



MANUAALISESTI JA AUTOMAATTISESTI TEHTYJEN PERIFEERISEN VEREN SIVELYVALMISTEIDEN VERTAILU

Menetelmävertailu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen
kemian toimintayksikölle

Maria Hemminki

Tiina Peltari

Opinnäytetyö
Syyskuu 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU

Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
K08MBIOAN

HEMMINKI, MARIA & PELTTARI, TIINA: Manuaalisesti ja automaattisesti tehtyjen perifeerisen veren sivelyvalmisteiden vertailu. Menetelmävertailu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikölle.

Opinnäytetyö 104 s., liitteet 17 s.
Syyskuu 2011

Perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu on yksi hematologian perustutkimuksista. Mikroskooppiseen tarkasteluun kuuluu leukosyyttien erittelylaskenta sekä leukosyyttien, erytrosyyttien ja trombosyyttien morfologian ja määrän arviointi. Mikroskooppisen tarkastelun luotettavuuden edellytyksenä on laadukas sivelyvalmiste.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla manuaalisella ja automaattisella menetelmällä tehtyjä perifeerisen veren sivelyvalmisteita. Manuaalisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedettiin käsin ja värjättiin Mirastainer® II –automaatilla. Automaattisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedettiin ja värjättiin Sysmex SP-1000i™ -automaatilla. Opinnäytetyön tehtävänä oli selvittää, kummalla menetelmällä saadaan aikaan laadukkaammat sivelyvalmisteet. Tavoitteena oli parantaa perifeerisen veren sivelyvalmisteen laatua, jotta potilastulokset ovat mahdollisimman luotettavia sekä tehostaa sivelyvalmisteen tekoa ja vähentää verensivelyvalmisteen tekoon liittyviä kustannuksia. Opinnäytetyön aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksiköstä.

Opinnäytetyössä käytettiin kokeellista, vertailevaa tutkimusmenetelmää. Tutkimusaineisto koostui 48 näytteestä (N=48), joista tehtiin sivelyvalmisteet kahdella eri menetelmällä. Sivelyvalmisteita tarkasteltiin sekä makroskooppisesti että mikroskooppisesti. Sivelyvalmisteiden tarkastelun avuksi laadittiin havainnointilomake. Saadut tulokset analysoitiin tilasto-ohjelmilla ja niitä havainnollistettiin graafisten kuvioiden sekä regressiosuorien ja korrelaatiokertoimien avulla.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, ettei sivelyvalmisteiden laadussa ole suurta eroa eri menetelmien välillä. Makroskooppisen tarkastelun perusteella Sysmex SP-1000i™ -automaatilla tehdyt sivelyvalmisteet ovat laadukkaampia kuin käsin vedetyt ja Mirastainer® II –automaatilla värjätty sivelyvalmisteet. Mikroskooppisen tarkastelun perusteella eri menetelmillä tehdyt sivelyvalmisteet ovat yhtä laadukkaita.

Asiasanat: perifeerinen veri, laadukas sivelyvalmiste, May-Grünwald-Giemsa, Mirastainer® II, Sysmex SP-1000i™.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

HEMMINKI, MARIA & PELTTARI, TIINA: Comparison of Manual and Automatic Peripheral Blood Smears. Comparison of Different Techniques to Department of Clinical Chemistry at Seinäjoki Central Hospital.

Bachelor's thesis 104 pages, appendices 17 pages
September 2011

One of the basic examinations in hematology is a microscopic analysis of peripheral blood smear. That contains leukocytes differential, assessment of leukocytes, platelets and erythrocytes morphology and count. High-quality blood smear is a precondition for a reliable microscopic examination. The subject of this thesis has been obtained from the Department of Clinical Chemistry at Seinäjoki Central Hospital.

The purpose of this thesis was to compare the quality of peripheral blood smears performed by using two different techniques. The objective of this thesis was to improve the quality of the peripheral blood smears and to improve the process of making blood smears. In the manual technique blood smears were prepared by hand and were stained by Mirastainer® II. In the automatic technique blood smears were made and stained by using Sysmex SP-1000i™. This thesis was empirical and comparative in nature. The study included 48 blood samples, of which blood smears were prepared by using two different techniques. The data were analyzed both macroscopically and microscopically.

These results suggest that the quality of blood smears is better by using Sysmex SP-1000i™ in the macroscopic examination. The quality of blood smears is equally good between different techniques in the microscopic examination. Overall, our study suggests that the quality of blood smears does not vary much between the different techniques.

Keywords: peripheral blood, high-quality blood smear, May-Grünwald-Giemsa, Mirastainer® II, Sysmex SP-1000i™.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	6
2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TEHTÄVÄ JA TAVOITE	8
3 PERIFEERISEN VEREN SIVELYVALMISTE	9
3.1 Tutkimusindikaatiot.....	9
3.2 Näyte	10
3.3 Sivelyvalmisteen teko manuaalisesti	11
3.4 May-Grünwald-Giemsa-värjäys	13
3.4.1 Värjäyksen suoritus.....	14
3.4.2 Päälystäminen	15
3.4.3 Värjäyksen virhelähteitä.....	15
4 MIRASTAINER® II- VÄRJÄYSAUTOMAATTI	17
5 SYSMEX SP-1000I™ - VETO- JA VÄRJÄYSAUTOMAATTI.....	20
6 VERISOLUJEN RAKENNE JA VÄRJÄYTYMINEN.....	23
6.1 Erytrosyytit.....	23
6.2 Leukosyytit	24
6.2.1 Granulosyytit.....	25
6.2.2 Lymfosyytit.....	28
6.2.3 Monosyytit.....	29
6.3 Trombosyytit.....	30
7 SIVELYVALMISTEEN TARKASTELU	32
7.1 Makroskooppinen tarkastelu.....	32
7.2 Mikroskooppinen tarkastelu.....	32
7.2.1 Erytrosyyttien mikroskooppinen tarkastelu.....	34
7.2.2 Leukosyyttien erittelylaskenta ja morfologinen arviointi	37
7.2.3 Trombosyyttien mikroskooppinen tarkastelu.....	39
8 MILLOIN ON AIHEELLISTA TEHDÄ SIVELYVALMISTE?	40
9 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	41
10 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	43
10.1 Kokeellinen tutkimus	43
10.2 Otos.....	44
10.3 Havainnointilomake	45
10.4 Tulosten analysointi.....	46
10.5 Luotettavuus.....	48
11 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN.....	50
11.1 Havainnointilomakkeen laadinta.....	50

11.2 Tutkimusaineiston hankinta	51
11.2.1 Tutkimusnäytteiden valinta	51
11.2.2 Sivelyvalmisteiden teko ja identifiointi	52
11.2.3 Sivelyvalmisteiden tarkastelu ja tulosten kirjaaminen	53
11.3 Tutkimusaineiston kuvailu, käsittely ja analysointi.....	54
12 TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	55
12.1 Sivelyvalmisteiden makroskooppinen tarkastelu	55
12.2 Sivelyvalmisteiden mikroskooppinen tarkastelu	58
12.2.1 Leukosyyttien erittelylaskenta	58
12.2.2 Leukosyyttien morfologia	63
12.2.3 Trombosyyttien määrä ja morfologia.....	66
12.2.4 Erytrosyyttien morfologia	68
12.3 Johtopäätökset	73
13 POHDINTA	74
13.1 Opinnäytetyöprosessin tarkastelu	75
13.2 Yhteenveto tutkimustuloksista	76
13.3 Työn luotettavuuden arviointi ja eettisyys.....	78
13.4 Jatkotutkimusehdotukset.....	80
LÄHTEET.....	81
LIITTEET	85

1 JOHDANTO

Verenkuva on yksi yleisemmin pyydetyistä laboratoriotutkimuksista. Nykypäivän kehittyneimmät verenkuva-analysaattorit tuottavat jopa yli 20 erilaista verisolujen määriin ja ominaisuuksiin liittyvää suuretta, kuten valkosolujen erittelyjakauman. Verenkuva-analysaattorit kykenevät hyvin laskemaan normaalin tai lähes normaalin erittelyjakauman, mutta valkosolujen varhaismuotojen ja solumorfologiapoikkeavuuksien kohdalla solujen tunnistaminen on heikkoa. (Savolainen 2007, 88–92.) Mikäli poikkeavia soluja esiintyy yli asetettujen rajojen, antaa automaatti hälytyksen, joka johtaa näytteen mikroskooppiseen tarkasteluun. Mikroskooppiseen tarkasteluun menee noin 5-20 prosenttia näytteistä. (Matinlauri & Vilpo 2010, 250–251.)

Perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu on yksi hematologian perustutkimuksista. Mikroskooppiseen tarkasteluun kuuluu leukosyyttien erittelylaskenta sekä leukosyyttien, erytrosyyttien ja trombosyyttien morfologian ja määrän arviointi. Mikroskooppisen tarkastelun luotettavuuden edellytyksenä on laadukas sivelyvalmiste sekä mikroskopijan ammattitaito. Sivelyvalmisteen laatuun vaikuttavat näytteenoton onnistuminen sekä sivelyvalmisteen teko. Luotettavan tuloksen saamiseksi sivelyvalmisteen valmistusmenetelmä tulisi vakioida mahdollisimman hyvin. Perinteisen manuaalisen sivelyvalmisteen valmistuksen rinnalle on noussut automaattilla tehdyt sivelyvalmisteet. (Pelliniemi 1998, 1181; Savolainen 2007, 91–92; Matinlauri & Vilpo 2010, 250–251.)

Veren sivelyvalmisteet värjätään Romanowsky:n värjäykseen kuuluvalla May-Grünwald-Giemsan (MGG) –värjäyksellä. Värjäys perustuu solujen sytokemiallisiin ominaisuuksiin, jolloin solujen eri osat värjäytyvät eri sävyillä riippuen niiden pH:sta. (Bain & Lewis 2006, 61-62; Mahlamäki 2004, 276–277.) Mirastainer® II on sivelyvalmisteen värjäysautomaatti, jolla voidaan värjätä valmiiksi vedetyt sivelyvalmisteet. Automaatti pystyy värjäämään kerralla 30 valmistetta ja siihen on mahdollista ohjelmoida yhdeksän eri värjäysvaihtoehtoa. (VWR International.) Sysmex SP-1000i™ on täysin automatisoitu sivelyvalmisteiden teko- ja

värjäysautomaatti, joka valmistaa sivelyvalmisteiden aina näytteen aspiroinnista valmiiksi värjätyksi lasiksi asti. Automaatti määrittää näytteen hematokriitin perusteella pisaran koon, vetokulman sekä vetonopeuden. (Sysmex Corporation 2007; Sysmex Europe GMBH 2007.)

Opinnäytetyön aihe saatiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön ylikemisti Kari Åkermanilta syksyllä 2010. Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa siirryttiin huhtikuussa 2011 manuaalisesta sivelyvalmisteiden teosta automaattiseen menetelmään. Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla manuaalisella ja automaattisella menetelmällä tehtyjä perifeerisen veren sivelyvalmisteita. Tavoitteena on parantaa perifeerisen veren sivelyvalmisteiden laatua, jotta potilastulokset ovat mahdollisimman luotettavia sekä tehostaa sivelyvalmisteiden tekoa ja vähentää verensivelyvalmisteiden tekoon liittyviä kustannuksia. Opinnäytetyön tehtävänä on selvittää, kummalla menetelmällä saadaan aikaan laadukkaammat sivelyvalmisteet. Menetelmävertailussa käytetään kokeellista, vertailevaa tutkimusmenetelmää.

Opinnäytetyön teoriaosuuden alussa käsitellään perifeerisen veren sivelyvalmistetta, sen tutkimusindikaatioita ja tekoa sekä MGG-värjäystä. Tämän jälkeen käsitellään Mirastainer® II ja Sysmex SP-1000i™ -automaatteja ja niiden toimintaperiaatteita, verisolujen värjäytyvyyttä ja sivelyvalmisteiden tarkastelun suorittamista. Tutkimusmenetelmä ja tutkimuksen suoritus on esitetty pääpiirteittäin. Tulososiossa saatuja tuloksia havainnollistetaan graafisten kuvioiden sekä regressiosuorien ja korrelaatiokertoimien avulla. Opinnäytetyö on suunnattu Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion henkilökunnalle sekä muille sivelyvalmisteiden menetelmävertailusta kiinnostuneille, joilla on hematologian perustietämystä. Tässä opinnäytetyössä sivelyvalmisteella tarkoitetaan perifeerisen veren sivelyvalmistetta, ellei toisin mainita.

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TEHTÄVÄ JA TAVOITE

Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa tehtiin vuonna 2010 noin 118000 perusverenkuvatutkimusta ja noin 17000 leukosyytien erittelylaskentaa verenkuvaa-analysaattoreilla. Mikroskooppiseen tarkasteluun meni noin 3700 näytettä eli 18 prosenttia verenkuvaa-analysaattoreilla tehdyistä leukosyytien erittelylaskennoista. (Tuomi 2011a.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla manuaalisella ja automaattisella menetelmällä tehtyjä perifeerisen veren sivelyvalmisteita. Manuaalisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedetään käsin ja värjätään Mirastainer® II –automaatilla ja automaattisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedetään ja värjätään Sysmex SP-1000i™ -automaatilla. Tavoitteena on parantaa perifeerisen veren sivelyvalmisteen laatua, jotta potilastulokset ovat mahdollisimman luotettavia sekä tehostaa sivelyvalmisteen tekoa ja vähentää veren sivelyvalmisteen tekoon liittyviä kustannuksia. Ominia tavoitteina meillä on kehittää tietämystä laadukkaasta sivelyvalmisteesta ja oppia soveltamaan tietoa käytäntöön sekä kehittyä perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppisessa tarkastelussa.

Opinnäytetyön tehtävänä on selvittää:

1. Millainen on laadukas perifeerisen veren sivelyvalmiste?
2. Mitkä ovat Mirastainer® II –automaatin toimintaperiaatteet?
3. Mitkä ovat Sysmex SP-1000i™ –automaatin toimintaperiaatteet?
4. Saadaanko manuaalisella vai automaattisella menetelmällä aikaan laadukkaammat perifeerisen veren sivelyvalmisteet?

3 PERIFEERISEN VEREN SIVELYVALMISTE

Perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppinen tarkastelu on yksi hematologian perusmenetelmistä. Mikroskooppisessa tarkastelussa leukosyyttien erittelylaskennan ja morfologian lisäksi arvioidaan punasolumorfologiaa sekä trombosyyttejä. Verenkuva-analysaattorit jaottelevat fysikaalisten ja sytokemiallisten ominaisuuksien perusteella leukosyytit eri luokkiin. Analysaattorista riippuen luokkia on joko kolme: granulotsyytit, lymfotsyytit ja muut tumalliset solut tai viisi: lymfotsyytit, neutrofiiliset, basofiiliset, ja eosinofiiliset granulotsyytit sekä monotsyytit. Verenkuva-analysaattorit kykenevät hyvin laskemaan normaalit tai lähes normaalit solut, mutta leukosyyttien varhaismuotojen ja morfologialtaan poikkeavien solujen laskentaan soluautomaatti ei sovellu. Noin 5-20 prosenttia näytteistä menee mikroskooppiseen tarkasteluun. Solujen mikroskooppisen tarkastelun ongelmana on pienestä solujen lasketusta määrästä ja vakioinnin vaikeudesta johtuva tulosten huono toistettavuus. Lisäksi ongelmana on sivelyvalmisteiden tekoon ja mikroskooppiseen tarkasteluun kuluva aika sekä menetelmän työläys. (Pelliniemi 1998, 1181; Savolainen 2007, 91–92; Matinlauri & Vilpo 2010, 250–251.)

Sivelyvalmiste voidaan tehdä laboratoriosta riippuen eri menetelmillä. Se voidaan valmistaa manuaalisesti levittämällä ja vetämällä pisara aluslasille tai peitinlasitekniikalla. (Perkins 2004, 12–13.) Suomessa peitinlasitekniikka ei ole yleisessä käytössä (Siitonen & Jansson 2007, 100). Sivelyvalmiste voidaan tehdä myös automaatiota hyödyntämällä joko sentrifugoimalla tai mekaanisesti levittämällä tutkittava näyte lasille (Perkins 2004, 13).

3.1 Tutkimusindikaatiot

Perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppisella tarkastelulla on tärkeä merkitys eri tautien diagnosoinnissa ja tarvittavien jatkotutkimusten määräämisessä. Se nopeuttaa huomattavasti joidenkin tautien diagnosointia ja auttaa eri tautien seurannassa. Veren sivelyvalmisteen mikroskooppista tarkastelua käytetään

tetään apuna muun muassa selvittämään muutoksia solujen määrissä ja morfologiassa. Veren sivelyvalmistetta tutkitaan infektio- ja loistautien diagnostiikassa, hematologisten maligniteettien selvittelyssä, poissuljennassa ja erotusdiagnoosiikassa sekä näiden tautien seurannassa ja hoitovasteen arvioinnissa. Tutkimusta käytetään myös anemioiden etiologian selvittelyyn ja hoidon tehon seurantaan sekä trombosyyttien määrän, koon ja ryhmittymisen arviointiin. (Peliniemi 1998, 1177–1184; Burns 2004a, 143; Bain 2005, 498–499; Leukosyytit, erittelylaskenta 2010.)

3.2 Näyte

Näyte sivelyvalmistetta varten voidaan ottaa joko laskimosta, yleisimmin kyynärtaipeesta tai ihopistoverenä sormenpäältä, korvalehdestä tai vastasyntyneiltä kantapäältä. Näytteen tulisi valua putkeen ongelmitta, muttei kuitenkaan liian kovalla paineella, jotta vältetään erytrosyyttien hemolysoitumiselta. Tämä edellyttää sen, että neula on ollut oikean kokoinen ja kunnolla suonessa eikä esimerkiksi kiinni suonen seinämässä. (Mullins 2007, 24, 26.)

Laskimoverinäyte otetaan putkeen, joka sisältää antikoagulanttia. Veren sivelyvalmisteen tekoon sopivin antikoagulantti on EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), koska se säilyttää hyvin solujen morfologian ja vaikuttaa fysikaalisesti vähiten soluihin. (Perkins 2004, 4; Maedel & Doig 2007, 176.) Yleensä käytetään EDTA:n dinatrium-, dikalium- (K2) tai trikaliumpuolijoja (K3). Etyleenidiamiinitetraetikkahapon vaikutus veren hyytymisen estossa perustuu sen kykyyn sitoa hyytymiselle välttämätöntä kalsiumia veressä. Ihanteellinen EDTA:n pitoisuus on 1,5 mg/ml. (Burns 2004b, 124–125; Maedel & Doig 2007, 176.) Näytteen oikean EDTA pitoisuuden ja sen tasaisen jakautumisen varmistamiseksi tulee erityisesti kiinnittää huomiota näyteputken täyttymiseen ja sekoittamiseen. Tällä on merkitystä myös solujen säilyvyyteen. Suositus näyteputken täyttöasteesta on +/- 20 prosenttia ihanteellisesta täyttötilavuudesta. Liian korkea EDTA pitoisuus voi aiheuttaa erytrosyyttien kutistumista sekä trombosyyttien turpoamista ja pilkkoutumista. Liian matala EDTA pitoisuus puolestaan voi aiheuttaa mikrohyytymien muodostumisen näytteeseen. (Mahlamäki 2004, 268–269.) Ety-

leenidiamiinitetraetikkahappo voi olla putkessa nestemäisenä tai kuivamuodossa. Mikäli antikoagulantti on nestemäisessä muodossa, tulee tuloksia arvioitaessa ottaa huomioon sen aiheuttama näytteen laimeneminen. (Savolainen 2007, 85–87.) Suomessa on yleisesti käytössä kuivamuotoinen K2 EDTA.

Joillakin potilailla EDTA antikoagulanttina aiheuttaa trombosyyttien satellitismia, jolloin trombosyytit kerääntyvät ja tarttuvat neutrofiilien ympärille, sekä trombosyyttien aggregoitumista eli kasautumista. Ilmiö tunnetaan myös nimellä pseudotrombosytopenia. Trombosyyttien satellitismia ja aggregoitumista voidaan epäillä, jos verenkuvaa-analysointilaitteella saadaan virheellisen matalia trombosyyttiarvoja. Pseudotrombosytopeniasta kärsivillä potilailla kyseinen ilmiö voidaan välttää ottamalla näyte uudelleen natriumsitraattiputkeen. Trombosyyttien aggregoitumista voivat aiheuttaa myös näytteen seisotus ennen sivelyvalmisteen tekoa sekä sivelyvalmisteen teko ihopistoverestä. (Bain 2006a, 8; Maedel & Doig 2007, 176; Savolainen 2007, 86.)

Sivelyvalmiste tulisi tehdä mahdollisimman tuoreesta näytteestä. Näytettä saisi säilyttää korkeintaan kolme tuntia huoneenlämmössä näytteenoton jälkeen, sillä tämän jälkeen tehtävissä sivelyvalmisteissa ilmenee usein artefaktoja. Yli viiden tunnin säilytys huoneenlämmössä aiheuttaa muun muassa erytrosyyttien morfologian muuttumista sferosyyttimäisiksi ja burr-soluiksi, leukosyyttien sytoplasman vakuolisoitumista, neutrofiilien degranuloitumista sekä tumarakenteiden hajoamista, mikä lopulta johtaa koko solun hajoamiseen. (Burns 2004b, 125; Maedel & Doig 2007, 176; Siitonen & Jansson 2007, 101.) Liian pitkän säilytyksen seurauksena myös trombosyyteissä tapahtuu muutoksia. Ne muun muassa turpoavat, menettävät granuloinnin sekä voivat aggregoitua. (Siitonen & Jansson 2007, 101.)

3.3 Sivelyvalmisteen teko manuaalisesti

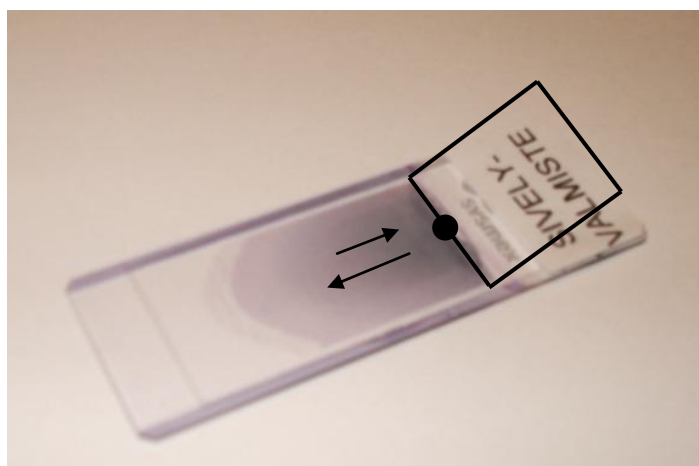
Ennen sivelyvalmisteen tekoa EDTA-näyte sekoitetaan huolellisesti solusekoittajassa ja vielä juuri ennen sivelyvalmisteen tekoa kääntelemällä näyteputkea vähintään 10 kertaa ylösalaisin (Houwen 2000, 2). Objektilasien on oltava puh-

das, pölytön ja rasvaton. Rasvaisella objektilasilla solut kasaantuvat ja väri voi saostua. (Mahlamäki 2004, 276; Thelml, Diem & Haferlach 2004, 17.) Objektilasin tulee olla kooltaan 75 x 25 mm ja paksuudeltaan noin 1 mm (Bain & Lewis 2006, 60). Objektilasi ei saa olla myöskään liian huokoinen ettei taustavärjäytymisen lisäänty (Bain 2006a, 9). Myös vetolasin puhtaus on edellytys laadukkaalle sivelyvalmisteelle. Vetolasissa tulee olla ehyt hiottu reuna ja sen tulee olla objektilasia kapeampi. (Mahlamäki 2004, 276; Bain 2006a, 9.) Mikäli sivelyvalmisteeseen laitetaan peitinlasi, vetolasin on oltava myös sitä kapeampi, jotta peitinlasi peittää alleen koko sivellyn alueen (Bain 2006a, 9). Objektilasille laitettavan veren määrä on 5-10 µl (Mahlamäki 2004, 276–277).

Sively voidaan aloittaa objektilasin loppupäästä tai vaihtoehtoisesti objektilasin hiospäästä (Houwen 2000, 2). Suomessa sively aloitetaan yleensä hiospäästä. Veripisara tiputetaan objektilasille noin senttimetrin päähän hiospäästä. Veripisara on siveltävä välittömästi, muutoin monosyytit ja muut isot solut sijaitsevat sivelyn häntäpäässä epäsuhtaisesti. Vetolasin reuna lasketaan objektilasille veripisaran eteen, josta se vedetään pisaraan 30–45 asteen kulmassa. Pisaran levittyä koko vetolasin reunan leveydelle, vetolasia työnnetään kevyesti objektilasin toista päätä kohti. (Mahlamäki 2004, 276–277; Thelml ym. 2004, 17; Bain 2006a, 9.) Veripisaran ollessa oikean kokoinen tulee sivelestä noin 3 cm:n pituinen. Sivelyn tulee loppua noin senttimetri ennen objektilasin päätyä. (Bain & Lewis 2006, 60.) Valmiin sivelyvalmisteen reunan on oltava sulkamaisen pyöreä (Thelml ym. 2004, 17). Sivelyvalmisteen tulee ohentua loppupäätä kohti tasaisesti, eikä sivelyvalmisteesä saa olla reikiä, aaltoja tai viiruja. Solujen tulee olla tasaisesti jakautuneena koko lasilla. (Walters, Estridge & Reynolds 1990, 157–158.)

Vetokulmaa ja vetonopeutta muuttamalla voidaan vaikuttaa sivelyn pituuteen ja paksuuteen. Vetokulman ollessa suurempi ja vetonopeuden nopeampi tulee sivelestä lyhyempi ja paksumpi, kun taas vetokulman ollessa pienempi ja vetonopeuden hitaampi tulee sivelestä pidempi ja ohuempi. Hematokriitin ja hemoglobiinin ollessa korkeat, jolloin veri on niin sanotusti paksua, tulee vetokulmaa pienentää ja niiden ollessa matalat, tulee vetokulmaa vastaavasti suurentaa oikean pituisen sivelyn aikaansaamiseksi. (Thelml ym. 2004, 17; Bain 2006a, 9;

Bain & Lewis 2006, 60.) Vetolasi on puhdistettava huolellisesti joka näytteen jälkeen, jottei patologisia soluja siirry näytteestä toiseen vetolasin mukana (Bain 2006a, 9; Bain & Lewis 2006, 60). Sivelyvalmiste ilmakuivataan välittömästi joko kevyesti ilmassa heiluttelemalla tai puhaltimen alla, jotta solumorfologia säilyy hyvänä. Mikäli sivelyvalmiste kuivuu hitaasti, solut voivat kutistua, sytoplasma vakuolisoitua ja tumarakenne muuttua. Tämä vaikeuttaa niin normaalien kuin patologisten solujen tunnistusta. (Bain 2006a, 10.) Sivelyvalmisteita kannattaa tehdä yhdestä näytteestä aina useampi lasi. Näin säästytään uuden näytteen otolta, mikäli valmisteelle tapahtuu jotain tai tarvittavan informaation saamiseksi joudutaan mikroskopoimaan useampi lasi. Sivelyvalmisteeseen tulee merkitä huolellisesti tarvittavat tunnistetiedot joko lyijykynällä, värjäyksen kestäväällä tusilla tai tarralla. (Mellanuora 2008, 13.) Kuvassa 1 on esitetty sivelyvalmisteen tekoperiaate.



KUVA 1. Sivelyvalmisteen teko manuaalisesti (Kuva: Maria Hemminki 2011)

3.4 May-Grünwald-Giemsa-värjäys

Veren sivelyvalmisteet värjätään Romanowsky:n värjäykseen kuuluvalla May-Grünwald-Giemsa-tekniikalla. Värjäys perustuu solujen sytokemiallisiin ominaisuuksiin, jolloin solujen eri osat värjäytyvät eri sävyillä riippuen niiden pH:sta. Reagenssit erottelevat solujen rakenteita niiden happamuuden ja emäksisyyden perusteella. Suositeltavin pH-arvo on 6,8, sillä pH:n muuttuminen tästä emäksi-

seen tai happamaan suuntaan aiheuttaa värisävyjen muuttumisen toisten värien kustannuksella. May-Grünwald-reagenssit koostuvat metyleenisinestä ja eosiini Y:stä. Giemsa-reagenssissa on näiden lisäksi vielä atsuuri B:tä. Hapan eosiini värjää solujen emäksisiä osia, kuten punasolujen hemoglobiinia, punaiseksi. Solujen happamat rakenteet puolestaan värjäytyvät emäksisillä metyleenisinellä ja atsuuri B:llä. Näitä siniseksi värjäytyviä solurakenteita ovat esimerkiksi tuman nukleiinihapot, sytoplasman granulat sekä ikluusiokappaleet. (Bain & Lewis 2006, 61–62; Mahlamäki 2003, 276–277; Siitonen & Jansson 2007, 109.)

3.4.1 Värjäyksen suoritus

Laboratoriosta riippuen on käytössä kiinnitystavoiltaan, värilaimennoksiltaan, huuhteluiltaan sekä värjäysajoiltaan toisistaan eroavia MGG-värjäysohjeita. Joidenkin ohjeiden mukaan sivelyvalmisteet tulisi ensin kiinnittää metanolissa 10–20 minuutin ajan. Kiinnitystä ei kuitenkaan välttämättä tarvita, jos sivelyvalmisteet värjätään samana päivänä kun ne on vedetty. Tällöin kiinnittämättömät lasit värjätään käyttämällä laimentamatonta May-Grünwald-värjäysliuosta. Laimentamattoman May-Grünwald-värjäysliuoksen suuri metanolipitoisuus kiinnittää sivelyvalmisteen värjäyksen yhteydessä. Kiinnitettyjä laseja värjätään fosfaattipuskuroidulla vedellä suhteessa 1:1 laimennetussa May-Grünwald-värjäysliuoksessa 5-15 minuuttia. Tämän jälkeen lasit laitetaan 10–15 minuutiksi Giemsa-värjäysliuokseen. Liuos voidaan valmistaa esimerkiksi sekoittamalla yhdeksän osaa fosfaattipuskuroitua vettä yhteen osaan Giemsa-reagenssia. May-Grünwald- ja Giemsa-värjäysliuosten laimennussuhteet vaihtelevat laboratorioittain. Giemsa-värjäysliuoksen jälkeen lasit huuhdellaan 1-4 kertaa fosfaattipuskuroidussa vedessä yhteensä 1-9 minuuttia. Huuhteluiden aikana värisävyt erottuvat toisistaan. Huuhteluiden jälkeen lasien annetaan kuivua pystyasennossa joko lämpökaapissa tai huoneenlämmössä imupaperin päällä. Värjäyksen aikana lasit eivät saa päästää kuivumaan. (Bain & Lewis 2006, 63–64; Reagena Oy 2003.)

3.4.2 Päälystäminen

Yleensä sivelyvalmisteen päälystäminen peitinlasilla ei ole tarpeellista. Mutta mikäli sivelyvalmistetta on tarkasteltava useaan kertaan tai sitä on säilytettävä pitkän aikaa, peitinlasi antaa suojaa mekaanisilta vaurioilta eikä värjäys altistu ilmalle ja haalistu. Koko sivelyn peittävä peitinlasi vähentää myös tartuntavaaraa. Peitinlasin koko on yleensä joko 25 x 25 mm tai 25 x 50 mm ja paksuus 0,13 millimetristä 0,17 millimetriin. Paksummat peitinlasit säilyvät paremmin ehjinä, mutta rajoittavat mikroskopointia. Peitinlasin laadulliset vaatimukset ovat samat kuin objektilasin kohdalla. Nykyisin on myös käytössä päälystysautomaatteja. Päälystysliimana käytettävän aineen tulee olla matalan viskositeetin omaavaa eli juoksevaa, jotta se levittyy ohuesti eikä kuplia muodostuisi. Se ei saa vaikuttaa mikroskooppiseen tarkasteluun, eikä aiheuttaa muutoksia väriin. Päälystysaine ei saa menettää pitävyyttään ajan kuluessa. (Houwen 2000, 5.) Päälystysliimana voidaan käyttää esimerkiksi kaupallista DEPEX® mounting mediumia. Päälystäminen tapahtuu laittamalla tippa päälystysliimaa joko värjätylle objektilasille tai suoraan peitinlasille. Peitinlasi asetetaan objektilasin päälle. Päälystysliimaa on oikea määrä kun se ei tule lasien reunojen yli.

3.4.3 Värjäyksen virhelähteitä

May-Grünwald-Giemsa- värjäyksessä tavallisimpia virheitä ovat värisakan muodostuminen, vaihteleva värjäystulos, värisävyjen sini- tai punavoittoisuus, lasien ylivärjäytyminen, tumakromatiinin rakenteen homogeenisuus sekä vesipeiliartefakti. Värisakan ja vaihtelevan värjäystuloksen aiheuttavat väriliuosten alkoholin haihtuminen, varastoliuosten väriaineiden sakkautuminen tai hapettuminen sekä Giemsa-liuoksen virheellinen laimennus. Sinivoittoiset värisävyt johtuvat huuhtelupuskurin pH:n liiallisesta emäksisyydestä, värjäysastioissa olevista pesuainejäännöksistä, liian pitkästä värjäysajasta, liian lyhyestä tai tehottomasta huuhtelusta, liian lyhyestä kiinnityksestä, varastoliuosten väriaineiden hapettumisesta sekä kiinnitysmetanolin huonosta laadusta. Lisäksi liian pitkä aika sivelyvalmisteiden teosta värjäykseen saattaa aiheuttaa värjäyksen sinivoittoisuutta. Punavoittoiset värisävyt aiheutuvat huuhtelupuskurin liian happamasta pH:sta,

liian pitkästä tai tehokkaasta huuhtelusta, lasien hitaasta tai epätasaisesta kuivumisesta sekä liian lyhyestä värjäysajasta. Sivelyvalmisteiden ylivärjäytyminen johtuu liian pitkästä värjäysajasta tai liian lyhyestä huuhtelusta. Huonolaatuinen metanoli ja liian lyhyt metanoli kiinnitys aiheuttava homogeeniset tumakromatiini rakenteet. Vesipeiliartefakta johtuu kiinnitysmetanoliin päässeestä vedestä. (Bain & Lewis 2006, 63; Siitonen & Jansson 2007, 109.)

4 MIRASTAINER® II- VÄRJÄYSAUTOMAATTI

Mirastainer® II -värjäysautomaattia voidaan käyttää hematologisten ja mikrobiologisten lasien värjäämiseen (kuva 2). Automaatissa on valittavana yhdeksän eri värjäysohjelmaa, jotka sisältävät 29 mahdollista vaihetta värjäyksen kulussa. Automaatti tekee käynnistettäessä tarkistuksen, joka varmistaa sen toimivuuden. Tarvittaessa automaatin käyttäjä voi myös manuaalisesti käynnistää laitteen tarkistuksen. Automaatissa on kuusi allasta, joista neljä on reagenssialtainta, yksi huuhteluallas ja yksi kuivausallas. Myös kuivaus- ja huuhtelualtasiin voidaan tarvittaessa laittaa reagensseja. Altaiden tilavuus on pääsääntöisesti 300 ml, poikkeuksena huuhteluallas, jonka tilavuus on 500 ml, tehokkaamman huuhtelun takaamiseksi. Värjäysaika vaihtelee 1 sekunnista 99 minuuttiin allasta kohden riippuen valitusta värjäysohjelmasta. Automaattiin mahtuu kerralla värjäytymään 20 tai 30 lasia värjäyskelkan koosta riippuen. (VWR International.)



KUVA 2. Mirastainer® II -värjäysautomaatti (Kuva: Maria Hemminki 2011)

Värjäyksen aluksi reagenssit laitetaan automaattiin omissa altaissaan. Seinäjoen Keskussairaalan hematologian laboratoriossa May-Grünwald- Giemsa värjäyksessä ensimmäisellä paikalla on Reagenan käyttövalmis May-Grünwald-värjäysliuos (May-Grünwald staining solution). Toisella paikalla on suhteessa 1:17 laimennettu Mercken Giemsa-värjäysliuos (Giemsa´s Azur eosin methylene blue solution). Laimennus tehdään sekoittamalla keskenään 272 millilitraa fosfaattipuskuroitua vettä sekä 17 millilitraa Giemsa-värjäysliuosta. Värjäysalaiden paikat 3-5 sisältävät fosfaattipuskuroitua vettä ja paikkaan 6 kuuluu kuivaus +45 Celsius asteessa. (Verenkuvavalmisteiden MGG-värjäys Mirastainer® II -automaatilla 2010.)

Objektilasit laitetaan värjäyskelkkaan hiospäät ylöspäin nostamalla liikkuva lukituslevy yläasentoon. Kelkan ollessa täynnä painetaan lukituslevy takaisin alas, jotta lasit pysyvät paikoillaan. Värjäysastioista poistetaan kannet ja värjäyskelkka työnnetään värjäysautomaatin käsivarren reikiin. Automaatti käynnistetään painikkeista "RUN 1" ja "Enter" painamalla. Värjäyksen aikana automaatin käsivarret kuljettavat valitun ohjelman mukaan kelkkaa värjäysliuksissa nostamalla laseja kahden sekunnin välein ylös ja alas värjäysaltaissa. Automaatin näyttö ilmoittaa käynnissä olevan värjäysvaiheen ja kuluneen ajan. Värjäyksen valmistuttua automaatti tuo kelkan takaisin alkuasentoon ja ilmoittaa äänimerkillä värjäyksen olevan valmis. Tämän jälkeen automaatti siirtyy lepotilaan. (Verenkuvavalmisteiden MGG-värjäys Mirastainer® II -automaatilla 2010.) Valmiit lasit voidaan kerätä automaatista poistetusta kelkasta. Värjäysastioiden päälle tulee laittaa kannet värjäyksen valmistuttua, jotta reagenssit eivät haihdu. Reagenssit vaihdetaan päivittäin.

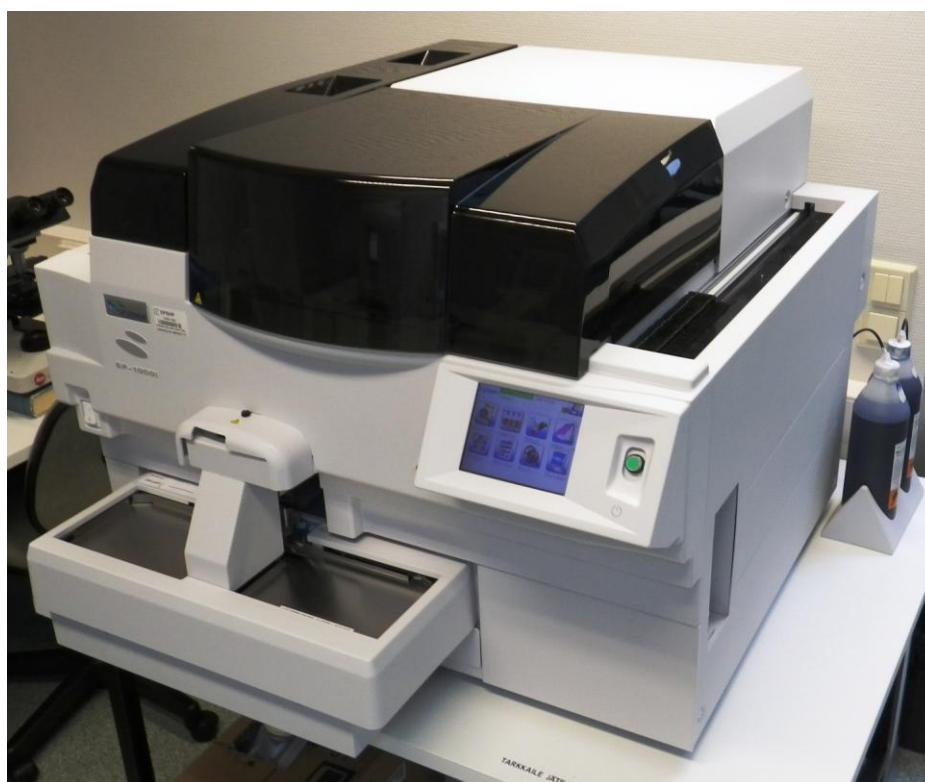
Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion Mirastainer® II- automaatilla värjäysohjelmassa yksi sivelyvalmisteet ovat ensin 5 minuuttia May-Grünwald-värjäysliuksessa (taulukko 1). Tämän jälkeen automaatti siirtää kelkan Giemsa-värjäysliukseen, jossa lasit ovat 15 minuuttia. Huuhteluja on kolme fosfaattipuskuroidussa vedessä. Jokainen huuhteluvaihe kestää 1 minuutin ja kuivauksessa menee 3 minuuttia. (Verenkuvavalmisteiden MGG-värjäys Mirastainer® II –automaatilla 2010.)

TAULUKKO 1. Mirastainer® II -automaatin MGG-värjäysohjelma (Verenkuva-
valmisteiden MGG-värjäys Mirastainer® II -automaatilla 2010)

Paikka	Reagenssi	Aika
1	Laimentamaton May-Grünwald	5 min
2	Laimennettu 1:17 Giemsa	15 min
3	Fosfaattipuskuroituvesi	1 min
4	Fosfaattipuskuroituvesi	1min
5	Fosfaattipuskuroituvesi	1 min
6	Kuivaus 45 °C	3 min

5 SYSMEX SP-1000i™ - VETO- JA VÄRJÄYSAUTOMAATTI

Sysmex SP-1000i™ on täysin automatisoitu sivelyvalmisteidenteko- ja värjäysautomaatti, joka valmistaa sivelyvalmisteen aina näytteen aspiroinnista valmiiksi värjätyksi lasiksi asti (kuva 3). Automaatti voi tehdä jopa 120 näytettä tunnissa. Automaatti kykenee aspiroimaan näytteen suljetusta putkesta tai avoimesta mikroputkesta. Vaikka se aspiroi näytettä vain 200 µl, automaatti vaatii että näytettä on 0,8-5 ml 12 mm läpimitaltaan olevassa putkessa tai 1-7 ml 15 mm putkessa. Mikroputkessa näytetilavuuden tulee olla 300 µl, josta automaatti aspiroi näytettä 60 µl. Automaatti määrittää näytteen hematokriitin perusteella pisaran koon, vetokulman sekä vetonopeuden. Automaatissa on kahdeksan eri hematokriittitason mukaan määräytyvää sivelyvalmisteen veto-ohjelmaa (taulukko 2). (Maedel & Doig 2007, 177–178; Sysmex Corporation 2007; Sysmex Europe GMBH 2007.)



KUVA 3. SYSMEX SP-1000i™ –veto- ja värjäysautomaatti (Kuva: Maria Hemminki 2011)

TAULUKKO 2. Sivelyvalmisteen veto-ohjelmat (Mukaillen Sysmex Europe GMBH 2007)

Veto-ohjelma	Hematokriitti (%)	Näytetilavuus (µl)	Vetokulma (astetta)	Vetonopeus (mm/s)
1	< 20	13	31	180
2	20-25	17	30	175
3	25-30	17	29	165
4	30-35	17	29	160
5	35-40	17	29	145
6	40-45	19	29	150
7	45-50	19	29	120
8	> 50	19	29	100

Ensin automaatti sekoittaa näyteputkea, jonka jälkeen se annostelee hyvin sekoitetun näytteen näytepipetillä koko lasin leveydelle viivaksi liikuttamalla näytepipettiä edes takaisin oikealta vasemmalle lasin päällä. Näytteen annostelun aikana pipetti ei kosketa lasia, jotta solut eivät vaurioidu. Sivelyvalmisteen teossa automaatti asettaa ensin vetolasin objektilasin päälle ja liikuttaa sitä hitaasti kohti pisaraa kunnes vetolasi koskettaa verta. Pisaran levittyä koko vetolasin leveydelle automaatti vetää vetolasin objektilasin toista päätä kohti, jolloin sivelyvalmiste muodostuu lasille. Jokaisen sivelyvalmisteen vedon jälkeen automaatti puhdistaa vetolasin ultraäänien avulla. Automaattiin sopivat 76mm x 26 mm tai 75 mm x 25 mm kokoiset objektilasit, joiden paksuus on 0,9-1,2 mm ja reunat on leikattu ja pyörästetty. (Maedel & Doig 2007, 177–178; Sysmex Corporation 2007; Sysmex Europe GMBH 2007.) Lasin hiottuun päähän automaatti tulostaa näytteen tunnistetiedot, päivämäärän, potilaan nimen sekä henkilötunnuksen.

Sivelyvalmisteen vedon jälkeen automaatti kuivaa lasin kaksivaiheisesti, jonka jälkeen se kuljetetaan kasettiin, jossa lasi siirtyy värjäykseen. Värjäyksessä automaatti annostelee liukset suoraan kasettiin. Automaatti tekee pääsääntöisesti laseille May-Grünwald-Giemsan värjäyksen. Automaatilla on mahdollista tehdä myös Wright:n värjäys. Mahdollista on myös suorittaa pelkästään sivelyvalmis-

teen värjäys valmiiksi vedetylle lasille. Värjäyksen jälkeen automaatti kuljettaa kuivuneen lasin keräysalueelle, josta valmiit sivelyvalmisteet voidaan poimia. (Maedel & Doig 2007, 177–178; Sysmex Corporation 2007; Sysmex Europe GMBH 2007.)

Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa Sysmex SP-1000i™ -automaatilla käytetään Reagenan valmistamia May-Grünwald (May-Grünwald staining solution) ja Giemsa (Giemsa staining solution) värjäysliuoksia. Värjäys on viisivaiheinen (taulukko 3). Ensimmäisessä vaiheessa lasit ovat kaksi minuuttia laimentamattomassa May-Grünwald-liuoksessa, jonka jälkeen lasit menevät kolmeksi minuutiksi metanolilla suhteessa 1:10 laimennettuun May-Grünwald-liuokseen. Kolmannessa vaiheessa on vuorossa fosfaattipuskuroidulla lavedellä suhteessa 1:25 laimennettu Giemsa-liuos, jossa lasit ovat kahdeksan minuuttia. Tämän jälkeen on vuorossa yhden minuutin kestävä huuhtelu. Viimeisenä vaiheena on 12 minuutin mittainen lasien kuivaus, jonka jälkeen lasit ovat valmiit. (Tuomi 2011b.)

TAULUKKO 3. Sysmex SP-1000i™ –veto- ja värjäysautomaatin MGG-värjäysohjelma (Tuomi 2011b)

Värjäysvaihe	Reagenssi	Aika
1	Laimentamaton May-Grünwald	2 minuuttia
2	Laimennettu 1:10 May-Grünwald	3 minuuttia
3	Laimennettu 1:25 Giemsa	8 minuuttia
4	Huuhtelu	1 minuutti
5	Kuivaus	12 minuuttia

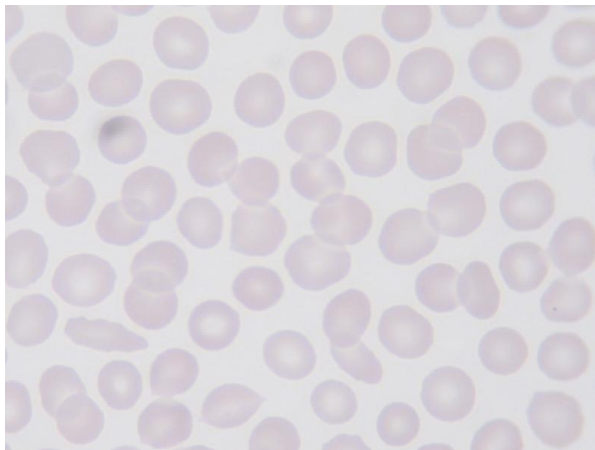
6 VERISOLUJEN RAKENNE JA VÄRJÄYTYMINEN

Verisolut syntyvät luuytimessä hematopoieettisista kantasoluista. Monikykyiset kantasolut pystyvät tuottamaan sekä itsensä kaltaisia kantasoluja että erilaistumiskyvyiltään suppeampia jälkeläisiä. Kaikki verisolut kehittyvät monikykyisistä kantasoluista linjavalintojen, solunjakautumisen ja kypsymisen seurauksena. Hematopoieesi jaetaan neljään päävaiheeseen: monikykyiset kantasolut, suuntautuneet kantasolut, jakautuvat/kypsyvät solut ja kypsät solut. (Siitonen & Koistinen 2007, 17–18; Smith 2007, 67; Matinlauri & Vilpo 2010, 247.) Kypsymiselle on tunnusomaista tuman pieneneminen, kromatiinirakenteen tiivistyminen, nukleoli(e)n häviäminen ja sytoplasman kypsyminen kullekin solutyypille ominaiseen tapaan (Matinlauri & Vilpo 2010, 247; Vilpo 2010a, 17). Kaikilla luuytimen solulinjoilla on tyypilliset morfologiset erityispiirteensä. Granulosyyttien tuma on liuskoittunut ja sytoplasman spesifiset granulat kehittyvät solujen kypsyessä. Trombosyytit eivät varsinaisesti ole soluja, vaan ne syntyvät hilseilemällä megakaryosyyttien sytoplasmasta. Niillä ei ole myöskään tumaa. (Matinlauri & Vilpo 2010, 247–248.) Verisolujen määrä säilyy terveellä ihmisellä varsin vakiona pieniä fysiologisia vaihteluja lukuun ottamatta (Hänninen 2004a, 263).

6.1 Erytrosyytit

Ensimmäinen morfologisesti tunnistettava erytropoieesin solu on proerytroblasti. Proerytroblasti kypsyy seuraavien kehitysvaiheiden kautta kypsäksi erytrosyytiksi noin seitsemässä vuorokaudessa: proerytroblasti, basofiilinen erytroblasti, polykromaattinen erytroblasti, ortokromaattinen erytroblasti, retikulosyytti ja erytrosyytti. (Hänninen 2004b, 265; Doig 2007, 78.) Kypsymisen aikana solun ja tuman koko pienenee, sytoplasma hemoglobininisoituu, tuma tulee pyknoottiseksi ja poistuu lopulta kokonaan solusta ortokromaattisessa vaiheessa. Retikulosyytti on normaalisti varhaisin erytropoieesin solu, joka vapautuu luuytimestä perifeeriseen vereen. Se kypsyy 1-2 vuorokaudessa kypsäksi erytrosyytiksi (kuva 4, sivu 24). (Hänninen 2004b, 265.)

Suurin osa verisoluista on erytrosyyttejä ($3,9\text{--}5,7 \times 10^{12} / l$) (Perusverenkuva ja trombosyytit 2010). Niitä on keskimäärin 1000-kertaa enemmän kuin leukosyyttejä ja 10-kertaa enemmän kuin trombosyyttejä. (Hänninen 2004a, 263; Vilpo 2010a, 18.) Erytrosyytit ovat muodoltaan pyöreitä kaksoiskoveria kiekkoja, joiden keskikohta on reunoja ohuempi. Tämän vuoksi ne värjäytyvät reunoiltaan tummemmiksi ja keskeltä vaaleammiksi. (Bain 2008, 2.) Tätä kutsutaan keski-kalpeudeksi, jonka osuus normaalissa erytrosyytissä on alle $1/3$ sen läpimitasta (Doig 2007, 85; Ruutu ym. 2007, 748). Erytrosyytit ovat läpimitaltaan $6,0\text{--}8,5 \mu\text{m}$. Erytrosyytit saavat niille ominaisen punaisen värin hemoglobiinista, joka on niiden tärkein proteiini. Hemoglobiini on sellaisenaan punaista ja erottuu värjäämättömässäkin sivelyvalmisteessa, mutta MGG-värjäyksellä saadaan erytrosyyttien värin sävyerot paremmin esille. (Bain 2008, 2-3.) Hapan eosiini värjää emäksisen hemoglobiinin punertavaksi (Bain 2006b, 80–81). Erytrosyyttien tehtävä on kuljettaa happea keuhkoista kudosten käyttöön muualle elimistöön ja kuljettaa hiilidioksidia kudoksista keuhkoihin (Hänninen 2004b, 266; Doig 2007, 86).



KUVA 4. Erytrosyyttejä (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Pelttari 2011)

6.2 Leukosyytit

Leukosyyttejä ovat granulotsyytit, lymfotsyytit ja monotsyytit. Granulotsyytit jaetaan sytoplasman granulan perusteella neutrofiilisiin, eosinofiilisiin ja basofiilisiin granulotsyytteihin. (Hänninen 2004b, 266.) Leukosyyttien määrä verenkierrossa

on $3,4\text{--}8,2 \times 10^9 / l$ (Perusverenkuva ja trombosyytit 2010). Leukosyytit ovat värjäämättömässä sivelyvalmisteessa valkoisia (Vilpo 2010b, 22). Leukosyyttien tuman nukleiinihapot ja nukleoproteiinit sekä primitiivisen sytoplasman proteiinit värjäytyvät emäksisillä metyleenisinellä ja atsuuri B:llä MGG-värjäyksessä. Myös granulosyyteille ominaiset granulat saadaan erottumaan MGG-värjäyksellä. (Mahlamäki 2004, 277.)

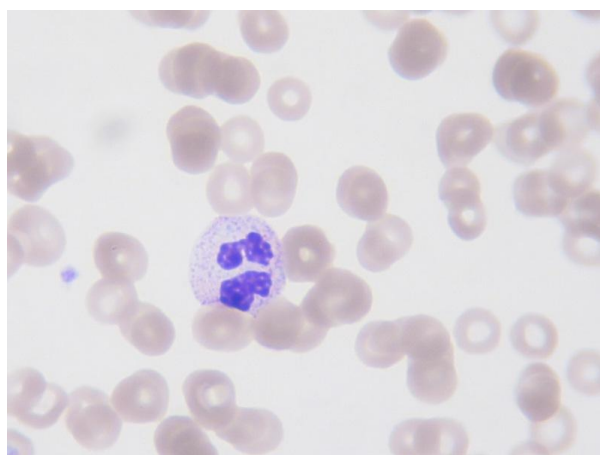
6.2.1 Granulosyytit

Granulopoieesin varhaisin morfologisesti tunnistettava solu on myeloblasti. Se kypsyy seuraavien vaiheiden kautta kypsäksi granulosyytiksi noin seitsemässä vuorokaudessa: myeloblasti, promyelosyytti, myelosyytti, metamyelosyytti, sauvatumainen granulosyytti ja liuskatumainen granulosyytti. (Hänninen 2004b, 266; Leclair 2007, 124–131.) Kypsymisen aikana sytoplasman basofiilinen värjäytyvyys vähenee, promyelosyyttivaiheessa sytoplasmaan muodostuu primaarigranuloita ja myelosyyttivaiheessa spesifisiä neutrofiilisiä, eosinofiilisiä tai basofiilisiä granuloita sekä tuma kypsyy, pienenee ja liuskoittuu. Normaalisti perifeeriseen vereen vapautuu vain sauva- ja liuskatumaisia granulosyyttejä. (Hänninen 2004b, 266–267.)

Myeloblasti on kooltaan noin $15\text{--}20 \mu\text{m}$. Sen tuma on iso ja kromatiinirakenteeltaan löyhää. Tumajyväsiä voi olla nähtävissä 1-2. Tuma värjäytyy punertavanvioletiksi. Sytoplasmaa on niukasti ja se värjäytyy syvän basofiilisesti. Granulaa ei juurikaan esiinny. (Leclair 2007, 127; Ruutu ym. 2007, 752.) Myeloblastin sytoplasmassa voi näkyä atsurofiilisesti värjäytyviä Auerin sauvoja, niitä voi esiintyä esimerkiksi akuutissa myeloisessa leukemiassa (Bain 2006a, 102). Promyelosyytti on suurin myeloisen sarjan soluista. Se on kooltaan yli $20 \mu\text{m}$. Tuma on iso, eksentrisesti sijoittunut, pyöreä tai soikea. Tuman kromatiinirakenne on löyhää ja värjäytyy violetiksi. Tumajyväsiä on yleensä nähtävissä 1-2. (Leclair 2007, 127; Ruutu ym. 2007, 751.) Sytoplasmaa on enemmän kuin myeloblastissa ja se värjäytyy basofiilisesti vaaleampana kuin myeloblastissa. Sytoplasmaa ja tumaa verhoaa atsurofiilinen karkea primaarigranula. (Leclair 2007, 127.)

Myelosyytti on viimeinen jakautuva solu myeloisessa solusarjassa. Se on kooltaan noin 16–24 μm . Tuma on pyöreä tai soikea ja sijoittunut solun keskelle. Myelosyytin tuman kromatiinirakenne on tiivistä ja kokkareista ja se värjätty tummanvioletiksi. Tumajyväsiä ei ole enää nähtävissä. Sytoplasman osuus on suurempi kuin promyelosyytillä. Sytoplasma värjätty harmaanpunertavaksi ja sitä peittävät granulosityttisarjan spesifiset granulat. (Leclair 2007, 127; Ruutu ym. 2007, 751.) Metamyelosyytti on kooltaan noin 12–18 μm . Tuma on munuaisen tai pavun muotoinen. Tuman kromatiinirakenne on tiiviimpää kuin metamyelosyytillä. Sytoplasma värjätty vaaleansinipunaiseksi ja sitä peittävät granulosityttisarjan spesifiset granulat. (Leclair 2007, 128; Ruutu ym. 2007, 751.)

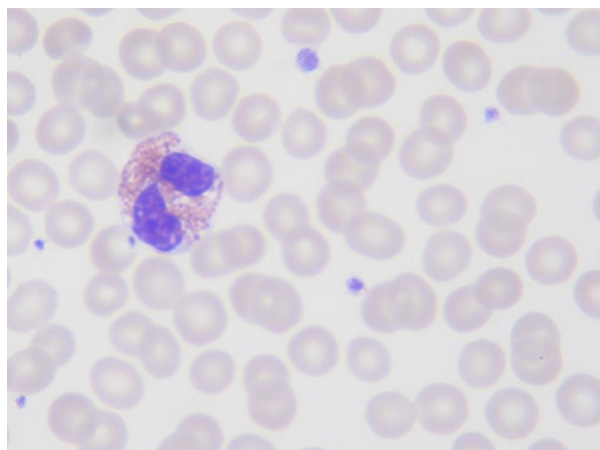
Suurin osa kaikista leukosyyteistä (40–81 %) on neutrofiilejä (kuva 5) (Leukosyytit, erittelylaskenta 2010). Neutrofiilit ovat läpimitaltaan noin 12–15 μm . Niiden tuma muodostuu tiheästä kromatiinirakenteesta ja se värjätty tumman basofiilisesti. Liuskatumaisen neutrofiilin tuma on liuskoittunut 2-5 lohkoon. Sauvatumaisen neutrofiilin tuma koostuu yhdestä lohkosta. (Bain 2006a, 90; Leclair 2007, 128–129.) Neutrofiilien granulat värjättyvät MGG-värjäyksellä vaaleanpunertaviksi. Neutrofiilien tärkein tehtävä on toimia elimistön ensimmäisenä suojaimekanismina akuutteja infektioita vastaan fagosytoimalla mikrobeja. (Hänninen 2004b, 266–267; Vilpo 2010b, 22.)



KUVA 5. Neutrofiili (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Pelttari 2011)

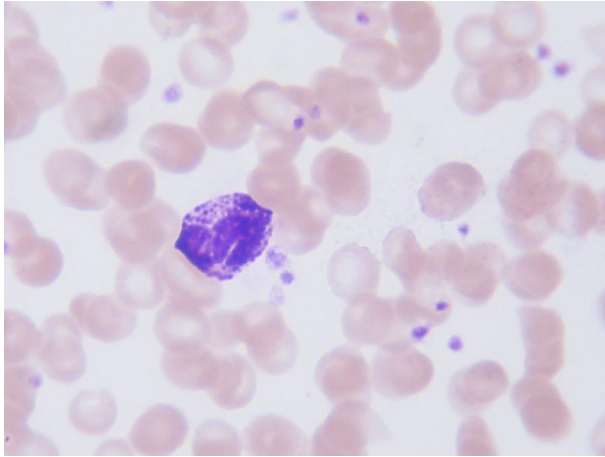
Kaikista perifeerisen veren leukosyyteistä eosinofiilejä on vain noin 1-6 prosenttia (kuva 6, sivu 27) (Leukosyytit, erittelylaskenta 2010). Eosinofiilit ovat hieman

isompia kuin neutrofiilit, noin 12–17 μm . Niissä on tavallisesti vain kaksi tumalohkoa. Eosinofiilien emäksisiä yhdisteitä sisältävät granulat värjäytyvät happamalla eosiinilla voimakkaan oranssin värisiksi. (Bain 2006a, 109; Leclair 2007, 130.) Eosinofiilit ovat fagosytoivia soluja. Niillä on keskeinen merkitys allergisten reaktioiden säätelyssä ja parasiittien torjunnassa. (Hänninen 2004b, 267; Vilpo 2010b, 22.)



KUVA 6. Eosinofiili (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Peltari 2011)

Basofiilien osuus kaikista leukosyyteistä on alle prosentti (kuva 7, sivu 28) (Leukosyytit, erittelylaskenta 2010). Basofiilit ovat kooltaan noin 10–14 μm . Niiden tuma on apilanlehtimäinen ja se on yleensä peittynyt tumman granulan alle. Basofiilien happamat granulat värjäytyvät emäksisellä metyleenisinellä tumman violeteiksi. (Bain 2006a, 112; Leclair 2007, 130–131.) Myös basofiilit ovat fagosytoivia soluja. Ne toimivat allergisten reaktioiden välittäjinä, mutta niiden merkitys ihmisen puolustusjärjestelmässä on vielä epäselvä. (Vilpo 2010b, 22.)



KUVA 7. Basofiili (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Pelttari 2011)

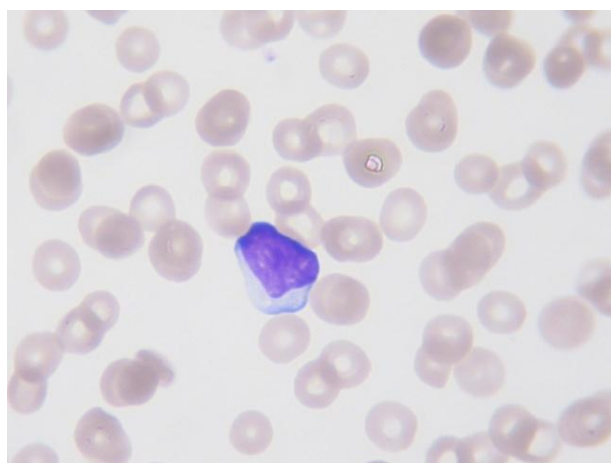
6.2.2 Lymfosyytit

Lymfopoieesin varhaisin morfologialtaan tunnistettava solu on lymfoblasti. Lymfoblasti kypsyy prolymfosyytti (pro-T ja pro-B) vaiheen kautta kypsäksi lymfosyytiksi. Luuytimessä monikykyisestä kantasolusta kehittyy lymfaattisia kantasoluja, joista osa kypsyy luuytimessä B-lymfosyyteiksi ja osa kateenkorvassa T-lymfosyyteiksi. (Hänninen 2004b, 267; Leclair 2007, 133–135.)

Lymfoblasti on kooltaan noin 14–20 μm . Tuma on suuri ja kromatiini on hienojakoista. Se värjäytyy tasaisesti purppuransiniseksi. Sytoplasmaa on niukasti ja se värjäytyy basofiilisesti, solun reunalta tummemmaksi ja läheltä tummaa vaaleammaksi. Granulaa ei esiinny. Lymfoblastissa voi olla 1-2 tumajyväästä. Prolymfosyytti on kooltaan noin 15–25 μm . Tuma on pyöreä ja kromatiinirakenne on tiivistynyttä. Prolymfosyytille on ominaista selvästi näkyvä tumajyvänen. Sytoplasma värjäytyy basofiilisesti, eikä granulaa esiinny. (Leclair 2007, 134–135; Ruutu ym. 2007, 752.) Kroonisen lymfaattisen leukemian muuttuessa aggressiivisemmäksi prolymfosyyttejä ilmaantuu perifeeriseen vereen.

Perifeerisen veren leukosyyteistä 20–45 prosenttia on lymfosyyttejä (kuva 8, sivu 29), joista noin 85 prosenttia on T-soluja ja luonnollisia tappajasoluja eli NK-soluja (natural killer). Loput 15 prosenttia lymfosyyteistä on B-soluja. (Leukosyytit, erittelylaskenta 2010; Vilpo 2010b, 24–25.) May-Grünwal-Giemsä -

värjätystä sivelyvalmisteesta B- ja T-soluja ei pysty erottamaan toisistaan (Vilpo 2010b, 24). Lymfosyytit ovat kooltaan 10–16 µm. Suurin osa perifeerisen veren lymfosyyteistä on pieniä lymfosyyttejä (10–12 µm). Niissä on tiivis tumman basofiilisesti värjäytynyt tuma ja niukasti syvän sinistä sytoplasmaa. Noin 10 prosenttia lymfosyyteistä on suurempia, runsas sytoplasmaisia ja tumman kromatiinirakenteeltaan löyhempiä, isoja lymfosyyttejä (12-16 µm). Ne ovat usein epä säännöllisen muotoisia. Sytoplasma värjäytyy MGG-värjäyksellä heikon basofiilisesti vaalean siniseksi. Isoissa lymfosyyteissä voi olla myös atsurofiilisesti värjäytynyttä granulaa, jolloin solua kutsutaan LGL-soluksi (large granular lymphocytes). Lymfosyyteissä voi esiintyä reaktiivisuutta tai atypiaa. (Bain 2006a, 113.) B-lymfosyyttien tärkein tehtävä on vasta-aineidentuotanto ja sen säätely. T-solut vastaavat soluunsidotusta immuniteetista. (Leclair 2007, 135–137; Vilpo 2010b, 25.



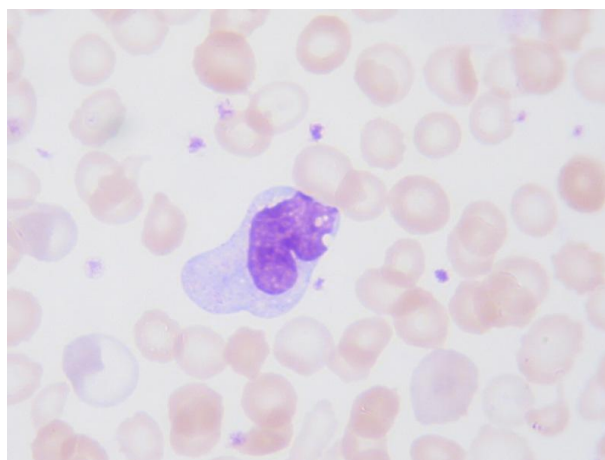
KUVA 8. Iso lymfosyytti (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Pelttari 2011)

6.2.3 Monosyytit

Monoblasti on monopoieesin varhaisin morfologisesti tunnistettava solu. Se kypsyy promonosyyttivaiheen kautta kypsäksi monosyytiksi (Hänninen 2004b, 267; Leclair 2007, 131–133.) Monoblasti on kooltaan noin 14–20 µm. Tuma on suuri ja kromatiinirakenne on löyhää. Monoblastissa tumajyväsiä voi olla 1-5 kappaletta. Sytoplasma värjäytyy basofiilisesti ja se on granulaaton. Monoblastissa voi näkyä myös vakuoleja. Promonosyytti on kooltaan 18–30 µm. Tuman

kromatiinirakenne on blastimaisen löyhää ja tumajyväsiä on erotettavissa. Sytoplasmaa on runsaasti ja se on tummempaa kuin kypsässä monosyytissä. Sytoplasmassa voi esiintyä granulaa. (Leclair 2007, 131–132; Ruutu ym. 2007, 752.)

Perifeerisen veren leukosyyteistä monosyyttejä on 1-11 prosenttia (kuva 9) (Leukosyytit, erittelylaskenta 2010). Monosyytti on perifeerisen veren suurin solu, läpimitaltaan noin 12–20 µm. Monosyytti on muodoltaan epäsäännöllinen. Sen tuma voi olla hevosenkenkämäinen, munuaisen tai pavun muotoinen tai tuma voi olla jopa liuoskoittunut. Sytoplasma värjäytyy MGG-värjäyksessä siniharmaaksi ja se sisältää hienojakoista atsurofiilistä granulaa. Sytoplasma voi olla vakuolisoitunut. (Bain 2006a, 119; Leclair 2007, 132.) Monosyytit ovat elimistön tärkeimpiä fagosytoivia soluja ja niillä on tärkeä rooli elimistön immuunipuolustuksessa. Verenkierrrossa monosyytit kiertävät vain noin 1,5 vuorokautta ja kulkeutuvat sitten kudoksiin makrofageiksi tai dendriittisoluiksi. (Hänninen 2004b, 267.)

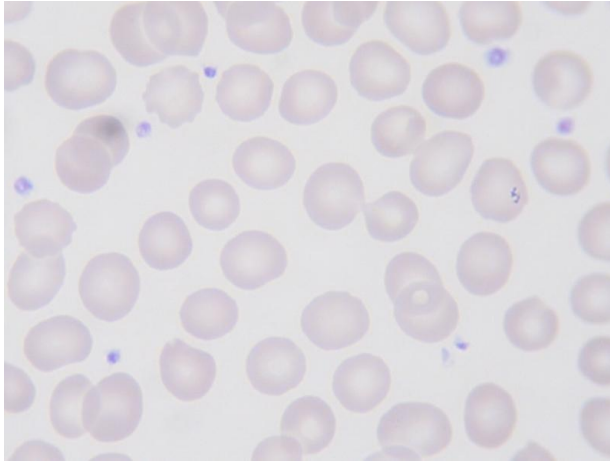


KUVA 9. Monosyytti (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Peltari 2011)

6.3 Trombosyytit

Trombosyyttejä on 50-kertainen määrä ($150\text{--}360 \times 10^9 / l$) veren leukosyytteihin verrattuna (kuva 10, sivu 31) (Vilpo 2010a, 18; Perusverenkuva ja trombosyytit 2010). Varhaisin trombopoieesin morfologisesti tunnistettava solu on megaka-

ryoplasti, joka kypsyy noin viidessä vuorokaudessa promegakaryosyytti vaiheen kautta kypsäksi megakaryosyytiksi. Trombosyytit muodostuvat kuroutumalla megakaryosyyttien sytoplasmasta. (Hänninen 2004b, 268; Fritsma 2007, 141–145.) Ne ovat noin 1-3 μm :n läpimittaisia tumattomia levyjä. (Hänninen 2004b, 268). Terveellä ihmisellä perifeerisessä veressä on nähtävissä vain kypsiä trombosyyttejä, ei megakaryosyyttejä tai niiden varhaismuotoja. Sivelyvalmis- teissa, jotka on värjätty MGG-värjäyksellä, trombosyyttien keskellä oleva granu- la (granulomeeri) värjäytyy atsurofiilisesti ja granulomeerin ja solukalvon väliin jäävä alue (hyalomeeri) värjäytyy heikon basofiilisesti. (Bain 2006a, 125.) Trombosyyteillä on tärkeä tehtävä verenvuodon tyrehtyttämässä primaarissa hemostaasissa (Vilpo 2010b, 24).



KUVA 10. Trombosyyttejä (Kuva: Maria Hemminki & Tiina Pelttari 2011)

7 SIVELYVALMISTEEN TARKASTELU

Sivelyvalmisteen tarkastelu tulee aloittaa identifiointitietojen tarkistamisella. Potilaan sukupuoli, ikä ja etninen tausta on myös hyvä huomioida (Bain 2006a, 61). Esimerkiksi hemoglobiiniarvot ovat naisilla matalammat kuin miehillä. Ikä vaikuttaa sekä leukosyyttien määrään että erittelyjakaumaan. Etninen tausta voi vaikuttaa leukosyyttien määrään, esimerkiksi valkoihoisilla leukosyyttiarvot ovat korkeammat kuin mustaihoisilla. (Savolainen 2007, 93,95.) Mikäli käytössä on verenkuvaa-analysaattorin tuloste, on sitä ensin syytä tarkastella. Tulosteesta selviää yleensä esimerkiksi se, miksi näyte on mennyt mikroskooppiseen tarkasteluun.

7.1 Makroskooppinen tarkastelu

Sivelyvalmisteen tarkastelu aloitetaan makroskooppisesti. Makroskooppisesti tarkastellaan sivelyn ja värjäyksen laatua: sivelyn pituutta, muotoa ja paksuutta sekä värin tasaisuutta ja poikkeavien väri- ja värjäyskasojen esiintymistä. Poikkeavat värjäyskasumat voivat aiheutua muun muassa trombosyyttien aggregaatiosta, punasoluagglutinaatiosta, raharullamuodostumista tai pahanlaatuisista solukasumista, jotka ovat todettavissa mikroskooppisessa tarkastelussa. Poikkeavaa värjäytymistä aiheuttaa muun muassa vieraiden aineiden läsnäolo, kuten hepariini, joka näkyy vaaleanpunaisena sävynä tai suonensisäiset huumausaineet sekä paraproteiinien aiheuttama sivelyn tummansininen värjäytyvyys. (Bain 2006a, 61; Bain 2006b, 80.)

7.2 Mikroskooppinen tarkastelu

Hyvänlaatuinen mikroskooppi on onnistuneen mikroskooppisen tarkastelun tärkeimpiä edellytyksiä (Siitonen & Jansson, 2007, 100). Mikroskopointi tulee suorittaa optimaalista valaistusta käyttäen. Sivelyvalmisteen tarkastelu aloitetaan pienellä 10- tai 25-kertaisesti suurentavalla kuivaobjektiivilla. Pienellä objektiivil-

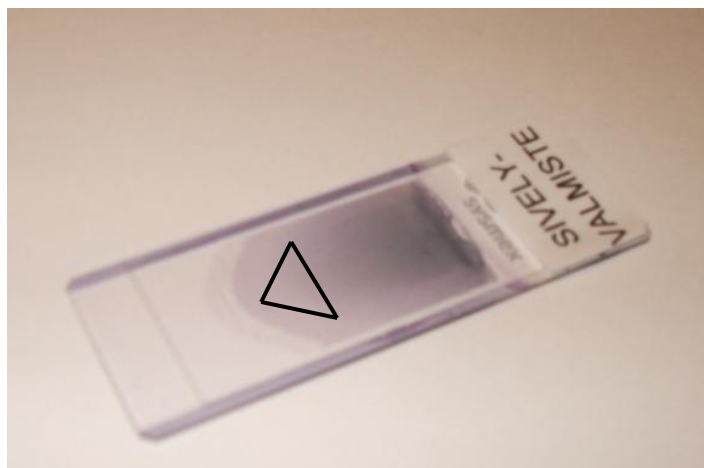
la tapahtuu niin sanottu esitarkastus, jossa tarkastellaan sivelyvalmisteesta sen laatua arvioimalla sivelyn ja värjäytyvyyden onnistumista sekä arvioidaan alustavasti solujen ryhmitystä, jakautumista, määrää ja värjäytyvyyttä. Lisäksi etsitään sivelyvalmisteesta hyvä alue leukosyyttien erittelylaskentaan ja solumorfologian arviointiin. Epäonnistuneesta sivelyvalmisteesta ei kannata antaa vastausta. (Bain 2006a, 61; Bain 2006b, 80; Maedel & Doig 2007, 183; Siitonen & Jansson 2007, 101–102.) Sivelyvalmiste tulee tutkia kauttaaltaan, sillä solut eivät jakaudu tasaisesti objektilasille. Pienten objektiivien käyttö on tärkeää, jotta huomataan harvakseltaan esiintyvät epänormaalit solut. Myös reunat ja häntäosa tulee katsoa läpi, koska suuret epänormaalit solut ja solukasat kerääntyvät näille alueille. (Bain 2006a, 61.)

Pienellä objektiivilla tapahtuvan yleistarkastelun jälkeen siirrytään käyttämään 50-kertaisesti suurentavaa öljyimmersio-objektiivia. Tämä sopii erityisesti sivelyvalmisteille, joita ei ole päällystetty peitinlasilla. (Bain 2006a, 62.) Päällystämättömiä objektilaseja voidaan tarkastella myös 40-kertaisesti suurentavalla kuivaobjektiivilla laittamalla tippa immersioöljyä objektilasille ja peitinlasi päälle (Mattila-Oksanen 2011). Vaihtoehtoisesti peitinlasilla päällystettyjä sivelyvalmisteita voidaan tarkastella 40-kertaisesti suurentavalla kuivaobjektiivilla (Bain 2006a, 62). Erytrosyyttien ja trombosyyttien ryhmityksen ja morfologian tarkastelu sekä leukosyyttien erittelylaskenta ja solumorfologian arviointi suoritetaan 500-kertaisella suurennoksella (Siitonen & Jansson 2007, 102). Pieniä yksityiskohtia, kuten punasoluinkluusioita ja leukosyyttien granulaatiota tarkastellessa voi olla syytä käyttää 100-kertaisesti suurentavaa öljyimmersio-objektiivia (Bain 2006a, 62). Erittelylaskennan ja solumorfologian arvioinnin jälkeen suoritetaan vielä jälkitarkastus joko 10- tai 50-kertaisesti suurentavalla objektiivilla. Jälkitarkastuksessa etsitään sellaisia harvakseltaan esiintyviä löydöksiä, jotka voivat yhdessä muiden verenkvalölöydösten tai kliinisten tietojen perusteella tukea diagnoosia. (Siitonen & Jansson 2007, 102.) Soluja tunnistettaessa kiinnitetään huomiota solun kokoon, tuman kokoon ja rakenteeseen, sytoplasman värjäytyvyyteen, määrään ja granulaarisuuteen sekä tuma-sytoplasma suhteeseen. (Mahlamäki 2004, 278–279).

Sivelyvalmisteiden mikroskooppinen tarkastelu paljastaa myös verenkuvanalyysiaattorin tuloksiin vaikuttavat virhetekijät, esimerkiksi trombosyyttien aggregaatio voi aiheuttaa liian matalia trombosyyttiarvoja tai kylmäagglutinaatio voi aiheuttaa tuloksiin virheellisesti makrosytoosiin sopivia arvoja. (Bain 2006a, 63; Bain 2006b, 80.)

7.2.1 Erytrosyyttien mikroskooppinen tarkastelu

Erytrosyyttien mikroskooppinen tarkastelu antaa pääsääntöisesti tietoa anemioista. Sivelyvalmisteesta tarkastellaan erytrosyyttien kohdalta niiden määrää, kokoa, muotoa, hemoglobiinipitoisuutta, solun sisäisiä kappaleita ja ryhmittymistä. (Maedel & Doig 2007, 185; Bain 2008, 29.) Tarkastelu tapahtuu sivelyvalmisteiden häntäosasta alueelta, jossa erytrosyytit ovat yhdessä kerroksessa vierieressä (kuva 11) (Maedel & Doig, 183). Punasolumorfologian arviointi on huonosti toistettavissa ilman verenkuvanalyysiaattorin antamaa tulostetta (Siitonen & Jansson 2007, 103).



KUVA 11. Erytrosyyttien tarkastelualue (Kuva: Maria Hemminki 2011)

Erytrosyyttejä tarkasteltaessa usein kiinnitetään ensimmäiseksi huomiota niiden ryhmittymiseen. Poikkeavana löydöksenä voi olla raharullamuodostusta, joka johtuu plasman kohonneesta proteiinipitoisuudesta tai agglutinaatioryhmitystä,

joka johtuu punasoluvasta-aineista. (Pelliniemi 1998, 1179; Mahlamäki 2004, 277; Bain 2006a, 89.)

Anisosytoosi kuvaa erytrosyyttien koon vaihtelua. Normaalikokoisia erytrosyyttejä kutsutaan normosyyteiksi. Erytrosyyttien ollessa normaalia pienempiä, alle 7 µm, kutsutaan niitä mikrosyyteiksi ja niiden ollessa normaalia suurempia, yli 8,5 µm, kutsutaan niitä makrosyyteiksi. (Bain 2006a, 66–68.) Anisosytoosin sekä mikro- ja makrosytoosin voimakkuutta voidaan arvioida seuraavasti: + (vähän), ++ (kohtalaisesti) tai +++ (runsaasti) (Maedel & Doig 2007, 185; Bain 2008, 32). Arvioinnissa voidaan käyttää myös vastaavia numeroita (1-3). Verenkuvaa-analysaattorin tulosteessa erytrosyyttien kokojaukaumasprosentti, E-RDV (red cell distribution width), kuvaa anisosytoosin määrää ja erytrosyyttien keskitilavuus, E-MCV (mean cell volume), kuvaa erytrosyyttien kokoa (Bain 2006a, 66–68).

Erytrosyyttejä, joiden keskikalpeus on yli kolmasosan solun läpimitasta, kutsutaan hypokromisiksi. Erytrosyyttejä, joissa keskikalpeutta ei erotu lainkaan, sanotaan hyperkromisiksi. Esimerkkinä hyperkromisista soluista ovat sferosyytit, jotka värjäytyvät hyperkromisesti pallomaisen muotonsa vuoksi. Dimorfisessa solukuvassa esiintyy kahta erilaista punasolupopulaatiota. Esimerkiksi verensiirron jälkeen voi esiintyä sekä normokromisia sekä hypokromisia erytrosyyttejä. (Bain 2006, 68–71; Bain 2008, 39–42.) Dimorfia vastataan useissa laboratorioissa anisokromiasiana, joka ymmärretään hemoglobiinista riippuvaisena värjäytyvyyden vaihteluna. Dimorfia kertoo normo- ja hypokromisten erytrosyyttien suhteesta.

Retikulosyytit värjäytyvät MGG-värjäyksellä sinisempinä kuin kypsät erytrosyytit, koska ne sisältävät vielä hieman sille sinertävän värin antavaa RNA:ta. Retikulosyytit ovat myös kooltaan hieman isompia kuin kypsät erytrosyytit. Retikulosyyttien esiintymistä sivelyvalmisteessa kutsutaan polykromasiaksi. (Bain 2006, 68–71; Bain 2008, 39–42.) Epätavallista erytrosyyttien muodon vaihtelua kutsutaan poikilosytoosiksi (Bain 2008, 32–35). Anisokromasian ja poikilosytoosiin määrää voidaan arvioida samoin kuin anisosytoosin voimakkuutta. Erytrosyyt-

tien muotoa ja värjäytyvyyttä voidaan kuvata useilla eri termeillä, joita on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Erytrosyyttien muoto ja värjäytyvyys (Mukaillen Bain 2006a, 71–86; Ruutu ym. 2007, 748–745)

Solu	Kuvaus
Ovalosyytti	Ovaalin muotoinen
Kynäsolu	Ovalosyytin äärimuoto, pitkä ja kapea
Akantosyytti	Pallomainen ja mikrosytaarinen, 5-10 piikkimäistä uloketta
Burr-solu	Piparkakkumainen, tasakokoisia ulokkeita
Pisarasolu	Pisaran muotoinen
Skistosyytti/Punasolufragmentti	Punasolufragmentteja, epäsäännöllisen muotoisia kappaleita
Sirppisolu	Puolikuun muotoinen, teräväkärkinen
Targetsolu	Maalitaulun näköinen, laaja keskivaalennus, jonka keskellä hemoglobinisoinut alue
Sferosyytti	Pieni ja pallomainen, hyperkrominen, hyvin vähäinen tai puuttuva keskivaalennus
Stomatosyytti	Toispuoleisesti kovera solu, keskivaalennus rakomainen
Polykromasia	Retikulosyyttien esiintyminen

}

Muoto

}

Värjäytyvyys

Erytrosyytit voivat sisältää inklusioita eli solun sisäisiä kappaleita, kuten Howell-Jollyn ja Pappenheimerin kappaleita, basofiilistä pilkutusta tai malariaplasmoideja. Tyypillisesti pernan poiston jälkeen esiintyvät Howell-Jollyn kappaleet ovat tuman jäänteitä ja Pappenheimerin kappaleet rautaa sisältäviä granuloita. Basofiilistä pilkutusta voi esiintyä nuorissa erytrosyyteissä, pilkut ovat RNA:ta sisältäviä jyväsiä, jotka täyttävät tasaisesti erytrosyytin. Basofiilistä pilkutusta esiintyy muun muassa erytrosyyttituotannon häiriötiloissa. (Mahlamäki 2004, 278; Bain 2008, 42.) Mikäli sivelyvalmisteesta löytyy erythroblasteja, ilmoitetaan niiden määrä yleensä 100 leukosyyttiä kohden (Mahlamäki 2004, 281).

7.2.2 Leukosyyttien erittelylaskenta ja morfologinen arviointi

Leukosyyttien erittelylaskennassa käytetään 50-kertaisesti suurentavaa öljyimersio-objektiivia (Mahlamäki 2004, 279; Siitonen & Jansson 2007, 101). Erittelylaskenta suoritetaan alueelta, jossa leukosyytit ovat hyvin säilyneitä. Paksulla alueella solumorfologia on usein huonoa valmisteen hitaan kuivumisen vuoksi ja ohuessa päässä esiintyy nopeasta kuivumisesta johtuvaa artefaktaa. (Siitonen & Jansson 2007, 102.) Erittelylaskentaan sopivalla alueella osa erytrosyyteistä voi olla hieman päällekkäin kahden tai kolmen erytrosyytin kasoissa, mutta suurin osa erytrosyyteistä on yhdessä kerroksessa vierä vieressä (kuva 12). Suuret solut, kuten monosyytit ja neutrofiilit, esiintyvät yliedustettuina sivelyvalmisteen häntäpäässä ja lymfosyytit paksummassa päässä. (Maedel & Doig 2007, 183; Mahlamäki 2004, 280; Houwen 2000,7.) Solujen epätasaisen jakautumisen vuoksi näkökenttää olisi hyvä siirtää objektilasin pitkän sivun suuntaisesti päästä häntään, pysyen optimaalisella tarkastelualueella. Yleensä laskeaan 100 tai 200 peräkkäistä leukosyyttiä, mitä enemmän sitä pienempi variaatio. (Mahlamäki 2004, 279–280; Siitonen & Jansson 2007, 101–102.)



KUVA 12. Leukosyyttien tarkastelualue (Kuva: Maria Hemminki 2011)

Leukosyyttien erittelylaskennassa solut eritellään sauva- tai liuskatumaisiin neutrofiileihin, eosinofiileihin, basofiileihin, monosyytteihin ja lymfosyytteihin. Poikkeavat solutyypit ilmoitetaan osana erittelylaskentaa (varhaismuodot) tai

sanallisena kommenttina (morfologiset poikkeavuudet) tuloksen yhteydessä. Leukosyyttien erittelylaskennan tulokset ilmoitetaan yleensä prosentteina. (Mahlamäki 2004, 280–281.)

Leukosyyttien erittelylaskennan lisäksi soluista tarkastellaan niiden morfologiaa. Neutrofiileistä tarkastellaan tuman liuskoittumista ja sytoplasman granulaatiota. Neutrofiilien tuma on yliliuskoittunut eli hypersegmentoitunut, kun liuskoja on kuusi tai enemmän. Yliliuskoittunut neutrofiili voi olla myös poikkeuksellisen iso (25–30 µm). Tuma on aliliuskoittunut eli hyposegmentoitunut, kun se koostuu yhdestä tai kahdesta pyörityneestä lohkoista. Niiden kromatiini on erittäin tiivistynyttä ja tumalohkot ovat liittyneet toisiinsa ohuella kromatiinisäikeellä. Hyposegmentaatioita esiintyy muun muassa Pelger-Huëtin anomaliassa, jossa tuma on kaksilohkoinen ja muistuttaa silmälaseja. (Ruutu ym. 2007, 751; Bain 2008, 49.) Hypergranulaatiota esiintyy usein infektioiden yhteydessä. Tällöin granulan määrä lisääntyy ja se on karkeampaa ja värjäytyy voimakkaan tummaksi. Hypergranulaatiota kutsutaan myös toksiseksi granulaksi ja karkeaksi granulaksi. Hypogranulaatioita eli granuloiden vähentymistä esiintyy erilaisissa kypsymishäiriöissä. (Bain 2006a, 98–100.) Eosinofiilien ja basofiilien morfologiassa esiintyy harvemmin merkittäviä poikkeamia (Mahlamäki 2004, 280).

Lymfosyyttien morfologia on terveelläkin ihmisellä hyvin vaihteleva, on isoja lymfosyyttejä, suuria granulaarisia lymfosyyttejä eli LGL-soluja (large granular lymphocyte), pieniä lymfosyyttejä ja pieni määrä reaktiivisia muotoja (Mahlamäki 2004, 280). Sytoplasman värjäytyminen reunoilta tummemmaksi kertoo lymfosyyttien reaktiivisuudesta tai atypiasta (Pelliniemi 1998, 1181). Reaktiivisuus lisääntyy erityisesti virusinfektioissa. Reaktiivisessa lymfosyytissä sytoplasman osuus lisääntyy ja siinä voi esiintyä vakuoleja tai granuloita. Sytoplasma voi värjäytyä myös kokonaan voimakkaan siniseksi. Reaktiivisen lymfosyytin koko kasvaa normaaliin lymfosyytiin verrattuna ja solun koko voi olla jopa 25–30 µm. (Ruutu ym. 2007, 752.) Atyypisiä lymfosyyttejä esiintyy esimerkiksi leukemioissa ja lymfoomissa. Karvasoluleukemiassa soluissa on runsaasti vaaleaa sytoplasmaa, solun reuna on repaleinen ja joissakin soluissa voidaan erottaa karvamaisia sytoplasman ulokkeita. (Pelliniemi 1998, 1181; Ruutu ym. 2007, 752.) Mycosis fungoides on ihoon paikallistuva T-solulymfooma. Taudin leukemiso-

tunutta muotoa kutsutaan Sézaryn oireyhtymäksi, jossa esiintyy epäsäännöllisen tumarakenteen omaavia Sézaryn soluja. Sézaryn solut voivat olla normaalin lymfosyytin kokoisia tai 2-3 kertaa suurempia. Ne ovat niukka sytoplasmaisia, tuma on hypersegmentoitunut, useaan kertaan laskostunut ja aivomainen. (Bain 2006a, 451–452.) Kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa sivelyvalmistuksessa esiintyy usein sivelyvalmisteen teon yhteydessä hajonneita isoja lymfosyyttejä, joista on vain tuma jäljellä. Näitä soluja kutsutaan Gumbrechtin varjosoluiksi. (Howard & Hamilton 2008, 46.)

7.2.3 Trombosyyttien mikroskooppinen tarkastelu

Mikroskooppisessa tarkastelussa arvioidaan trombosyyttien kohdalla niiden määrää, ryhmittymistä ja morfologiaa. Tarkastelu tapahtuu alueelta, josta suoritetaan myös erytrosyyttien tarkastelu (kuvio 11, sivu 34). Normaalisti trombosyytit esiintyvät yksittäin, mutta voivat joskus muodostaa trombosyyttiagregaatteja tai ryhmittyä neutrofiilien pinnalle (trombosyyttien satellismi). Trombosyyttien morfologiset poikkeavuudet ovat harvinaisia. Tavanomaista kookkaampia trombosyyttimuotoja voi esiintyä muun muassa tiloissa, joissa trombosyyttien tuotanto on vilkastunut tai myelodysplastisissa oireyhtymissä. (Pellinieni 1998, 1184; Bain 2006a, 125–126.)

8 MILLOIN ON AIHEELLISTA TEHDÄ SIVELYVALMISTE?

Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa on käytössä kaksi Sysmex XE-5000™ –verenkuva-analysaattoria. Leukosyyttien erittelylaskenta tehdään normaalisti verenkuva-analysaattorilla, mutta verenkuva-analysaattorin hälyttäessä annettujen rajojen rikkoutuessa, menee näyte mahdollisesti mikroskooppiseen tarkasteluun.

Leukosyyttien määrän ollessa $0,5-2,0 \times 10^9 / l$ näyte menee mikroskooppiseen tarkasteluun. Sysmex XE-5000™:n antaessa *WBC abn scattergram* –hälytyksen (epänormaali hajontakuviot leukosyyteissä) menee näyte mikroskooppiseen tarkasteluun, jos solupopulaatiot eivät erotu kuvaajalla toisistaan tai jokin diffiparametri puuttuu. Sysmex XE-5000™:n hälyttäessä solujen epäkypsyyttä *Immature Gran?* (näytteessä on mahdollisesti epäkypsiä granulosityttejä) tai *Blasts?* (näytteessä on mahdollisesti blasteja) näyte menee aina mikroskooppiseen tarkasteluun. (Validointisäännöt SIS-ohjelmassa 2011, 4-5.)

Monocytosis (monosyyttien absoluuttinen määrä $> 2 \times 10^9 / l$) tai *Basophilia* (basofiilien osuus $> 5 \%$) –hälytyksen ilmetessä näyte menee mikroskooppiseen tarkasteluun. Sysmex XE-5000™:n antaessa *Abn lymphocytes/L-blast?* (näytteessä on mahdollisesti epätyypillisiä lymfosyyttejä tai lymfoblasteja) tai *Atypical lymphocytes?* (näytteessä on mahdollisesti epätyypillisiä lymfosyyttejä) –hälytyksen, menee näyte mikroskooppiseen tarkasteluun. *NRBC?* (näytteessä on mahdollisesti erythroblasteja) –hälytyksen ilmetessä näyte menee mikroskooppiseen tarkasteluun. (Validointisäännöt SIS-ohjelmassa 2011, 4-5.)

Yleiskriteerinä näytteen mikroskooppiselle tarkastelulle pidetään monissa hematologian laboratorioissa poikkeavaa tulosta kahdessa eri parametrissa. Trombosyytteihin liittyvien hälytysten kohdalla riittää yleensä näytteen katsominen mikroskoopissa natiivisti. Erytrosyytteihin liittyvät hälytykset eivät yleensä johda näytteen mikroskooppiseen tarkasteluun. Näytteestä voidaan pyytää myös solujen morfologinen tarkastelu (B-Morfo), jolloin näytteestä tehdään siveilyvalmiste, jonka mikroskooppisen tarkastelun suorittaa yleensä erikoislääkäri.

9 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Manuaalisen ja automaattisen sivelyvalmisteen teon menetelmävertailuja ei ole julkaistu Suomessa. Ulkomaisia julkaisuja löytyi muutamia. Gemen, de Wit, van Gerve ja de Jongh-Leuvenink (2009, 719–723) ovat julkaisseet Alankomaissa tehdyn tutkimuksen luuydinvalmisteiden värjäämisestä Sysmex SP-1000i™ –automaatilla. Sysmexin SP-100™ -veto- ja värjäysautomaatilla on tehty vuonna 2000 kaksi manuaali- ja automaattitekniikkaa vertailevaa tutkimusta. Pawlick ja Relopez (2000, 26–29) ovat julkaisseet Californiassa Yhdysvalloissa tehdyn tutkimuksen ja Bron, Jellema, Noordervliet, Reymer, Baelde, Paauwe, den Ottonlander ja Kluuin-Nelemans (2000, 71–76) Alankomaissa tehdyn tutkimuksen. Sysmex SP-100™ eroaa Sysmex SP-1000i™:stä siten, että se on pelkkä vetoautomaatti ja siinä on viisi hematokriittiin perustuvaa veto-ohjelmaa kun SP-1000i™ on sekä veto- ja värjäysautomaatti ja siinä on kahdeksan hematokriittiin perustuvaa veto-ohjelmaa. Vuonna 2008 Simson, Gascon-Lema ja Brown ovat tehneet samantyyllisen tutkimuksen käyttäen Beckman Coulter LH755 –veto- ja värjäysautomaattia (Simson, Gascon-Lema & Brown 2010, 64-76).

Gemenin ym. (2009, 719–723) tekemässä tutkimuksessa vertailtiin manuaali- ja Sysmex SP-1000i™ –automaatin värjäyksiä. Tutkimuksen tarkoituksena oli optimoida Sysmex SP-1000i™ –automaatin värjäysohjelma luuydinnäytteille. Pawlickin ja Relopezin (2000, 26–29) tutkimuksessa kroonista myeloista leukemiaa sairastavan potilaan näytteestä vedettiin sivelyvalmisteet Sysmex SP-100™ –automaatilla ja värjättiin manuaalisesti. Pawlickin ja Relopezin mukaan automaattilla vedetyt sivelyvalmisteet osoittautuivat laadukkaimmiksi ja toistettavuus sivelyvalmisteiden välillä oli parempaa kuin manuaalisesti vedetyissä sivelyvalmisteissa. Bronin ym. (2000, 71–76) tekemässä tutkimuksessa tutkittiin nimenomaan sivelyn laatua. Sysmex SP-100™ –automaatilla tehdyt lasit olivat osoittautuneet huonommiksi kuin manuaalisesti tehdyt, joten Sysmex SP-100™ –automaatin veto-ohjelma optimoitiin tutkimuksessa. Tutkimuksessa selvisi myös, että Sysmex SP-100™ –automaatilla tehdyissä sivelyvalmisteissa varjosolujen määrä oli suurempi, jopa kolminkertainen, verrattuna manuaalisesti tehtyihin sivelyvalmisteisiin erityisesti kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa.

Simsonin ym. (2010, 64–76) tekemässä tutkimuksessa vertailtiin manuaalisesti ja Beckman Coulter LH755 –veto- ja värjäysautomaatilla tehtyjä sivelyvalmisteita. Tutkimus oli julkaistuista tutkimuksista kattavin sivelyvalmisteen teon manuaali- ja automaattitekniikkaa vertaileva tutkimus. Näytteitä oli 139 ja niiden leukosyyttiarvot vaihtelivat välillä $1.0\text{--}352.8 \times 10^9 / l$. Leukosyyttien erittelylaskennassa tulosten ero manuaalisesti ja automaatilla tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä oli alle viisi prosenttia. Leukosyyttisolukasoja, joissa oli kahdesta kolmeen solua, esiintyi enemmän automaatilla tehtyjen sivelyvalmisteiden häntäosassa kuin manuaalisesti tehdyissä sivelyvalmisteissa, tällä ei ole kuitenkaan kliinistä merkitystä. Leukosyyttisolukasoja, joissa oli yli neljä solua, esiintyi saman verran sekä manuaalisesti että automaatilla tehdyissä sivelyvalmisteissa. Makroskooppisesti muutamassa automaatilla tehdyssä sivelyvalmisteessä näkyi erillinen solulinja sivelyvalmisteen hännässä, niillä ei ollut kuitenkaan vaikutusta leukosyyttien erittelyjakaumaan. Varjosoluja esiintyi useammin automaatilla tehdyissä sivelyvalmisteissä kuin manuaalisesti tehdyissä, kuitenkin huomattavasti vähemmän kuin Bronin ym. (2000, 71–76) tekemässä tutkimuksessa. Simsonin ym. (2010, 64–76) tekemän tutkimuksen lopputuloksena manuaalisesti ja Beckman Coulter LH755 –veto- ja värjäysautomaatilla tehtyjen sivelyvalmisteiden laadun välillä ei ole kliinisesti merkittäviä eroja.

10 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Empiiriset tutkimukset perustuvat menetelmiin, jotka on kehitetty teoreettisten tutkimusten pohjalta. Empiirisissä tutkimuksissa tutkimusongelmana voi olla jonkin ilmiön syiden selvittäminen tai ratkaisun löytäminen jonkin asian toteuttamiseen parhaalla mahdollisella tavalla. Lisäksi tutkimuksella voidaan selvittää toteutuuko käytännössä jokin teoriasta poimittu hypoteesi. Kokeellinen tutkimus kuuluu empiirisiin eli havainnoiviin tutkimuksiin. (Heikkilä 2008, 13.) Opinnäytetyömme on kokeellinen, vertaileva tutkimus. Anttilan mukaan kokeellisen tutkimuksen avulla tutkitaan jonkin ilmiön vaikutusta johonkin kontrolloiduissa olosuhteissa (Anttila 2005, 183–184). Opinnäytetyössä tutkitaan sivelyvalmisteiden valmistuksessa käytetyn menetelmän vaikutusta sivelyvalmisteen laatuun. Vilkan mukaan vertailevan tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää paremmin tarkasteltavaa asiaa kahden tai useamman tutkimuskohteen avulla sekä tuoda selkeämmin esille asioiden välisiä eroja. Aineiston keräystavaksi soveltuu hyvin muun muassa havainnointi. (Vilka 2007, 21.) Opinnäytetyössä vertaillaan sivelyvalmisteen valmistusmenetelmiä.

10.1 Kokeellinen tutkimus

Kokeellisen tutkimuksen tavoitteena on ennemminkin selittää kuin ennustaa ilmiöitä. Pidemmällä aikavälillä kokeellisen tutkimuksen tavoitteena on tulosten yleistettävyyden tutkimuskohteen ulkopuolelle. (Soininen 1995, 76.) Tutkija voi vaikuttaa tapahtumiin ja havainnoida haluamiensa tekijöiden välistä suoraa syy-yhteyttä kokeellisessa tutkimuksessa. Kokeellisessa tutkimuksessa havaintojen teko on systemaattista ja kontrolloitua, jolloin tapahtumien kulku on raportoitava sellaisella tarkkuudella, että tutkimuksen suoritus on mahdollista toistaa. (Anttila 2005, 269–270.)

Kokeellisella tutkimuksella on kolme perusominaisuutta: standardoitavuus, manipuloitavuus sekä kontrolloitavuus. Standardoitavuuden tarkoituksena on ulkoisten olosuhteiden hallitseminen siten, että niitä on mahdollista vakioida tai

harkitusti ja systemaattisesti muunnella. (Soininen 1995, 76.) Kokeellisessa tutkimuksessa yritetäänkin tutkia vain tutkitun muuttujan vaikutusta vakioimalla muut tekijät (Heikkilä 2008, 21). Mahdollisuutta käsitellä riippumatonta muuttujaa lähtötilanteen siitä kärsimättä kutsutaan manipulointavuudeksi. Kontrolloituudella puolestaan tarkoitetaan sitä että riippumattomat muuttujat eivät vaihtelee kontrolloimattomina tutkimuksessa. Lisäksi siinä pyritään riippuvaan muuttajaan vaikuttavien tekijöiden eliminoimiseen, vakioimiseen sekä kontrolloimiseen. (Soininen 1995, 76.)

Riippumaton muuttuja tarkoittaa muuttujaa, joka on tutkimuksen tekijän mitattavissa, manipuloitavissa tai validoitavissa päättäessään sen suhteesta tutkittavaan ilmiöön. Riippumaton muuttuja on sellainen, joka on riippumaton tutkittavasta ilmiöstä ja jonka vaikutus riippuvaan muuttajaan yritetään selvittää. Riippuva muuttuja on puolestaan tutkimuksen kohteena oleva ilmiö tai tekijä, jota tarkkaillaan selvitetessä riippumattoman muuttujan vaikutuksia. (Soininen 1995, 69.) Opinnäytetyössä muuttujana on verensivelyvalmisteen valmistusmenetelmä. Tutkimuksessa pyritään vakioimaan menetelmästä riippumattomat sivelyvalmisteiden laatuun vaikuttavat tekijät, joita ovat muun muassa näyte, sen käsittely ja säilytys.

10.2 Otos

Perusjoukosta valitaan otannan avulla otos, johon tutkittava muuttuja vaikuttaa. Perusjoukko tarkoittaa tutkimuksen kohteena olevaa joukkoa, josta halutaan tehdä päätelmiä. Otos muodostuu havaintoyksiköistä, joista halutaan saada selville tutkittavana olevaa tietoa. Otos edustaa perusjoukkoa. Se on perusjoukon osa, jonka avulla voidaan saada kokonaiskuva koko tutkittavasta kohde-ryhmästä. (Vilkkä 2007, 51–53; Heikkilä 2008, 33–34.) Jotta tutkimuksen tulokset olisivat luotettavia, otoksen tulisi edustaa hyvin perusjoukkoa. Otoksen tulisi vastata perusjoukkoa tutkittavien ominaisuuksien suhteen, jolloin otoksessa pitäisi olla samoja ominaisuuksia samassa suhteessa kuin perusjoukossa. (Heikkilä 2008, 33–34.) Perusjoukkona opinnäytetyössä on Seinäjoen keskus-

sairaalassa hematologian laboratoriossa tehtävät näytteet, joista tehdään verenkuvaa-analysaattorilla erittelylaskenta.

Otantamenetelmiä on erilaisia ja oikean menetelmän valinta on edustavan otoksen saamiseksi tärkeää. Käytettävän menetelmän valinta riippuu muun muassa perusjoukon koosta ja tutkimuskohteesta, resursseista ja tutkimuksen tavoitteista. (Vilka 2007, 56; Heikkilä 2008, 35–36.) Opinnäytetyössä käytetään otantamenetelmänä harkinnanvaraista otantaa. Vilkan mukaan harkinnanvaraisessa otannassa tutkimuskohteet valitaan tutkijan oman harkinnan mukaisesti hänen parhaalla katsomallaan tavalla, mutta kuitenkin perustellusti (Vilka 2007, 58). Perusjoukosta valitaan mahdollisimman kattava otos, jossa tulisi esille mahdollisimman monipuolisesti veren sivelyvalmisteet. Tämä pyritään varmistamaan valitsemalla otokseen näytteitä, joiden hemoglobiini pitoisuus, leukosyytti-, erytrosyytti- ja trombosyyttiarvot ovat vaihtelevia.

10.3 Havainnointilomake

Havainnointilomakkeen suunnittelu vaatii muun muassa kirjallisuuteen tutustumista, käsitteiden määrittelyä, tutkimusongelman miettimistä, tutkimuksen tavoitteiden päättämistä sekä tutkimusasetelman valintaa. Lomaketta suunniteltaessa tulee ottaa huomioon aineiston käsittelymenetelmä. Kysymyksiä laadittaessa tulee miettiä millä tavalla saadaan varmasti vastaus tutkimusongelmaan, minkä tyyppisiä kysymyksiä käytetään ja että kysymykset on ymmärrettävissä yksiselitteisesti. Hyvä havaintolomake on selkeä ja siisti. Teksti ja kysymykset on aseteltu lomakkeeseen hyvin. Vastausohjeet ovat yksinkertaiset ja helposti ymmärrettävissä. Kysymykset etenevät loogisesti ja samaan aiheeseen liittyvät kysymykset on jaoteltu selkeillä otsikoilla kokonaisuuksiksi. Hyvä lomake on myös esitestattu ja sen tulokset on helppo syöttää tilasto-ohjelmaan. (Vilka 2007, 63–79; Heikkilä 2008, 47–49.) Näitä piirteitä käytetään perustana havainnointilomakkeen laadinnassa (liite 1).

10.4 Tulosten analysointi

Tulosten analysointi alkaa aineiston käsittelyllä, joka sisältää lomakkeiden tiedon tarkistamisen, tietojen syötön ja tallentamisen tietokoneelle sellaisessa muodossa, että niitä voidaan käsitellä numeerisessa muodossa tilasto- ja taulukko-ohjelmilla. Tietojen tarkistamisen aikana tutkija käy läpi täytettyjen lomakkeiden tiedot, arvioi vastausten laadun, puuttuvat tiedot sekä virheet. Puuttuvat tiedot voivat olla havaintoyksiköiden tai havaintoyksiköiden muuttujien tietoja. Tutkija voi käsitellä puuttuvia tietoja joko ottamalla ne mukaan analyysiin ja käsittelemällä ne omana luokkanaan tai jättämällä puuttuvat tiedot kokonaan pois. Tutkijan on kuitenkin varmistettava, etteivät puuttuvien tietojen poistaminen vääristä tutkimuksen tuloksia. Analyysiin mukaan valittujen puuttuvien tietojen erityisluonteen tulisi tulla esille havaintomatriisissa. (Vilkkä 2007, 106–108.) Kaikista tarkastelun kohteen olevista sivelyvalmisteista ei saatu tulosta, joidenkin arviointikohteiden osalta. Nämä puuttuvat tiedot otettiin kuitenkin mukaan tulosten analysointiin.

Havaintomatriisi tarkoittaa taulukkoa, johon lomakkeiden tiedot syötetään ja tallennetaan (Vilkkä 2007, 111). Tietojen syötössä tulee olla huolellinen, sillä tallennusvirheet ovat yleisiä ja niiden ilmeneminen puolestaan aiheuttaa mittausvirhettä. Tämä johtaa tulosten luotettavuuden heikkenemiseen. Tietojen syötön jälkeen tutkijan tulee tarkistaa, että havaintomatriisiin syötetyt tiedot vastaavat lomakkeessa olevia tietoja. Tällöin varmistetaan jo analyysivaiheessa, ettei tulosten virheellisyydestä johtuvia tulkintavirheitä synny. (Vilkkä 2007, 114.) Virheiden muodostuminen pyritään välttämään syöttämällä lomakkeiden tiedot huolellisesti oikeisiin havaintomatriiseihin, kunkin kysymyksen tiedot omaansa. Vielä tämän jälkeen lomakkeiden ja havaintomatriisien yhdenmukaisuus tarkistetaan tallennusvirheiden muodostumisen välttämiseksi.

Havaintomatriiseista voi muodostaa muun muassa erilaisia diagrammeja, kuvaajia ja suorja. Regressiosuoran avulla voidaan kuvata kahden muuttujan välistä lineaarista riippuvuutta. Regressiosuoraa kuvataan havaintokaaviossa, jossa toinen muuttuja on x-akselilla ja toinen y-akselilla. Havaintopari eli havaintokaaviossa olevan yksittäisen pisteen koordinaatit kertoo yhden tilastoyksikön

arvot näihin muuttujiin tarkasteltuna. Regressiosuoran yhtälö saadaan laittamalla suora havaintoparien muodostamaan pistejoukkoon siten, että suoran ja pisteiden välisten y-akselin suuntaisten etäisyyksien neliöiden summa on mahdollisimman pieni. (Heikkilä 2008, 92–93.)

Regressiosuoran yhtälö on $y=a+bx$, jossa b on kulmakerroin ja a on vakio. Kulmakerroin b tunnetaan myös nimellä regressiokerroin. Se kertoo, kuinka paljon y :n arvo keskimäärin muuttuu x arvon muuttuessa yhden yksikön verran. (Heikkilä 2008, 93.)

Kulmakerroin b saadaan kaavasta 1:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (1)$$

Vakio a saadaan puolestaan kaavasta 2:

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2)$$

Korrelaatiokerrointa käytetään kahden muuttujan välisen riippuvuuden mittaamiseen. Korrelaatio kuvaa riippuvuuden suuntaa, voimakkuutta sekä yhteisvaihtelua. Kerroin vaihtelee välillä $-1:n$ ja $+1:n$ välillä ja se kuvaa kuinka hyvin muuttujia kuvaavat pisteet osuvat samalle suoralle. Mitä lähempänä kerroin on arvoa $+1$, sitä voimakkaampi on positiivinen korrelaatio eli toisen muuttujan kasvaessa myös toinen muuttuja kasvaa. Vastaavasti jos kerroin on lähellä arvoa -1 , on muuttujien välillä voimakas negatiivinen korrelaatio, jolloin toisen muuttujan kasvaessa toinen muuttuja pienenee. Mikäli kerroin on lähellä arvoa 0 , ei muuttujien välillä ole lineaarista riippuvuutta. (Heikkilä 2008, 90-91; Vilka 2007, 130.) Havaintoaineiston ollessa riittävän suuri tulkitaan riippuvuusaste yleisesti siten, että korrelaatio on vahva, jos $r \geq 0,8$, kohtalainen, jos $0,3 \leq r < 0,8$ ja heikko, jos $r < 0,3$ (Ernwall, Ernwall & Kaukkila 2002, 78). Mikäli havaintopiste on kaukana suoralta, korrelaatiokerroin laskee. Vastaavasti jos havaintopiste on

lähellä suoraa, mutta kaukana origosta, korrelaatiokerroin nousee. Näin käy etenkin poikkeavien tulosten kohdalla.

Korrelaatiokerroin lasketaan kaavasta 3:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$= \frac{S_{xy}}{S_x S_y} \quad (3)$$

jossa

(x_i, y_i) = Jakauman muodostamat lukuparit

S_x ja S_y = Muuttujien x ja y keskihajonnat

10.5 Luotettavuus

Tutkimusta voidaan pitää onnistuneena, jos sen avulla saadaan luotettavia vastauksia tutkimuskysymyksiin (Heikkilä 2008, 29). Tuloksia ei voida pitää tosina ja pätevinä, mikäli tutkija käsittelee saatuja tuloksia oman alkuperäisen ajattelumallinsa mukaisesti (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 232). Tutkimus tulokset eivät saa olla tutkijasta riippuvaisia vaan niitä tulee käsitellä objektiivisesti (Heikkilä 2008, 31). Tutkimuksen luotettavuutta voidaan pitää hyvänä, jos otos vastaa hyvin perusjoukkoa ja mittaamisessa on vain vähän satunnaisvirheitä (Vilka 2007, 152). Tutkijan tulee olla tarkka ja kriittinen tietoja kerätessä, syöttäessä, käsiteltäessä ja tuloksia tulkittaessa, jotta vältetään näiden virheiden syntyminen (Heikkilä 2008, 30). Tutkimuksen luotettavuutta lisää tutkijan tarkka selostus kaikista tutkimuksen toteuttamisen vaiheista (Hirsjärvi ym. 2009, 232).

Kokeellisen tutkimuksen tuloksia tulee arvioida kriittisesti (Heikkilä 2008, 21). Arvioinnissa käytetään hyväksi reliabiliteettia ja validiteettia. Reliabiliteetti kuvaa

tutkimuksen luotettavuutta, joka tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta eli siis tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tuloksen reliabiliteettia voidaan pitää hyvänä, mikäli kaksi tutkijaa päätyy samaan tulokseen tai samaa tutkimuskohdetta tutkitaan eri tutkimuskerroilla ja saadaan sama tulos. (Vilkkä 2007, 149; Hirsjärvi ym. 2009, 231.) Tulosten luotettavuuden varmistamiseksi tarkastellaan tutkimuksen aluksi näytteenä olevia veren sivelyvalmisteita yhdessä opetusmikroskoopilla yhtenevän vastauskäytännön varmistamiseksi.

Validiteetti eli pätevyys tarkoittaa puolestaan tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä sen on tarkoituskin mitata (Hirsjärvi ym. 2009, 231). Validius varmistetaan etukäteen huolellisella suunnittelulla ja tarkoin harkitulla tiedonkeruulla, sillä mikäli mitattavia muuttujia ja käsitteitä ei ole tarkoin määritetty, eivät tuloksetkaan voi olla valideja (Heikkilä 2008, 30). Opinnäytetyön validiteetti varmistetaan perehtymällä ennen kokeellisen osuuden suoritusta aiheeseen liittyvään teoretiseen tietoon. Sen pohjalta valitaan tutkimusmenetelmä ja laaditaan kokeellisessa osuudessa käytettävän havaintolomakkeen kysymykset.

11 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

Saimme opinnäytetyömme aiheen alkusyksystä 2010 Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön ylikemistiltä Kari Åkermanilta. Aiheen saatamme aloimme perehtyä sitä koskevaan aineistoon. Keskustelimme loppuvuodesta 2010 Kari Åkermanin kanssa tarkemmin työn sisällöstä, jonka jälkeen aloimme suunnitella tarkemmin tutkimuksen kulkua ja kirjoittaa teoriaa opinnäytetyöhömmme. Opinnäytetyösuunnitelma valmistui helmikuussa 2011. Luvan opinnäytetyömme toteuttamiseen saimme Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön ylilääkäri Onni Niemelältä ja ylikemisti Kari Åkermanilta 25.4.2011.

Kävimme 14.4.2011 Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä keskustelemassa ylikemisti Kari Åkermanin ja kemisti Heidi Tuomen kanssa opinnäytetyöstämme. Keskustelimme kokeelliseen osuuteen valittavista näytteistä, sivelyvalmisteiden teosta sekä sivelyvalmisteiden vertailussa käytettävistä kriteereistä. Lisäksi tutustuimme Sysmex SP-1000i™-automaatin käyttöön.

11.1 Havainnointilomakkeen laadinta

Sivelyvalmisteista vertailemme sekä makroskooppisia että mikroskooppisia ominaisuuksia. Näytteiden makroskooppisen ja mikroskooppisen vertailun avuksi laadimme havainnointilomakkeen (liite 1). Havainnointilomakkeen laadinnan perustana käytimme Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa käytössä olevia sivelyvalmisteen tarkastelukriteereitä, jotka painottuvat mikroskooppiseen tarkasteluun. Lisäksi arvioinnin kohteeksi valittiin makroskooppisia ominaisuuksia. Havainnointilomake sisältää 14 kysymystä, jotka on jaettu viiteen eri osa-alueeseen: sivelyvalmisteen muoto ja värjäytyvyys, leukosyytit, trombosyytit ja erytrosyytit. Jokaisen osa-alueen lopussa on myös kohta muille huomioille. Havainnointilomake sisältää oman sarakkeen manuaalisesti ja automaattisesti tehdyille sivelyvalmisteille. Havainnointilomake käsittää

makroskooppisen tarkastelun, johon sisältyy sivelyvalmisteiden muodon ja värjäytyvyyden arviointi sekä mikroskooppisen tarkastelun leukosyyttien erittelyjakaumasta ja morfologiasta, trombosyyttien määrästä sekä hyalomeerin ja granulomeerin erottumisesta. Mikroskooppinen tarkastelu sisältää lisäksi erytrosyyttien koon, värjäytyvyyden, muodon, ryhmittymisen sekä inkluusiokappaleiden tarkastelun.

Laatiessamme havainnointilomaketta saimme kehitysehdotuksia opinnäytetyötämme ohjaavilta opettajilta ja opiskelutovereiltamme, jonka pohjalta muokkasimme havainnointilomakkeen lopulliseen muotoonsa. Esitestasimme havainnointilomakkeen kysymysten selkeyden ja ymmärrettävyyden muutamalla Tampereen Ammattikorkeakoulun Bioanalytiikan koulutusohjelman K08MBIOAN-ryhmän opiskelijalla. Havainnointilomake osoittautui toimivaksi sellaisenaan.

11.2 Tutkimusaineiston hankinta

Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion henkilökunta valmisti sivelyvalmisteet 14.4.–23.5.2011. Näytemuotona käytettiin kuivamuotoista EDTA K2-laskimoverta. Solujen morfologian säilyvyyden varmistamiseksi sivelyvalmisteet pyrittiin valmistamaan mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Käytännössä tämä ei kuitenkaan kaikkien näytteiden kohdalla toteudu, sillä osa aamulla Seinäjoen ympäristökunnissa otetuista näytteistä saapuu laboratorioon vasta iltapäivällä.

11.2.1 Tutkimusnäytteiden valinta

Näytteeksi valittiin Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion toivomuksesta mahdollisimman monipuolisia näytteitä. Vastasyntyneiden mikronäytteet rajattiin pois työstä, sillä niistä ei tällä hetkellä Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa tehdä sivelyvalmisteita Sysmex SP-1000i™-automaatilla. Näytteitä oli yhteensä 48, joista 2 normaaleja ja 46 patologisia,

Seinäjoella käytössä olevien kriteerien mukaan mikroskooppiseen tarkasteluun meneviä. Näytteiden leukosyyttien määrät vaihtelivat välillä $0,4-126,6 \times 10^9 / l$, erytrosyyttien määrät välillä $1,1-5,4 \times 10^{12} / l$, hemoglobiiniarvo välillä $42-179 \text{ g} / l$ sekä trombosyyttien määrät välillä $12-550 \times 10^9 / l$ (taulukko 5).

TAULUKKO 5. Tutkimuskohteena olevat näytteet

Leukosyyttien määrä	($\times 10^9 / l$)	0,4 – 126,6
Erytrosyyttien määrä	($\times 10^{12} / l$)	1,1 – 5,4
Hemoglobiini	(g / l)	42 - 179
Trombosyyttien määrä	($\times 10^9 / l$)	12 - 550

11.2.2 Sivelyvalmisteiden teko ja identifiointi

Jokaisesta näytteestä valmistettiin sivelyvalmisteet kahdella eri menetelmällä, menetelmällä A ja B. Menetelmä A on aiemmin Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa käytössä ollut ja menetelmä B nykyisin käytössä oleva menetelmä. Aiemmin käytössä olevassa menetelmässä sivelyvalmisteet vedettiin käsin ja värjättiin MGG-värjäyksellä Mirastainer® II –automaatilla. Nykyisin näytteet vedetään ja värjätään MGG-värjäyksellä Sysmex SP-1000i™ –automaatilla.

Menetelmässä A näytteet vedettiin Thermo Scientificin 76 x 26 millimetrin kokoisille Menzel-Gläser –objektilaseille käsin. Näytteet ilmakeivattiin puhaltimen alla ja värjättiin MGG-värjäyksellä Mirastainer® II –automaatilla ohjelmalla yksi. Mirastainer® II –automaatin toimintaperiaate ja värjäysohjelma yksi on käsitelty luvussa 4 sivulla 19.

Menetelmässä B sivelyvalmisteet vedettiin ja värjättiin Sysmex SP-1000i™ –automaatilla. Automaatin toimintaperiaate ja MGG-värjäysohjelma on käsitelty luvussa 5 sivulla 22. Sysmex SP-1000i™ –automaatti on yhteydessä laboratoriojärjestelmä SIS:iin, josta se saa näytteen hematokriittiarvon, jonka mukaan se valitsee näytteelle sopivan pisaran koon, vetokulman ja –nopeuden. Automaatti

käyttää Sysmexin SP-Slides objektilaseja, jotka ovat kooltaan 76 x 26 millimetriä.

Kaikki sivelyvalmisteet päällystettiin niiden säilyvyyden takaamiseksi DEPEX® -päällystysliimalla ja Thermo Scientificin 24 x 50 millimetrin kokoisilla ja 0,15 millimetrin paksuisilla Menzel-Gläser -laseilla. Sivelyvalmisteet numeroitiin juoksevalla numeroinnilla 1-48. Numeroinnin perään merkittiin lisäksi joko kirjain A (menetelmä A) tai kirjain B (menetelmä B).

11.2.3 Sivelyvalmisteiden tarkastelu ja tulosten kirjaaminen

Näytteiden mikroskooppinen tarkastelu tapahtui Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman tiloissa 9.-27.5.2011. Aikaa sivelyvalmisteiden tarkasteluun molemmat opinnäytetyön tekijät käyttivät noin 21 tuntia eli yhteensä sivelyvalmisteiden tarkasteluun käytettiin aikaa noin 42 tuntia. Tarkastelun tueksi saimme Sysmex XE-5000™- verenkuvaa-analysaattorin antamat tulokset. Leukosyyttien erittelylaskennassa laskettiin 100 leukosyyttiä sivelyvalmisteesta. Mikroskooppisen tarkastelun aluksi katsoimme yhdessä opetusmikroskoopilla näytteenä olevia verensivelyvalmisteita. Lisäksi katsoimme muutamia näytteitä rinnakkain siten, että molemmat katsoivat samat näytteet ensin itsenäisesti, jonka jälkeen vertasimme saamiamme tuloksia toisiinsa. Tällä tavalla varmistimme, että annamme samanlaisia vastauksia näytteiden morfologiasta ja erittelylaskennasta, eikä näytteiden mikroskooppisen tarkastelun tekijöiden välillä ole suurta virhettä aiheuttavaa eroa. Mikroskooppinen tarkastelu suoritettiin ZEISS Primo Star mikroskoopilla. Okulaarien suurennos oli 10-kertainen ja näkökenttäluku oli 20. Sivelyvalmisteiden mikroskooppinen esitarkastus suoritettiin 10-kertaisesti suurentavalla kuivaobjektiivilla ja solujen morfologian ja määrän arviointi sekä leukosyyttien erittelylaskenta 40-kertaisesti suurentavalla kuivaobjektiivilla, koska sivelyvalmisteet olivat päällystettyjä.

Sivelyvalmisteista otettiin sekä makroskooppisia ja mikroskooppisia kuvia. Mikroskooppiset kuvat kuvattiin Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan

koulutusohjelman tiloissa. Mikroskooppisissa kuvissa on käytetty 100-kertaisesti suurentavaa öljyimmersio-objektiivia sekä 2,2-kertaista digitaalista suurennosta.

11.3 Tutkimusaineiston kuvailu, käsittely ja analysointi

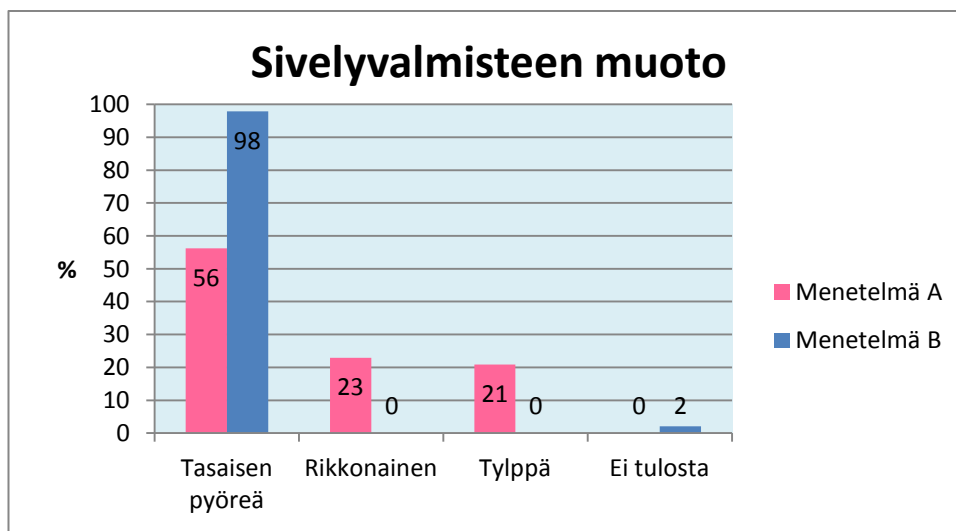
Havainnointilomakkeiden tiedot syötettiin Microsoft® Office Excel 2007 ohjelmistossa oleviin havaintomatriiseihin. Tietoja syötettäessä ne muutettiin numeeriseen muotoon. Avoimiin kommentteihin tuli vastauksia solulinjan ja varjosolujen esiintyvyydestä. Solulinja käsiteltiin tutkimustulosten analysointi osuudessa sanallisesti ja varjosoluista tehtiin havaintokuvio. Erytrosyyttien värjäytyvyyden ja poikilosytoosin arvioinnin tulosten syötössä havaintomatriisiin käytettiin multi-response muuttujaa, sillä yhdessä sivelyvalmisteessa on mahdollista vastata useampi vaihtoehto. Multiresponse muuttuja tarkoittaa tilastoyksikköä, jonka on mahdollista saada useita arvoja (Manninen 2004, 14). Excelissä olevat havaintomatriisit siirrettiin Tixel-ohjelmaan, jonka avulla tulokset analysoitiin ja ne muokattiin esitettävään muotoon. Tulosten analysoinnissa käytettiin pylväsdiagrammeja ja erittelylaskennan kohdalla regressiosuoraa sekä korrelaatiokerrointa.

12 TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimusaineisto koostuu 48 näytteestä (N=48), joista on tehty sivelyvalmiste menetelmällä A, jossa sivelyvalmiste on vedetty käsin ja värjätty Mirastainer® II –automaatilla ja menetelmällä B, jossa sivelyvalmiste on vedetty ja värjätty Sysmex™ SP-1000i -automaatilla. Makroskooppisessa tarkastelussa sekä leukosyyttien, trombosyyttien ja erytrosyyttien morfologian arvioinnissa N=48. Leukosyyttien erittelylaskennan kohdalla N=46, koska yhdessä näytteessä oli liian vähän leukosyyttejä erittelylaskennan suorittamiseen ja yhdessä menetelmällä B tehdyssä sivelyvalmisteesta oli iso reikä, joka esti erittelylaskennan suorittamisen. Makroskooppisen tarkastelun tuloksia sekä leukosyyttien, erytrosyyttien ja trombosyyttien arvioinnin tuloksia havainnollistetaan pylväsdiagrammien avulla ja leukosyyttien erittelylaskennan tuloksia regressiosuorien ja korrelaatiokerroimien avulla.

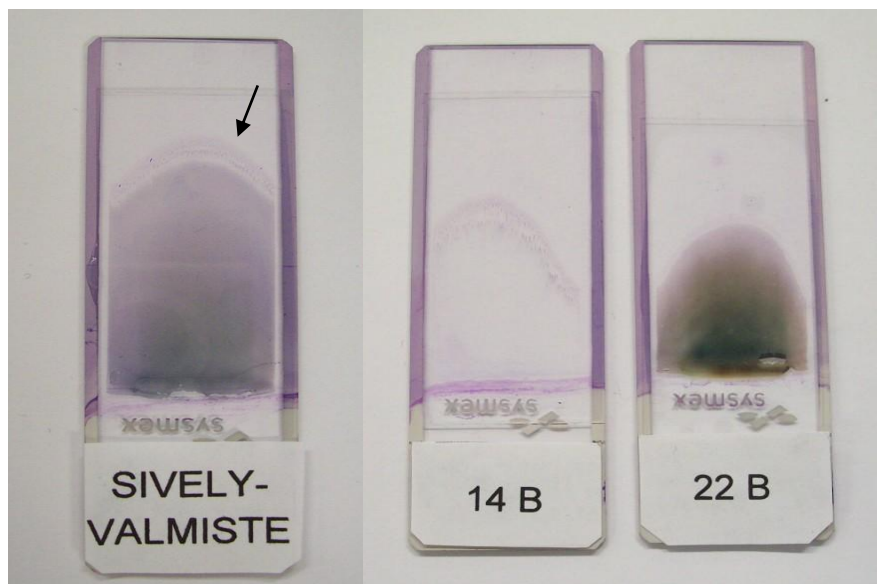
12.1 Sivelyvalmisteiden makroskooppinen tarkastelu

Sivelyvalmisteista arvioitiin makroskooppisesti niiden muotoa, tummuutta ja tasaisuutta. Menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista 98 prosenttia oli muodoltaan tasaisen pyöreitä (kuvio 1, sivu 56). Yhdestä menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta, koska siinä oli iso reikä (kuva 13, sivu 56). Menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista hieman yli puolet (56 %) oli tasaisen pyöreitä ja loput rikkonaisia (23 %) tai tylppiä (21 %). Menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet olivat muodoltaan tasalaatuisempia kuin menetelmällä A tehdyt.



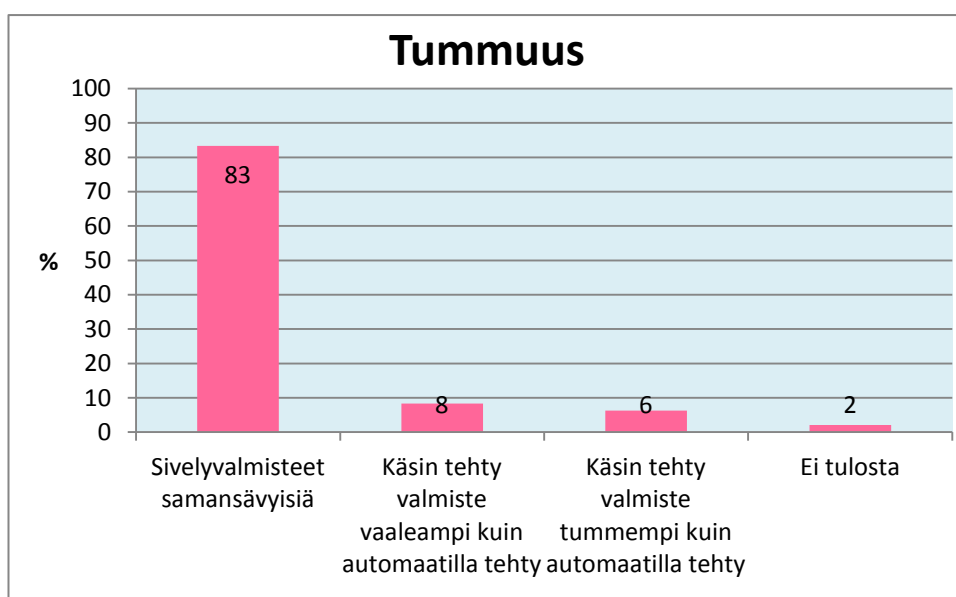
KUVIO 1. Sivelyvalmisteen muoto N=48

Kaikissa menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa oli sivelyn loppupäässä makroskooppisesti havaittava erillinen solulinja (kuva 13, nuoli). Kuvassa 13 on makroskooppisia kuvia menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista. Sivelyvalmisteessa 14 B on iso reikä ja sivelyvalmiste 22 B on paksu ja lyhyt. Lisää makroskooppisia kuvia sivelyvalmisteista löytyy liitteestä kaksi.



KUVA 13. Makroskooppisia kuvia menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista. (Kuva: Tiina Peltari)

Suurin osa (83 %) menetelmällä A ja menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista oli tummuudeltaan samansävyisiä (kuvio 2). Pieni osa (8 %) menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista on vaaleampia kuin menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet ja osa (6 %) menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista on tummempia kuin menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet. Yhdestä menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta sivelyvalmisteiden tummuutta tarkasteltaessa, koska siinä oli iso reikä. Kaiken kaikkiaan suurin osa eri menetelmillä tehdyistä sivelyvalmisteista on tummuudeltaan samansävyisiä. Sävyerot voivat johtua muun muassa sivelyvalmisteiden paksuudesta.



KUVIO 2. Sivelyvalmisteiden tummuus N=48

Kaikki sivelyvalmisteet, joista saatiin tulos, olivat tasaisesti värjäytyneitä (kuvio 3, sivu 58). Menetelmällä A tehdyt sivelyvalmisteet olivat punasävyisempiä kuin menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet, jotka olivat sinisävyisempiä, mikä johtuu mahdollisesti värjäysohjelman pienistä eroista ja eri menetelmissä käytetyistä eri valmistajien reagensseista (taulukko 1, sivu 19 ja taulukko 3, sivu 22).



KUVIO 3. Sivelyvalmisteiden tasaisuus N=48

12.2 Sivelyvalmisteiden mikroskooppinen tarkastelu

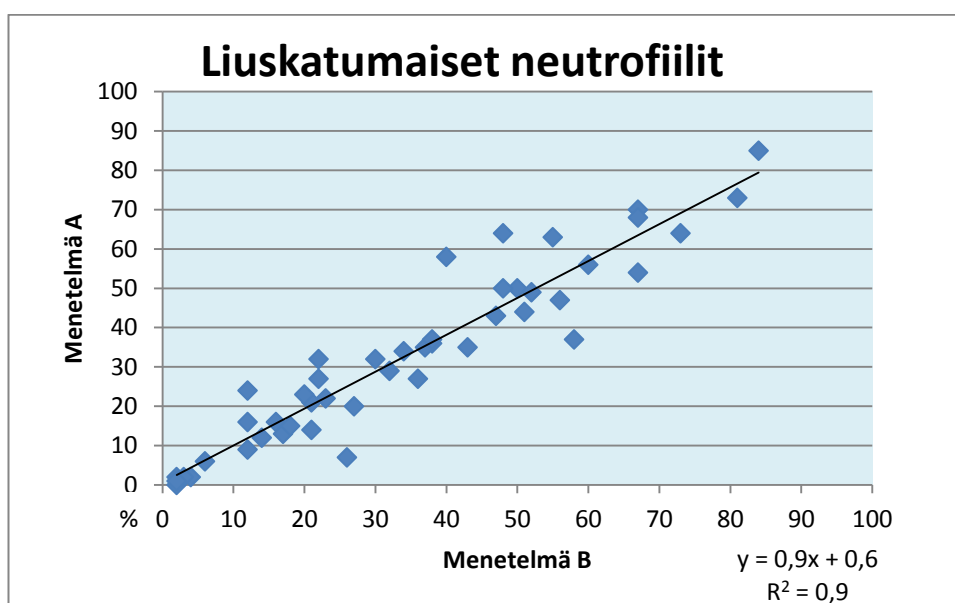
Sivelyvalmisteista arvioitiin mikroskooppisesti leukosyyttien, trombosyyttien ja erytrosyyttien morfologiaa ja määrää sekä suoritettiin leukosyyttien erittelylaskenta. Leukosyyteistä arvioitiin neutrofiilien granulan karkeutta ja tuman liuskoituneisuutta, lymfosyyteistä reaktiivisuutta ja atypiaa sekä monosyyteistä atypiaa.

12.2.1 Leukosyyttien erittelylaskenta

Leukosyyttien erittelylaskennan tulosten tarkasteluun on valittu neljä regressiosuoraa (liuskatumaiset neutrofiilit, sauvatumaiset neutrofiilit, lymfosyytit ja monosyytit), koska muiden solujen esiintyminen näytteissä oli vähäistä. Tästä johtuen regressiosuorat ja korrelaatiokertoimet eivät ole luotettavia joidenkin solujen kohdalla. Kaikki havaintokuvat löytyvät liitteestä 3. Havaintokuviossa y-akselilla on esitetty menetelmällä A ja x-akselilla menetelmällä B saadut tulokset havaintopisteinä. Havaintokuvioden asteikot ovat liuskatumaisten neutrofiilien, sauvatumaisen neutrofiilien, lymfosyyttien ja monosyyttien kohdalle 0-100

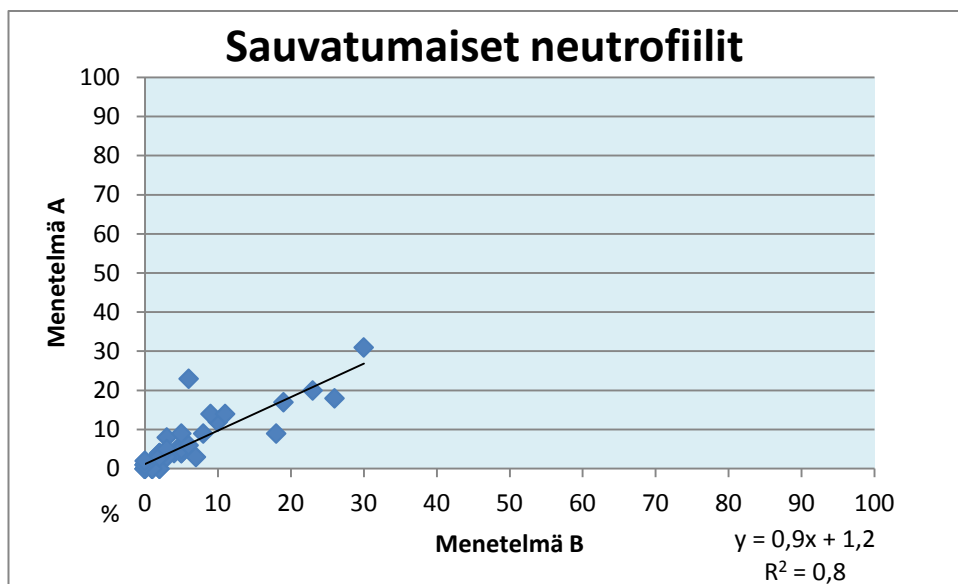
% ja muiden solujen kohdalla 0-15 %, sillä muiden solujen esiintyvyys näytteissä oli vähäistä. Tällä tavalla kuvioista saatiin selkeämpiä.

Liuskatunaisia neutrofiilejä esiintyi kaikissa 46 näytteessä. Kuten kuvioista neljä nähdään havaintopisteet sijoittuvat melko säännönmukaisesti koordinaatistoon. Tällöin riippuvuutta voidaan sanoa lineaariseksi. Koordinaatistoon on piirretty lineaarisuutta osoittamaan regressiosuora, josta voidaan nähdä havaintopisteiden sijainti suoraan nähden. Havainnoista laskettu korrelaatiokerroin on 0,9, joka osoittaa korrelaation olevan vahvaa.



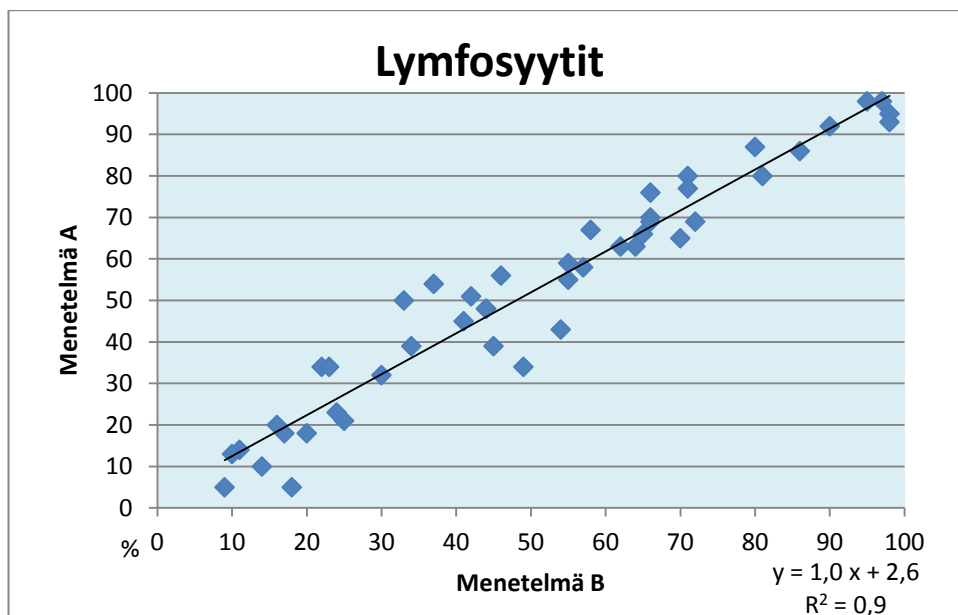
KUVIO 4. Liuskatunaiset neutrofiilit N=46

Sauvatunaisia neutrofiilejä esiintyi 41 näytteessä. Suurimmassa osassa näytteistä sauvatunaisia neutrofiilejä esiintyi alle kymmenen, joten havaintopisteet eivät erotu kunnolla toisistaan. Kuvioista viisi (sivu 60) kuitenkin nähdään, että havaintopisteet sijoittuvat melko säännönmukaisesti koordinaatistoon, jolloin riippuvuus on lineaarista. Korrelaatiokerroin on 0,9, joka osoittaa korrelaation olevan vahvaa.



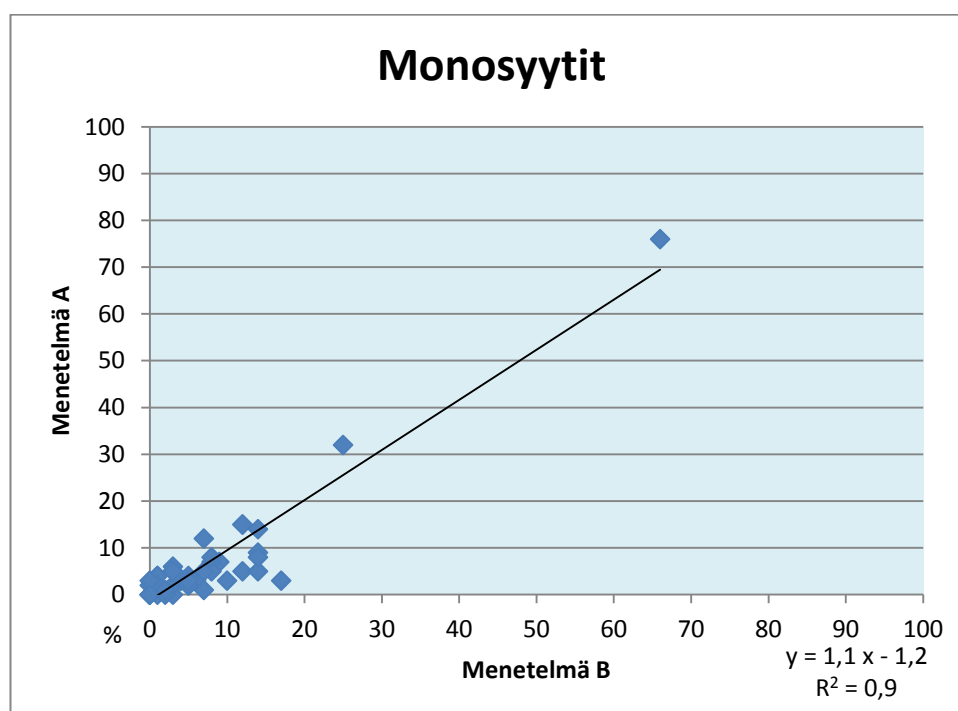
KUVIO 5. Sauvatumaiset neutrofiilit N=46

Lymfosyyttejä esiintyi kaikissa 46 näytteessä. Kuten kuviosta kuusi nähdään, havaintopisteet sijoittuvat koordinaatistoon melko säännönmukaisesti ja tasaisesti molemmin puolin regressiosuoraa. Tällöin riippuvuuden voidaan sanoa olevan lineaarista. Korrelaatio on todella vahva, sillä korrelaatiokerroin on 1,0.



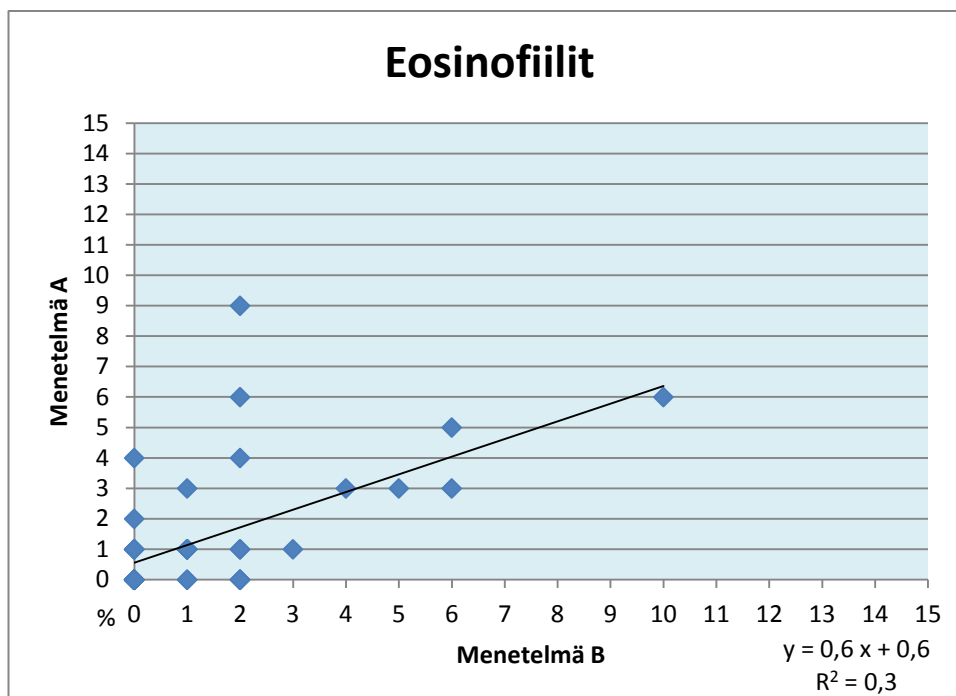
KUVIO 6. Lymfosyytit N=46

Monosyyttejä esiintyi 44 näytteessä. Suurimmassa osassa näytteistä monosyyttejä esiintyi alle 20, joten havaintopisteet eivät erotu koordinaatistossa kunnolla toisistaan. Kuviosta seitsemän kuitenkin nähdään, että havaintopisteet sijoittuvat melko säännönmukaisesti koordinaatistoon. Täten riippuvuus on lineaarista. Korrelaatiokertoimen arvo 0,9 osoittaa korrelaation olevan vahvaa. Korrelaatioita, erityisesti monosyyttien kohdalla, nostavat havainnointipisteet, jotka ovat lähellä käyrää, mutta kaukana origosta.



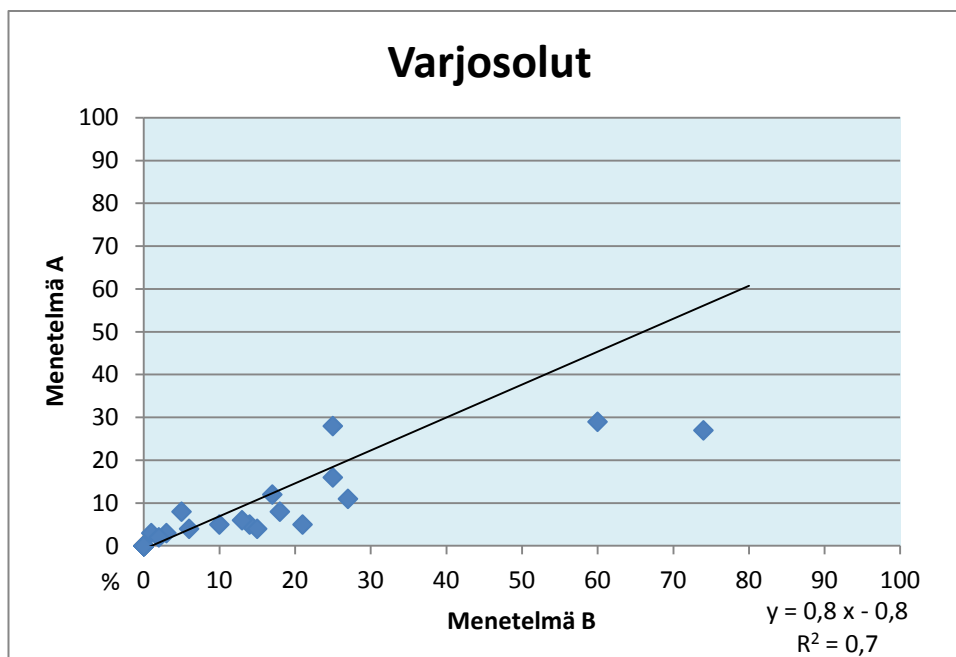
KUVIO 7. Monosyytit N=46

Regressiosuorat ovat lineaarisia ja korrelaatiokertoimet ovat voimakkaita liuskatumaisten neutrofiilien, sauvatumaisten neutrofiilien, lymfosyyttien ja monosyyttien kohdalla, joita esiintyi lähes kaikissa tarkasteltavissa näytteissä. Muiden solujen kohdalla lineaarisuus oli vaihtelevaa voimakkaasta huonoon ja korrelaatiokertoimet vaihtelivat vahvasta heikkoon johtuen solujen vähäisestä esiintymisestä tarkasteltavissa näytteissä. Tästä esimerkkinä eosinofiilit (kuvio 8, sivu 62). Eosinofiilien korrelaatiokerroin on 0,6, joka kertoo korrelaation olevan heikkoa. Kaiken kaikkiaan voidaan kuitenkin todeta, että leukosyyttien erittelykaumassa ei ole merkittäviä eroja menetelmän A ja menetelmän B välillä.



KUVIO 8. Eosinofiilit N=46

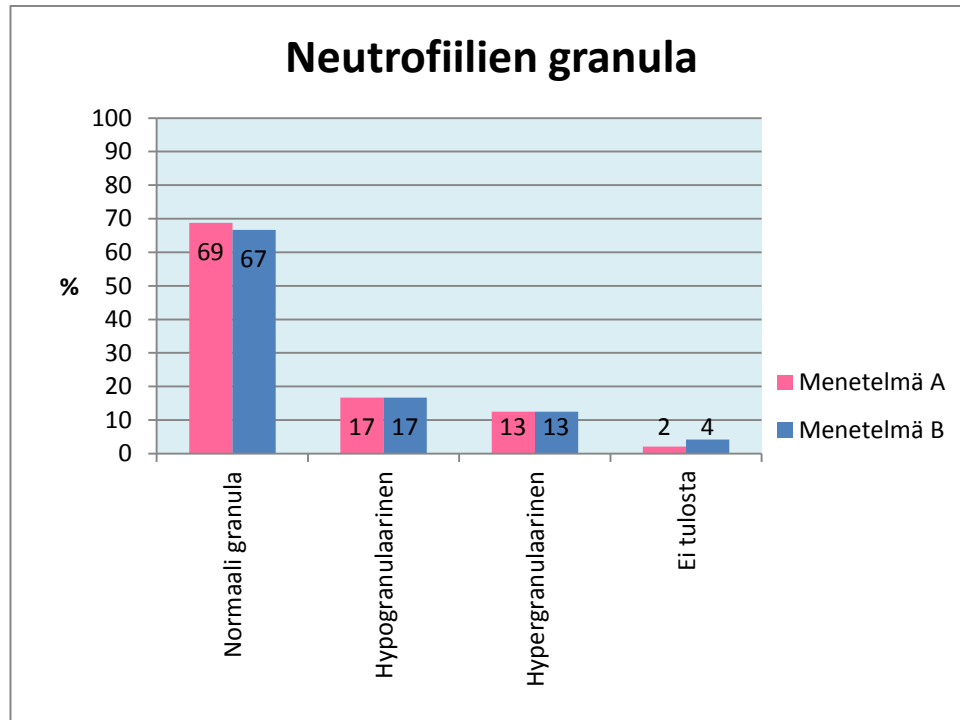
Vaikka varjosolut eivät varsinaisesti olleet tutkimuskohteena, valittiin ne kuitenkin yhdeksi tarkastelukohteeksi. Mikroskooppisen tarkastelun yhteydessä huomattiin eri menetelmien välillä eroavaisuuksia varjosolujen määrässä. Varjosoluja esiintyi 18 tutkimuksen kohteena olleessa näytteessä. Havainnointikuviosta yhdeksän (sivu 63) on havaittavissa pisteiden painottuminen regressiosuoran alapuolelle. Tämä johtuu siitä, että menetelmällä B on saatu suurempia tuloksia kuin menetelmällä A. Muutamassa näytteessä, joissa varjosoluja esiintyi erityisen paljon, oli varjosolujen määrä menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa jopa kaksinkertainen verrattuna menetelmällä A tehtyihin sivelyvalmisteisiin. Korrelaatiokerroin on 0,8, mikä kertoo korrelaation kuitenkin olevan vahvaa.



KUVIO 9. Varjosolut N=46

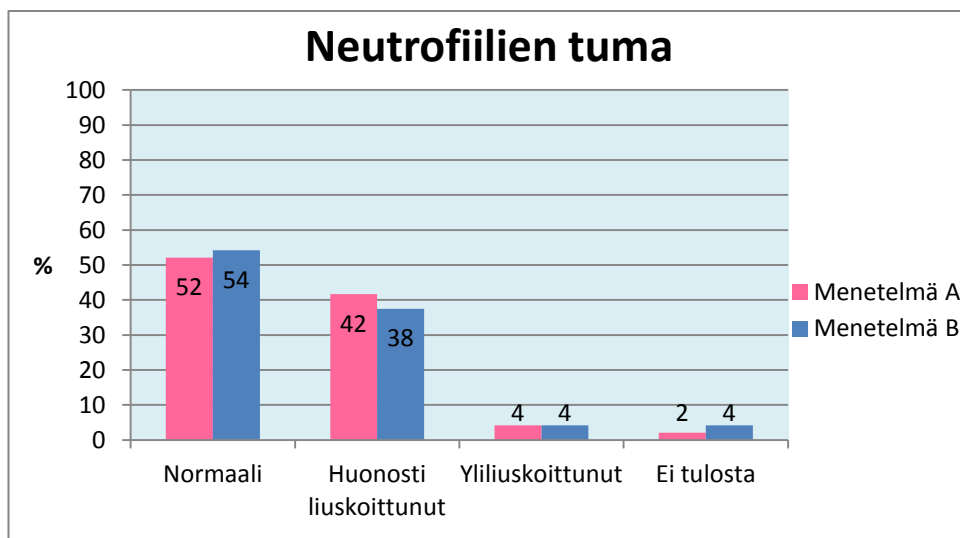
12.2.2 Leukosyyttien morfologia

Neutrofiilien granulan karkeuden suhteen ei ollut juurikaan eroa eri menetelmien välillä (kuvio 10, sivu 64). Normaali granula oli 69 prosentissa menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa ja 67 prosentissa menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa. Hypogranulaarisuuden ja hypergranulaarisuuden kohdalla eri menetelmien välillä ei ollut eroa. Hypogranulaarisia sivelyvalmisteita oli 17 prosenttia ja hypergranulaarisia 13 prosenttia. Yhdestä menetelmällä A ja kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta. Yhdessä näytteessä oli liian vähän leukosyyttejä morfologian arvioinnin suorittamiseen ja yhdessä menetelmällä B tehdyssä sivelyvalmisteessa oli iso reikä.



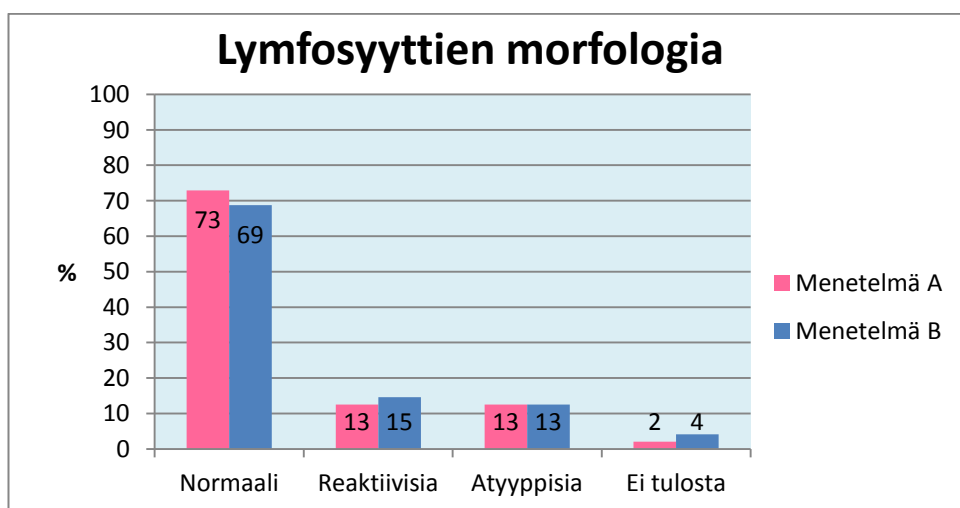
KUVIO 10. Neutrofiilien granula N=48

Neutrofiilien tuman liuskoittumisessa oli pientä hajontaa (kuvio 11, sivu 65). Menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista 52 prosenttia ja menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista 54 prosenttia oli tumaltaan normaaleja. Huonosti liuskoittunut tuma oli 42 prosentissa menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista ja 38 prosentissa menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista. Sekä menetelmällä A että menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa oli neljässä prosentissa tuman yliliuskoittuneisuutta. Yhdestä menetelmällä A ja kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta. Neutrofiilien morfologiassa ei ollut merkittäviä eroja eri menetelmällä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä.



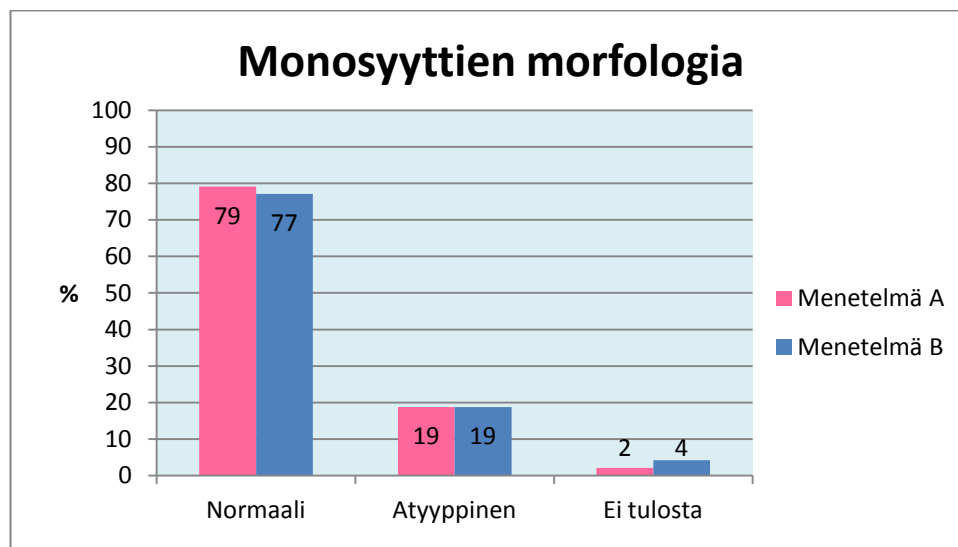
KUVIO 11. Neutrofiilien tuma N=48

Lymfosyyteistä menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa normaaleja oli 73 prosenttia ja menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa 69 prosenttia (kuvio 12). Reaktiivisia ja atyyppisia lymfosyyttejä oli molempia 13 prosenttia menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa. Menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa oli 15 prosenttia reaktiivisia ja 13 prosenttia atyyppisiä lymfosyyttejä. Yhdestä menetelmällä A ja kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta.



KUVIO 12. Lymfosyyttien morfologia N=48

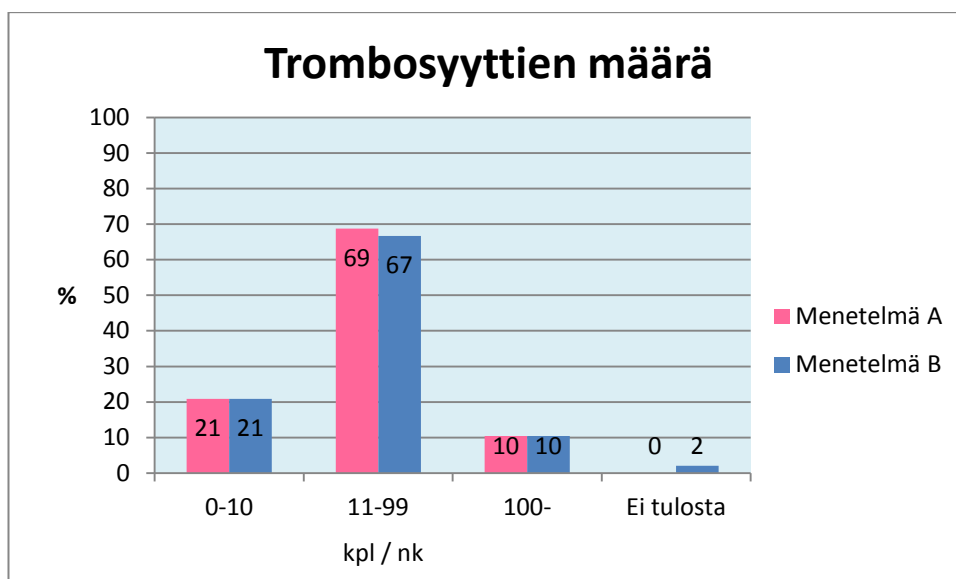
Monosyyttien morfologiassa eri menetelmien välillä oli vielä vähemmän eroja kuin lymfosyyttien morfologiassa. Monosyyteistä 79 prosenttia menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista ja 77 prosenttia menetelmällä B tehdyistä sivelyvalmisteista oli normaaleja (kuvio 13). Kummallakin menetelmällä atyyppisiä monosyyttejä oli 19 prosenttia. Yhdestä menetelmällä A ja kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta.



KUVIO 13. Monosyyttien morfologia N=48

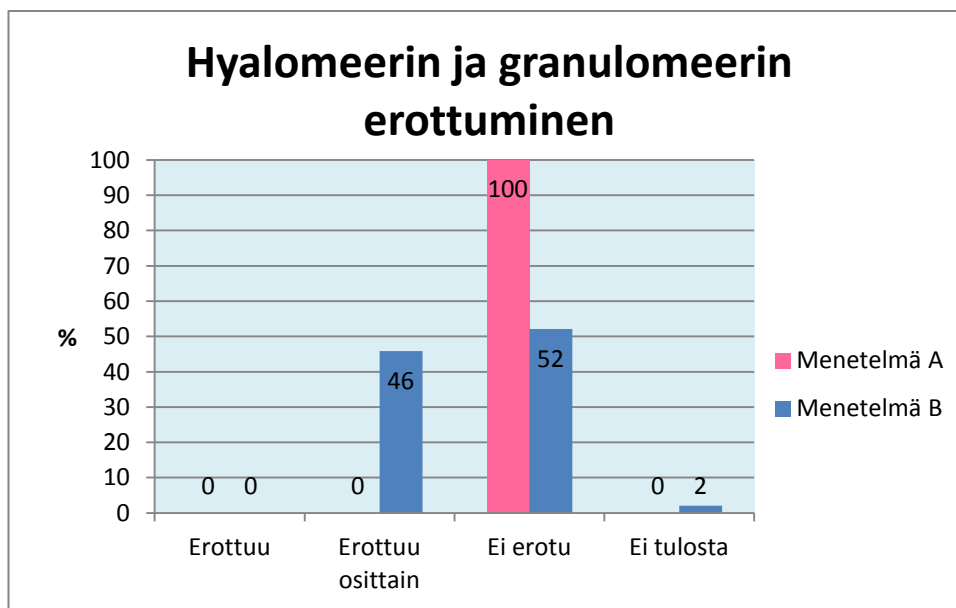
12.2.3 Trombosyyttien määrä ja morfologia

Trombosyyttien kohdalla sivelyvalmisteista arvioitiin niiden määrää sekä hyalo-meerin ja granulomeerin erottumista. Trombosyyttien määrässä ei menetelmien välillä ollut suurta eroa (kuvio 14, sivu 67). Kummallakin menetelmällä trombosyytit erottuivat sivelyvalmisteista yhtä hyvin, kun trombosyyttejä oli 0-10 kappaletta näkökentässä, molemmissa menetelmissä annettu vastaus oli 21 prosenttia. Menetelmällä A trombosyyttejä oli näkökentässä 11–99 kappaletta 69 prosentissa sivelyvalmisteista. Menetelmällä B vastaava luku oli 67 prosenttia. Trombosyyttien määrän ollessa 100 kappaletta näkökentässä tai enemmän kummallakin menetelmällä saatiin sama tulos 10 prosenttia. Voikin todeta, ettei perifeerisen veren sivelyvalmisteiden valmistusmenetelmien välillä ole suurta eroa trombosyyttien erottumisen arvioinnissa.



KUVIO 14. Trombosyyttien määrä (kappaletta / näkökenttä) N=48

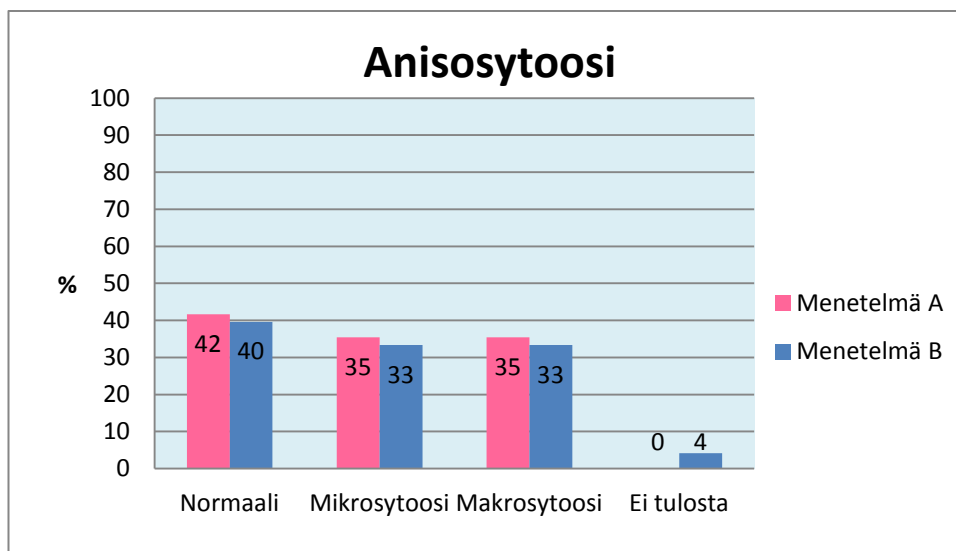
Missään menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa eivät erottuneet hyalomeeri ja granulomeeri (kuvio 15, sivu 68). Sen sijaan 46 prosentissa menetelmällä B valmistetuissa sivelyvalmisteissa hyalomeeri ja granulomeeri erottuivat osittain. Kuitenkaan 52 prosentissa menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa hyalomeeri ja granulomeeri eivät erottuneet toisistaan. Missään sivelyvalmisteissa hyalomeeri ja granulomeeri eivät erottuneet täysin. Hyalomeerin ja granulomeerin erottumisella ei ole kuitenkaan kliinistä merkitystä, koska trombosyyttien määrät vastasivat hyvin toisiaan eri menetelmillä tehdyissä sivelyvalmisteissa. Yhdestä menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta.



KUVIO 15. Hyalomeerin ja granulomeerin erottuminen N=48

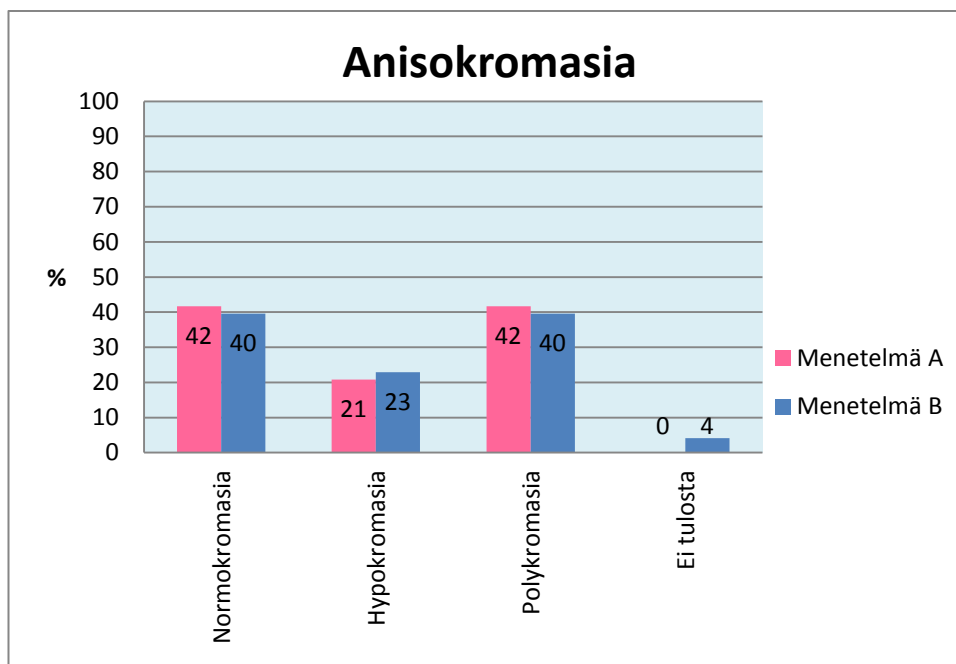
12.2.4 Erytrosyyttien morfologia

Erytrosyyttien kohdalla sivelyvalmisteista arvioitiin niiden kokoa, ryhmitystä, muotoa, värjäytyvyyttä sekä inkluusiokappaleiden esiintymistä. Anisosytoosin arvioinnissa ei ilmennyt eroa eri menetelmien välillä (kuvio 16, sivu 69). Menetelmällä A tehdyistä sivelyvalmisteista normaaleja oli 42 prosenttia ja menetelmällä B 40 prosenttia. Mikroosytoosin ja makrosoosin kohdalla saatiin menetelmällä A molemmista vastaukseksi 35 prosenttia. Menetelmällä B vastaava luku oli 33 prosenttia. Kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta, sillä toisessa oli iso reikä ja toisessa sivelyvalmiste oli liian paksu erytrosyyttien tarkastelun suorittamiseen (kuva 13, sivu 56). Vastausten yhteenlaskettu prosenttiosuus ylitti 100 prosenttia, sillä anisosytoosin arvioinnissa käytettiin multiresponse muuttujaa.



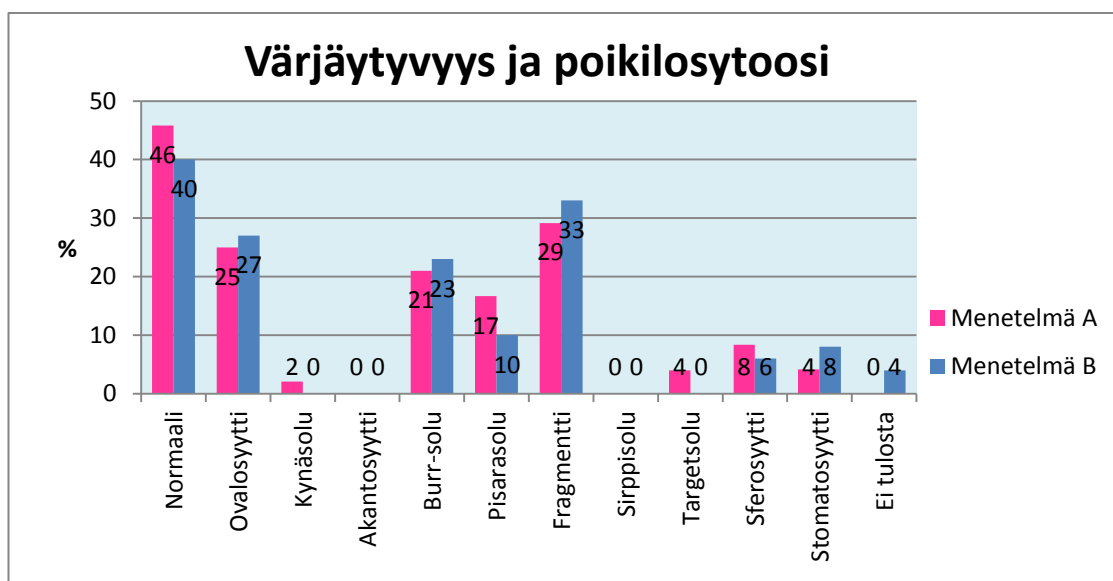
KUVIO 16. Anisosytoosi N=48

Myöskään anisokromasian tarkastelussa ei ilmennyt suurta eroa menetelmien A ja B välillä (kuvio 17, sivu 70). Menetelmällä A oli 42 prosenttia sivelyvalmisteista normokromisia. Menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteista vastaava luku oli 40 prosenttia. Hypokromisia sivelyvalmisteita oli menetelmällä A 21 prosenttia ja menetelmällä B 23 prosenttia. Polykromasiaa saatiin menetelmällä A vastaukseksi 42 prosenttia ja menetelmällä B 40 prosenttia. Kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta. Myös anisokromasian tarkastelussa käytettiin multiresponse muuttujaa, joten näidenkin arvojen yhteenlaskettu prosenttiosuus ylittää 100 prosenttia.



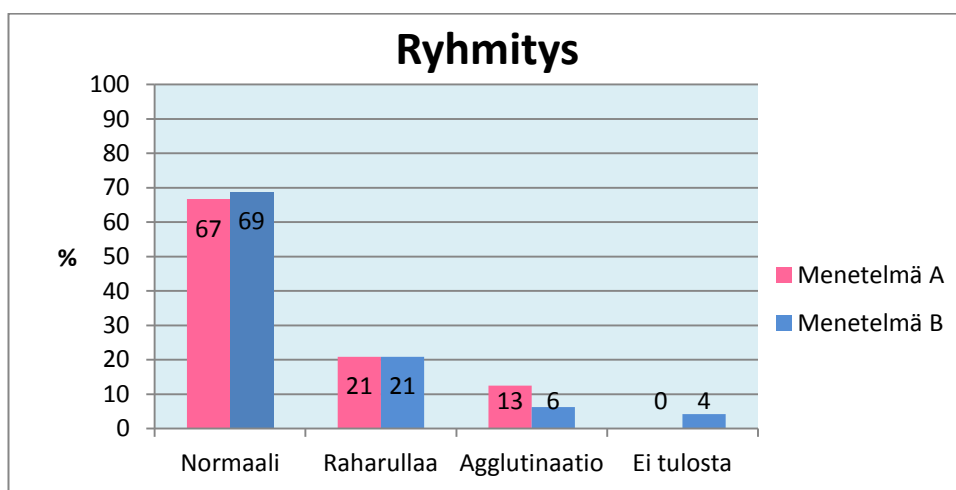
KUVIO 17. Anisokromasia N=48

Värjäytyvyyden ja poikilosytoosin tarkastelun kohdalla oli jo enemmän eroa eri menetelmien välillä. Normaaleja sivelyvalmisteita oli menetelmällä A 46 prosenttia ja menetelmällä B 40 prosenttia (kuvio 18, sivu 71). Menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa oli ovalosyyttejä 25 prosenttia ja menetelmällä B tehdyissä 27 prosenttia. Kynäsoluja oli 2 prosenttia ja targetsoluja 4 prosenttia menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa, mutta menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa niitä ei ollut lainkaan. Akantosyyttejä ja sirppisoluja ei ollut kummallakaan menetelmällä tehdyissä sivelyvalmisteissa. Menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa oli 23 prosenttia burr-soluja ja menetelmällä B 21 prosenttia. Pissarasoluja oli menetelmällä A 17 prosenttia ja menetelmällä B 10 prosenttia. Menetelmällä A punasolufragmentteja oli 29 prosentissa sivelyvalmisteista ja menetelmällä B 33 prosentissa. Sferosyyttejä oli menetelmällä A 8 prosenttia ja menetelmällä B 6 prosenttia. Menetelmällä A tehdyissä sivelyvalmisteissa oli 4 prosenttia stomatosyyttejä ja menetelmällä B 8 prosenttia. Kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta. Tässäkin yhteenlaskettu prosenttiosuus on yli 100 prosenttia multiresponse muuttujien vuoksi.



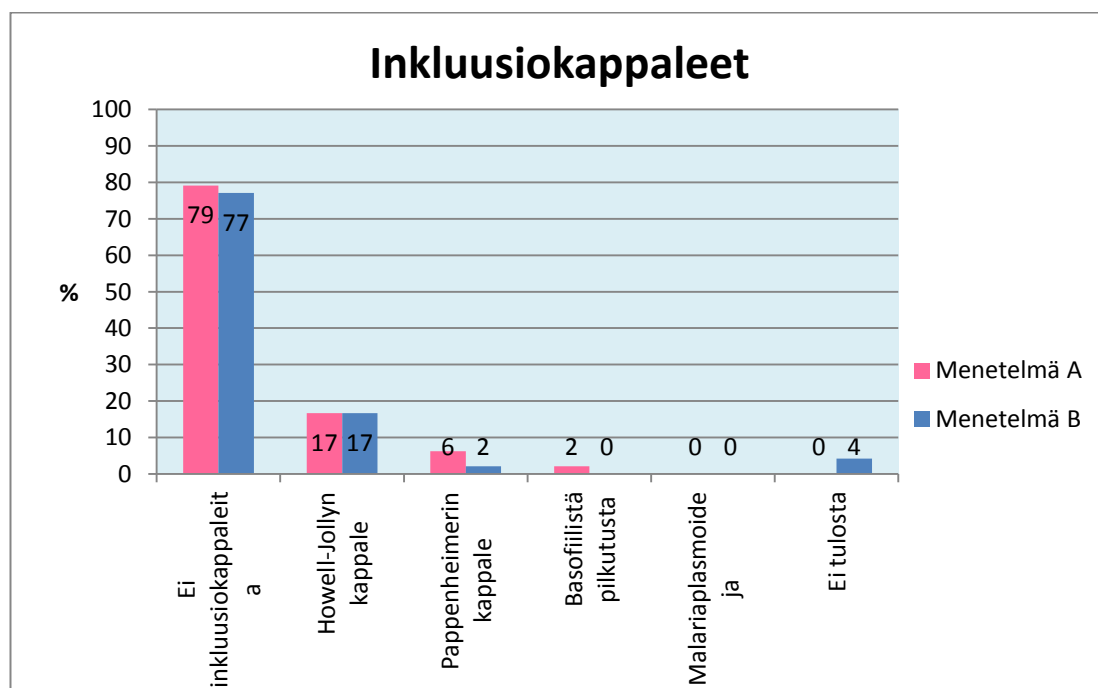
KUVIO 18. Värjäytyvyys ja poikilosytoosi N=48

Erytrosyyttien ryhmittymisen tarkastelussa menetelmällä A oli normaaleja siveilyvalmisteita 67 prosenttia ja menetelmällä B 69 prosenttia (kuviokuva 19). Raharullaa oli molemmilla menetelmillä tehdyissä siveilyvalmisteissa 21 prosenttia. Suurempi vaihtelu oli agglutinaation kohdalla, sillä menetelmällä A agglutinaatiota oli 13 prosentissa siveilyvalmisteista ja menetelmällä B 6 prosentissa. Kahdesta menetelmällä B tehdystä siveilyvalmisteesta ei saatu tulosta.



KUVIO 19. Ryhmittys N=48

Inklusiokappaleiden kohdalla menetelmien välillä ei ole suurta eroa. Menetelmällä A valmistetuista sivelyvalmisteista 79 prosentista ei löytynyt inklusiokappaleita (kuvio 20). Menetelmän B kohdalla vastaava arvo oli 77 prosenttia. Howell-Jollyn kappaleita oli molemmilla menetelmillä saman verran, 17 prosenttia. Pappenheimerin kappaleita oli menetelmällä A 6 prosenttia ja menetelmällä B 2 prosenttia. Basofiilistä pilkutusta oli menetelmällä A 2 prosenttia, kun taas menetelmällä B ei yhtään. Kummallakaan menetelmällä valmistetuissa sivelyvalmisteissa ei ollut malariaplasmoideja. Kahdesta menetelmällä B tehdystä sivelyvalmisteesta ei saatu tulosta. Erytrosyyttien kohdalla erot eri menetelmien kohdalla olivat hieman suurempia kuin leukosyyttien ja trombosyyttien kohdalla, mutta kuitenkin niin pieniä, etteivät ne ole kliinisesti merkittäviä.



KUVIO 20. Inklusiokappaleet N=48

12.3 Johtopäätökset

Suurin ero tuloksissa eri menetelmillä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä ilmeni makroskooppisessa tarkastelussa. Menetelmällä A tehdyt sivelyvalmisteet olivat muodoltaan vaihtelevia. Sivelyvalmisteiden värjäytyvyys oli tasaista molemmilla menetelmillä tehdyissä sivelyvalmisteissa, eikä niissä ilmennyt sini- ja punavoit-
toisuuden lisäksi muita eroavaisuuksia. Molemmilla menetelmillä tehdyt sively-
valmisteet olivat tasaisesti värjäytyneitä.

Leukosyyttien erittelylaskennassa ilmeni vahva positiivinen korrelaatio ja hyvä lineaarisuus eri menetelmillä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä niiden solujen kohdalla, joita esiintyi suurimmassa osassa sivelyvalmisteista. Solujen kohdalla, joita esiintyi vain muutamissa sivelyvalmisteissa, korrelaatio vaihteli suuresti. Varjosoluja esiintyi menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa enemmän kuin menetelmällä A tehdyissä.

Leukosyyttien ja erytrosyyttien morfologian tarkastelussa ei ilmennyt eroja eri menetelmien välillä. Trombosyyttien kohdalla ilmeni eroavaisuuksia hyalomee-
rin ja granulomeerin erottumisessa eri menetelmien välillä. Menetelmällä A nä-
mä eivät erottuneet lainkaan, toisin kuin menetelmällä B, jossa osassa sively-
valmisteista hyalomeeri ja granulomeeri erottuivat osittain. Trombosyyttien mää-
rässä ei ollut eroja eri menetelmien välillä.

13 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla manuaalisella ja automaattisella menetelmällä tehtyjä perifeerisen veren sivelyvalmisteita. Manuaalisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedettiin käsin ja värjättiin Mirastainer® II –automaatilla (menetelmä A). Automaattisessa menetelmässä sivelyvalmisteet vedettiin ja värjättiin Sysmex SP-1000i™ -automaatilla (menetelmä B). Tavoitteena oli parantaa perifeerisen veren sivelyvalmisteen laatua, jotta potilastulokset olisivat mahdollisimman luotettavia sekä tehostaa sivelyvalmisteen tekoa ja vähentää veren sivelyvalmisteen tekoon liittyviä kustannuksia. Opinnäytetyön tehtävänä oli selvittää, millainen on laadukas sivelyvalmiste, automaattien toimintaperiaatteet sekä kummalla menetelmällä saadaan aikaan laadukkaammat sivelyvalmisteet. Onnistuimme tehtävissämme hyvin. Opinnäytetyön teoriaosuudessa on selvitetty laadukkaamman sivelyvalmisteen kriteerit ja automaattien toimintaperiaatteet. Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että makroskooppisessa tarkastelussa menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet ovat laadukkaampia ja mikroskooppisessa tarkastelussa eri menetelmillä tehdyt sivelyvalmisteet ovat yhtä laadukkaita.

Sivelyvalmisteet tehdään tällä hetkellä Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa Sysmex SP-1000i™ -automaatilla. Tutkimustulosten perusteella eri menetelmien välillä ei ole laadullisia eroavaisuuksia, joten voidaan sanoa sivelyvalmisteiden laadun pysyneen samana, vaikka menetelmä onkin vaihtunut. Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa sivelyvalmisteiden laatua. Tavoitteeseen laadun parantamisessa ei varsinaisesti päästy, vaan tutkimustulosten perusteella varmennettiin lähinnä laadun pysyvyys entisellään sivelyvalmisteiden tekomenetelmästä riippumatta. Sivelyvalmisteiden makroskooppinen laatu kuitenkin parani Sysmex SP-1000i™ -automaatin myötä. Sivelyvalmisteiden teko tehostui Sysmex SP-1000i™ -automaatin käyttöönoton myötä, sillä se pysyy tekemään kaksinkertaisen määrän sivelyvalmisteita tunnissa verrattuna aikaisemmin käytössä olleeseen manuaaliseen menetelmään. Sivelyvalmisteiden teosta aiheutuvia kustannuksia ei eritelty opinnäytetyössä, mutta niiden uskotaan kuitenkin vähenevän automaation myötä ainakin henkilöstökustannusten

osalta. Ominia tavoitteina meillä oli kehittää tietämystä laadukkaasta sivelyvalmisteesta ja oppia soveltamaan tietoa käytäntöön sekä kehittyä perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppisessa tarkastelussa. Onnistuimme hyvin näissä tavoitteissa ja opinnäytetyön teon myötä kehityimme erityisesti perifeerisen veren sivelyvalmisteen mikroskooppisessa tarkastelussa. Opinnäytetyön myötä opimme myös hyödyntämään sivelyvalmisteen teon ja mikroskooppisen tarkastelun teoritietoa käytännön työhön. Koimme opinnäytetyömme aiheen mielenkiintoiseksi ja tutkimuksen suorittamisen mielekkääksi sen työelämälähtöisyyden vuoksi.

13.1 Opinnäytetyöprosessin tarkastelu

Opinnäytetyössä pysyttiin hyvin alkuperäisessä aikataulussa. Ainoastaan kokeellisen osuuden suorittaminen viivästyi hieman, sillä Sysmex SP-1000i™ -automaatti otettiin käyttöön huhtikuussa 2011, jonka jälkeen sivelyvalmisteet tutkimusta varten voitiin tehdä. Alkuperäisen suunnitelman mukaisesti sivelyvalmisteiden teon piti tapahtua helmi-maaliskuussa 2011. Mikroskooppinen tarkastelu saatiin kuitenkin suoritettua ajallaan toukokuun 2011 loppuun mennessä.

Teoriaosuuden kirjoittaminen sujui hyvin. Suurimman ongelman tuotti automaattien toimintaperiaatteita käsittelevien kappaleiden kirjoittaminen. Aluksi automaateista oli vaikea löytää lähdemateriaalia, mutta lopulta kuitenkin niistä saatiin kattavasti tietoa. Tarkastelun avuksi laadittu havainnointilomake osoittautui esitestauksen myötä toimivaksi. Tulosten analysoinnin ja johtopäätösten jälkeen havainnointilomakkeeseen olisi haluttu tehdä pieniä muutoksia. Esimerkiksi trombosyyttien kohdalla hyalomeerin ja granulomeerin erottuminen ei varsinaisesti antanut opinnäytetyöhön lisäarvoa, koska sitä ei sivelyvalmisteista normaalisti arvioida. Se kertoo ennemminkin värjäytyvyyden onnistumisesta. Havainnointilomakkeessa vastausvaihtoehtoina morfologian arvioinnin kohdalla oli -, +, ++ tai +++. Tuloksia analysoitaessa näitä asteikkoja ei kuitenkaan hyödynnetty, vaan päädyttiin käyttämään vain kyllä tai ei vastauksia, sen mukaan esiintyykö tutkittavaa ominaisuutta vai ei. Tämä helpotti tulosten syöttöä havainto-

matriiseihin ja tulosten tulkintaa. Saatuihin tutkimustuloksiin ja niistä tehtyihin johtopäätöksiin oltiin tyytyväisiä, sillä ne vastasivat hyvin tutkimuksen aluksi asetettuun kysymykseen: kummalla menetelmällä saadaan aikaan laadukkaammat sivelyvalmisteet?

Yhteistyö Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikön kanssa sujui hyvin ja joustavasti. Suoritimme molemmat kolmannen opintovuoden ammattitaitoa edistävän harjoittelun Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä ja olimme siellä myös kesätöissä, mikä helpotti suuresti opin- näytetyön tekemistä. Yhteistyö oppinäytetyön tekijöiden välillä sujui myös hyvin. Työt jakautuivat tasapuolisesti molempien oppinäytetyön tekijöiden kesken.

13.2 Yhteenveto tutkimustuloksista

Suurin ero tuloksissa eri menetelmillä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä ilmeni makroskooppisessa tarkastelussa. Menetelmällä A tehdyt sivelyvalmisteet olivat muodoltaan vaihtelevia. Tämä voi johtua siitä että sivelyvalmisteiden tekijät vaihtelivat, jolloin sivelyvalmisteiden laatu vaihteli sivelyvalmisteiden tekijän mukaan. Vaihtelua sivelyvalmisteiden kesken tuli jokaisen tekijän yksilöllisestä kä- sialasta johtuen muun muassa vetotekniikasta, -nopeudesta ja -kulmasta. Vaik- ka menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet olivat tasalaatuisempia, niiden laa- dussa ilmeni kuitenkin suuria puutteita yksittäisten näytteiden kohdalla. Tästä ovat esimerkkinä yhdessä tutkimuskohteena olleessa sivelyvalmisteessa ollut lähes koko sivelyn kokoinen reikä sekä toisen sivelyvalmisteiden paksuus, josta johtuen erytrosyyttien mikroskooppinen tarkastelu oli mahdotonta (kuva 13, sivu 56).

Yksittäiset sivelyvalmisteiden laadun heikkoudet menetelmällä B tehtyjen sive- lyvalmistien kohdalla voivat johtua monista näytteessä tai laitteessa olevista teki- jöistä. Näitä tekijöitä voi näytteen kohdalla olla muun muassa näytteen huono sekoittuminen, hyytymä tai riittämätön näytemäärä. Laitteesta johtuva häiriö on voinut aiheutua muun muassa aspiroinnin epäonnistumisesta, ilmakuplasta, vetolasin huonosta kunnosta tai epäpuhtaudesta, väärästä näytemäärästä, ve-

tokulmasta tai –nopeudesta. Kaikissa menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa oli sivelyn loppupäässä makroskooppisesti havaittava erillinen solulinja (kuva 13, sivu 56). Solulinjan esiintymisellä ei ollut vaikutusta erittelylaskennan jakaumaan. Tämä on todettu myös Simsonin ym. (2010, 64–76) tekemässä tutkimuksessa.

Sivelyvalmisteiden värjäytyvyys oli tasaista molemmilla menetelmillä tehdyissä sivelyvalmisteissa, eikä niissä ilmennyt sini- ja punavoittoisuuden lisäksi muita eroavaisuuksia. Sini- ja punasävyisyys johtuivat mahdollisesti värjäysohjelmien pienistä eroavaisuuksista ja eri menetelmillä käytetyistä eri valmistajien reagensseista. Punasävyisyys menetelmällä A ja sinisävyisyys menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa eivät kuitenkaan vaikuttaneet morfologian arviointiin ja solujen tunnistettavuuteen (liite 2).

Mikroskooppisessa tarkastelussa eri menetelmillä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä ei ollut merkittävää eroa. Leukosyyttien erittelylaskennassa ilmeni vahva positiivinen korrelaatio ja hyvä lineaarisuus eri menetelmillä tehtyjen sivelyvalmisteiden välillä niiden solujen kohdalla, joita esiintyi suurimmassa osassa sivelyvalmisteista. Solujen kohdalla, joita esiintyi vain muutamissa sivelyvalmisteissa, korrelaatio vaihteli suuresti johtuen yksittäisistä poikkeavista tuloksista, jotka nostivat tai laskivat korrelaatiota voimakkaasti. Varjosoluja esiintyi menetelmällä B tehdyissä sivelyvalmisteissa enemmän kuin menetelmällä A tehdyissä. Tämä on todettu myös Bronin ym. (2000, 71–76) ja Simsonin ym. (2010, 64–76) tekemissä tutkimuksissa. Varjosolujen esiintyminen automaattisesti valmistetuissa sivelyvalmisteissa voi johtua muun muassa automaatiassa aiheutuvasta voimakkaasta mekaanisesta rasituksesta sivelyvalmisteeseen vedon yhteydessä tai vedon jälkeisen kuivauksen voimakkuudesta.

Leukosyyttien ja erytrosyyttien morfologian tarkastelussa ei ilmennyt eroja eri menetelmien välillä. Trombosyyttien kohdalla ilmeni eroavaisuuksia hyalomeroon ja granulomeerin erottumisessa eri menetelmien välillä. Menetelmällä A nämä eivät erottuneet lainkaan, toisin kuin menetelmällä B, jossa osassa sivelyvalmisteista hyalomeeri ja granulomeeri erottuivat osittain. Hyalomeroon ja granulomeerin erottumiseen eri menetelmien välillä on mahdollisesti vaikuttanut eri

menetelmissä käytetyt eri valmistajien reagenssit. Vaikka hyalomeeri ja granulomeeri eivät erottuneet, trombosyytit oli kuitenkin helposti havaittavissa. Koska trombosyyttien määrissä ei eri menetelmien välillä ollut merkittävää eroa, ei hyalomeerin ja granulomeerin erottumisella ei ole oikeastaan merkitystä mikroskooppisen tarkastelun kannalta.

Kaiken kaikkiaan sivelyvalmisteiden makroskooppisen tarkastelun perusteella voidaan sanoa, että menetelmällä B tehdyt sivelyvalmisteet ovat muodoltaan laadukkaampia, vaikka niissä ilmenikin yksittäisiä laadullisia puutteita, sillä menetelmällä A tehtyjen sivelyvalmisteiden muoto oli todella vaihtelevaa. Opinnäytetyössä oli kuitenkin tarkoituksena vertailla eri menetelmillä tehtyjä sivelyvalmisteita Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa käytössä olevien tarkastelukriteerien mukaisesti, jotka painottuvat mikroskooppisen tarkasteluun. Mikroskooppisen tarkastelun perusteella kummallakin menetelmällä tehdyt sivelyvalmisteet ovat yhtä laadukkaita. Tämä on todettu myös Simsonin ym. (2010, 64–76) tekemässä tutkimuksessa.

13.3 Työn luotettavuuden arviointi ja eettisyys

Työn luotettavuutta eli reliabiliteettia lisää se, että sivelyvalmisteiden teko tapahtui Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion työntekijöiden toimesta. Luotettavuutta laskee opinnäytetyöntekijöiden vähäinen kokemus sivelyvalmisteiden mikroskooppisessa tarkastelussa. Koska opinnäytetyöntekijät suorittivat mikroskooppisen tarkastelun kaikkien näytteiden osalta, pysyi tarkastelun taso kokoajan samantasoisena. Mikroskooppisen tarkastelun luotettavuutta lisäsi kuitenkin tutkimuksen aluksi suoritettu sivelyvalmisteiden tarkastelu yhdessä opetusmikroskoopilla. Luotettavuuteen vaikutti myös muutaman näytteen rinnakkainen tarkastelu, jolloin ensin tarkasteltiin muutamia sivelyvalmisteita itsenäisesti, jonka jälkeen vertailtiin saatuja tuloksia.

Sivelyvalmisteiden tarkastelun yhteydessä ilmeni muutamia sivelyvalmisteiden laadusta johtuvia puuttuvia tietoja, sillä joistakin tarkastelun kohteena olevista sivelyvalmisteista ei saatu tulosta joidenkin arviointikohteiden osalta. Nämä puut-

tuvat tiedot otettiin kuitenkin mukaan tulosten analysointiin, koska niillä on merkitystä tuloksiin. Havainnointilomakkeen tietoja syötettäessä tilasto-ohjelmaan virheiden muodostuminen pyrittiin välttämään syöttämällä tiedot huolellisesti oikeisiin havaintomatriiseihin, kunkin kysymyksen tiedot omaansa. Vielä tämän jälkeen lomakkeiden ja havaintomatriisien yhdenmukaisuus tarkistettiin tallenusvirheiden muodostumisen välttämiseksi.

Työn luotettavuuteen vaikutti näytteiden säilytys ja käsittely. Sivelyvalmisteet tulisi tehdä kolmen tunnin sisällä näytteenotosta, käytännössä tämä ei kuitenkaan kaikkien näytteiden kohdalla toteutunut, sillä osa aamulla Seinäjoen ympäristökunnissa otetuista näytteistä saapui laboratorioon vasta iltapäivällä. Luotettavuutta heikensi myös suhteellisen pieni otoskoko. Tilastollisen tutkimuksen otoskoon alarajana pidetään 100 näytettä. Tässä opinnäytetyössä otoskoko oli 48 näytettä. Opinnäytetyöhön varatun ajan puitteissa suurempi otoskoko ei olisi ollut mahdollinen.

Ennen tutkimuksen suoritusta perehdyttiin aihetta käsittelevään lähdeaineistoon ja sen pohjalta koottiin opinnäytetyön teoriaosuus. Lähdemateriaalina käytettiin monipuolisia ja ajantasaisia lähteitä. Suomenkielisiä lähteitä aiheesta oli käytössä suhteellisen vähän, joten suurin osa lähteistä oli englanninkielisiä. Suurin osa lähteistä oli 2000-luvulta, mutta muutama sivelyvalmisteen tekoa ja menetelmäteoriaa koskeva lähde on 1990-luvulta. Vanhempia lähteitä päädyttiin kuitenkin käyttämään, sillä niissä olevan tiedon katsottiin olevan edelleen paikkansa pitävää. Lähteinä käytettiin aiheeseen liittyviä kirjoja, artikkeleita ja Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion työohjeita. Automaateista oli vaikea löytää tietoa ja niihin liittyvä aineisto kerättiin lähinnä valmistajan laatimista käyttöohjeista ja laite-esitteistä.

Tutkimuksessa eettisyys nousi erityisesti esille sivelyvalmisteiden kohdalla, sillä niissä säilytettiin alkuperäiset identifiointitiedot, koska tutkimuksen suorituksen jälkeen sivelyvalmisteet palautettiin Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorioon. Identifiointitiedot olivat myös näkyvillä verenkuvaa-analysaattorin tulosteissa. Sivelyvalmisteita ja verenkuvaa-analysaattorin tulosteita säilytettiin koko opinnäytetyöprosessin ajan niin, ettei niihin ollut ulkopuolisilla pääsyä.

Näytteet oli numeroitu tutkimusta varten siten, ettei tuloksia käsiteltäessä alkuperäisiä identifiointitietoja käytetty.

13.4 Jatkotutkimusehdotukset

Jatkotutkimusaiheena voisi tutkia mikronäytteistä Sysmex SP-1000i™ -automaatilla tehtyjä sivelyvalmisteita. Toisena jatkotutkimusaiheena voisi tutkia luuydinnäytteiden värjäystä Sysmex SP-1000i™ -automaatilla. Tällä hetkellä Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratoriossa mikronäytteistä tehdään sivelyvalmisteet manuaalisesti ja luuydinnäytteet värjätään Mirastainer® II -automaatilla. Lisäksi jatkotutkimuksena voisi vertailla samasta näytteestä rinnakkain Sysmex SP-1000i™ -automaatilla tehtyjen sivelyvalmisteiden mikroskooppisen tarkastelun toistettavuutta ja laatua. Suhteellisen pienen otoskoon takia osaa soluja esiintyi sivelyvalmisteissa vain vähän, jonka vuoksi niistä ei voitu tehdä luotettavia johtopäätöksiä. Yhtenä jatkotutkimusaiheena voisikin olla näiden harvemmin esiintyneiden solujen erittelylaskennan ja morfologian laadun tarkastelu suuremmalla otoskoolla.

Lopuksi haluamme kiittää erityisesti Seinäjoen keskussairaalan hematologian laboratorion henkilökuntaa, jotka avustivat meitä työssämme valmistamalla tutkittavat sivelyvalmisteet sekä työmme ohjaukseen osallistuneita ylikemisti Kari Åkermania ja sairaalakemisti Heidi Tuomea. Lisäksi haluamme kiittää Tampereen ammattikorkeakoulussa opinnäytetyöprosessin ohjaukseen osallistuneita. Haluamme kiittää myös niitä Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman opiskelijoita, jotka osallistuivat havainnointilomakkeen esittämiseen.

LÄHTEET

- Anttila, P. 2005. Ilmaisu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. Hamina: Akatiimi.
- Bain, B.J. 2005. Diagnosis from the Blood Smear. *The New England journal of medicine* 353: 498-507.
- Bain, B.J. 2006a. Blood cells. A practical guide. 4. painos. Oxford: Blackwell.
- Bain, B.J. 2006b. Blood cell morphology in health and disease. Teoksessa Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (toim.) *Dacie and Lewis Practical haematology*. 10. painos. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 79-113.
- Bain, B.J. 2008. *Beginner's Guide to Blood Cells*. 2. painos. Wiley: Blackwell Science.
- Bain, B.J. & Lewis, S.M. 2006. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. Teoksessa Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (toim.) *Dacie and Lewis Practical haematology*. 10. painos. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 59-77.
- Bron, J.W, Jellema, G., Noordervliet, R., Reymer, F., Baelde, H.A., Paauwe, J., den Ottonlander, G.J. & Kluin-Nelemans, H.C. 2000. Improved Performance of the Automated Slide Preparation Unit, Sysmex SP-100™. *Sysmex Journal International* vol 1 nro 2, 71-76.
- Burns, C. 2004a. Peripheral Blood Smear. Teoksessa McKenzie, S. (toim.) *Clinical laboratory hematology*. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 140-147.
- Burns, C. 2004b. Routine Hematology Procedures. Teoksessa McKenzie, S. (toim.) *Clinical laboratory hematology*. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 123-139.
- Doig, K. 2007. Erythrocyte Production and Destruction. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) *Hematology. Clinical Principles and Applications*. 3. painos. Philadelphia: Saunders, 77-93.
- Ernvall, R., Ernvall, S. & Kaukkila, H-S. 2002. Tilastollisia menetelmiä sosiaali ja terveysalalle. Porvoo: WSOY.
- Fritsma, G.A. 2007. Platelet Production, Structure and Function. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) *Hematology. Clinical Principles and Applications*. 3. painos. Philadelphia: Saunders, 141-159.
- Gemen, E.F.A., de Wit, N.C.J., van Gerven, M-L.P.B. & de Jongh-Leuvenink, J. 2009. The Sysmex SP-1000i™ for Automated Bone Marrow Slide Smear Staining. *LabMedicine* vol 40 nro 12, 719-723.
- Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. 7.uudistettu painos. Helsinki: Edita.

Hemminki, M. 2011. Tampereen ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma.

Hemminki, M. & Pelttari, T. 2011. Tampereen ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Houwen, B. 2000. Blood Film Preparation and Staining Procedures. Laboratory Hematology 6: 1-7.

Howard, M.R. & Hamilton, P.J. 2008. Haematology. An illustrated colour text. 10. painos. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Hänninen, A. 2004a. Veren koostumus. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 263–264.

Hänninen, A. 2004b. Verisolujen muodostus. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 264–268.

Leclair, S.J. 2007. Leukopoiesis. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) Hematology. Clinical Principles and Applications. 3. painos. Philadelphia: Saunders, 124-140.

Leukosyytit, erittelylaskenta. 2010. Seinäjoen keskussairaala, kliinisen kemian laboratorio. Ohjekirja. Päivitetty 15.02.2010. Luettu 09.05.2011. <http://www.epshp.fi/kotisivut/labnet/html/2225.htm>

Maedel, L. & Doig, K. 2007. Examination of the peripheral blood smear and Correlation with the complete blood count. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) Hematology. Clinical Principles and Applications. 3. painos. Philadelphia: Saunders, 175-192

Mahlamäki, E.K. 2004. Verenkuvan tutkimukset. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 268–281.

Manninen, P. 2004. Johdatus tilastolliseen data-analyysiin. Sovellus- ja atk-keskeinen näkökulma. 7. painos. Tampere: Tampereen yliopisto.

Matinlauri, I. & Vilpo, L. 2010. Hematopoiesi ja sen tutkiminen. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 247-254.

Mattila-Oksanen, L. 2011. Henkilökohtainen tiedonanto 27.04.2011.

Mellanuora, J. 2008. Laadukas perifeerisen veren sivelyvalmiste. Bioanalyttikko 2/2008, 12–14.

Mullins, C. 2007. Specimen Collection. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) Hematology. Clinical Principles and Applications. 3. painos. Philadelphia: Saunders, 17-29.

Pawlick, G. & Relopez, J. 2000. Kaiser Permanente Interlaboratory Abnormal Cell Study Comparing slide Quality of the Sysmex SP-100™ Automated Slide Preparation Unit to Manual Technique. Sysmex Journal International vol 10, no 1, 26-29.

Pelliniemi, T-T. 1998. Veren sivelyvalmiste. Duodecim 1998;114(12):1177-1184.

Pelttari, T. 2011. Tampereen ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma.

Perkins, S. 2004. Examination of the blood and bone marrow. Teoksessa Greer, J., Foerster, J., Lukens, J., Rodgers, G., Paraskevas, F. & Glader, B. Wintrobe's clinical hematology. 11.painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3-25.

Perusverenkuva ja trombosyytit. 2010. Seinäjoen keskussairaala, kliinisen kemian laboratorio. Ohjekirja. Päivitetty 08.06.2010. Luettu 09.05.2011. <http://www.epshp.fi/kotisivut/labnet/html/2474.htm>

Reagena Oy. 2003. May-Grünwald-Giemsa. Värjäysliuokset. Päivitetty 10.04.2003. Luettu 18.05.2011. http://www.reagena.fi/www/en/products/pdf/instructions/MGG_fin.pdf

Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) 2007. Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Savolainen, E. 2007. Verinäytteet ja verenkuvatutkimukset. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 85–99.

Siitonen, S. & Jansson, S-E. 2007. Morfologiset tutkimukset. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 100–111.

Siitonen, T. & Koistinen, P. 2007. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 16-31.

Simson, E., Gascon-Lema, M.G. & Brown, D.L. 2010. Performance of automated slidemakers and strainers in a working laboratory environment – routine operation and quality control. International Journal of Laboratory Hematology February, 32(1p1): e64-e76.

Smith, L. 2007. Hematopoietic Theory. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Doig, K. (toim.) Hematology. Clinical Principles and Applications. 3. painos. Philadelphia: Saunders r, 57-76.

Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turun yliopiston täydennyskoulutuskeskus.

Sysmex Corporation. 2007. Automated hematology slide preparation unit. SP-1000i™. Instructions for use. Japani.

Sysmex Europe GMBH. 2007. Slide preparation with Sysmex SP-Series. Sysmex Xtra Online. Volume N°1. Saksa.

Thelm, H., Diem, H. & Haferlach, T. 2004. Colof Atlas of Hematology. Practical microscopy and clinical diagnosis. Stuttgart: Thieme.

Tuomi, H., sairaalakemisti. 2011a. Perusverenkuvatutkimukset ja MGG-värijäyskäytäntö. Henkilökohtainen tiedonanto 04.02.2011.

Tuomi, H., sairaalakemisti. 2011b. Sysmex SP-1000i™ värijäysohjelma. Henkilökohtainen tiedonanto 04.05.2011.

Validointisäännöt SIS-ohjelmassa. 2011. Työohje. Kliininen kemia. Seinäjoen keskussairaala. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri.

Verenkuvavalmisteiden MGG-värijäys Mirastainer® II -automaatilla. 2010. Työohje. Kliininen Kemia. Seinäjoen keskussairaala. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.

Vilpo, J. 2010a. Hematopoieesi. Teoksessa Vilpo, J. (toim.) Ilmari Palvan veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Medivil Oy, 15–20.

Vilpo, J. 2010b. Verisolujen rakenne ja funktiot. Teoksessa Vilpo, J. (toim.) Ilmari Palvan veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Medivil Oy, 21–27.

VWR International. Mirastainer system. Operator's manual. Belgia.

Walters, N., Estridge, B. & Reynolds, A. 1990. Basic medical laboratory techniques. 2. painos. Albany: Delmar.

LIITTEET

LIITE 1: HAVAINNOINTILOMAKE

LIITE 2: KUVIA SIVELYVALMISTEISTA

LIITE 3: TAULUKOITA JA HAVAINNOINTIKUVIOITA

HAVAINNOINTILOMAKE

LIITE 1: 1 (4)

SIVELYVALMISTEEN MAKROSKOOPPINEN TARKASTELU

Näyte nro: _____

Mikroskopiija: _____

1 MUOTO

Käsin tehty
sivelyvalmisteAutomaatilla tehty
sivelyvalmiste

Sivelyvalmisteen pään muoto: (Rastita yksi vaihtoehto)

Tasaisen pyöreä:

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Rikkonainen:

Typpä:

Muuta huomioitavaa

muodossa:

2 VÄRJÄYTYVYYS

Tummuus: (Rastita yksi vaihtoehto)

Sivelyvalmisteet samansävyisiä:

Käsin tehty valmiste vaaleampi kuin automaatilla tehty:

Käsin tehty valmiste tummempi kuin automaatilla tehty:

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Tasaisuus: (Rastita yksi vaihtoehto)

Sivelyvalmiste on

tasaisesti värjäytynyt:

epätasaisesti värjäytynyt:

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Muuta huomioitavaa

värjäytyvyydessä:

SIVELYVALMISTEEN MIKROSKOOPPINEN TARKASTELU

2 (4)

3 LEUKOSYYTIT

3.1 Erittelylaskenta / 100 leukosyytiä

Leukosyytien laskenta	erittely-	Käsin tehty sively- valmiste	Automaatilla tehty sivelyvalmiste
Blasti			
Promyelosyytti			
Myelosyytti			
Metamyelosyytti			
Sauvatumainen neutrofiili			
Liuskatumainen neutrofiili			
Eosinofiili			
Basofiili			
Lymfosyytti			
Monosyytti			

Muuta huomioitavaa

erittelylaskennassa:

3.2 Neutrofiilit

Käsin tehty si-
velyvalmisteAutomaatilla tehty
sivelyvalmiste

3.2.1 Granula (- / + / ++ / +++)

Hypogranulaarinen

Hypergranulaarinen

3.2.1 Tuma (- / + / ++ / +++)

Huonosti liuskoittunut

Yliliuskoittunut

Muuta huomioitavaa

neutrofiileissä:

Käsin tehty si-
velyvalmiste

Automaatilla tehty 88
sivelyvalmiste

3.3 Lymfosyytit (- / + / ++ / +++)

3 (4)

Reaktiivisia

Atyyppisia

Muuta huomioitavaa

lymfosyyteissä:

3.4 Monosyytit (- / + / ++ / +++)

Atyyppisia

--

--

Muuta huomioitavaa

monosyyteissä:

4 TROMBOSYYTIT

4.1 Määrä kpl / näkökenttä

0-10

11-99

100-

4.2 Hyalomeerin ja granulomeerin erottuminen: (Rastita yksi vaihtoehto)

Erotuu:

Erotuu osittain:

Ei erotu:

Muuta huomioitavaa

trombosyyteissä:

5 ERYTROSYYTIT

5.1 Anisosytoosi (- / + / ++ / +++)

Mikrosytoosi

Makrosytoosi

Käsin tehty si-
velyvalmisteAutomaatilla tehty
sivelyvalmiste

4 (4)

5.2 Värjäytyvyys ja poikilosytoosin määrä (- / + / ++ / +++)

Normokromasia

Hypokromasia

Polykromasia

Värjäytyvyys ja poikilosytoosi (- / + / ++ / +++)	Käsin tehty si-velyvalmiste	Automaatilla tehty sivelyvalmiste
Ovalosyytti		
Kynäsolu		
Akantosyytti		
Burr-solu		
Pisarasolu		
Skistosyytti/Punasolufragmentti		
Sirppisolu		
Targetsolu		
Sferosyytti		
Stomatosyytti		

5.3 Ryhmitys (- / + / ++ / +++)

Raharulla

Agglutinaatio

5.4 Inklusio-kappaleet (- / + / ++ / +++)

Howell-Jollyn kappale

Pappenheimerin kappale

Basofiilistä pilkutusta

Malariaplasmoideja

Muuta huomiotavaa:

erytrosyyteissä:

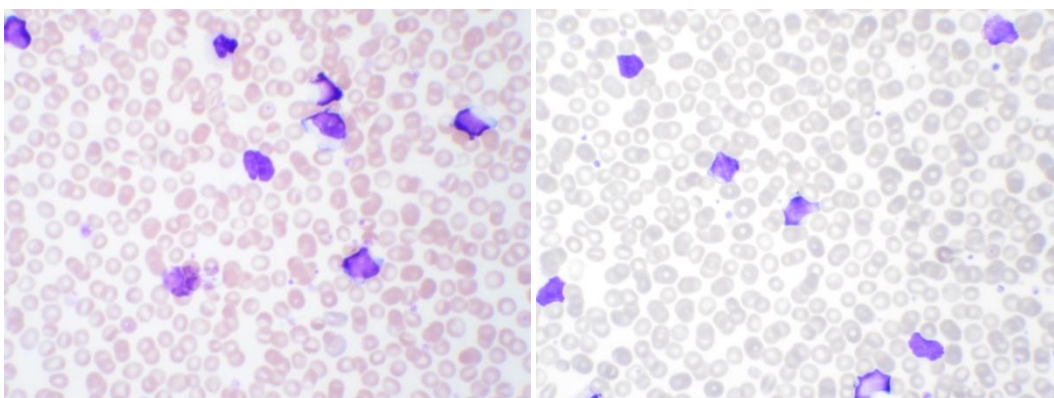
KUVIA SIVELYVALMISTEISTA

LIITE 2: 1 (3)

1 Makroskooppisia kuvia



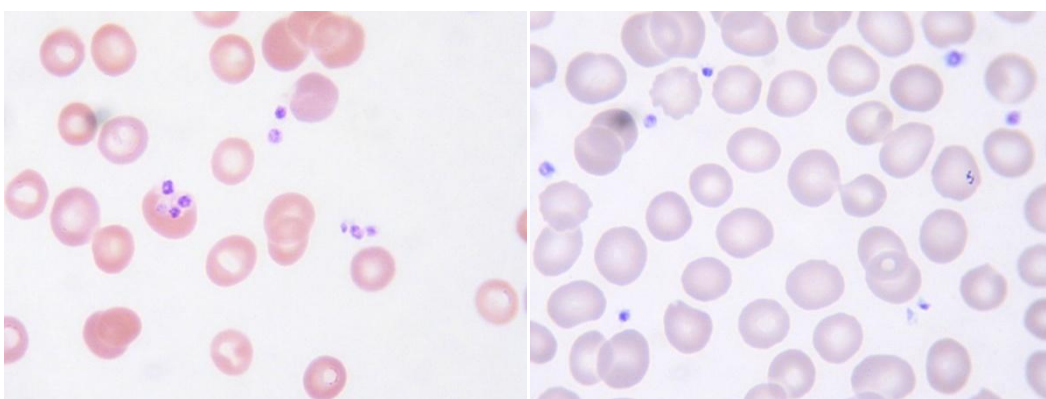
2 Mikroskooppinen yleiskuva



Menetelmä A

Menetelmä B

3 Erytrosyyttejä ja trombosyyttejä

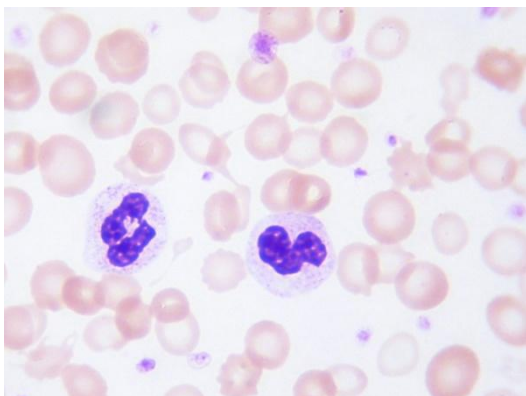


Menetelmä A

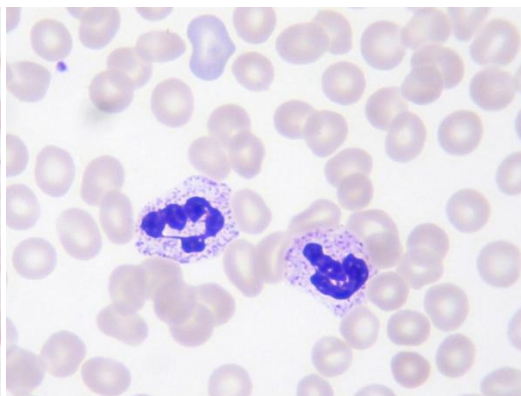
Menetelmä B

4 Neutrofiilejä

2 (3)

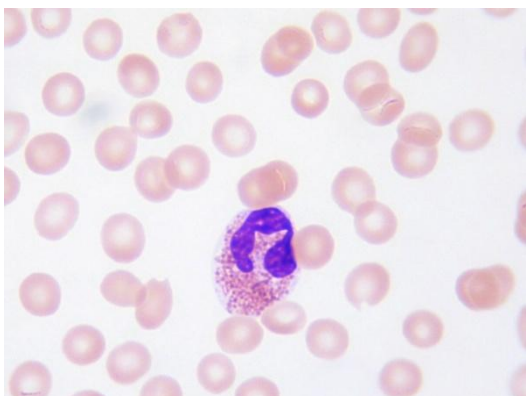


Menetelmä A

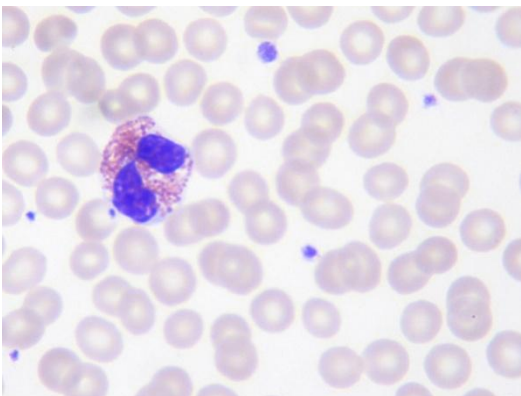


Menetelmä B

5 Eosinofiilejä

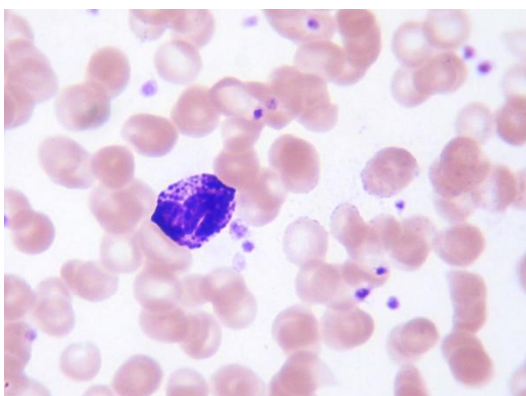


Menetelmä A

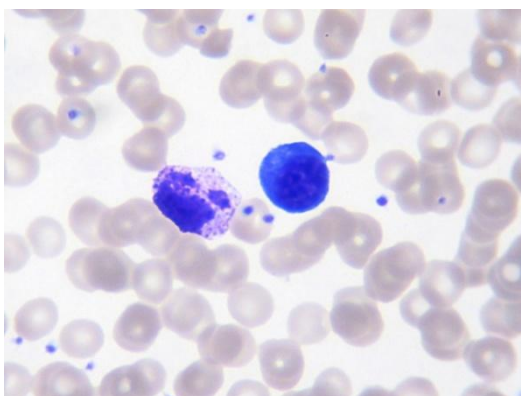


Menetelmä B

6 Basofiilejä



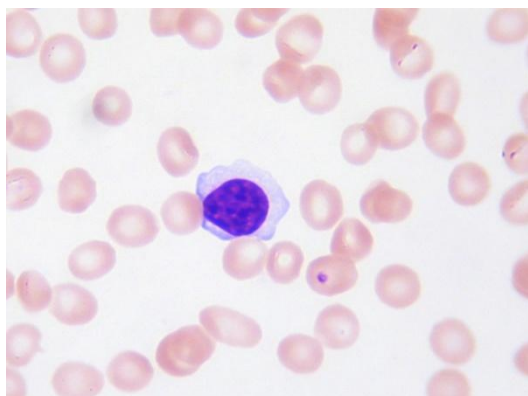
Menetelmä A



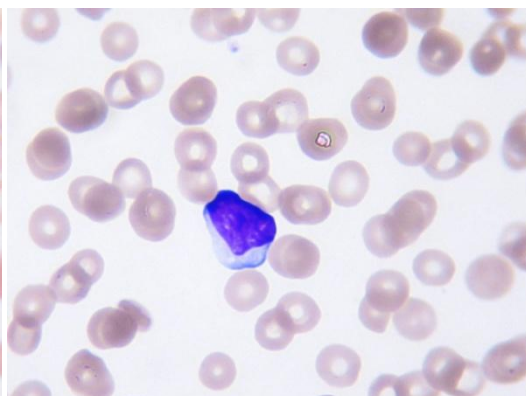
Menetelmä B

7 Lymfosittejä

3 (3)

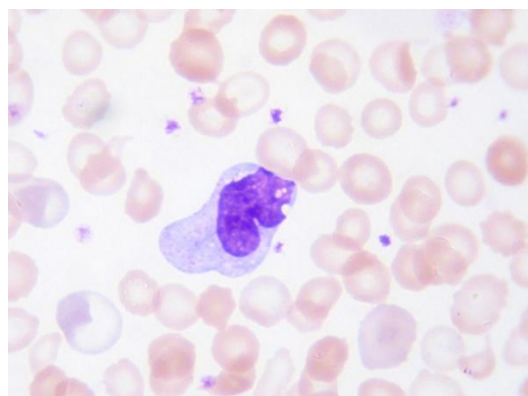


Menetelmä A

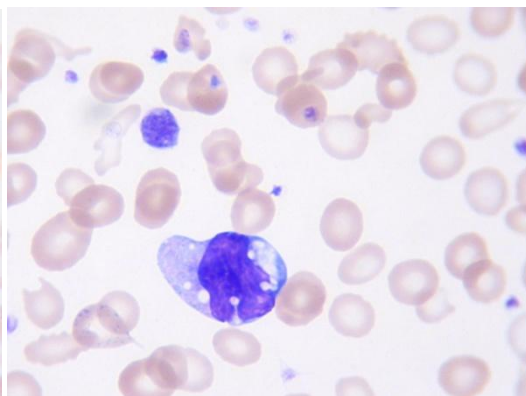


Menetelmä B

8 Monosyyttejä



Menetelmä A



Menetelmä B

TAULUKOITA JA HAVAINNOINTIKUVIOITA

LIITE 3: 1 (12)

Makroskooppinen tarkastelu

Muoto

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Tasaisen pyöreä	27	56	27	56
Rikkinainen	11	23	38	79
Tylppä	10	21	48	100
Ei tulosta	0	0	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Tasaisen pyöreä	47	98	47	98
Rikkinainen	0	0	47	98
Tylppä	0	0	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Tummuus				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Sivelyvalmisteet samansävyisiä	40	83	40	83
Käsin tehty valmiste vaaleampi kuin automaattilla tehty	4	8	44	92
Käsin tehty valmiste tummempi kuin automaattilla tehty	3	6	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Tasaisuus

2 (12)

Menetelmä A

	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Sivelyvalmiste on tasaisesti värjäytynyt	48	100	48	100
Sivelyvalmiste on epätasaisesti värjäytynyt	0	0	48	100
Ei tulosta	0	0	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

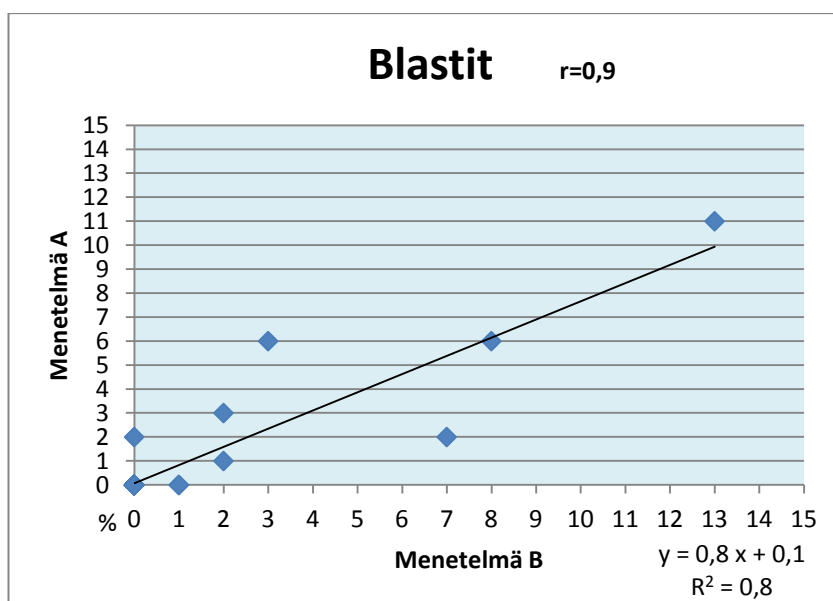
Menetelmä B

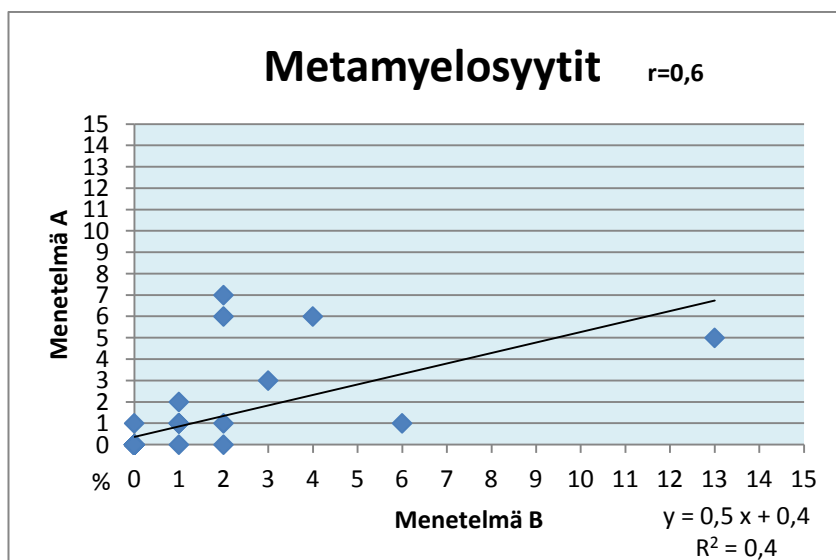
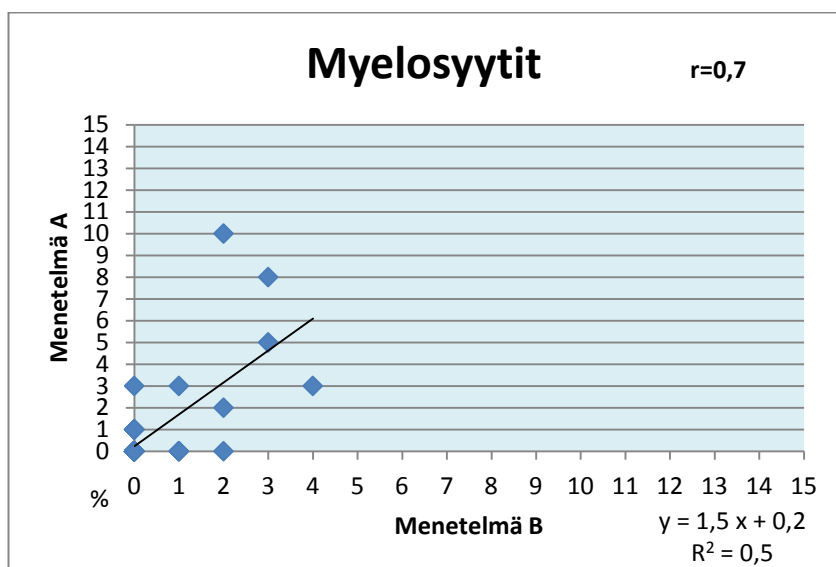
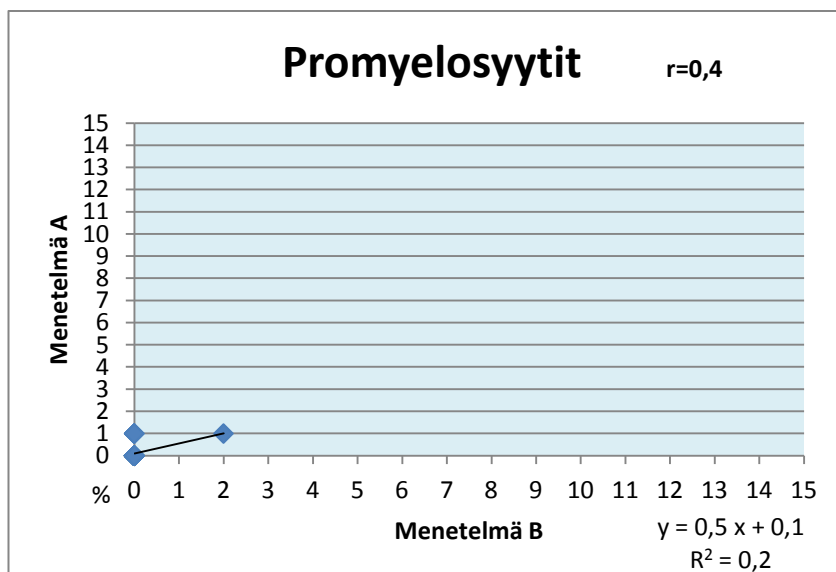
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Sivelyvalmiste on tasaisesti värjäytynyt	47	98	47	98
Sivelyvalmiste on epätasaisesti värjäytynyt	0	0	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Mikroskooppinen tarkastelu

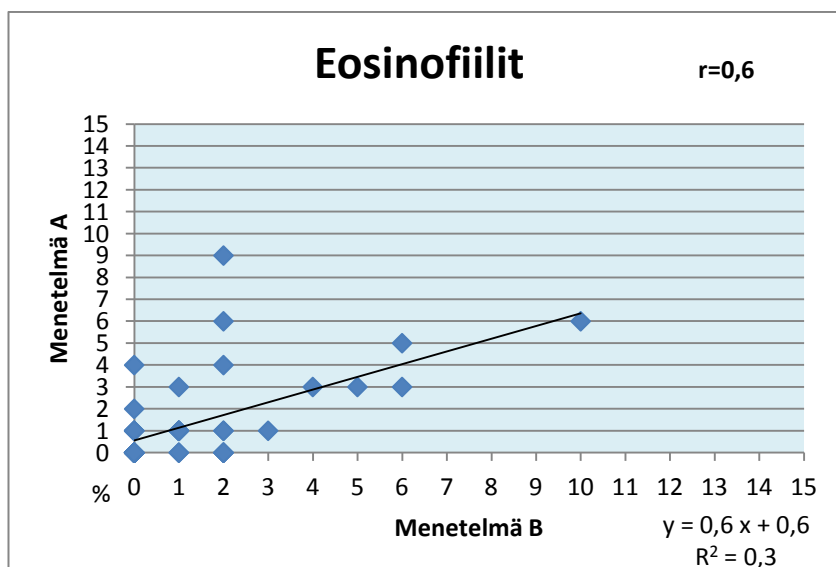
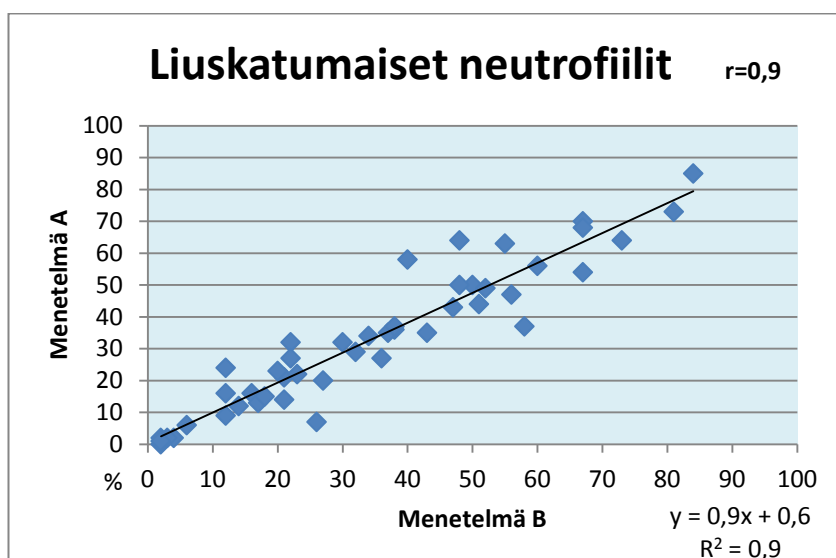
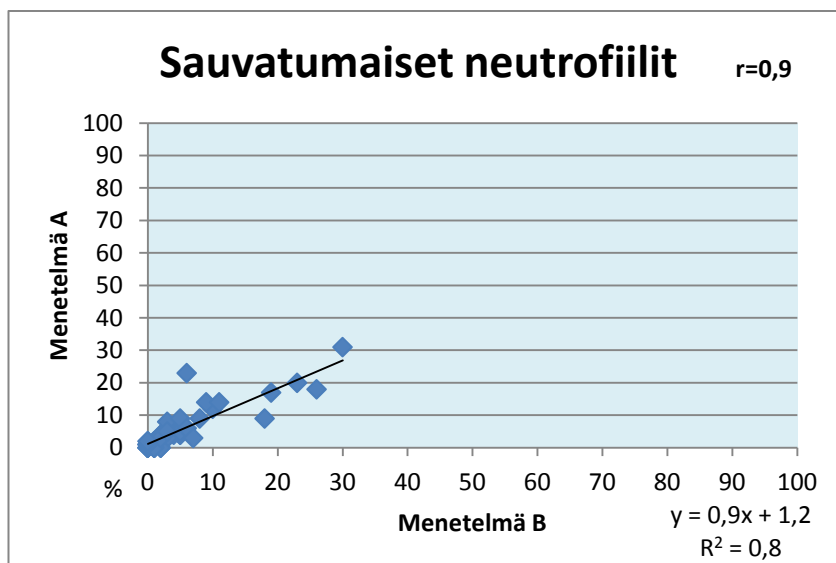
Leukosyytit

Leukosyyttien erittelylaskenta N=46

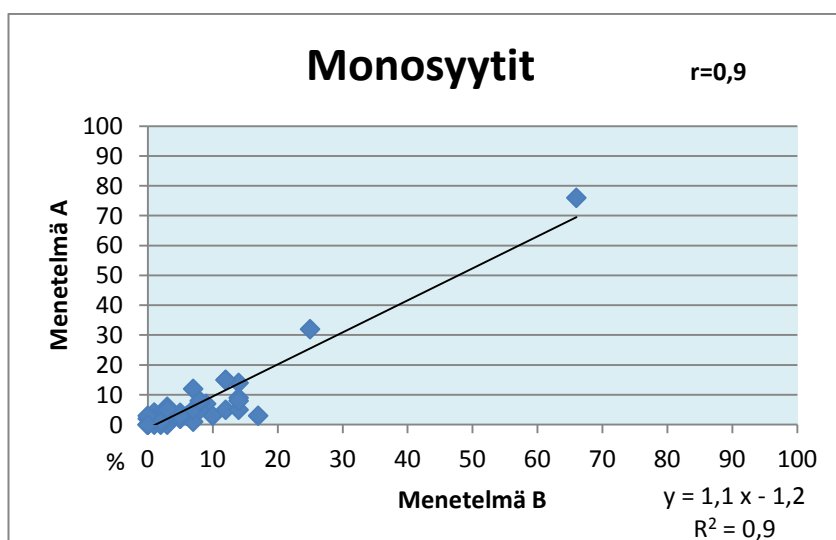
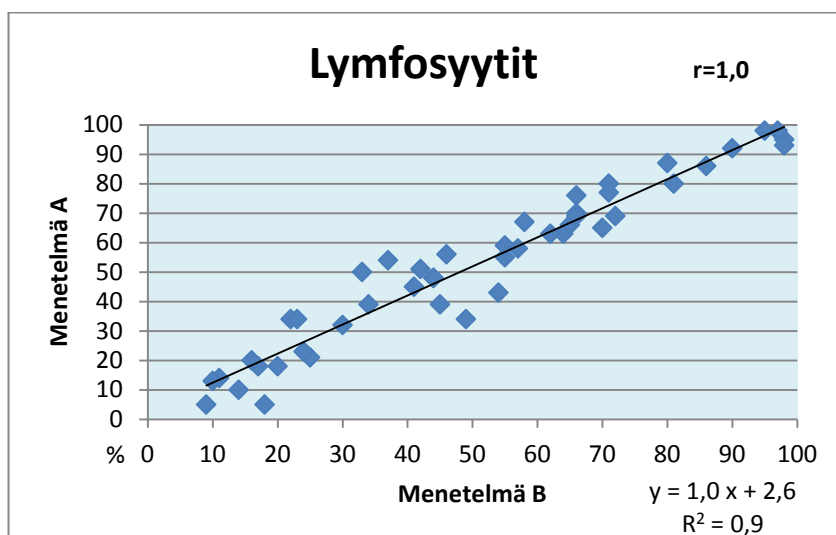
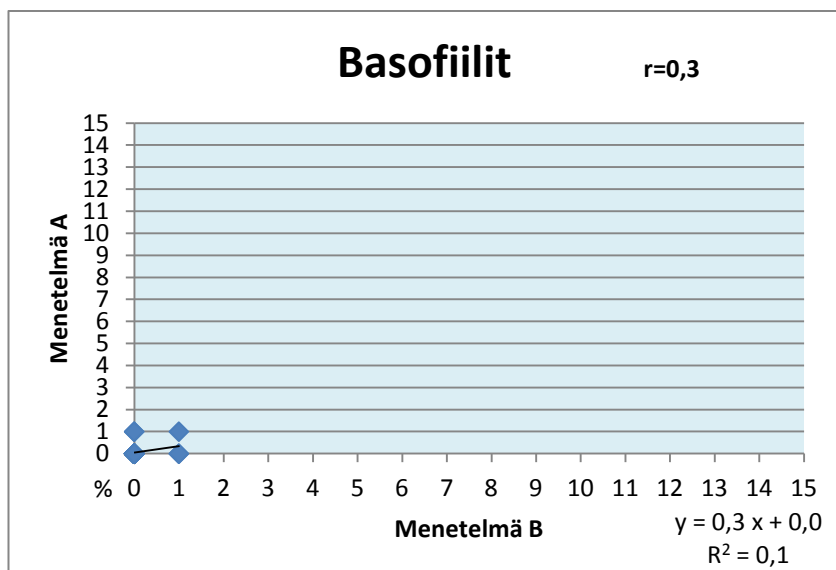




4 (12)



5 (12)



Neutrofiilien granula

6 (12)

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali granula	33	69	33	69
Hypogranulaarinen	8	17	41	85
Hypergranulaarinen	6	13	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali granula	32	67	32	67
Hypogranulaarinen	8	17	40	83
Hypergranulaarinen	6	13	46	96
Ei tulosta	2	4	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Neutrofiilien tuma

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	25	52	25	52
Huonosti liuskoittunut	20	42	45	94
Yliliuskoittunut	2	4	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	26	54	26	54
Huonosti liuskoittunut	18	38	44	92
Yliliuskoittunut	2	4	46	96
Ei tulosta	2	4	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Lymfosyytit

7 (12)

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	35	73	35	73
Reaktiivisia	6	13	41	85
Atyyppisia	6	13	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	33	69	33	69
Reaktiivisia	7	15	40	83
Atyyppisia	6	13	46	96
Ei tulosta	2	4	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Monosyytit

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	38	79	38	79
Atyyppinen	9	19	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	37	77	37	77
Atyyppinen	9	19	46	96
Ei tulosta	2	4	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Trombosyytit

8 (12)

Trombosyyttien määrä

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
0-10	10	21	10	21
11-99	33	69	43	90
100-	5	10	48	100
Ei tulosta	0	0	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
0-10	10	21	10	21
11-99	32	67	42	88
100-	5	10	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Hyalomeerin ja granulomeerin erottuminen

Menetelmä A				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Erottuu	0	0	0	0
Erottuu osittain	0	0	0	0
Ei erotu	48	100	48	100
Ei tulosta	0	0	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Menetelmä B				
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Erottuu	0	0	0	0
Erottuu osittain	22	46	22	46
Ei erotu	25	52	47	98
Ei tulosta	1	2	48	100
Yht.	48	100	48	100
N:	48			

Erytrosyytit

9 (12)

Anisosytoosi

Menetelmä A		
	<i>Lkm</i>	%
Normaali	20	42
Mikrosytoosi	17	35
Makrosytoosi	17	35
Ei tulosta	0	0
Yht.	54	113
N:	48	

Menetelmä B		
	<i>Lkm</i>	%
Normaali	19	40
Mikrosytoosi	16	33
Makrosytoosi	16	33
Ei tulosta	2	4
Yht.	53	110
N:	48	

Anisokromasia

Menetelmä A		
	<i>Lkm</i>	%
Normokromasia	20	42
Hypokromasia	10	21
Polykromasia	20	42
Ei tulosta	0	0
Yht.	50	104
N:	48	

Menetelmä B		
	<i>Lkm</i>	%
Normokromasia	19	40
Hypokromasia	11	23
Polykromasia	19	40
Ei tulosta	2	4
Yht.	51	106
N:	48	

Värjäytyvyys ja poikilosytoosi

Menetelmä A		
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>
Normaali	22	46
Ovalosyytti	12	25
Kynäsolu	1	2
Akantosyytti	0	0
Burr-solu	11	23
Pisarasolu	8	17
Skistosyytti/Punasolufragmentti	14	29
Sirppisolu	0	0
Targetsolu	2	4
Sferosyytti	4	8
Stomatosyytti	2	4
Ei tulosta	0	0
Yht.	76	158
N:	48	

Menetelmä B		
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>
Normaali	19	40
Ovalosyytti	13	27
Kynäsolu	0	0
Akantosyytti	0	0
Burr-solu	10	21
Pisarasolu	5	10
Skistosyytti/Punasolufragmentti	16	33
Sirppisolu	0	0
Targetsolu	0	0
Sferosyytti	3	6
Stomatosyytti	4	8
Ei tulosta	2	4
Yht.	72	150
N:	48	

Ryhmitys

11 (12)

Menetelmä A

	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	32	67	32	67
Raharullaa	10	21	42	88
Agglutinaatio	6	13	48	100
Ei tulosta	0	0	48	100
Yht.	48	100	48	100
N	48			

Menetelmä B

	<i>Lkm</i>	<i>%</i>	<i>Kum. lkm</i>	<i>Kum-%</i>
Normaali	33	69	33	69
Raharullaa	10	21	43	90
Agglutinaatio	3	6	46	96
Ei tulosta	2	4	48	100
Yht.	48	100	48	100
N	48			

Inklusiokappaleet

Menetelmä A		
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>
Ei inklusiokappaleita	38	79
Howell-Jollyn kappale	8	17
Pappenheimerin kappale	3	6
Basofiilistä pilkutusta	1	2
Malariaplasmoideja	0	0
Ei tulosta	0	0
Yht.	50	104
N:	48	

Menetelmä B		
	<i>Lkm</i>	<i>%</i>
Ei inklusiokappaleita	37	77
Howell-Jollyn kappale	8	17
Pappenheimerin kappale	1	2
Basofiilistä pilkutusta	0	0
Malariaplasmoideja	0	0
Ei tulosta	2	4
Yht.	48	100
N:	48	