappo-Schiff (PAS) Alcian sininen-PAS (AB-PAS)
Glykogeenin pilkkominen	Diastaasi-PAS (D-PAS) D-AB-PAS
Sidekudos	Verhoeff Gomor Van Gieson Herovici
Amyloidifibrillit	Kongopuna
Neuroendokriiniset granulat	Fontana Masson Grimelius
Melaniini	Fontana Masson
Neurofibrillaariset solmut, amyloidikertymät	Bielschowsky
Kuparin osoitus	Rodaniini
Raudan osoitus	Berliininsini
Erilaiset mikro-organismit	Giemsa Modifioitu Giemsa Ziehl-Neelsen Wartin-Starry
Luuytimen solutyypin tunnistus	Giemsa Leder

4.1 Hematoksyliini-eosiini

Hematoksyliini-eosiini -värjäyksen (HE) hyvä puoli on, että se värjää eri solun osat hyvin tarkasti. Usein jo sen avulla pystytään tekemään tautidiagnoseja tai sen avulla voidaan hyvin päätellä, mitä muita värjäyksiä tarvitaan. (Anderson 2011.) HE:n hyvänä puolena voidaan pitää sitä, että värjäystulos on hyvin säilyvä (Mäkinen 2012.1129).

HE-värjäys (kuvio 1) perustuu kudskomponenttien happamuuteen ja emäksisyyteen: hapan väri värjää emäksisiä kudoksen osia ja päinvastoin (Naukkarinen 2000:153-154). Hematoksyliinillä värjäytyvät ensisijaisesti tumat, ja lisäksi myös solulimassa oleva RNA (Mäkinen 2012:1129), sillä nukleiinihapot ovat happamia (Naukkarinen 2000:153). Eosiinilla taas saadaan värjättyä solunsisäisiä ja ulkoisia proteiineja, kuten sidekudosta (Mäkinen 2012:1129). Lisäksi eosini värjää lihasta, joka on emäksinen. (Naukkarinen 2000:153-154). Hematoksyliinillä värjättyt tumat ovat yleensä sinisävyisiä, ja sytoplasma vaaleanpunaisen ja punaisen eri sävyjä (Young – Lowe – Stevens – Heath 2006:428). Myös punasolut ja eosinofiiliset granulat värjäytyvät vaaleanpunaisen eri sävyillä (Couture – Laurie 2004:27). Eosiinin oikea diffausaika on tärkeä, jotta värjäyksen lopputulos on hyvä (Naukkarinen 2000:154).

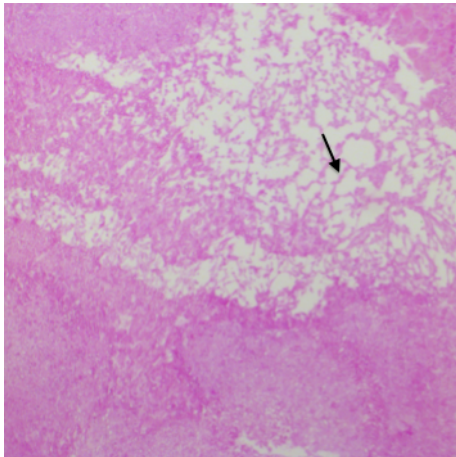


Kuvio 1. HE-värjäyksessä tumat ovat sinisävyisiä, sytoplasma vaaleanpunaista.

4.2 Perjodihappo-Schiff

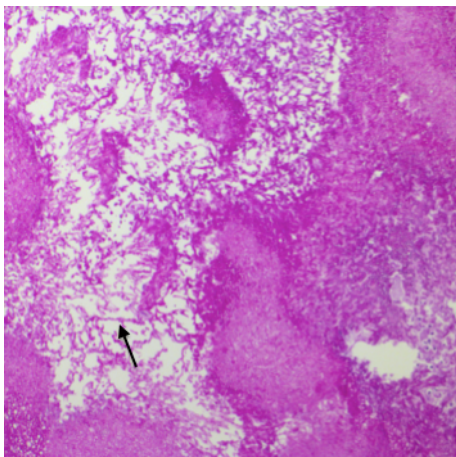
Yksi eniten käytössä olevista erikoisvärjäyksistä on perjodihappo-Schiff- eli PAS-värjäys (Mäkinen 2012:1129; Veuthey ym. 2014:99). Sen avulla voidaan tehdä kasvainten erotusdiagnostiikkaa, sillä sitä käyttämällä nähdään hyvin glykogeenejä ja neutraaleja limoja, sekä tyvikalvoa (Layton – Bancroft 2013:221). Tätä värjäystä voidaan käyttää esimerkiksi maksa- ja munuaisnäytteisiin (Veuthey ym. 2014:100). PAS-värjäyksellä saadaan lisäksi sienet värjättyä HE-värjäystä tarkemmin (Bartlett 2013:303). Näihin rakenteisiin PAS-värjäys on sopiva, sillä se värjää hiilihydraatteja punaiseksi (Koukila-Kähölä – Richardson 2000:139). Esimerkki PAS-värjäyksestä on kuviossa 2.

PAS-värjäyksessä hiilihydraatteja sisältävät rakenteet värjäytyvät perjodihapon avulla; hiilihydraateista hapetetaan vierekkäisten OH-ryhmiin sitoutuneiden hiiliatomien välinen sidos auki, jotta pääsee syntymään dialdehydi. Sen jälkeen se pystyy reagoimaan Schiffin reagenssin kanssa, jossa on pararosaniliini-väriainetta. (Naukkarinen 2000:155.) Kun aldehydit yhdistyvät kovalenttisesti, syntyy punavioletti yhdiste. (Veuthey ym. 2014:99).



Kuvio 2. PAS-värjäyksessä sienirihmoja

Tämän jälkeen voidaan tarvittaessa värjätä vielä tumat hematoksyliinillä siniseksi (Layton – Bancroft 2013:224). Näin voidaan vielä korostaa sieniorganismeja (Schnadig – Woods 2009:79). Tämä värjäys on nimeltään tuma-PAS (kuvio 3).



Kuvio 3. T-PAS värjäyksessä sienirihmoja

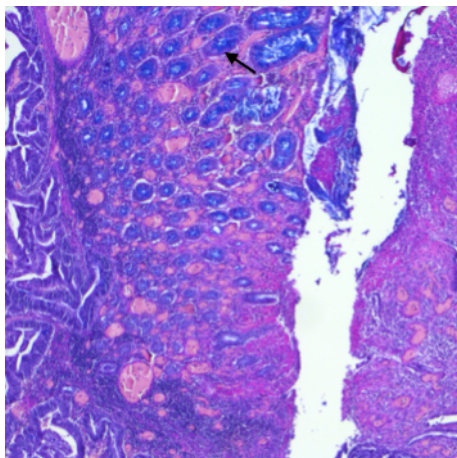
Värjäystä tehdessä on tärkeää, että Schiffin reagenssi on valmistettu oikein, jolloin se on väriltään kirkasta tai aavistuksen vaaleankeltaista. (Naukkarinen 2000:155.) Jos se

pääsee kontaminoitumaan tai sitä ei ole säilytetty riittävän ilmatiiviisti, reagenssin väri muuttuu vaaleanpunaiseksi ja sen reaktiivisuus heikkenee. Tällöin reagenssi täytyy joko suodattaa tai vaihtaa. (Wulff 2004:69.)

4.2.1 Alcian sininen-PAS

Jotta saadaan värjättyä neutraalien limojen lisäksi myös happamia limoja, voidaan PAS-värjäykseen yhdistää Alcian sininen eli AB-värjäys. Sitä käytetään paljon etenkin maha-suolikanavan näytteitä värjätessä. (Naukkarinen 2000:155.)

Usein värjätään ensin perus AB-värjäys, jonka avulla happamat limat värjätään siniseksi (kuvio 4). Tämän jälkeen tehdään PAS-värjäys, joka värjää neutraalit limat punaisiksi. (Layton – Bancroft 2013:225; Naukkarinen 2000:155.) Tumavärinä tässäkin voidaan käyttää hematoksyliiniä (Naukkarinen 2000:155). Solut ja kudokset, joissa on sekä neutraaleja ja happamia limoja, voivat värjäytyä sinivioletin ja violetin eri sävyinä, koska Alcian blue sitoutuu niihin ja ne reagoivat myös Schiffin reagenssin kanssa. Värjäytymätön kudos, tarkoittaa ettei näytteessä ole lima-aineita. (Layton- Bancroft 2013:225-226.)



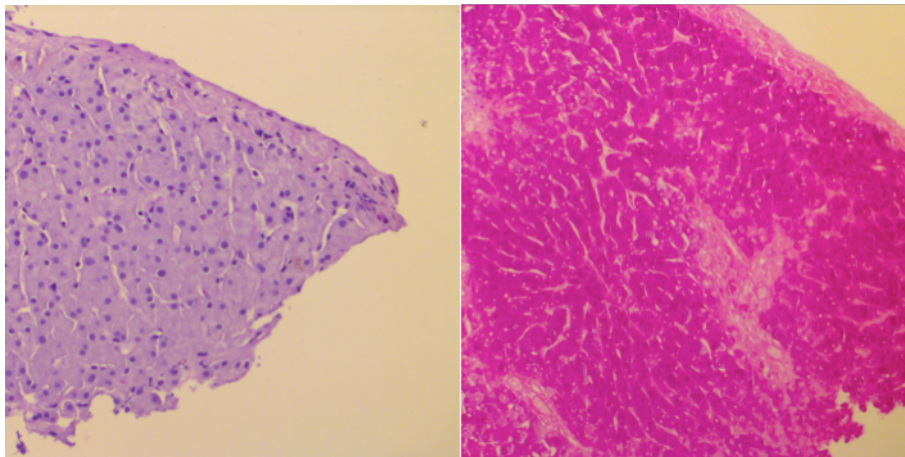
Kuvio 4. AB-PAS värjäyksessä nähdään limaa erittäviä soluja sinisenä

Hematoksyliini-värjäys täytyy tehdä kevyesti, jotta ei värjätä sytoplasmaa ja lima-aineita, jolloin voidaan peittää AB-väri. AB- ja PAS-värjäysten työjärjestys voi vaikuttaa lopputulokseen: jos PAS tehdään ensin, neutraalit limat ja glykogeeni voivat värjäytyä violetin värisiksi. Neutraalit limat ja glykogeeni voidaan nähdä myös magentan värisinä, jos tehdään ensin AB-värjäys. (Layton – Bancroft 2013:226.)

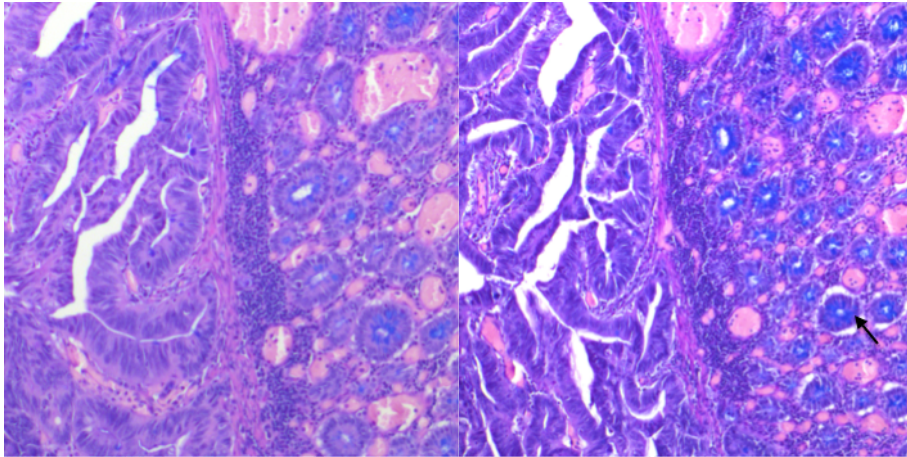
4.2.2 Diastaasi-PAS ja diastaasi-AB-PAS

Lima-aineiden erottaminen glykogeenista voi olla ongelmallista, jos käytetään PAS-tekniikkaa (Layton – Bancroft 2013:231). Erottamisen apuna voidaan käyttää glykogeenin pilkkomista ennen varsinaista PAS-värjäystä. Tällöin värjäys suoritetaan aina kahdelle saman kudoksen leikkeelle, joista toisesta pilkotaan glykogeeni ja toisesta ei. Näin tuloksia voidaan verrata keskenään. (Veuthey ym. 2014:99-100.) Diastaasi-esikäsitelyä voidaan käyttää myös ennen alcian-blue -värjäystä (Alcian Blue/PAS Kit 2011). Värjäyksistä esimerkit kuvioissa 5 ja 6.

Glykogeenin pilkkomiseen käytetään usein laboratoriossa joko alfa-amylaasi- tai diastaasientsyymiä, jotka pilkkovat glykogeenin α -1:4-glykosididoksia. Pilkkoutumisen seurauksena vapautuvat glukoosi- ja maltoosimolekyylit, jotka voidaan niiden vesiliukoisuuden vuoksi huuhdella pois näytteestä vedellä. (Layton – Bancroft 2013:231.) Näin glykogeeni saadaan poistettua ennen PAS-värjäystä (Veuthey ym. 2014:100). Amylaasilla käsittelemättömistä näytteistä saatu positiivinen reaktio yhdessä glykogeeni pilkkottujen näytteiden värjäytymättömyyden kanssa varmistaa glykogeenin olemassaolon näytteessä. (Veuthey ym. 2014:100.)



Kuvio 5. D-PAS -värjäys vasemmalla ja PAS-värjäys oikealla maksanäytteestä



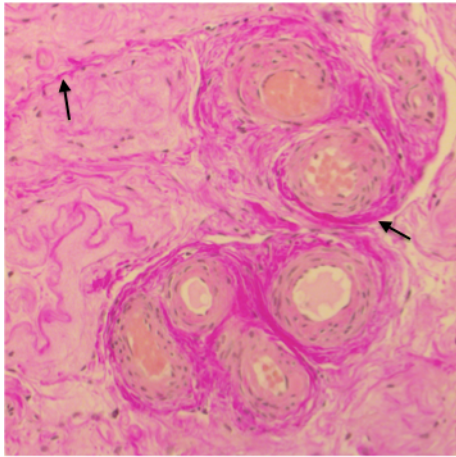
Kuvio 6. D-AB-PAS -värjäys vasemmalla ja AB-PAS -värjäys oikealla keuhkonäytteestä

Ihmisen sylki on tehokas glykogeenin pilkkomisessa, mutta käyttöä ei suositella turvallisuussyistä ja koska sylkivalmisteita ei ole standardisoitu. Kaupallisissakin diastaasi- ja amylaasierissä voi olla vaihtelua puhtaudessa ja aktiivisuudessa. Lisäksi kontaminoivat entsyymit voivat pilkkoa myös muuta materiaalia, kuin haluttua glykogeenia. (Layton-Bancroft 2013:231.)

4.3 Van Gieson

Van Gieson -värjäystä voidaan käyttää erottamaan toisistaan kollageenia ja kasvainten sileää lihasta. Lisäksi sen avulla pystytään osoittamaan tiettyihin sairauksiin liittyvää kollageenin määrän lisääntymistä. (Van Gieson Staining 2016.)

Trikromi-värjäys on yleisnimitys useille eri tekniikoille, jotka värjäävät lihasta, kollageenisäikeitä, fibriiniä ja punasoluja. Pääsääntönä trikromi-värjäyksissä on, että pienempi värimolekyylitunkeutuu ja värjää kudusrakenteen, mutta jos suurempi molekyylitunkeutuu samaan rakenteeseen, se tulee korvaamaan pienemmän. (Bancroft – Layton 2013:199-200.) Van Gieson -sidekudosvärjäyksessä (kuvio 7) kollageenisäikeet värjäytyvät happofuksiinin avulla punaiseksi, tumat sinisiksi hematoksyliinillä ja lihas, sarveistunut epiteeli sekä erytrosyytit pikriinihapolla keltaisiksi (Young ym. 2006:428; Venerucci n.d.:68-69).



Kuvio 7. Eri vahvuisia sidekudossäikeitä Van Gieson -värjäyksessä punaiseksi värjäytyneenä

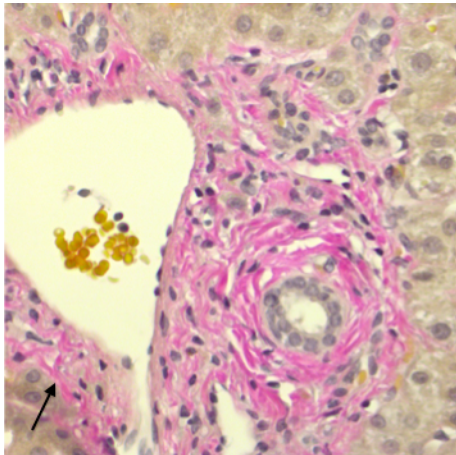
Trikromi-värjäyksissä formaliinifikoitu kudos värjäytyy huonosti, koska kudosityhmät kyllästyvät formaldehydillä. Niinpä jäljelle jää vain vähän kudosityhmiä, jotka voivat reagoida trikromi-värien kanssa. Pikriinihappo tai elohopeakloridiliuos parantavat trikromi-värien intensiivisyyttä ja kirkkautta. (Bancroft – Layton 2013:202.) Hematoksyliinillä tehtävän tumaväriin täytyy olla vahva ennen Van Gieson -liuosta, sillä pikriinihapossa tapahtuu värien differentaatiota. Väritasapaino heikentyy, jos Van Gieson -liuoksen jälkeen tehdään vesipesu. (Bancroft – Layton 2013:202.)

4.4 Herovici

Herovici-menetelmästä on saatavilla huonosti tutkimus- ja oppikirjatietoa. Herovici-menetelmällä voidaan värjätä selektiivisesti tumia, sytoplasmaa ja sidekudosta. Sitä voidaan käyttää tutkittaessa kudoksen uusiutumista, kuten arpikudoksen muodostumista ja haavojen paranemista. (Turner – Pezzone – Brown – Badylak 2013:140). Herovici-värjäys on Van Gieson -värjäystä tarkempi, sillä se pystyy erottelemaan nuoremman ja vanhemman kollageenin toisistaan (Lillie – Tracy – Pizzoloto – Donaldson – Reynolds 1980:157).

Herovici-värjäys muodostuu pikrofuksiinista ja aniliinisinisestä tai pikrometyylisinisestä. Se värjää punaiseksi tiheää kypsää kollageenia, kuten vatsan limakalvon alaista hermokudoksen kollageenia. Nuori vastamuodostunut kollageeni, kuten sikiön tai haavojen paranemisen yhteydessä muodostuva kollageeni, taas värjäytyy siniseksi. (Lillie ym. 1980:153.) Siniseksi värjäytyvä kudos on tyypillisesti tyypin III kollageenia, kun taas punaiseksi värjäytyy usein tyypin I kollageeni (Turner ym. 2013:140). Tummat värjäytyvät mustiksi. Punasolut ja sytoplasma keltaisiksi, ja elastiset kuidut oransseiksi.

(Fitzgerald – Kirkpatrick – Foo – Naylor 1996:201.) Kuviossa 8 nähdään esimerkki Herovici-värjäyksestä.



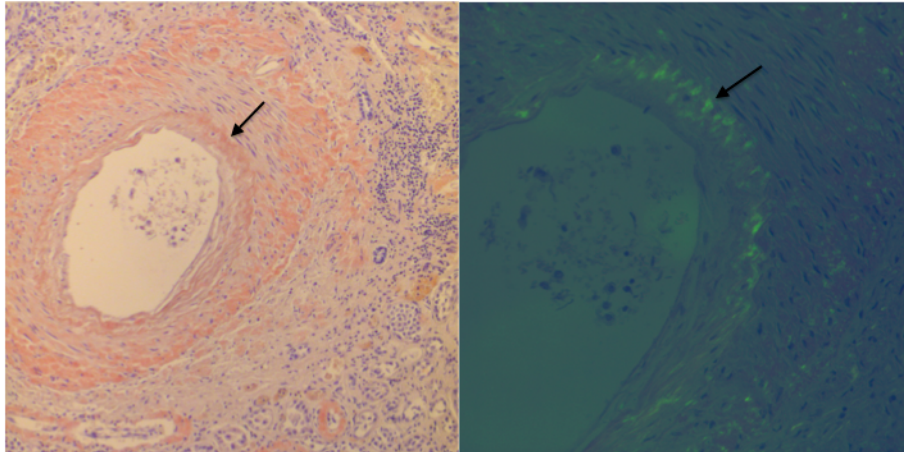
Kuvio 8. Kypsä kollageeni värjäytyy Herovici -värjäyksessä punaisella, punasolut keltaisia.

Turnerin, Pezzonen, Brownin ja Badylakin mukaan värjäytymistulos saattaa olla vaihteleva, jos kollageeni on denaturoitunut, tai jos kudosta on käsitelty kollageenaasilla. Värjäystulokseen voi vaikuttaa myös pH. He pitävät sitä kuitenkin luotettavana ja nopeana värjäysmenetelmänä. (Turner ym. 2013:146.)

4.5 Kongonpuna

Kongonpuna -värjäyksellä voidaan osoittaa amyloidifibrillejä (Naukkarinen 2000:154). Amyloidoosi on proteiinin taittumisen häiriötila, jolloin normaalisti liukenevat proteiinit kasautuvat kudoksiin epänormaaleina liukenemattomina fibrilleinä, ja häiritsevät näin kudosten toimintaa. Amyloidoosia voi esiintyä kaikissa sisäelimissä, verisuonten seinämissä ja sidekudoksessa. (Gilbertson – Hunt 2013:271, 274.)

Kongonpuna on fluoresoiva väriaine, joka ei ole spesifi vain amyloidille. Sen amyloidispesifisyyttä voidaan lisätä käyttämällä alkoholimenetelmää yhdistettynä korkeaan ionipitoisuuteen ja pH:hon. (Gilbertson – Hunt 2013:279.) Kongonpunan sitoutuminen amyloidiin uskotaan tapahtuvan poolittomien vetysidosten avulla (Stanforth 2004:57). Amyloidi ja eosinofiiliset granulat värjäytyvät lohenpunaisiksi (Gilbertson – Hunt 2013:280; Naukkarinen 2000:154). Kaikissa kudskomponenteissa, jotka sitovat kongonpuna lineaarisesti, esiintyy polarisoidussa valossa vihreää kahtaistaitoisuutta (Gilbertson – Hunt 2013:279). Kuviossa 9 nähdään kongonpunalla värjättyä amyloidia mikroskoopin erilaisissa valaistusolosuhteissa.



Kuvio 9. Kongopuna -värjäyksessä amyloidi näkyy valomikroskoopissa punaisena ja polarisoidussa valossa omenanvihreänä.

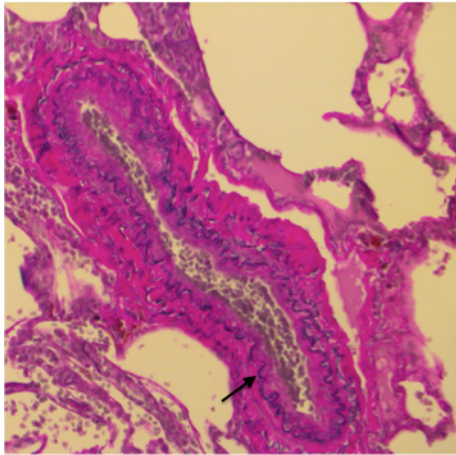
Jokaisessa amyloidivärjäyserässä pitäisi olla mukana positiivinen kontrolli, jotta voidaan varmistaa värjäystulos (Naukkarinen 2000:154). Formaliinifiksoitu näyte voi antaa vääriä positiivisia tuloksia, koska myös tiheet kollageenisäikeet sitovat kongonpuna. Käyttämällä emäksistä kongonpuna -menetelmää tämä ilmiö vähenee. Pitkä parafiinin poisto-aika ja värin pitkä vaikutusaika saavat amyloidin yhtymään paremmin kongonpunaan, ja näin erottumaan paremmin ja selektiivisemmin. (Gilbertson – Hunt 2013:279.)

4.6 Verhoeff

Verhoeff-värjäystä voidaan käyttää kaikissa kudoksissa, mutta usein sillä värjätään ihoa, keuhkoja ja verisuonia. Sen avulla voidaan osoittaa elastiinikatoa esimerkiksi keuhkolaajentumapotilailla tai verisuonissa valtimonkovettumataudissa. Sen avulla voidaan tutkia myös suonten elastisuutta. Sitä käytetään korostamaan elastisia säikeitä ja erottamaan sidekudosta. (Verhoeff 2017.) Värjäyksestä esimerkki kuviossa 10.

Tekniikka perustuu mustan regressiivisen rautahematoksyliinin toimintaan. Rautahematoksyliini pysyy kudoksessa hyvin käytettäessä hapanta vastaväriä. Aluksi kudos ylivärjätään rautahematoksyliinillä, jolloin negatiivisesti varautuneet kudokskomponentit värjäytyvät mustiksi. Seuraavaksi rautapitoinen kloridiliuos irrottaa värin muista kudokskomponenteista, paitsi tumista ja elastiinisäikeistä, sillä niillä on korkea affiniteetti väriaineen kanssa. Sen jälkeen kudoksen kollageeni värjätään Van Gieson -liuoksella, joka koostuu fuksiinista ja pikriinihaposta. Kollageenikuidut värjäytyvät tällöin punaiseksi ja

sytoplasma keltaiseksi. (Verhoeff 2017.) Värjäyksessä voi olla haastavaa saada hienorakenteiset kuidut värjättyä, niin että ne erottuvat taustasta (Bamcroft – Cook 1994:59).

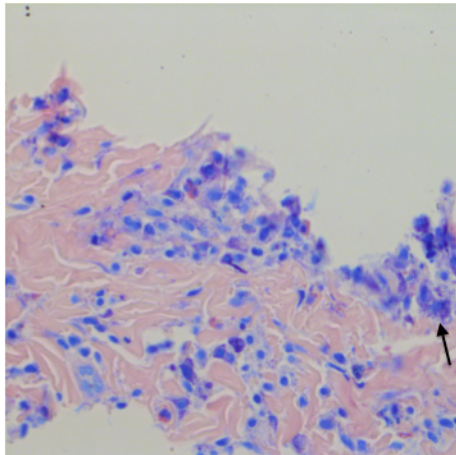


Kuvio 10. Verhoeff-värjäyksessä elastiinisäikeet näkyvät verisuonen seinämän sisällä mustina.

4.7 Giemsa

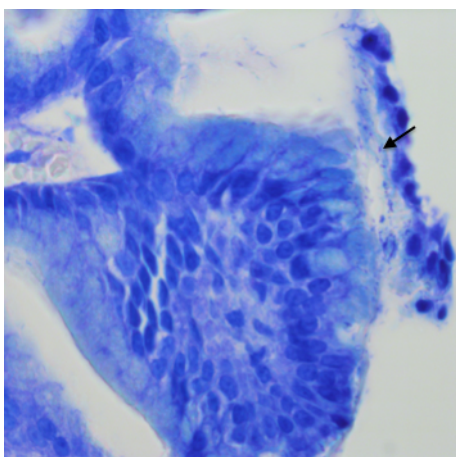
Giemsa-värjäyksellä voidaan osoittaa mikro-organismeja, eli parasitteja ja bakteereita, kuten *Trichomonas*, *Leishmaniat* ja helicobakteerit. Lisäksi kromatiinin ja tumajyvästen RNA värjäytyy Giemsaalla, joten sitä voidaan käyttää myös leukemioissa, lymfoomissa ja myeloomissa tunnistettaessa eri solutyyppejä. Myös immuunijärjestelmän syöttösolujen granulat värjäytyvät tällä värjäyksellä. (Naukkarinen 2000:157.) Näitä nähdään kuviossa 11.

Giemsa-väriaineessa yhdistyvät metyleenisininen ja hapan väri kuten eosini (Wulff 2004:68). Kudos yli värjätään ensin Giemsaalla, jonka jälkeen ylimääräinen väri poistetaan eli diffataan (Naukkarinen 2000:157). Diffauksessa käytetään heikkoa happoa (Wulff 2004:68). Oikea diffausaika on aina värjättävästä kudoksesta riippuvainen (Naukkarinen 2000:157). Giemsaalla värjättyssä näytteessä mikro-organismit värjäytyvät tummansinisiksi. Myös tumat värjäytyvät tumman sinisiksi ja sytoplasma vaaleanpunaiseksi. Onnistunut värjäystulos voi olla hyvin riippuvainen liuoksen pH:sta. Giemsa-työliuos ei yleensä ole stabiili, joten aina ennen värjäystä tulisi tehdä uusi työliuos. (Wulff 2004:68.)



Kuvio 11. Giemsaalla värjättyssä näytteessä nähdään granulaisia syöttösoluja

Modifioitu Giemsa -värjäys voidaan toteuttaa muuten samalla tavalla kuin tavallinen Giemsa-värjäys, mutta happovaihe jätetään pois (Potters – Loffeld – Stobberingh – Spreeuwel – Arends 1987,1223). Modifioitua Giemsaä käytetään osoittamaan bakteereja, erityisesti *Helicobacter pylori* (Karttunen – Pääkkö 2013:1090-1091). Se on kroonisen gastritiin aiheuttajabakteeri, joka aiheuttaa esimerkiksi mahahaavaa, vatsasyöpää sekä muita mahalaukkuun ja pohjukaissuoleen liittyviä sairauksia. Suurin heikkous modifioidussa Giemsa -värjäyksessä on vähäinen kontrasti kudoksen ja organismien välillä, mutta kokenut katsoja pystyy erottamaan ne. (Rotimi – Cairns – Gray – Moayyedi – Dixon 2000:756,758.) *Helicobacter pylori* värjäytyy tumman siniseksi (kuvio 12). Kollageeni, lihas ja tumat siniseksi ja sytoplasma vaihtelevan vaaleansiniseksi. (Differential Stain, *Helicobacter pylori* sp. in *Tissue Sections* 2014.)

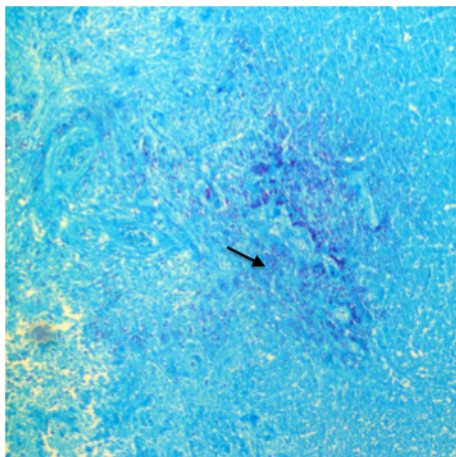


Kuvio 12. Modifioitu Giemsa -värjäys, nuoli osoittaa *Helicobakter pyloria*

4.8 Ziehl-Neelsen

Mykobakteerien solukalvossa on paljon tyydyttymätöntä rasvaa, joten ne eivät värjydy vesiliukoisilla väriaineilla. Näiden haponkestävien mykobakteerien tunnistamiseen on kehitetty Ziehl-Neelsen -värjäys, jota käytetään tavallisesti tuberkuloosia aiheuttavan *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin tunnistuksessa. (Pynninen 2013:232.)

Ziehl-Neelsen -värjäyksen perusmenetelmässä käytetään apuna lämpöä, jotta fuksiini läpäisee soluseinämän paremmin, mutta samalla periaatteella ja aineilla voidaan värjäys tehdä myös ilman lämpöä (Vasanthakumari – Jagannath – Rajasekaran 1986: 4718). Kylmämenetelmässä voidaan käyttää joko korkeampia fuksiini- ja fenolipitoisuuksia tai lisätä värien vaikutusaikaa (Lahiri – Chatterjee 1994:256). Väriaine fuksiini tunkeutuu bakteerien lipidikalvon läpi fenolien avulla. Värjäysmenetelmä perustuu siihen, että mykobakteerit ovat haponkestäviä, joten fuksiini voidaan poistaa happoalkoholiliuoksella kaikista muista bakteereista ja rakenteista. Tämän jälkeen vain haponkestävät mykobakteerit ovat punaiseksi värjäytyneitä (kuvio 13). Lopuksi värjätään tausta esimerkiksi sinisellä tai light greenillä. Light greenin etuna on se, että punainen bakteeri erottuu hyvin. (Pynninen 2013:232-234.) Sinisellä värjättäessä täytyy välttää vastavärjäämästä kudosta liikaa, sillä hyvin vähäinen määrä organismeja saattaa tällöin erottua huonosti (Bartlett 2013:297).



Kuvio 13. Ziehl-Neelsen -värjäyksessä sauvabakteereita sinistä taustaa vasten

4.9 Hopeavärjykset

Erilaiset hopeavärjykset perustuvat siihen, että kudოსleike kyllästetään hopeanitraatilla (hopean suolalla) joko alkalisoimalla hopealiuos tai nostamalla reaktiolämpötilaa. Tällöin hopeanitraatti pystyy tunkeutumaan kudokseen paremmin. Kudoksiin tunkeutunut hopeanitraatti ei pääse enää ulos esimerkiksi tyvikalvosta, hermoista tai sienirihmoista, sillä ne ovat rakenteeltaan niin tiiviitä. Tämän jälkeen hopeanitraatti voidaan pelkistää metalliseksi hopeaksi näissä kudოსosissa. (Naukkarinen 2000:155.)

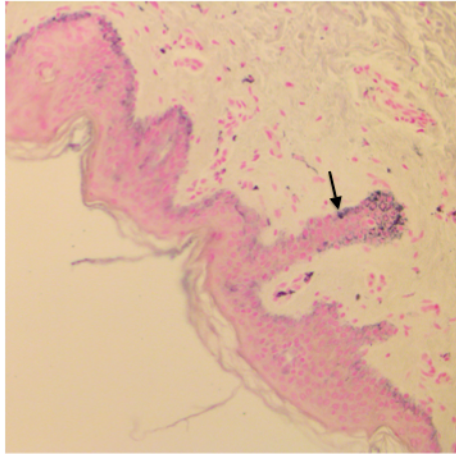
Hopeavärjykset voivat toimia kolmella eri periaatteella. Fontana Masson -värjäys toimii argentaaffinisesti. Wartin Starry-, Grimelius-, Gomorin retikuliini- ja Bielschowsky-värjykset toimivat argyrofiilisesti. (Naukkarinen 2000:155-156.) Näiden toiminta käydään läpi tarkemmin värjäyskohtaisissa alaluvuissa. Lisäksi von Kossa -värjäyksessä voidaan käyttää menetelmää, jossa kudoksen suolat, kuten karbonaatti, fosfaatti tai uraatti reagoivat hopeasuolojen kanssa. Niiden pelkistyminen metalliseksi hopeaksi tapahtuu valon avulla. (Naukkarinen 2000:155.)

Hopealiuosten valmistuksessa tulisi käyttää kahdesti tislattua vettä, jotta vältetään epäspesifistä hopean sakkautumista näytteissä (Grimelius 2002:10). Hopeavärjäyksissä tulee käyttää erityisen puhtaita ja ehjiä työskentelyvälineitä, sekä muovipintaisia välineitä, jotta hopea ei pääse pelkistymään epäpuhtauksiin tai metalliin (Naukkarinen 2000:156; Venerucci n.d.:28; Smith – Hafer 2004:82). Värjäyksessä suositellaan käytettävän aina tuoreita hopea- ja pelkistinliuoksia. Oikeanlaisen peitinlasin kiinnityssaiheen valinta on tärkeää, sillä esimerkiksi glyseroli ja gelatiini poistavat hopeaa näytteistä, jotka ovat jo valmiiksi hyvin värjäytyneitä. (Grimelius 2002:10.) Positiivinen kontrolli on apuna värjäyksen lopputuloksen arvioinnissa (Naukkarinen 2000:156).

4.9.1 Fontana Masson

Fontana Masson -värjäystä voidaan käyttää neuroendokriittisten solujen granuloiden värjäykseen, tai värjäämään melaniinia sekä sen esiasteita. Fontana Masson on argentaaffiininen värjäys, eli siinä hopean pelkistimenä toimii kudoksessa jo oleva komponentti. (Naukkarinen 2000:155-156.) Menetelmässä käytetään Fontanan hopealiuosta, tämä ammoniakki-hopealiuos pelkistetään metallisen hopean muodostamiseksi ilman ulkoista pelkistintä, sillä melaniini on voimakas pelkistin. Tätä ominaisuutta hyödynnetään osoitettaessa melaniinia. Melaniini, hopeasuoloilla värjäytyvät kudokset ja kromilla värjäytyvät kudokset värjäytyvät tällöin mustiksi ja tumat punaisiksi. (Orchard

2013:248-249.) Tausta värjäytyy keltaiseksi tai kellanruskeaksi (Grimelius 2002:10). Värjäyksestä on esimerkki kuviossa 14. Jos näytettä pidetään 56 °C:ssa liian pitkään, leikkeen pintaan voi nousta sakkaa (Orchard 2013:249).

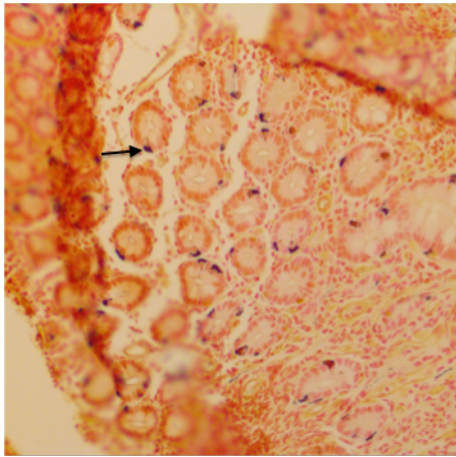


Kuvio 14. Melaniini näkyy Fontana Massonilla värjätynä granulaisen mustana

4.9.2 Grimelius

Grimelius-värjäystä voidaan käyttää neuroendokriinisten granuloiden osoittamiseen (Naukkarinen 2000:156). Se värjää melkein kaikki neuroendokriiniset kasvaimet ja sitä voidaan käyttää yleisenä neuroendokriinisenamarkkerina (Grimelius 2008: 246.). Sillä voidaan osoittaa myös kilpirauhasen, lisäkilpirauhasen ja ruuansulatuskanavan soluja (Westermarck 2015:115). Lisäksi sitä voidaan käyttää myös karsinoiditumoooreita osoitettaessa (Ascoli – Newman – Kline 1986:157).

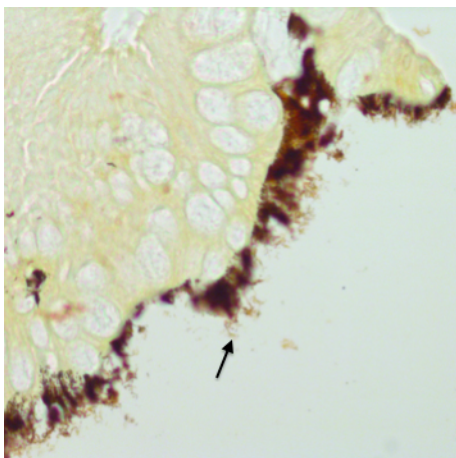
Grimelius-värjäys on myös hopeavärjäys, mutta se poikkeaa Fontana Masson -värjäyksestä siten, että pelkistin ei ole peräisin kudoksesta vaan se lisätään värjäysliuokseen. Tätä kutsutaan argyrofiiliseksi värjäykseksi. (Naukkarinen 2000:156.) Argyrofiiliset menetelmät osoittavat argyrofiilisiä ja argentaaffiinisiä granuloita (Ascoli ym. 1986:159). Argyrofiiliset granulat värjäytyvät vaalean ruskeista mustaan (Venerucci n.d.:28). Tämä näkyy kuviossa 15. Tausta värjäytyy keltaisesta vihreänkeltaiseen (Grimelius 2002:10).



Kuvio 15. Ohutsuolessa argyrofiilista reaktiota Grimelius-värjäyksessä.

4.9.3 Wartin-Starry

Wartin-Starry -värjäystä voidaan käyttää spirokeetta-bakteerien osoittamiseen (Bartlett 2013:300). Sekä lisäksi helicobakteerien etsimiseen (Naukkarinen 2000:156). Värjäys on argyrofiilinen hopeavärjäys. Spirokeetat ovat argyrofiilisia, eli ne imevät hopealiuoksesta hopeaa. (Wartin Starry Staining Technique For Spirochetes 2015.) Värjäys perustuu tiettyjen bakteerien kykyyn sitoa hopeaioneja vesipohjaisesta liuoksesta. Pelkistävän hydrokinonin lisääminen muuttaa bakteeriin sitoutuneen hopean näkyväksi metalliseksi hopeaksi. (Wulff 2004:65.) Spirokeetta- ja helicobakteerit värjäytyvät mustiksi, ja tausta värjäytyy kullankeltaiseksi tai vaalean ruskeaksi (Bartlett 2013:300; Wulff 2004:65; Wartin Starry Staining Technique For Spirochetes 2015). Spirokeettoja nähdään kuviossa 16.

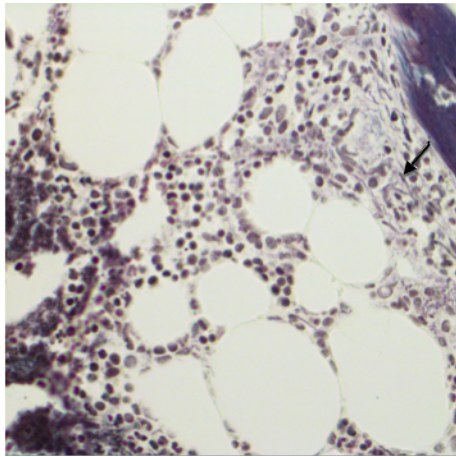


Kuvio 16. Spirokeetat näkyvät hapsuina kudoksen pinnalla Wartin-Starry -värjäyksessä

4.9.4 Gomorin retikuliinivärjäys

Gomorin retikuliinivärjäystä käytetään diagnosoitaessa maksan ja luuytimen sairauksia (Naukkarinen 2000:156). Retikuliinit koostuvat III-typin kollageenista. Normaalissa luuytimessä on näkyvillä vain muutamia hentoja retikuliinisäikeitä, ja ne kasautuvat pienten verisuonten ympärille. Lisääntynyt retikuliinin määrä liittyy useisiin sairauksiin, kuten pahanlaatuisiin kasvaimiin tai kantasolujen erilaistumishäiriöön. (Theil 2012:287.)

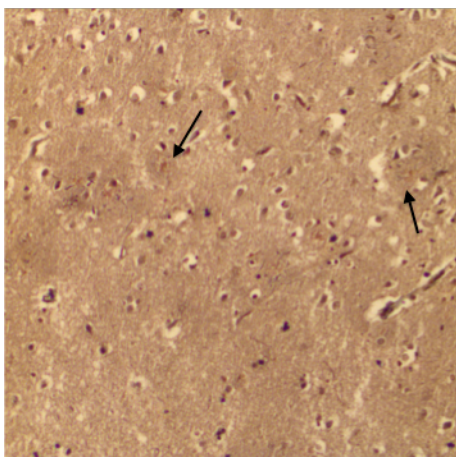
Gomorin retikuliinivärjäys on argyrofiilinen hopeavärjäys (Naukkarinen 2000:156). Siinä käytetään hopeakyllästystekniikkaa värjätessä soluväliaine glykoproteiinia, joka ympäröi retikuliinikuituja (Krishna 2013:8). Kaliumpermanganaattia käytetään hapettavana aineena. Hapettamisen jälkeen oksaalihapon avulla poistetaan ylimääräinen kaliumpermanganaatti, mikä parantaa retikuliinisäikeiden värjäytyvyyttä. Herkistävä aine kyllästää säikeet ja luo metalliorganisen sidoksen, joka korvautuu hopealla ammoniakkihopealiuos –käsittelyssä. (Reticulin Silver Stain 2012.) Formaliini toimii pelkistävä aineena, joka muuttaa kudokseen kerääntyneen kasaantuneen hopean metalliseksi hopeaksi (Gomorri's Silver Impregnation Staining Technique for Reticulin Fibers 2015.). Hopealiuoksella kyllästetyt kudokset näkyvät nyt ruskeina tai mustina. Näytteet säilytetään vielä esimerkiksi kultakloridilla paremman kontrastin ja selkeyden aikaansaamiseksi, sillä kulta reagoi ja yhdistyy pelkistetyn hopean kanssa. Pelkistämätön hopea poistetaan kaliumtiosulfaattiliuoksella. (Reticulin Silver Stain 2012.) Tummat näkyvät valmiissa värjäyksessä harmaina, ja muiden kudosten värjäytyvyys riippuu käytettävästä vastaväriaineesta (Gomorri's Silver Impregnation Staining Technique for Reticulin Fibers 2015). Kuviossa 17 normaalissa luuytimessä nähdään hentoa retikuliinisäiettä ja paljon soluja.



Kuvio 17. Gomorin retikuliinivärjyksessä nähdään luuytimessä hentoa retikuliinisäiettä

4.9.5 Bielschowsky

Bielschowsky-värjäystä käytetään Alzheimerin taudissa esiintyvien neurofibrillaaristen solmujen ja aivojen amyloidikertymien osoittamiseksi (Smith – Hafer 2004:81). Bielschowsky-värjäys on myös argyrofiilinen hopeavärjäys (Naukkarinen 2000:156). Kudosleike käsitellään hopeanitraatti- ja ammoniakkihopeanitraattiliuoksella. Hopea kerääntyy neurofibrillaarisiin solmuihin sekä hermosolun dendriittien ja aksonien amyloidikertymiin (kuvio 18). Sen jälkeen kasaantunut hopea pelkistetään metalliseksi hopeaksi formaliinilla. Lopuksi natriumtiosulfaatilla poistetaan pelkistymätön hopea. Neurofibrillaariset solmut ja amyloidikertymät värjäytyvät mustiksi ja tausta nähdään keltaisena tai keltaisena. (Smith – Hafer 2004:81-82.)

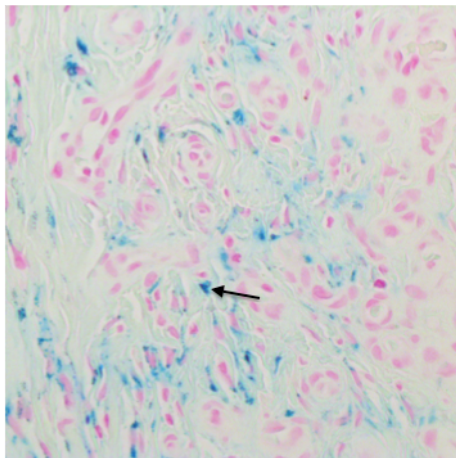


Kuvio 18. Amyloidikertymiä eli plakkeja aivoissa Bielschowskylla värjätynä

4.10 Berliininsini

Berliininsini (Prussian blue, Berlin blue) on rautavärjäys (Tienhaara 2000:159). Rautaa on elimistössä hemoglobiinissa, myoglobiinissa ja joissain entsyymeissä. Se varastoituu joko ferrimuodossa (Fe^{3+}) tai sitoutuen proteiiniin hemosideriiniksi. Tärkein varasto raudalle elimistössä on luuydin, kun rautaa on elimistössä liikaa, se varastoituu hemosideriiniksi. Mikäli rautaa imeytyy elimistön rautamäärään nähden aivan liikaa, se varastoituu eri elimiin. (Naukkarinen 2000:158.)

Berliininsini -värjäyksessä rauta irrotetaan proteiinista, johon se on kiinnittynyt, laimean suolahapon avulla. Sen jälkeen Fe^{3+} reagoi kaliumferrosyanidin kanssa. Tässä reaktiossa raudan ja kaliumferrosyanidin yhdistyessä syntyy kirkkaan sinistä ferriferrosyanidia eli preussinsinistä. (Naukkarinen 2000:158; Tienhaara 2000:159.) Rauta, joka on sitoutuneena hemoglobiiniin tai ferritiiniin, ei värjäydy. (Tienhaara 2000:159.) Lisäksi tumia värjäämään käytetään yleensä Kernectrotia tai fuksiinia, jotka värjäävät tumat punaiseksi (Naukkarinen 2000:158). Esimerkki berliininsini -värjäyksestä on kuviossa 19.



Kuvio 19. Berliininsini -värjäyksessä preussinsininen osoittaa rautaa.

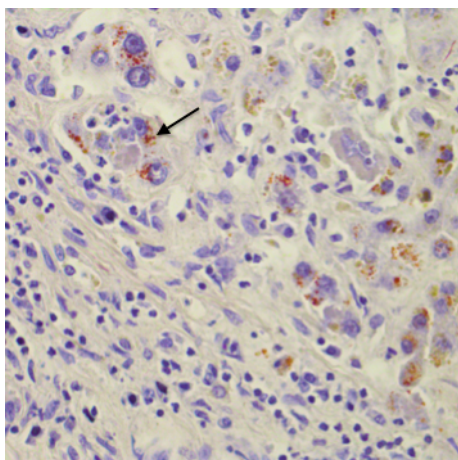
Berliininsini -värjäyksessä käytetään jokaisessa värjäyssarjassa positiivista kontrollinäytettä, jotta voidaan olla varmoja värjäyksen toimivuudesta (Tienhaara 2000:159; Naukkarinen 2000:158). Jotta värjäys onnistuu, tulee kaliumferrosyanidiliuos olla tuoretta ja suolahappo lisätään siihen juuri ennen värjäystä (Naukkarinen 2000:158). Tässä värjäyksessä tärkeää on, etteivät värjäyksessä käytetyt työvälineet sisällä pieniäkään määriä rautaa. Värjäysastiat tulee siis olla hyvin pestyjä ja värjäysliuoksissa ei

saa käyttää esim. metallipinsettejä, jotta vältetään kontaminaatioilta. (Tienhaara 2000:159.)

4.11 Kuparin osoitus rodaniinilla

Kupari on elimistölle välttämätön hivenaine, joka auttaa pitämään hermosolut ja immuunijärjestelmän terveenä, sekä auttaa elimistöä valmistamaan punaisia verisoluja. Se myös auttaa muodostamaan kollageenia, voi toimia antioksidanttina ja auttaa raudan imeytymisessä elimistöön. (Ehrlich 2015.) Kuparin kasautuminen liittyy Wilsonin tautiin, mikä on tärkein kuparinmetabolian häiriötila. Se nostaa kuparin kertymistä maksassa, silmissä ja aivojen tyvitumakkeissa. (Orchard 2013: 260.)

Rodaniinin toiminta perustuu siihen, että se on kelatoiva-aine ja sillä on voimakas affiniteetti kudoksissa proteiineihin sitoutuneisiin kuparikasautumiin (Ellis n.d.). Rodaniini osoittaa proteiinit, joihin kupari sitoutuu, eikä niinkään kuparia itseään. Kuparikasautumat värjäytyvät kirkkaan punaisesta oranssiin (kuvio 20). Tumat värjäytyvät sinisiksi. (Copper – Rhodanine method n.d.) Sappi nähdään vihreänä. Tulokset auttavat tunnistamaan toisistaan sapon ja rautapigmentit. (Orchard 2013: 260.)



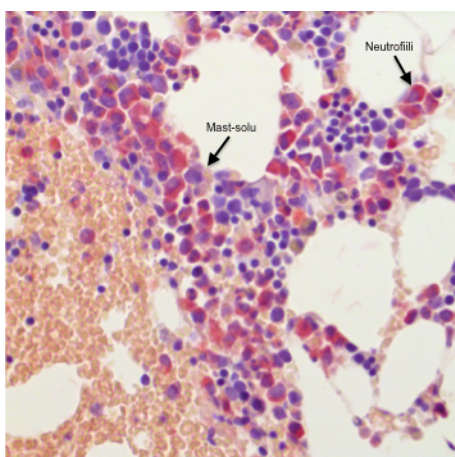
Kuvio 20. Rodaniinilla osoitettuja kuparikasautumia punaoransseina

Värjäystä tehdessä näytelasit pitäisi valuttaa hyvin joka vaiheen jälkeen, etteivät liuokset pääse sekoittumaan seuraaviin. Mikäli näyte ylivärjäytyy hematoksyliinillä kuparikasautumia ei välttämättä enää pystytä näkemään. (Copper Stain, Rhodanine 2015.)

4.12 Leder

Leder-värjäystä (CAE) voidaan käyttää veren sivelyvalmisteissa ja luuydinaspiraateissa hematologiassa (Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d.). Patologiassa sitä käytetään luuytimen parafiinileikkeissä, jotka ovat dekalsifioitu esimerkiksi EDTA:lla (Katayama – Mochino 1983:381). Histopatologiassa sen avulla voidaan diagnosoida neutrofiilisia granulosityttejä ja syöttösoluja (Rice – Bain 2012:304-305; Katayama – Mochino 1983:391). Sen avulla voidaan myös erotella suurisolu-tyyppisiä lymfoomia (Katayama – Mochino 1983:392). Värjäyksen loppureaktiot erottelevat toisistaan granulosityttiset, lymfosyyttiset ja monosyyttiset solut (Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d.).

Leder-värjäyksessä vastamuodostunut diatsoniumsuola hydrolysoi entsyymaattisesti naftoli AS-D-kloroasetatin ja vapauttaa naftolihydristeitä. Nämä yhdisteet yhdistyvät diatsoniumsuolojen kanssa ja muodostavat värjäytyneitä kasaumia alueille, joissa on esteraasiaktiivisuutta. (Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d.). Vastavärjäys tehdään hematoksyliinillä. Naftoli AS-D-kloroasetatiestaraasin aktiivisuutta pidetään markkerina kypsille ja epäkypsille neutrofiilisille granulosityteille, sekä syöttösoluille. (Katayama – Mochino 1983:391.) Positiivinen reaktio nähdään kirkkaan punaisena ja tumat sinisenä (Leder 1970:1). Granulosityteistä tulee voimakas positiivinen reaktio, kun taas syöttösolut ovat hieman reaktiivisia (kuvio 21). Degranuloituneet solut eivät välttämättä värjäydy, sillä juuri granulat ovat yleensä positiivisia. (Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d.)



Kuvio 21. Normaalisessa luuytimessä Leder-värjäyksellä kirkkaanpunaiseksi värjäytyneitä neutrofiileja ja hailakoita syöttösoluja (mast-solut)

Jokaista värjäystä varten tulee aina valmistaa uusi värjäysliuos. Työskennellessä tulisi käyttää lasisia astioita ja pipettejä, sillä N.N dimetyyliformamidi liuottaa muovia, joka pilaa liuksen. Myöskään parafilmiä ei saa siis käyttää. Leikkeet tulee huuhdella hyvin tislattulla vedellä ennen värjäystä, sillä etanoli heikentää värjäysliuosta. (Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d.)

5 Värjäysreagenssien käyttöturvallisuus

Tässä osiossa kerrotaan ensin yleisesti käyttöturvallisuustiedotteista ja niiden sisällöistä. Sen jälkeen käyttöturvallisuustiedotteiden käyttöä käsitellään patologian laboratorion ja sen työntekijöiden osalta, sekä lopuksi vielä yksittäisen värjäyksissä käytetyn reagenssin haittavaikutusten kautta.

Käyttöturvallisuustiedotteella tarkoitetaan asiakirjaa, jossa on tietoa seoksen tai aineen ominaisuuksista, riskeistä ja turvallisesta käytöstä teollisuuden tai ammatin tarpeisiin. REACH-asetuksessa (EY), N:o 1907/2006 tietojen toimittamista koskevan osaston IV 31 artiklassa säädetään, että kemikaalin valmistaja, maahantuoja, jakelija tai muu toiminnan harjoittaja, jonka vastuulla tuotteen markkinoille tuominen on, tulee laatia ammattikäyttöön suunnatusta kemikaalista käyttöturvallisuustiedote. Käyttöturvallisuustiedote on myös toimitettava kemikaalin vastaanottajalle, joko sähköisenä tai paperisena, suomen- ja tarvittaessa ruotsinkielisenä. Käyttöturvallisuustiedote tulee laatia vaaralliseksi luokitelluista aineista ja seoksista. Lisäksi sellainen tulee laatia luokittelemattomista seoksista, jotka sisältävät vaarallista ainetta. Sama koskee myös biokertyviä, hitaasti hajoavia ja myrkyllisiä (PBT) tai erittäin hitaasti hajoavia ja erittäin voimakkaasti biokertyviä (vPvB) aineita, tai jos aine sisältyy kandidaattilistaan, eli mahdollisesti sisältyy luvanvaraisten aineiden luetteloon. (Käyttöturvallisuustiedote 2016.)

Patologian laboratoriossa histologian erikoisvärjäyksiä tekevän työntekijän tulee tietää käsittelemiensä tuotteiden käyttöturvallisuuteen liittyvät suositukset. Käyttöturvallisuustiedotteen avulla työntekijä näkee aineiden mahdolliset haittavaikutukset sekä osaa suojautua asianmukaisesti, ja käsitellä kemikaaleja oikein ja turvallisesti. Lisäksi käyttöturvallisuusohjeista voidaan selvittää, millä tavalla eri kemikaalit tulee hävittää turvallisesti ja ympäristöä vaarantamatta. Opinnäytetyön tuotokseen lisättiin jokaisen värjäyksen yhteyteen käyttöturvallisuustiedotteista työskentelyn kannalta tärkeimpiä huomioon otettavia asioita. Histologisissa värjäyksissä käytettävät reagenssit voivat olla esimerkiksi karsinogeeneja eli syöpää aiheuttavia, ne voivat vahingoittaa sikiötä tai aiheuttaa

perimänvaurioita (Hydrokinoni 2017; Congo red 2015). Lisäksi ne voivat olla esimerkiksi erittäin myrkyllisiä vesieliöille (Hopeanitraatti 2017).

Yhtenä esimerkkinä vaarallisesta histologian värjäyksissä käytettävästä aineesta mainittakoon Wartin-Starry ja Grimelius -värjäyksissä tarvittava hydrokinoni, jolle on annettu neljä kemikaalien varoitusmerkkiä, jotka ovat syövyttävä, vakava terveysvaara, ympäristölle vaarallinen ja haitallinen/ärsyttävä/herkistävä/vaarallinen otsonikerrokselle. Sen vaaralausekkeissa mainitaan sen voivan aiheuttaa allergisen ihoreaktion, olevan haitallista nieltynä, vaurioittavan vakavasti silmiä ja lisäksi sen epäillään aiheuttavan syöpää ja perimän vaurioita. Lisäksi se on erittäin haitallista vesieliöille, joille se voi aiheuttaa pitkäaikaisia haittavaikutuksia. (Hydrokinoni 2017.) Patologian laboratoriossa hydrokinoni kerätään ympäristöön pääsyn estämiseksi erilleen.

6 Hyvä työohje

Ohjeen tehtävä on kertoa lukijalle, kuinka tulisi menetellä päästäkseen haluttuun lopputulokseen. Ohjeet voivat olla joko sanallisia, kuvallisia tai niiden yhdistelmiä. Hyvin toteutettu ohje säästää lukijan sekä kirjoittajan aikaa. Vaikeaselkoisen ohjeen seuraaminen voi olla pahimmillaan mahdotonta, ja sen mukaan toimimalla voidaan saada aikaan jopa vahinkoa. Niinpä tärkeät toimintaohjeet olisi hyvä testata ennen käyttöönottoa. (Kankaanpää – Piehl 2011: 295–296.)

Onnistunut tekstin ja kuvien asettelu houkuttelee lukemaan ohjetta, sekä parantaa sen ymmärrettävyyttä. Rauhallisen vaikutelman aikaansaamiseksi kannattaa yleisilme jättää ilmapaksi, sillä ulkoasultaan liian levoton ohje voi olla vaikeaselkoinen. Värillinen ohje huomataan mustavalkoista paremmin, mutta kannattaa silti pysyä hillityssä värien käytössä. Huomion kiinnittäminen väreillä onnistuu parhaiten, kun korostetaan tärkeät kohdat väreillä ja pysytään muuten mustavalkoisessa yleisilmeessä. Tyypillinen pohjaväri on valkoinen. (Lipponen – Kyngäs – Kääriäinen 2006: 68.)

Käytetty fontti ja sen koko vaikuttavat ohjeen ulkoasuun ja luettavuuteen. Tekstin tulisi erottua hyvin taustastaan ja olla helposti luettava. Tavallisin fonttikoko on 12 ja usein ohjeessa käytettyjä fontteja ovat Arial tai Times New Roman. Otsikot voidaan erottaa muusta tekstistä lihavoinnilla tai käyttämällä isoja kirjaimia. Muu teksti kannattaa kirjoittaa pienenä. Alleviivaukset usein heikentävät tekstin luettavuutta, ja myös tekstin ulkoasu kärsii, joten niitä ei välttämättä kannata käyttää ohjeistuksessa. Jos käytetään

suoria lainauksia, ne erotetaan muusta tekstistä kursivoinnilla. (Lipponen ym. 2006: 68.)

6.1 Ohjeistavan tekstin kirjoitus

Työelämään tehtävät tekstit tehdään aina jonkun luettavaksi. Lukija haluaakin hyötyä siitä saadakseen tietoa. Siksi teksti pitää laatia niin, että lukija otetaan huomioon. Teksti tulisi kohdentaa aina kullekin kohderyhmälle erikseen, ja kielen tulisi olla tekstissä sanastoltaan ja rakenteeltaan ymmärrettävää. Useimmille lukijoille yleiskieli on sopiva. Työelämässä lukijoilla on usein kiire, joten turhat asiat tekstistä kannattaakin karsia pois, jotta lukijalle tarpeelliset asiat ei huku sivuseikkoihin. Lisäksi tärkeitä asioita kannattaa korostaa. Liiallinen tiedon määrä voi saada lukijan päättämään, ettei jaksa edes kiinnostua tekstistä, tai hän ei pysty näkemään mikä tekstissä on olennaista. Tekstistä voi rajata huoletta pois myös kaiken sen, mikä ei koske lukijaa tai minkä hän jo tietää. (Kankaanpää – Piehl 2011: 67, 70–71, 85.)

Jos halutaan lukijan toimivan ohjeistuksen mukaan, pitäisi tekstissä käydä selvästi ilmi, mitä pitää tehdä. Lisäksi on hyvä miettiä, onko lukijalle tarpeellista perustella miksi näin tulee toimia. Perustelu on yleensä paras keino saada ihminen toimimaan, ja sitä kannattaa käyttää, jos epäilee, saadanko kohde toimimaan halutulla tavalla. Tehtävän suorittamisohje olisi paras esittää aikajärjestyksessä, eli missä järjestyksessä toimija etenee. Lisäksi ohjeistuksessa voi olla hyvä olla johdanto, jossa kerrotaan ohjeiden tarkoitus ja mihin tulokseen niillä päästään, sekä mitä välineitä tarvitaan. Myös käsitteitä voidaan selittää johdannossa, jos se on tarpeen. (Kankaanpää – Piehl 2011: 63, 80, 296.)

6.2 Kuvien käyttö ohjeessa

Kuvaa ja tekstiä käytetään tavallisesti täydentämään toisiaan, ja kuvalla pitääkin olla aina tarkoitus tai jokin sanoma. Kuva kertoo enemmän kuin tuhat sanaa, ja sitä voidaan käyttää apuna mielenkiinnon herättämisessä, kertomisessa ja havainnollistamisessa. Kuvan valintaa tehtäessä pitäisi miettiä, mihin kuva tulee ja mitä se kertoo katsojalle. Jos halutaan käyttää havainnollistavia valokuvia, usein paras tähän tarkoitukseen on lähikuva. Sen avulla saadaan esiin kohteen erityispiirteitä. Kaikki samaan ohjeeseen tulevat kuvat olisi hyvä olla myös keskenään samantyyllisiä. (Kuva 2017.) Kuvien yhteyteen olisi aina hyvä liittää kuvateksti, sillä se ohjaa kuvien luentaa. Kuvia käytettäessä

pitää huomioida tekijänoikeudet, eli mitä tahansa kuvia ei saa kopioida ja käyttää luvatta. (Lipponen ym. 2006:67).

6.3 Patologian laboratorion värjäystyöohje

Labquality voi myöntää patologian yksikölle laatutunnuksen, mikäli se täyttää International Academy of Pathologyn (IAP) ylläpitämän Patologian Laboratorion Toimintajärjestelmä –standardin vaatimukset (Aho 2017:12.). Standardin vaatimukset perustuvat suosituksiin ulkomaalaisten patologianlaboratorioiden laatujärjestelmistä ja muiden laboratorioalojen toimintakäsikirjoista. Siinä otetaan huomioon myös kansainvälisten standardien laatujärjestelmien sertifiointin ja testauslaboratorioiden akreditoinnin periaatteita. (Patologian laboratorion toimintajärjestelmä 2016:4-5.)

IAP:n julkaisemassaan Patologian laboratorion toimintajärjestelmä -ohjeessa on kerrottu suositukset siihen, mitä värjäysohjeiden tulisi sisältää. Värjäysohjeen, kuten muidenkin ohjeiden, tulisi olla kaikki muodoltaan yhtenäisiä. Lisäksi kaikkien työohjeiden pitäisi olla riittävän yksityiskohtaisia, jotta niitä noudattaessa ei pääse syntymään väärinkäsityksiä. Värjäysohjetta laadittaessa sivun alkuun tulisi laittaa otsikko ja yksikkökohtainen koodi, jos sellainen on käytössä. Alussa tulisi aina olla näkyvässä myös ohjeen laatija, hyväksyjä ja päivämäärä sekä lisäksi ohjeen versionumero. Useamman sivun ohjeissa yläreunaan täytyy sijoittaa sivunumero, sekä ohjeen nimi ja päivytystiedot. Näiden tietojen jälkeen voidaan aloittaa itse ohje. Ohjeen eri osa-alueet tulisi suosituksen mukaan otsikoida taulukon 2 mukaan. Ensin kerrotaan mikä määritettävä tai värjättävä asia on. Lisäksi esitellään menetelmän periaate, lääketieteellinen tausta sekä näytteen laatu. Näiden taustatietojen jälkeen siirrytään työn suoritukseen, jonka jälkeen käsitellään työn tulos ja sen tulkinta. Näitä seuraavat työskentelyn virhelähteet sekä tarvittavat kontrollit. Värjäysohjeessa pitäisi mainita myös laitteet ja välineet, joita työskennellessä tarvitaan, sekä käytettävät reagenssit ja varotoimenpiteet. Lopuksi tulisi käydä ilmi ohjeen laadinnassa käytetty kirjallisuus. Näiden jälkeen voidaan lisätä vielä mahdolliset liitteet. (Patologian laboratorion toimintajärjestelmä 2016:30.)

Taulukko 2. Värjäysohjeen otsikointi

1	Värjättävä tai määritettävä asia
2	Menetelmän periaate
3	Lääketieteellinen tausta
4	Näytteen laatu
5	Työn suoritus
6	Tulos ja tulkinta
7	Virhelähteet
8	Kontrollit
9	Laitteet ja välineet
10	Reagenssit
11	Varotoimenpiteet
12	Kirjallisuus
13	Liitteet

Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratoriossa ei ole tehty akkreditointia, eikä työohjeiden rakenteelle tai sisällölle ole olemassa erityisiä kriteereitä. Nykyisessä histologian värjäysohjekansiossa on 29 eri värjäystä. Tällä hetkellä värjäysohjeissa on mukana itse värjäysohje ja työskentelyssä tarvittavat reagenssit ja tarvittavien liuosten valmistusohjeet. Lisäksi ohjeissa kerrotaan, mikä on värjäyksen tulos. Useimmissa ohjeissa on myös värjäyksen periaate tai taustatietoa värjäykseen liittyen. Myös virhelähteitä on joissakin ohjeissa mainittu. Aiemmin osaan värjäyksistä oli liitetty reagenssien hävitysohjeita, tai käsin ohjeisiin lisättyjä käyttöturvallisuustietoja ja huomautuksia ”Huomioi käyttöturvallisuustiedote”.

7 Opinnäytetyön toteutus

Keskustelua opinnäytetyön aiheesta työelämän, koulun opinnäytetyönohjaajan ja opinnäytetyöntekijän välillä alettiin käydä keväällä 2017. Opinnäytetyön tavoitteeksi valikoitui Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorion käyttöön tulevan konkreettisen tuotoksen valmistaminen, joten opinnäytetyö on tuotteellinen. Tehtävänä oli täydentää histologian värjäysohjekansiota kuvien avulla ja käyttöturvallisuustiedotteiden pääkohdilla. Patologian laboratoriosta tulleiden toiveiden perusteella värjäysohjekansiossa olevista 29 erikoisvärjäyksestä värjättiin työtä varten 21, sillä osa värjäyksistä vie paljon aikaa tai ne ovat hyvin harvoin käytössä.

7.1 Toimintaympäristö

Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian yksikkö sijaitsee Länsi-Pohjan keskussairaalassa Kemissä. Osastolla työskentelee tällä hetkellä kaksi patologiaa, yksi täyttä ja yksi puolikasta päivää tekevä osastosihteeri, sekä laitoshuoltaja. Lisäksi laboratoriossa

työskentelee lääkintävahtimestari, joka työskentelee histologisten näytteiden vastaanotto- ja käyntiinpano-pisteessä, sekä avustaa obduktioissa, huolehtii vainajien vastaanotosta ja luovutuksesta. Laboratoriossa työskentelee 3 laboratoriohoitajaa, sekä osastonhoitaja.

Histologian näytteet käsitellään käyntiinpanon ja yön yli tapahtuvan kuduskuljetuksen jälkeen histologian leikkauspisteellä, jossa tapahtuu ensin näytteiden parafiiniinivalaminen ja sitten mikrotomin avulla leikkeiden leikkaaminen. Perusvärjäykset värjätään värjäysautomaatilla. Erikoisvärjäykset ja immunohistokemialliset värjäykset tekee loppuun sytologian pisteessä työskentelevä laboratoriohoitaja. Histologian erikoisvärjäysten ohjeet laboratoriossa ovat koottuna kansioon. Työskentelyn aloittaessaan laboratoriohoitaja voi ottaa kansioista mukaansa tarvitsemansa sivut, joiden ohjeilla valmistetaan ja kerätään värjäystä varten liuokset vetokaappiin. Yksittäisten värjäysten suoritushjeet ovat koottuna yhdelle sivulle, ja se otetaan mukaan vetokaappiin, jossa värjäys suoritetaan. Näin voidaan seurata työskennellessä ohjetta vaihe vaiheelta. Värjäyksen lopputuloksen laboratoriohoitaja arvio mikroskooppisesti, värjäysohjekansiossa olevan sanallisesti kuvatun tuloksen perusteella ja aiempaan kokemukseensa nojaten. Valmiit kudusvärjäyslasit jaetaan patologeille, jotka antavat niistä lausunnon.

Patologian laboratoriossa käsitellään myös sytologisia solu-, irtosolu- ja harjanäytteitä, sekä ohutneulabiopsioita. Sytologian pisteessä työskentelevä laboratoriohoitaja kirjaa sytologian näytteet ja tekee niistä joko sytosentrifuugivalmisteen tai liippaa yskökset lasille. Gynekologiset irtosolunäytteet tulevat valmiiksi laseille siveltyinä ja kiinnitettyinä. Näytteet värjätään värjäysautomaatilla. Näytteet esitarkastaa skriinaus-pisteessä työskentelevä laboratoriohoitaja, ennen näytteiden jakamista patologeille.

Niin sanottujen perustutkimusten lisäksi tehdään jääleiketutkimuksia. Ne ovat pikatutkimuksia, joissa näyte jäädytetään, leikataan ja värjätään HE- ja toluidisini-värjäyksillä. Vastaus ilmoitetaan lähettävälle lääkärille mahdollisimman pian.

7.2 Värjäysohjeiden tekoprosessi

Työskentely aloitettiin teorian tietoa hakemalla, sekä kirjoittamalla työsuunnitelma. Suunnitelman valmistumisen jälkeen haettiin tutkimuslupa hallintoylihoitajalta, jotta saatiin lupa käyttää tarvittavia tiloja (patologian laboratorio), laitteita (värjäyslaitteet, mikroskooppi, kuvauskalusto, mikrotomi) ja tietokantoja potilasnäytteistä ja käyttöturvallisuustiedotteista. Ennen käytännön työhön ryhtymistä käytiin läpi kerättyä teorian tietoa

sekä muotoiltiin raporttia, jotta teoreettinen tietoperusta olisi värjäyksiin ryhdyttäessä olemassa. Opinnäytetyön eteneminen on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Opinnäytetyön eteneminen

Ajanjakso	Työvaihe
Elokuu – lokakuu 2017	Opinnäytetyösuunnitelman kirjoittaminen; taustatutkimuksen hakeminen; työharjoittelu; suunnitelman palautus 6.10.; suunnitelmaseminaari 11.10.
Marraskuu 2017	Työharjoittelu
Joulukuu 2017	Teoriaosan kirjoittaminen raporttiin; lisää tiedonhakua
Tammikuu 2018	Työskentely patologian laboratoriossa: näytteiden leikkaus ja värjäys. Raportin kirjoittaminen. Käyttöturvallisuusohjeisiin tutustuminen.
Helmikuu 2018	Näytteiden leikkaus ja värjäys. Lasien kuvaaminen. Värjäyskansion kokoaminen; työturvallisuusohjeiden lisääminen kansioon.
Maaliskuu 2018	Lasien kuvaaminen. Värjäyskansion kokoaminen; työturvallisuusohjeiden lisääminen kansioon. Raportin kirjoittaminen.
Huhtikuu 2018	Raportin viimeistely. Opinnäytetyön palautus 19.4. Seminaari 26.4.

Kun värjäysten periaatteet ja käytännön työvaiheet oli selvitetty, tehtiin värjäystyön suhteen työaikataulu. Värjäysten onnistuessa kerralla oikein, työlle laskettiin tarvittavaksi aikaa viikko. Kuitenkin aikataulua laatiessa varauduttiin siihen, että saatettaisi tarvita myös uusintavärjäyksiä. Työssä tarvittavat erikoisvärjäykset tehtiin Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratoriossa. Värjäysten tekemiseen itse päädyttiin, jotta voin kehittää ammattitaitoani ja tutustua erilaisiin histologian värjäysmenetelmiin tarkemmin. Lisäksi tällä menettelytavalla ei ollut tarpeen ottaa huomioon kuvien tekijänoikeuksia.

Käytännön työskentely aloitettiin etsimällä värjättävät näytteet. Työssä käytettiin LPSHP:n patologian laboratoriossa aiemmin kerättyjä näytteitä, joista oli tehty työssä tarvittavia värjäyksiä ja jotka olivat värjäyspositiivisia. Muutamissa värjäyksissä käytettiin myös kontrollinäytteitä. Työtä varten värjättiin myös muutamia potilasnäytteitä, joista pyydettiin tarvittuja värjäyksiä. Myöhemmin myös patologi antoi ehdotuksia hyvistä näytteistä. Värjättävät näytteet valikoitiin värjättävän ilmiön positiivisuuden perusteella, kuten esimerkiksi T-PAS -värjäykseen sienirihmoja sisältävä näyte, Ziehl-Neelsenin -näyte, joka sisältää sauvabakteereja, tai kuparia osoittaessa näyte, jossa voidaan nähdä kuparisakkaa. Osaa värjäyksistä käytetään tiettyihin kudoksiin, kuten Bielschowski-värjäystä, jota käytetään aivojen värjäämiseen, joten näihin näyte valittiin sopivan kudoksen mukaan. Yleisvärjäyksiä varten, joiden suhteen ei vaadittu mitään tiettyjä ominaisuuksia, kuten HE, värjättävä näyte valittiin satunnaisesti. Työskennel-

lessä ei käytetty mitään henkilötietoja, joiden perusteella henkilöt, joista näytteet ovat otettu, olisivat jäljitettävissä. Lasit nimettiin jo työskentelyvaiheessa vain värjäyksen nimen mukaan, joten niitä ei pystytä jäljittämään alkuperäiseen näytteeseen. Valmiissa työssä ei tule esille henkilön tunnistamista mahdollistavia tietoja.

Värjäyksiä varten tarvittavat näytteet leikattiin itse vesiliukumikrotomilla. Konevärjäyksiä varten, joita oli viisi (HE, PAS, AB-PAS, T-PAS, D-AB-PAS), vietiin lasit leikkauksen jälkeen Tissue TEK Prisma -värjäysautomaattiin värjättäväksi. Loput värjäykset tehtiin käsivärjäyksinä ja niitä varten valmistettiin myös tarvittavat liuokset. Parafiininpoisto tehtiin aina koneellisesti ja näytelasien päällystyksessä käytettiin peitinkalvoautomaattia, paitsi Kongopuna -värjäyksessä, joka päällystettiin ohjeiden mukaan peitinlasilla. Valmiiden värjäysten laatua ja edustavuutta arvioitiin yleensä päivän päätteeksi ensin ohjaajan kanssa. Tämän lisäksi patologi hyväksyi aina värjäyksen tulokset, jonka jälkeen osa värjäyksistä uusittiin mikäli värjäys ei ollut täysin onnistunut, kuten esimerkiksi Wartin-Starry, jossa värjäys oli sakkainen. Joissakin tapauksissa valittu näyte ei ollut kyseisen värin esilletuloon paras mahdollinen, kuten esimerkiksi Leder ja Gomor, joissa ensimmäinen luuydin oli fibroottinen ja haluttiin kuitenkin käyttää normaalimman näköistä luuydintä. Grimeliuksessa onnistunutta värjäystä eri kudoksilla tehtiin uudestaan parikin kertaa, jotta saatiin positiivisuus näkyviin. Ensimmäisessä Giemsa-näytteessä taas positiivisuutta oli niin paljon mastosytoosi tautilasta johtuen, että värjättiin myös toinen näyte, jotta värjäys tulisi paremmin esiin. Giemsa- ja Gomor-värjäyksissä hyödynnettiin värjäysohjeessa kuitenkin molempien värjäyskertojen kuvat, jotta voitiin havainnollistaa, miten erilaiselta värjäys voi onnistuessaankin näyttää.

Näytteiden haussa päästiin alkuun ohjaajan opastuksella ja värjäyksiä tehdessä kysyttiin apua tarvittaessa, jos jokin oli uutta tai tarvittiin opastusta. Värjäysten valmistuttua oli aika työstää taas raporttia, suunnitella tulevan värjäysohjekansion muotoa tarkemmin ja alkaa muotoilemaan sitä. Ohjekansion pohjana käytettiin aiemmin käytössä olleen värjäysohje -kansion sähköistä tiedostoa, jota muokattiin niin, että jokaisen ohjeen ulkoasu oli yhtenäinen ja kuvat mahtuivat mukaan.

Mikroskoopin kameran kuvausohjelmistoa ei saatu aluksi toimimaan, joten sopivaa ajankohtaa kuvien ottamiselle jouduttiin siirtämään. Ennen värjäysten kuvaamista istuttiin ylilääkärin kanssa saman mikroskoopin ääreen ja käytiin jokainen värjätty näytelasi läpi. Katsoimme miltä esimerkiksi sidekudossäikeet, sienirihmat tai kupari värjäyksessä näyttivät. Samalla arvioitiin vielä, että näytteessä on nähtävillä värjäyksessä esiin halut-

tu positiivinen tulos, tai värjäyksen periaate tulee hyvin esille, ja että lasi on riittävän hyvä kuvattavaksi. Lisäksi käytiin läpi sitä, minkä tyyppisiä kuvia tai millaisia asioita lasilta olisi hyvä kuvata. Muutamista värjäyksistä toivottiin kansioon liitettäväksi useampia eri näytteistä otettuja kuvia, sillä ne näyttävät erilaisilta eri tiloissa. Lasit kuvattiin mikroskoopissa Leican LAS V4.12 -ohjelmalla. Tässä vaiheessa otettiin useampia kuvia jokaisesta lasista eri suurennoksilla sopivista kohdista, jotta myöhemmin voitaisi valikoida tarvittavia kuvia. Kuvien käsittelyä pyrittiin välttämään, jotta värjäykset näyttäisivät mahdollisimman paljon siltä, miltä ne mikroskoopissakin näyttävät. Kuitenkin kongonpuna -värjäyksen polarisoidussa valossa otettua kuvaa jouduttiin muokkaamaan, sillä kuvattaessa ei saatu oikeaa värisävyä esille, joten muokkaamalla pyrittiin pääsemään hiukan lähemmäs todellista kuvaa. Kuvat lisättiin muokattuun värjäysohjekansion pohjaan.

Käyttöturvallisuustiedotteet haettiin Länsi-Pohjan keskussairaalan intrasta löytyvästä EcoOnline kemikaalidokumentaation hallintajärjestelmästä, johon patologian laboratoriossa käytössä olevat kemikaalit ovat listattuna. Muutamia käyttöturvallisuustiedotteita haettiin myös internetistä valmistajien sivuilta. Materiaali käytiin läpi ja mukaan työhön liitettiin tärkeimmät kohdat kemikaalien käsittelyyn liittyen patologian laboratoriossa. Näitä ovat kemikaalien varoitusmerkit ja vaara- sekä turvalausekkeet. Varoitusmerkit otettiin mukaan, koska ne antavat ensi silmäyksellä viitteitä huomioon otettavista asioista kemikaalia käsiteltäessä. Merkkien yhteyteen liitetyt vaara- ja turvalausekkeet tarkentavat, miten aineiden kanssa tulisi toimia. Lisäksi liitettiin tieto siitä, kuinka kemikaali tulee hävittää. Kemikaalien nielemistä koskevat varoitukset jätettiin pois, sillä patologian laboratoriossa kemikaaleja ei oletusarvoisesti syödä. Suojakäsineiden käyttö jätettiin mainitsematta käyttöturvallisuus-osiossa, sillä lähes jokaisen värjäyksissä käytettävän kemikaalin käyttöturvallisuustiedotteessa ohjeistetaan käyttämään nitrilikumisia suojakäsineitä, ja patologian laboratoriossa oletuksena on, että aina kemikaaleja käsiteltäessä käytetään suojakäsineitä.

Jo kansion tekstiosuutta uudelleen muotoillessa alkoi tuntumaan, että uudessa muodossaan ohjekansiosta tulee hyvin pitkä. Alkuperäinen suunnitelma oli liittää se mukaan opinnäytetyön raportin loppuun, mutta se ei kuitenkaan tuntunut lopulta olennaiselta. Niinpä raporttiin liitettiin erikoisvärjäyksen teoriaosuuksien yhteyteen työstettyjä kuvia, ja kansion sisältö esitellään muutamien esimerkkien avulla.

8 Histologian värjäysohjekansion kuvaus

Opinnäytetyön tuotteena valmistui täydennetty värjäysohjekansio. Värjäysohjekansion ohjeet olivat aiemmin 1-3 sivun mittaisia, riippuen värjäyksestä. Ohje alkoi värjäyksen nimellä ja seuraavaksi tuli yleensä menetelmän periaate, joihinkin värjäykseen oli liitetty myös muuta tietoa tutkittavaan aiheeseen tai värjäykseen liittyen. Tämän jälkeen käytiin läpi reagenssit ja liuosten valmistus. Sen jälkeen oli värjäyksen suoritus ohje ja tulos, sekä mahdollisia virhelähteitä. Lopuksi mainittiin käytetyt kirjallisuuslähteet. Useissa ohjeissa oli reagenssit -otsikon alla ”Huomioi käyttöturvallisuustiedote” ja hävitysohjeita joillekin liuoksille tai käsin ohjeisiin lisättyjä käyttöturvallisuustietoja. Kemikaalien hävittämisohejeita löytyy laboratoriossa myös erilliseltä tulosteelta formaliini- ja xyleeniviemäreiden vierestä seinältä. Kansiota oli täydennetty eri aikoihin, joten ohjeet erosivat toisistaan hieman ulkoasullisesti. Kansiossa oli käytetty esimerkiksi eri fontteja eri ohjeissa ja sisennykset erosivat toisistaan.

Ohjeen rakenteen lähtökohtana käytettiin IAP:n Patologian laboratorion toimintajärjestelmä suositusta. Suosituksen mukaan ohje alkaa värjäyksen indikaatiolla. Mikäli ohjeessa oli kerrottuna lisäksi lääketieteellistä taustaa, joka liittyi määritettävään asiaan se liitettiin suosituksesta poiketen jo osaksi indikaation kuvausta. Tämä siksi, että se täydensi tekijän mielestä luontevasti määritettävää asiaa. Tämän jälkeen ohjeessa esitellään värjäyksen periaate. Seuraavaksi kerrotaan näytteen laatu, mikäli se poikkeaa jollain tavoin rutiiniohjeistuksesta (4µm parafiinileike). Näytteen laadun jälkeen mainitaan kontrolli, mikäli sitä käytetään kyseisessä värjäyksessä. Kontrolli-osio käsitellään suosituksesta poiketen jo tässä vaiheessa, koska sen halutaan kiinnittävän huomion jo ennen värjäyksen aloittamista. Myös työn tulos on esitelty suosituksesta poiketen ennen värjäystä, sillä se haluttiin mahtuvan samalle sivulle värjäyksestä otetun kuvan kanssa. Näin kuva ja tulos saadaan yhdessä tarkasteltavaksi mikroskoopin luokse, kun tarkistetaan värjäyksen onnistuminen. Kuviossa 22 havainnollistetaan asettelu Berliinin sini -värjäysohjeen alkuosassa.

BERLIININ SINI

(Gomorin rautareaktio, rautasulfidireaktio)

VÄRJÄYKSEN INDIKAATIO:

Jos halutaan selvittää, onko kudoksessa vanhojen verenvuotojen jätteitä. Jos nähdään pigmenttiä, jonka laatu halutaan selvittää, esim. hematoomien jätteet, arvissa olevat pigmentit, endometriosisipesäkkeiden reunoilla olevat vanhat pigmenttijäämät. Tai jos halutaan selvittää, onko näkyvä pigmentti hemosideriiniä, ferritiiniä vai esim. melaniinia, jota se kovasti muistuttaa.

PERIAATE:

Kemiallinen värjäys (Perl v.1867). Menetelmässä osoitetaan laimealla suolahappoliuoksella kudoksen proteiineista irrotetut ferri-ionit (Fe^{+++}) kaliumferrosyanidilla. Reaktiotuote on liukenematon ferriferrosyanidi eli berliininsini.

NÄYTTEEN LAATU: 5 μ parafiinileike

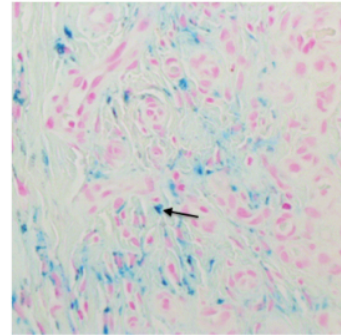
KONTROLLI: Värjäykseen mukaan positiivinen kontrolli

TULOS:

Rautapigmentit: **kirkkaan sininen**

Tumat: **punainen**

Sytoplasma: **vaalean punainen**



Rauta näkyy kirkkaan sinisenä.

Kuvio 22. Berliinin sini-ohjesivun alku.

Seuraavina ovat työnsuoritukseen liittyvät kohdat. Ensin reagenssit ja niiden valmistusohjeet ja sitten värjäyksen työvaiheet. Suosituksen mukaan näiden jälkeen on vuorossa virhelähteet. Tätä suositusta on noudatettu, mikäli ohjeisiin on virhelähteitä kirjattu. Lopussa ovat kirjallisuuslähteet. Nämä osiot on havainnollistettu kuviossa 23.

REAGENSIT:**Rodaniini -kantaliuos: Säilytys jääkaappissa**

- 0,2 g 5-(4-dimethylaminobentzylden)-rhodanin
 $C_{12}H_{12}N_2OS_2$, C.I.45160
- 100 ml 100 % etanolia

Käyttöliuos

- 3 ml hyvin sekoitettua kantaliuosta
- 47 ml tislattua vettä

Borax

- 0,5 g Natriumtetraboraattia (Borax) $Na_2B_4O_7 \cdot x10 H_2O$
- 100 ml aquaa

VÄRJÄYS:

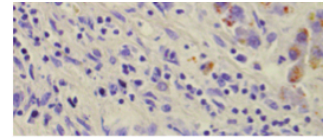
- Xyleenit 3x 2 min, abs alk 3x 1 min .95 % alk 1x 1 min
- Tislattu vesi huuhtelu
- Käyttöliuos 3 tuntia 56C tai 18 tuntia 37C
- Tislattu vesi huuhtelu useita kertoja
- Harrisin htx 1 min
- Tislattu vesi huuhtelu
- Borax-liuos nopea kasto
- Juokseva vesi 10min
- Tislattu vesi
- 95 % alk. 2x 1 min, abs. alk. 2x 1 min, Xyleenit 3x 2 min. Päällystys

VIRHELÄHTEET:

Lipofuskiini voi myös värjäytyä punaiseksi.

LÄHTEET:

Poulsen-Christoffersen: Atlas of liver biopsies s.226/1979. OYS:n ohje KK/7.5.1996.
Bancroft-Stevens.Theory and practice of Histological Techniques third edition s. 261



Kuparisakka näkyy punertavana

Versoin: 3

Marintech HP-1 learesuunnike-Deckton-Hiet kanein mukattu docx

Kuvio 23. Kuparin osoittaminen -ohjesivun loppuosa.

Kuvattavat erikoisvärjykset päädyttiin tekemään itse, jotta tekijänoikeuksista ei tarvitse huolehtia. Alkuperäinen suunnitelma oli liittää jokaisesta erikoisvärjyksestä yksi kuva ohjeen yhteyteen, joka havainnollistaa värjäyksen lopputulosta. Lopulta kuitenkin päädyttiin lisäämään joihinkin värjäyksiin useampia kuvia, jotta nähtäisiin miten erilaiselta värjäys voi näyttää eri kudoksessa tai eri tilassa. Lisäksi voitiin käyttää erikokoisia suurennoksia, jotka selventävät lopputulosta. Kaikki kuvat liitettiin ohjeisiin 6x6 cm kokoisina. Näin niistä vielä pystytään näkemään värjäys, mutta ne eivät veisi liikaa tilaa ohjeessa. Jotta kaikki kuvat saatiin mahtumaan selkeästi yhdelle sivulle, kokoa rajattiin neliöksi, jolloin voitiin keskittyä paremmin haluttuun yksityiskohtaan ja säästettiin tilaa myös tekstiä varten. Kuviiin liitettiin tarvittaessa nuolia, jotka osoittavat huomioitavia asioita. Kuviossa 24 näkyy kuinka kuva on aseteltu ohjeeseen.

FONTANA-MASSON

VÄRJÄYKSEN INDIKAATIO:

Melaniini pigmentin osoittaminen (melanoomat), APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) -soluissa ja karsinoidituumoreissa esiintyvien argentaffiinisten granuloiden osoittaminen.

PERIAATE:

Metalli-impregnaatio -argentaffiininen reaktio. Melaniinilla on kyky pelkistää ja näin vapauttaa metallista hopeaa ammoniakaalisesta hopealiuksesta: $[Ag(NH_3)_2] + e + Ag + 2 NH_3$. Sähköisen varauksensa menettänyt metallinen hopea sitoutuu melaniini-proteiini -komplekseihin, jotka ovat solun sytoplasmassa sijaitsevilla melaniinigranuloissa: värjäytyvät mustiksi, lisäksi solun argentaffiiniset granulat ja lipofuskiini värjäytyvät mustiksi.

TULOS:

Tumat: **vaalean punainen**

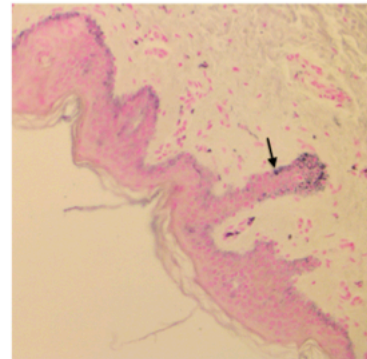
Melaniini: **musta**

REAGENSIT:

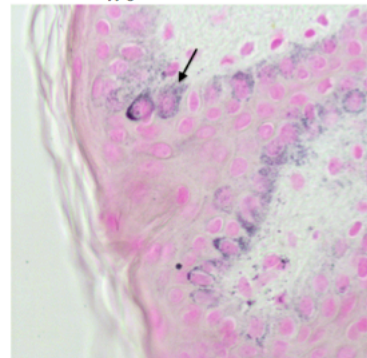
Hopeanitraatti-liuos:

Kantaliuos:

- 10 g hopeanitraattia ($AgNO_3$)
- 100 ml aquaa
- Ota 95 ml 10% hopeanitraattia
- Lisätään ammoniakkia, (muodostuu sakkaa), kunnes saadaan täysin kirkas, sakaton liuos.
- Lisätään tipottain 10% hopeanitraattia (jäljelle jääneestä 5 ml:sta), kunnes liuos hyvin kevyesti samentuu.
- Seisotetaan yön yli
- Säilytetään **jääkaapissa ruskeassa pullossa 1 kk.**



Melaniini näkyy granulaisena



Kuvio 24. Fontana Masson –värjäyksestä on liitetty yleiskuva ja lähempää otettu suurennos ja värjäytynyttä granulaista melaniinia on osoitettu nuolin.

Värjäysohjeiden perään liitettiin myös jokaisen värjäyksen osalta olennaisimmat kohdat käytettävien kemikaalien käyttöturvallisuustiedotteista. Ohjekansioon päätettiin ottaa mukaan kemikaalien varoitusmerkit ja vaara- sekä turvalausekkeiden sisältö. Varoitusmerkit otettiin mukaan, koska ne antavat nopeasti viitteitä huomioon otettavista asioista kemikaalia käsiteltäessä. Merkkien yhteyteen liitetyt vaara- ja turvalausekkeet tarkentavat, miten aineiden kanssa tulisi toimia. Lisäksi liitettiin tieto siitä, kuinka kemikaali tulee hävittää. Kemikaalien nielemistä koskevat varoitukset jätettiin pois, sillä patologian laboratoriossa kemikaaleja ei oletusarvoisesti syödä. Myöskään suojakäsineiden käyttöä ei mainita käyttöturvallisuus-osiossa, sillä lähes jokaisen kemikaalin käyttöturvallisuustiedotteessa ohjeistetaan käyttämään nitrilikumisä suojakäsineitä, ja patologian laboratoriossa oletuksena on, että aina niitä käytetään aina kemikaaleja käsiteltäessä. Käyttöturvallisuusasiat kirjattiin hyvin lyhyesti ja ytimekkäästi, jotta ne ehditään lukea työskentelyn lomassa, sillä eri kemikaaleja on kuitenkin välillä käytössä hyvinkin paljon. Lisäksi eri kemikaalien hävitystapa korostettiin punaisella värillä, sillä se on tärkeä tieto jätteiden oikeanlaisen hävityksen kannalta. Kuvio 25 esittelee Wartin-Starry -

värjäyksen käyttöturvallisuussivun avulla, kuinka käyttöturvallisuusasiat on esitetty ja sivu muotoiltu.

WARTIN-STARRY -KÄYTTÖTURVALLISUUS:

Sitruunahappo



Ärsyttää voimakkaasti silmiä.
Silmiin joutuessa huuhto runsaalla vedellä.

Hopeanitraatti



Voi edistää tulipaloa; hapettava.
Voimakkaasti ihoa syövyttävä ja silmiä vaurioittava.



Käytä suojavaatetusta, silmiensuojainta, kasvosuojainta.
Silmiin joutuessa huuhdellaan vedellä useiden minuuttien ajan.



Altistumisen jälkeen hakeuduttava lääkäriin.
Erittäin myrkyllinen vesielioille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.
Vältettävä päästämistä ympäristöön.

Hävitys: oma hopeajäteastia.

Gelatiinipulveri

Huuhdellaan iholta ja silmistä vedellä.
Ei erityisiä ympäristövaroituksia

Hydrokinoni



Voi aiheuttaa allergisen reaktion.
Vaurioittaa vakavasti silmiä.



Epäillään aiheuttavan perimävaurioita.
Epäillään aiheuttavan syöpää.



Käytä henkilösuojaimia.



Silmiin joutuessa huuhtelee runsaalla vedellä, hakeudu välittömästi lääkäriin.
Iholle joutuessa pese varovasti vedellä ja saippualla.



Erittäin myrkyllistä vesielioille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.

Hävitys: formaliiniviemäriin

Kuvio 25. Wartin-Starry -käyttöturvallisuussivu.

Kansion tekstin fontiksi valittiin Arial, sillä se oli toinen fontti, jota suositeltiin Lipposen, Kynkään ja Kääriäisen (2006) teoksessa. Lisäksi se koettiin selkeäksi ja helposti luettavaksi. Tärkeitä asioita korostettiin punaisella fontilla. Värjäyksien nimet erotettiin muusta tekstistä suuremmalla fontilla ja keskityksellä. Väliotsikoissa käytettiin samaa fonttikokoa muun tekstin kanssa, mutta erotettiin ne isoilla kirjaimilla. Reagenssien ja liuosten nimistä päädyttiin poistamaan aiemmin olleita alleviivauksia, koska Lipposen, Kynkään ja Kääriäisen (2006) mukaan tekstin ulkoasu ja luettavuus kärsivät. Aiemmin alleviivatut kohdat oli kuitenkin tarpeen erottaa muista otsikoista, joten ne päädyttiin kursivoimaan ja sisentämään. Selkeyttä tavoiteltiin myös muokkaamalla eri ohjeet keskenään samanlaisiksi: liuosten valmistuksessa kaikissa ohjeissa tarvittavat määrät ovat nyt samalla puolen reagensseja, ja myös muu muotoilu, kuten fontit ja sisennykset, pyrittiin tekemään mahdollisimman samanlaisiksi jokaiseen ohjeeseen. Muutamien käyttöturvallisuutta koskevien sivujen fonttikokoa jouduttiin kuitenkin pienentämään yleisesti käytössä olevasta, sillä ne haluttiin ehdottomasti mahtuvan yhdelle sivulle. Myös ohjeistus työn tekniseen suorittamiseen haluttiin aina kokonaan yhdelle sivulle, jotta ohjesivu voidaan ottaa helposti mukaan vetokaappiin värjäystä tehtäessä.

Työskentelyn aikana tuotoksesta pyydettiin muutamia kertoja palautetta työelämästä ohjetta käyttävältä taholta. Saadun palautteen perusteella ohjeisiin liitettyjä kuvia pienennettiin, sillä ne veivät lähes puolet ohjeen ensimmäisestä sivusta. Näin ne veivät vähemmän tilaa ohjeessa ja saatiin sopimaan tekstin rinnalle. Kuvakoko pyrittiin kuitenkin pitämään sellaisena, että siitä näkisi riittävän hyvin tarvittavat asiat. Yksittäiset värjäykset ovat palautteen perusteella sovitettu mahtumaan yhdelle sivulle, jotta ne olisivat helposti otettavissa mukaan ja seurattavissa vetokaapissa värjäystä suoritettaessa. Palautteen perusteella lisättiin työturvallisuusosioiden otsikkoihin myös kyseisen värjäyksen nimi. Tämä siitä syystä, että kansioista irrotettaessakin tietty työturvallisuus sivu on liitettävissä oikeaan värjäykseen, eivätkä ne pääse menemään sekaisin keskenään. Positiivista palautetta saatiin ainakin hyvistä kuvista ja siitä, että periaatteet olivat selkeästi esillä kaikissa värjäyksissä.

Opinnäytetyössä valmistuva täydennetty värjäysohjekansio tulee korvaamaan aiemmin käytössä olleen kansion. Täydennetty kansio luovutetaan Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin patologian laboratorion käyttöön ja he vastaavat jatkossa sen päivittämisestä.

9 Pohdinta

Tässä luvussa käsitellään ja arvioidaan opinnäytetyön prosessia sekä raportin ja tuotoksen lopputuloksia. Tämän lisäksi pohditaan raportin ja tuotoksena valmistuneen täydennetyn värjäysohjekansion hyödynnettävyyttä, sekä annetaan suositukset sen mahdollisille myöhemmille päivityksille työelämässä.

9.1 Prosessin ja tuotteen arviointi

Prosessin alussa eniten haasteita oli tiedonkeruussa. Haastetta alkuun pääsemiseen toivat värjäykset, joiden nimet erosivat toisistaan, yhdistämällä esimerkiksi Van Gieson -värjäyksen nimeen Weigert - Van Gieson. Näiden värjäysten kohdalla piti tehdä taustatutkimusta, jotta selvisi onko kyseessä vain eri nimivariaatio vai kokonaan eri värjäys. Erityisen haastavaa oli löytää juuri oikeaa tietoa oikeasta väristä. Joidenkin erikoisvärjäysten kirjoitusasut olivat värjäysohjekansiossa erilaisia kuin useissa lähteissä. Esimerkiksi kansiossa ollut Herovic osoittautui Herovici-värjäykseksi tai kuparin osoitus löytyi lopulta Rhodaniinina. Raporttiin päädyttiin ottamaan mukaan ne kirjoitusmuodot, jotka laajemmin tuntuivat olevan lähteissä mainittuina.

Työssä on pyritty käyttämään mahdollisimman tuoretta lähdemateriaalia. Kuitenkin osa erikoisvärjäyksiä käsittelevästä materiaalista on jopa 70-luvulta. Näitä vanhempia lähteitä päädyttiin ottamaan mukaan, sillä useimmat histologian erikoisvärjäystekniikat ovat säilyneet periaatteiltaan lähes muuttumattomina tai niiden modifikaatioina kehittämistään asti (Naukkarinen 2000:153). Mukaan on pyritty ottamaan mahdollisimman paljon tietoja jotka toistuivat samanlaisina mahdollisimman monissa eri julkaisuissa, tällä tavalla pyrittiin myös arvioimaan ja varmistamaan tiedon paikkansa pitävyys. Tietoja on verrattu tarvittaessa, mikäli se on ollut mahdollista, myös LPSHP:n patologian laboratorion työhöjeksiin.

Osa värjäyksistä onnistui kerralla ja toisia värjättiin useampaankin kertaan, jotta saatiin hyvät lopputulokset. Lopullisiin kuviin olen tyytyväinen, sillä onnistuin saamaan suhteellisen realistisen väriset kuvat näytelaseista, jos ei polarisoivassa valossa kuvattua kongopunaa oteta huomioon. Jonkun mikroskoopilla kuvaukseen enemmän perehtyneen ihmisen neuvot olisivat varmasti olleet paikallaan, jotta ei olisi tarvinnut turvautua kuvankäsittelyyn. Kuvat toivoin alkuperäisessä suunnitelmassani saavani ohjekansioon isompina, jolloin niistä olisi voinut tarkastella lähemmin yksityiskohtia. Kuitenkin, jotta sain sivujen asettelun ja sivumäärän pysymään toivotussa, jouduin tinkimään kuva-koosta. Kuvat on kuitenkin saatu säilytettyä sellaisessa koossa, että niistä näkee värjäysten yleisilmeen ja ne ovat varmasti kokonaisuuden kannalta toimivampia näin pienempänä.

Ohjeet olisi varmasti kannattanut kirjoittaa kokonaan alusta asti uuteen tiedostoon, eikä muotoilla uudestaan jo olemassa ollutta pohjaa. Vanhan pohjan muotoilussa todella monet asiat piti muotoilla kokonaan uudestaan yhtenäisen ilmeen aikaan saamiseksi; sivujen muotoilut, fontit, poistaa välilyöntejä, lisää välilyöntejä ja pilkkuja yms. Kaikki tämä vei aikaa ja uudelleen kirjoittaminen alusta saakka olisi varmasti ollut helpompaa. Työtä aloittaessa kuitenkin tuntui, että asiasisältö säilyisi näin varmasti oikeana, eikä tulisi kirjoitusvirheitä johtuvia epäselvyyksiä tuleviin ohjeisiin.

Työelämän kanssa yhteistyö sujui mielestäni joustavasti. Sain tehdä opinnäytetyötäni laboratoriossa omaa tahtiani tarvitsemassani aikataulussa. Tarvittavaa opastusta ja kudosvärjäysten arviointia varten osaston työntekijät käyttivät aikaansa kiitettävästi. He myös vastasivat aina esiinnousseisiin kysymyksiini, sekä sain nopeasti palautetta kysyessäni sitä suunnitelma- ja työskentelyvaiheessa. Työtä ohjaavalta opettajalta pyydettiin myös työn etenemisen aikana palautetta joitakin kertoja, ja saadun palautteen

pohjalta tehtiin muutoksia työhön. Koen oppineeni opinnäytetyö prosessin aikana todella paljon työhön kuuluneiden erikoisvärjäysten periaatteista, taustoista, miltä niiden kuuluu näyttää ja mitä niissä voidaan nähdä. Myös tiedonhakutaidot ovat varmasti kehittyneet prosessin aikana ja alan käsitteet etenkin englanniksi ovat entistä tutumpia.

9.2 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyössä käytetyn lähdekirjallisuuden luotettavuus on pyritty varmistamaan käyttämällä mahdollisimman tuoreita julkaisuja, sekä vertailemalla eri julkaisujen sisältöjä toisiinsa. Tämän lisäksi lähdekirjallisuudessa on pyritty hyödyntämään ensisijaisesti vertaisarvioituja tieteellisiä julkaisuja tai luotettavien tuotevalmistajien julkaisemia dokumentteja, sekä muita luotettaviksi arvioituja lähteitä. Käytännön työn suhteen, kudosvärjäysten onnistuneisuus on arvioitu yhdessä patologin kanssa.

Tämä opinnäytetyö on laadittu Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TENK) laatiman Hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti (Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukausepäilyjen käsitteleminen Suomessa 2012), ja bioanalyytikon eettisiä ohjeita noudattaen (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2011). Ennen työskentelyn aloittamista työlle haettiin tutkimuslupa Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin hallintoylihoitajalta. Työssä käytettiin potilaista otettuja kudospäytteitä, työskennellessä ei käytetty mitään henkilötietoja, joiden perusteella henkilöt, joista näytteet ovat otettu, olisivat jäljitettävissä. Lasit nimettiin jo työskentelyvaiheessa vain värjäyksen nimen mukaan, joten niitä ei pystytä jäljittämään alkuperäiseen näytteeseen. Valmiissa työssä ei myöskään tule esille henkilön tunnistamista mahdollistavia tietoja. Opinnäytetyössä käytetyt näytteet ovat minun itse kuvaamiani, joten kuvien käyttöön ei ole tarvinnut pyytää lupaa.

9.3 Työn hyödynnettävyys

Tuote tullaan tulostamaan kansioon niin, että sen sivut ovat liikuteltavissa työskentelyn vaatimalla tavalla. Tuotoksesta on hyötyä ennen kaikkea patologian laboratoriossa vasta vähän aikaa työskennelleille laboratoriohoitajille, sillä värjäysten lopputulokset eivät ole välttämättä vielä tuttuja. Värjäyksiä on kuitenkin paljon, osaa tehdään harvakseltaan ja työntekijät kiertävät eri työpisteissä, joten jokin värjäys saattaa tulla yhden ihmisen kohdalle pitkänkin ajan kuluttua laboratorioon töihin tulon jälkeen. Samoin kuvista on hyötyä jo pidempään alalla olleille työntekijöille muistin virkistämiseksi, sillä edellisestä värjäyskerrasta voi olla pitkäkin aika, eikä työntekijä välttämättä täysin muis-

ta, miltä värjäyksen tulisi näyttää. Tällöin kuvia apuna käyttäen on helpompi arvioida lopputulosta. Lisäksi työharjoittelussa olevat bioanalyttikko-opiskelijat voivat hyötyä kuvista tutustuessaan erikoisvärjäyksiin.

Käyttöturvallisuustietojen lisääminen työhön helpottaa kemikaalien käsittelyssä, sillä niiden hävitysohjeet löytyvät nyt samasta paikasta värjäysohjekansioista, missä muukin ohje on, eikä tarvitse etsiä tietoa erillisestä paperista tai intranetistä. Lisäksi jokaisen värjäyksen yhteydessä näkee vaaramerkkien avulla yhdeltä sivulta, mitä työskentelyn aikana tulee ottaa kunkin kemikaalin käsittelyssä huomioon. Jatkossa ohjekansioita voisi varmasti vielä päivittää IAP:n suosituksissakin olevilla kattavammilla lääketieteellisellä taustalla ja liittää virhelähteitä kaikkiin värjäyksiin. Lisäksi kansioon voitaisiin lisätä värjäyksissä käytettävät koneet ja tarvikkeet. Samoin kansioista nyt kuvaamatta jätetyt värjäykset voisi lisätä mukaan jossakin vaiheessa.

Värjäysohjekansio kokonaisuudessaan ei varmasti ole hyödynnettävissä muissa patologian laboratorioissa, sillä jokaisessa laboratorioissa on omanlaiset värjäysprotokolat ja käytänteitä. Kuvien käytössä tulisi huomioida, että eri patologioiden mieltymyksissä saattaa olla eroja sen suhteen milloin värjäys on ns. onnistunut. Värjäyksessä käytettävät liuokset tai värjäysprotokolat voivat siis eri laboratorioiden välillä erota toisistaan. Tästä syystä värjäykset eivät välttämättä eri laboratorioiden välillä näytä täysin samalta. Kuitenkin otettujen kuvien vapauttamista laajempaan käyttöön voidaan tarvittaessa harkita, jolloin niitä voitaisiin käyttää hyödyksi muuallakin juuri ohjekansioissa tai opetusmateriaalina. Tämän lisäksi raportissa on koottuna tiiviisti teoretietoja suomeksi useista eri erikoisvärjäyksistä kuvien kera. Tätä tietoa voisivat varmasti hyödyntää myös bioanalyttikko-opiskelijat opintojensa aikana tutustuessaan histologian erikoisvärjäyksiin.

Lähteet

- Aho, Heikki 2017. Patologian laatutunnus 1995-2018. *Moodi* 39 (3). 12-14.
- Alcian Blue/PAS Kit 2011. Käyttöohje. Pennsylvania. Polysciences, Inc.
- Anderson, James 2011. An introduction to routine and special staining. Leica Biosystems Education. Verkkodokumentti. <<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-routine-and-special-staining>>. Luettu 11.9.2017.
- Ascoli, Valeria – Newman, Gary A. – Kline, Tilde S. 1986. Grimelius Stain for Cytodiagnosis of Carcinoid Tumor. *Diagnostic Cytopathology* 2 (2). 157-159.
- Bancroft, John D. – Cook, Harry C. 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Edinburgh. Churchill Livingstone.
- Bancroft, John D. – Layton, Christopher 2013. Connective and mesenchymal tissues with their stains. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britannia. Churchill Livingstone. 187-214.
- Bartlett, Jeanine, H. 2013. Microorganisms. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britannia. Churchill Livingstone. 291-315.
- Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2011. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Verkkodokumentti. <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+ohjeet+suomi+2011.pdf>>. Luettu 3.1.2018.
- Chloracetate Esterase Stain CAE/LEDER n.d. University of Calgary. Verkkodokumentti. <<https://www.ucalgary.ca/airwayinflammation/ces>>. Luettu 28.12.2017.
- Congo red 2015. Käyttöturvallisuustiedote. Münster. Waldeck GmbH & Co KG.
- Copper – Rhodanine method n.d. WebPath: Internet Pathology Laboratory. Verkkodokumentti. <<https://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/COPPER.PDF>>. Luettu 13.12.2017.
- Copper Stain, Rhodanine 2015. Työohje. Wisconsin. Newcomer Supply.
- Couture, Rick – Hafer, Laurie J. 2004. Staining Methods: Nucleus and Cytoplasm. Teoksessa Wulff, Sonja - Hafer, Laurie – Cheles, Mary – Stanforth, David A. (toim.): *Guide to special stains*. Carpinteria, California. DakoCytomation. 22-33. Saatavilla myös sähköisesti osoitteesta: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf>. Luettu 1.10.2017.
- Differential Stain, *Helicobacter pylori* sp. in Tissue Sections 2014. Työohje. Wisconsin. Newcomer Supply.
- Ehrlich, Steven D. 2015. Copper. University of Maryland Medical Center. Verkkodokumentti. <www.umm.edu/health/medical/altmed/supplement/copper>. Luettu 4.1.2018.

- Ellis, Roy n.d. Rhodanine Staining Protocol. IHC WORLD. Verkkodokumentti. <www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/rhodanine_ellis.htm>. Luettu 4.1.2018.
- Fitzgerald, A. M. – Kirkpatrick, J. J. – Foo, I. T. – Naylor, I. L. 1996. Human skin histology as demonstrated by Herovici's stain: a guide for the improvement of dermal substitutes for use with cultured keratinocytes? *Burns* 22 (3). 200-202.
- Floyd, Alton D. 2013. Quantitative data from microscopic specimen. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britannia. Churchill Livingstone. 539-560.
- Floyd, Alton D. 2010. Evolution of Use of Special Stains. Teoksessa Kumar George. L. – Kiernan John. A. (toim.). *Education Guide: Special Stains and H & E*. Kalifornia. Dako. 39-44. Saatavilla myös sähköisesti osoitteessa: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_education_guide.pdf>. Luettu 1.4.2018.
- Gilbertson, Janet A. – Hunt, Toby 2013. Amyloid. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britannia. Churchill Livingstone. 271-290.
- Gomorri's Silver Impregnation Staining Technique for Reticulin Fibers 2015. *LaboratoryInfo.com*. Verkkodokumentti. <<https://laboratoryinfo.com/gomorri-silver-impregnation-staining-technique-for-reticulin-fibers/>>. Luettu 13.12.2017.
- Grimelius, Lars 2002. Silver Stains for the Identification of Neuroendocrine Cell Types. Teoksessa Hacker, Gerhard W. – Gu, Jiang (toim.) *Gold and Silver Staining: Techniques in Molecular Morphology*. Florida. CRC Press. 1-11.
- Grimelius, Lars 2008. Methods in Neuroendocrine Histopathology, A Methodological Overview. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 113 (3). 243-260.
- Hydrokinoni 2017. Käyttöturvallisuustiedote. Karlsruhe. Carl Roth GmbH + Co KG.
- Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Verkkodokumentti. <http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Luettu 4.1.2018.
- Hopeanitraatti 2017. Käyttöturvallisuustiedote. Karlsruhe. Carl Roth GmbH + Co KG.
- Kankaanpää, Salli – Piehl, Aino 2011. *Tekstintekijän käsikirja. Opas työssä kirjoittaville*. Helsinki. Suomen Yrityskirjat Oy.
- Karttunen, Tuomo – Pääkkö, Paavo 2013. Patologia on muutakin kuin kasvaindiagnoosia. *Duodecim* 129 (10). 1089-1096.
- Katayama, Isao – Mochino, Tadaaki 1983. Naphthol AS-D chloroasetate esterase reaction: Systematic Modifications for Optimization to Smears and Sections. *Acta Pathologica Japonica* 33 (2). 381-393.
- Kiernan John A. 2010. General Oversight Stains for Histology and Histopathology. Teoksessa Kumar George. L. – Kiernan John. A. (toim.). *Education Guide: Special Stains and H & E*. Kalifornia. Dako. 29-36. Saatavilla myös sähköisesti osoitteessa: <

https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_education_guide.pdf>. Luettu 1.4.2018.

Koukila-Kähkölä, Pirkko – Richardson, Malcolm 2000. Natiivit ja sienivärjäykset. *Moodi* 24 (4-5). 134-141.

Krishna, Murli 2013. Role of special stains in diagnostic liver pathology. *Clinical Liver Disease*. 2 (S1). 8-10.

Kumar, George. L. – Gill Gary. W. 2010. Introduction to Special Stains. Teoksessa Kumar George. L. – Kiernan John. A. (toim.). *Education Guide: Special Stains and H & E*. Kalifornia. Dako. 1-28. Saatavilla myös sähköisesti osoitteessa: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_education_guide.pdf>. Luettu 1.4.2018.

Kuva 2017. ammattikorkeakoulu. Verkkodokumentti. <<https://www.kamk.fi/Verkkoppimisen-tyokalupakit/eOpettaja/Tuottaminen-ja-testaus/Sisaltojen-havainnollistaminen/Kuva>>. Luettu 18.4.2017.

Käyttöturvallisuustiedote 2016. Tukes. Verkkodokumentti. <www.tukes.fi/fi/Toimialat/Kemikaalit-biosidit-ja-kasvinsuojeluaineet/Kauttoturvallisuustiedote/>. Luettu 30.9.2017.

Lahiri, K. K. – Chatterjee, S. K. 1994. A simple cold staining method for acid fast bacilli. *Medical Journal Armed Forces India* 50 (4). 256-258.

Layton, Cristopher – Bancroft, John D. 2013. Carbohydrates. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britania.Churchill Livingstone. 215-238.

Leder, L. D. 1970. Diagnostic experiences with the naphthol AS-D chloroacetate esterase reaction. *Blut* 21 (1). 1-8.

Lillie, R. D. – Tracy, R. E. – Pizzolato, P. – Donaldson, P. T. – Reynolds, C. 1980. Differential staining of collagen types in paraffin sections: A color change in degraded forms. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology* 386 (2). 153-159.

Lipponen, Kaija - Kyngäs, Helvi - Kääriäinen, Maria 2006. Potilasohjauksen haasteet. Käytännön hoitotyöhön soveltuvat ohjausmallit. Oulun yliopistollinen sairaala. Oulun yliopisto. Hoitotieteen ja terveystieteiden laitos.

Mäkinen, Markus 2012. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpen, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): *Patologia*. Helsinki. Kustannus Oy Duodecim. 1127-1130.

Naukkarinen, Anita 2000. Histologiset värjäykset. *Moodi* 24 (4-5). 153-158.

Orchard, Guy E. 2013. Pigments and minerals. Teoksessa Suvarna, S. Kim – Layton, Christopher – Bancroft, John D. (toim.) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Iso-Britania.Churchill Livingstone. 239-270.

Patologian laboratorion toimintajärjestelmä 2016. International Academy of Pathology. Laadunvarmistustyöryhmä. Verkkodokumentti < <https://www.labquality.fi/wp->

content/uploads/2017/10/Patologian-laboratorion-toimintajärjestelmä_versio-4_2_5.pdf>. Luettu 28.11.2017.

Patologian yksikkö 2017. Länsi-Pohjan sairaanhoitopiirin kuntayhtymä. Verkkodokumentti. <<http://www.lpshp.fi/fi/yksikot/patologia.html>>. Luettu 24.9.2017.

Potters, H.V.P.J. – Loffeld, R.J.L.F. – Stobberingh, E. – Spreeuwel, J.P.van – Arends, J.W. 1987. Rapid staining of *Campylobacter pyloridis*. Histopathology 11 (11). 1223.

Pynninen, Laura 2013. Gram ja Ziehl-Neelsen-värjäykset – bakteerien jäljillä. Moodi 36 (7). 232-234.

Reticulin Silver Stain 2012. Työohje. Anatomical Pathology. Thermo Fisher Scientific.

Rotimi, O. – Cairns A. – Gray S. – Moayyedi, P. – Dixon, M. F. 2000. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. Journal of Clinical Pathology. 53 (10). 756-759.

Rice, Alexandra – Bain, Barbara J. 2012. Cytochemical, Immunocytochemical, Histochemical and Immunohistochemical Staining of Bone Marrow and Peripheral Blood. Teoksessa Kottke-Marchant, Kandice – Davis, Bruce H. (toim.): Laboratory Hematology Practice. Oxford. Wiley-Blackwell. 300-314.

Smith, Susie – Hafer, Laurie J. 2004. Staining Methods: Nervous System. Teoksessa Wulff, Sonja - Hafer, Laurie – Cheles, Mary – Stanforth, David A. (toim.): Guide to special stains. Carpinteria, California. DakoCytomation. 80-85. Saatavilla myös sähköisesti osoitteesta:
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf>. Luettu 1.10.2017.

Schnadig, Vicki J. – Woods, Gail L. 2009. Histopathology of fungal infections. Teoksessa Anaissie, Elias J. – McGinnis, Michael R. – Pfaller, Michael A. (toim.): Clinical mycology. New York. Elsevier. 79-108.

Schroderus, Anna-Mari – Tiilikainen, Reija 2013. Kliinisen histologian opetusmateriaali. Opinnäytetyö. Savonia-ammattikorkeakoulu. Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala. Bioanalytiikan koulutusohjelma.

Stanforth, David A. 2004. Staining Methods: Carbohydrates and Amyloid. Teoksessa Wulff, Sonja - Hafer, Laurie – Cheles, Mary – Stanforth, David A. (toim.): Guide to special stains. Carpinteria, California. DakoCytomation. 48-59. Saatavilla myös sähköisesti osoitteesta:
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf>. Luettu 1.10.2017.

Söderström, Mirva 2015. Preanalyttiset virhelähteet patologian diagnostiikassa. Moodi 39 (1). 19-21.

Terveyskeskuksen gastroskopianäytteiden histologinen tutkimus, 5 tai useampia näytteitä 2016. HUSLAB-liikelaitos. Verkkodokumentti.
<<https://huslab.fi/ohjekirja/863.html>>. Luettu 4.1.2018.

- Theil, Karl S. 2012. Bone Marrow Processing and Normal Morphology. Teoksessa Kottke-Marchant, Kandice – Davis, Bruce H. (toim.): Laboratory Hematology Practice. Oxford. Wiley-Blackwell. 281-299.
- Tienhaara, Anri 2000. Rautavärjäys. Moodi 24 (4-5). 159-161.
- Turner, N. J. – Pezzone, M. A. – Brown, B. N. – Badylak, S. F. 2013. Quantitative multispectral imaging of Herovici's polychrome for the assessment of collagen content and tissue remodelling. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 7 (2). 139-148.
- Van Gieson Staining 2016. Työohje. California. BioGenex.
- Vasanthakumari, R. – Jagannath, K. – Rajasakaran, S. 1986. A cold staining method for acid-fast bacilli. Bulletin of the World Health Organization 64 (5). 741-743.
- Venerucci, Francesca n.d. Histopathology Kits methods and applications. Bologna. Bio-Stain srl.
- Verhoeff 2017. Histalim. Verkkodokumentti. <www.histalim.com/accueil/activities/our-services/histology/verhoeff/>. Luettu 27.12.2017.
- Veuthey, Tania – Herrera, Georgina – Doderio, Veronica I. 2014. Dyes and stains: from molecular structure to histological application. Frontiers in Bioscience (19). 91-112.
- Värjäysmenetelmät, värgningsmetoder, staining 2006. Solunetti. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/varjaysmenetelmat/>>. Luettu 25.8.2017.
- Wartin Starry Staining Technique For Spirochetes 2015. LaboratoryInfo.com. Verkkodokumentti. <<https://laboratoryinfo.com/warthin-starry-staining-technique-for-spirochetes/>>. Luettu 22.12.2017.
- Westermarck, Per 2015. Lars Grimelius and his silver impregnation method - Commentaries on the paper in Upsala Journal of Medical Sciences with the highest number of citations. Upsala Journal of Medical Sciences 120 (2). 113-116.
- Wulff, Sonja 2004. Staining Methods: Microorganisms. Teoksessa Wulff, Sonja - Hafer, Laurie – Cheles, Mary – Stanforth, David A. (toim.): Guide to special stains. Carpinteria, California. DakoCytomation. 60-70. Saatavilla myös sähköisesti osoitteesta: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf>. Luettu 1.10.2017.
- Yleisohje (Histologiset näytteet) 2012. Coronaria Diagnostiikka Oy. Verkkodokumentti. <<https://www.coronaria.fi/wp-content/uploads/2017/03/yleisohje-histologiset-naytteet.pdf>>. Luettu 1.4.2018.
- Young, Barbara – Lowe, James S. – Stevens, Alan – Heath, John W. 2006. Weater's Functional Histology; A Text and Colour Atlas. Appendix 2: Notes on staining techniques. Philadelphia. Churchill Livingstone. 428-429.