

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

2019

Marianna Petrova

KUIVAUSTAVAN VAIKUTUS FETAALIHEMOGLOBIINI- VÄRJÄYKSEN LAATUUN

Marianna Petrova

KUIVAUSTAVAN VAIKUTUS FETAALIHEMOGLOBIINIVÄRJÄYKSEN LAATUUN

Fetaalihemoglobiinivärjäys on sytokemiallinen tutkimusmenetelmä, jota käytetään pääosin epäiltäessä fetomaternaalista eli sikiöstä äitiin tapahtuvaa verenvuotoa. Fetomaternaalivuoto on vakava raskauskomplikaatio, joka voi johtaa sikiön vammautumiseen tai jopa kuolemaan. Fetaalihemoglobiini on sikiön ja vastasyntyneen pääasiallinen hemoglobiinimuoto, kun taas aikuisella pääasiallinen hemoglobiinimuoto on hemoglobiini A.

Tämä opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona Tykslabin (Turun yliopistollisen keskussairaalan laboratorio) hematologian laboratoriolle. Opinnäytetyötä tehdessä kyseisen laboratorion menetelmätyöhjeen mukaan fetaalihemoglobiinivärjäykset tehtiin siten, että sivelyvalmisteet ilmakehään työvaiheiden välissä. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako kuivaustapa värjäyksen onnistumiseen ja voiko fetaalihemoglobiinivärjäystä nopeuttaa käyttämällä ilmapuhallinta eli fööniä valmisteiden kuivaukseen työvaiheiden välissä. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa toimeksiantajalle uutta tietoa mahdollista menetelmätyöhjeen päivitystä varten.

Tätä opinnäytetyötä varten hankittiin kymmenen näyteparia, joista kukin muodostui vastasyntyneen lapsen ja aikuisen miehen verinäytteestä. Jokaisesta näyteparista tehtiin verisivelyvalmisteet. Puolet valmisteista värjättiin Tykslabin hematologian laboratorion nykyisen fetaalihemoglobiinivärjäysohjeen mukaan, eli ilmakehään työvaiheiden välissä ja puolet valmisteista kuivattiin foonilla. Värjätty sivelyvalmisteet tarkasteltiin mikroskooppilla opinnäytetyön tekijän ja kahden opinnäytetyön ohjaajan toimesta.

Värjäysten mikroskooppisen tarkastelun jälkeen voitiin todeta, ettei ilmakehään työvaiheiden välissä ja foonilla kuivattujen sivelyvalmisteiden välillä ollut laadullisia eroja. Tämän johdosta Tykslabin hematologian laboratorio harkitsee fetaalihemoglobiinivärjäyksen menetelmätyöhjeen päivittämistä siten, että jatkossa valmisteiden kuivaamiseen käytettäisiin fööniä.

ASIASANAT:

Fetaalihemoglobiini, fetaalihemoglobiinivärjäys, fetomaternaalivuoto, hematologia

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science

2019 | 26 pages

Marianna Petrova

INFLUENCE OF DRYING METHOD IN QUALITY OF KLEIHauer-BETKE TEST

Kleihauer–Betke test is a cytochemical research method, which is mainly used in the suspicion of fetomaternal hemorrhage, in other words bleeding of fetus into maternal circulation. Fetomaternal hemorrhage is a severe pregnancy complication which can cause injuries or even death of the fetus. Fetal hemoglobin is the major hemoglobin component in fetuses and newborns while adult's major hemoglobin component is hemoglobin A.

This bachelor's thesis was commissioned by hematology laboratory of Tykslab (Turku University Hospital Laboratory). While working on this thesis, the aforementioned laboratory's Kleihauer–Betke tests were performed in a way, where blood smears were air-dried between the stages of the test. The purpose of this thesis was to investigate if drying method impacts the quality of Kleihauer–Betke test and investigating the possibility to speed up performing of Kleihauer–Betke test by drying blood smears with a blow-dryer between different stages of the test. The goal of this thesis was to produce new information for the potential updating of the Kleihauer–Betke test's work instructions.

Ten blood specimen pairs were gathered for the research of this thesis. Each specimen pair contained a blood sample from a newborn and an adult male. Blood smears were drawn from each specimen pair. Half of the blood smears were stained with Tykslab hematology laboratory's current Kleihauer–Betke test work instructions, simply put by air-drying the blood smears between the stages of the test and other half were dried with a blow-dryer. The Kleihauer–Betke stained blood smears were examined with microscope by the writer of this thesis and by two supervisors of the thesis.

After microscopy examination the writer of the thesis and the supervisors discovered that there weren't any quality differences between air-dried and blow-dried blood smears. Due to this thesis, the hematology laboratory of Tykslab will consider updating Kleihauer–Betke test work instructions, so that in the future the blow-dryer would be used to dry the blood smears.

KEYWORDS:

Fetal hemoglobin, Kleihauer–Betke test, fetomaternal hemorrhage, hematology

SISÄLTÖ

SANASTO	6
1 JOHDANTO	8
2 FETOMATERNAALIVUOTO	9
3 FETAALIHEMOGLOBIINI	10
3.1 Fetaalihemoglobiinin rakenne	10
4 FETAALIHEMOGLOBIININ TUTKIMUSMENETELMÄT	11
4.1 Fetaalihemoglobiinivärjäys	11
4.1.1 Verisivelyvalmiste	12
5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	13
6 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	14
6.1 Aineiston hankinta	14
6.2 Käytännön toteutus	14
6.2.1 Fetaalihemoglobiinivärjäysten teko	15
6.3 Näytteiden tarkastelu	17
6.4 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	17
6.5 Opinnäytetyön eettisyys	17
7 TULOKSET	19
7.1 Tulosten tarkastelu	19
7.2 Sivelyvalmisteiden tekoon ja värjäykseen käytetty aika	19
8 POHDINTA	21
8.1 Opinnäytetyöprosessi	21
8.2 Luotettavuus	22
8.3 Eettisyys	22
8.4 Ammatillinen kasvu	23
8.5 Jatkotutkimusehdotukset	23
LÄHTEET	24

KUVAT

Kuva 1. Aikuistyyppin hemoglobiini ja fetaalihemoglobiini.	10
Kuva 2. Värjäämättömät verisivelyvalmisteet.	12
Kuva 3. Valmisteiden kuivaaminen foonilla.	15
Kuva 4. Sitraattifosfaattipuskuriliuos lämpövesihauteessa.	16
Kuva 5. Vasemmalla hematoksyliini ja oikealla eosini.	16
Kuva 6. Näyte 5. Vasemmalla foonilla kuivattu ja oikealla ilmakeivattu sivelyvalmiste. Fetaalihemoglobiinisolut näkyvät kirkkaan punaisina.	20
Kuva 7. Negatiivinen kontrolli. Aikuistyyppin punasolut näkyvät haamumaisina. Värjäytyneet solut ovat leukosyyttejä.	20

TAULUKOT

Taulukko 1. Kuivausmenetelmiin käytetyn ajan vertailu.	19
--	----

SANASTO

DEIONISOITU VESI	Ioninvaihtomateriaalin läpi suodatettu vesi (Helmenstine 2019)
EDTA	Etyylidiamiinitetraetikkahappo. EDTA sitoo veressä olevan kalsiumin ja estää siten veren hyytymisen (BD Vacutainer 2019)
ELUUTIO	Kiinnittyneen partikkelin tai aineen irrottaminen nesteeseen (Tieteen termipankki 2019)
EMÄSDENATURAATIO	Denaturaatiolla tarkoitetaan proteiinin rakenteen tuhoutumista (Solunetti 2006b). Emäsdenaturaatiota hyödynnetään fetaalihemoglobiinin määrittämisessä (Stephens ym. 2012)
EOSIINI B	Fetaalihemoglobiinivärijäyksessä käytettävä väriainelu (Sigma-Aldrich 2014)
FETAALIHEMOGLOBIINI	Sikiön ja vastasyntyneen pääasiallinen hemoglobiini muoto (Hänninen & Mahlamäki 2004)
FETOMATERNAALIVUOTO	Sikiöstä istukan kautta äitiin tapahtuva massiivinen verenvuoto (Ulander ym. 2002)
HEMATOKSYLIINI	Fetaalihemoglobiinivärijäyksessä käytettävä väriainelu (Sigma-Aldrich 2014)
HEPATOOMA	Maksasolukasvain (Terveyskirjasto 2019a)
HYDROPS	Nesteen kerääntyminen kudoksiin tai onkaloihin (Hamdan 2017)
ISOELEKTRINEN FOKUSOINTI	Isoelektrisiin pisteisiin perustuva proteiinien erottelumenetelmä (Cresswell 1998)
KAPILLAARIELEKTROFOREESI	Erottamismenetelmä, joka perustuu molekyylien elektroforeettisten liikkuvuuksien eroihin (Libretexts 2019)
KLEIHAUER-BETKEN HAPPOELUUTIOTESTI	Sytokemiallinen määrittämis menetelmä, joka perustuu fetaalihemoglobiinin happokestävyys testin (Kim & Makar 2012)
KORKEAN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRFIA (HPLC)	

	Komponenttien erotusmenetelmä, joka perustuu liikkuvassa faasissa olevan analyytin pumpaamiseen stationäärifaasia sisältävän kolonin läpi (Koester 2016)
LEUKEMIA	Verisyöpä (Salonen 2019)
LUUYTIMEN HYPOPLASIA	Ilmiö, jossa rasvakudoksen määrä ylittää puolet tumallisista soluista (Solunetti 2006a)
MORFOLOGIA	Muotoon ja rakenteeseen liittyvä oppi (Terveyskirjasto 2019b)
MYELODYSPLASTISET OIREYHTYMÄT	Ryhmä veritauteja, joissa keskeisimpänä piirteenä on luuytimen tehoton verisolujen muodostus (Siitonen & Ebeling 2015)
RADIAALINEN IMMUNODIFFUUSIO (RID)	Immunodiffuusiomenetelmä, jossa antigeenin määrä osoitetaan mittaamalla agarosigeelissä olevan saostumarenkkaan halkaisija (Bindarid 2005)
RH-IMMUNISAATIO	Ilmiö, jossa RhD-negatiivisen äidin vereen muodostuu anti-D-vasta-aineita sikiön RhD-positiivisia punasoluja vastaan (Veripalvelu 2018)
SIRPPISOLUANEMIA	Periytyvä hemolyyttinen anemia, jonka kliiniseen kuvaan kuuluu sirpin muotoiset punasolut (Savolainen ym. 2015)
SITRAATTIFOSFAATTIPUSKURI	Kleihauer-Betken testissä käytetty liuos, jonka avulla HbA eluoidaan punasoluista (Loikas & Pellikka 2018)
SYTOKEMIA	Tieteenala, joka perustuu solujen kemiallisten rakennesein selektiiviseen värjäykseen (Your Dictionary 2014)
TALASSEMIAT	Ryhmä periytyviä veritauteja, joita yhdistää hemoglobiinisynteesin häiriö punasoluissa (Savolainen ym. 2015)
TYREOTOKSIKOOSI	Liiallinen kilpirauhashormonien määrä veressä (Väyrynen 2019)
VERISIVELYVALMISTE	Objektilasille ohueksi kerrokseksi sivelty veripisara (Mahlamäki 2003)
VIRTAUSSYTOTOMETRIA	Mittausmenetelmä, joka perustuu solun eri ominaisuuksien yhtäaikaiseen mittaamiseen solususpension virratessa mittauslaitteen lävitse (Bakke 2001)

1 JOHDANTO

Fetaalihemoglobiinivärjäystä käytetään epäiltäessä fetomaternaalista, eli sikiöstä äitiin tapahtuvaa verenvuotoa. Sikiön punasoluja voi joutua raskaana olevan äidin verenkiertoon esimerkiksi kaatumisen tai vatsaan kohdistuneen iskun seurauksena. (Loikas & Pellikka 2018.) Fetomaternaalivuodon tunnistaminen on erittäin tärkeää, koska se voi johtaa sikiön vakavaan vammautumiseen tai jopa kuolemaan (Ulander ym. 2002). Fetaalihemoglobiini (HbF) on sikiökaudella pääasiallinen hemoglobiinimuoto ja sen määrä vähenee ensimmäisen ikävuoden aikana aikuisen tasolle (Hänninen & Mahlamäki 2004). Fetaalihemoglobiinivärjäys on sytokemiallinen menetelmä, jossa fetaalihemoglobiinia sisältävät punasolut värjäytyvät kirkkaanpunaisiksi muiden punasolujen jäädessä haamumaisiksi. Värjätyt verisivelylvalmisteet tarkastellaan mikroskoopilla ja HbF-positiivisten solujen osuus kaikista punasoluista ilmoitetaan prosentteina. (Loikas & Pellikka 2018.)

Tämän opinnäytetyön aihe saatiin helmikuussa 2019 Tykslabin hematologian laboratoriolta. Opinnäytetyö toteutettiin ja kirjoitettiin syksyllä 2019. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako fetaalihemoglobiinivärjäyksen aikana käytetty kuivaustapa värjäyksen onnistumiseen. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa toimeksiantajalle uutta tietoa mahdollista menetelmätyöhö ohjeen päivittämistä varten.

Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksella on käynnissä oleva hanke nimeltään ”Työelämäyhteistyön ja opetuksen kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa” (TurkuCRC T163/2017) ja tämä opinnäytetyö on kyseisen hankkeen osatutkimus.

2 FETOMATERNAALIVUOTO

Fetomaternaali­vuoto tarkoittaa sikiöstä istukan kautta äitiin tapahtuvaa massiivista verenvuotoa. Se on hyvin harvinainen (1/1000 raskautta), mutta vakava raskauskomplikaatio. Sen riski lisääntyy raskauden loppua kohden. Fetomaternaali­vuodon aikainen havaitseminen tärkeää, koska siihen liittyy sikiön vakavan vammautumisen tai jopa kuoleman riski. Fetomaternaali­vuotoa pidetään massiivisena, kun vuodon määrä on puolet sikiön verivolyy­mista tai vähintään 150 ml. Lievimmillään fetomaternaali­vuoto voi aiheuttaa sikiölle anemiaa tai hydropsin. (Ulander ym. 2002.) Fetomaternaali­vuodon yleisin oire on sikiön liik­keiden loppuminen tai vähentyminen (Tarvonen ym. 2011). Fetomaternaali­vuodolle altistavia tekijöitä ovat mm. kohdun alueelle kohdistunut trauma, perätilassa olevan sikiön ulkokäännös, raskausmyrkytys, istukan kasvaimet, identtiset kaksoset ja lapsivesipunktiot (Wylie & D’Alton 2010). Vaikka fetomaternaali­vuodon yleisin yksittäinen syy on synnyttäjän trauma, sillä voidaan selittää vain 30% vuototapauksista (Tarvonen ym. 2011). Yli 30 ml:n fetomaternaali­vuodoista yli 80%:ssa tapauksista vuodon syy jää tuntemattomaksi. Massiivisen fetomaternaali­vuodon aiheuttamaa sikiön anemiaa voidaan hoitaa kohdun­sisäisellä verensiirrolla. Joissain tapauksissa päädytään ennen­aikaiseen synnytykseen sikiön pelastamiseksi. (Wylie & D’Alton 2010.)

Sikiön punasoluja päätyy raskauden aikana äidin verenkiertoon normaalisti vain pieni määrä, 96%:ssa raskauksista alle 0,5 ml. Kliinisesti merkittävien fetomaternaali­vuotojen raportointi vaihtelee sen mukaan, millaista vuodon määrää pidetään merkittävänä. Yleisenä raja-arvona pidetään 30 ml. Yli 30 ml:n suuruisia fetomaternaali­vuotoja arvioidaan esiintyvän noin 3 raskaudessa 1000 raskautta kohden. Vaikka yli 30 ml:n suuruinen vuoto on jo kliinisesti merkittävä ja voi aiheuttaa äidille Rh-immunisaation, vasta yli 150 ml:n suuruinen fetomaternaali­vuoto voidaan yhdistää kohonneeseen riskiin sikiön sairastavuuden ja kuolleisuuden kannalta. Yli 30 000:n satunnaisesti valitun raskauden julkaisussa yli 150 ml:n fetomaternaali­vuotoa esiintyi 0,2 raskaudessa 1000:ta raskautta kohden. (Wylie & D’Alton 2010.)

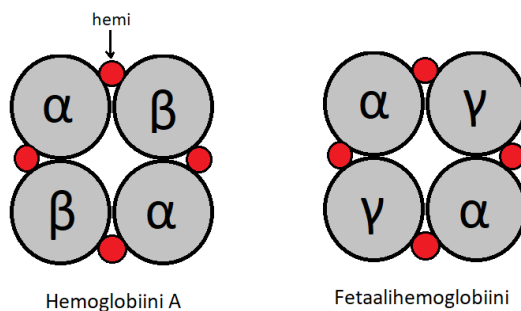
3 FETAALIHEMOGLOBIINI

Fetaalihemoglobiini eli HbF on sikiökaudella pääasiallinen hemoglobiinimuoto ja sen määrä vähenee ensimmäisen ikävuoden aikana aikuisen tasolle. Aikuisella HbF-soluja on normaalisti alle 0,1% kaikista punasoluista. (Hänninen & Mahlamäki 2004.) Fetaalihemoglobiinia sisältäviä punasoluja muodostuu sikiöaikana viikoilla 3-8 ruskuaispussissa, viikoilla 6-30 maksassa, viikoilla 9-28 pernassa ja lopulta viikosta 28 alkaen luuytimessä. Fetaalihemoglobiini sitoo happea tehokkaammin kuin aikuistyyppin hemoglobiini. Tämän ominaisuuden avulla sikiön punasolut sitovat itseensä happea äidin verenkierrosta istukan kautta. (Kaufman & Lappin 2019.)

Kohonneita veren fetaalihemoglobiinipitoisuuksia voi esiintyä aikuisiällä fetomaternaalivuodon lisäksi tiettyjen sairauksien yhteydessä. Tällaisia synnynnäisiä sairauksia ovat esimerkiksi osa talassemioista sekä sirppisoluanemia. Hankinnaisena kohonneita HbF-pitoisuuksia voi esiintyä leukemian, tyreotoksikoosin, myelodysplastisten oireyhtymien, hepatooman sekä luuytimen hypoplasian yhteydessä. (Stephens ym. 2012.)

3.1 Fetaalihemoglobiinin rakenne

Punasolu koostuu suurimmaksi osaksi hemoglobiinista (28%) ja muista proteiineista, vedestä (61%), lipideistä ja hiilihydraateista. Hemoglobiini eli Hb on konjugoitunut proteiini, joka muodostuu neljästä hemistä ja neljästä globiinipeptidistä. Hemi koostuu rauta-atomista ja protoporfyyriinistä. Hemoglobiini A eli HbA on aikuisen pääasiallinen hemoglobiinimuoto ja se muodostuu kahdesta alfa- ja kahdesta beetaglobiiniketjusta. Fetaalihemoglobiini eli HbF muodostuu kahdesta alfa- ja kahdesta gammaglobiiniketjusta (Kuva 1). (Hänninen & Mahlamäki 2004.)



Kuva 1. Aikuistyyppin hemoglobiini ja fetaalihemoglobiini.

4 FETAALIHEMOGLOBIININ TUTKIMUSMENETELMÄT

Fetaalihemoglobiinin määrittämiseen on kehitetty aikojen saatossa useita eri menetelmiä. Näitä menetelmiä ovat mm. Kleihauer-Betken happoeluutiotesti, virtaussytometria, korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC), kapillaarielektroforeesi (CZE), radiaalinen immunodiffuusio (RID), isoelektrinen fokusointi (cIEF) sekä emäsdenuuraatio. (Stephens ym. 2012.)

4.1 Fetaalihemoglobiinivärjäys

Kleihauer-Betken happoeluutiotesti eli fetaalihemoglobiinivärjäys on Kleihauerin, Braunin ja Betken vuonna 1957 kehittämä sytokemiallinen menetelmä. Menetelmä perustuu fetaalihemoglobiinin happokestävyyteen. (Kim & Makar 2012.)

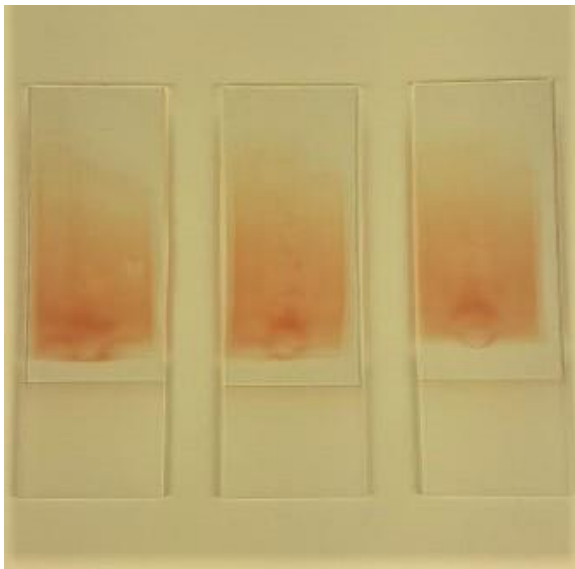
Fetaalihemoglobiinivärjäystä käytetään pääosin epäiltäessä fetomaternaalivuotoa. Tutkimukseen käytetään raskaana olevan naisen EDTA-verta. Positiivisena kontrollina käytetään miehen ja vastasyntyneen keskenään sekoitettua EDTA-verta ja negatiivisena kontrollina miehen EDTA-verta. Kontrolleihin käytettävien verinäytteiden näytteenottoajat tulisi olla mahdollisimman lähellä tutkittavan näytteen näytteenottoaikaa. Verinäytteistä tehdään verisivelyvalmisteet suosituksen mukaisesti heti näytteenoton jälkeen. Tarvittaessa tutkimukseen käytettävät verinäytteet säilyvät 24 tuntia huoneenlämmössä tai enintään kolme vuorokautta +4 °C:ssa. Sivelyn jälkeen valmisteet ilmakuivataan ja kiinnitetään 80% etanolissa 5 minuuttia. Valmisteita käsitellään happamassa sitraattifosfaattipuskuriliuoksessa +37 °C:ssa, jolloin hemoglobiini A liukenee ja jäljelle jää fetaalihemoglobiini. Puskuriliuoksen jälkeen valmisteet ilmakeivataan ja värjätään hematoksyliini- ja eosiniliuoksilla. Värjäyksen aikana fetaalihemoglobiinia sisältävät punasolut värjäytyvät kirkkaanpunaisiksi ja hemoglobiini A:ta sisältäneet solut jäävät haamumaisiksi. Värjätyt valmisteet tarkastellaan mikroskoopilla ja HbF-positiivisten punasolujen osuus kaikista punasoluista ilmoitetaan prosentteina. Prosenttiosuuden laskemiseen käytetään työohjeessa olevaa laskukaavaa $HbF = \frac{x}{10y} \times 100$ (x = HbF-solujen määrä 30 näkökentässä & y = punasolujen määrä 3 näkökentässä). (Loikas & Pellikka 2018.)

Opinnäytetyötä tehdessä fetaalihemoglobiinivärjäystä käytettiin fetomaternaalivuodon osoittamiseen Suomessa ainoastaan Tykslabissa ja Islabissa (Tykslab 2019; Islab 2018). Tykslabin hematologian laboratoriossa käytettiin työtä tehdessä Sigma-Aldrich -

fetaalihemoglobiinikittiä. Kitti sisältää sitraattifosfaattipuskurikonstraatin (laimennosuhde deionisoituun veteen 1:10), happaman hematoksyliiniliuoksen sekä eosini B -liuoksen (Sigma-Aldrich 2014).

4.1.1 Verisivelyvalmiste

Veren sivelyvalmisteen tekoon käytetään tuoretta EDTA-kokoverta tai kapillaarivertä sormenpäästä. Objektilasille laitettu veripisara sivellään ohueksi kerrokseksi vetolasin avulla. Valmisteen sopiva paksuus on solumorfologian säilymisen ja lasin tulkittavuuden kannalta tärkeää. Ilmakuivattu valmiste kiinnitetään alkoholilla ja värjätään. Mikäli valmiste arkistoidaan, se peitetään päällystysaineella ja peitinlasilla värjäyksen jälkeen. Valmis verisivelyvalmiste tarkastellaan mikroskoopilla. (Mahlamäki 2003.)



Kuva 2. Värjäämättömät verisivelyvalmisteet.

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää kuivausmenetelmän vaikutus fetaalihemoglobiinivärjäyksen onnistumiseen. Opinnäytetyötä tehdessä Tykslabin hematologian laboratorion fetaalihemoglobiinivärjäyksissä verisivelyvalmisteet ilmakeivattiin työvaiheiden välissä, minkä takia värjäysten teko vei paljon aikaa. Valmisteiden kuivaaminen ilmapuhaltimella eli föönillä nopeuttaisi värjäyksen tekoa huomattavasti.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa toimeksiantajalle eli Tykslabin hematologian laboratoriolle. Opinnäytetyön toimeksiantaja saattaa tulevaisuudessa hyödyntää tätä opinnäytetyötä harkitessaan fetaalihemoglobiinivärjäyksen menetelmätyöohjeen päivittämistä. Menetelmätyöohjeen päivityksen myötä fetaalihemoglobiinivärjäysten teossa käytettäisiin jatkossa fööniä valmisteiden kuivaamiseen. Tutkimusten nopeamman valmistumisen myötä voitaisiin välttää mahdollisen hoidon turha viivästyminen. Siten voitaisiin vaikuttaa positiivisesti potilasturvallisuuteen. Fetomaternaaliivuodon aikainen havaitseminen on tärkeää, sillä se ehkäisee sikiön vammautumista tai jopa menehtymistä (Ulander ym. 2002).

6 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

6.1 Aineiston hankinta

Tämän opinnäytetyön aineisto muodostui kymmenestä näyteparista (n=10). Näyteparit koostuivat vastasyntyneen (alle kahden kuukauden ikäisen) lapsen ja (yli 18-vuotiaan) miehen EDTA-verinäytteistä, joiden näytteenottoajat olivat mahdollisimman lähellä toisiinsa. Verinäytteitä oli siis yhteensä 20. Tähän ratkaisuun päädyttiin, koska näytesekoitukseen tarvittiin sekä fetaalihemoglobiinisoluja, että aikuistyyppin hemoglobiinia sisältäviä soluja. Fetaalihemoglobiinivärjäysten laadun arvioinnin edellytyksenä oli fetaalihemoglobiinia sisältävät verisivelylvalmisteet.

Aineistona käytettiin EDTA-putkeen otettuja verinäytteitä. Miesten näytteet oli otettu laskimosta ja vastasyntyneiden näytteet oli otettu pääosin ihopistosnäytteenä kantapäältä. Suurin osa näytteistä saatiin Tykslabin päivystys- ja automaatiolaboratorion hematologian linjastolta. Osa vastasyntyneiden näytteistä saatiin napaverinäytteenä näytteenkäsittelyn kautta. Potilaista ei otettu verinäytteitä tätä opinnäytetyötä varten, vaan aineisto koostui näytteistä, joista oli jo analysoitu potilaalle pyydetyt tutkimukset. Tästä opinnäytetyöstä ei siis aiheutunut mitään haittaa tai ylimääräisiä toimenpiteitä potilaille. Näytteistä oli poistettu potilaiden henkilötiedot ennen näytteiden luovuttamista opinnäytetyön tekijälle. Näin varmistettiin näytteiden anonymiteetti.

6.2 Käytännön toteutus

Ennen varsinaisen työn aloittamista tehtiin opinnäytetyösuunnitelma ja opinnäytetyösopimus. Verisivelylvalmisteet ja fetaalihemoglobiinivärjäykset tehtiin useana eri päivänä Tykslabin hematologian laboratoriossa. Värjätyt valmisteet tarkasteltiin mikroskoopilla ensin opinnäytetyön tekijän toimesta Turun AMK:n tiloissa ja sen jälkeen opinnäytetyön ohjaajien toimesta hematologian laboratoriossa.

Näyteparin miehen ja vastasyntyneen verestä tehtiin sekoitus. Sekoituksesta tehtiin kuusi verisivelylvalmistetta ja lisäksi miehen näytteestä tehtiin kaksi erillistä valmistetta, joita käytettiin negatiivisina kontrolleina. Näin ollen jokaisesta näyteparista tehtiin kahdeksan valmistetta. Negatiivisia kontrolleja käytettiin verrokkeina, jotta nähtäisiin ovatko

värjykset onnistuneet. Positiivisia kontroleja ei tarvittu, koska näyteseikoituksista tehdystä valmisteista löytyi valmiiksi fetaalihemoglobiinia sisältäviä soluja.

6.2.1 Fetaalihemoglobiinivärjäysten teko

Fetaalihemoglobiinivärjykset tehtiin alusta loppuun vetokaapissa. Värjäyksissä noudatettiin Loikas & Pellikka 2018 menetelmätyöohjetta. Jokaisessa kuivausvaiheessa puolet valmisteista kuivattiin föönillä (Kuva 3) ja puolet ilmakuvattiin. Föönissä käytettiin kylmäpuhallustoimintoa.

Näytteistä tehtiin verisivelylvalmisteet, jotka kiinnitettiin alkoholilla. Alkoholilla huuhdeltiin juoksevalla hanavedellä ja valmisteet kuivattiin. Valmisteet eluoiattiin lämminvesihauhteessa olevassa sitraattifosfaattipuskuriliuoksessa (Kuva 4). Eluoinnin aikana aikuistyyppin hemoglobiini liukenee pois ja jäljelle jää fetaalihemoglobiini (Loikas ja Pellikka 2018). Tämän jälkeen valmisteet huuhdeltiin deionisoidulla vedellä ja kuivattiin. Eluoidut valmisteet värjättiin hematoksyliini- ja eosiniiliuoksilla (Kuva 5). Värjäyksen aikana fetaalihemoglobiinia sisältävät punasolut värjäytyvät kirkkaan punaisiksi ja solut, joissa ei ole HbF:a jäävät haamumaisiksi (Loikas & Pellikka 2018). Valmisteet huuhdeltiin deionisoidulla vedellä värjäysliuosten välissä ja värjäyksen jälkeen. Lopuksi valmisteet kuivattiin ja päällystettiin peitinlasilla.



Kuva 3. Valmisteiden kuivaaminen föönillä.



Kuva 4. Sitraattifosfaattipuskuriliuos lämpövesihauteessa.



Kuva 5. Vasemmalla hematoksyliini ja oikealla eosini.

6.3 Näytteiden tarkastelu

Värjättyjä verisivelyvalmisteita oli yhteensä 80 eli kahdeksan yhtä näyteparia kohden. Yhden näyteparin kahdeksasta valmisteesta kaksi oli miehen verestä tehtyjä negatiivisia kontroleja ja loput kuusi miehen ja vauvan näytesekoituksesta tehtyjä valmisteita. Jokaisesta näyteparista valittiin yksi föönillä kuivattu ja yksi ilmakuvattu valmiste mikroskooppiseen tarkasteluun. Lisäksi kaikki negatiiviset kontrollit tarkistettiin.

Valmisteet tarkasteltiin mikroskoopilla 40-kertaisella suurennoksella. Jokaisesta sivelyvalmisteesta tarkasteltiin 30 näkökenttää. Saman näyteparin föönillä kuivattua ja ilma-kuivattua valmistetta vertailtiin keskenään.

6.4 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Toiminnallinen opinnäytetyö perustuu työelämän kehittämiseen ja usein toimeksiantoon. Tuotoksena voi olla esimerkiksi uusi menetelmä tai toimintatapa. Uuden kehittäminen perustuu aiempaan tietoon. (Turkuamk Messi 2016.) Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena on käytännön toiminnan opastaminen, ohjeistaminen, järjestäminen tai järjeistämisen ammatillisessa kentässä. Opinnäytetyössä tulisi osoittaa riittävällä tasolla alan tietojen ja taitojen hallintaa. Sen tulisi olla käytännönläheinen, työelämälähtöinen sekä tutkimuksellisella asenteella toteutettu. Ammattikorkeakoulututkimuksen tavoitteena on, että opiskelija toimii valmistuttuaan alansa asiantuntijatehtävissä ja tietää siihen liittyvät tutkimisen ja kehittämisen perusteet. (Vilka & Airaksinen 2003.)

Tämä opinnäytetyö on tyypiltään toiminnallinen opinnäytetyö. Opinnäytetyön tuotoksena on kahden eri metodin vertailu. Opinnäytetyön toimeksiantaja voi hyödyntää tätä opinnäytetyötä uuden menetelmätyöohjeen tarpeen arvioinnissa.

6.5 Opinnäytetyön eettisyys

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjeen mukaan hyvän tieteellisen käytännön lähtökohtiin kuuluu muun muassa rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä, avoimuus ja vastuullinen viestintä tutkimustuloksia julkaistaessa, muiden tutkijoiden työn ja saavutusten kunnioittaminen, tarvittavien tutkimuslupien hankkiminen sekä tietosuojaa koskevien kysymysten huomioon ottaminen. Hyvän tieteellisen käytännön ohje eli HTK-

ohje antaa mallin hyvästä tieteellisestä käytännöstä kaikille tutkimuksen harjoittajille ja sitä noudatetaan kaikilla tieteenaloilla Suomessa. Ohjeen tavoitteena on tieteellisen epärehellisuuden ennaltaehkäisy ja hyvän tieteellisen käytännön edistäminen tutkimusta harjoittavissa organisaatioissa. (TENK 2012.)

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjeiden mukaisesti hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Opinnäytetyössä käytettävä kirjallisuus valittiin tarkkaan luotettavista lähteistä. Työssä ei käytetty plagioitua tekstiä ja kaikki käytännön toteutuksen vaiheet tehtiin huolellisesti työhjeita noudattaen. Opinnäytetyön aineisto koostui näytteistä, joista oli jo analysoitu potilaille pyydetty tutkimukset, joten tutkimuksesta ei aiheutunut potilaille mitään haittaa. Tietosuoja otettiin huomioon antamalla tutkittaville näytteille juoksevat numerot. Opinnäytetyön ohjaajat poistivat näytteistä potilas-tiedot ennen kuin näytteet luovutettiin opinnäytetyön tekijälle. Värjäysten valmistuttua verinäyteputket hävitettiin niille tarkoitettuun jätesäiliöön ja objektilasilla olevat verisive-lyvalmisteet hävitettiin särmaisjäteastiaan. Ylijääneet reagenssit ja väriaineet hävitettiin omaan jätekanisteriinsa.

7 TULOKSET

7.1 Tulosten tarkastelu

Värjätyt verisivelylmisteet tarkasteltiin mikroskoopilla 40-kertaisella suurennoksella ensin opinnäytetyön tekijän toimesta ja sen jälkeen kahden opinnäytetyön ohjaajan toimesta. Valmisteet tarkasteltiin visuaalisesti katsomalla jokaisesta näytteestä 30 näkökenttää. Kahdella eri kuivausmetodilla värjättyjä valmisteita vertailtiin keskenään. Solujen laskeminen ei ollut tässä tapauksessa tarpeellista.

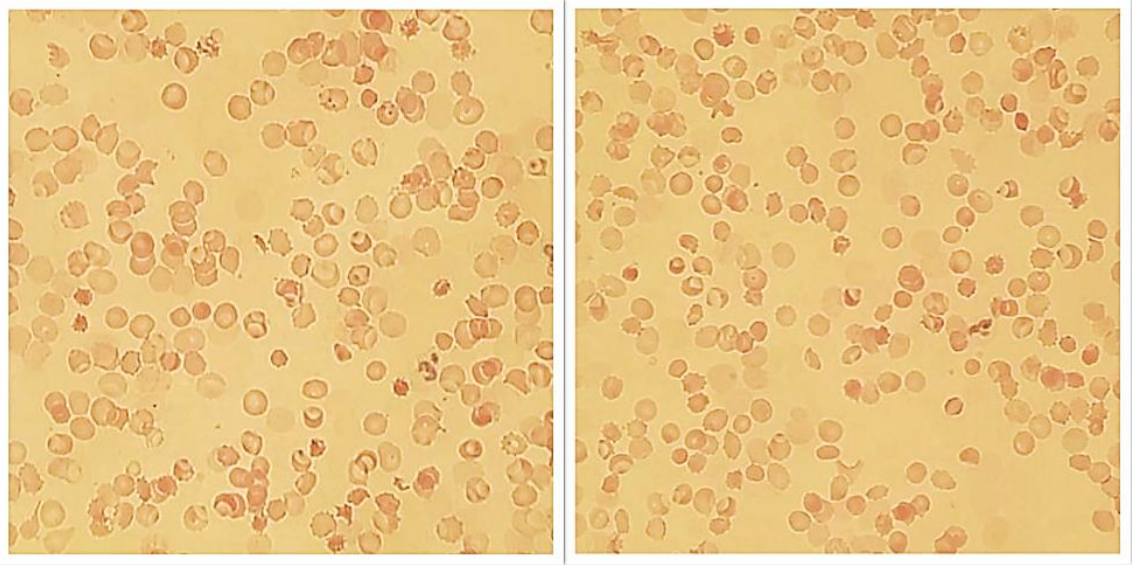
Sivelyvalmisteiden tarkastelun jälkeen voitiin todeta, ettei föönillä kuivattujen ja ilma-kuivattujen valmisteiden välillä ollut laadullisia eroja (Kuva 6). Kaikki negatiiviset kontrollit todettiin onnistuneiksi, eli niissä ei ollut värjäytyneitä punasoluja (Kuva 7). Opinnäytetyön tekijä ja ohjaajat olivat tuloksista yksimielisiä.

7.2 Sivelyvalmisteiden tekoon ja värjäykseen käytetty aika

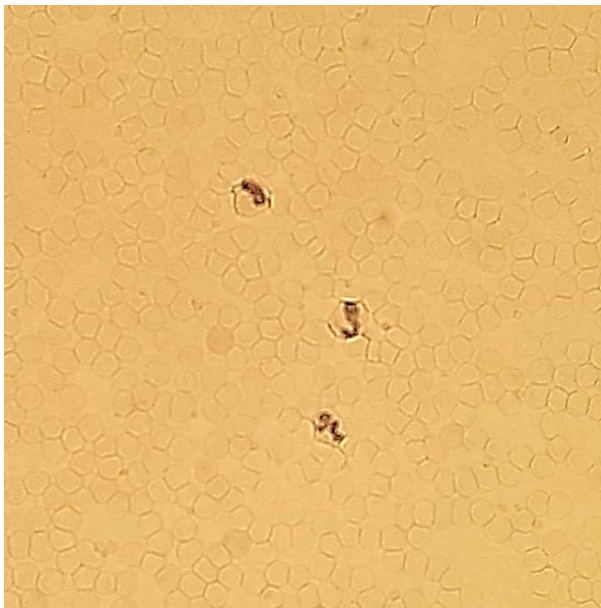
Alla olevassa taulukossa vertaillaan kahdella eri kuivausmenetelmällä tehtyjen sivelyvalmisteiden teossa käytettyä aikaa. Mittauksen aikana värjättiin yhden näyteparin sivelyvalmisteet.

Taulukko 1. Kuivausmenetelmiin käytetyn ajan vertailu.

Kuivaustapa	Fööni	Ilmakuivaus	Ero
Esivalmistelut ja sivelyvalmisteiden teko	19 min	29 min	10 min
Kiinnitys ja värjäys	43 min	80 min	37 min
Yhteensä	62 min	109 min	47 min



Kuva 6. Näyte 5. Vasemmalla fönillä kuivattu ja oikealla ilmakuivattu sivelyvalmiste. Fetaalihemoglobiinisolut näkyvät kirkkaan punaisina.



Kuva 7. Negatiivinen kontrolli. Aikuistyyppin punasolut näkyvät haamumaisina. Värjäytyneet solut ovat leukosyyttejä.

8 POHDINTA

8.1 Opinnäytetyöprosessi

Valitsin tämän aiheen opinnäytetyökseni, koska se oli mielenkiintoinen ja merkityksellinen. Koin, että tämän opinnäytetyön avulla voidaan saavuttaa hyötyä kliinisessä ympäristössä. Opinnäytetyön käytännön toteutukseen meni yllättävän paljon aikaa, koska vastasyntyneiden näytteitä saatiin linjastolta vaihteleva määrä. Lisäksi työpäivät eivät olleet peräkkäin, vaan sijoituivat aikataulullisista syistä elo-lokakuulle 2019. Opinnäytetyön suunnitelma kirjoitettiin keväällä 2019 ja varsinainen opinnäytetyö saatiin valmiiksi joulukuussa 2019.

Opinnäytetyön viitekehukseen oli melko haastavaa löytää kirjallisuuslähteitä ja tutkimuksia. Tämä johtui osittain siitä, ettei moni hyödyllinen verkkojulkaisu ollut avoimesti saatavilla. Etsiessäni kansainvälisiä julkaisuja en löytänyt yhtäkään tutkimusta, jossa keskityttäisiin verisivelyvalmisteiden kuivausmetodeihin. Huomasin kuitenkin, että joissain verisivelyvalmisteisiin liittyvissä julkaisuissa mainitaan, että valmisteet voi halutessaan kuivata tuulettimen tai föönin kylmäpuhalluksen avulla. Tästä päätellen fööniä käytetään verisivelyvalmisteiden kuivaamiseen maailmalla ainakin jonkin verran. Föönikuivausta käytetään myöskin Tykslabin hematologian laboratoriossa joidenkin värjäysten yhteydessä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää kuivaustavan vaikutus fetaalihemoglobiinivärjäyksen onnistumiseen. Opinnäytetyön käytännön toteutuksen aikana mikroskooppisen tarkastelun jälkeen voitiin todeta, ettei ilmakeivattujen ja föönillä kuivattujen valmisteiden välillä ollut laadullisia eroja. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa uutta tietoa toimeksiantajalle eli Tykslabin hematologian laboratoriolle mahdollista menetelmätyöhjeen päivittämistä varten. Lopullisen päätöksen työhjeen päivittämisestä tekee toimeksiantaja. Tämän opinnäytetyö saattaa osaltaan vaikuttaa fetaalihemoglobiinivärjäysten nopeutumiseen tulevaisuudessa.

8.2 Luotettavuus

Tämän opinnäytetyön tuloksia ei voida vähäisen näytemäärän (n=10) vuoksi pitää tilastollisesti merkittävänä. Opinnäytetyötä ei myöskään ole toteutettu tutkimuksellisesta näkökulmasta. Sivelyvalmisteet tarkasteltiin visuaalisesti, minkä takia tuloksia ei voida esittää kvantitatiivisesti. Visuaalinen tarkastelu on myöskin tulkintakysymys, joten sitä ei voida yksinään pitää kovin luotettavana mittarina värjäysten laadun arvioinnissa. Solujen laskeminen ei olisi ollut tässä tapauksessa relevanttia.

Toimeksiantajan näkökulmasta opinnäytetyö saattaa silti olla hyvinkin hyödyllinen, sillä työ tehtiin kyseisen laboratorion ohjeiden mukaisesti ja näytemäärä oli ennalta sovittu. Lisäksi valmiit sivelyvalmisteet tarkasteltiin sekä opinnäytetyön tekijän, että molempien ohjaajien toimesta. Kaikki tarkastajat olivat samaa mieltä siitä, ettei kahdella eri tavalla kuivatuissa sivelyvalmisteissa ollut laadullisia eroja.

Opinnäytetyön ohjaajat hankkivat näytteet opinnäytetyön tekijälle ja huolehtivat opinnäytetyössä käytettyjen potilasnäytteiden soveltuvuudesta tutkimukseen. Miesten verinäytteissä oli sovitusti normaali perusverenkuva. Vastasyntyneiden EDTA-näytteiden pienen määrän vuoksi potilaiden perusverenkuva ei huomioitu, vaan kaikki saadut näytteet otettiin mukaan aineistoon. Osassa värjäytyistä verisivelyvalmisteista oli solumorfologialtaan poikkeavia, vastasyntyneistä peräisin olevia HbF-punasoluja, mutta niiden esiintyminen ei ollut merkityksellistä värjäyksen laadun tarkastelun kannalta.

8.3 Eettisyys

Kliinisen laboratoriotyön eettisiin periaatteisiin kuuluu potilaan hyvinvointi ja hänen oikeuksiensa kunnioittaminen. Bioanalytikko sitoutuu noudattamaan salassapitovelvollisuutta ja käsittelee kaikkia potilasnäytteitä näytteen luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. (Bioanalytikkoliitto 2017.)

Opinnäytetyön aineistona käytettiin vain sellaisia potilasnäytteitä, jotka olisivat menneet hävitettäväksi ja joista oli jo analysoitu kaikki potilaalle pyydyt tutkimukset. Verinäytteet luovutettiin opinnäytetyön tekijälle ilman potilastietoja, joten potilastietoja ei käytetty eikä tarkasteltu missään vaiheessa. Tällä tavalla varmistettiin potilaiden tietosuojaa ja potilasnäytteiden anonymiteettiä.

Tämä opinnäytetyö on Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksen käynnissä olevan hankkeen ”Työelämäyhteistyön ja opetuksen kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa” (TurkuCRC T163/2017) osatutkimus.

8.4 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön tekeminen oli työläs, mutta opettavainen ja palkitseva kokemus. Opinnäytetyötä tehdessä olen saanut kattavan käsityksen ammattikorkeakoulun opinnäytetyöprosessista. Oman opinnäytetyön lisäksi olen päässyt seuraamaan muiden opinnäytetöiden etenemistä sekä vertaisarvioinut toisen opiskelijan työtä. Olen omaksunut uusia tapoja hankkia luotettavaa tietoa ja oppinut entistä tarkempaa lähdekritiikkiä. Erityisesti kansainvälisten julkaisujen etsiminen ja niiden lukeminen on ollut minulle ennen opinnäytetyön tekemistä vieraampaa, mutta jatkossa tulen todennäköisesti käyttämään enemmän myös englanninkielisiä lähteitä tiedonhakuun.

8.5 Jatkotutkimusehdotukset

Yhtenä jatkotutkimuksena voitaisiin tehdä kirjallisuuskatsaus, jossa etsittäisiin tietoa erilaisista fetaalihemoglobiinin tutkimusmenetelmistä ja niitä vertailtaisiin keskenään. Toisena jatkotutkimusehdotuksena voitaisiin tehdä kirjallisuuskatsaus, jossa esitellään sairauksia ja tiloja, joissa fetaalihemoglobiini on kohonneena. Samalla voitaisiin kertoa, millaisia fetaalihemoglobiinin tutkimusmenetelmiä näiden sairauksien yhteydessä käytetään. Kolmantena jatkotutkimusehdotuksena tässä opinnäytetyössä tehty tutkimus voitaisiin toistaa suuremmalla näytemäärällä ja tehdä tutkimuksellisesta näkökulmasta. Näin saataisiin luotettavampi tutkimustulos, jolla voisi olla laajempi kliininen merkitys.

LÄHTEET

Bakke, A.C. 2001. The Principles of Flow Cytometry. *Laboratory Medicine* 32(4):207-211. Viitattu 20.11.2019. <file:///C:/Users/maria/AppData/Local/Temp/ThePrinciplesofFlowCytometry.pdf>

BD Vacutainer. 2019. BD Vacutainer® EDTA tubed FAQ: What does EDTA stand for and how does the anticoagulant work? Viitattu 20.11.2019. <https://www.bd.com/en-us/offers/capabilities/specimen-collection/blood-specimen-collection/venous-collection/bd-vacutainer-blood-collection-tubes/vacutainer-blood-collection-tube-faq/edta-tubes-faq>

Bindarid. 2005. Human IgG, IgA & IgM 'NL' Bindarid Radial Immunodiffusion Kits. *Cosmobio*. Viitattu 20.11.2019. https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/BDS/_RN0103.20070813.pdf

Cresswell, S. 1998. Protein separation techniques. Teoksessa Delves, P.J. (toim.) *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier, 2034-39

Hamdan, A.H. 2017. Pediatric Hydrops Fetalis. *Medscape*. Viitattu 20.11.2019. <https://emedicine.medscape.com/article/974571-overview>

Helmenstine, A.M. 2019. The Difference Between Distilled and Deionized Water. *ThoughtCo*. Viitattu 20.11.2019. <https://www.thoughtco.com/distilled-versus-deionized-water-609435>

Hänninen, A. & Mahlamäki, E.K. 2004. Kliinisen hematologian tutkimukset. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 263-337

Islab 2018. B-Hemoglobiini, fetaali, värjäys. Viitattu 11.11.2019. <http://webohjikirja.mylabservices.fi/ISLAB/index.php?test=1563>

Kaufman, D.P. & Lappin, S.L. 2019. Physiology, Fetal Hemoglobin. *StatPearls*. Viitattu 9.11.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500011/>

Kim, Y.A. & Makar R.S. 2012. Detection of fetomaternal hemorrhage. *American Journal of Hematology* 87:417-423. Viitattu 10.11.2019. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ajh.22255>

Koester, V. 2016. What is HPLC? *Chemistry Views*. Viitattu 20.11.2019. https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC.html

Libretexts. 2019. Capillary Electrophoresis. *Libretexts Chemistry*. Viitattu 20.11.2019. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis)

Loikas, S. & Pellikka, E. 2018. Menetelmätyöohje: B-Fetaalihemoglobiini, värjäys. *Tykslab*.

Mahlamäki, E.K. 2004. Veren kuvan tutkimukset. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 268-282

Salonen, J. 2019. Leukemia (verisyöpä). *Duodecim Terveyskirjasto*. Viitattu 20.11.2019. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00040

Savolainen, E-R.; Kakko, S.; Jahnukainen, K & Juvonen, E. 2015. Periytyvät punasolupoiikkeavuudet. Teoksessa Porkka, K.; Lassila, R.; Remes, K. & Savolainen, E-R. (toim.) *Veritaudit*. Kustannus Oy Duodecim, 219–227

Sigma-Aldrich 2014. Procedure No. 285: Fetal hemoglobin. Viitattu 10.11.2019. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/285.pdf

- Siitonen, T. & Ebeling, F. 2015. Myelodysplastiset oireyhtymät. Teoksessa Porkka, K.; Lassila, R.; Remes, K. & Savolainen, E-R. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim, 284–302
- Solunetti. 2006a. Hypoplasia. Viitattu 20.11.2019. <http://www.solunetti.fi/fi/patologia/hypoplasia/>
- Solunetti 2006b. Tertiäärirakenne. Viitattu 20.11.2019. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/terti-aarirakenne/2/>
- Stephens, A.D.; Angastiniotis, M.; Baysal, E., Chan, V.; Davis, B.; Fucharoen, S.; Giordano, P.C.; Hoyer, J.D.; Mosca, A. & Wild, B. 2012. International Council for Standardization in Haematology: ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin F. *International Journal of Laboratory Hematology* 34: 14-20. Viitattu 9.11.2019. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1751-553X.2011.01367.x>
- Suomen Bioanalytikkoliitto. 2017. Bioanalytikon, laboratoriohitoajan eettiset ohjeet. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Viitattu 10.11.2019. https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf
- Tarvonen, M.; Ulander, V-M.; Süvari, L. & Teramo, K. 2011. Vuoto sikiöstä äitiin – joskus lievänkin tapaturman vakava komplikaatio. *Duodecim* 127(16):1727-31. Viitattu 11.11.2019. <https://www.duodecimlehti.fi/duo99727>
- Terveyskirjasto. 2019a. Lääketieteen sanasto: Hepatooma. *Duodecim*. Viitattu 20.11.2019. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt01120
- Terveyskirjasto. 2019b. Lääketieteen sanasto: Morfologinen. *Duodecim*. Viitattu 20.11.2019. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt02170
- Tieteen termipankki. 2019. Mikrobiologia:irrottaminen. Viitattu 20.11.2019. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:irrottaminen>
- Turkuamk Messi. 2016. Opinnäytetyön lajit. Viitattu 1.6.2019. [https://messi.turkuamk.fi/Etusivu > Opiskelu > Opinnäytetyö > Opinnäytetyön lajit](https://messi.turkuamk.fi/Etusivu%20Opiskelu%20Opinnäytetyö%20Opinnäytetyön%20lajit)
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsittely Suomessa. Viitattu 8.4.2019. https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf
- Tykslab 2019. B-Hemoglobiini, fetaali, värjäys. Viitattu 11.11.2019. <http://webohjekerja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=1563>
- Ulander, V-M.; Ämmälä, P.; Sjöberg, J. & Lehtovirta, P. 2002. Massiivinen fetomaternalivuoto — salakavala ja vakava raskauskomplikaatio. *Duodecim* 118:621-624. Viitattu 1.6.2019. <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo92850.pdf>
- Veripalvelu. 2018. Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa. Suomen Punainen Risti. Viitattu 20.11.2019. <https://www.veripalvelu.fi/terveydenhuollon-ammattilaiset/neuvoloille/seulontaohjelma#RHd%20immunisaatio>
- Vilkka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy
- Väyrynen, T. 2019. Luentotiivistelmä: Perustietoa kilpirauhasesta. Suomen Kilpirauhasliitto Ry. Viitattu 20.11.2019. <https://kilpirauhasliitto.fi/luentotiivistelma-perustietoa-kilpirauhasesta/>
- Wylie, B.J. & D'Alton, M.E. 2010. Fetomaternal Hemorrhage. *Obstetrics & Gynecology* 115(5):1039-1051 Viitattu 5.11.2019. https://www.researchgate.net/profile/Magne_Fagerhol/publication/16547238_Fetomaternal_hemorrhage/links/0a85e53c22f2fac82e000000/Fetomaternal-hemorrhage.pdf

Your Dictionary. 2014. Cytochemistry. Viitattu 20.11.2019. <https://www.yourdictionary.com/cytochemistry>