

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Patologia
2013

Jenna Leppäsalo

PLEURANESTEEN SYTOSENTRIFUGIVALMIS- TEIDEN JA SOLUBLOKKIEN DIAGNOSTISTEN VASTAUSTEN VERTAILU



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Patologia

Toukokuu 2013 | 34+11

Ohjaajat: Veronica Fagerholm, Mikko Laiho, Sanna Virtanen

Jenna Leppäsalo

PLEURANESTEEN SYTOSENTRIFUGIVALMISTEIDEN JA SOLUBLOKKIEN DIAGNOSTISTEN VASTAUSTEN VERTAILU

Pleuranestettä voi kertyä keuhkopussiin, kun elimistön fysiologinen tasapaino järkkyy. Ellei syy pleuranestekertymään selviä potilaan taudinkuvasta, voidaan vastausta etsiä tutkimalla pleurapunktion avulla kerättyä nestettä ja nesteeseen irronneita soluja. Pleuranesteen irtosolututkimuksen tärkein indikaatio on malignin kasvaimen epäily.

Pleuranesteen käsittelytapa ja preparaatin valmistus vaihtelevat eri laboratorioissa. Yleisimmin pleuranesteestä tehdään sytosentrifugivalmiste ja runsassoluisesta näytteestä myös histologinen solublokki. Sytosentrifugivalmiste värjätään Papanicolaoun värjäyksellä ja solublokkista tehdään hematoksyliini-eosiini-värjäys. Solublokkista voidaan lisätutkimuksena tehdä myös immunohistokemiallisia värjäyksiä.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla pleuranesteestä kahdella eri menetelmällä saatuja diagnostisia vastauksia ja vastausten eroja. Tutkimus suoritettiin vertailemalla sytosentrifugi- ja solublokkimenetelmällä vastattuja Papa-luokkia. Tutkimuksen tavoitteena oli saada selville kahden menetelmän yhtenevyys ja menetelmillä tuotettujen laboratoriotutkimustulosten luotettavuus.

Eri menetelmillä saadut Papa-luokat samasta näytteestä vastasivat tutkimuksessa toisiaan kohtalaisesti. Sytosentifugivalmisteissa havaitut benignit muutokset tulkittiin ¼:ssa tapauksista solublokin perusteella solukuvaltaan normaaleiksi. Noin ¼ sytosentifugivalmisteiden mukaan normaaleista näytteistä vastattiin taas solublokkien perusteella benigneiksi tai maligniteetin suhteen lievästi epäilyttäväiksi.

Sytosentifugivalmisteista havaittuja maligniteetin suhteen epäilyttäviä löydöksiä ei solublokkien perusteella usein diagnosoitu lainkaan: Yli puolet näytteistä, joista oli sytosentifugivalmisteiden perusteella annettu Papa-luokka III tai IV, oli solublokin tutkimisen jälkeen luokiteltu solukuvaltaan normaaleiksi tai benigneiksi. Selvästi malignit löydökset havaittiin solublokeista puolestaan hieman paremmin kuin sytosentrifugivalmisteista.

ASIASANAT:

Pleuraneste, pleuranestekertymä, pleurapunktio, irtosolututkimus, sytosentrifugi, solublokki, agar, sytologinen diagnoosi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Pathology

May 2013 | 34+11

Instructors: Veronica Fagerholm, Mikko Laiho, Sanna Virtanen

Jenna Leppäsalo

COMPARING CYTOLOGICAL DIAGNOSES OF PLEURAL FLUID BASED ON CYTOCENTRIFUGE AND CYTOBLOCK PREPARATIONS

Pleural effusion may form in association with a number of diseases and by several mechanisms. When the reason for the liquid accumulation is unknown, examination of the pleural effusion may reveal the cause of the disease. The most important indication for cytological examination of pleural fluid is when a malignant tumor is suspected.

There are various methods for preparing pleural fluid samples. Different laboratories may use different approaches. The most commonly used method is the cytocentrifuge technique. For highly cellular samples, histological cytoblocks are also commonly used. Cytocentrifuge preparations are usually further processed by Papanicolaou staining and cytoblock preparations with hematoxylin-eosin staining. The cytoblock preparation may additionally be stained using immunohistochemical methods.

The purpose of the study was to compare the diagnostic outcomes of two different pleural effusion sample preparation methods. The study was conducted by comparing the diagnostic Pap classes of pleural fluid cytocentrifuge and cytoblock preparations made from the same patient samples. The aim of the study was to determine the level of agreement between the diagnoses obtained using the cytocentrifuge and cytoblock sample preparation methods.

The results obtained with the two different sample preparation methods were moderately correlated. One fourth of the cases which were interpreted as benign based on the cytocentrifuge preparation were also classified as normal based on the corresponding cytoblock preparation. Approximately one fourth of the cases which were classified as normal based on the cytocentrifuge preparation were interpreted as benign or suspected malignant based on the cytoblock preparation.

Cells which were classified as suspected malignant based on the cytocentrifuge preparation were not as easily detected in the corresponding cytoblock preparation: More than half of the cases classified as Pap class III or IV based on the cytocentrifuge preparations were classified as normal or benign based on the cytoblock preparation. On the other hand, clearly malignant cells were detected slightly more often in the cytoblock preparation than in the cytocentrifuge preparation.

KEYWORDS:

Pleural fluid, pleural effusion, pleural puncture, cytological examination, cytocentrifuge, cytospin, cytoblock, agar, cytological diagnosis

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1 Sytologia	7
2.2 Pleura ja pleuraneste	7
2.2.1 Pleuranestekertymät	9
2.3 Pleuranesteen sytologinen irtosolututkimus	10
2.3.1 Sytosentrifugivalmiste	10
2.3.1.1 Papanicolaoun värjäys	12
2.3.2 Solublokki	12
2.3.2.1 Hematoksyliini-eosiini-värjäys	13
2.3.2.2 Immunohistokemialliset värjäykset	14
2.3.3 Reaktiiviset ja benignit muutokset näytteessä	14
2.3.4 Pleuran primaariset kasvaimet	15
2.3.5 Pleuran metastaattiset kasvaimet	16
2.3.6 Diagnostiset vastaukset	16
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE	18
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	19
4.1 Tutkimusaineisto ja -menetelmä	19
4.2 Tutkimuksen käytännön toteutus	20
4.2.1 Tutkimusaineiston keruu	20
4.2.2 Aineiston analysointi	21
5 TUTKIMUSTULOKSET	22
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	26
7 POHDINTA	27
7.1 Virhelähteet	28
7.2 Tutkimuksen luotettavuus	28
7.3 Tutkimusetiikka	30
7.4 Jatkotutkimusaiheet	31

LÄHTEET

32

LIITTEET

- Liite 1. Hoitotyön tutkimus- ja opinnäytetyölupa
- Liite 2. Sytologian laboratorion toimintaohje
- Liite 3. Työohje: Solublokki agarmenetelmällä

KUVAT

- Kuva 1. Pleura. (Muokattu lähteestä Beltina - Health Encyclopedia 2013.) 8
- Kuva 2. Näytekyvetin osat. (Muokattu lähteestä Venojärvi 2011, 5.) 11

KUVIOT

- Kuvio 1. Papa-luokkien osuudet tutkimusaineistossa eri valmisteiden mukaan. 22

TAULUKOT

- Taulukko 1. Papanicolaoun luokkien tulkinta. (Muokattu lähteestä Stenbäck & Koivuniemi 1994, 11.) 17
- Taulukko 2. Sytosentrifugivalmisteen ja solublokin perusteella vastattujen Papa-luokkien erot. 23
- Taulukko 3. Sytosentrifugivalmisteen Papa-luokan vastaavuus samasta näytteestä valmistetun solublokin Papa-luokkaan. 24
- Taulukko 4. Sytosentrifugivalmisteen ja solublokin perusteella vastattujen Papa-luokkien erot Papa-luokittain. 25

1 JOHDANTO

Keuhkopussiin eli pleuraan voi kertyä nestettä monen sairauden tai mekanismin johdosta. Ellei syy pleuranestekertymään selviä potilaan esitetietojen ja kliinisten löydösten perusteella, voidaan vastausta etsiä tutkimalla pleurapunktion avulla kerättyä nestettä ja nesteeseen irronneita soluja. Pleurapunktiossa nestettä aspiroidaan eli imetään keuhkopussin ontelosta neulan avulla näyteputkeen. (Bourne 1990, 487; Riska & Saarelainen 2011, 185.)

Tärkein indikaatio pleuranesteen sytologiseen tutkimukseen on pahanlaatuisen eli malignin kasvaimen epäily. Maligni kasvain on syynä 50 prosenttiin kaikista pleuranestekertymistä. Yleisimmin aiheuttajana on keuhko-, rinta- tai ruoansulatuskanavan syöpä. (Taskinen 1994, 299; Riska & Saarelainen 2011, 187.) Joskus syynä on keuhkopussin pintaa verhoavasta mesoteelisolukosta alkunsa saanut maligni kasvain eli mesotelioma (Riska 2007a).

Pleuranesteen sytologiset tutkimusmenetelmät ja näytteen käsittelytapa vaihtelevat eri laboratorioissa. Tavallisesti pleuranestenäytteestä tehdään ensin sytosentrifugivalmiste. Turun yliopistollisessa keskussairaalassa (Tyks:ssa) runsassoluisesta näytteestä valmistetaan lisäksi histologinen solublokki. (Taskinen 1994, 299; Tykslab 2012a.)

Aihe tutkimukseen saatiin Tyks:n sytologian osastolta. Siellä oli aikaisemmin havaittu, että sytosentrifugivalmisteiden ja solublokeista tehtyjen leikkeiden perusteella annetut diagnostiset vastaukset eivät aina vastaa toisiaan. Ilmiötä haluttiin tutkia tarkemmin, jotta selviäisi, onko menetelmien välillä merkitsevää eroa. Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla pleuranesteestä kahdella eri menetelmällä annettuja vastauksia ja niiden eroja. Tavoitteena oli saada selville kahden menetelmän yhtenevyys ja menetelmillä tuotettujen laboratoriotutkimustulosten luotettavuus.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Sytologia

Sytologia eli soluoppi on solujen ja niiden rakenneosien tutkimista. Sytologinen tutkimus on kehittynyt yhtä aikaa mikroskooppitekniikan ja värjäysmenetelmien kanssa. Solujen värjääminen mahdollistaa niiden rakenneosien yksityiskohtaisen tutkimisen mikroskoopilla. (Stevens 1990, 107; Stenbäck & Koivuniemi 1994, 1-3.)

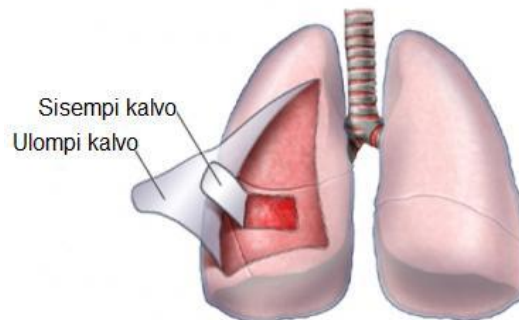
Sytologinen diagnostiikka perustuu pääosin kehomme onteloiden epiteeleiltä hilseilleiden tai mekaanisesti irrotettujen solujen mikroskooppiseen tutkimiseen. Sytologisessa irtosolututkimuksessa kiinnitetään erityistä huomiota mahdollisiin solumuutoksiin eli epänormaalilta näyttäviin atyyppisiin soluihin. Atyyppisen solun piirteitä ovat muun muassa muutokset solun koossa ja muodossa, sytoplasman määrässä ja värjäytyvyydessä sekä tuman koossa ja rakenteessa. (Stenbäck & Koivuniemi 1994, 7-8; Timonen 1998, 81.)

2.2 Pleura ja pleuraneste

Keuhkojen ulkopintaa ja rintakehän sisäpintaa peittävät kalvot, jotka muodostavat keuhkopussin eli pleuran (ks. Kuva 1). Pleuran sisäpinnalla on mesoteelisolukkoa ja sen alla sidekudosta. Pleuraontelon sisäpintaa voitelee ohut nestekerros, joka mahdollistaa hengitettäessä kalvojen kitkattoman liikkeen toisiaan vasten. (Taskinen 1994, 297; Riska & Saarelainen 2011, 185.)

Terveellä henkilöllä on pleuranestettä keuhkopussin sisäpinnalla 5-10 μ m:n paksuinen kerros. Sitä muodostuu verenpaineen vaikutuksesta plasman suodoksena pleuran hiussuonten seinämän läpi. Nesteen proteiinipitoisuus on noin 15g/l, ja siinä esiintyy mesoteelisoluja sekä jonkin verran valkosoluja. Normaalitilassa pleuranesteen määrä pysyy vakiona, sillä sen muodostuminen ja imeytyminen ovat tasapainossa. Tasapainoon vaikuttavat muun muassa pleuran hiussuonten

verenpaine sekä veriplasman ja pleuranesteen kolloidiosmoottinen paine. (Tas-
kinen 1994, 297; Riska 2007b; Riska & Saarelainen 2011, 185.)



Kuva 1. Pleura. (Muokattu lähteestä Beltina - Health Encyclopedia 2013.)

Osmoottinen paine aiheutuu nesteeseen liuenneiden aineiden määrästä. Aineet pyrkivät aina suuremmasta pitoisuudesta pienempään, mutta kuitenkin kaikki suuret molekyylit eivät pääse solukalvon läpi. Tällöin vesi pyrkii tasoittamaan konsentraatioeroa siirtymällä laimeammasta nesteestä väkevämpään. Tämä aiheuttaa väkevämpään liukseen suuremman osmoottisen paineen, koska liuenneet aineet vievät tilaa vedeltä. Kolloidiosmoottisella paineella tarkoitetaan nesteeseen liuenneiden proteiinien aiheuttamaa osmoottista painetta. (Niemi ym. 1995, 63-65; Nienstedt ym. 2004, 232-233.)

Pleuran hiussuonten valtimon puoleisessa päässä verenpaine on suurempi kuin plasman kolloidiosmoottinen paine. Tällöin nestettä tihkuu hiussuonten läpi plasman suodoksena pleuraonteloon. Hiussuonen aiheuttaman virtausvastuksen johdosta verenpaine on laskimon puoleisessa päässä puolestaan pienempi. Suurin osa pleuranesteestä imeytyykin takaisin verenkiertoon hiussuonten laskimon puoleisessa päässä kolloidiosmoottisen paineen vaikutuksesta. Pleuranesteen proteiinit ja solut imeytyvät keuhkopussin imusuonistoon, sillä ne eivät suurimolekyylisinä aineina pääse takaisin hiussuoniin. (Nienstedt ym. 2004, 236; Riska 2007b; Riska & Saarelainen 2011, 185.)

2.2.1 Pleuranestekertymät

Pleuranestettä voi kertyä keuhkopussiin, jos elimistön fysiologinen tasapaino järkkyy. Joidenkin kasvainten erittämää limaa lukuun ottamatta pleuraneste on aina peräisin veren plasmasta. Nestekertymän muodostumiseen vaikuttavat hiussuonten läpäisevyys ja verenpaine, pleuratilan alipaine sekä veriplasman ja pleuranesteen kolloidiosmoottinen paine. (Taskinen 1994, 297; Riska 2007b; Riska & Saarelainen 2011, 185.)

Pleuranestekertymät eli effuusiot jaetaan muodostumistapansa ja koostumuksensa perusteella transudaatteihin ja eksudaatteihin. Transudaatiksi kutsutaan nestekertymää, joka muodostuu pleuran hiussuonten verenpaineen nousun tai plasman kolloidiosmoottisen paineen laskun seurauksena. Transudaatti on usein koostumukseltaan vähäsoluista, ja sen proteiinipitoisuus on pieni. (Taskinen 1994, 297; Anttila ym. 2012, 558.)

Yleisin syy pleuran transudaatin muodostumiseen on sydämen vajaatoiminta, mutta se voi liittyä myös esimerkiksi nefroottiseen oireyhtymään tai maksakirroosiin. Nefroottisessa oireyhtymässä veren matala proteiinipitoisuus johtaa plasman kolloidiosmoottisen paineen alenemiseen. Samalla suolojen kertyminen elimistöön nostaa hiussuonten verenpainetta. Nämä tekijät yhdessä johtavat pleuran transudaatin muodostumiseen. Maksakirroosissa transudaattia kertyy pleuraan samalla mekanismilla veren matalan proteiinipitoisuuden johdosta. (Taskinen 1994, 298; Riska & Saarelainen 2011, 186-187.)

Keuhkopussiin kertyvä eksudaatti muodostuu pleuran hiussuonten lisääntyneen läpäisevyyden seurauksena, tavallisesti hiussuonivaurion yhteydessä. Eksudaatissa on tulehdussoluja, ja sen proteiinipitoisuus on suuri. Kroonisten tulehdusten lisäksi eksudaattia aiheuttavat tyypillisesti malignit kasvaimet. Kyseessä voi olla maligni mesoteliooma, keuhkotuumori tai muu pleuraan metastasoitunut eli etäpesäkkeen tehnyt maligni kasvain. (Riska & Saarelainen 2011, 187; Anttila ym. 2012, 558.)

2.3 Pleuranesteen sytologinen irtosolututkimus

Pleuranesteen sytologisen irtosolututkimuksen tärkein tehtävä on antaa alustava diagnoosi malignin kasvaimen epäilyn yhteydessä. Sytologisesta näytteestä ei aina saada yhtä tarkkaa ja luotettavaa tulosta kuin kudoksenäytteestä tehtävällä tutkimuksella. Pleuranesteen sytologiset tutkimukset antavat kuitenkin hyviä viitteitä potilaan sairaudesta, vaikka varmaa diagnoosia ei niiden perusteella voitaisikaan tehdä. Sytologisen tutkimuksen etuina ovat lisäksi sen nopea ja yksinkertainen suorittaminen. (Stenbäck & Koivuniemi 1994, 11-12 16; Riska & Saarelainen 2011, 185.)

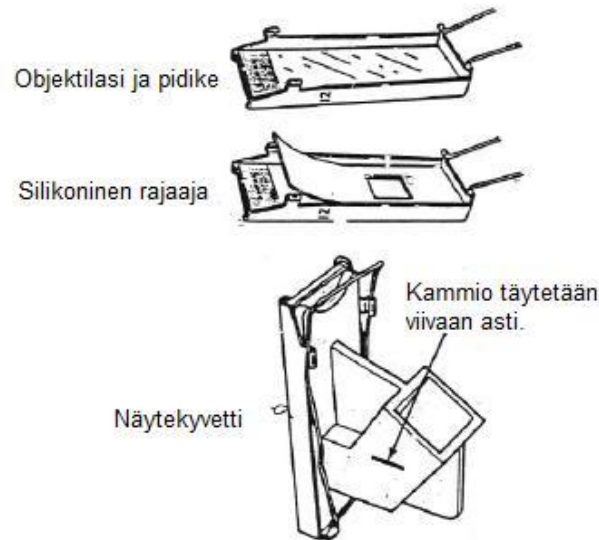
Pleuranestenäyte otetaan aspiroimalla nestettä keuhkopussista neulan avulla. Näyte otetaan antikoagulanttia sisältävään näyteputkeen hyytymien muodostumisen ehkäisemiseksi. Pleurapunktiossa kerätään tavallisesti 50-100 ml nestettä, joka toimitetaan viivytyksettä laboratorioon. Sytologisten näytteiden käsittely ja valmistus vaihtelevat eri laboratorioissa. Tavallisesti pleuranestenäytteestä tehdään sytosentrifugivalmiste ja runsassoluisesta näytteestä myös histologinen solublokki. (Bourne 1990, 487; Taskinen 1994, 299; Tykslab 2012a.)

2.3.1 Sytosentrifugivalmiste

Sytosentrifugivalmisteen tekoa varten laboratorioon saapunut näyte sentrifugoidaan, ja pohjalle saostunut solusedimentti fiksoidaan eli kiinnitetään. Fiksoinnin tarkoituksena on estää näytteen autolyysi eli solujen hajoaminen sekä bakteerien toiminta näytteessä, jotta näyte pysyy mahdollisimman muuttumattomana tutkimuksen ajan. Ellei näytettä voida sentrifugoida tunnin kuluessa punktiosta, siihen voidaan jo näytteenoton yhteydessä lisätä fiksiivi. Tyks:n sytologian laboratorioon pleuraneste saapuu valmiiksi 70% etanoliin fiksoituna (ks. Liite 2). (Taskinen 1994, 299; Nurminen 2004, 6; Tykslab 2012a.)

Fiksoitua näytettä pipetoidaan tarvittava määrä näytekammioon, joka on kiinnitettynä identifioituun objektilasiin tähän tarkoitettuun pidikkeellä. Objektilasin ja näytekammion välissä on silikoninen rajaaja, jonka tarkoituksena on rajata näyt-

te tiettyyn kohtaan objektilasia (ks. Kuva 2). (Bales & Durfee 1979, 1202-1206; Venojärvi 2011, 4-5; Tyks-Sapa-liikelaitos 2013.)



Kuva 2. Näytekyvetin osat. (Muokattu lähteestä Venojärvi 2011, 5.)

Menetelmän tarkoituksena on saada solut kiinnittymään objektilasille yhden solukerroksen paksuudelta. Kammioon pipetoitava näytemäärä riippuu tällöin näytteen solumäärästä eli sakeudesta. Mitä sakeempaa näyte on, sitä vähemmän sitä pipetoidaan kammioon. Näytekammioon on hyvä lisätä myös polyetyleeniglykoli (PEG)-liuosta, joka parantaa solujen kiinnittymistä objektilasille. Vajaaksi jäävä kammio pipetoidaan täyteen fysiologisella keittosuolaliuoksella. (Bales & Durfee 1979, 1202-1206; Venojärvi 2011, 4-5; Tyks-Sapa-liikelaitos 2013.)

Solut sentrifugoidaan kammioista objektilasille Cyto-Tek® -solusentrifugin avulla. Näytteitä sentrifugoidaan 5 minuuttia nopeudella 2000 rpm (revolutions per minute, kierrosta minuutissa). Sentrifugoinnin jälkeen ylimääräinen neste valutetaan pois kammioista, ja näytteen annetaan kuivua pelkän rajaajan kanssa. Kun näyte on kuivunut, rajaaja poistetaan ja objektilasin solut värjätään Papanicolaoun värjäysmenetelmällä. (Taskinen 1994, 299; Venojärvi 2011, 4-5; Tyks-Sapa-liikelaitos 2013.)

2.3.1.1 Papanicolaoun värjäys

Papanicolaoun värjäysmenetelmä on kehitetty erityisesti syövän sytologisen diagnostiikan apuvälineeksi. Menetelmällä saadaan solujen tumien rakenne ja levyepiteelisolujen sytoplasma hyvin esille. Papanicolaoun värjäysprosessi jakautuu kolmeen päävaiheeseen: tumavärjäykseen sekä ensimmäiseen ja toiseen sytoplasmavärjäykseen. Värjäyksessä väriaineiden sitoutuminen perustuu solukomponenttien happamuuteen ja emäksisyyteen. (Stevens 1990, 107; Aho 2000, 140-143.)

Tumavärjäyksessä väriaineena toimii emäksinen hematoksyliini. Hematoksyliini sitoutuu solujen happamiin komponentteihin värjäten näin myös tumat tummansinisiksi. Tumissa väriaine sitoutuu nukleiinihappoihin tuoden näin tumien sisärakenteen hyvin esille. (Stevens 1990, 107.)

Sytoplasmaväriaineita on Papanicolaoun värjäyksessä kaksi. Niistä Orange-G-6-fosfovolframihappo (OG-6) toimii väriaineena ensimmäisessä sytoplasmavärjäyksessä. Se sitoutuu näytteen emäksisiin komponentteihin ja värjää täten keratiinin oranssiksi sekä eosinofiilien granulat ja levyepiteelin pintasolut punaisen sävyillä. (Aho 2000, 144-145.)

Toisessa sytoplasmavärjäyksessä väriaineena on Eosin Azure (EA), joka sisältää eosini-Y:tä ja light green -väriä. Hapan light green värjää aineenvaihdunnallisesti aktiivisten solujen eli keskikerrossolujen, parabasaalisolujen ja lieriösolujen emäksiset sytoplasmat vihertäviksi. Samoin histiosyytit ja leukosyytit värjäytyvät vihreiksi. Myös eosini-Y on hapan väri, joka värjää punaisiksi levyepiteelin pintasolujen sytoplasmat, punasolut sekä värekarvat. (Aho 2000, 144-145.)

2.3.2 Solublokki

Histologinen solublokki voidaan tehdä sytologisesta näytteestä, jos siinä on runsaasti soluja. Solublokki valmistetaan yleensä fiksoimattomasta tuorenäytteestä, mutta se voidaan tehdä myös formaliini- tai etanolifiksoidusta näytteestä.

Solublokin valmistusmenetelmät vaihtelevat eri laboratorioissa. Tyks:n sytologian osastolla solublokki valmistetaan agarmenetelmällä (ks. Liite 3). (Taskinen 1994, 299; Tyks-Sapa-liikelaitos 2010; Tykslab 2012b.)

Agarsolublokkimenetelmässä etanolissa fiksoitu näyte sentrifugoidaan, ja koeputken pohjalle saostunut solusedimentti sekoitetaan yhtä suureen määrään agaria. Kovettunut agarnappi irrotetaan koeputkesta, ja halkaistaan kahteen osaan. Agarnapin puolikkaat fiksoidaan vielä formaliinissa ja lähetetään histologian laboratorioon. (Tyks-Sapa-liikelaitos 2010.)

Histologian osastolla agarnapit soluineen kudosprosessoidaan muiden histologisten näytteiden mukana. Kudosprosessoinnin tarkoituksena on poistaa näytteestä vesi ja imeyttää tilalle parafiini. Dehydraatio eli veden poisto tehdään nousevan alkoholisarjan avulla. Tämän jälkeen näyte kirkastetaan ksyleenissä, jotta parafiini saadaan imeytettyä eli infiltroitua soluihin. Kun sula parafiini on infiltroitu näytteeseen, solumateriaali voidaan valaa parafiiniblokiksi kuten histologinen kudospätkä. Parafiiniblokista leikataan mikrotomilla 2-4 µm:n paksuisia leikkeitä objektilasille histologisia värjäyksiä varten. (Taskinen 1994, 299; Kieran 1999, 44-48; Tyks-Sapa-liikelaitos 2010.)

2.3.2.1 Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Tavallisesti solublokista tehdyt leikkeet värjätään hematoksyliini-eosiini (HE)-värjäyksellä (Tykslab 2012b). HE-värjäys on histologisten näytteiden värjäyksessä yleisesti käytetty menetelmä, joka vastaa sytologista Papanicolaoun värjäystä. Hematoksyliini värjää happamat komponentit näytteestä tumman sinisiksi ja toimii siis tumaväriaineena. Eosiini puolestaan osoittaa emäksiset komponentit ja värjää näin ollen sytoplasman ja sidekudossäikeet punaisen eri sävyillä. (Stevens 1990, 107; Rantala ym. 1998, 75-76.)

2.3.2.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Patologi voi halutessaan pyytää solublokista jatkotutkimuksena immunohistokemiallisia värjäyksiä (Tykslab 2012b). Immunohistokemiallisilla värjäyksillä saadaan tarkempaa tietoa näytteen solujen hyvän- ja pahanlaatuisuudesta. Nii-tä käytetäänkin erityisesti kasvainsolujen tunnistamisessa ja luokittelussa (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 133).

Immunohistokemiallisten värjäysten tarkoituksena on osoittaa näytteestä kas-vaimen ilmentämä antigeeni sille spesifin vasta-aineen avulla. Antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktio saadaan mikroskoopissa nähtäväksi liittämällä vasta-aineeseen erilaisia merkkiaineita eli leimaamalla se. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 133; DeLellis & Hoda 2006.) Näytettä inkuboidaan tutkitta-van antigeenin mukaan valitulla leimatulla vasta-aineella, jolloin vasta-aine si-toutuu sille spesifiin antigeeniin, mikäli sitä näytteessä esiintyy. (Robinson ym. 1990; Kiernan 1999.)

2.3.3 Reaktiiviset ja benignit muutokset näytteessä

Pleuranestekertymä saa aikaan pleuran kalvojen mesoteelisolujen suurenemi-sen ja muodon pyöristymisen sekä mesoteeliproliferaation eli mesoteelisolujen jakaantumisen. Tämän vuoksi soluja irtoaa pleuran kalvoilta nesteeseen taval-lista enemmän. Mesoteelisoluissa esiintyy usein proliferaation yhteydessä vaih-televan asteista reaktiivista atypiaa. (Bourne 1990, 488; Taskinen 1994, 299-300.)

Reaktiivisella atypialla tarkoitetaan benignejä solumuutoksia, jotka liittyvät usein krooniseen tulehdukseen, virustautiin tai allergiseen tilaan. Atypia voi olla meta-plastista tai regeneratiivista. Metaplastinen atypia on epiteelisolujen erilaistumi-sen vähenemistä. Regeneratiivinen atypia kuvaa normaalista poikkeavaa epi-teelisolukon uudistumista eli regeneraatiota tai epiteelivaurion korjaantumista eli reparaatiota. (Stenbäck & Koivuniemi 1994, 12-13.)

Reaktiivisen atypian erottaminen maligneista solumuutoksista saattaa olla hankalaa. Reaktiiviset muutokset liittyvät kuitenkin usein kroonisiin effuusioihin, joissa solukuva on joko tulehdussolu-, makrofagi- tai mesoteelisoluvaltainen. Voimakasta tulehdusta ja maligneja soluja ei tavallisesti esiinny näytteessä samanaikaisesti. (Bourne 1990, 488; Taskinen 1994, 299-300.)

Etenkin pleuran eksudaatin mesoteelisoluissa esiintyy usein reaktiivista vaihtelua, jopa selvää atypiaa ja mitooseja eli tuman jakautumista. Solukuvan arviointia voi häiritä runsas tulehdussolukko sekä näytteen verisyys tai fibriini- ja proteiinikertymät. Akuuteissa tulehduksissa näytteessä näkyy tavallisesti runsaasti neutrofiilisiä granulosityyttejä ja kroonisissa tulehduksissa lymfosyyttejä. Eosinofiilisten granulosityttien runsaus viittaa usein allergiseen reaktioon, keuhkoinfarktiin tai kasvaimeen. (Bourne 1990, 489; Taskinen 1994, 301–303.)

2.3.4 Pleuran primaariset kasvaimet

Pleuran primaariset kasvaimet saavat alkunsa joko pinnallisesta mesoteelisolukosta tai sen alaisesta sidekudoksesta. Ne ovat harvinaisia, eivätkä yksittäiset hyvänlaatuiset eli benignit pleuran kasvaimet yleensä aiheuta effuusioita. Malignin mesoteliooman ennuste on huono, ja elinaikaa on yleensä vain 12-18 kuukautta diagnoosista. (Taskinen 1994, 305-306.)

Mesotelioomista irtoilee pleuranesteeseen usein runsaasti maligneja soluja yksitellen ja rykelminä. Runsassoluiset reunoiltaan poimuilevat pallomaiset solurykelmät viittaavat vahvasti maligniin mesotelioomaan. Solurykelmät voivat olla myös papillaarisia, rauhasmaisia tai jonomaisia. (Bourne 1990, 490; Taskinen 1994, 306.)

Mesotelioomalle tyypilliset solut ovat kookkaita ja monitumaisia. Sytoplasma on usein melko runsasta ja vakuolisoitunutta eli siinä on runsaasti solunesterakkuiloita. Joskus esiintyy ”kannibalismia” eli solusyöntiä, jossa maligni mesoteelisolufagosytoi eli ottaa sisäänsä toisia maligneja soluja. Mesotelioomalöydösten taustalla nähdään usein paksua juosteista limaa, jota esiintyy reaktiivisessa mesoteeliatypiaassa vähän. (Bourne 1990, 490; Taskinen 1994, 306-309.)

2.3.5 Pleuran metastaattiset kasvaimet

Pleuranesteen maligneista löydöksistä noin 65%:ssa on kyseessä metastaattinen adenokarsinooma eli rauhasepiteelistä peräisin olevan syövän etäpesäke. Yleisimmät pleuraan metastasoivat kasvaimet aikuisilla ovat keuhkon, rintarauhasen, munasarjojen ja mahalaukun adenokarsinoomat. Metastaasi saattaa olla malignin kasvaimen ensimmäinen ilmentymä, jolloin ennuste on aina huono. Keskimääräinen elinikä potilaalla, jolla todetaan pleurametastaasi, on noin kolme kuukautta primaarikasvaimen sijainnista riippuen. (Taskinen 1994, 309.)

Adenokarsinoomalle tyypillisiä rakenteita ovat pallomaiset, papillaariset tai rauhasmaiset monikerroksiset solurykelmät, joiden reunus on usein tasainen. Tummat ovat usein kookkaita, sijaitsevat solun laidassa ja niissä on suuria nukleoleja. Ne voivat olla onttoja, uurteisia tai poimuttuneita. Sytoplasmaa on soluissa tavallista runsaammin, ja siinä esiintyy joskus vakuoleja. (Bourne 1990, 489; Taskinen 1994, 315.)

Hyvin erilaistuneet adenokarsinoomat ovat helposti tunnistettavissa, mutta aina malignin löydöksen tyyppitys ei ole helppoa. Tyyppityksessä kiinnitetään huomiota solujen kokoon, solurakenteisiin, solujen välisiin suhteisiin ja solurykelmien rakenteisiin. Huonosti erilaistuneiden kasvainten tyyppityksessä ja kasvaimen sijainnin arvioinnissa käytetään hyödyksi immunohistokemiallisia värjäyksiä. (Taskinen 1994, 311-316.)

2.3.6 Diagnostiset vastaukset

Sytologisia näytteitä arvioidaan tavallisesti Papanicolaoun (Papa) luokkien avulla (ks. Taulukko 1). Papa-luokkia on viisi, ja ne kuvaavat solujen pahanlaatuisuusastetta. Papa-luokka I tarkoittaa normaalia solukuvaa, ja Papa-luokka V viittaa jo maligniin löydökseen. Myöhemmin Papanicolaoun järjestelmään on lisätty luokka 0, joka kuvaa epäonnistunutta tai riittämätöntä näytettä. (Stenbäck & Koivuniemi 1994, 8-12.)

Taulukko 1. Papanicolaoun luokkien tulkinta. (Muokattu lähteestä Stenbäck & Koivuniemi 1994, 11.)

Papa-luokka	Tulkinta
0	Epäedustava/riittämätön näyte
I	Normaali solukuva
II	Hyvänlaatuisia solumuutoksia eli benigniä atypiaa
III	Lievästi pahanlaatuisuuden suhteen epäilyttäviä (malignisuuspekteja) soluja tai premalignia atypiaa
IV	Vahvasti pahanlaatuisuuden suhteen epäilyttäviä (malignisuuspekteja) soluja
V	Pahanlaatuisia eli maligneja soluja

Kuten sytologisesta näytteestä yleensä, myös pleuranesteen irtosolututkimuksesta annetaan maligniteetti-arvio Papanicolaoun luokkia käyttäen. Lisäksi näytteestä vastataan solujakauma eli eritellään effuusiossa esiintyvät solut ja niiden runsaus. Poikkeavissa löydöksissä patologi antaa lausuntonsa ja sytologisen diagnoosin näytteestä. (Stenbäck & Koivuniemi 1994, 8; Timonen 1998, 86-87; Tykslab 2012a.)

Histologisesta solublokista patologi antaa myös lausunnon ja diagnoosin. Mikäli solublokista on tehty lisäksi immunohistokemiallisia värjäyksiä, vastaukset annetaan erikseen HE-värjäyksestä ja immunohistokemiallisista värjäyksistä. Vastaus saattaa tällöin tarkentua immunohistokemiallisten värjäysten valmistumisen myötä. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 158-159; Tykslab 2012b.)

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla pleuranesteestä kahdella eri menetelmällä saatuja diagnostisia vastauksia ja vastausten eroja. Tutkittavista pleuranestenäytteistä oli tehty sytosentrifugivalmiste, joka oli värjätty Papanicolaoun värjäysmenetelmällä sekä agarsolublokki, josta tehdyt leikkeet oli värjätty hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä. Patologin pyynnöstä solublokista oli voitu tehdä myös immunohistokemiallisia värjäyksiä. Sytosentrifugivalmisteesta ja solublokista oli molemmista annettu omat vastauksensa. Tutkimustehtävänä oli analysoida vastauksia tilastollisin menetelmin.

Tutkimuksen tavoitteena oli saada selville kahden menetelmän yhtenevyys ja menetelmillä tuotettujen laboratoriotutkimustulosten luotettavuus. Mikäli diagnostiset vastaukset poikkeaisivat merkittävästi toisistaan, voitaisiin tulevaisuudessa pohtia vaihtoehtoisia menetelmiä, ja näin parantaa tutkimustulosten luotettavuutta.

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

4.1 Tutkimusaineisto ja -menetelmä

Tutkimusaineistona olivat pleuranesteen sytologisen irtosolututkimuksen tulokset sekä samoista näytteistä valmistettujen histologisten solublokkien diagnostiset vastaukset. Tutkimusaineisto koottiin Tyks:n patologian laboratorion tutkimista näytteistä. Aineisto kerättiin potilastietokannasta Tyks:n patologian yksikön QPati-tietojärjestelmän avulla.

Tutkimusaineistoon mukaan hyväksyttävien näytteiden valintaperusteena oli, että näytteestä oli saatavilla sekä sytologisen irtosolututkimuksen tulos että histologisen solublokin lausunto. Aineistoon valittiin 100 edellä mainitut kriteerit täyttävää näytettä. Tarkasteltavaksi saatiin yhteensä 200 tutkimuksen diagnostiset vastaukset.

Tutkimusmenetelmänä oli kvantitatiivinen vertaileva tutkimus. Siinä tutkimusaineistoa käsitellään tilastotieteen menetelmin oikeiden johtopäätösten aikaansaamiseksi. Ennen kuin tilastotieteellinen analysointi voitiin suorittaa, tutkimusaineiston diagnostiset vastaukset oli saatettava tilastollisesti käsiteltävään muotoon. (Hirsjärvi ym. 2004, 131; Tilastokeskus 2012.)

Tutkimus suoritettiin vertailemalla sytosentrifugivalmisteen perusteella annettua Papa-luokkaa vastaavan näytteen histologisen solublokin Papa-luokkaan. Tilastollista analysointia varten tutkimusaineisto koottiin Microsoft Office Excel -ohjelmalla taulukkomuotoon. Aineiston analysoinnissa apuna käytettiin myös SPSS (*IBM SPSS Statistics 20*) -ohjelmaa.

4.2 Tutkimuksen käytännön toteutus

Tutkimusaineiston keruu suoritettiin Tyks:n patologian yksikössä, sytologian osastolla tammikuussa 2013. Ennen tutkimusaineiston keruuta anottiin Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin Hoitotyön tutkimus- ja opinnäytetyölupaa, joka myönnettiin 11.12.2012 (ks. Liite 1). Tutkimusaineiston analysointi ja tutkimusraportin kirjoittaminen suoritettiin kevään 2013 aikana. Tutkimuksen käytännön toteutuksessa apuna olivat Tyks:n patologian yksikön solubiologi ja sytologiasistentti. Turun ammattikorkeakoulusta ohjaajana toimi FT Sanna Virtanen.

4.2.1 Tutkimusaineiston keruu

Tutkimusaineisto kerättiin Qpati-tietojärjestelmän avulla potilastietokannasta tutkimuksen tekijän käsiteltäväksi. Aineiston keruun suoritti ohjaaja, koska tekijällä ei ollut pääsyä potilastietokantaan. Tietokantahaussa käytettiin "Pleural cytologic material" -hakutermiä. Tutkimukseen sopivat tapaukset valittiin satunnaisesti vuonna 2012 tehdyistä pleuranesteen sytologisista tutkimuksista.

Valittaessa tutkimukseen sopivia pleuranesteen irtosolututkimuksen tuloksia ja histologisen solublokin lausuntoja tuli huomioida näytteiden saapumispäivä. Sytosentrifugi- ja solublokinäytteen saapumispäivien piti olla samat, jotta varmistuttiin siitä, että molemmat valmisteet oli tehty potilaan samasta näytteestä. Tutkimuksista kirjattiin ylös potilaan ikä ja sukupuoli sekä tutkimusten diagnostiset vastaukset. Mitään yksilöiviä potilas- tai tunnistetietoja ei poimittu tietokannasta, ja tällä varmistettiin potilaiden yksityisyyden suoja.

Tietokantahaun jälkeen tutkimukseen tarvittavat tiedot kirjattiin Microsoft Office Excel -ohjelmalla taulukkomuotoon. Yhdessä ohjaajan kanssa päädyttiin siihen, että menetelmien vastaavuutta vertaillaan Papa-luokkien avulla. Kaikista solublokeista Papa-luokkaa ei oltu erikseen vastattu, jolloin luokka tuli päätellä lausunnon ja diagnoosin pohjalta. Excel-taulukkoon kirjattiin näytteiden tunnistenumerot (1-100), potilaan ikä ja sukupuoli sekä sytosentrifugivalmisteen ja solublokin perusteella annetut Papa-luokat.

4.2.2 Aineiston analysointi

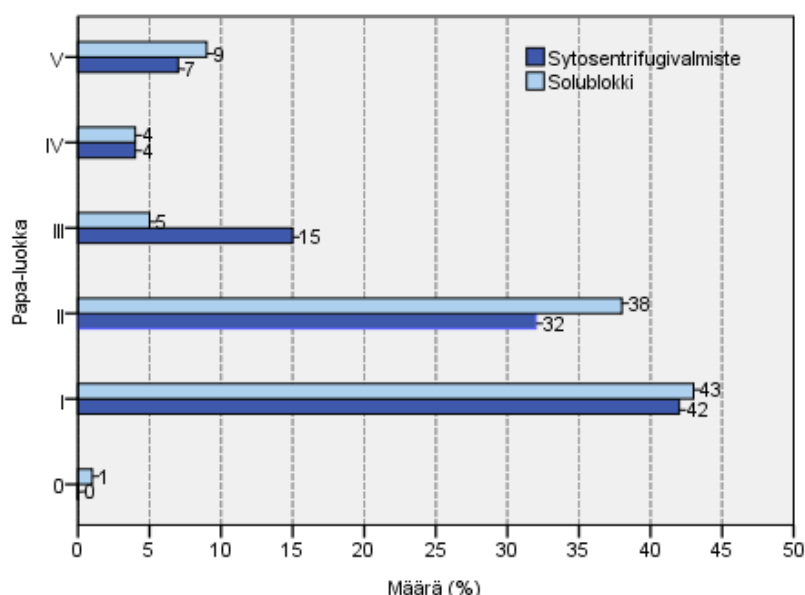
Aineistoa analysoitiin SPSS-ohjelmalla, joka on tilastotieteelliseen analyysiin suunniteltu ohjelmisto. Taulukoiden ja kaavioiden tekemisessä apuna käytettiin lisäksi Excel-ohjelmaa. Tutkimusaineistosta laskettiin kunkin Papa-luokan prosentuaaliset osuudet koko näytemäärästä sekä sytosentrifugivalmisteissa että solublokeissa. Ristiintaulukoimalla havainnollistettiin sitä, miten vastaukset eroavat eri menetelmillä tutkittuina.

SPSS-ohjelmalla suoritettiin myös Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi. Testin avulla selvitettiin, onko kahdella menetelmällä samasta näytteestä saatujen Papa-luokkien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa. Wilcoxonin testin tuloksena saadaan p-arvo, joka kertoo erojen merkitsevyydestä. Erot ovat erittäin merkitseviä, kun $p < 0,001$, merkitseviä, kun $0,001 \leq p < 0,01$ ja jokseenkin merkitseviä, kun $0,01 \leq p < 0,05$. Mikäli p-arvo on suurempi kuin 0,05, muuttujien välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi ei edellytä aineistolta normaalijakaumaa ja sopii myös järjestysasteikollisille muuttujille. Siksi se katsottiin käyttökelpoiseksi tähän tutkimukseen. (Ernvall 2012a, 9; Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2003.)

Kahdella menetelmällä vastattujen Papa-luokkien keskinäistä riippuvuutta tarkasteltiin myös pareittain korrelaation avulla. Korrelaation arviointia varten laskettiin SPSS-tilasto-ohjelmalla Spearmanin korrelaatiokerroin, r . Se on yleisimmin käytetty järjestyskorrelaatiokerroin ja sopi tähän tutkimukseen, koska tutkitavat muuttujat ovat järjestysasteikollisia. Korrelaatio tulkitaan voimakkaaksi, kun $0,7 \leq r < 1$, kohtalaiseksi, kun $0,3 \leq r < 0,7$ ja heikoksi/merkityksettömäksi, kun $0 < r < 0,3$. Korrelaatiokerroimen ollessa 0, muuttujien välillä ei ole riippuvuutta. Jos korrelaatiokerroin on puolestaan 1, muuttujien välillä on täydellinen riippuvuus. Korrelaatiokerroimen yhteydessä ilmoitetaan usein myös p-arvo, joka kertoo tuloksen merkitsevyydestä. (Ernvall 2012b, 6; Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2004.)

5 TUTKIMUSTULOKSET

Tutkimukseen valituista pleuranesteen irtosolunäytteistä 64% oli otettu miehiltä ja 36% naisilta. Potilaiden ikä vaihteli 40 ja 98 vuoden välillä. Miehet olivat keskimäärin 69-vuotiaita ja naiset 73-vuotiaita. Papa-luokkien esiintyvyydet näytteissä jakautuivat melko epätasaisesti (ks. Kuvio 1). Suurin osa näytteistä oli solukuvaltaan normaaleja tai niissä esiintyi benignejä muutoksia. Papa-luokkaan I kuului 42% sytosentrifugivalmisteista ja 43% solublokeista. Papa-luokkaan II kuului puolestaan 32% sytosentrifugivalmisteista ja 38% solublokeista.



Kuvio 1. Papa-luokkien osuudet tutkimusaineistossa eri valmisteiden mukaan.

Muut Papa-luokat oli tutkimusaineiston näytteissä niukemmin edustettuina. Papa-luokkaan III kuului 15% sytosentrifugivalmisteista ja 5% solublokeista: Lievästi malignisuspekteja löydöksiä havaittiin sytosentrifugivalmisteistä selvästi enemmän kuin solublokkimenetelmällä. Vahvasti malignisuspekteja soluja löydettiin molemmilla menetelmillä yhtä paljon: Papa-luokka IV oli vastattu kummankin menetelmän perusteella 4% näytteistä. Selviä karsinoomalöydöksiä diagnosoitiin solublokkien avulla hieman enemmän kuin sytosentrifugivalmisteiden perusteella: Papa-luokkaan V kuului 7% sytosentrifugivalmisteistä ja 9% solublokkien näytteistä.

Ensin kaikkia sytosentrifugivalmisteiden ja solublokkien perusteella annettuja Papa-luokkia (0)I-V analysoitiin yhdessä, jotta saatiin kokonaiskuva Papa-luokkien vastaavuudesta. Aineiston analysointi aloitettiin parierojen vertailulla tekemällä Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi (ks. Taulukko 2). Testin tuloksena saatiin, ettei sytosentrifugivalmisteiden ja solublokkien perusteella annettujen vastausten välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa ($p=0,467$).

Taulukko 2. Sytosentrifugivalmisteen ja solublokin perusteella vastattujen Papa-luokkien erot.

Wilcoxonin merkittyjen sijalukujen testi

<i>Muutokset Papa-luokissa</i>		<i>n</i>	<i>p</i>
<i>Solublokki - Sytosentrifugivalmiste</i>	Negatiivinen muutos	20 ^a	0,467
	Positiivinen muutos	15 ^b	
	Ei muutosta	65 ^c	
	Yhteensä	100	

a. Papa-luokka solublokin perusteella < Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

b. Papa-luokka solublokin perusteella > Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

c. Papa-luokka solublokin perusteella = Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

Vastaavat Papa-luokat sekä sytosentrifugivalmisteen että solublokin perusteella oli annettu kuitenkin vain 65 näytteestä sadasta. Kun laskettiin eri menetelmillä vastattujen Papa-luokkien välinen korrelaatio, saatiin Spearmanin korrelaatiokertoimeksi 0,606 ($p<0,001$). Sytosentrifugivalmisteiden ja solublokkien Papa-luokkien välinen korrelaatio oli kohtalaista.

Solublokeista 20 näytteessä Papa-luokka oli pienempi ja 15 tapauksessa suurempi kuin vastaavan näytteen sytosentrifugivalmisteen perusteella oli vastattu. Samasta näytteestä eri menetelmillä vastattujen Papa-luokkien välillä oli vaihtelevuutta, mutta selvää päätelmää sen suhteen, antaako toinen menetelmä toistuvasti pienemmän tai suuremman Papa-luokan, ei kuitenkaan voitu tehdä. Siksi verrattiin vielä erikseen kaikkia sytosentrifugivalmisteiden perusteella vastat-

tuja Papa-luokkia solublokin tutkimisen jälkeen annettuihin Papa-luokkiin. Vertailu kahden menetelmän välillä suoritettiin ristiintaulukoimalla (ks. Taulukko 3).

Taulukko 3. Sytosentrifugivalmisteen Papa-luokan vastaavuus samasta näytteestä valmistetun solublokin Papa-luokkaan.

		Näytteen Papa-luokka solublokin perusteella							
		0	I	II	III	IV	V	Yhteensä	
Näytteen Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella	I	<i>f</i>	1	30	9	2	0	0	42
		%	2,4%	71,4%	21,4%	4,8%	0,0%	0,0%	100,0%
	II	<i>f</i>	0	8	23	0	1	0	32
		%	0,0%	25,0%	71,9%	0,0%	3,1%	0,0%	100,0%
	III	<i>f</i>	0	4	5	3	1	2	15
		%	0,0%	26,7%	33,3%	20,0%	6,7%	13,3%	100,0%
	IV	<i>f</i>	0	1	1	0	2	0	4
		%	0,0%	25,0%	25,0%	0,0%	50,0%	0,0%	100,0%
	V	<i>f</i>	0	0	0	0	0	7	7
		%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Yhteensä	<i>f</i>	1	43	38	5	4	9	100
		%	1,0%	43,0%	38,0%	5,0%	4,0%	9,0%	100,0%

Ristiintaulukoimalla saatiin selville, että näytteistä, joista oli vastattu sytosentrifugivalmisteen perusteella Papa-luokka I (n=42), 71,4% vastattiin samaan luokkaan kuuluvaksi myös solublokkimenetelmällä. Näytteistä 26,2% puolestaan antoi solublokkimenetelmän perusteella suuremman Papa-luokan. 21,4%:ssa todettiin solublokeissa benigniä atypiaa, ja ne sijoitettiin Papa-luokkaan II. 4,8%:ssa diagnosoitiin solublokkien pohjalta maligniteetin suhteen lievästi epäilyttävä löydös eli ne luokiteltiin Papa-luokkaan III. Lisäksi joukossa oli yksi tapaus, josta vastattiin solublokkimenetelmällä luokka 0, koska näyte todettiin liian niukaksi.

Kun tarkasteltiin näytteitä, joista oli vastattu sytosentrifugivalmisteen perusteella Papa-luokka II (n=32), saatiin selville, että 71,9% näytteistä, sijoitettiin samaan Papa-luokkaan myös solublokin tutkimisen jälkeen. Näytteistä 3,1% antoi solublokkimenetelmällä suuremman luokan ja ne sijoitettiin Papa-luokkaan IV. Puolestaan pienempi luokka saatiin 25%:sta tapauksista, ja nämä näytteet kuuluivat tällöin solublokin mukaan Papa-luokkaan I.

Maligniteetin suhteen lievästi epäilyttäviksi oli vastattu sytosentrifugivalmisteista 15%, mutta solublokkien perusteella vain 5% näytteistä. Tapauksista, joista oli vastattu sytosentrifugivalmisteen perusteella Papa-luokka III (n=15), 20% vastattiin samaksi luokaksi myös solublokkimenetelmällä. Näytteistä 20% antoi suuremman vastauksen solublokin tutkimisen jälkeen: 6,7% luokiteltiin Papa-luokkaan IV ja 13,3% Papa-luokkaan V. Tapauksista 60%:sta vastattiin pienempi luokka solublokin perusteella: 33,3% sijoitettiin Papa-luokkaan II ja 26,7% Papa-luokkaan I.

Papa-luokkaan IV eli maligniteetin suhteen vahvasti epäilyttäviksi diagnosoitiin molemmilla menetelmillä 4% näytteistä. Tapauksista, jotka sytosentrifugivalmisteen tutkimisen pohjalta vastattiin Papa-luokkana IV (n=4), 50% luokiteltiin myös solublokin tutkimisen jälkeen samaan luokkaan. Loput 50% jakaantuivat solublokkimenetelmällä pienempiin Papa-luokkiin I ja II.

Maligneja löydöksiä diagnosoitiin solublokkien perusteella hieman enemmän kuin sytosentrifugivalmisteiden pohjalta. Kuitenkin kaikki näytteet, jotka sytosentrifugivalmisteen tutkimisen perusteella luokiteltiin maligneiksi (n=7), vastattiin Papa-luokkaan V myös solublokin tutkimisen jälkeen (ks. Taulukko 4).

Taulukko 4. Sytosentrifugivalmisteen ja solublokin perusteella vastattujen Papa-luokkien erot Papa-luokittain.

Näytteen Papa-luokka sytosentrifugivalmisteessa	Papa-luokan muutos solublokin tutkimisen jälkeen		
	Ei muutosta Papa-luokassa ^a	Muutos suurempaan Papa-luokkaan ^b	Muutos pienempään Papa-luokkaan ^c
I	71,4 %	26,2 %	2,4 %
II	71,9 %	3,1 %	25 %
III	20 %	20 %	60 %
IV	50 %	0 %	50 %
V	100 %	0 %	0 %

a. Papa-luokka solublokin perusteella = Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

b. Papa-luokka solublokin perusteella > Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

c. Papa-luokka solublokin perusteella < Papa-luokka sytosentrifugivalmisteen perusteella

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Yleisesti pleuranesteen sytologisen irtosolututkimuksen diagnostiset tulokset vastasivat toisiaan kohtalaisesti. Samasta näytteestä vastatut Papa-luokat vaihtelivat jonkin verran tutkimusmenetelmästä riippuen, mutta selvää suuntaa ei voida sanoa, antaako toinen menetelmä toistuvasti pienemmän tai suuremman Papa-luokan kuin toinen. Sytosentifugivalmisteissa havaitut benignit muutokset tulkittiin 25%:ssa tapauksista solukuvaltaan normaaleiksi solublokkien perusteella. Toisaalta taas 26,2% sytosentifugivalmisteiden mukaan normaaleista näytteistä vastattiin solublokkien perusteella benigneiksi tai maligniteetin suhteen lievästi epäilyttäviksi.

Tarkasteltaessa erikseen Papa-luokkia III-IV eli malignisuspekteja näytteitä, havaittiin kahden menetelmän perusteella vastattujen Papa-luokkien välillä merkittävää vaihtelua. Sytosentifugivalmisteista havaittuja maligniteetin suhteen epäilyttäviä löydöksiä ei oltu usein solublokkien perusteella diagnosoitu lainkaan. Lähes 60%:sta näytteistä, joista oli sytosentifugivalmisteiden perusteella annettu Papa-luokka III tai IV, oli vastattu solublokin tutkimisen jälkeen pienempi luokka eli Papa-luokka I tai II. Selvästi malignit löydökset, jotka luokitellaan Papa-luokkaan V, havaittiin puolestaan solublokeista hieman paremmin kuin sytosentrifugivalmisteista.

7 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla pleuranesteestä kahdella eri menetelmällä saatuja diagnostisia vastauksia ja vastausten eroja. Tavoitteena oli saada selville kahden menetelmän yhtenevyys ja menetelmillä tuotettujen laboratorio-tutkimustulosten luotettavuus. Tutkimuksen suunnitteluvaiheessa asetettuihin ongelmiin saatiin tutkimuksen edetessä vastaukset, ja tuloksia voidaan hyödyntää käytännön työelämässä.

Saadut tutkimustulokset ovat hieman ristiriitaisia: Joidenkin Papa-luokkien kohdalla solublokin perusteella saatiin joskus pienempi Papa-luokka kuin sytosentrifugivalmisteen tutkimisella, mutta toisten Papa-luokkien kohdalla suunta oli taas päinvastainen. Merkittävintä vaihtelu oli Papa-luokissa III ja IV, joissa Papa-luokka useimmiten muuttui solublokin tutkimisen jälkeen sytosentrifugivalmisteseen nähden pienemmäksi.

Se, miksi solublokin perusteella saadaan usein pienempi Papa-luokka malignisuspekteissa löydöksissä, saattaa johtua siitä, ettei soluja leikkaannu agar-solublokkimenetelmällä objektilasille riittävästi, kuten Sorvali (2005, 141-144) on tutkimuksessaan osoittanut. Tällöin malignisuspekteja soluja ei välttämättä saada objektilasille mikroskopoitavaksi. Tutkimuksessa oli mukana myös tapaus, josta sytosentrifugivalmisteen perusteella oli vastattu Papa-luokka I, mutta solublokin perusteella vastausta ei voitu niukkuuden vuoksi lainkaan antaa. Myös useissa muissa solublokkien lausunnoissa oli huomautus niukasta näytteestä tai että näyte sisälsi vain runsaasti verta.

Syitä siihen, miksi agarmenetelmällä objektilasille saatava solumäärä jää niukaksi, on havaittu useita. Soluja ei saada valettua agariin kovin tiiviisti, ja siksi objektilasille leikkautuu vain satunnaisia soluja. Myös agarnapin valmistustekniikassa on useita tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa lopulliseen näytelasille saatavaan solumäärään. Näitä tekijöitä ovat muun muassa käytetyn koeputken malli,

lisätyn agarin määrä ja sekoitustapa soluihin sekä agarnapin leikkaustyyli. (Sorvali 2005, 141-144.)

Maligneissa tapauksissa niukan näytteen ongelmaa ei solublokeissa havaittu olevan. Kasvaimesta irtoaakin usein paljon soluja näytteeseen (Myhre 1993, 195), jolloin myös objektilasille saatava solumäärä on luonnollisesti runsaampi. Maligneja löydöksiä diagnosoitiin solublokkien perusteella jopa hieman enemmän kuin sytosentrifugivalmisteiden pohjalta. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että solublokeista tehty immunohistokemialliset värjäykset ovat antaneet solujen pahanlaatuisuudesta tarkempaa tietoa kuin Papanicolaoun värjäys.

7.1 Virhelähteet

Tutkimusaineistoon kerättiin ensin tietoa runsaammin kuin mitä tutkimukseen lopulta tarvittiin. Tutkimukseen tarvittavat tiedot siirrettiin Excel-taulukon muotoon käsin kirjaamalla. Tiedot käytiin useaan kertaan läpi, jotta oikeilla sarakkeilla ja riveillä oli varmasti oikeat tiedot. Virheiden mahdollisuus käsin kirjauksessa on silti olemassa, vaikka huolellisuutta ja tarkkuutta noudatettiinkin.

Tutkimukseen vaikuttavia virheitä on voinut tapahtua myös tutkimuksen tekijästä riippumatta. Laboratoriotutkimusprosessi, jonka sytologinen näyte käy läpi, on erittäin monivaiheinen ja virheitä on voinut tapahtua missä tahansa prosessin vaiheessa. Tutkimusaineistoon valittujen näytteiden tulkintaan vaikuttavia virheitä on voinut tapahtua jo näytteiden otossa ja preparaatin valmistuksessa sekä vielä mikroskopoitaessa ja vastausten kirjaamisessa. Luotettavan diagnoosin aikaansaaminen edellyttää huolellista työskentelyä ja osaamista.

7.2 Tutkimuksen luotettavuus

Tutkimuksen tekijällä oli tilastollisesta analysoinnista hyvin vähän aikaisempaa kokemusta. Myös SPSS-tilasto-ohjelma oli aluksi täysin vieras ohjelmisto. Tutkimuksen tekijä sai kuitenkin lyhyen perehdytyksen tilasto-ohjelman käytöstä ja tarvittaessa apua ohjaajilta aineiston analysoinnissa. Aineiston käsittelytapaa ja

analysointiin sopivia tilastollisia testauksia pohdittiinkin yhdessä ohjaajien kanssa, jotta saatiin aineistosta mahdollisimman paljon irti.

Ensin tutkimukseen valittiin 50 näytettä, mutta koska suurempien Papa-luokkien osuus jäi näin hyvin pieneksi, päätettiin näytemäärä nostaa sataan. Siltikin luotettavuutta laskee se, että esimerkiksi Papa-luokkaa IV oli edustamassa vain 4% näytteistä. Suurin osa näytteistä kuului Papa-luokkaan I tai II. Papa-luokkien I ja II perusteella tehdyt havainnot ovat näin ollen paljon luotettavampia kuin suuremmista Papa-luokista saadut tutkimustulokset.

Suhteellisen pienestä otoksesta huolimatta tutkimustulokset vaikuttavat luotettavilta, koska solublokkien ja sytosentrifugivalmisteiden Papa-luokkien välillä on todettu aikaisemmissakin tutkimuksissa olevan eroa (Weihmann ym. 2012 553-559). Agarsolublokkimenetelmä on koettu heikoksi menetelmäksi, koska soluja ei leikkaannu menetelmällä objektilasille riittävästi (Sorvali 2005, 141-144). Toisaalta solublokkimenetelmällä on todettu saavan tarkempaa tietoa solujen pahanlaatuisuudesta, koska solublokista voidaan tehdä myös immunohistokemiallisia värjäyksiä (Martín ym. 2001, 723-730; Weihmann ym. 2012 553-559). Näistä syistä voi myös johtua, että tutkimuksesta saadut tulokset ovat hieman ristiriitaisia.

Tutkimuksen luotettavuuteen vaikuttaa myös se, että aineiston pleuranestenäytteitä ovat diagnosoineet useat Tyks:in patologian yksikön patologit. Heidän välillä voi olla pieniä tulkinta eroja, jotka ovat voineet vaikuttaa annettuihin Papa-luokkiin. Etenkin Papa-luokkien II ja III sekä III ja IV välinen raja voi olla hyvinkin häilyvä. Annettuihin diagnostisiin tuloksiin on voinut vaikuttaa myös patologin osaaminen ja kokemus mikroskoppoinnista. Lisäksi sytosentrifugivalmisteiden esitarkastajan tekemät huomiot näytteestä ovat voineet vaikuttaa patologin antamaan vastaukseen. Yleensä pyritään siihen, että samasta potilaasta tehdyt valmisteet tulkitsee sama patologi, mutta aina se ei onnistu. Sytosentrifugivalmisteesta saadaan usein tulos ensin, koska solublokin valmistamiseen, leikkaamiseen ja värjäämiseen kuluu enemmän aikaa.

Tutkimusaineiston diagnostiset vastaukset olivat myös tyyliltään hyvin erilaisia, koska jokaisella patologilla on oma tapansa kirjoittaa. Jotkut lausunnot olivat pitkiä ja selkeitä tulkita, kun taas toiset olivat kovin lyhyitä. Osassa vastauksista oli ilmoitettu Papa-luokka myös solublokista, mutta toisista se piti päätellä lausunnon ja diagnoosin perusteella. Yleensä näytteen Papa-luokka solublokista oli helposti pääteltävissä, ja tutkimuksen tekijällä oli myös mahdollisuus keskustella ohjaajan kanssa epäselvistä tapauksista. Tutkimuksen luotettavuutta olisi kuitenkin lisännyt se, jos kaikista solublokeista olisi annettu Papa-luokka jo valmiiksi.

7.3 Tutkimusetiikka

Tutkimusetiikan toteutumisen lähtökohtana on tutkimuksen luotettavuus ja avoimuus sekä ihmisarvon kunnioittaminen. Luotettavuudella tarkoitetaan sitä, että tutkimuksella tuotettavaan informaatioon suhtaudutaan kriittisesti ja tutkimustulokset on perusteltavissa. Omia tuloksia ei vääristellä eikä oleellisia seikkoja jätetä kertomatta. Myös toisen tekstin luvaton kopioiminen ja esittäminen omana on kiellettyä. (Pietarinen 2002, 59-66; Kuula 2006, 60.) Tässä tutkimuksessa eettiset näkökohdat huomioitiin ja tutkimuseettisiä periaatteita noudatettiin tutkimuksen jokaisessa vaiheessa.

Ihmistä tutkittaessa on huomioitava tutkittavien itsemääräämisoikeus, vahingoittumattomuus ja yksityisyyden kunnioittaminen (Kuula 2006, 60). Vaikka tässä tutkimuksessa tutkittiin laboratoriotutkimusmenetelmiä eikä ihmistä, tutkimuksen aineistona käytettiin silti potilastuloksia. Tutkimuksen tulos ei kuitenkaan vaikuttanut potilaiden diagnooseihin tai hoitoon. Tutkimusta varten ei myöskään tarvittu potilaista uusia näytteitä, sillä aineistona käytettiin jo valmiiksi vastattuja potilastuloksia. Näin ollen potilaille ei aiheutunut tutkimuksesta minkäänlaista haittaa tai vaivaa.

Jokaisen tutkijan velvollisuus on noudattaa tietosuojalakea. Tietosuojalla tarkoitetaan ihmisen yksityisyyden kunnioittamista ja suojelemista. Tietosuojan toteutuminen edellyttää tutkittavien henkilötietojen suojaamisen niin, etteivät ne pää-

se ulkopuolisten käsiin. (Kuula 2006, 64.) Tässä tutkimuksessa käytettiin sytologisen tutkimuksen tuloksia sekä histologisia lausuntoja ja diagnooseja. Potilaiden yksityisyyden suoja pysyi taattuna, koska aineisto käsiteltiin nimettömänä ja ilman tunnistetietoja. Tutkimusaineisto oli koko tutkimuksen ajan sähköisessä muodossa, eikä sitä missään vaiheessa tulostettu paperille. Aineiston käsittelyn jälkeen tutkimusmateriaali hävitettiin.

7.4 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimusaiheena voisi olla vastaavanlaisen tutkimuksen suorittaminen runsaammalla näytämäärällä, jolloin myös suuremmat Papa-luokat tulisivat paremmin edustetuiksi. Tässä tutkimuksessa suurin osa näytteistä oli Papa-luokkaa I tai II. Vertailtavaksi voisi ottaa myös pelkästään näytteitä, joista on sytosentifugivalmisteen perusteella annettu Papa-luokka III-V.

Jatkotutkimuksena voisi myös selvittää, miksi sytosentifugi- ja agarsolublokkimenetelmällä ei aina saada vastaavia diagnostisia tuloksia. Olisi mielenkiintoista tietää, johtuuko se todella siitä, ettei soluja leikkaannu objektilasille agarsolublokkimenetelmällä tarpeeksi. Mielenkiintoista olisi selvittää myös, miksi tässä tutkimuksessa 26,2% sytosentrifugivalmisteiden mukaan solukuvaltaan normaaleista näytteistä tulkittiin solublokin perusteella benigneiksi tai lievästi malignuspekteiksi, ja onko agarsolublokkimenetelmä kuitenkin epäluotettavampi kuin sytosentrifugimenetelmä.

LÄHTEET

Aho, H. 2000. Sytologiset värjäykset. *Moodi* 4-5/2000, 140-147.

Anttila, S.; Kaarteenaho, R. & Pääkkö, P. 2012. Keuhkot ja pleura. Teoksessa Mäkinen, M.; Carpén, O.; Kosma, V.; Lehto, V.; Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Duodecim, 505-572.

Bales, C. & Durfee, G. 1979. *Cytologic Techniques*. Teoksessa Koss, L. (toim.) *Koss' Diagnostic Cytology and It's Histopathologic Bases*. 3. uudistettu painos. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1187-1266.

Beltina – Health Encyclopedia. 2013. Pleura definition. Viitattu 5.2.2013 <http://www.beltina.org/health-dictionary/pleura-definition.html>

Bourne, L. 1990. Non-gynaecological cytology. Teoksessa Bancroft, J. & Stevens, A. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3. uudistettu painos. Edinburgh: Churchill Livingstone, 481-495.

DeLellis, R. & Hoda, R. 2006. *Immunocytochemistry and Molecular Biology in Cytological Diagnosis*. Teoksessa Koss, L. (toim.) *Koss' Diagnostic Cytology and It's Histopathologic Bases*. 5. uudistettu painos. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1635-1671.

Ernvall, S. 2012a. IBM SPSS Statistics tilasto-ohjelma. Pikaopas. Turun ammattikorkeakoulu.

Ernvall, S. 2012b. Tilastotieteen menetelmiä. Riippuvuudet ja yhteydet. Kurssimateriaali. Turun ammattikorkeakoulu.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. *Tutki ja kirjoita*. 10., uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Kiernan, J. 1999. *Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice*. 3., uudistettu painos. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Kuula, A. 2006. *Tutkimusetiikka: aineistojen hankinta, käyttö ja säilytys*. Tampere: Vastapaino.

Martín, F.; Pastor, J.C.; Saornil, M.A.; Aragón, J.; Rodríguez De La Rúa, E.; Bailez, C.; Miranda, I. & Fernández, N. 2001. Comparison of different techniques for cytologic analysis of vitreous specimens. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 12/2001, 723-730. Viitattu 22.11.2012

<http://www.oftalmo.com/seo/archivos/articulo.php?idSolicitud=951&numR=12&mesR=12&anioR=2001&idR=53>

Myhre, E. 1993. *Patologia*. Keuruu: Otava.

Naukkarinen, A. & von Boguslawsky, K. 1998. *Immunohistokemia*. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino, 133-159.

Niemi, M.; Virtanen, I. & Vuorio, E. 1995. *Solu- ja molekyylibiologia*. 6., uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Nienstedt, W.; Hänninen, O.; Arstila, A. & Björkqvist, S. 2004. *Ihmisen fysiologia ja anatomia*. 15., uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Nurminen, J. 2004. *Histologia*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

- Pietarinen, J. 2002. Eettiset perusvaatimukset tutkimustyössä. Teoksessa Karjalainen, S.; Lounis, V.; Pelkonen, R. & Pietarinen, J. Tutkijan eettiset valinnat. Helsinki: Gaudeamus, 58-69.
- Rantala, I.; Naukkarinen, A. & Helin, H. 1998. Histologia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino, 65-80.
- Riska, H. 2007a. Keuhkosityöpä ja mesoteliooma. Teoksessa Mäyränpää, M. (toim.) Therapia Fennica. 9., uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. Viitattu 7.3.2013 http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Keuhkosity%C3%B6p%C3%A4_ja_mesoteliooma
- Riska, H. 2007b. Pleuranestekertymä. Teoksessa Mäyränpää, M. (toim.) Therapia Fennica. 9., uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. Viitattu 4.11.2012 <http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Pleuranestekertym%C3%A4>
- Riska, H. & Saarelainen, S. 2011. Nestettä pleurassa – ongelmasta hoitoon. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 2/2011, 185-190.
- Robinson, G.; Ellis, I. & MacLennan, K. 1990. Immunocytochemistry. Teoksessa Bancroft, J. & Stevens, A. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 3. uudistettu painos. Edinburgh: Churchill Livingstone, 413-436.
- Sorvali, K. 2005. Agar- vs. trombiinisolublokki. Moodi 4/2005, 141-144.
- Stenbäck, F. & Koivuniemi, A. 1994. Yleistä sytologiaa. Teoksessa Koivuniemi, A. (toim.) Kliininen sytologia: irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kandidaattikustannus Oy, 1-16.
- Stevens, A. 1990. The haematoxylin. Teoksessa Bancroft, J. & Stevens, A. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 3. uudistettu painos. Edinburgh: Churchill Livingstone, 107-118.
- Taskinen, E. 1994. Pleura- ja askitesnesteen irtosolututkimukset. Teoksessa Koivuniemi, A. (toim.) Kliininen sytologia: irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kandidaattikustannus Oy, 297-318.
- Tilastokeskus 2012. Kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen tutkimus. Viitattu 22.11.2012 <http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/01/04/index.html>
- Timonen, T. 1998. Sytologia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino, 81-87.
- Tykslab 2012a. Tutkimusohjekirja. Pf-Pleuranesteen irtosolututkimus. Viitattu 4.11.2012 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/4076.html>
- Tykslab 2012b. Tutkimusohjekirja. Histologinen solublokki sytologisesta näytteestä. Viitattu 4.11.2012 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/11216.html>
- Tyks-Sapa-liikelaitos 2010. Solublokki agar-menetelmällä. Työohje. Patologian palvelualue: Sytologian laboratorio.
- Tyks-Sapa-liikelaitos 2013. Sytologian laboratorion työpisteet. Toimintaohje. Patologian palvelualue: Sytologian laboratorio.
- Venojärvi, M. 2011. Sytologisen näytteen laboratorioprosessi. Kurssimateriaali. Turun ammattikorkeakoulu.
- Weihmann, J.; Weichert, C.; Petersen, I. & Gajda, M. 2012. Evaluation of a cell block method in cytological diagnostics. Der Pathologe 6/2012, 553-559. Viitattu 25.11.2012 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00292-012-1586-8>

Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2003. Hypoteesien testaus. Viitattu 10.3.2013
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hypoteesi/testaus.html>

Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto 2004. Korrelaatio ja riippuvuusluvut. Viitattu 19.2.2013
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/korrelaatio/korrelaatio.html>

LUPAHAKEMUS (katso erilliset ohjeet: <http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus>)

Hakemus lähetetään: VSSHP, TYKS, Hoitotyön toimisto, suunnittelija, PL 52, 20521 TURKU

 Uusi tutkimus Jatko/Muutos lupaan

TUTKIMUSLUVAN HAKIJA/HAKIJAT	Nimi/nimet: Jenna Janita Leppäsalo
	Osoite: Uudenmaankatu 18 as.17, 20500 Turku puhelin:0407633506 sähköposti: jenna.j.leppasalo@students.turkuamk.fi
Opiskelu- tai työpaikka	Turun ammattikorkeakoulu, Terveyden ja hyvinvoinnin oppilaitos
Opinnäytetyö	<input type="checkbox"/> Väitöskirja <input type="checkbox"/> Pro gradu <input checked="" type="checkbox"/> Opinnäytetyö/AMK <input type="checkbox"/> muu, mikä? _____ <input type="checkbox"/> Licensiaattityö <input type="checkbox"/> Ylempi AMK
TUTKIMUKSEN/OPINNÄYTETYÖN TIIVISTETTY KUVAUS (mm. tutkimuksen nimi, päätavoitteet, menetelmät, aineisto, tutkimuksen suorituspaikka, tutkimuksen merkitys)	Pleuranesteen sytosentrifugivalmisteiden ja solublokkien diagnostisten vastausten vertailu: Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla pleuranesteestä kahden eri menetelmän perusteella annettuja diagnostisia vastauksia. Tutkimusaineisto sisältää pleuranesteen sytologisen irtosolututkimuksen tuloksia sekä samoista näytteistä valmistettujen histologisten solublokkien tuloksia. Tehtävänä on analysoida vastauksia tilastollisin menetelmin. Opinnäytetyön tavoitteena on saada selville kahden menetelmän yhtenevyys ja menetelmillä tuotettujen laboratoriotutkimustulosten luotettavuus. Mikäli vastaukset poikkeavat merkittävästi toisistaan, voidaan tulevaisuudessa pohtia vaihtoehtoisia menetelmiä, ja näin parantaa tutkimustulosten luotettavuutta. Tutkimus suoritetaan Turun yliopistolaisen keskussairaalan patologian yksikön sytologian osastolla.
TUTKIMUKSEN OHJAAJA(T) YHTEYSTIEDOT	5.12.2012 <i>Sanna Virtanen</i> allekirjoitus/nimen selvennys Sanna Virtanen sanna.virtanen@turkuamk.fi 10.12.2012 <i>Veronica Fagerholm</i> allekirjoitus/nimen selvennys VERONICA FAGERHOLM Veronica.fagerholm@tyks.fi
SITOUS JA JULKAISULUPA	Sitoudun noudattamaan hyvää tutkimuskäytäntöä, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä vaiitovelvollisuutta (http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/10711 , www.turkuacr.fi). 10.12.2012 <i>Jenna Leppäsalo</i> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys JENNA LEPPÄSALO 1.1.2013 <i>Jenna Leppäsalo</i> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys 1.1.2013 <i>Jenna Leppäsalo</i> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys
YLIHOITAJAN LAUSUNTO JA YHDYSHENKILÖN NIMEÄMINEN VSSHP:ssä	Klinikan/yksikön kehittämishanke, johon opinnäytetyö/tutkimus liittyy: Yhdyshenkilö/virkan/toimen nimike: _____ (yh nimeää) Puollan <input type="checkbox"/> En puolla <input type="checkbox"/> Ylihoitaja(t) 1/1 _____ allekirjoitus/nimen selvennys 1/1 _____ allekirjoitus/nimen selvennys
HOITOTYÖN ASiantuntija-ryhmän lausunto	<input type="checkbox"/> Lupaa puolletaan <input type="checkbox"/> Ei puolleta, Perustelu (tarv. liitteenä) <input type="checkbox"/> Pyydetään lähettämään eettiselle toimikunnalle 1/1 _____ allekirjoitus/nimen selvennös <input type="checkbox"/> Pyydetään lisäselvityksiä: _____
EETTINEN TOIMIKUNTA	Eettisen toimikunnan lausunto saatu (liitteenä) 1/1
TUTKIMUSLUVAN MYÖNTÄMINEN	<input checked="" type="checkbox"/> Myönnetty <input type="checkbox"/> Ei myönnetty 11.12.2012 <i>Benita Dalöheim</i> allekirjoitus/nimen selvennys BENITA DALÖHEIM allekirjoitus/nimen selvennys VSSHP:n/sairaalan nimen saa julkaista tutkimusraportissa/opinnäytetyössä Haluan nähdä tutkimusraportin/opinnäytetyön ennen julkaisuluvan antoa Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/>
	Päätös annettu tiedoksi hakijalle 11.12.2012 Päätöksen antoi <i>Sahel Poohtia / PV</i>

SYTOLOGIAN LABORATORIO

1(7)

TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

Versio: 1

Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä

Tarkastanut: Tuula Aarikka

Hyväksynyt: Heikki Aho

Päivittänyt:

SYTOLOGIAN LABORATORION TYÖPISTEET

1 Laboratorio

1.1 Näytteiden numerointi

Näytteet tuodaan sytologian laboratorioon objektilaseille siveltyinä, alkoholiin (50 - 70 %) fiksoituina tai tuoreinäytteinä. QPati - ohjelma hakee näytteelle lähetteen Multilab II:sta. Lähetete tallennetaan patologian atk-järjestelmään, jolloin näyte saa C-näytenumeron ja saapunut - merkinnän (selailu). Osaston tai patologian vastausten selailussa: näyte saapunut.

1.2 Valmissivelyt

Valmiiksi objektilasille siveltyinä laboratorioon tulevat gynekologiset irtosolunäytteet on kiinnitetty sprayfiksatiivilla näytteenottajan toimesta.

Osa ohutneulabiopsianäytteistä tulee laboratorioon ilmakeivattuina valmissivelyinä. Lisäksi spermanäytelasit tulevat valmiiksi fiksoituna laboratorioon.

Näytteitä numeroitaessa on selvitettävä, onko kyseessä fiksoitu vai ilmakeivattu näytelasi. Fiksoidut lasit värjätään Papanicolaoun-värjäyksellä ja ilmakeivatut lasit May-Grünwald-Giemsan -värjäyksellä.

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

2(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

1.3 Sivelyvalmisteet

Yskös- ja runsaista bronkusnäytteistä (imu, harjaus, huuhtelu) tehdään sivelyvalmisteet poly-l-lysiini - esikäsitellyille objektilaseille, yskösnäytteestä kaksi lasia, bronkusnäytteestä yksi lasi. Tarkoituksena on saada lasille näyttemateriaalia yhden solukerroksen paksuudelta solumorfologian tulkintaa varten.

Sivelyvalmisteiden teko aloitetaan näytelasien numeroinnilla. Alkoholifiksoitu näyte sekoitetaan ja kaadetaan kertakäyttöiselle petrimaljalle. Vetolasin (esikäsittelemätön apulasi) avulla siirretään ja sivellään edustava kohta näyttemateriaalista objektilasille. Yskösnäytteen lasit sivellään erinäköisistä kohdista näytettä. Sivelyn jälkeen loput näytteestä kaadetaan takaisin näytepurkkiin ja sitä säilytetään varalla viikon ajan (jääkaappi + 4° C). Silminnähdessä niukasta näytteestä on mahdollista tehdä sytosentrifuugivalmiste (Cyto-Tek), jotta solut saataisiin varmistettuna talteen.

Välittömästi sivelyn jälkeen näyte kiinnitetään lasille sprayfiksatiivilla (polyetyleeniglykoli + abs. alk. + etikkahappo) ja lasit ilmakeuhataan.

Kuivuneet lasit nostetaan värjäyskelkkaan ja värjätään Tissue-Tek DRS värjäysautomaatissa ohjelmalla: Muu sytologia, Papanicolaou-värjäys koneellisesti.

Värjätty lasit päällystetään peitinlasilla (24 × 32 mm) ksyleeniliukoisella peitinaineella avulla. Kuivuttuaan lasit ovat valmiit mikroskopoitaviksi.

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

3(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

1.4 Sytosentrifugivalmisteet (CytoTek)

Muista alkoholifiksoiduista näytteistä tehdään sytosentrifugivalmisteet poly-l-lysiini -esikäsitellyille objektilaseille. Tarkoitus on saada lasille soluja yhden solukerroksen paksuudelta. Solusentrifugi (CytoTek) sinkoaa solut objektilasin pintaan. Lasit värjätään Papanicolaoun-värjäyksellä Tissue-Tek DRS automaatissa (ohjelma: Muu sytologia).

Valmisteiden teko aloitetaan numeroimalla lasit. Seuraavaksi kootaan näytekyveti: lasi pidikkeeseen, lasille halutun kokoinen rajaaja, jonka päälle kiristetään sopivan kokoinen näytekyveti (kertak. 1 ml/6 ml/12 ml).

Näytekammioon tiputetaan o, 5 ml (12 ml kammio) PEG-liuosta (polyetyleeniglykoli) (liite3:3), joka kiinnittää solut lasille. Näyte sekoitetaan huolellisesti ja pipetoidaan kammion merkkiviivaan asti. Paksulta tai sakkaiselta näytävää näytettä laimennetaan 0,9 %:lla natriumkloridi liuoksella. Näytteen ja natriumkloridi liuoksen suhde määritetään silmämääräisesti. Veri voidaan tarvittaessa hajottaa näytteestä 0.1 M suolahappoliuoksella. Näytekammion korkki suljetaan ja näyte + Peg-liuos sekoitetaan keskenään. Näytteitä sentrifugoidaan 5 min 2000 rpm. Näytepurkit ja loppu näytteestä säilytetään (+4°C) varalla viikon ajan.

Sentrifugoinnin jälkeen näytekammiosta kaadetaan supernatantti viemäriin ja kammiota valutetaan hetki ylösalaisin selluvanun päällä. Valutuksen jälkeen irrotetaan pidike ja kammio poistetaan. Näytelasit rajoittajineen laitetaan vetokaappiin kuivahtamaan. Tämän jälkeen rajoittajat poistetaan ja näytteitä kuivataan vielä hetki ennen värjäystä.

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

4(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

Jos näyte on niukka, käytetään valmisteen tekoon 6 ml:n kyvettä ja rajoittajaa. Periaatteena on, että näytettä jätetään aina (ei BAL-näytettä) hiukan jäljelle mahdollista lisatarvetta varten.

Kuivuneet näytelasit värjätään Papanicolaou-värjäyksellä koneellisesti (Tissue-Tek DRS), ohjelma: Muu sytologia.

1.5 Näytteiden värjääminen

Sytologiset näytteet värjätään ohjelmoitavalla värjäysautomaatilla (Tissue-Tek DRS). Värjäysautomaattiin on ohjelmoitu Papanicolaoun värjäys gynekologisille ja muille sytologisille näytteille sekä May-Grünwald-Giemsan värjäysilmakuivatuille sivelyvalmisteille.

Värjäysautomaatin liuosmäärityskartta ja päivittäishuolto (liite3:1)

Lisävärjäyksiä tehdään rutiinisti: Preussinsini, raudan osoittamiseksi, Grocott, pneumocystis jerovecii osoittamiseksi ja/tai Oil-RedO (ORO) makrofageihin kerääntyneen lipidien osoittamiseksi BAL (bronkoalveolaarilavaatio)-näytteille. Amyloidin osoittamiseksi tehdään Kongo-värjäys. Tarvittaessa sytologian laboratoriossa värjätään myös parafiinileikkeistä Grocott. Värjäykset tehdään käsin työohjeiden mukaan.

1.6 BAL (bronkoalveolaarilavaatio)-näytteet

BAL-näyte tuodaan laboratorioon tuorenäytteenä ja se on käsiteltävä kahden tunnin sisällä näytteenotosta.

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

5(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

Osa näytteestä fiksoidaan kahteen tyhjään näytepurkkiin: 2 osaa näytettä +1 osa fiksiivia (esim. 5 ml + 2,5 ml). Fiksoinnin jälkeen, seuraavana päivänä näytteistä tehdään sytosentrifugivalmisteet (Cyto-Tek) (koko näytemäärä 7,5 ml + NaCl), joista toinen värjätään Papanicolaou- (kone)värjäyksellä ja toinen rautavärjäyksellä.

Näytteen solukkuus määritellään suodatetusta näytteestä. Esitarkastaja arvioi mikroskooppisesti, millä näytemäärällä saadaan sopivan ohuet ja toisaalta tarpeeksi solukkaat valmisteet lisävärjäksiä varten. Sopivaa näytemäärää käyttäen tehdään Cytospin - valmisteet MGG-, Grocott- tms. värjäksiä varten. Tuorenäytteestä esitarkastaja laskee myös kokonaissolumäärän.

Laboratoriossa on BAL-näytteen yksityiskohtainen käsittelyohje.

1.7 Ohutneulapoliklinikka

Patologian yksikön lääkäri käy kaksi kertaa viikossa korvapoliklinikalla ottamassa ohutneulanäytteitä.

Etukäteen sytologian laboratoriohoitaja

- tulostaa potilaiden lähetteet
- numeroi näytelasit valmiiksi patologille
- laittaa valmiiksi näyteputket, joissa on sitraatti-alkoholi fiksiivia Papanicolaoun värjäystä varten ja näyteputket, joissa on PBS-puskuria immunohistokemiallisia värjäksiä tai solublokkia varten

1.8 Solublokki

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

6(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

Ohutneulabiopsianäytteestä patologi tai esitarkastaja voi pyytää tekemään solublokin. Osaston lähettämästä tuoreesta pleuranesteestä valmistetaan solublokki, jolle annetaan histologian B - näytenumero.

Laboratoriossa on solublokin valmistuksesta yksityiskohtainen ohje.

2 Esitarkastus

Solunäytteiden esitarkastuksesta vastaavat histologian ja sytologian erikoispätevyuden suorittaneet ja edelleen tehtävään toimipaikkakoulutetut laboratoriohoitajat.

Sytologisten näytteiden vastaus on Papanicolaoun luokka ja tarvittaessa lääkärin antama lausunto (SD). Gynekologisen sytologian vastaukset annetaan Bethesda-järjestelmän diagnoosin mukaisesti.

Esitarkastaja mikroskopoii näytelasit huolellisesti kenttä kentältä, merkitsee (rengastaa) löydökset lasille ja antaa oman vastausehdotuksensa. Sytologian laboratoriossa potilastietoja käsitellään vain tietokoneella. Näytteen esitiedot haetaan näytölle ja esitarkastaja tallentaa löydökset esitarkastustaulukkoon. Esitarkastetut näytteet jaetaan tietokoneella työjärjestyksen mukaisesti lääkärille vastattavaksi, jolloin selailussa merkintä: odottaa. Näytteet lähetetään patologille.

Lisäksi esitarkastaja laskee Bürkerin kammion avulla BAL-tuorenäytteen kokonaissolumäärän. Solumäärän perusteella hän päättää Cytospin-valmisteisiin käytettävän näytemäärän.

Esitarkastajat osallistuvat sisäisen ja ulkoisen laaduntarkkailun auditointitoimintaan esitarkastamalla auditointinäytteet.

SYTOLOGIAN LABORATORIO
TYKS-SAPA-liikelaitos, patologia

7(7)

Versio: 1
Pvm: 5.2.2013

Laatinut: Anne Röyttä
Hyväksynyt: Heikki Aho

Tarkastanut: Tuula Aarikka
Päivittänyt:

3 Muuta

Laboratoriohenkilökunta huolehtii reagenssien ja muiden tarvikkeiden riittävydestä. Tarvikkeet tilataan apteekista ja logistiikkakeskuksesta. Apteekin alkoholitilauksen hyväksyy lääkäri. Hallinnollinen osastonhoitaja tai apulaisosastonhoitaja hyväksyy tilaukset.

Laboratoriohenkilökunta huolehtii myös laboratorion laitteiden perushuollosta.

3.1 Vetokaappien ja sentrifuugien huolto

Päivittäin, työskentelyn jälkeen:

- suihkuta vetokaapin pinnoille ja sytosentrifugin irrotettuun roottoriin 1 % (200ppm) Klorillia ja pyyhi
- pyyhi sytosentrifugin sisus 1 % Klorillilla kostutetulla selluvanulla
- eritetahroihiin (+HIV, HBV, hepatiitti) **25 %** (5000ppm) Klorilli 1 tunnin ajan
- suihkuta ja pyyhi lopuksi 70 % alkoholilla

Sytosentrifugin viikkopesu (edellisen lisäksi) perjantaina työskentelyn jälkeen:

- sulje poistoletku tulpalla ja täytä letku **0.05 %** klooriheksidiini-hydrokloridilla
- anna aineen vaikuttaa 1 tunnin ajan
- laske desinfektioaine pois ja huuhto letku 70 % alkoholilla
- sulje letku ja täytä se 70 % alkoholilla
- anna vaikuttaa yli viikonlopun

TYKS-SSAPA-liikelaitos
Patologian palvelualue

Koodi: Sytologian laboratorio
Solublokki agar-menetelmällä

Laatinut: Minnamaija Lintunen 28.7.2010
Hyväksynyt: Heikki Aho 5.8.2010

Versio 2
Päivitetty 28.8.2012 A. Röyttä

TYÖOHJE:

Solublokki agar-menetelmällä

1 Menetelmän periaate

Solunäytteestä valmistetaan solublokki agar-menetelmällä. Ensin sytologiassa solupelletti tehdään kovaksi agar-napiksi, joka lähetetään 10 % formaliinissa histologialle. Siellä se kuduskuljetuksen jälkeen valetaan parafiiniblokiksi, josta sitten voidaan leikata ohuita leikkeitä histologisia ja immunohistokemiallisia värjäyksiä varten.

2 Näytteen laatu

Yleensä näyte on tuore pleuraneste, mutta fiksoidustakin näytteestä voidaan samalla menetelmällä tehdä solublokki. Aamupäivällä otettu tuorenäyte voidaan tarvittaessa säilyttää +2 - +8 °C:een lämpötilassa iltapäivään. Jos näyte tulee niin myöhään, ettei sitä ehditä saman päivän aikana tekemään, voidaan näyte fiksoida 10 %:lla puskuroidulla formaliinilla jo ennen agariin valua. Tämä pitää kuitenkin mainita erikseen histologialle lähetettäessä.

3 Työn suoritus

3.1 Solublokin valmistaminen

Sulata agar:

- ota riittävä määrä agar-putkia jääkaapista (agaria tarvitaan yhtä suuri määrä kuin sedimenttiä on)
- laita putki korkki avonaisena pieneen dekantteriin, jossa on vettä
- sulata agar lämmittämällä vettä lämpölevyllä n.100-150°C lämpötilassa
- jätä agar-putki kuumaan veteen, ettei se jähmety ennen pipetointia

Tee näytteestä pelletti agariin:

- jaa hyvin sekoitettu näyte 8:aan (8-12 putkea riippuen näytteen määrästä) suippopohjaiseen sentrifuugiputkeen
- sentrifugoi 10 min 2000 rpm
- kaada tai pipetoi pasteur-pipetillä supernatantti takaisin alkuperäiseen näytepulloon
- yhdistä pelletit yhteen sentrifuugiputkeen pasteur-pipetillä
- sentrifugoi 10 min 2000 rpm
- pipetoi pasteur-pipetillä supernatantti takaisin alkuperäiseen näytepulloon (säilytys jääkaapissa noin viikon ajan)
- metallivartisella tikulla voi tarvittaessa irrottaa näytettä putken pohjasta
- tarkista, ettei agar ole liian kuumaa eli ettei se polta kättä
- pipetoi sula agar pasteur-pipetillä pelletin päälle samalla varovasti Vortexilla sekoittaen (sekoita ripeästi, ettei agar jähmety liian nopeasti)

TYKS-SSAPA-liikelaitos
Patologian palvelualue

Koodi: Sytologian laboratorio
Solublokki agar-menetelmällä

Laatinut: Minnamaija Lintunen 28.7.2010
Hyväksynyt: Heikki Aho 5.8.2010

Versio 2
Päivitetty 28.8.2012 A. Röyttä

- metallivartisella tikulla voi tarvittaessa siirtää näytteen edustavasti agarin keskelle
- laita putki jääkaappiin n 30 minuutiksi kovettumaan (näyte on vielä tuorenäyte)

Jos näytteestä ei ehditä tekemään saman päivän aikana solublokkia:

- jaa hyvin sekoitettu näyte 8:aan (8-12 putkea riippuen näytteen määrästä) suippopohjaiseen sentrifuugiputkeen
- sentrifugoi 10 min 2000 rpm
- kaada tai pipetoi pasteur-pipetillä supernatantti takaisin alkuperäiseen näytepulloon
- yhdistä pelletit yhteen sentrifuugiputkeen pasteur-pipetillä
- kaada solujen päälle 10 %:sta puskuroitua formaliinia 10-kertainen määrä pellettiin nähden ja sekoita
- jätä putki huoneenlämpöön yön yli (jääkaapissa formaliini saattaa kiteytyä)
- seuraavana päivänä sulata agar ja valmista solublokki kuten yllä

Valmista näyte parafiiniblokin tekoa varten:

- kovettunut agar-nappi irrotetaan metallivartisella tikulla myötäillen putken reunaa ja kopautetaan selluloosavanun päälle (jos näyte ei ole kunnolla kovettunut, sen voi laittaa verkkopussiin ennen kasettiin laittoa)
- leikkaa kovettunut agar-nappi halki vertikaalisesti steriilillä veitsellä (saat kaksi samanmuotoista palaa)
- laita palat numeroituun kasettiin makaamaan ja sulje kansi tiukasti
- laita 10 %:sta puskuroitua formaliinia kannelliseen näytepurkkiin ja upota kasetti sinne (formaliinia tarvitaan 10-kertainen määrä)
- tulosta QPatista lähete näytteelle mukaan
- pakkaa purkki minigrip-pussiin ja lähetä purkki histologialle, joka laittaa blokin lyhyeen kuljetukseen ja parafiiniin valuun eli siitä tehdään parafiiniblokki

4 Tulos ja sen tulkinta

Näytteestä tehdään parafiinileikkeitä, jotka sitten värjätään histologisella HE-värjäyksellä sekä tarvittaessa immunohistokemiallisella värjäyksellä vasta-aineiden avulla ennen lopullisen vastauksen antamista.

5 Virhelähteet

Solujen määrän tulee olla riittävä, jotta siitä saadaan sentrifugoitaessa pelletti. Agarin tulee kovettua, jotta solupelletti saadaan siirrettyä kasettiin. Agarilla ei saa lämmittää ja jäähdyttää edestakaisin. Myöskään liian kuumaa agarilla ei saa laittaa näytteiden päälle. Näytettä ei saa missään tapauksessa fiksoida alkoholilla, jos siitä on tarkoitus tehdä immunohistokemiallisia värjäyksiä. Näytettä ei myöskään saa fiksoida liian pitkään formaliinissa.

TYKS-SSAPA-liikelaitos
Patologian palvelualue

Koodi: Sytologian laboratorio
Solublokki agar-menetelmällä

Laatinut: Minnamaija Lintunen 28.7.2010
Hyväksynyt: Heikki Aho 5.8.2010

Versio 2
Päivitetty 28.8.2012 A. Röyttä

6 Laitteet ja välineet

- lämpölevy
- sentrifuugi
- eppendorf-putket (1,5 ml)
- suippokärkiset sentrifuugiputket korkilla (10 ml)
- kasetit(pienireikäiset)
- verkkopussit
- kannelliset näytepurkit
- metallivartiset näytteenottotikut
- steriilit kertakäyttöveitset

7 Reagenssit

- Bacto Agar BD
- formaliini (10%, neutraalipuskuroitu)

7.1 Agar-liuoksen valmistaminen

Agar-liuos valmistetaan hyvissä ajoin ennen varsinaista solublokin tekoa vetokaapissa:

4,0 g Bacto Agar (Becton Dickinson, ref 214010)
100 ml aqua

- mittaa dekantterilasiin aqua ja agar ja liuota seos lämpölevyllä n. + 80-100°C lämpötilassa vetokaapissa (varo ylikuohumista; liuotus voi kestää kauan, yli tunninkin)
- liukenemisen voi tarkistaa pipetoimalla seosta eppendorf-putkeen ja jos hetken odotuksen jälkeen liuos jakaantuu kahteen kerrokseen ei liuos ole vielä valmis (valmis liuos myös jähmettyy jäähdytettäessä)
- jaa valmis liuennut liuos kerta-annoksiin eppendorf-putkiin (n.1,5 ml/ putki)
- nämä agar-putket säilytetään +2 - + 8 °C lämpötilassa, jossa ne sitten jähmettyvät
- huom: älä käytä lämmitettyä agaria uudelleen, koska se ei enää jähmety

8 Varotoimenpiteet

Noudata yleisiä työturvallisuusohjeita eli käytä työtakkia ja suojakäsineitä. Työskentele vetokaapissa. Varo lämmitettäessä ylikuohuvaa agaria.