



SAVONIA

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

HE-VÄRJÄYKSEN OPTIMOINTI

TEKIJÄ/T:

Minna Kauria
Jaana Suhonen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Tutkinto-ohjelma Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma	
Työn tekijä(t) Minna Kauria ja Jaana Suhonen	
Työn nimi HE-värjäyksen optimointi	
Päiväys 19.10.2020	Sivumäärä/Liitteet 37/3
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) HUS Diagnostiikkakeskus, Patologia, Etelä-Karjala	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Patologia eli tautioppi jakautuu kahteen erikoisalaan, histologiaan ja sytologiaan. Hematoksyliini-eosiinivärjäys (HE-värjäys) on yleisin patologian laboratoriossa käytetty histologinen perusvärjäys. HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa HE-värjäyksen laadun on havaittu vaihtelevan viikon aikana. Laadun vaihtelu vaikeuttaa patologin työtä. Laboratorion värjäyslinjastossa ei ole käytössä hematoksyliinin diffausta eli ylimääräisen värin poistoa, mikä on yksi mahdollinen syy värjäyksen laadun vaihtelulle. Tässä työssä tutkittiin muun muassa diffauksen vaikutusta lopulliseen värjäystulokseen. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa HE-värjäyksen laatua.</p> <p>Tutkimuksessa yhdistettiin kokeellista sekä kvantitatiivista tutkimusmenetelmää. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä pieniä muutoksia HE-värjäysohjelmiin ja vertailla niitä laboratoriossa käytössä olevaan HE-värjäysohjelmaan eli rutiiniin. Tutkimuksessa käytettiin neljää eri kudosta, jotka värjättiin kahdeksalla muokatulla HE-värjäysohjelmalla. Arvioitavat kudokset olivat iho, suoli, tonsilla eli nielurisa ja kohtu. Nämä ovat yleisimpiä histologialla tutkittavia kudoksia. Värjäystulosten arviointiin laadittiin strukturoitu arviointilomake, jossa oli valmiit vastausvaihtoehdot sekä sanallisesti että numeerisesti. Tuloksien arvioinnin suoritti kolme patologia, jotka ovat tämän erikoisalan asiantuntijoita.</p> <p>Tulosten analysoinnissa käytettiin kvantitatiivista menetelmää, jossa värjäysohjelmien paremmuusjärjestys määritettiin keskiarvojen perusteella. Tulosten perusteella hematoksyliinin diffauksella ei saatu värjäyksen laatua parannettua. Parhaaksi värjäysohjelmaksi valikoitui muokattu värjäysohjelma 1, jossa hematoksyliinin vastaväri, eosini diffattiin 96 prosenttisella etanolilla. Johtopäätöksenä tutkimuksesta todettiin, että HE-värjäyksen laatu parani ja opinnäytetyön tavoite täyttyi. Uusi HE-värjäysohjelma otettiin käyttöön HUS Diagnostiikkakeskuksen, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa ja se tulee helpottamaan patologin diagnostista työtä. Jatkotutkimusaiheena voisi selvittää uuden värjäysohjelman toimivuutta useammilla eri kudoksilla.</p>	
Avainsanat hematoksyliini, eosini, histologinen värjäys, HE-värjäys, optimointi, histologia	

Field of Study Social Services, Health and Sports	
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science	
Author(s) Minna Kauria ja Jaana Suhonen	
Title of Thesis H&E staining optimization	
Date October 19, 2020	Pages/Appendices 37/3
Client Organisation /Partners HUS Diagnostic Center, Pathology, South Karelia	
<p>Abstract</p> <p>Pathology, the study of disease, is divided into two distinct specialties: histology and cytology. Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) is the most commonly used histological basic stain used in pathology laboratories. The quality of the H&E stain has been observed to vary in the pathology laboratory of HUS Diagnostical Centre in South Karelia during the week. This complicates the pathologist's work significantly. The differentiation of hematoxylin, also known as the elimination of excessive color, is not available among the staining protocols of the laboratory, which is a possible cause for the varying quality. This research was, inter alia, concerned with the impact of differentiation on the result of the stain. The aim of this thesis was to improve the quality of the H&E stain.</p> <p>The research combined empirical and quantitative research methods. The purpose of the thesis was to implement small changes into the H&E staining protocols and compare them to the routine H&E stain used in the laboratory. Four different tissues which were stained with eight modified H&E stains were utilized in the research. The tissues applied were skin, intestine, tonsil, and uterus. These are the most common histologically examined tissues. A structured form was composed for the assessment of the stain results, which included predetermined, both verbal and numeral, answer choices. The results were evaluated by three pathologists, who are experts on this field.</p> <p>The results were analyzed with a quantitative research method, according to which staining protocols were ranked based on averages. The results indicate that the differentiation of hematoxylin did not improve the quality of the stain. The modified staining protocol 1, in which the complementary color of hematoxylin, eosin, was differentiated with 96% ethanol, was selected as the top staining protocol. In conclusion, the study indicates that the quality of the H&E stain improved, and the aim of the thesis was achieved. The new H&E stain protocol was implemented to the HUS Diagnostical Centre, South Karelia pathology laboratory and it is expected to support the diagnostic work of pathologists. Future research could examine the functionality of the new staining protocol on multiple different tissues.</p>	
<p>Keywords hematoxylin, eosin, histological staining, H&E stain, optimization, histology</p>	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	HISTOLOGINEN NÄYTEPROSESSI	8
2.1	Kudosprosessointi	8
2.2	Kudosnäytteen edustavuus.....	9
3	HE-VÄRJÄYS	11
3.1	Värjäykseen vaikuttavat tekijät	11
3.2	Hematoksyliini	11
3.3	Eosiini	12
3.4	Optimointi	13
3.5	Aikaisempia tutkimuksia HE-optimoinnista.....	13
4	LAATU PATOLOGIAN LABORATORIOSSA	14
4.1	Sisäinen laadunvarmistus laboratoriossa	14
4.2	Ulkoinen laadunarviointi laboratoriossa	15
4.3	Kudosvärjäyksen laatu	15
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE	16
6	TUTKIMUSMENETELMÄT	17
7	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS JA TULOKSET	18
7.1	Opinnäytetyöprosessin käytännön työn aikataulut.....	18
7.2	Työn toteutus	18
7.3	Värjäysohjelmat	19
7.4	Arviointilomake ja tulosten arviointi	19
7.5	Työn tulokset.....	20
8	TUTKIMUSETIIKKA.....	28
8.1	Tutkimuksen eettisyys	28
8.2	Tulosten luotettavuus	28
9	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	30
	LÄHTEET	32
	LIITE 1: VÄRJÄYSOHJELMAT SALATTU.....	35
	LIITE 2: ARVIOINTILOMAKE.....	36
	LIITE 3. TUTKIMUSLUPA.....	37

1 JOHDANTO

Patologia eli tautioppi juontuu kreikan sanoista *pathos* (kärsimys) ja *logos* (oppi). Patologia pyrkii selvittämään solujen, kudosten ja elinten rakenteellisia ja toiminnallisia muutoksia eri sairauksissa ja tautitiloissa. (Mäkinen, Carpén, Kosma, Lehto, Paavonen & Stenbäck 2012, 10.) Patologia jakautuu kahteen erikoisalaan, histologiaan ja sytologiaan. Histologiassa tutkitaan erilaisia kudoksenäytteistä, esimerkiksi leikkauksen yhteydessä poistettuja kasvaimia tai tähystyksessä otettuja koepaloja. Sytologia vastaavasti käsittää kehon nesteiden tutkimisen, esimerkiksi virtsan, selkäydinnesteen tai ysköksen. Ennen kuin patologi voi tehdä lausunnon, on kudoksenäytteet käsiteltävä erilaisten kudoksenkäsittely- ja värjäysprosessien avulla. (Suomen Bioanalyttikoliitto ry, 2019.) Hematoksyliini-eosiinivärjäys (HE-värjäys) on yleisin laboratoriossa käytetty histologinen perusvärjäys (Mäkinen ym. 2012, 1129).

Kliininen patologia on mielenkiintoinen, haasteellinen ja tekijöitä kiinnostava laboratorion erikoisala. Opinnäytetyön aihe valikoitui koulun aihekuvauslistalta. Työn toimeksiantaja on Etelä-Karjalan sosiaali- ja terveyspiirin (Eksote) patologian laboratorio, joka fuusiossa muuttui vuoden 2020 alusta HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratorioksi. Patologian laboratoriossa on huomattu, että HE-värjäyksen laatu vaihtelee viikon aikana. Käytetyn eosinin pH:n vaihtelun on arvioitu olevan yksi värjäyksen laatuun vaikuttava tekijä, mutta sen säätäminen työviikon aikana ei ole työmäärään nähden järkevä vaihtoehto. Laboratoriossa ei ole käytössä värjäyslinjastossa tumavärin eli hematoksyliinin diffausta (ylimääräisen värin poisto), ja värjäyksen taustalle jää hieman sinisyyttä, joka mahdollisesti vaikuttaa myös eosinin värisävyyteen. Tumia värjäävän hematoksyliinin värisävy pysyy tasaisena koko viikon, mutta eosinilla värjäytyvien kudosten värisävy on erilainen alku- ja loppuviikosta. Patologian laboratorion työntekijät eivät ole tyytyväisiä käytössä olevaan HE-värjäykseen, ja heillä on tarve saada parempi perusvärjäys.

Opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä pieniä muutoksia HE-värjäysohjelmiin ja vertailla niitä laboratorion käytössä olevaan HE-rutiinivärjäykseen. Vertailut värjäysohjelmat on esitetty LIITTEESSÄ 1, joka on salattu. Tavoitteena on parantaa HE-värjäyksen laatua. HE-värjäyksen optimointi mahdollistaneee värjäystulosten tasalaatuisuuden ja laadukkuuden, joka tulee helpottamaan patologin diagnostiikan tekemistä. Kokeessa yhdistettiin määrällistä sekä kokeellista tutkimusmenetelmää. Laadimme numeerisen arviointilomakkeen värjäysohjelmien arviointia varten. Värjäysohjelmia arvioivat kolme patologia, joista kaksi työskentelee HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa ja yksi Helsingissä. Ohjaavana opettajana opinnäytetyöllemme toimii Savonian ammattikorkeakoulusta Susanna Vuohelainen ja toimeksiantajan puolelta ohjaajana toimii laboratoriohoitaja Hanna Turunen.

2 HISTOLOGINEN NÄYTEPROSESSI

Kudos- ja solunäytteiden patologisen diagnostiikan peruseriaatteet ovat yli sata vuotta sitten kehitettyjä menetelmiä tutkittaessa monien sairauksien, kuten syövän, diagnostiikkaa. Huolimatta uusien geneettisten ja molekyylibiologisten tutkimusmenetelmien nopeasta kehitymisestä vanhat patologisen diagnostiikan peruseriaatteet ovat pysyneet samoina. (Mäkinen ym. 2012, 5.) Histologia eli kudosoppi on kudosnäytteiden, esimerkiksi leikkauksen yhteydessä poistetun kasvaimen käsittelyä sekä värjäystä mikroskopointia ja diagnostiikan tekoa mahdollistavaan muotoon (Suomen bioanalyttikoliitto ry, 2019). Histologisten värjäysmenetelmien avulla kudoksista voidaan erotella eri väreillä eri osia ja kerroksia. Tämä mahdollistaa mikroskooppisen tarkastelun ja monien sairauksien tunnistamisen. Värjäyksissä käytetään valikoivia eli selektiivisiä väriaineita. Ne sitoutuvat kudosten solukoihin kemiallisten ominaisuuksien mukaan. (Solunetti 2006.)

HE-värjäys on Suomessakin yleisemmin käytetty patologian laboratorion perusvärjäys. Perusvärjäyksellä saadaan kudoksesta eri rakenteita näkyviin, ja se mahdollistaa kudoksen morfologisen tarkastelun. (Solunetti 2006.) Mikäli HE-värjäys ei anna patologille tai tutkijalle tarpeeksi tarvittavaa tietoa tai halutaan varmistaa HE-värjäyksellä esiin tulleita löydöksiä, käytetään erikoisvärjäyksiä. Muita erikoisvärjäysmenetelmiä ovat muun muassa PAS-, hopea-, Giemsa- ja Weigert van Gieson värjäys. Erilaisilla väreillä voidaan erotella kudoksista näkyviin eri osia. (Mäkinen ym. 2012, 1129.)

2.1 Kudosprosessointi

Näytteen saapuessa laboratorioon kestää vähintään kolmesta viiteen vuorokautta, ennen kuin näyte on käynyt kaikki kudosprosessoinnin vaiheet läpi ja on valmiina patologin arvioitavaksi. Kudosprosessoinnilla tarkoitetaan kaikkia niitä työvaiheita, joita näyte käy läpi, ennen kuin se on värjättyinä leikkeenä objektilasilla. Työvaiheet ovat seuraavat:

- Näytteen kirjaus laboratorion tietokantaan
- Fiksaatio
- Näytteen dissekointi
- Kuduskuljetus
- Parafiiniin valu
- Blokkien leikkaaminen
- Leikkeiden värjäys, päällystys ja tarkistus

Kirjaamisvaiheessa tarkastetaan lähetteen tiedot ja näytteille annetaan yksilöivät tunnistetiedot. Jotta kudoksesta saadaan mikroskopoitavaksi sopiva ja edustava näyte, se täytyy ensin prosessoida. Näyteprosessi alkaa fiksaatiolla. Suomessa yleisimmin käytössä oleva fiksaatiivi on 10 % formaldehydi eli formaliini. Formaliini estää kudoksen autolyysin eli hajoamisen lopettamalla entsyymien ja bakteerien toiminnan (Hopwood 1996, 23). Formaliini kovettaa kudosta muodostamalla ristikudoksia kudoksen proteiinien välille ja helpottaa kudoksen jatkokäsittelyä. Formaliinin ansiosta kudos ei muuta

muotoaan eikä tilavuutta. Hyvä fiksaatio mahdollistaa kudoksen dissekoinnin eli leikkaamisen ja onnistuneen värjäyksen. Formaliinia täytyy olla kymmenkertainen määrä fiksoitavan kudoksen tilavuuteen nähden, ja fiksointiin käytettävän astian on oltava riittävän suuri. Fiksaatio on tärkein vaihe kudosisprosessoinnissa hyvän lopputuloksen saamiseksi. (Mediq Suomi Oy 2020.)

Erikokoiset näytemateriaalit vaativat erilaisen kudosisprosessoinnin. Fiksoitu kudoksenäyte dissekoidaan eli leikataan sopivan kokoisiksi näytepaloiksi kudosiskuljetusautomaattiin laitettaviin kasetteihin. Suuret operatiiviset näytteet, kuten suoli ja rinta, valokuvataan, piirretään tai kuvataan tekstiin niin tarkkaan, että näytteeseen orientoituminen onnistuu vaivatta myöhemminkin. Näytteenottokehtien huolellinen selostaminen ja merkitseminen ovat keskeisiä asioita, koska ne ovat ainoa esikäsittelyvaiheesta jäävä dokumentti. Kudosisprosessoinnin yhteydessä niistä leikataan useammista edustavista paikoista kudospaloja tutkimukseen. Pienten näytteiden, kuten biopsioiden tai eturauhasen höyläysnäytteiden ollessa kyseessä, näytemateriaali suodatetaan tai ladotaan kokonaisina ilman fiksaatiota kudosiskuljetukseen meneviin näytekasetteihin. (Mäkinen ym. 2012, 1126–1130.)

Kudosiskuljetuksessa kudoksenäytteestä poistetaan vesi eli dehydroidaan, poistetaan rasva, kirkastetaan ja imeytetään parafiini kudokseen eli suoritetaan parafiini-infiltraatio. Kudosiskuljetus kovettaa kudosisrakenteet ja mahdollistaa näytteiden säilymisen. Kudosiskuljetusprosessin jälkeen näytteet valetaan muottien avulla parafiiniin näyteblokeiksi. Näyteblokeissa on parafiiniin valetun näytteen lisäksi tunnistenumeron sisältämä näytekasetti. Näytteet täytyy asetella kasetteihin oikein leikkausterää nähden. Esimerkiksi ihonäytteet asetetaan pinnan suhteen kohtisuorasti. Jäähdyessään parafiini kovettuu kudoksen sisään ja ympärille mahdollistaen ohuiden leikkeiden leikkaamisen näytteistä. Valetut blokit leikataan mikrotomeilla ohuiksi leikkeeksi näytelaseille odottamaan värjäystä. (Mäkinen ym. 2012, 1126–1128.)

Mikrotomeja on erilaisia, ja ne ovat suunniteltu eri käyttötarkoituksiin. Olennainen ero niissä on toimintamekanismi. Isot näyteblokit ja kovat näytteet leikataan yleensä mikrotomilla, jossa näyte pysyy paikallaan ja veitsi liikkuu edestakaisin vaakatasossa blokkiin nähden. Vesiliukumikrotomissa blokit lukitaan mikrotomin kiinnitysalustaan, jota liikutetaan leikkausterää vasten käsin tai automaattisesti. Leikkausterät valmistetaan ruostumattomasta teräksestä, lasista tai timantista. Leikkeiden leikkaamisessa käytetään eri leikepaksuuksia näytteen rakenteen takia. Yleisesti käytetty leikkeen paksuus on 3–5 µm. Virheitä mikrotomilla leikkausvaiheessa aiheuttavat muun muassa likainen, tylsä tai viallinen terä, liian lämmin näyteblokki tai väärä terän leikkauskulma. (Spencer & Bancroft 2008, 93–97.)

2.2 Kudoksenäytteen edustavuus

Kudoksenäytteen edustavuudella on suuri merkitys diagnoosiin. Edustava näyte on otettu oikeasta kohtaa, säilytetty ja lähetetty oikein. Osa patologisanatomisten näytteiden tutkimuksista vaativat ilman fiksaatiota olevan tuoreen kudoksen. Esimerkkinä voidaan mainita tutkimukset, joissa värjäykset eivät toimi fiksoidussa kudoksessa, sekä osa vasta-ainetutkimuksista. Edustavalla näytteellä tarkoitetaan näytettä, jossa on näkyvillä kaikki halutut solukerrokset sekä solutyypit. Liian pieni ja pinnallinen koepala on epäedustava. Maligneja eli pahanlaatuisia muutoksia tutkittaessa kudoksenäytteessä täytyy olla myös maligneja soluja, ja näyte on täytynyt osata ottaa juuri optimaalisesta kohdasta kudoksesta. (Mäkinen ym. 2012, 1125–1133.)

Edustavan ihonäytteen tulee yltää ihonalaiseen rasvakudokseen asti, ja kaikkien ihon kerrosten sekä solukoiden tulee näkyä. Paras näyte on veneiiltonäyte. Operatiivisissa näytteissä, kuten suoli ja kohtu, on näytteiden nopea esikäsittely ensiarvoisen tärkeää. Autolyysi eli kudoksen hajoaminen johtaa huonoon fiksaatioon ja kudostartefaktojen syntyyn. (Mäkinen 2012, 1130–1133.)

Kudoksen rakenne ja kovuus vaikuttavat sen käsittelyyn ja värjäytymiseen. Tonsilla eli nielurisa on imukudosta ja rakenteeltaan löyhää kudosta. Imukudos värjäytyy tummasävyiseksi itukeskusta ympäröivien runsaiden pienten lymfosyyttien vuoksi. (Solunetti 2006.)

3 HE-VÄRJÄYS

Hematoksyliini-eosiini (HE) -värjäys on yleisin histologinen ja morfologinen värjäys, jolla värjätään ensin lähes kaikki patologian laboratorioon tulevat histologiset kudokset (Mills 2017). HE-väri koostuu kahdesta väriaineesta, hematoksyliinistä ja eosiinista. HE-väriliuos on hyvin säilyvää ja tummat selkeästi värjäävää. Tumien selkeä värjäytyminen on avuksi tumien atypia-astetta eli tumien poikkeavuutta arvioitaessa. (Mäkinen 2012, 1129.) HE-värjäyksen tulokset tulkitaan HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratorion työohjeen mukaan seuraavalla tavalla (Työohje HE-värjäys, 4, HUS Diagnostiikkakeskus, Patologia, Etelä-Karjala, 2020):

Tumat	→	sinivioletit
Sytoplasma	→	vaaleanpunaisen eri sävyt
Erytrosyytit	→	punaiset
Limat	→	vaalean siniset
Kollageenisäikeet	→	kalpean vaaleanpunaiset
Fibriini	→	syvän vaaleanpunaiset
Kalkki	→	violetti
Lihäs	→	syvän vaaleanpunaiset
Eosinofiilit	→	punaiset

3.1 Värjäykseen vaikuttavat tekijät

Onnistuneeseen värjäykseen vaikuttavia tekijöitä ovat mahdollisimman nopea ja riittävä fiksaatio, onnistunut kuduskuljetus, sopiva leikepaksuus sekä rypyttömät ja ehjät leikkeet. Väriaine on kaksoissidoksia sisältävä yhdiste, joka absorboi valoa. Absorbointi tarkoittaa valon imeytymistä. Erilaiset väriaineet absorboivat valoa eri tavalla, ja näin ollen väri muuttuu. Värjäysreaktioon vaikuttavat myös väriaineen affiniteetti eli sitoutumisvoimakkuus kudokseen, ionisidokset, pH, värjäys- ja pesu-aika, lämpötila sekä käytetty liuotin. (Horobin 2008, 105–106.)

3.2 Hematoksyliini

Hematoksyliini värjää kudosten happamat rakenteet, kuten tumien nukleiinihapot, sinimustan sävyiksi ja osittain myös sytoplasmassa esiintyvää RNA:ta. Hematoksyliiniä saadaan meksikolaisesta *Hematoxylon camperchianum*- puusta uuttamalla, ja sitä viljellään nykyisin pääasiassa Länsi-Intiassa. Hematoksyliiniä voidaan valmistaa myös itse, mutta nykyisin laboratorioissa käytetään pääosin käyttövalmiina olevia kaupallisia hematoksyliinejä. Kaupallisia hematoksyliinejä ovat muun muassa Harris,

Mayers, Gill. (Brown 2012, 31.) Hematoksyliini ei itsessään ole väriaine, vaan sen värjäävänä aineena toimii sen sisältämä hemateiini. Hemateiinia saadaan hematoksyliinistä hapettamalla ilmaa ja valoa hyväksi käyttäen tai kemiallisesti. Hemateiini on riittämätön värjäämään kudosta huonon sitoutumisvoimakkuuden eli affiniteetin vuoksi ilman emäksistä peitta-ainetta. (Wilson & Gamble 2002, 125–127.)

Väriaineet ovat värihappojen ja emästen suoloja. Peitta-aineet eli mordantit toimivat metallisuolakomplekseina kiinnittäen väriaineet kudokseen. (Nation ja Orchard 2012.) Mordantin lisäys tekee hematoksyliinistä positiivisesti varautuneen eli kationisen väriaineen, joka värjää anionisia eli negatiivisesti varautuneita biopolymeereja kuten DNA:ta, RNA:ta ja glykosaminoglykaaneja (Horobin & Bancroft 1998, 88–89). Positiivisesti varautuneet väriaineet sitoutuvat happamiin eli basofiilisiin kudoksiin. Mayerin hematoxyliinissä mordanttina käytetään alumiinisuoloja ja hapettimena natriumjodaattia. (Bancroft & Layton 2013, 175–176.)

HE-värjäys voidaan suorittaa käyttäen progressiivista tai regressiivistä värjäystä. Progressiivisessa värjäyksessä näytettä pidetään väriliuoksessa niin kauan, kunnes haluttu värjäytyvyys saavutetaan. Regressiivisessä värjäyksessä näyte ensin ylivärjätään, jonka jälkeen näytteen ylimääräinen väri huuhdotaan pois eli diffataan, kunnes haluttu värjäytyminen saavutetaan. Regressiivinen värjäys on yleisemmin käytetty sen helppouden vuoksi. Diffaamisessa käytetään yleensä happoa poistamaan ylimääräinen emäksinen väriaine ja emäksistä ainetta poistamaan ylimääräinen hapan väriaine. Diffaaminen poistaa myös näytelasin taustaan jäänyttä väriä ja lisää värin terävyyttä. (Brown 2012, 38.) Hematoksyliinistä voidaan poistaa ylimääräinen väri esimerkiksi suolahappo–alkoholiseoksella (Solunetti, 2006).

Diffaamisella on suuri merkitys HE-värjäyksessä. Diffaukset muodostavat 90 % kaikista HE-värjäysliuoksista, kun otetaan huomioon myös ei värjäävät liuokset esimerkiksi, ksyleeni- ja alkoholihuuhteet. Diffaamisella on ylimääräisen värin poiston lisäksi muitakin merkityksiä. Esimerkiksi hematoksyliini värjää tumat ensin punaiseksi, jotka diffaamalla hieman emäksisellä aineella muuttuvat siniseksi eli sinistyvät. Vesijohtovesi on yleensä tarpeeksi emäksistä. Diffaus myös pysäyttää värjäyslinjastossa edellisen liuoksen toiminnan sekä edistää väriaineen tasaista jakautumista kudoksissa. (Gill 2010, 177–179.)

3.3 Eosiini

Eosiini on hapan ksanteeni väriaine, joka värjää kudoksen emäksiset rakenteet ja sytoplasman sekä lihas- ja sidekudoksen (Brown 2012, 45). Se tarttuu solun sisäisiin ja ulkoihin proteiineihin värjäten ne vaalean- ja tummanpunaisen eri sävyiksi (Reagena Oy 2011). Eosiinilla saadaan näkymään kudoksen löysiä ja tiiviitä rakenteita, ja se värjää hyvin punasolut ja eosinofilit. Eosiini on negatiivisesti varautunut ja sitoutuu kudoksen positiivisiin varauksiin, eritoten proteiineihin. Se värjää myös kollageenisäikeet ja sytoplasman tukirangan punaisen eri sävyillä. (Panula 2013, 17.) Eosiineja on erilaisia. Eosiini Y on sekä veteen- että alkoholiin liukeneva ja yleisin käytetty hematoksyliinin vastaväri. Eosiiniliuos on yleensä tislattuun veteen sekoitettua ja 0,5–1,0 % vahvuista. Pieni osuus etikkahappoa (0,5 ml/1000 ml) liuoksessa terävöittää värisävyjä. (Wilson & Gamble 2002, 130; Bancroft 2013, 173.) Liuoksen pH:ta säädetään happamalla puskuriliuoksella, kuten etikka- tai suolahapolla. Eosiinin

pH:lla on suuri merkitys värjäytymisen voimakkuuteen. Eosiinin pH:n ollessa yli 5 värjäytymisen voimakkuus heikkenee tehden värisävystä hailakan, ja vastaavasti pH-arvon laskiessa alle 4 värjäys muuttuu tummaksi. Paras värjäystulos saavutetaan Eosiinin pH:n ollessa lähellä 5:ttä. (Brown 2012, 53–58.)

3.4 Optimointi

Optimoinnilla haetaan parasta mahdollista vaihtoehtoa ja ratkaisua tutkittavalle asialle. HE-värjäystä arvioitaessa mikroskooppisesti siihen vaikuttavat myös tulosta tulkitsevan ja diagnoosin tekevän patologin oma mieltymys sekä tottumus eri värisävyihin. Optimoinnin tarkoituksena on muun muassa vähentää epäspesifistä värjäytymistä, saada tuman yksityiskohdat paremmin näkyviin sekä helpottaa diagnoosin tekemistä parantamalla värjäysten ominaisuuksia. (Brown 2012, 71.) Subjektiiiviseen näkemykseen perustuva värjäyksen optimointi pitää tehdä laboratorikohtaisesti, eikä näin ollen optimoinnin tuloksia voida vertailla.

HE-värjäys on histologinen perusvärjäys, joka suoritetaan patologian laboratoriossa värjäysautomaatilla. Värjäysautomaatti mahdollistaa päivittäisten suurten näytemäärien värjäykset. Se takaa tasalaatuisen värjäyksen ja poissulkee inhimilliset virheet, joita käsin värjäyksessä voi tapahtua. Samalla värjäysautomaatilla tehdään useita erilaisia värjäyksiä, ja optimointia rajoittava tekijä onkin värjäysautomaattiin mahtuva astioiden lukumäärä. (Immuno Diagnostic Oy, 2020.)

3.5 Aikaisempia tutkimuksia HE-optimoinnista

Aikaisempia HE-värjäyksen optimoinnista tehtyjä tutkimuksia tai opinnäytetöitä emme löytäneet julkisista tietokannoista. PAS-värjäysten optimoinnista on aikaisemmin tehty opinnäytetyö Vaasan keskussairaalan patologian osastolle. Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman opiskelijat Nousiainen ja Tynjälä tutkivat työssään, miten hematoksyliinin vaihtaminen toiseen, inkubaatioaikojen muuttamien ja väriliuosten koostumusten muuttaminen vaikuttavat värjäystulokseen. Vertailussa olivat Weigertin ja Mayerin hematoksyliini. Optimointi on aloitettu PAS-värjäyksestä, sillä se on pohjana D-PAS- ja AB-PAS-värjäyksille. Työssään he onnistuivat parantamaan PAS-värjäystulosten laatua ja poistamaan aiemmin tulkintaa häirinneet artefaktat. (Nousiainen & Tynjälä, 2013.)

Laamanen ja Ruotsalainen vertailivat opinnäytetyössään vuonna 2018 Mayerin ja Colen hematoksyliinejä HE-värjäyksessä. Heidän tarkoituksenaan oli selvittää, miten Colen hematoksyliini värjää kudonäytteet yleisemmin käytettyyn Mayerin hematoksyliiniin verrattuna. Tavoitteena heillä oli tehdä värjäystulosten arviointi Colen hematoksyliinille. Tutkimuksen tekijöiden mukaan värjäystulosten keskiarvot olivat molemmilla hematoksyliineillä samansuuntaiset ja Colen hematoksyliini soveltuu hyvin tutkimuksessa tarkasteltujen kudosten värjäämiseen. (Laamanen & Ruotsalainen, 2018.)

4 LAATU PATOLOGIAN LABORATORIOSSA

Vielä nykyisinkin PAD:n (patologis-anatomisen lausunnon ja diagnoosin) tekeminen on lukijapainotteista, ja se perustuu ihmissilmäparin mikroskoopilla tekemään subjektiiviseen havaintoon (Kivi 2017, 7). Patologian laboratoriossa tehdään paljon käsityötä verraten muihin laboratorion aloihin. Ennen kuin värjätyt lasit ovat valmiina patologin arvioitavana, ne ovat käyneet läpi monta käsityönä tehtävää vaihetta. Mainittakoon niistä dissekointi eli kudoksenäytteiden leikkaaminen ja valaminen. Laatua seurataan kaikissa työvaiheissa. Laadittujen ohjeiden noudattaminen sekä huolellisuus ja tarkkuus ovat lopulliseen laatuun liittyviä tekijöitä. Kliinisessä laboratoriossa tulosten laadun mittaaminen ja arviointi ovat iso osa asiakas- ja potilasturvallisuutta sekä sen kehittämistä. (Labquality 2020.)

Patologian laboratoriossa laatua valvotaan tarkoin niin sisäisesti kuin ulkoisesti. Jokaisessa laboratoriossa tulee olla laadittuna laatujärjestelmä, jossa on määritelty, mitä standardia toiminta noudattaa. HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratorio noudattaa standardien SFS-EN ISO 15189 ja SFS-EN ISO/IEC 17025 mukaista toimintajärjestelmää (HUS 2020). Laatujärjestelmä on tiivistetty laatukäsikirjaksi, joka voi olla myös sähköisessä muodossa. Laatukäsikirjassa määritetään tarkasti kaikki toimintaan liittyvät ohjeistukset tutkimusten vastuuhenkilöjaottelusta yksittäisiin kontrollimateriaaleihin ja organisaatiokaavioista jätehuoltoon. Laatukäsikirjasta selviää esimerkiksi, miten laatua mitataan, ja miten tulosten luotettavuus sekä toiminnan laatu saavutetaan kaikissa olosuhteissa. Laatujärjestelmällä pidetään yllä, seurataan ja kehitetään laboratorion tulosten laatua. (Pro pilvipalvelut, julkaisuaika tuntematon.)

4.1 Sisäinen laadunvarmistus laboratoriossa

Sisäiseen laadunvarmistukseen kuuluvat kaikki laboratoriossa tehtävät toimenpiteet, joilla tutkimustulosten täsmävyys ja toistettavuus varmistetaan jokaisella mittauskerralla. Apuna tulosten täsmävyteen ja toistettavuuteen käytetään vakioita ja referenssivalmisteita sekä kolmannen osapuolen kontrolleja. Kolmannen osapuolen kontrolleilla tarkoitetaan kontrolleja, joita ei ole suunniteltu ja optimoitu käytettäväksi vain tietyillä mittalaitteilla. Näillä riippumattomilla kontrolleilla varmistetaan mittalaitteiden ja -testien todellinen suorituskyky ja havaitaan testierien vaihdosten myötä mahdollisesti esiintyvät tasomuutokset. (Labquality 2020.)

Sisäisiä laadunvarmistusmenettelyjä ovat esimerkiksi validointi ja verifiointi. Validoinnilla varmennetaan menetelmän ja laitteen soveltuvuus sekä suorituskyky tiettyyn käyttötarkoitukseen (VTT Technology 276 2016). Verifiointilla tarkoitetaan objektiiviseen näyttöön perustuvaa vaatimukset täyttävää toimivuuden varmistamista. Verifiointi suoritetaan esimerkiksi jo aiemmin validoidun menetelmän tai laitteen vaihtuessa uuteen. (Labquality 2020.) Auditoinnissa verrataan toimintaa, ohjeistusta ja vaatimuksia sekä varmistetaan niiden vastaavan viranomaisvaatimuksia (Fimea 2015). Auditointi voi olla sekä sisäistä että ulkoista laadunarviointia.

4.2 Ulkoinen laadunarviointi laboratoriossa

Oikea tulostaso varmistetaan ulkoisella laadunarvioinnilla. Ulkoinen laadunarviointi on myös edellytyksenä laboratorioden toimiluvissa ja kaikissa laboratoriotointaan liittyvissä laatujärjestelmissä. Suomessa ulkoisia laadunarviointikielroksia järjestää puolueeton ja riippumaton Labquality Oy. Labquality Oy tarjoaa yksinomaan sosiaali- ja terveydenhuoltoon räätälöityjä laatua parantavia palveluja. Laadunarviointikielrokset on akkreditoitu ISO 17043- standardin mukaisesti. Laatuarviointikielrosten avulla laboratoriot voivat seurata ja parantaa suorituskykyään. (Labquality 2020.)

Akkreditointi on kansainvälisiin kriteereihin perustuva menettelytapa, jolla todetaan toiminnan pätevyys ja tulosten oikeellisuus laboratoriossa. Akkreditointi kertoo kuluttajalle laboratorion luotettavuudesta, pätevydestä ja uskottavuudesta. Suomessa akkreditointielimenä toimii FINAS (Finnish Accreditation Service), jonka toiminta on kansainvälisesti yhdenvertainen muiden maiden akkreditointitoiminnan kanssa. Tämän takia Suomessa akkreditoitujen toimijoiden antamat todistukset ja tulokset ovat maailmanlaajuisesti hyväksytyjä. (Finas 2015.)

4.3 Kudosvärjäyksen laatu

Kudosvärjäyksen laadulla on tärkeä merkitys diagnoosia tehtäessä. Laadukas värjäys tuo esiin kaikki diagnoosin kannalta tärkeät yksityiskohdat selkeästi, esimerkiksi nukleolit eli tymäjävyset, kromatiinin rakenteen, sytoplasman ja eosinofilit. Liian hailakka värjäys ei tuo esiin tarvittavia rakenneosia ja vastaavasti liian tumma värjäys hankaloittaa yksityiskohtien erottumisen. Oikean tasapainon löytäminen eri kudoksia ja kudosten osia värjäävien liuosten välillä onkin työlästä ja hienosäätöä vaativaa. (Henwood 2010, 135–137.) Värjäysprosessi on tärkeä vaihe kudosvärjäyksen laatua arvioitaessa. Välin heikko intensiteetti kudokseen tai värjäyksen liian voimakas taustareaktio aiheuttavat laatuvirheiden synnyn. (Labqualitydays 2018.)

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa on huomattu HE-värjäyksen laadun vaihtelevan viikon aikana. Laboratoriossa ei ole käytössä värjäyslinjastossa tumavärin eli hematoksyliinin diffausta. Diffaus tarkoittaa ylimääräisen värin poistoa. Värjäyksen taustalle jää hieman sinisyyttä, joka mahdollisesti vaikuttaa myös eosiinivärisävyyteen. Tumia värjäävän hematoksyliinin värisävy pysyy tasaisena koko viikon, mutta eosiinilla värjättyjen kudosten värisävy on erilainen alku- ja loppuviikosta. Työn toimeksiantaja ei ole tyytyväinen heidän käytössään olevaan HE-värjykseen ja heillä on tarve saada parempi värjäys. Opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä pieniä muutoksia HE-värjäysohjelmiin ja vertailla niitä käytössä olevaan HE-rutiinivärjykseen. Tavoitteena on parantaa HE-värjäyksen laatua.

Tutkimuskysymykset:

- Miten uudet, hieman muokatut värjäysohjelmat soveltuvat kudosten värjykseen rutiinivärjykseen verrattuna?
- Miten Mayerin hematoksyliinin diffaus etanolisuolahapolla (EtHCl) vaikuttaa värjäyksen laatuun?

6 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimuksessa yhdistettiin kokeellista sekä kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusmenetelmää. Kvantitatiivisen tutkimuksen ominaisuuksiin kuuluu tulosten kuvantaminen numeeristen suureiden avulla, objektiivisuus ja asioiden välisten riippuvuuksien sekä tutkittavissa ilmiöissä tapahtuneiden muutosten selvittäminen. Kokeellisen tutkimuksen avulla mitataan yhden käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan ja selvitetään jonkin tekijän vaikutusta kontrolloiduissa olosuhteissa. (Heikkilä 2014, 8–11.) Opinnäytetyömme kokeellisen osuuden muodostivat kudosten leikkaaminen, värjäminen eri värjäysohjelmilla kontrolloidusti laboratoriossa ja arviointilomakkeen laatiminen. Muunneltuja värjäysohjelmia verrattiin kontrollina toimineeseen rutiinivärjäykseen, eli muuttujana tutkimuksessa oli värjäysohjelma. Kvantitatiivinen tutkimusmenetelmä oli luonteva valinta arviointilomakkeen analyysimenetelmäksi. Työ koostui pääsääntöisesti kokeellisesta osuudesta, ja pienemmän osuuden eli tulosten analyysin muodosti kvantitatiivinen osuus. Tässä työssä emme testanneet tulosten tilastollista merkitsevyyttä, koska tässä työssä tärkeämpi oli käytännön merkitsevyys.

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida erilaisilla mittareilla. Tutkimuksen pitää tuottaa uskottavaa ja luotettavaa tietoa, jota arvioidaan validiteetin ja reliabiliteetin avulla (Kananen 2015, 90). Tutkimuksen pätevyys eli validiteetti tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä tutkimuksessa on tarkoituskin mitata. Tutkimuksessa mittaustulosten toistettavuus eli reliabiliteetti tarkoittaa mittauksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2018, 231.)

Tutkimuksessa keräsimme tietoa arviointilomakkeella, johon oli laadittu strukturoituja eli valmiin vaihtoehdon sisältäviä kysymyksiä, joista arvioija valitsi sopivimman vaihtoehdon. Kysymykset oli laadittu niin, että vastausvaihtoehdot ovat muutettavissa numeeriseen muotoon mahdollistaen näin ollen tulosten erilaiset laskutoimitukset eli määrällisen analyysin (Kananen 2015, 84).

7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS JA TULOKSET

Työn toimeksiantajalla oli tarve saada laadukkaampi yleisvärjäyksenä käytetty HE-kudosvärjäys. Patologian laboratoriossa ei ole käytössä värjäyslinjastossa tumavärin eli hematoksyliinin diffausta, ja värjäyksen taustalle jää hieman sinisyyttä, joka mahdollisesti vaikuttaa myös eosiniin värisävyyteen. Tumia värjäävän hematoksyliinin värisävy pysyy tasaisena ja hyvänä koko viikon, mutta eosinilla värjäytyvien kudosten värisävy on hyvä alkuvuikosta ja huononee loppuvuikkoa kohden. Tasalaatuinen värjäystulos helpottaa mikroskopointia ja patologin työtä sekä on tärkeää luotettavan diagnoosin saamiseksi. Tavoitteena oli parantaa HE-värjäyksen laatua ja saada optimaalinen rutiinivärjäys. Tarkoituksena oli tehdä pieniä muutoksia HE-värjäysohjelmiin ja vertailla niitä kontrollina toimineeseen HE-rutiinivärjäykseen.

7.1 Opinnäytetyöprosessin käytännön työn aikataulut

Saimme myönteisen tutkimuslupapäätöksen työllemme marraskuussa 2019 Eksotelta. Vuoden 2020 alussa Eksoten laboratorio- ja kuvantamispalvelut yhdistyivät fuusiossa HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan laboratorioksi. Käytännön työn aloitimme joulukuussa 2019 harjoittelemalla vesiliukumikrotomin käyttöä ja näytteiden leikkaamista ennen varsinaisten leikkeiden tekoa. Värjättävät näyteleikkeet leikkasimme monikudosblokeista joulunalusviikolla 2019. Pidimme palaverin toimeksiantajan edustajan ja ohjaavan opettajan kanssa tammikuun puolella välissä, jolloin tarkentui työn sisältö sekä vertailtavien värjäysohjelmien määrä. Kaikki työssä käytettävät lasit värjättiin tammikuussa 2020 niin kuin olimme suunnitelleet aikatauluja laatiessamme.

Arviointilomakkeeseen liittyvän palaverin pidimme patologin kanssa tammikuun lopulla, jonka jälkeen laadimme arviointilomakkeen. Patologilta saimme värjättävien kudosten arviointikriteerit. Ne ovat yleisimpiä luotettavan diagnoosin teossa käytettäviä kriteereitä. Värjättyt lasit annettiin arvioitavaksi kahdelle Etelä-Karjalan patologille helmikuussa 2020 ja Helsingin patologille maaliskuussa 2020. Viimeiset arviointitulokset saimme huhtikuussa Helsingin patologilta, minkä jälkeen teimme tuloksista toimeksiantajan pyynnöstä lyhyen yhteenvedon.

7.2 Työn toteutus

Patologin toiveiden mukaan käytimme tutkimuksessa kudoksina ihoa, suolta, kohdunseinämää ja lymfaattisena kudoksena tonsillaa eli nielurisaa. Nämä ovat yleisempiä histologian laboratoriossa tutkittavia kudoksia. Patologi piti myös tärkeänä, että yksi kudoksista on lymfaattista- eli imukudosta. Imukudos on rakenteeltaan löyhää kudosta. Imukudos värjäytyy tummasävvyiseksi itukeskusta ympäröivien runsaiden pienten lymfosyyttien vuoksi. (Solunetti 2006.) Saimme kudospälyt valmiiksi monikudosblokkeihin valettuina, joten meidän työksemme jäi blokkien leikkaaminen ohuiksi leikkeiksi näytelaseille ja lasien värjäykset. Monikudosblokeissa oli neljä kudosta valettuina samaan muottiin. Blokeista leikkasimme vesiliukumikrotomilla 3 µm:n paksuisia leikkeitä näytelaseille. Kaikki näytteet olivat käsitelty histologisessa näyteprosessissa ja värjättävät leikkeet leikattu yhdestä ja samasta monikudosblokista, joten saimme edustavat ja vertailtavat näytelasit. Näytelaseja tehtiin kolme rinnakkaista jokaista värjäysohjelmaa varten.

Ennen näytelasien antamista arvioijille tarkastimme värjäysten onnistumisen itse. Värjäystulosten arviointiin laadimme strukturoidun kyselylomakkeen arvioijille, jossa oli valmiit vastausvaihtoehdot numeerisesti esitettynä. Lomake toteutettiin paperisena versiona, jotta arviointi mikroskooppien ääressä olisi arvioijille mahdollisimman helppoa. Kuvasimme värjätyt kudokset ja dokumentoimme työn kaikki vaiheet.

7.3 Värjäysohjelmat

Testattavat värjäysohjelmat tulivat toimeksiantajan edustajan, opinnäytetyö ohjaajamme Hanna Turusen ehdotuksina. Värjäykset suoritettiin Sakura TISSUE-TEK® PRISMA-värjäysautomaatilla tammiukuussa 2020 kahden ensimmäisen viikon aikana sairaalan päivittäisten rutiinivärjäysten jälkeen. Rutiinivärjäyksen rinnalle tehtiin kahdeksan eri värjäysohjelmaa pienin muutoksin. Sakura TISSUE-TEK® PRISMA-värjäysautomaatin värjäysastioiden määrä oli rajoittava tekijä värjäysohjelmia muuttaessa. Värjäysautomaatissa ei ollut tilaa uusille astioille, joten hematoksyliiniä diffatessa eli ylimääräisen värin poistossa käytimme jo linjastossa valmiina olevaa 70-prosenttista etanolisuolahappoa (EtHCL). Värjäsimme yhdeksällä eri värjäysohjelmalla jokaisesta kolme rinnakkaista näytelasia. Ohjelmista yksi oli sairaalan omassa käytössä oleva HE-rutiinivärjäysohjelma.

Värjättyjä laseja tarkastelimme valomikroskoopilla yhdessä toimeksiantajan edustajan ja opinnäytetyömme ohjaajan kanssa. Rajasimme arviointiin menevät lasit rutiinivärjäyksen lisäksi neljään parhaiten värjäytyneeseen lasiin. Arvioinnin ulkopuolelle jääneissä laseissa ei ollut nähtävissä arviointiin tarvittavia kriteereitä tai selkeitä muutoksia rutiinilasiin verrattuna. Arviointiin menevissä laseissa havaitsimme eroja muun muassa veren ja tuman rakenteiden erottumisessa sekä sytoplasmassa. Tuloksissa esittelimme rutiinivärjäyksen ja parhaan värjäysohjelman kuvien kera, sekä hieman myös muita arviointiin päässeitä värjäysohjelmia. Värjäysohjelmat (liite 1).

7.4 Arviointilomake ja tulosten arviointi

Arviointilomake laadittiin käyttäen 5-portaista Likertin asteikkoa, jonka katsoimme soveltuvan parhaiten tähän tutkimukseen. Strukturoidut valmiit vastausvaihtoehdot ja niitä vastaavat numerot nopeuttivat arvioijia subjektiivisen näkemyksen perusteella tapahtuvaa parhaan vaihtoehdon valintaa sekä helpottivat tilastollista käsittelyä. Arviointilomakkeen loppuun lisäsimme mahdollisuuden avoimeen kommentointiin muutamalla rivillä. Avoimella kommentilla voidaan saada hyviä ideoita ja vastauksia kysymyksiin, joita strukturoiduilla kysymyksillä ei ole mahdollisesti osattu kysyä. (Heikkilä 2014, 34–39.) Avoimissa kommentteissa erään arvioijan mielestä eosinofiilit olisivat olleet yksi hyvä kriteeri arvioitavaksi, ja hän olisi toivonut rutiinivärjäyksen olleen piilotettuna näytesarjaan.

Arviointi suoritettiin numeerisesti arviointiasteikolla 1–5.

- 1 eli huono tarkoittaa luotettavan diagnoosin mahdotonta tekemistä
- 2 eli välttävä tarkoittaa diagnoosin hidasta ja työlästä tekemistä
- 3 eli tyydyttävä tarkoittaa riittävää värjäytyvyyttä diagnoosin tekoon

4 eli hyvä tarkoittaa selkeää värjäytyvyyttä luotettavan diagnoosin tekoon, lievää alitai ylivärjäytymistä

5 eli erinomainen, optimaalinen

Mikäli arvioija on antanut kysymysmerkin tai viivan jonkun arviointikriteerin kohdalle, se saa tulokseksi nollan. Tämä tarkoittaa, ettei kudoksessa ole arvioitavaa kriteeriä ollenkaan tai sitä on riittävästi arvion tekemiseen. Arviointilomake (liite 2).

Patologian laboratoriossa suurta ammattitaitoa vaativan diagnoosin tekee patologi, joka mikroskopoi lukuisia laseja päivittäin. Hänen työtään helpottamaan on tärkeää saada värjäysohjelma, jolla lasit värjäytyvät selkeästi. Arvioijina toimi kolme patologia, kaksi HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratorion patologia sekä yksi patologi Helsingistä. Toimeksiantajan edustaja ehdotti yhdeksi lisäarvioijaksi Helsingin patologia, koska arvioinnin hajonta olisi jäänyt pieneksi vain Etelä-Karjalan patologian laboratorion kahden patologin arvioidessa tuloksia. Helsingin patologi toimii myös patologian laatu päällikkönä ja ylilääkärinä, joka toi hyvän lisän arvioijien joukkoon. Laadimme paperisen arviointilomakkeen, joka helpotti arvioijien työtä heidän arvioidessaan värjättyjä laseja mikroskoopin ääressä. Arviointilomakkeessa oli arvioitavana 10 eri värjäytyvyyden kriteeriä, jota haastattelemamme patologi itse piti tärkeänä diagnoosia tehtäessä. Arvioitavina kohteina olivat kudoksissa: tumajyväsien, solumembraanin ja hermojen erottuminen, tuman ja plasmajyvien kromatiini, punasolut, sidekudos, sytoplasman sävy, taustan värjäytyminen sekä värjäyksen soveltuvuus PAD (patologisanatomisen lausunto ja -diagnoosi) arviointiin.

7.5 Työn tulokset

Värjäsimme kudokset kontrollina toimineella rutiinivärjäyksellä sekä kahdeksalla eri muokatulla värjäysohjelmalla. Mikroskooppisen tarkastelun jälkeen arvioitavaksi valikoitui rutiinin lisäksi neljä ohjelmaa, jotka esitetään taulukossa 1 ja kuvassa 1. Tulosten tilastoinnissa laskettiin arviointilomakkeella saatujen arvioitavien kriteerien pisteiden aritmeettinen keskiarvo. Keskiarvo saadaan jakamalla havaintoarvojen summa havaintojen lukumäärällä (Heikkilä 2014, 63).

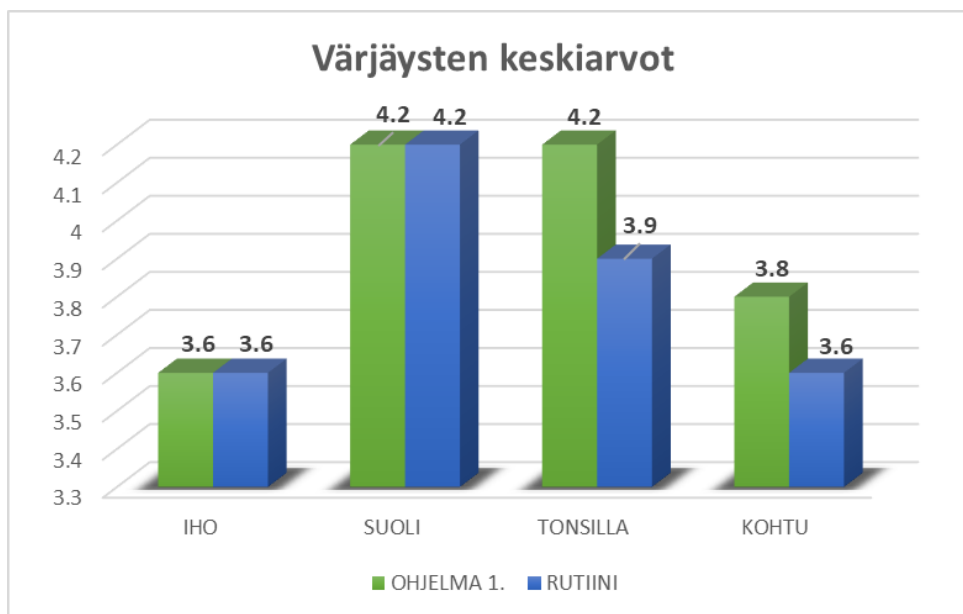
Arviointilomakkeessa jokaisella kudoksella on määritetty kymmenen arvioitavaa kriteeriä ja kolme eri arvioijaa eli yhteensä 30 pisteytettyä tulosta ($n=30$). Kudosten keskiarvo saadaan jakamalla yhteenlasketut pisteen luvulla 30. Värjäysohjelmien keskiarvo saadaan laskemalla jokaisen kudoksen pisteytetty tulokset yhteen ja saatu tulos jaetaan luvulla 120 ($n=120$).

TAULUKKO 1. Arvioitujen värjättävien kudosten (n=30) ja kaikkien kudosten (n=120) keskiarvot.

VÄRJÄYSOHJELMA	IHO ka.	SUOLI ka.	TONSILLA ka.	KOHTU ka.	KAIKKI KUDOKSET ka.
Rutiini	3,6	4,2	3,9	3,6	3,8
Ohjelma 1	3,6	4,2	4,2	3,8	4,0
Ohjelma 4	3,1	3,8	3,7	3,3	3,5
Ohjelma 7	3,0	3,5	3,4	3,0	3,2
Ohjelma 8	3,4	3,9	3,6	3,3	3,6

Parhaan yhteenlasketun tuloksen sai ohjelma 1. keskiarvolla 4,0 arviointiasteikolla 0—5, joka tarkoittaa hyvää ja selkeää värjäytyvyyttä luotettavan diagnoosin tekoon (taulukko 1). Tässä värjäysohjelmassa eosinin jälkeinen vesihuuhtelu korvattiin yhden minuutin 96-prosenttisella etanoli diffauksella. Lymfaattinen tonsillakudos ja kohtu värjäytyivät rutiiniohjelmaa paremmin värjäysohjelmalla 1, kun taas ihon ja suolen värjäytyvyyttä pidettiin yhtä hyvänä (kuva 1). Rutiini eli käytössä oleva värjäysohjelma sijoittui yhteenlaskettujen tulosten perusteella toiseksi keskiarvolla 3,8 arviointiasteikolla 0—5 (taulukko 1). Tässä värjäysohjelmassa eosinin diffaus suoritettiin minuutin vesihuuhtelulla.

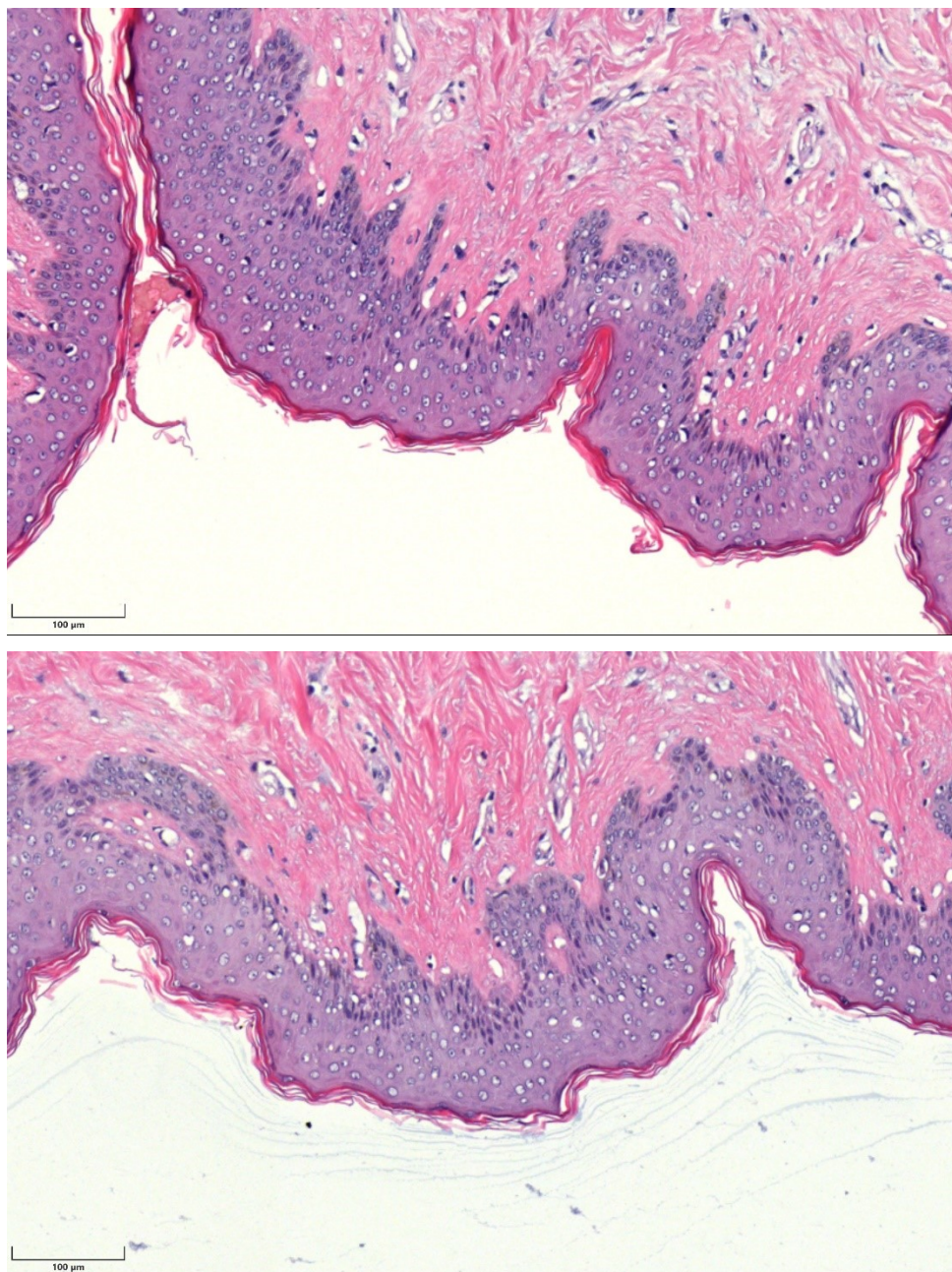
Ohjelmissa 4, 7 ja 8 testattiin Mayerin hematoksyliiniajan pidentämistä ja sen diffausta 70-prosenttisellä EtHCL:lla. Ohjelmassa 4. Mayerin hematoksyliiniaikaa pidennettiin 6,5 minuuttiin ja diffattiin 3 sekuntia. Ohjelma sijoittui neljänneksi keskiarvolla 3,5 arviointiasteikolla 0—5 (taulukko 1). Tällä ohjelmalla arvioijien mielestä iho värjäytyi huonoiten ja suoli kudoksista parhaiten. Ohjelmassa 7. Mayerin hematoksyliiniaika oli 7 minuuttia ja diffausaika yksi sekunti. Ohjelma sijoittui viidenneksi keskiarvolla 3,2 arviointiasteikolla 0—5, joka tarkoittaa tyydyttävää ja riittävää värjäytyvyyttä diagnoosin tekoon (taulukko 1). Tällä ohjelmalla värjäytyi iho sekä kohtu huonoiten ja suoli parhaiten. Ohjelmassa 8. Mayerin hematoksyliiniaika oli pisin, 8 minuuttia, ja diffausaika oli yksi sekunti. Tällä ohjelmalla suoli värjäytyi parhaiten ja kohtu heikoiten. Ohjelma sijoittui arvioinnissa kolmanneksi (taulukko 1).



KUVA 1. Värjäysten keskiarvot ohjelmalla 1. ja rutiinilla

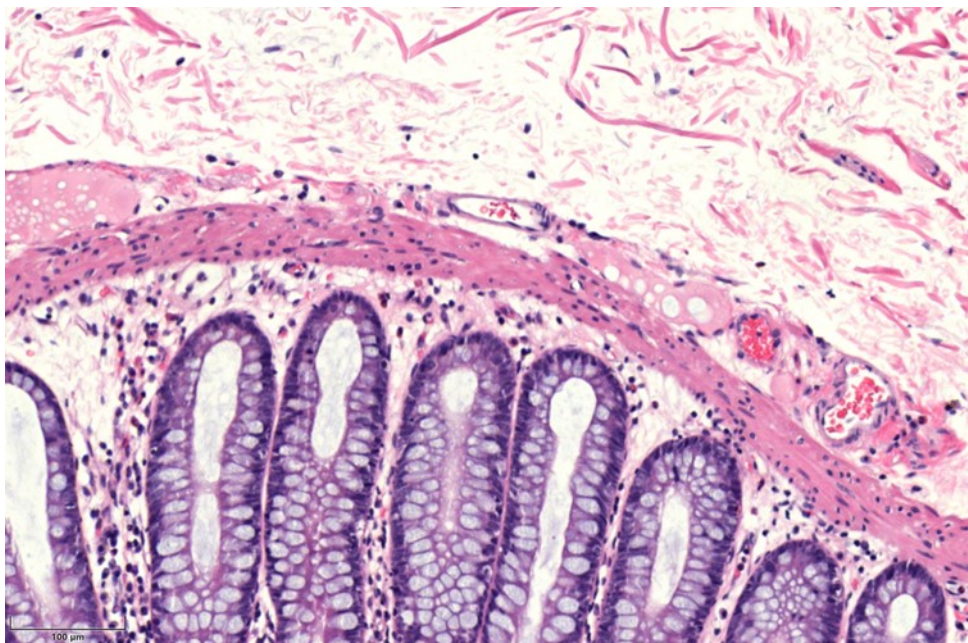
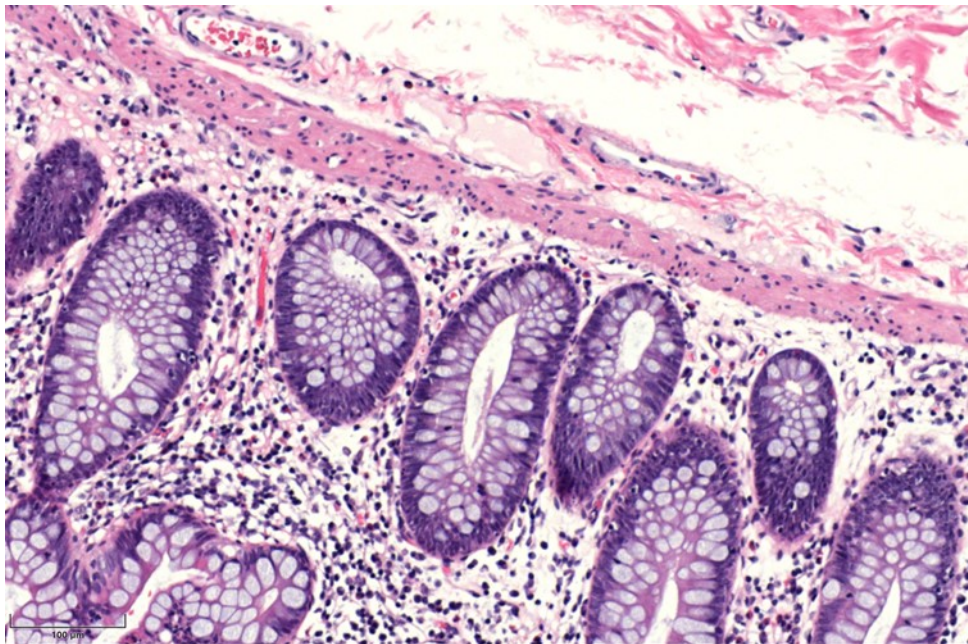
Seuraavaksi työssä vertailtiin tarkemmin käytössä olevaa rutiinivärjäystä ja kokeilluista uusista ohjelmista parhaat pisteet saanutta ohjelmaa 1. Aiempana Precipoint M8 -digimikroskooppikameralla objektiivilla 40 otettuja kuvia kudokset rutiinivärjäyksellä sekä parhaan värjäystuloksen saaneella ohjelmalla. Kuvat ovat vain yksi pieni näkymä koko lasista, joten kaikki arvioitavat kriteerit eivät välttämättä näy skannatuissa kuvaleikkeissä tai niitä ei ole kudoksissa ollenkaan, esimerkiksi plasmajien kromatiinia ihossa.

Keskiarvon perusteella iho värjäytyi molemmilla ohjelmilla yhtä hyvin. Värjäysohjelmalla 1. ihosta parhaiten erottuivat arvioijien mielestä tumajyväset, tuman kromatiini sekä solumembraani. Taustan värjäytyminen ja värjäyksen soveltuvuus PAD-arviointiin saivat yhtä hyvän arvosanan. (kuva 2. alakuva.) Rutiinivärjyksellä värjätyin ihon sytoplasman sävy ja hermojen erottuminen jakoi mielipiteitä arvioijien kesken. Niissä tulokset vaihtelivat välillä 2–5. Tuman kromatiini erottui kaikkien arvioijien mielestä hyvin. (kuva 2. yläkuva.)



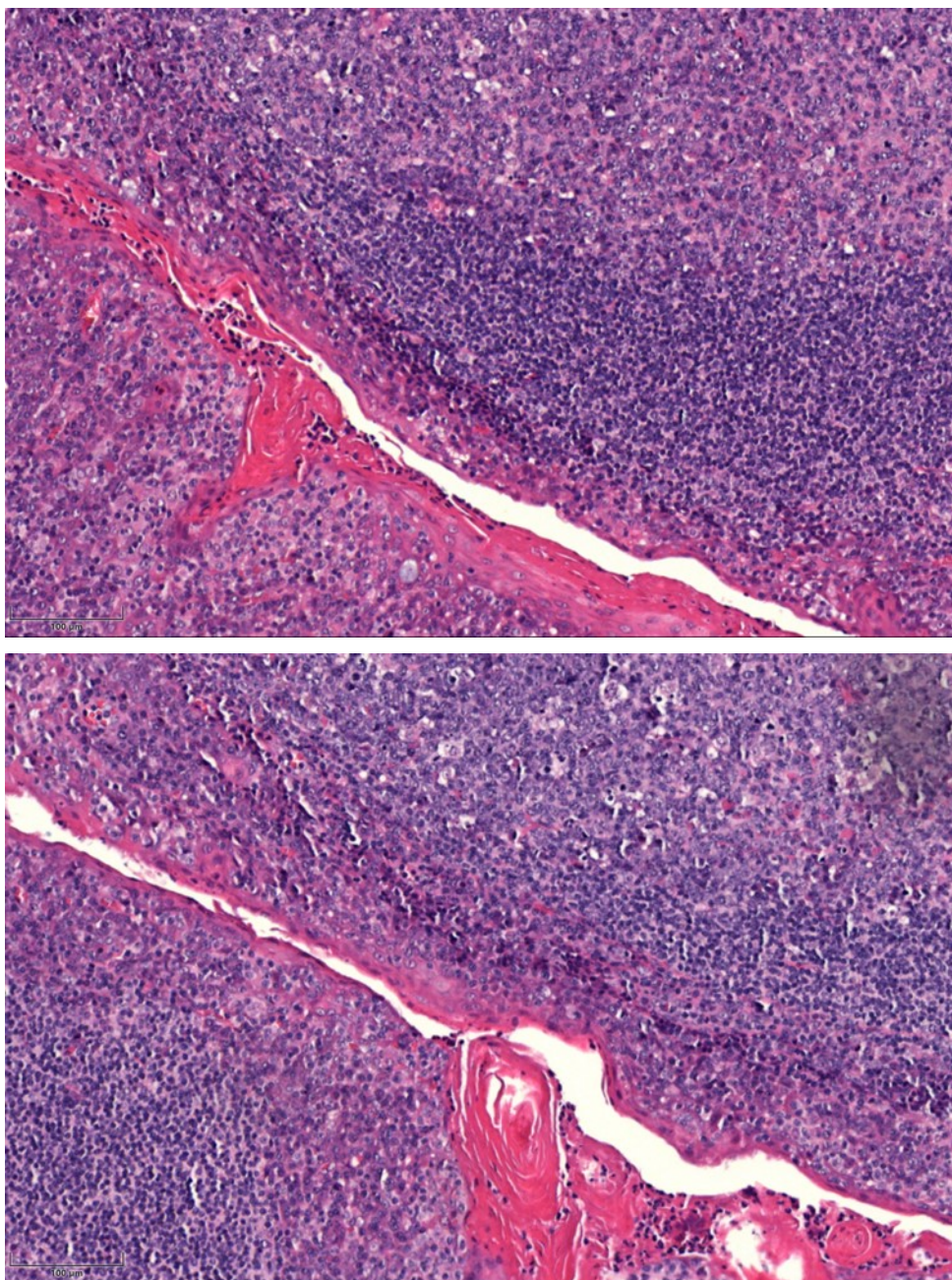
KUVA 2. Yläkuvassa iho rutiinivärjyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa iho värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. (Kauria & Suhonen 2020.)

Keskiarvon perusteella suoli värjäytyi molemmilla värjäysohjelmilla yhtä hyvin ja selkeästi (kuva 1). Punasolujen värjäytyvyyttä ja hermojen erottumista pidettiin rutiinivärjäystä selkeästi parempina värjäysohjelmalla 1. tehdyllä värjäyksellä. Tumajyväsien erottuminen sai yhtä hyvän keskiarvon molemmilla värjäyksillä. (kuva 3.)



KUVA 3. Yläkuvassa suoli rutiinivärjäyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa suoli värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. (Kauria & Suhonen 2020.)

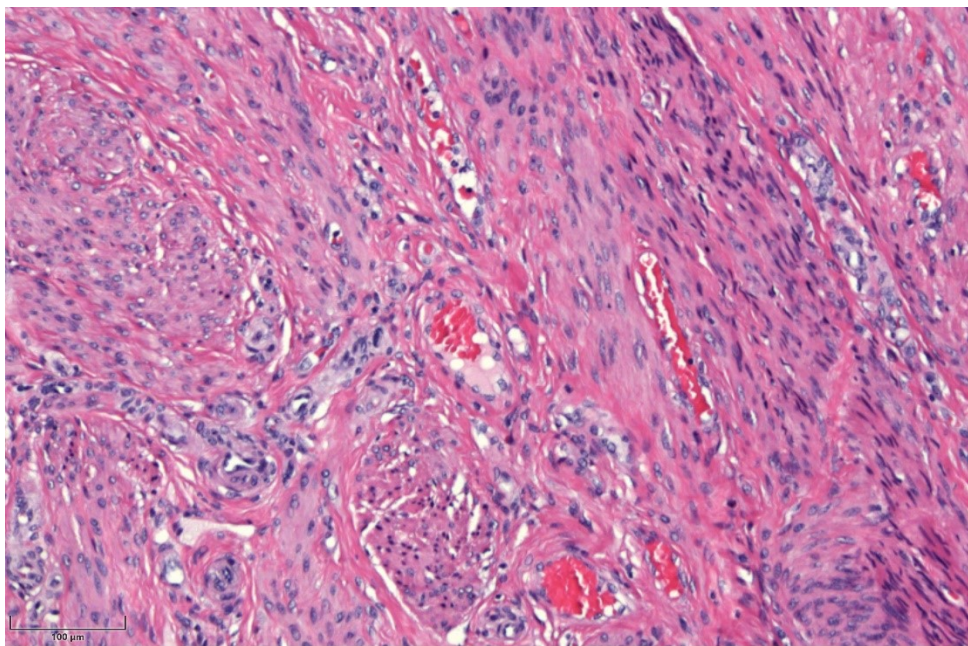
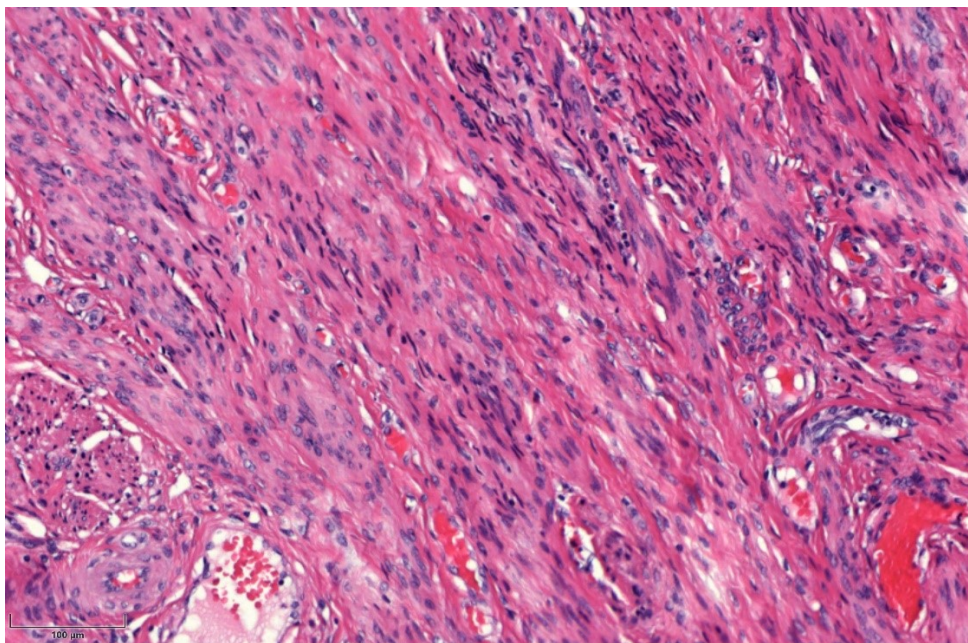
Keskiarvon perusteella tonsillan värjäytyvyydellä oli suurin ero värjäysohjelmien kesken. Tonsillan tumajyväset ja punasolut erottuivat värjäysohjelmalla 1. erinomaisesti. Sidekudos, plasmasolujen kromatiini, sytoplasman sävy sekä hermojen erottuminen saivat värjäysohjelmalla 1. paremman arvosanan kuin rutiinivärjyksellä. Ainoastaan tuman kromatiini värjäytyi erinomaisesti rutiinivärjyksellä ja hyvin värjäysohjelmalla 1. (kuva 4. alakuva.)



KUVA 4. Yläkuvassa tonsilla rutiinivärjyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa tonsilla värjäysohjelmalla 1. 40 x suurennoksella. (Kauria & Suhonen 2020.)

Tulosten perusteella kohtu sai paremman keskiarvon ohjelmalla 1. kuin rutiinivärjyksellä. Värjäysohjelmalla 1. värjättyä kohtuleikkeessä punasolut erottuivat kaikkien mielestä erinomaisesti ja optimaalisesti. Myös sidekudoksen värjäytyminen ja sytoplasman sävy saivat hyvän arvosanan. Yhden arvioijan mielestä hermojen erottuminen ei ollut riittävää värjäysohjelmalla 1. (kuva 5. alakuva.)

Rutiinivärjyksellä kohdun plasmasolujen kromatiini jakoi mielipiteitä. Yhden arvioijan mielestä ne olivat selkeästi värjäytyneet ja kaksi arvioijaa merkitsivät tuloksen viivaksi eli nollaksi. Solumembraanin erottuminen arvioitiin pisteillä 3–5. (kuva 5. yläkuva.)



KUVA 5. Yläkuvassa kohtu rutiinivärjyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa kohtu värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. (Kauria & Suhonen 2020.)

Yhteenvedona tuloksista voidaan todeta parhaaksi värjäykseksi ohjelman numero 1. Sen värjäystulos oli yhtä hyvä kudoksilla iho ja suoli kuin käytössä olevassa rutiinivärjäyksessä. Värjäysohjelma 1. värjäsi kudoksista tonsillan ja kohdun paremmin kuin rutiinivärjäys. Lymfaattisen tonsillan eli nieluri-san värjäytyvyyden ero oli värjäysohjelmilla selkein.

8 TUTKIMUSETIIKKA

Etiikan peruskysymyksiä ovat kysymykset oikeasta ja väärästä, hyvästä ja pahasta. Tutkimusta tehtäessä on otettava huomioon monia eettisiä kysymyksiä. Esimerkiksi on huomioitava, että tiedon hankintaan ja julkistamiseen liittyvät tutkimuseettiset periaatteet ovat yleisesti hyväksytyjä. Eettisesti hyvä tutkimus edellyttää hyvän tieteellisen käytännön noudattamista tutkimuksenteossa. (Hirsjärvi ym. 2018, 23.)

8.1 Tutkimuksen eettisyys

Tutkimustyötä määrittävät monet lait, säädökset ja ohjeistukset. Tutkimustyössämme käytimme ihmisperäisiä näytteitä, joita ei ollut tutkimusta varten erikseen kerätty. Ne olivat diagnosointinäytteistä yli jäänyttä kudosta, joista oli poistettu jo kaikki tunnistetiedot eli näytteet olivat täysin anonyymeja. Saimme kudospäätteet valmiiksi monikudosblokkeihin valettuina, joten näytteiden alkupeirää henkilötietoineen ei ole meillä eikä lukijoillakaan mahdollisuutta tietää. (Tietosuojalaki 5.12.2018/1050, § 2, laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488, § 2).

Noudatimme tutkimuksessa tutkimuseettisiä periaatteita, hyvää tieteellistä käytäntöä, rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta aina työn alusta tutkimustulosten arviointiin saakka. Tutkimuksessa käytetyt värjätyt näytelasit nimettiin arviointia ja tilastollista käsittelyä varten. Tutkimuksen luotettavuuden varmistamiseksi käytimme tiedonhakuun vain luotettavia lähteitä sekä merkitsimme viitteet ja lähteet asianmukaisesti. Noudatimme hyvää tutkimusetiikkaa työn jokaisessa vaiheessa. Saadut tutkimustulokset koottiin arviointilomakkeilta alkuperäisessä muodossa ja tulokset esitettiin niistä mitään poistamatta tai niihin mitään lisäämättä. Tutkimustuloksiin emme antaneet omien mielipiteiden vaikuttaa emmekä tehneet omia tulkintoja. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta ETENE 2012, 6.) Saimme tutkimusluvan opinnäytetyöllemme Eksotelta (liite 3).

8.2 Tulosten luotettavuus

Tulosten oikeellisuutta ja luotettavuutta tarkastellaan käsitteiden reliabiliteetti ja valideetti avulla. Reliabiliteetti tarkoittaa toistettavuutta eli tulosten pysymistä samanlaisina toistettaessa tutkimus ja valideetilla tarkoitetaan pätevyyttä ja oikean asian tutkimista. (Hirsjärvi ym. 2018, 231.)

Tutkimuksessa käytetty arviointilomake oli oikea mittari ja aineistonkeruumenetelmä antamaan luotettavaa ja objektiivista tietoa tähän tutkimukseen tukien tutkimuksen valideettia. Arviointilomakkeen sisältämät kriteerit olivat valideja, koska ne olivat patologin itsensä antamia ja niitä käytetään diagnooseja tehtäessä. Patologit olivat parhaita mahdollisia arvioijia tässä tutkimuksessa ja heidän ammattitaitonsa lisäsi tulosten luotettavuutta. Vaikka heidän antamansa tulokset sisälsivät subjektiivisen näkemyksen, omat mieltymykset sekä tottumukset eri värisävyihin laseja arvioitaessa, on tulos kuitenkin validi. Se, arvioivatko patologit tarpeeksi kriittisesti arvioivat näytelasit opinnäytetyön ollessa kyseessä, mietitytti meitä. Toisaalta patologit tiesivät, että tässä opinnäytetyössä etsittiin mahdollisesti uutta rutiinivärjäystä heidän työkalukseen, joten uskoimme heidän olevan motivoituneita.

Reliabiliteettia voidaan todeta usealla eri tavalla. Esimerkiksi tutkittaessa samaa asiaa eri tutkimuskerroilla saaden samat tulokset tai kahden arvioijan päätyessä samanlaiseen tulokseen voidaan tutkimusta pitää reliaabelina. (Hirsjärvi ym. 2018, 231.) Tutkimuksen arvioijien lukumäärä (3) oli pieni, mutta riittävä suhteessa erikoisalaa ja ylipäättänsäkin patologioiden lukumäärään nähden Suomessa. Lisäksi heidän antamansa tulokset olivat hyvin yhteneviä, mikä lisäsi tutkimustulosten luotettavuutta. Tutkimuksen kaikissa työvaiheissa oli käytetty dokumentoituja työohjeita ja standardisoituja menetelmiä, joten työ on toistettavissa, mutta täysin samoihin tuloksiin ei välttämättä päästä, mikä johtuu arvioijien subjektiivisen näkemyksen merkityksestä.

Tutkimuksessa oli neljä kudosta, joiden värjäytyvyyttä tarkastelimme eri värjäysohjelmilla. Vaikka otos eli pieni, se edustaa lukumäärällisesti suurinta joukkoa tutkittavista kudoksista patologian laboratoriossa. Oli tärkeää saada värjättävät kudokset mahtumaan samaan monikudosblokkiin, jotta leikatut objektilasilla värjäytyivät samalla ohjelmalla samaan aikaan. Pohdimme, olisiko isompi otos lisännyt värjäystulosten hajontaa ja vaikuttanut näin ollen lopputulokseen. Pohdimme myös, antoivatko neljä arvioinnissa käytettyä kudosta tarpeeksi riittävän arvion värjäysohjelmista?

Keräsimme arviointilomakkeelta tiedot tulosten tilastoimista varten Excel-taulukkoon. Kyselyn vastausprosentti oli täydet 100, mikä lisäsi tulosten luotettavuutta. Tarkistimme useaan kertaan virheiden minimoimiseksi, että tulokset olivat oikein syötettynä taulukkoon. Laskimme saaduista tuloksista keskiarvot erikseen kullekin kudokselle sekä värjäysohjelmalle ja käytimme keskiarvoa tulosten esittämisessä. Vastaukset olivat arvioijien kesken hyvin yhteneviä, joten pidimme tuloksia reliaabeleina ja varsin valideina. Tulosten luotettavuutta heikentää keskiarvon käyttö tulosyhteenvedossa, mikäli vastausten hajonta on suuri. Tulos voi vääristyä, sillä samaan keskiarvoon päästään monilla eri luvuilla. Pohdimme myös, olisiko arviointilomakkeessa käytetty suurempi kriteerimäärä vaikuttanut keskiarvoihin.

9 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tekeminen oli todella mielenkiintoista ja motivoivaa, koska tutkimusaihe tuli toimeksiantajalta ja tutkimuksella oli todellinen tarve. Patologian laboratorion henkilökunnalla ei ollut aikaa suorittaa tätä aikaa vievää prosessia oman työnsä ohella, joten he halusivat teettää sen opiskelijoilla opinnäytetyönä. Haasteelliseksi tästä työstä teki meidän kummankin vähäinen kokemus patologiasta, lyhyt teoriaopintojakso ja kokeellisen osuuden suorittaminen ennen koulutukseen kuuluvaa patologian harjoittelujaksoa. Aito kiinnostus kliinistä patologiaa kohtaan ja korkea motivaatio edesauttoivat kuitenkin työn onnistumisessa.

Opinnäytetyöprosessi oli pitkä ja aikaa vievä. Se kehitti ja vahvisti ajanhallinta- ja stressinsietokykyä. Aloitimme työn aihekuvauksen ja tutkimussuunnitelman tekemisellä keväällä 2019. Kokeellisen osuuden eli kudokset leikkaamisen vesiliukumikrotomilla olimme suunnitelleet tekemämme jo aikaisemmin syksyllä 2019, mutta se siirtyi patologian laboratorion kiireiden ja lupa-asioden vuoksi loppuvuoteen. Saimme sen tehtyä joululomalla ja pysyimme näin ollen suunnitellussa aikataulussa. Kudokset leikkaaminen opetti meille mikrotomin käyttöä, tarkkuutta ja kehitti myös laboratoriotyössä tarvittavia kädentaitoja. Värjäykset teimme alkuvuodesta 2020 ennen opiskeluun liittyvää työharjoittelujaksojen alkamista. Sovimme yhdessä, että aloitamme opinnäytetyön kirjallisen osuuden koostamisen kokopäiväisesti heti kesätöiden jälkeen eli syyskuun alusta. Se osoittautui hyväksi suunnitelmaksi ja keskittyminen pelkästään opinnäytetyöhön nopeutti työn loppuunsaattamista.

Histologisissa värjäyksissä ei ole vain yhtä oikeaa värjäystulosta diagnostiikan mahdollistavien kriteerien täytyttyä. Tulos on subjektiivinen ja perustuu patologin mieltymykseen ja tottumukseen värien voimakkuuksien suhteen. Tässä työssä oli tärkeää saada aikaiseksi värjäystulos, joka miellytti juuri toimeksiantajan patologeja. Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa HE-värjäyksen laatua optimoimalla käytössä oleva värjäysohjelma. Optimointi vaatii asiantuntemusta sekä kokemusta koko värjäysprosessista, jonka vuoksi vertailtavat värjäysohjelmamuutokset saimme valmiina toimeksiantajalta. Värjäysohjelmissa oli useampia muuttujia, jotka he tiesivät ammattitaidon ja kokemuksen perusteella vaikuttavan värjäyksen lopputulokseen.

Teoriaosuutta kirjoittaessa törmäsimme siihen tosiasiaan, että tieteellistä lähdemateriaalia kliinisestä histologiasta oli hyvin suppeasti saatavilla ja valtaosin samojen tekijöiden englanninkielisiä julkaisuja. Tiedonhaku kehitti niin kielitaitoa kuin tietoteknistä osaamista, koska valtaosa tiedosta täytyi etsiä internetistä ja kääntää suomeksi. Käytimme tiedonhakuun muun muassa sosiaali- ja terveysalan tietokantoja, kuten Cinahl ja PubMed, joista löytyy alaan liittyviä kansainvälisiä artikkeleita ja kirjallisuutta. Pyrimme pitämään tekstin asiasisällön samana tekemällä käännöstyöt parhaan taitomme mukaan. Histologia on tieteenalana vanha ja tieto on pysynyt muuttumattomana. Uutta lähdemateriaalia ei juurikaan ollut käytettävissä, joten käytimme työssä myös luotettavia vanhoja lähteitä. Tieteellinen kirjoittaminen ja kriittinen tiedonhaku kehittyivät työssä valtavasti, mutta yllättivät haasteellisuudellaan ja hitaudellaan. Joinakin päivinä saimme työstettyä tekstiä kahdeksassa tunnissa vain muutaman rivin.

Opinnäytetyöprosessilla oli monella tapaa merkitystä meille. Se lisäsi tietoa ja ymmärrystä patologian laboratorion työtehtävistä ja histologisesta HE-värjäyksestä syventäen samalla ammatillista osaamista ja ajattelua. Näitä kaikkia asioita voidaan tulevaisuudessa hyödyntää työelämässä. Monien ihmisten aikataulujen sovittaminen yhteen ja töiden tärkeysjärjestyksessä tekeminen kehitti myös organisointikykyä. Ryhmätyötaidot lisääntyivät erilaisia vahvuuksia yhdistellessä sekä huomioidessa kaikkien mielipiteitä ja näkemyksiä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa HE-värjäyksen laatua HUS Diagnostiikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa. Värjäsimme kahdeksalla eri värjäysohjelmalla kudokset, joiden värjäytyvyyttä olimme pyytäneet kolmen patologin vertaamaan rutiinivärjäyksellä värjättyihin kudoksiin. Rutiinivärjäys toimi työssämme kontrollina. Keräsimme arviointilomakkeilla tietoa kudosten värjäytyvyyksistä ja teimme niistä tulosityhteenvedon. Annoimme toimeksiantajalle lyhyen tulosityhteenvedon heidän pyynnöstään jo huhtikuussa 2020.

Tutkimuskysymykset olivat:

- Miten uudet, hieman muokatut värjäysohjelmat soveltuvat kudosten värjäykseen rutiinivärjäykseen verrattuna?
- Miten Mayerin hematoksyliinin diffaus etanolisuolahapolla (EtHCl) vaikuttaa värjäyksen laatuun?

Johtopäätöksenä tutkimustuloksista voidaan todeta, että muokattu värjäysohjelma 1. oli kokonaistuloksissa paras värjäysohjelma ja Mayerin hematoksyliinin diffauksella ei ollut värjäyksen laatua parantavaa vaikutusta. Värjäysohjelma 1. värjäsi puolet tutkimuksessa käytettävistä koekudoksista paremmin kuin toiseksi tullut rutiinivärjäys. Kudoksista ihon ja suolen värjäytyvyytuloksilla ei ollut eroa, mutta tonsilla ja kohtu saivat paremman keskiarvoon perustuvan tuloksen värjäysohjelmalla 1. Tonsillan ja kohdun värjäytyvydet olivat tulosten mukaan tässä työssä ratkaisevat tekijät. Tonsillan voimakas värjäytyminen asettaa vaatimuksia värjäysohjelmalle. Tonsilla sisältää runsaasti pieniä lymfosyyttejä, jotka värjäytyvät siniseksi ja tekevät näytelasista helposti liian tumman. Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa HE-värjäyksen laatua, joka parani muokatulla värjäysohjelmalla 1. Opinnäytetyöllä oli iso merkitys työn toimeksiantajalle ja tulee helpottamaan patologin työtä ja diagnoosin tekoa. Uusi värjäysohjelma 1. otettiin HUS diagnostikkakeskus, Etelä-Karjalan patologian laboratoriossa käyttöön ja verifioitiin huhtikuussa 2020. Voimme todeta opinnäytetyön tavoitteen toteutuneen.

HE-värjäyksessä käytetyn eosinin pH:n vaihtelun oli arvioitu olevan yksi värjäyksen laatuun vaikuttava tekijä, eikä sen säätäminen työviikon aikana ole työmäärään nähden järkevä vaihtoehto. Tässä työssä emme tutkineet eosinin pH:n vaihtelua. Mikäli uuden värjäysohjelman verifiointin jälkeen havaitaan vielä vaihtelua eosinin pH:ssa, sen merkitystä värjäystulokseen voitaisiin selvittää jatkotutkimuksen avulla. Toisena jatkotutkimuksen aiheena voisi selvittää uuden värjäysohjelman toimivuutta eri kudoksilla.

LÄHTEET

- Bancroft, John D. & Layton, C. 2013. The hematoxylin and eosin. Teoksessa Suvarna, K., Layton, C. & Bancroft, J. (toim.) Bancroft`s theory and practice of histological techniques. 7.painos. Churchill Livingstone: Elsevier.
- Brown, S. 2012. The Science and Application of Hematoxylin and Eosin Staining. Verkkomateriaali. Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center Northwestern University, 31. <https://mhpl.facilities.northwestern.edu/files/2013/10/The-Science-and-Application-of-Hematoxylin-and-Eosin-Staining-6-5-2012.pdf>. Viitattu 24.4.2019.
- Fimea 2015. Miksi auditoidaan? Verkojulkaisu. Fimea.fi. Päivitetty 28.8.2015. https://www.fimea.fi/documents/160140/765540/29223_2015-05-28_Auditoinnit_Puranen.pdf. Viitattu 8.9.2020.
- Finas 2015. Akkreditointi. Verkojulkaisu. Finas.fi. Päivitetty 27.10.2016. <https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>. Viitattu 8.9.2020.
- Gill, Gary W. 2010. H&E Staining. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology. Education Guide. Special stains and H & E. 2. painos. Verkkodokumentti. https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_eduguide.pdf. Viitattu 15.9.2020.
- Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.
- Henwood, Anthony 2010. Microscopic Quality Control of Hematoxylin and Eosin – Know your Histology. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology. Education Guide. Special stains and H & E. 2. painos. Verkkodokumentti. https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_eduguide.pdf. Viitattu 30.9.2020.
- Hirsjärvi, Sirkka, Remes, Pirkko & Sajavaara, Paula 2018. Tutki ja kirjoita. 22. painos. Helsinki: Tammi.
- Hopwood, David 1996. Fixation and fixatives. Teoksessa Bancroft, J. & Stevens A. (toim.) Theory and practice of histological techniques. 4.painos. Churchill Livingstone: Pearson Professional Limited.
- Horobin, Richard W. 2008. How do histological stains work? Teoksessa Bancroft, J. & Gamble, M. (toim.) Theory and practice of histological techniques. 6.painos. Churchill Livingstone: Elsevier.
- Horobin, Richard W. & Bancroft, John 1998. Troubleshooting histology stains. Churchill Livingstone: Pearson Professional Limited.
- HUS 2020. Potilashoito ja potilasturvallisuus. Verkojulkaisu. Hus.fi. Päivitetty 15.5.2020. <https://www.hus.fi/tietoa-meista/potilashoito-ja-potilasturvallisuus/hus-diagnostiikkakeskus>. Viitattu 7.9.2020.
- HUS Diagnostiikkakeskus, Patologia, Etelä-Karjala. 2020. Työohje, HE-värjäys. Viitattu 7.10.2020.
- Immuno Diagnostic Oy 2020. Histologian ja sytologian laitteet. Esite. <https://www.immunodiagnostic.fi/kliininen-diagnostiikka/patologia/histologian-ja-sytologian-laitteet>. Viitattu 28.9.2020.
- Kananen, Jorma 2015. Opinnäytetyön kirjoittajan opas. Näin kirjoitan opinnäytetyön tai pro gradun alusta loppuun. E-kirja. Boogi.fi. <https://www-booky-fi.ezproxy.savonia.fi/lainaa/1194>. Viitattu 14.9.2020.
- Kauria, Minna & Suhonen, Jaana 2020. Yläkuvassa iho rutiinivärjäyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa iho värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. Valokuva. 3.3.2020. Lappeenranta.

- Kauria, Minna & Suhonen, Jaana 2020. Yläkuvassa suoli rutiinivärjäyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa suoli värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. Valokuva. 3.3.2020. Lappeenranta.
- Kauria, Minna & Suhonen, Jaana 2020. Yläkuvassa tonsilla rutiinivärjäyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa tonsilla värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. Valokuva. 3.3.2020. Lappeenranta.
- Kauria, Minna & Suhonen, Jaana 2020. Yläkuvassa kohtu rutiinivärjäyksellä 40x suurennoksella. Alakuvassa kohtu värjäysohjelmalla 1. 40x suurennoksella. Valokuva. 3.3.2020. Lappeenranta.
- Kivi, Niina 2017. Modernia patologiaa ja uusia diagnostisia menetelmiä. Moodi, Labquality Oy:n asiakaslehti -verkkolehti 3 (7). digiplus.fi/www/moodi/2017_03/page_7.html. Viitattu 7.9.2020.
- Laamanen, Minna & Ruotsalainen, Pauliina 2018. Mayerin ja Colen hematoksyliinien vertailu hematoksyliini-eosiivärjäyksessä. Opinnäytetyö. Bioanalyytikan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2018111517211> Viitattu 11.9.2020.
- Labquality 2020. ISO-standardien mukaiset sertifiointit. Verkkojulkaisu. Labquality.fi. Päivitetty 2020. <https://www.labquality.fi/auditointi-ja-sertifiointi/iso-standardien-mukaiset-auditoinnit/>. Viitattu 7.9.2020.
- Labquality 2020. Sisäinen laadunvarmistus. Verkkojulkaisu. Labquality.fi. Päivitetty 2020. <https://www.labquality.fi/sisaiset-kontrollit/laboratorioiden-sisainen-laadunvarmistus/>. Viitattu 7.9.2020.
- Labquality 2020. Ulkoinen laadunarviointi laboratorioille ja vieritestaukseen. Verkkojulkaisu. Labquality.fi. Päivitetty 2020. <https://www.labquality.fi/laadunarviointi/>. Viitattu 8.9.2020.
- Labquality 2020. Validointi ja verifiointi. Verkkojulkaisu. Labquality.fi. Päivitetty 2020. https://www.labquality.fi/vieritestisuositus/luotettava_vieritesti/validointi_verifiointi/. Viitattu 8.9.2020.
- Labqualitydays 2018. Laatuongelmien tunnistusseminaari. e-posteri. Labquality.fi. https://www.labqualitydays.fi/wp-content/uploads/sites/2/2018/01/LQD18_Abstrakti_Aho_Lintunen.pdf. Viitattu 29.9.2020.
- Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488, § 2. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1999/19990488>. Viitattu 24.9.2019.
- Mediq Suomi Oy 2020. Reagenan värjäysreagenssit ja puskurit patologiaan. Tuoteluettelo. <http://tuoteluettelo.mediq.fi/liitteet/d387624/>. Viitattu 17.9.2020.
- Mills, C. 2017. Six Steps of Processing a Biopsy in the Histology Lab. Verkkodokumentti. Owlcation. <https://owlcation.com/stem/What-Happened-to-That-Biopsy-the-Doctor-Took-From-Me>. Viitattu 22.4.2019.
- Mäkinen, M. 2012. Diagnostiset menetelmät. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Mäkinen, M. 2012. Kudosnäytteiden eri tyypit. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Mäkinen, M. 2012. Lukijalle. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. Verkkokirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 5. <https://www.oppiportti.fi/op/pat00883/do>. Viitattu 23.9.2019.

- Mäkinen, M. 2012. Yleisimpien näytteiden käsittelyyn liittyviä ohjeita. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Nation, Brian & Orchard, Guy 2012. Histopathology. Verkkokirja. Oxford: OUP Oxford.
<http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzY3ODA5OF9fQU41?sid=b44492f2-e6a8-4207-9c64-e308eede4fb1@pd>. Viitattu 24.9.2019.
- Nousiainen, Sonja & Tynjälä, Jenni. 2013. Pas-värjäykset histologiassa -artefaktat ja optimointi. Tampereen ammattikorkeakoulu. Bioanalyytikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.
<http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2013112417951> Viitattu 11.9.2020.
- Panula, Pertti 2013. Histokemia ja histologinen valmiste. Verkkodokumentti. Biotekniikan laitos.
<https://docplayer.fi/63056943-Histokemia-ja-histologinen-valmiste-pertti-panula-biolaaketieteen-laitos-2013.html>. Viitattu 10.9.2020.
- Pro pilvipalvelut julkaisuaika tuntematon. Laatukäsikirja. Verkkojulkaisu. <https://www.laatuksikirja.fi/>. Viitattu 8.9.2020.
- Reagena Oy 2011. Visible difference. Verkkoaineisto. Reagena. <https://www.reagena.com/fi/tuotteet/diagnostiikka/varjaysliuokset/patologia/#HE>. Viitattu 22.4.2019.
- Solunetti 2006. Värjäysmenetelmät. Verkkoaineisto. Solunetti.fi. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/varjaysmenetelmat/2/>. Viitattu 11.11.2019.
- Spencer, Lena T. & Bancroft John.D. 2008. Microtomy: Paraffin and frozen. Teoksessa Bancroft, J. & Gamble, M. (toim.) Theory and practice of histological techniques. 6.painos. Churchill Livingstone: Elsevier.
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalytikko/bioanalytikon-koulutus/erikoisalat/kliininen-histologia-ja-sytologi/>. Viitattu 23.9.2019.
- Tietosuoja laki 5.12.2018/1050, § 2. <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2018/20181050>. Viitattu 24.9.2019.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta ETENE 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf. Viitattu 24.9.2019.
- VTT Technology 276 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkojulkaisu.
<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>. Viitattu 8.9.2020.
- Wilson, Ian & Gamble, Marilyn 2002. The hematoxylin and eosin. Teoksessa Bancroft, J. & Gamble, M. (toim.) Theory and practice of histological techniques. 5.painos. Churchill Livingstone: Harcourt Publishers Limited.

LIITE 1: VÄRJÄYSOHJELMAT SALATTU

LIITE 3. TUTKIMUSLUPA



Päätös

1 (3)

Etelä-Karjalan sosiaali- ja
terveyspiiri

26.11.2019
EKS/3780/13.01.05/2019

§ 2 / 2019

Tutkimuslupahakemus: HE-värjäyksen optimointi/Kauria Minna, Suhonen
Jaana

Hakija/Vireillepanija

Kauria Minna, Suhonen Jaana

Päätös

Myönnän tutkimusluvan HE-värjäyksen optimointi -tutkimukselle.
Voimassaolo 1.12.2019 - 31.12.2020

Muutoksenhaku

Tähän päätökseen voi hakea muutosta.Oikaisuvaatimusohje sisältyy
päätökseen.

 A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Arja Nenonen".

Nenonen Arja
Ylikemisti

Tiedoksianto

Kauria Minna
Suhonen Jaana
Risto Suomalainen
Hanna Turunen