

Päivi Parkkisenniemi

**VIRTSAN IRTOSOLUNÄYTTEEN KÄSITTELYN VAIKUTUS SOLUJEN
SÄILYMISEEN**

VIRTSAN IRTOSOLUNÄYTTEEN KÄSITTELYN VAIKUTUS SOLUJEN SÄILYMISEEN

Päivi Parkkisenniemi
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä: Päivi Parkkisenniemi

Opinnäytetyön nimi: Virtsan irtosolunäytteen käsittelyn vaikutus solujen säilyvyyteen

Työn ohjaaja: Outi Mäkitalo ja Mika Paldanius

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Kevät 2016

Sivumäärä: sivut + liitteet
(39 + 12)

Ennen näytteen analyysiä tapahtuva näytteen käsittely on merkittävä laatuun vaikuttava työvaihe. Mikäli näyte on huonosti säilynyt tai jopa tuhoutunut ennen sen tutkimista, näytteestä ei saada luotettavaa tietoa ja laboratoriossa tehdään turhaa työtä monessa vaiheessa.

Virtsan irtosolunäyte (U- Syto) tutkitaan, kun epäillään virtsateiden pahanlaatuista kasvainta löydösten tai oireiden perusteella. Se on asiakkaalle eräs helpoimmin annettavista laboratorionäytteistä, mutta näytteen käsittelyssä tulee olla huolellinen, että solujen muoto ja rakenne (morfologia) säilyisivät mahdollisimman hyvin tutkimuskelpoisina.

Lapin keskussairaalan (LKS) patologian laboratorio Rovaniemellä tutkii virtsan irtosolunäytteitä koko Lapin alueelta. Tämä opinnäytetyö tehtiin LKS:n patologian laboratoriolle virtsan irtosolunäytteen säilymiseen vaikuttavien tekijöiden tutkimiseksi, koska toisinaan kaukaa tulevat virtsan irtosolunäytteet ovat olleet huonosti säilyneitä.

Tutkimustehtävinä oli ottaa selvää, onko uudempaa tietoa virtsan irtosolunäytteen teknisistä menetelmistä Suomesta tai muualta maailmasta sekä vertailla eräiden näytteen kiinnitys- eli fiksatiivaineiden ja ajan vaikutusta solujen säilyvyyteen.

Tutkimusmenetelminä olivat kirjallisuuskatsaus ja käytännön koesarja, jossa virtsan irtosolunäytteitä oli 13, lasimäärä yhteensä 106 kpl. Näytteistä tehtiin ns. sytosentrifugivalmisteet. Muuttujina toimivat eri fiksatiivit sekä näytteen säilytysajat 3 vrk ja 5 vrk. Eri soluryhmien (punasolut, liuskatumaiset leukosyytit, levyepiteeli- ja uroteelisolut) morfologinen säilyvyys arvioitiin valomikroskooppisesti.

Tutkimuksen perusteella ei löytynyt uudempia menetelmiä virtsan irtosolunäytteen valmistamiseksi. Parhaiten solujen morfologia säilyi sekä 3 vrk että 5 vrk:n säilytysajan B- ja E-fiksatiiveissa. Tulokset ovat jatkossa hyödynnettävissä näytteen laadun arvioinnissa ja apuna fiksatiivin valinnassa. Mahdollisia jatkotutkimusaiheita olisivat virtsanäytteenotto ja kuljetus.

Asiasanat: uroteelisoluu, virtsan irtosolunäyte, virtsan solujen säilyvyys, fiksatiivi, Papanicolaou

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme of Biomedical Laboratory Technology

Author: Päivi Parkkisenniemi

Title of thesis: The effect of exfoliated urine specimen handling to the preservation of the cells

Supervisor(s): Outi Mäkitalo and Mika Paldanius

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2016 Number of pages: 39 + 12

An exfoliative urine sample for cytology is usually given in order to determine whether there is a malignant process going on in the bladder or not. It's one of the easiest laboratory specimen that a customer can give, but there have to be careful in order to preserve the cells at their best.

Recently, in a laboratory field, it has been paid increasing attention to the preanalytical phase of the laboratory process. If the sample is poorly preserved or even destroyed before the examination, reliable information is impossible to obtain and the laboratory carry out unnecessary work in several stages. This work focused on the fixing phase of the specimen. The other parts of the preanalytics (for example sample collection, logistics) were not examined in this study.

The area of the hospital district of Lapland is large. This study was done for the Central hospital of Lapland, Department of Pathology, Rovaniemi and was done because of an interest to study the effect of the distance to the preservation of the cells in urine specimen, because every now and then the urine samples end up to the laboratory poorly preserved. The aim is that a customer can take the sample at home and regardless of distance and time, when the sample is put in a suitable fixing material it would be as well-preserved as possible.

The aim of this study was to increase the knowledge of the preservation of the exfoliative urine sample for cytology. The research task was to reveal more information available about the technical methods of urine cytology specimen fixation and to determine which fixative would preserve the best the urine specimen.

The research methods used were a literature review and an experimental test, which included a comparative test serie of the urine fixatives (n = 13, 106 slides in total) made from the exfoliated urine samples of the urothelial cancer patients. The comparison was made light microscopically to determine the morphological preservation of the squamous epithelial cells, urothelial cells, erythrocytes and other particles.

Literature review revealed that there were not newer technical methods of the urine cytology specimen available. According to the test serie, fixatives B and E preserved the best the morphology of the urothelial cells after 3 and 5 days of preservation. In the future, the results may be utilized as a help for choosing the best fixative and to determine the quality of the sample. The further study suggestions are the exfoliative urine sample collection and the logistics.

Keywords: exfoliative urine sample, urine preservation, urine fixation, urine cytology, urothelial cell, Papanicolaou

SISÄLLYS

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | JOHDANTO | 7 |
| 2 | VIRTSANÄYTE SYTOLOGIAN TUTKIMUSKOHTENA | 8 |
| 2.1 | Solututkimuksen historiaa | 8 |
| 2.2 | Virtsateiden anatomiaa | 8 |
| 2.3 | Virtsanäytteen solut | 9 |
| 2.4 | Virtsasta tehtäviä tutkimuksia | 10 |
| 2.5 | Virtsan irtosolunäyte (U-Syto) | 10 |
| 2.6 | Virtsan irtosolunäytteen tulkinta | 11 |
| 3 | TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT | 13 |
| 4 | TUTKIMUSMENETELMÄT | 15 |
| 4.1 | Menetelmät | 15 |
| 4.1.1 | Kirjallisuuskatsaus | 16 |
| 4.1.2 | Tiedonhaku | 16 |
| 4.2 | Aiemmat tutkimukset | 17 |
| 4.3 | Kirjallisuuskatsauksen tulokset | 19 |
| 4.4 | Koesarja | 19 |
| 5 | TUTKIMUSAINEISTON KERUU JA KÄSITTELY | 20 |
| 5.1 | Suositukses | 20 |
| 5.2 | Lapin keskussairaalan U-Syto-ohje | 21 |
| 5.3 | Näytemateriaali | 22 |
| 5.4 | Näytelasin valmistusmenetelmä | 22 |
| 5.5 | Käytetyt fiksaatiomenetelmät | 23 |
| 5.6 | Solujen valomikroskopian arviointiperusteet | 24 |
| 6 | TUTKIMUKSEN TOTEUTUS | 25 |
| 6.1 | Näytteen tekninen valmistaminen | 25 |
| 6.2 | Materiaalit | 26 |
| 6.3 | Mikroskopointi | 26 |
| 6.3.1 | Punasolujen säilyvyys | 27 |
| 6.3.2 | Liuskatumaisten leukosyyttien säilyvyys | 28 |
| 6.3.3 | Levyepiteelisolujen säilyvyys | 29 |
| 6.3.4 | Välimuotoisten epiteelisolujen säilyvyys | 30 |

| | | |
|-------|------------------------------|----|
| 6.3.5 | Muut solut..... | 31 |
| 6.4 | Tulosten tulkinta | 31 |
| 6.5 | Keruu- ja lupamenettely..... | 32 |
| 6.6 | Luotettavuus..... | 33 |
| 7 | POHDINTA..... | 34 |
| | LÄHTEET..... | 36 |
| | LIITTEET | 40 |

1 JOHDANTO

Virtsan irtosolunäyte (U- Syto) pyydetään tutkittavaksi, kun epäillään virtsateiden pahanlaatuista kasvainta löydösten tai oireiston perusteella sekä usein myös leikkauksen sekä säde- ja solusalpaajahoitojen hoitovaikutusten seuranta varten. Virtsan sytologista tutkimus on suuntaa antava tutkimus ja siitä saatava tulos varmistetaan aina kudoksenäytteellä.

Ennen analyysia tapahtuvan näytteen käsittelyn on todettu vaikuttavan oleellisesti näytteen laatuun. Tavoitteena on saada asiakkaalle luotettavaa ja laadukasta hoitoa, ja luotettava laboratorio-tulos voidaan saada aikaan vain laatuvaatimukset täyttävästä näytteestä.

Pohjois-Suomessa etäisyydet ovat pitkiä, joten matka asiakkaan luota näytteenottoon ja sieltä tutkimuslaboratorioon voi viedä kauankin aikaa. Lapin keskussairaalan (LKS) patologian osastolle tulee virtsan sytologisia näytteitä kaukaa maakunnasta. Koska näytteessä olevat solut ovat olleet toisinaan huonosti säilyneitä tai kokonaan hajonneita, tulkinta on vaikeutunut tai ollut jopa mahdotonta. LKS:n patologian laboratoriossa haluttiin selvittää virtsan irtosolunäytteen kiinnitys- eli fiksaatiomenetelmää tarkemmin turhan laboratoriotyön välttämiseksi.

Tämän työn tavoitteena on lisätä tietoa virtsan solunäytteen valmistuksen teknistä menetelmistä sekä tutkia kiinnitysaineiden eli fiksaatiivien vaikutusta virtsan irtosolunäytteen laatuun. Tässä tutkimuksessa ei tutkita näytteenottotapahtumaa tai kuljetusta näytteen laatuun vaikuttavina tekijöinä. Keskeisimpänä tehtävänä on selvittää, onko LKS:n patologian laboratoriossa nykyisin käytössä olemalle virtsan sytologisen näytteen käsittelymenetelmälle olemassa näytteen säilymistä lisääviä vaihtoehtoja.

Tutkimusmenetelminä ovat kirjallisuuskatsaus ja kokeellinen tutkimus. Tutkimus on tärkeä toimeksiantajalle laboratorion menettelytapojen kehittämiseksi sekä myös bioanalytiikan ammattialalle, sillä virtsan irtosolunäytteen teknisistä menetelmistä ei ole olemassa paljoa tuoretta tutkittua tietoa. Tutkimuksessa vertaillaan virtsanäytteen fiksointimenetelmien ja -ajan vaikutusta solujen säilymiseen simuloimalla tilannetta, jossa näyte on otettu asiakkaan kotona kaukana tutkimuspaikasta. Tavoitteena on, että asiakas voi tulevaisuudessa ottaa näytteen kotonaan, joka voi sijaita kaukanakin tutkimuspaikasta, ja sopivaan kiinnitysaineeseen laitettuna välimatkasta ja ajasta riippumatta näyte olisi mahdollisimman hyvin säilynyt.

2 VIRTSA-NÄYTE SYTOLOGIAN TUTKIMUSKOHTENA

2.1 Solututkimuksen historiaa

Soluoppi eli sytologia alkoi kehittyä v. 1650 luvulla Euroopassa mikroskoopin keksimisen jälkeen, jolloin soluja ja niiden rakenneosia oli mahdollista tutkia tarkemmin. Näihin aikoihin hollantilainen tutkija Hooke oli katsonut mikroskoopillaan korkkiviipaleita, nähnyt niissä lokeroita ja pikkukammioita ja kuvannut näkemäänsä sanalla ”cellula”, mistä tuli vieraaseen kieleen cell- vartaloinen sana. Suomenkielisen vastineen ”solu” on keksinyt Lönnrot (Koivuniemi 1994, 1).

Viime vuosisadan vaihteessa useat tutkijat esittivät, että mikroskopoimalla keuhkon eritteiden solumateriaaleja voitiin nähdä samanlaisia muutoksia kuin potilaan keuhkosyövässä. V.1928 kreikkalainen lääkäri Georgios Papanicolaou raportoi Battle Creekin konferenssissa, Michiganissa, hal- vasta ja helposti tehtävästä testistä kohtusyövän ja syövän esiasteiden diagno soimiseksi, mutta vasta hänen työtoverinsa Herbert Trautin kanssa v. 1943 julkaisema kirjan *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear* ilmestymisen jälkeen hänen työnsä huomioitiin. Papanicolaoun myö- hemmin (1954) julkaisema kirja *Atlas of Exfoliative cytology* loi pohjan nykypäivän solupatologialle (Wikipedia. Georgios_Papanicolaou, viitattu 23.2.2016.).

2.2 Virtsateiden anatomiaa

Virtsatiet koostuvat kahdesta munuaisaltaasta, kahdesta virtsajohtimesta (ureter), virtsarakosta (vesica urinaria) ja virtsaputkesta (urethra). Virtsarakon sisäpintaa verhoaa kerrostuneesta epitee- listä ja sidekudoksesta koostuva pinta, jota esiintyy ainoastaan virtsateissä. Pintasolukko on nimel- tään välimuotoinen epiteeli (uroteeli, transitionaalinen epiteeli) jossa on normaalisti 7 solukerrosta (Weid, Bibbo, Keebler, Koss, Patten & Rosenthal 1997, 276; Koss 1996, 711.).

Tyhjässä virtsarakossa uroteeli on paksuudeltaan 4- 5 solukerrosta ja venyneessä, täydessä ra- kossa vain noin 2-3 solukerroksen paksuinen. Mikäli virtsarakossa on vähän virtsaa, epiteeli ja sen alla oleva sidekudos ovat poimulla ja epiteelisolut näyttävät enimmäkseen kuutiomaisilta. Kun virt- sarakossa on paljon virtsaa, virtsarakko venyy, pinta kiristyy, poimut häviävät ja solujen muoto

muuttuu litteämmiksi. Tästä solujen muodon muuttumisesta johtuu nimitys välimuotoinen epiteeli (Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie 2011, 474.).

2.3 Virtsanäytteen solut

Kehon eri onteloita ja pintoja peittää kalvo, joka on muodostunut erilaisista pintasoluista. Pintasolut ovat kiinnittyneinä tyvikalvoon, jonka alla on side- ja tukikudoskerros. Solunäytteen tutkimisessa käytetään hyväksi sitä seikkaa, että onteloiden eritteisiin, kuten esim. virtsarakossa olevaan virtsaan, itsestään irronneet solut ovat kullekin elimelle enemmän tai vähemmän tyypillisiä.

Virtsanäytteeseen materiaalia saadaan ylempistä ja alemmista virtsateistä, niiden epiteelirakenteesta. Sytologiselle diagnostiikalle merkittäviä soluja saadaan alueelta, joka ulottuu virtsaputken suulta munuaisaltaaseen. Uroteelisoluja ovat esim. syvemmältä epiteelistä peräisin olevat välimuotoisen epiteelin solut ja pintakerroksista peräisin olevat ns. sateenvarjosolut.

Miehillä virtsassa on usein eturauhasen soluja, siemenrakkulan soluja ja siittiöitä. Virtsanäytteessä esiintyy myös levyepiteelikontaminaatiota virtsaputken suulta ja naisilla myös vaginan epiteelistä sekä punasoluja, tulehdussoluja, kiteitä, bakteereja ja sieniä (Koivuniemi 1994, 271). Reaktiivisia eli lievästi muuntuneita uroteelisoluja voi esiintyä esim. erilaisten tulehduksen, virtsakivien tai sädehoidon seurauksena. Muita virtsanäytteessä esiintyviä soluja ovat munuaisepiteelisolut, endometriumsolut ja erilaiset ns. inkluusiokappaleet kuten lieriöt (De May 1996, 388- 391.).

Virtsan ei ole soluille edullinen ympäristö ja mm. virtsan happamuus tai virtsan vaihteleva osmolali-teetti saa aikaan solujen hajoamista eli degeneraatiota. Soluissa tapahtuva hajoamismuutos aiheuttaa tumien pyknoosia eli tiivistymistä, kromatiinin kokkaroitumista tai koko tuman hajoamista (Koivuniemi 1994, 8). Uroepiteelin ikä on vain noin vuosi, joten monet soluissa näkyvät hajoamismuutokset voivat olla myös luonnollisista syistä johtuvia (De May 1996, 392.).

2.4 Virtsasta tehtäviä tutkimuksia

Tavallisimpia virtsannäytetutkimuksia ovat keskivirtsanäytteestä tehtävät kemialliset seulontakokeet ja partikkelilaskennat (U-KemSeul, U-Solut, U-sakka) sekä bakteeriviljely (U-BaktVi), jotka tehdään kliinisen kemian tai mikrobiologian laboratorioissa. Tällöin pyydetään aamun ensimmäinen virtsanäyte, koska tällöin virtsa on väkevimmillään ja siinä on eniten mahdollisia tutkittavia komponentteja.

Virtsan pahanlaatuisen tai tulehduksellisen prosessin varmistamista varten tehdään U-Syto- tutkimus eli virtsan sytologinen tutkimus, jossa virtsan soluja tutkitaan valomikroskoopilla patologian laboratorioissa (Nordlab, tutkimusohjekirja 2014, viitattu 10.3.2016). Virtsanäytteenotto on hieman erilainen virtsan sytologista tutkimusta (U-Syto) varten, kuin virtsan kemiallisia tai mikrobiologisia tutkimuksia varten. Sytologinen virtsan tutkimus tehdään keski- tai loppuvirtsanäytteestä, johon ei käy aamuvirtsanäyte vaan siihen suositellaan päivän toista virtsanäytettä, koska solut hajoavat herkästi oltuaan pitkään, esim. yli yön, virtsarakossa (Koivuniemi 1994, 269).

2.5 Virtsan irtosolunäyte (U-Syto)

Virtsan irtosolunäyte otetaan oireiden (esim. verivirtsaisuus, kipu virtsatessa) selvittelyä varten, kun halutaan selvittää uusiutuvia tulehduksia, joita ei ole saatu selvitettyä muilla laboratoriokokeilla, virtsateiden pahanlaatuisten kasvainten diagnostiikkaa ja niiden seuranta varten sekä syövän hoitovaikeuksien (sytostaatti- ja sädehoidon) jälkeistä seuranta varten. Normaalisti virtsassa on vain vähän soluja, mutta häiriötiloissa solut menettävät keskinäisen kiinnittymiskykynsä ja niitä irtoaa virtsaan tavallista enemmän (Koivuniemi 1994, 270.). Kasvaimet ovat usein verisuonittuneita pinnaltaan, jolloin virtsaan ilmestyy verta (Laurila 2013, 229).

Virtsarakon syöpä on maailman seitsemänneksi yleisin syöpä ja se on yleinen teollisuusmaissa. Suomessa se on miesten neljänneksi yleisin ja naisten seitsemänneksi yleisin syöpä (Syöpäjärjestöt. Viitattu 18.3.2016). Sairastuneiden keski-ikä on noin 65 vuotta ja tärkeimpänä oireena on veren ilmestyminen virtsaan. Diagnoosi perustuu virtsanäytteeseen, rakkotähystykseen, ultraäänitutkimukseen ja koepalaan (Virtsarakon syöpä. Terveyskirjasto. Viitattu 18.3.2016.).

2.6 Virtsan irtosolunäytteen tulkinta

Virtsan irtosolunäyte tutkitaan patologian laboratoriossa. Näyte valmistetaan laboratorion käytännön mukaisesti mikroskoipoitavaksi valmisteeksi. Tärkeimmät solut ovat välimuotoiset epiteelisolut eli uroteelisolut, joissa esiintyyiin muutoksiin virtsan irtosolunäytteen diagnostiikka perustuu. Mikroskooppisella tarkastelulla pystytään erottelemaan hyvänlaatuiset ja pahanlaatuiset solut toisistaan pelkästään solujen ulkomuodon ja rakenteen eli morfologian perusteella.

Laboratoriohoitaja/ bioanalyytikko esitarkastaa valmisteeseen valomikroskoopilla, merkitsee epäilyttävät solut tussirenkaalla ja antaa alustavan ehdotuksen Papa- luokasta. Patologian erikoislääkäri antaa näytteestä lopullisen vastauksen. Poikkeavissa soluissa havaitaan muutoksia solujen tumissa, sytoplasmassa ja solujen ryhmittymisessä. Yleensä saadaan suuntaa antava vastaus, joka varmistetaan kudoksenäytteellä.

Näytteen pahanlaatuisuus- eli maligniteettiarvio perustuu kasvaimesta virtsaan irronneiden syöpäsolujen tunnistamiseen valomikroskooppisesti. Virtsan sytologian tarkkuus on 95- 100%, joten pahanlaatuinen löydös on lähes varma. Hyvänlaatuinen löydös ei kuitenkaan sulje pois syövän mahdollisuutta. Hyvin erilaistuneista syöivistä vapautuu vähemmän syöpäsoluja ja solumuutokset ovat vähäisempiä, mikä takia herkkyys on pienempi (6-45 %). Huonosti erilaistuneiden kasvaimen tunnistamisessa tutkimus on parempi (herkkyys 80-95%) (Laurila 2013, 230).

Virtsan irtosolututkimus perustuu Papanicolaoun määrittelemiin solumuutoksiin, joista solujen tumamuutokset ovat tärkeimpiä (LIITE 1. Papa- luokitus). Papanicolaou luokitteli sytologiset diagnoosit viiteen ryhmään (I, II, III, IV ja V), ja mukaan lisätään myös usein kuudenneksi luokaksi 0-näyte eli riittämätön näyte (Koivuniemi 1994, 12- 13; Karttunen, Soini & Vuopala 2005, 284.).

Solun kromatiini voi olla lisääntynyt (hyperkromasia), sen määrä voi vaihdella (aneuploidia) tai se voi olla epätasaisesti jakautunut esim. kokkareista, juosteista tai kasautunut tumakelmuun viereen. Tumakoko voi vaihdella suuresta pieneen (makronukleus- mikronukleus), tuman muoto voi olla epäsäännöllinen tai yhdessä solussa voi olla monta tumaa. Tuman nukleoleissa eli tumajyväsissä voi olla muutoksia; ne voivat olla suurentuneita, epäsäännöllisen muotoisia tai ne voivat värjäytyä poikkeavalla tavalla. Tumakelmuun korostuminen eli paksuuntuminen, paksuuden vaihtelu, epäsäännöllinen mutkittelu, sahanterämäisyys, kulmikkuus, poimuilu ja silmuilu voivat olla solun pahanlaatuisuuden merkkejä.

Pahanlaatuisissa soluissa soluliman määrä vaihtelee ja se on usein niukempi kuin normaaleissa soluissa. Solu voi olla esim. sammakonmuotoinen, käärmeenmuotoinen tai sukkulamainen. Soluliman värjäytyvyys voi olla poikkeava, mikä viittaa solun kypsymishäiriöön. esim. voimakas eosinofilia eli soluliman värjäytyminen oranssiksi viittaa epänormaaliin keratinisaatioon eli pintasolujen irtoamiseen. Sytoplasman rakenteiden ja tuotteiden (rakkulat ja pisarat eli vakuolit, pigmenttijyvät, keratiiniin ja liman määrä) ovat usein normaalista solusta poikkeavia. Soluliman täydellinen hajoaminen jättää jälkeensä pelkkiä tumia. Solujen koko on usein suurentunut, tuma- solulima- suhde on suurempi kuin vastaavissa hyvänlaatuisissa soluissa, joka johtuu tumen suurenemisestä. Mitooseja on enemmän tai ne ovat patologisia (Koivuniemi 1994, 8.).

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Potilaan oikeus saada laadukasta ja luotettavaa hoitoa perustuu lainsäädäntöön (Laki potilaan asemasta ja oikeuksista. Viitattu 10.3.2016). Laboratoriotutkimuksen luotettavuuden perusta on ennen näytteen tutkimista tapahtuvat käsittelyvaiheet, johon kuuluvat tutkimuspyyntö, asiakkaan ohjaaminen ja valmistautuminen tutkimukseen, näytteenotto, säilytys ja kuljetus, näytteen vastaanotto laboratoriossa ja näytteen valmistaminen analyysikelpoiseksi (Tuokko 2008, 7).

Laboratoriotulosten tarkkuuteen, luotettavuuteen ja oikeellisuuteen vaikuttavien tekijöiden kannalta juuri ennen näytteen tutkimista olevan vaiheen katsotaan olevan tärkein (Moodi 2016, 16). Näytettä tutkivan henkilön ammattitaitoon kuuluu kyky arvioida näytteen tutkimuskelpoisuutta sekä tuntee toiminnan takana olevat eettiset ohjeet, suositukset ja laadunvarmistusmenetelmät (Tuokko, Rautajoki & Lehto, 2008, 5.).

Virtsanalyysi on erittäin altis virheille ja niitä voi aiheuttaa mm. sopimaton näytteenotto- ja kuljetusmenetelmä. Säilöntäaineiden käytöstä voi olla apua joidenkin aineosien tutkimisessa, mutta säilöntäainetta, joka mahdollistaa täydellisen virtsanalyysin ei vielä ole olemassa (Delanghe & Speeckaert 2014, 89).

Pohjois-Suomessa etäisyydet ovat pitkiä. Useimmiten asiakas tulee antamaan näytteen laboratorioon, mutta asiakas voi ottaa näytteen myös kotonaan saatuaan asianmukaisen ohjauksen ja tarvittavat välineet (Nordlab 2015. Viitattu 10.3.2016; Makkonen & Tuokko 1997, 126.). Näytteen matka ottopaikasta tutkimuslaboratorioon voi viedä kauankin aikaa. Lapin keskussairaalan patologian osastolle tulee virtsan sytologisia näytteitä ympäri maakuntaa, aina 490 km päästä Utsjoelta asti (*KUVIO 1.*). Vuoden 2015 aikana oli LKS:n patologian laboratoriossa vastattu 1517 virtsan sytologista näytettä.



KUVIO 1. Lapin sairaanhoitopiirin alue

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on lisätä tietoa virtsan irtosolunäytteen teknisistä menetelmistä ja virtsan solujen säilyvyydestä. Tutkimustehtävinä on

1. katsoa kirjallisuuskatsauksen avulla, löytyykö uudempaa tutkimustietoa virtsan solunäytteen teknisistä menetelmistä Suomesta tai muualta maailmasta
2. vertailla virtsanäytteen fiksaatiomenetelmien - ja - ajan vaikutusta solujen morfologiaan simuloimalla tilannetta, missä näyte on otettu asiakkaan kotona kaukana tutkimuspaikasta.

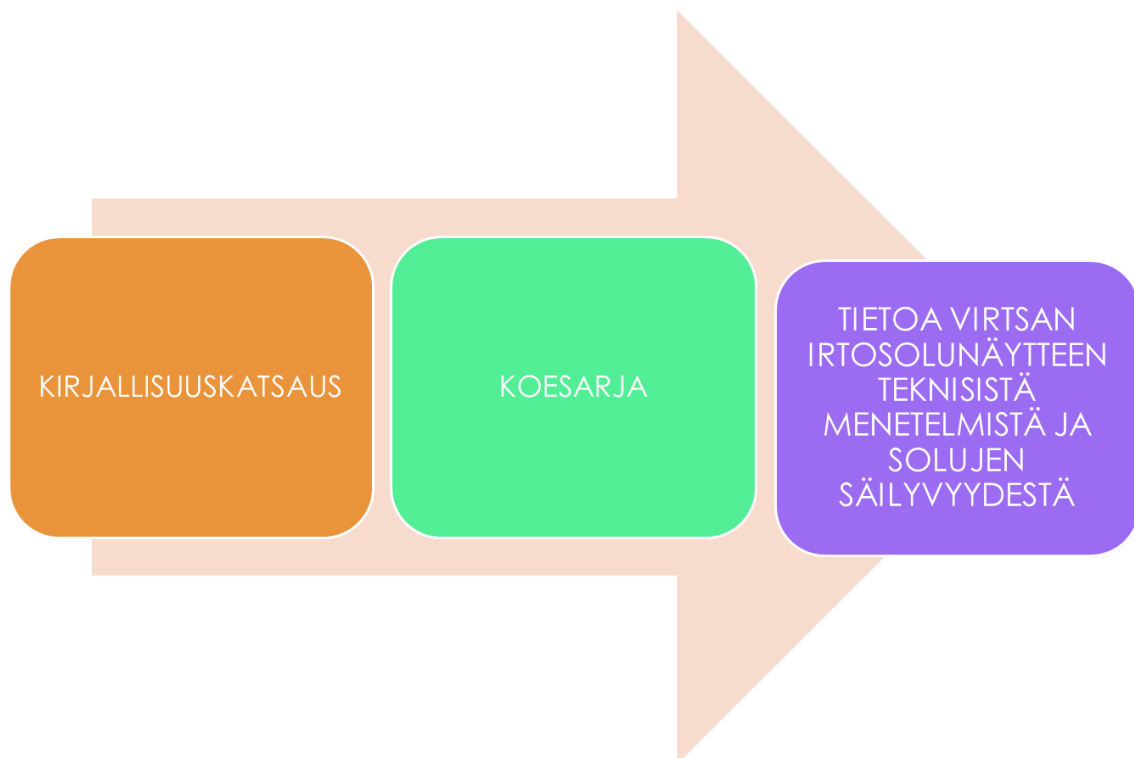
Tavoitteena on sopivaan kiinnitysaineeseen laitettuna välimatkasta ja ajasta riippumatta näyte olisi mahdollisimman hyvin säilynyt.

4 TUTKIMUSMENETELMÄT

4.1 Menetelmät

Tämän tutkimuksen avulla pyritään ratkaisemaan käytännöstä tulleita ongelmia. Toimintaa ohjaa käytännön tavoitteet, joihin haetaan tukea teoriasta. Tavoitteena on edetä järjestelmällisesti, analyyttisesti ja kriittisesti. Kehittämistyöstä saadut tulokset tulee osoittaa, mihin tietoperustaan tutkimuksellinen kehittämistyö liittyy ja tuoko se siihen mahdollisesti uutta (Ojasalo, Moilanen & Rita-lahti. 2015 18- 20.).

Menetelminä on käytetty sekä kirjallisuuskatsausta (laadullinen tutkimusmenetelmä) ja koesarjaa (määrällinen tutkimusmenetelmä) (KUVIO 2.) ja tavoitteena on näin menetellen lisätä tutkimuksen kattavuutta. Määrällisen eli kvantitatiivisen tutkimusmenetelmän avulla on tarkoitus saavuttaa numeraalista tietoa. Laadullisen eli kvalitatiivisen tutkimusmenetelmän tavoitteena on saada tietoa, joka auttaa merkitysten ymmärtämisessä (Vilka, 2015. 66, 67.).



KUVIO 2. Tutkimusmenetelmät

4.1.1 Kirjallisuuskatsaus

Kirjallisuuskatsaus on tutkimusmenetelmä, jossa tutkitaan jo tehtyä tutkimusta eli kootaan tutkimusten tuloksia, jotka ovat perustana uusille tutkimustuloksille. Kirjallisuuskatsaus kuuluu menetelmänä kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen tutkimusmenetelmän yhdistelmään (Salminen 2011, 10, 7, 11, 15)

Koska tarkoituksena on valikoida mukaan mahdollisimman edustava joukko tutkimuksia, on aihepiiri rajattava. Lisäksi määritellään hyväksymis- ja poissulkukriteerit eli millaiset tutkimukset halutaan hyväksyä mukaan sekä miten ja kuinka kauas historiaan tietoa haetaan (Metsämuuronen 2005, 39.).

4.1.2 Tiedonhaku

Tietoa haettiin eri tavoilla: erilaisista tietokannoista, viitehakemistoista ja kirjoista. Aineisto hankittiin OAMK:n kirjastosta, LKS:n patologian osaston käsikirjastosta, kotimaisesta Leevi- ja Theseus-tietolähteestä sekä internetistä kansainvälisistä tietolähteistä PubMed, Ebsco, Ebrary, Uptodate ja ClinicalKey. Näitä tietolähteitä pidettiin tutkittavan aiheen kannalta luotettavina. Internetistä hankittavan tiedon perusteena oli se, että tiedon tuli olla kokonaan luettavissa ja ilmaiseksi.

Pubmed-tietokanta osoittautui tiivistelmien perusteella tärkeimmäksi lähteeksi, mutta löydettyjen tulosten sisäänottoa rajoitti se, että tutkimukset eivät olleet saatavilla ilmaiseksi eivätkä niissä käytetyt menetelmät antaneet vastauksia tutkimuskysymyksiin. Lähteiden hallinta tapahtui RefWorks-ohjelmaa käyttäen.

Mukaan otettavan aineiston sisään- ja poissulkukriteerinä oli se, kuinka lähellä virtsan sytologisen näytteen tutkimusmenetelmä on täällä hetkellä LKS:ssä käytössä olevaa menetelmää. Mukaan otettiin myös kliinisen kemian tutkimuksia varten otettujen virtsanäytteiden fiksaatiomenetelmiä koskevia tutkimuksia, koska niistä katsottiin voivan saada tietoa tutkimuskysymysten kannalta.

4.2 Aiemmat tutkimukset

Virtsan solunäytteitä ja niiden käsittelyä käsittelevää tutkimuksista on suurin osa julkaistu ulkomailla. Vuosien varrella fiksatiivit ja näytteen valmistusmenetelmät ovat vaihdelleet laajasti ja sen mukaan, millä menetelmällä näytettä tutkittiin ja mihin tarkoitukseen näyte valmistettiin. Näistä eri aikoina käytetyistä kiinnitysmenetelmistä voi saada viitteitä virtsan irtosolujen säilyvyyteen.

Joitakin tutkimuksia on tehty virtsan irtosolunäytteen säilyvyydestä (Lindberg & Ohlin, 1978; Pearson, Kromhout & King, 1981; Howell, Deitch, Anderotti, Westrick & de Vere White; 1993; Ng, W. F., Choi, F. B., Wu, C.; Leung, C. F. & Ng, C. S. 1994; Hussain & Murtadha. 2011). Kotimaisia tutkimuksia on olemassa mm. Kouri, Vuotari, Pohjavaara & Laippala; 2002; Kouri, Malminiemi, Penders, Pelkonen, Vuotari & Delanghe 2008 sekä kaksi kappaletta vuosilta 2012 ja 2013 (Hyvärinen & Hatula, 2012; Karhuvaara, 2013).

Vuonna 1978 virtsanäytteen ensisijaiseksi fiksatiiviksi Lindberg ja Ohlin suosittelivat alkoholipohjaista fiksatiivia (Lindberg & Ohlin. 1978). Vuonna 1981 Pearson, Kromhout ja King testasivat solujen säilyvyyttä erilaisissa fiksatiiveissa ja kokeilivat erilaisia säilytysaikoja ja totesivat, että solujen yksityiskohdat säilyivät paremmin matalassa pH:ssa ja sen takia suosittelivat C- vitamiinia annettavaksi asiakkaalle virtsan pH:n alentamiseksi (Pearson, Kromhout & King, 1981). Vuonna 1993 tehdyssä tutkimuksessa taas suositeltiin virtausytometrian virtsanäytteille metanoli- etikkahappofiksatiivia (20:1) (Howell, Deitch, Andreotti, Westrick & de White. 1993). Näytelasin kuivaamista 37 °C lämpölevyllä ja 30 sekunnin kastamista NaCl:ssa suositeltiin tehtäväksi virtsanäytteille ennen alkoholifiksaatiota (Ng, Choi, Wu; Leung & Ng. 1994).

Kouri, Vuotari, Pohjavaara ja Laippala olivat tutkineet virtsan solujen säilyvyyttä sekä virtausytometrasta ja visuaalista mikroskopointia varten (säilytysaika maksimissaan 3 vuorokautta), totesivat artikkelissaan, että virtsan partikkelit säilyvät huoneenlämmössä enintään 1 päivän kestävän kuljetuksen ajan. (Kouri ym. 2002). Kouri, Malminiemi, Penders, Pelkonen, Vuotari & Delanghe (2008) testasivat virtsan säilyvyyttä erilaisissa kaupallisissa vakuumputkissa virtausytometrisia tutkimuksia varten. Vakuumputkessa solut säilyivät ehjinä. Tuloksen mukaan virtsanäyte voidaan kuljettaa + 20 C, jos se on säilytetty asianmukaisesti. Pidemmät viipeet vaativat fiksoinnin huolellista suunnittelua (Kouri ym. 2008).

Hussain ja Murtadha tutkivat 0-4 tunnin kuluttua näytteenotosta tapahtuvan fiksoinnin vaikutusta solujen säilymiseen ja tämä mukaan jokainen viive vaikuttaa solujen säilymiseen. He suosittelivat sytologiaa varten tulevien virtsanäytteiden välitöntä kiinnittämistä (Hussain ym. 2011).

Vakuumiputken soveltuvuutta virtsan irtosolunäytteen käsittelyyn on tutkittu bioanalytiikan opinnäytetyössä (Hyvärinen & Hatula, 2012). Tutkimuksessa vertailtiin perinteistä etanolifiksatiivimenetelmää ja säilöntäaineetonta vakuumiputkea. He eivät tutkineet virtsan solujen ajallista säilyvyyttä. Virtsan irtosolunäytteiden vertailussa ei havaittu merkittäviä muutoksia uroteelisolujen määrässä ja morfologiassa, mutta uroteelisolujen ryhmittymisessä havaittiin eroavaisuuksia. Jatkotutkimusaiheeksi he suosittelivat tutkittavaksi mm. kuinka kauan virtsanäyte säilyy vakuumiputkessa ilman fiksiivia, jolloin saatua tietoa voitaisiin käyttää esim. kotinäytteenotossa näytteen lähetykseen ja kuljetukseen (Hyvärinen & Hatula, 2012.).

Turun ammattikorkeakoulussa tehdyssä opinnäytetyössä (Karhuvaara, 2013) on tehty virtsan irtosolunäytteen päivitetty ohjeet Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirissä sijaitsevan Tykslabin ohjekirjaan. Mainitussa tutkimuksessa jatkotutkimusaiheeksi on ehdotettu samaa tutkimusta, mutta se tehtäisiin laajemmalla systemaattisella kirjallisuuskatsauksella. Lisäksi mukaan tutkimukseen ehdotettiin empiiristä osuutta, jossa vertailtaisiin virtsanäytteen avulla erilaisten teknisten vaiheiden vaikutusta kuten esim. etanolifiksiivien vaikutusta solujen säilyvyyteen.

Lapin keskussairaalan patologian laboratorioissa tehtiin v. 2013 elo-syyskuussa käytännön koe, jossa vertailtiin 50 virtsanäytettä ja pyrittiin selvittämään säilyvätkö virtsan solut kliinisen kemian puolella käytössä olevassa säilöntäaineeseen (BD Vacutainer® Plus C & S Boric Acid, sodium borate, 364955) otetussa virtsanäytteessä. Vertailukohtana oli perinteisesti käsitelty virtsanäyte (sentrifugointi + 50 % alkoholi). Näytteet valmistettiin tutkittaviksi valmisteiksi seuraavana päivänä. Virtsan eri soluryhmien säilyvyysarvio tehtiin valomikroskooppisesti kuten Kouri ym. julkaisunsa (Kouri ym. 2008. 703- 713) mukaan tehneet.

Tämä tutkimus pohjautuu osaksi Hyvärisen & Hatulan sekä Karhuvaaran tekemien opinnäytetöiden jatkotutkimusaiheisiin. Tutkimustieto siitä, kuinka pitkään virtsan solut säilyvät tutkittavina eri fiksiiveissa tai ilman fiksiivia on tärkeää silloin, kun välimatka ja -aika näytteenantajan ja tutkimuspaikan välillä on pitkä, kuten on esimerkiksi Lapissa. Aihe on myös tärkeä ammattialan kannalta, koska virtsan irtosolunäytteen säilyvyydestä ei ole juuri tehty tutkimusta.

4.3 Kirjallisuuskatsauksen tulokset

Kirjallisuuskatsauksen perusteella virtsan irtosolunäytteen teknisistä menetelmistä ei saatu selville sellaisia tutkimuksia, joita voitaisiin suoraan soveltaa LKS: ssa tällä hetkellä käytössä olevaan sytologisen virtsanäytteen tekniseen valmistusmenetelmään. Osa virtsanäytteen säilyvyyttä käsittelevistä tutkimuksista oli tehty virtaussytometrasta menetelmää tai kliinisen kemian tutkimuksia varten, jotka eivät ole käytössä Lapin keskussairaalan patologian laboratoriossa.

Kirjallisuuslähteistä ja tutkimustuloksista ei yhtä ainoaa yleisesti käytössä olevaa menettelytapaa virtsan irtosolunäytteiden kiinnitykseen tai käsittelymenetelmiin löytynyt. Myöskään siitä ei löytynyt tutkimustuloksia, kuinka kauan näyte säilyy vakuumiputkessa fiksoimattomana.

4.4 Koesarja

Koesarjassa eri fiksaatiomenetelmin käsitellyjä näytteitä säilytetään 1-3-5 vrk. ja vertaillaan säilytysajan vaikutusta virtsan solujen morfologiaan. 5 vrk valittiin pisimmäksi säilytysajaksi, koska ajateltiin, että se olisi pisin mahdollinen aika jonka kuluessa näyte tulisi maakunnasta. Näytelasit tutkitaan valomikroskopoimalla ja eri soluryhmien säilyvyydestä tehdään silmämääräinen arvio.

5 TUTKIMUSAINIESTON KERUU JA KÄSITTELY

5.1 Suositukset

Virtsanäyte on asiakkaalle yksi helpoimmin annettavista laboratorionäytteistä ja asianmukaisen ohjauksen saatuaan hän voi ottaa näytteen kotonaan. Virtsan irtosolunäytteen käsittelystä on annettu suosituksia ja ohjeita eri tahoilta. Yhteistä niille kaikille on, että virtsanäyte vaatii säilöntäaineen (= kiinnitysaine eli fiksatiivin), onnistuu parhaiten päivän toisesta näytteestä ja että 50 % alkoholi on suositelluin kiinnitysaine.

Jos näyte otetaan laboratorion ulkopuolella eikä sitä voida käsitellä välittömästi tai viimeistään 2 tunnin kuluessa näytteenotosta, näytteeseen tulisi lisätä fiksatiivia solumateriaalin säilyttämiseksi sellaisena kun se oli näytteenottohetkellä sekä mikrobitoiminnan lopettamiseksi. Yleisin ja suositelluin fiksatiivi 50 % alkoholia, jota pidetään parhaana yleisfiksatiivina ja sen sanotaan säilyttävän näytteen tutkimuskelpoisena useita päiviä. Alkoholi aiheuttaa kuitenkin solujen kutistumista, joka tekee tulkinnan vaikeammaksi ja solut voivat olla myös heikosti kiinnittyneitä objektilasille (Koss 1979, 119.).

Hoitotyön tutkimussäätiön suosituksen liitteessä on kuvailtu potilaan itse antamien näytteiden teknisiä laatuvaatimuksia ja sen mukaan solututkimukseen täytyy olla tuorenäyte ja säilöntäaine. Suosituksen mukaan virtsan solujen tutkimuksiin tarkoitetut näytteet siirretään jo kotona sovittuihin säilöntäaineputkiin, minkä lisäksi syöpäsolujen tutkimiseksi suositellaan otettavaksi aamun toinen virtsanäyte tai antamaan virtsanäyte mieluiten hoitoyksikössä (Potilaan itse antamien näytteiden teknisiä laatuvaatimuksia: Hoitotyön suositus, viitattu 29.3.2016.).

Eurooppalainen suositus virtsanäytteen tutkimisesta vuodelta 2001 käsittelee yleisesti koko virtsan tutkimusprosessia kliinisen kemian ja kliinisen mikrobiologian näkökulmasta. Suosituksessa kuvailaan myös virtsan mikroskopointia (Aspevall, Hallander, Gant & Kouri. 2001.176- 177.) ja siinä ei käsitellä virtsan irtosolunäytteen käsittelyä.

Virtsan sytologisesta tutkimuksesta on Labquality Oy:n antama toimintaohje (1999), jonka mukaan tulee toimia, jos virtsan perustutkimuksen yhteydessä todetaan selvästi morfologialtaan poikkeavia

soluja. Koska uroepiteelin soluja pystytään yleensä arvioimaan vain patologian laboratorioissa, tulee löydöksen varmistamiseksi hoitoyksikön pyytää virtsan tuumorisolujen tutkimista patologian laboratoriolta. Tutkimus onnistuu parhaiten päivän toisesta näytteestä ja se otetaan patologian laboratorion ohjeiden mukaan. Muun ohjeen puuttuessa patologian laboratorioon lähetetään keskisuihkunäytteestä sentrifugoitu sakka, joka on fiksoitu 50 % alkoholiin (Moodi 7.1999.12,18).

Kliinisiä laboratoriotutkimuksia varten tehdyn näytteenotto-oppaan mukaan virtsan sytologinen näyte suositellaan otettavaksi 50 % etanoliin, jolloin näytettä ja etanolia sekoitetaan yhtä suurat määrät. Näyte sentrifugoidaan välittömästi 10 min. 1500 kierrosta/min., supernatantti eli päällä oleva neste poistetaan ja sakan päälle laitetaan 50 % etanoli (Tuokko, Rautajoki, Lehto, 2008, 72.).

Kliinisen sytologian kirjan mukaan virtsanäyte suositellaan otettavaksi 3-5- peräkkäisenä päivänä. Aamun ensimmäinen virtsanäyte on runsassoluinen, mutta osa soluista on hajonneita oltuaan yön ajan virtsarakossa. Suositellaan, että asiakas juo nestettä 0,5-1 l ja antaa tutkimukseen virtsanäytteen, jossa on vähemmän soluja, mutta ne ovat parempikuntoisia. Näytetekniikkana käytetään tutkimuspaikasta riippuen solusuodatusta (Millipore) tai sytosentrifugointia alle 2 tuntia otetusta tai 50 % alkoholiin fiksoidusta näytteestä. Alkoholifiksatiivin sanotaan saostavan kuona- ym. aineita, jotka haittaavat suodatusta, joten tuore virtsa suositellaan sentrifugoitavaksi ja vain "solunappi" fiksoidaan (Koivuniemi, 1994, 269.).

5.2 Lapin keskussairaalan U-Syto-ohje

Virtsan irtosolututkimus (U- Syto) tehdään LKS:ssa Nordlabin ohjeen mukaan (Virtsan irtosolututkimus. Nordlab. Viitattu 10.3.2016). Ohje on edellä mainittujen suositusten mukainen. Asiakas tulee antamaan näytteen laboratorioon tai antaa näytteen maakunnassa, ja näytteen kuljetus patologian laboratorioon tapahtuu Nordlabin toimesta.

Näyte ei saa olla aamun ensimmäinen virtsanäyte. Alapesun jälkeen otetaan näytteeksi keski- tai loppuvirtsaa 20- 200 ml. Asiakas voi antaa samana päivänä useamman näytteen, mikäli näytteenottojen välissä on vähintään kaksi tuntia ja hän on juonut ja liikkunut välillä. Näyte tulee toimittaa laboratorioon kahden tunnin sisällä näytteenotosta virtsanäytteen esikäsitteilyä varten (LIITE 2).

5.3 Näyttemateriaali

Näytteet (13 kpl) virtsan solujen säilyvyyden testaamista varten saatiin LKS:n urologian poliklinikan näytteistä. Näytteet annettiin laboratorion näytteenotossa ja näyte toimitettiin tuoreena patologian laboratorioon jatkokäsiteltäväksi voimassa olevien käytäntöjen mukaisesti. Näytteet valittiin laaditusten hyväksymiskriteerien mukaisesti vk 14- 16 tulevista näytteistä ja ne saivat olla samankin potilaan eri kelloaikaan antamia näytteitä.

Näytteen tuli olla mielellään uroteelikarsinoomaa sairastaneen näyte, sillä syövässä virtsaan irtoaa soluja enemmän ja terveen ihmisen virtsassa ei yleensä ole mainittavasti uroteelisoluja, joiden säilyvyyttä voitaisiin analysoida (*TAULUKKO 2. Näytteen hyväksymiskriteerit*). Näytettä tulee lisäksi olla ainakin 80- 100 ml, että näytteestä saadaan valmistettua tarvittava määrä laseja vertailua varten. Lisäksi virtsanäytteen tulee olla tuore, että se voidaan käsitellä jatkossa usealla eri menetelmällä.

TAULUKKO 2. Näytteen hyväksymiskriteerit

| Virtsanäyte (ominaisuus) | syy |
|--------------------------------|--|
| uroteelikarsinoomanäyte | syöpäsoluja irtoaa enemmän näytteeksi |
| näytettä tulee olla 80- 100 ml | voidaan tehdä tarvittava määrä laseja |
| tuore näyte | jatkokäsittely erilaisilla kiinnitysaineilla |

5.4 Näytelasin valmistusmenetelmä

Normaalisti, kun fiksoidaan tuore virtsan irtosolunäyte, se jaetaan näytteenottoastiasta 5 kpl 10 ml muovisiin koeputkiin, minkä jälkeen putket sentrifugoidaan 10 min. (sentrifugi Sigma 3 E-1). Supernatantit kaadetaan pois, kaikkien 5 kpl putkien "sakat" fiksoidaan yhteen 10 ml muoviseen koeputkeen ja päälle lisätään 50 % alkoholia.

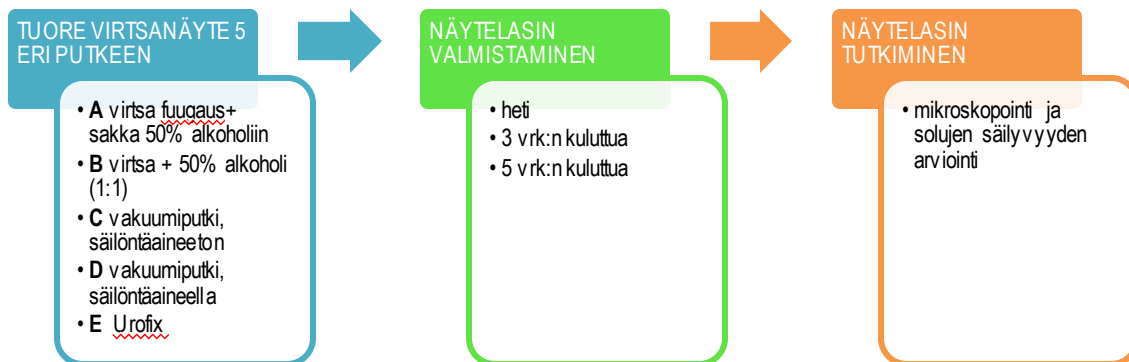
Tähän tutkimukseen, näytemäärän vakioimiseksi ja fiksointimenetelmien vertailua varten, virtsanäytettä laitetaan kuhunkin fiksaatiiviin 10 ml. Testattaessa yhden näytteen solujen säilyvyyttä, näytettä ei voida jakaa 5 useampiin osiin (à 10 ml), sillä muuten näytemäärä kullekin lasille jäisi liian pieneksi ja eri fiksaatiivimenetelmillä valmistettuja näytelaseja ei voitaisi vertailla keskenään. Virtsa-ssä voi olla muutenkin vähän irronneita soluja.

Tutkittavat näytteet valmistettiin mikroskoitaviksi laseiksi LKS: n patologian laboratoriossa ns. sytosentrifugimenetelmällä (LIITE 3). Sytosentrifugikyvettejä on olemassa kahta kokoa: 6 ml ja 12 ml. Tätä tutkimusta varten näytteet valmistetaan 6 ml kyvetissä, siksi että mikroskoitava näyte-alue olisi pienempi ja mahdollisia soluja olisi nähtävillä enemmän, kun normaalisti näyte lasi valmistetaan 12 ml kyvetissä, jolloin mikroskoitava alue on suurempi.

5.5 Käytetyt fiksaatiomenetelmät

Virtsan solujen säilyvyyden arviota varten kutakin näytettä fiksoitiin 5 erilaisella fiksaatiomenetelmällä A, B, C, D ja E (LIITE 5.), minkä jälkeen niistä tehtiin sytosentrifugilasit työohjeen mukaisesti (LIITE 6.) heti, 3 vrk ja 5 vrk kuluttua (KUVIO 3.). LKS: n patologian osastolla on tällä hetkellä käytössä menetelmä (A). Fiksointimenetelmä B:tä haluttiin testata, kauanko siinä säilyy 50 % alkoholiin kiinnitetty virtsanäyte (max.5 vrk). Kaupallisia vakuumiputkia C (ilman fiksaatiivia,) ja D (sisältää fiksaatiivin) haluttiin testata, virtsanäytteenotossa on käytössä vakuumiputkimenetelmä virtsanäytteen klinisen kemian ja mikrobiologian tutkimuksia varten. E-fiksaatiivia haluttiin testata, koska menetelmä oli uusi ja haluttiin tietää säilyvätkö solut siinä paremmin.

Vakuumiputkien vertailulla haluttiin selvittää olisiko jompikumpi vakuumiputki sellainen, että sitä voitaisiin käyttää jatkossa virtsan solututkimuksia varten sekä katsoa kuinka kauan virtsanäyte säilyy vakuumiputkessa ilman fiksaatiivia että fiksoimatta. Näytteiden valmistusajat on valittu siten, että ne kuvaavat mahdollista viivettä näytteenottohetkestä näytteen valmistamiseen.



KUVIO 3. Virtsanäyte jaetaan viiteen eri putkeen eri säilytystapojen vertailua varten

5.6 Solujen valomikroskopian arviointiperusteet

Näytelasi tutkitaan valomikroskopilla ja arvioidaan punasolujen liuskatumaisten leukosyyttien, levyepiteelisolujen, välimuotoisten epiteelisolujen ja mahdollisten muiden solujen säilyminen eri tavoin säilytettynä. Arvioinnin mittarina toimii mikroskopilla tehty silmämääräinen arvio solujen säilymisestä (LIITE 7) joka perustuu mukaeltuna artikkeleihin: Kouri, Vuotari, Pohjavaara & Laippala, 2002; Aspevall, Hallander, Gant & Kouri, 2002.

6 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

6.1 Näytteen tekninen valmistaminen

Näytteitä valmistettiin (KUVA 1) viikkojen 15-16 aikana. Näytelasin valmistamista varten kirjoitettiin Qpati- tietokoneohjelmalla objektilasi (Surgipath® Xtra® Clipped Corner), johon tulivat näytteen tunnistetiedot. Lasi tulostettiin automaattisella Leica IPS- lasitulostimella (Leica Biosystems. Printer for microscopic slides. Viitattu 27.4. 2016).

Sytosentrifugiin laitettava kyvetti muodostuu objektilasista, metallipidikkeestä, silikonitiivisteestä ja kyvettiosasta.



KUVA 1. Näytelasin valmistaminen

Näyte sentrifugoitiin sytosentrifugilla (Cyto- Tec Cyto centrifuge, viitattu 18.3.2016). 7 min. 2000 rpm (470 G), jonka jälkeen se valutettiin ylösalaisin käännettynä imevän alustan päällä ja annettiin kuivua tasaisella alustalla yön yli ennen värjäämistä (LIITE 3.).

Näytteet värjättiin Papanicolaoun värjäyksellä (LIITE 4) Sakura® Tissue Tek – värjäyskoneella (Tissue Tek Prisma & Film Automated Slide Stainer & Coverslipper. Viitattu 18.3.2016). Valmiit lasit kuivuivat ja haihtuivat huoneenlämmössä vähintään 1-2 h ennen mikroskopointia.

6.2 Materiaalit

Näytteiden valmistukseen tarvittava määrä objektilaseja, 150 kpl sekä kiinnitykseen tarvittava 50 % alkoholifiksatiivi ja värjäysreagenssit saatiin LKS:n patologian laboratorion kautta. Näytteenotto purkki oli Nordlabilta virtsan vakuuminäytteenottoon tarkoitettu keltakorkkinen, 100 ml astia, johon näytteet normaalitkin annetaan virtsan irtosolututkimusta varten.

Säilöntäaineettomat (BD Vacutainer®. Viitattu 2.2.2016) ja säilöntäaineelliset (BD Vacutainer® Plus UA Preservative Tube. Viitattu 2.2.2016) vakuumputket saatiin BD-firman edustajalta. E-säilytysmenetelmässä testatut putket opinnäytetyön tekijä sai mukaansa Italiasta, Veronasta ja ne ovat kaupallisia virtsan irtosolunäytteen säilytysputkia (Bio-Optica. Urofix®. Viitattu 2.2.2016).

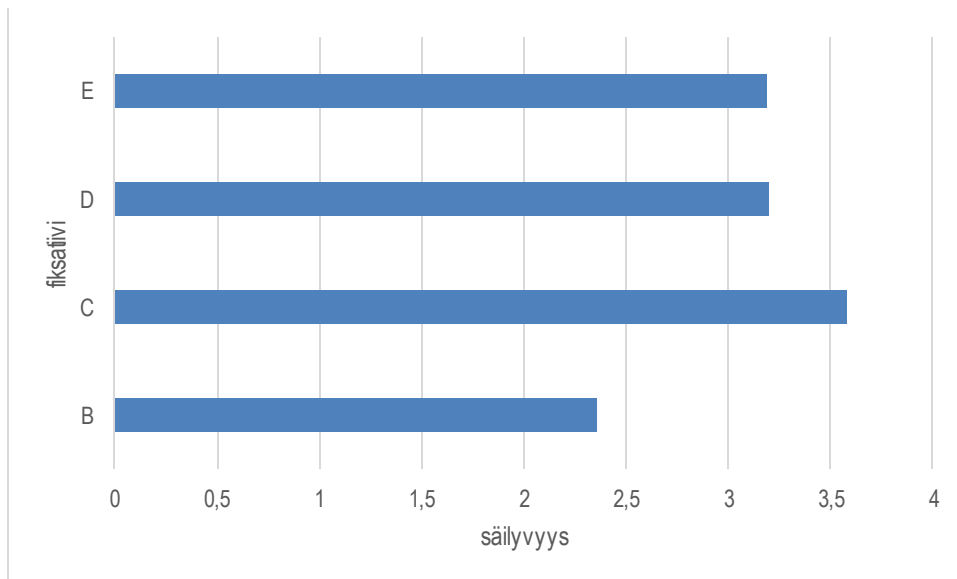
6.3 Mikroskopointi

Näytteiden mikroskopoinnissa käytettiin LKS:n tiloja ja Leica DM3000- valomikroskooppia. Mikroskopoinnin ja tarvittavan solumorfologian säilyvyysarvion teki opinnäytetyön tekijän lisäksi 3 muuta LKS:ssä työskentelevää laboratoriohoitajaa, jotka toimivat sytologian esitarkastajina.

Mikroskopointia tehtiin viikoilla viikolla 16- 18. Vertailtavia sytosentrifugilaseja tuli yhteensä 106 kappaletta, minkä lisäksi tutkimukseen otettujen näytteiden alkuperäiset objektilasit haettiin arkistosta mukaan vertailua varten, jolloin kokonaislasimäärä oli yhteensä 118 kappaletta.

6.3.1 Punasolujen säilyvyys

Punasolut säilyvät 3 vrk:n säilytyksen jälkeen kohtalaisesti fiksatiivissa B ja ne olivat kaikissa muissa fiksatiiveissa melkein hajonneita. 5 vrk:n kuluttua punasolut säilyvät parhaimmin B- fiksatiivissa.

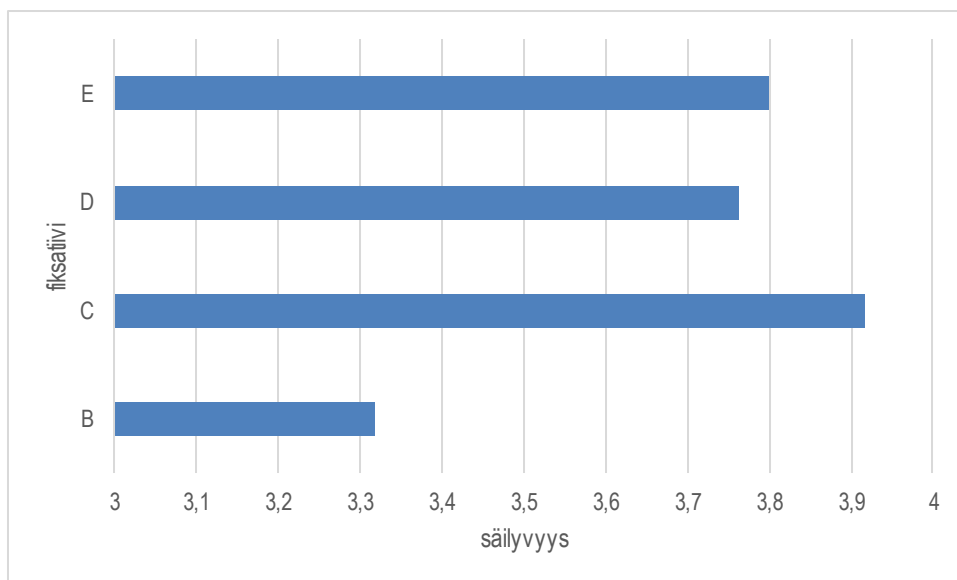


KUVIO 3. Punasolujen säilyvyys 3 vrk: n säilytyksen jälkeen

(asteikko: 1 hyvin säilyneet, 2. kohtalaisesti säilyneet, 3. melkein hajonneet 4. kaikki hajonneet)

6.3.2 Liuskatumaisten leukosyyttien säilyvyys

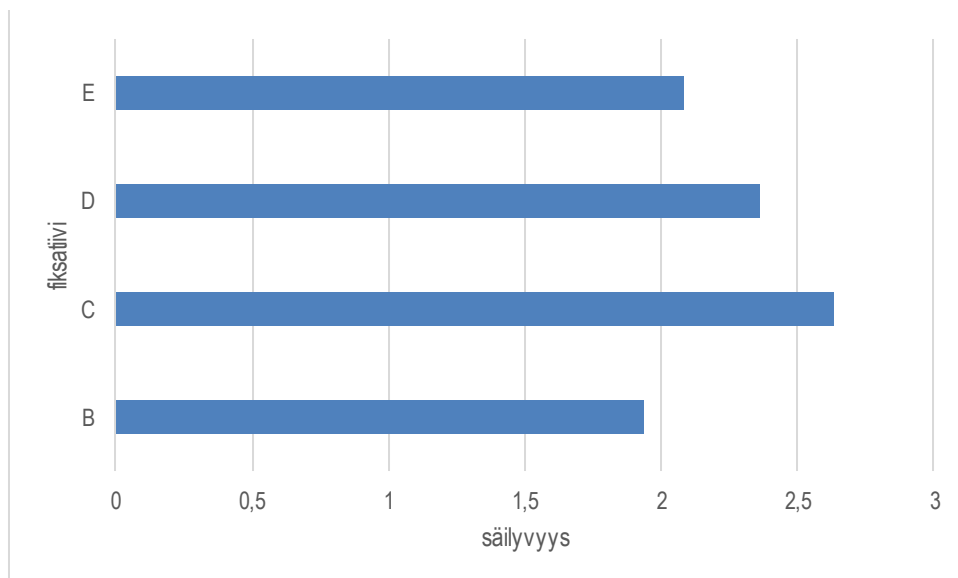
Liuskatumaiset leukosyytit olivat jo 3 vrk:n säilytyksen jälkeen kaikissa fiksatiiveissa melkein kaikki hajonneita ja 5 vrk:n kuluttua kaikki olivat hajonneita.



KUVIO 4. Liuskatumaisten levyepiteelisolujen säilyvyys 3 vrk:n kuluttua
(asteikko: 1 hyvin säilyneet, 2. kohtalaisesti säilyneet, 3. melkein hajonneet
4. kaikki hajonneet)

6.3.3 Levyepiteelisolujen säilyvyys

3 vrk:n säilytyksen jälkeen levyepiteelisolut säilyivät kohtalaisesti (säilyvyys 2-3) kaikissa fiksatiiveissa. 5 vrk:n säilytyksen jälkeen parhaiten fiksatiiveissa B ja E.

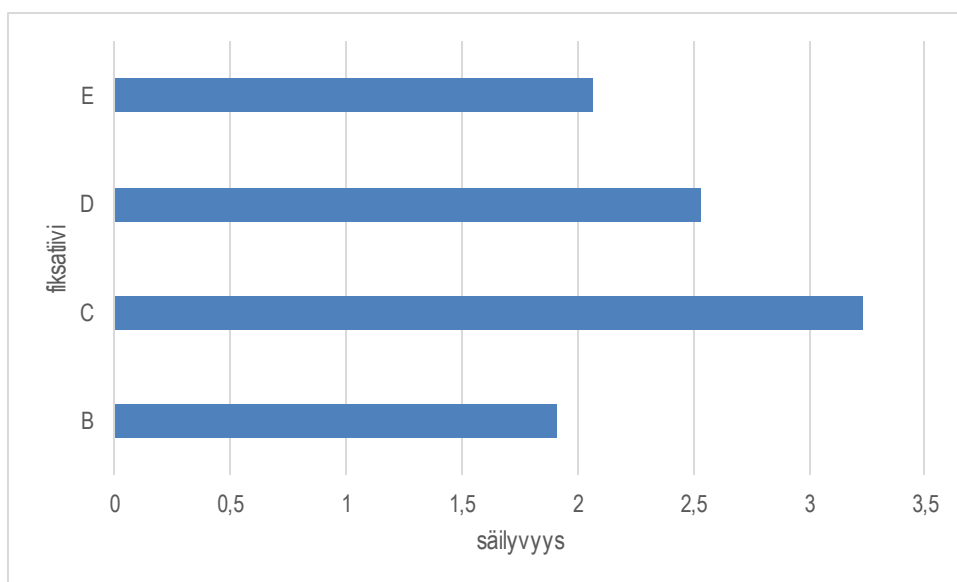


KUVIO 5. Levyepiteelisolujen säilyvyys 3 vrk:n säilytyksen jälkeen

(asteikko: 1 hyvin säilyneet, 2 kohtalaisesti säilyneet, 3 melkein hajonneet
4. kaikki hajonneet)

6.3.4 Välimuotoisten epiteelisolujen säilyvyys

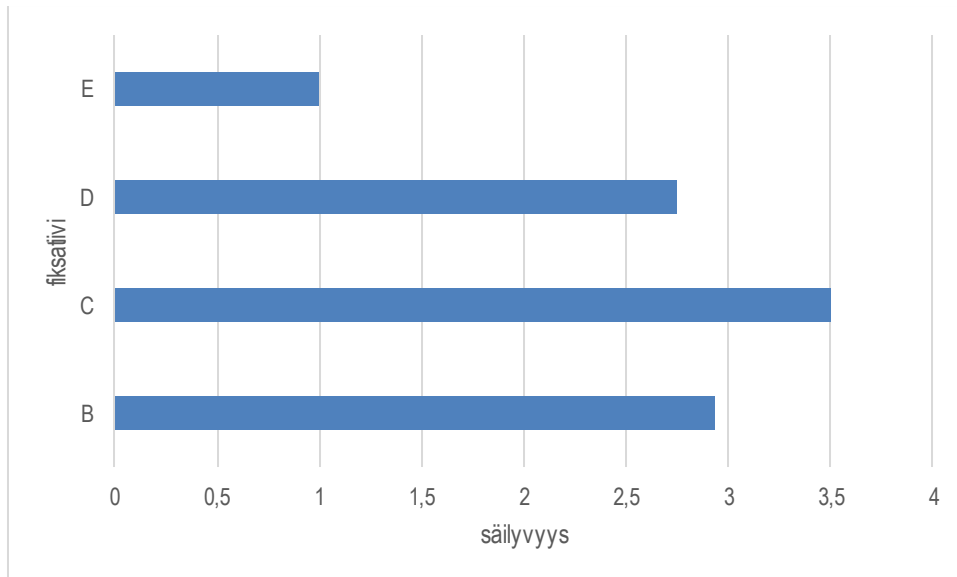
Välimuotoiset epiteelisolut eli uroteelisolut säilyvät kohtalaisesti 3 vrk:n kuluttua ja parhaiten fiksaatiivissa B ja E. 5 vrk:n kuluttua huonoimmin säilyneitä uroteelisoluja löytyi C- ja D- fiksaatiiveista.



KUVIO 6. Välimuotoisten epiteelisolujen säilyvyys 3 vrk:n säilytyksen jälkeen
(asteikko: 1 hyvin säilyneet, 2 kohtalaisesti säilyneet, 3 melkein hajonneet
4 kaikki hajonneet)

6.3.5 Muut solut

Muut virtsassa esiintyvät solut olivat fiksaatiivissa E hyvin säilyneitä 3 vrk:n jälkeen ja kohtalaisesti säilyneitä tai melkein hajonneita muissa fiksaatiiveissa. 5 vrk:n kuluttua kaikissa fiksaatiiveissa solut olivat säilyneet vähintään kohtalaisesti tai joissakin oli melkein hajonneita (fiksaatiivi C).



KUVIO 7. Muut solut- säilyvyys 3 vrk:n säilytyksen jälkeen

(asteikko: 1 hyvin säilyneet, 2. kohtalaisesti säilyneet, 3. melkein hajonneet
4. kaikki hajonneet)

6.4 Tulosten tulkinta

Vertailun lähtökohtana oli eli nykyisin käytössä oleva A- fiksaatiivi, jossa solut heti fiksoituna säilyttivät ulkonäkönsä ja muotonsa kaikista parhaiten. Parhaaksi fiksaatiiviksi osoittautuivat fiksaatiivit B (1(näyte):1 (50 % alkoholi) ja E (Urofix©), joissa solujen morfologia säilyi tulkittavana 3 vrk: ja 5 vrk:n säilytyksen jälkeen. Mikäli halutaan tutkia erityisesti välimuotoisten epiteelien säilyvyyttä 3 ja 5 vrk:n jälkeen, kaikkien tutkimusnäytteitä katsoneiden mielestä E–fiksaatiivi säilytti solujen muodon

ja rakenteen kauneimpana. E- fiksatiivissa punasolut säilyivät huonosti. Solujen säilyvyydestä on valokuvia liitteessä 10.

Eri soluryhmien säilyvyyksistä tehtiin taulukko Excel-ohjelmalla ja saaduista arvoista laskettiin keskimääräinen säilyvyys. Tämän jälkeen 13 eri näytteestä tehtiin soluryhmäkohtainen säilyvyysarvio eri fiksatiiveilla 3 ja 5 vrk:n säilytysajan jälkeen. Tulosten havainnollistamiseksi tehtiin soluryhmien kuvaajat 3 vrk:n säilytysajan jälkeen. 5 vrk:n säilytysaikaa ei havainnollistettu kuvaajilla, sillä soluryhmät olivat säilyneet tuon säilytysajan jälkeen huonosti tai olivat kokonaan tuhoutuneet. Alkuperäiset taulukot ja tulokset ovat kirjoittajan hallussa.

Kolme ensimmäiseksi tullutta näytettä olivat näytemäärältään niukkoja, joten tutkimusta päätettiin jatkaa vielä alkuperäisestä 10 näytteestä kolmella näytteellä, jolloin näytteiden yhteismääräksi tuli $n = 13$ ja lasien määräksi 109 kpl. Vertailuun otettiin lisäksi alkuperäinen, A-menetelmällä valmistettu objektilasi, ja näiden lasien yhteismäärä oli 118 kpl. Kaikki tutkimukseen valmistetut näytelasit ovat arkistoituna LKS:n patologian laboratoriossa.

6.5 Keruu- ja lupamenettely

Tutkimus suunniteltiin Oulun ammattikorkeakoulun eettisiä ohjeita (Oulun ammattikorkeakoulu, opinnäytetyön ohjeet, viitattu 12.3.2016), Lapin sairaanhoitopiirissä tehtävien opinnäytetöiden eettisiä ohjeita (Lapin keskussairaalan eettiset ohjeet, 2009) noudattaen sekä hyviä tutkimustyön eettisiä periaatteita noudattaen (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2012). Koska kyseessä oli laboratoriomenetelmän testaus, ei lääketieteellinen tutkimus (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta. 9.4.1999 /488. Viitattu 19.5.2016), näytteitä voitiin käyttää ilman erillistä potilaalta pyydettyä tutkimuslupaa, kun niistä oli ensin valmistettu alun perin pyydetty tutkimus (Vuopala, keskustelu 9.2.2016).

Tutkimus aloitettiin vasta kun tutkimussuunnitelma oli hyväksytty ja organisaation antama tutkimuslupa saatu. Näytteet käsiteltiin nimettömänä, eikä tutkittavien henkilöllisyys tullut esiin missään tutkimuksen vaiheessa. Aineisto kerättiin tarkoitukseen sopivin menetelmin hyvän tutkimuskäytännön mukaisesti ja tutkimusaineisto on analysoitu ja raportoitu luotettavasti ja rehellisesti. Opinnäytetyö perustuu toimeksiantoon ja siitä on tehty kirjallinen sopimus tekijän, toimeksiantajan ja koulun kesken.

6.6 Luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuutta kuvataan käsitteillä *reliabiliteetti* ja *validiteetti*: Reliabiliteetti viittaa tutkimuksen toistettavuuteen. Tutkimusasetelma tulisi suunnitella niin, että se on tarvittaessa toistettavissa. Validiteetti viittaa siihen, ja mitataanko sitä, mitä on tarkoitus mitata. Tutkimuksen validiteettia määriteltäessä täytyy miettiä ovatko käsitteet oikeita, onko teoria oikein valittu ja mitataanko sitä, mitä oli tarkoitus (Metsämuuronen 2006, 56, 65.).

Tarkka selostus tutkimuksen toteuttamisesta ja sen eri vaiheista lisää tutkimuksen luotettavuutta. Tutkimuksen tekijän tulee selvittää, mitä tutkimuksessa on tehty ja miten saatuihin lopputuloksiin on päästy. Itsearviointi tutkimuksesta ja mahdolliset virhelähteet on kerrottava selvästi (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 232- 233.).

Solujen säilyvyyden arvioi opinnäytetyöntekijän lisäksi 3 eri sytologiaan perehtynyttä laboratoriohoitajaa, mikä lisää tutkimuksen luotettavuutta. Lasit arvioitiin ns. sokkotutkimuksena, jolloin lasia tulkitseva ei tiennyt millä tavalla lasi oli valmistettu, eikä se näin ollen voinut vaikuttaa mikroskopijan arviointiin.

7 POHDINTA

Tehtävänä oli selvittää, löytyykö virtsan irtosolunäytteen käsittelymenetelmistä uutta tietoa ja kuinka kauan virtsan solutsäilyvät eri fiksatiiveissa. Tutkimuksen avulla saatiinkin vastauksia näihin kysymyksiin. Kokonaisvaltaisen näkökulman ja teoriapohjan luomiseksi oli hyödyllistä perehtyä ensin uusimpiin artikkeleihin sekä katsella aihepiiriä myös historiassa taaksepäin. Lisäksi tehty koesarja tuo käytäntöön uutta tietoa, jota voidaan käyttää hyväksi tulevaisuudessa.

Kirjallisuuskatsauksen perusteella nykyiset virtsan irtosolunäytteen käsittelymenetelmät perustuvat vanhempiin tutkimuksiin ja uusiakin artikkeleita oli hyvin niukasti saatavilla. Säilyvyyteen vaikuttavista tekijöistä ei löytynyt uudempiä tutkimustuloksia tai artikkeleita.

Koesarjan avulla saatiin arvoitua mihin fiksatiiviin näyte olisi parasta laittaa sekä myös arvio siitä, kuinka pitkän ajan jälkeen näytteen antamisesta näytteestä kannattaa enää tehdä sytologista irtosoluvalmistetta. Jatkossa näitä tietoja voidaan käyttää hyväksi näytteen laatua arvioitaessa ja suunniteltaessa näytteen kuljetusta. Lisäksi tämän avulla voidaan arvioida, mitä fiksatiivia olisi parasta käyttää solujen säilyvyyden kannalta.

Jos tekijällä olisi ollut aiempaa kokemusta tällaisen työn tekemisestä, olisi ajankäyttöä voinut kohdistaa aikaa vaativimpiin vaiheisiin huomattavasti tarkemmin. Tutkimustyö uhkasi jossain vaiheessa laajeta ja jos laajentaminen olisi ollut mahdollista, mukaan olisin ottanut myös kuljetuksen ja näytteenoton laatuun vaikuttavina tekijöinä.

Tutkimuksen tekeminen on alusta asti ollut mielenkiintoista. Kirjallisessa osassa mielenkiintoisinta oli löytää niin monia eri tahojen suosituksia ja huomata, että yhtä ainoaa menetelmää ei ole olemassa. Jokainen laboratorio ottaa käyttöön parhaan mahdollisimman menettelytavan, joka perustuu olemassa oleviin suosituksiin ja tutkimustietoon. Menettelytavan valintaan vaikuttaa myös laboratorion ja näytteenantajan välimatka. On eri asia antaa näyte laboratoriossa, jossa se käsitellään välittömästi parhaalla mahdollisella tavalla, kuin antaa se kotona, jonka jälkeen näytettä käsitellään seuraavan kerran usean vuorokauden kuluttua.

Näytteiden sentrifugointi ja valmistaminen 3 ja 5 vrk:n kuluttua jälkeen vaati opinnäytetyön tekijän työpanosta laboratoriossa myös kahtena viikonloppuna. Mikroskopointi vaati aluksi hieman kalibrointia, kun piti määritellä omaan silmämääräiseen arvioon perustuva asteikko, jota käyttäisi läpi koko näytesarjan. Virtsan solujen säilyvyyden arviointi oli kaikilla 4 arvioijalla yllättävän yhteneväinen ja samankaltainen, vaikka näytteet mikroskoipoitiin toisistaan riippumatta. Yhteenveto tutkimustuloksista oli melko vaivatonta tiedonkäsittelyohjelman avulla, mutta vei kovasti aikaa monien muuttujien takia.

Opinnäytetyötä tekemisen aikana kävi ilmi, että virtsan sytologisen näytteestä ei laboratoriossa ollut olemassa näyttöön perustuvaa tietoa esim. lukumääriä paljonko oli ollut ns. huonoja näytteitä tai kauanko näytteet keskimäärin viipyvät matkalla. Jos virheitä ei kirjata systemaattisesti, niiden laatua ja määrää on mahdotonta arvioida, joten on suositeltavaa, että jatkossa kirjattaisiin ylös, jos virtsanäyte on ollut huono tai se on jouduttu uusimaan.

Seuraavalla kerralla miettsin vielä tarkemmin koesarjan muuttujia, koska nyt muuttujia oli hyvin runsaasti; eri fiksatiiveja, aika, eri soluryhmiä ja 4 eri henkilöä, jotka antoivat arvionsa näytteistä, mutta toisaalta tällä menetelmällä saatiin paljon tietoa. Vaikka yhdeksi näytteen laatuksiteriksi laitetiin uroteelikarsinoomaa sairastavan näyte, ei kaikista näytteistä löytynyt uroteelisoluja, vaan löytyi esim. tulehdusta ja runsaasti bakteereja.

Tieto ja erityisesti tiedonhankintamenetelmien käyttö ja sen myötä ammatillinen osaaminen on lisääntynyt monipuolisesti. Seuraavalla kerralla osaa varmasti paremmin pohtia mitä eri asioita on otettava huomioon tutkimustyön tekemisessä. Jatkossa voisi miettiä myös sopivaa näytteen laatuksiteristöä ja ottaa lisää kliinisen kemian osaamista tähän pohdintaan mukaan. Jatkotutkimusideaksi voisin ehdottaa virtsan sytologisen näytteen koko käsittelyvaiheiden kartoittamista, etenkin näytteenoton ja kuljetuksen.

LÄHTEET

Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyön ohje. Oulun ammattikorkeakoulu. 2014. Viitattu 10.3.2016. <https://oiva.oamk.fi/utills/opendoc.php?aWRfZG9rdW1lbnR0aT0xNDMwNzY0Njky>.

Aspevall, O., Hallander, H., Gant, V. & Kouri, T. 2001. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clinical Microbiology and Infection* 7 (4), 173-178.

Bio-Optica. Milano.Urofix®. Viitattu 2.2.2016. <http://www.bio-optica.it/pdf2/CR721.pdf>.

Bibbo M. 1991.M.D. Comprehensive Cytopathology W.B. Saunders Company.

Cyto-Tech Cytocentrifuge. Sakura®. Viitattu 18.3.2016. <http://www.sakura.eu/Our-products/item/13/Cytology/54/Cyto-Tek-Cytocentrifuge>.

Delanghe Joris & Speeckaert Marijn. 2014 Feb 15. Preanalytical requirements for urinalysis. *Biochem Med (Zagreb)* 24 (1), 89-104. Viitattu 10.2.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3936984/pdf/biochem-24-1-89-12.pdf#page=1&zoom=auto,-115,808>.

DeMay Richard. 1996. The Art and Science of Cytopathology. Exfoliative Cytology. American Society of Clinical Pathologists. ASCP Press.

Georgios Papanicolaou. Wikipedia. Viitattu 23.2.2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Georgios_Papanicolaou.

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2009: Tutki ja kirjoita. Hämeenlinna. Kirjayhtymä Oy.

Hoitotyön suositus (online). Hoitotyön Tutkimussäätiön asettama työryhmä. Helsinki: Hoitotyön Tutkimussäätiö. 17.5. 2016. Viitattu 29.3.2016. Saatavilla: www.hotus.fi.

Hussain, G. A. & Murtafda, A. M. T. 2011. The Consequence of Delayed Fixation on Subsequent Preservation of Urine Cells. *Oman Medical Journal* Vol.26 (1), 14-18.

Hyvärinen, N. & Hatula, S. 2012. Vakuumiputken soveltuvuus virtsanäytteen käsittelyyn irtosolututkimuksen yhteydessä. Tampereen ammattikorkeakoulu. Viitattu 13.3.2016. https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/49873/Hatula_Sirke_Hyvarinen_Ninni.pdf?sequence=2.

Karttunen, T, Soini, Y & Vuopala, K. 2005. Tautioppi. Helsinki. Edita Publishing.

Karhuvaara, K. 2013. Sytologisen virtsan irtosolututkimuksen päivitetty ohjeet. Turun ammattikorkeakoulu. Viitattu 13.3.2016. https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/68539/Karoliina_Karhuvaara.pdf?sequence=1.

Koivuniemi, A. 1994. Kliininen sytologia : irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset Helsinki : Kandidaattikustannus.

Koss L. Diagnostic Cytology and Histopathology bases. 1979. 3rd edition. J.B. Lippincott Company

Kouri, T., Malminiemi, O., Penders, J., Pelkonen, V., Vuotari, L. & Delanghe, J. 2008. Limits of preservation of samples of urine strip tests and particle counting. Clin Chem Lab Med 46(5):703-713.

Kouri, T., Vuotari, L., Pohjavaara, S. & Laippala, P. 2002. Preservation of Urine for Flow Cytometric and Visual Microscopic Testing. Clinical chemistry 48 (6), 900-905.

Laki lääketieteellisistä tutkimuksista. 9.4.1999 /488. Viitattu 19.5.2016. <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1999/19990488>.

Laki potilaan asemasta ja oikeuksista. Viitattu 10.3.2016. <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1992/19920785#L2P3>.

Lapin sairaanhoitopiiri ky. Lapin sairaanhoitopiirissä tehtävien opinnäytetöiden eettinen ohjeistus. Eettinen toimikunta.2006.

Laurila, M.2013. Sytologia virtsarakon tautien diagnostiikassa. Moodi 7/2013. 229-231.

Leica Biosystems. Printer for microscopic slides. Viitattu 27.4.2016. <http://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/specimen-labeling-products/details/product/leica-ip-s/>.

Lindberg, L. G. & Ohlin, B. 1978. Specimen Fixation in Urinary Cytology. Acta Cytologica 22 (3), 142-145

Makkonen, S & Tuokko S. 1997. Näytteenotto. Helsinki: Oy. Edita Ab. 169.

Metsämuuronen J. toim., Laadullisen tutkimuksen käsikirja. 2006. Jyväskylä. Gummerus.

Moodi 7. Erillisjulkaisu. Suositus virtsan perustutkimuksia ja bakteeriviljelyä varten. 1999. Labquality Oy.

Moodi 1/2016. Preanalytiikan teemanumero. 2016. Labquality Oy.

Ng, W. F., Choi, F. B., Wu, C., Leung, C. F. & Ng, C. S. 1994. Rehydration of Air-Dried Smears with Normal Saline. Acta Cytologica 1 (January-February), 56-64.

Ojasalo, K., Moilanen, T. & Ritalahti, J. 2015. Kehittämistyön menetelmät. Helsinki. WSOY.

Pearson, J. C., Kromhout, L. & King, E. B. 1981. Evaluation of Collection and Preservation Techniques for Urinary Cytology. Acta Cytologica 25 (3), 327-333.

Potilaan itse antamien näytteiden teknisiä laatuvaatimuksia: Hoitotyön tutkimussäätiö. 17.5.2016. Viitattu 19.5. 2016. http://www.hotus.fi/system/files/Liite%206_0.pdf.

Salminen A. 2011. Mikä kirjallisuuskatsaus ?. Vaasa: Vaasan yliopiston julkaisu. Viitattu 2.3. 2016. http://www.uva.fi/materiaali/pdf/isbn_978-952-476-349-3.pdf.

Syöpäjärjestöt. Virtsarakon syöpä. Viitattu 18.3.2016. <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/virtsarakon-syopa/#virtsarakon-syovan-aiheuttajat>.

Tissue- Tek Prisma & Film Automated Slide Stainer & Coverslipper. Sakura®. Viitattu 18.3. 2016. <http://www.sakura.eu/Our-products/item/9/Staining-coverslipping/153/Tissue-Tek-Prisma-Film-Automated-Slide-Stainer-Coverslipper>.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Viitattu 10.3.2016. http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_verkkoversio040413.pdf.pdf#overlay-context=fi/ohjeet-ja-julkaisut.

Tuokko, S., Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet- opas näytteenottoa varten. Helsinki: Tammi.

U-Syto, 4078, U-Virtsan irtosolututkimus- ohje, Nordlab/ LKS. 25.11. 2015. Viitattu 7.3.2016.

Vacutainer® (no additive), Vacutainer® Urinalysis Plus. BD. Viitattu 7.4. 2016.

https://www.bd.com/vacutainer/pdfs/urine_products_VDP40100.pdf

Vilkkä, H. Tutki ja kehitä. 2015. Jyväskylä. PS-kustannus.

Virtsan irtosolututkimus. Nordlab. Ohjeet ammattilaisille. Viitattu 10.3.2016. <http://oyslab.fi/ohje-kirja/4078.html>.

Virtsan sytologinen näyte. Nordlab. Potilasohjeet U-syto-1. Viitattu 10.3.2016. <http://www.nordlab.fi/fi/terveydenhuollon-ammattilaisille/potilasohjeet>.

Virtsarakon syöpä. Terveyskirjasto. Viitattu 18.3.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00638.

Vuopala, K. Virtsan irtosolujen säilyvyys. PowerPoint-esitys. Laaduntarkkailupäivät 10.10.2013. Helsinki

Vuopala, K. 2016. LT, patologian erikoislääkäri, dosentti, ylilääkäri, patologian yksikkö, Lapin keskussairaala. Keskustelu 9.2.2016.

Wied, G. L., Bibbo, M., Keebler, C. M., Koss, L. G., Patten, S. F. & Rosenthal, D. L. 1997. Compenium on Diagnostic Cytology. Eight Edition. Chicago, Illinois, U.S.A.: Tutorials of Cytology.

LIITTEET

1. PAPA-LUOKITUS
2. LKS/NORDLAB VIRTSAN IRTOSOLUTUTKIMUS OHJE
3. LKS/NORDLAB POTILASOHJE
4. TYÖOHJE/ SYTOTEK- VALMISTE
5. PAPANICOLAOU- VÄRJÄYS
6. VERTAILUSSA KÄYTETYT FIKSATIIVIT
7. TYÖOHJE/ NÄYTELASIEN VALMISTAMINEN
8. SOLURYHMIEN SÄILYVYYSARVIO
9. NÄYTEKOHTAINEN SÄILYVYYSARVIO
10. VALOKUVIA/ SOLUJEN SÄILYVYYS

(mukaeltu kirjasta Koivuniemi ym. 1999)

0- näyte eli riittämätön, solumäärältään liian niukka näyte.

Papa –luokassa I löytyy vain normaaleja välimuotoisen epiteelin soluja, joita tavallisesti löytyy vain vähän virtsanäytteestä. Näytteessä voi silti olla neutrofileja, tautia aiheuttavia pieneliöitä kuten alkueläimiä (Trichomonas), sieniä tai bakteereja.

Papa- luokka II kuuluvat solumuutokset, jotka eivät herätä syöpäepäilyä. Solumuutokset ovat lieviä ja niitä voivat aiheuttaa mm. bakteeri- tai virustulehdukset tai virtsakivet, virtsateiden tutkimus- tai hoitotoimenpiteet, sädehoito tai kemoterapia.

Papa- luokka III pahanlaatuisen kasvaimen todennäköisyys kasvaa. Tähän luokkaan kuuluvat lievät tai keskivaikeat muutokset solun koossa, muodossa tai järjestyksessä. Jos saadaan tutkittavaksi niukka löydös epäilyttäviä, pahanlaatuisia soluja, sijoitetaan löydös usein luokkaan III:een. Vahvat, etenkin virusten tai virtsatiekivien aiheuttamat solumuutokset tai näytteen puutteellisen tai väärän fiksaation takia tuhoutuneet pahanlaatuiset solut sijoitetaan myös tähän Papaluokkaan.

Papa- luokka IV pahanlaatuisten solujen todennäköisyys kasvaa 95-98% :iin.

Papa- luokka V pahanlaatuisten muutosten todennäköisyys on jo yli 99%

Yleistä

U -Syto, 4078

U -Virtsan irtosolututkimus

Lähettävä lääkäri kirjoittaa lähetteen patologian laboratorioon ja tutkimus tilataan myös laboratoriojärjestelmään näytteenottoa varten, jokaiselle näytteelle oma laboratoriolähete (yleensä 3x).

Valmistautumisohje

Potilasohje näytteenottoa varten / Sytologinen virtsanäyte:

- Ei aamun ensimmäistä virtsaa!
- Virtsamatta tulee olla 2-4 tuntia, juominen on suositeltavaa
- Suoritetaan käsienpesu, sekä huolellinen alapesu ilman saippuaa
- Alkuvirtsa lasketaan hukkaan, jonka jälkeen näyteastia viedään keskelle näytesuihkua
- Näytteeksi otetaan keski- ja loppuvirtsa 20-200 ml, purkki mielellään yli puolilleen
- samana päivänä voi antaa useamman näytteen, kunhan näytteenottojen välissä on vähintään kaksi tuntia ja on juonut sekä liikkunut välillä
- Mikäli näytettä ei voida ottaa laboratoriossa, tulee kotona otettu näyte toimittaa laboratorioon 2 tunnin kuluessa näytteenotosta. Näytopurkki tulee varustaa nimellä ja syntymäajalla

Näyte

2 - 4 tuntia rakossa ollutta keski- ja loppuvirtsa, riittävä määrä on 20-200 ml.

Ei aamun ensimmäistä virtsaa

Säilytys: näyte toimitettava laboratorioon 2 tunnin sisällä näytteenotosta virtsanäytteen esikäsittelyä varten.

Jos näyte saadaan toimitettua arkipäivinä klo 14.45 mennessä ja KAHDEN tunnin sisällä näytteenotosta Lshp patologian laboratorioon, patologian laboratorio käsittelee näytteen.

(mukaeltu)

Lääkäri on pyytänyt teiltä virtsatutkimuksen, jolla selvitetään virtsassa olevia soluja.

Näytteenotto- ohje:

Ei aamun ensimmäistä virtsaa!

Virtsaamatta tulee olla 2-4 tuntia, juominen on suositeltavaa. Samana päivänä voitte antaa useamman näytteen, jos näytteenottojen välissä on vähintään kaksi tuntia aikaa ja olette juoneet sekä liikkuneet välillä.

Voitte mennä suoraan laboratorioon näytteenottoa varten, jossa saatte hoitajalta näytepurkin ja ohjeet näytettä varten.

Voitte ottaa näytteen myös kotona, jos pystytte toimittamaan näytteen laboratorioon kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Näytteen saaminen, säilyttäminen ja kuljettaminen oikein on tärkeää solujen säilymisen ja tuloksen luotettavuuden kannalta. Tarvittavat välineet saatte hoitoyksiköstänne

Käsien pesun jälkeen tehkää huolellinen alapesu ilman saippuaa. Laskekaa virtsaa ensin pieni määrä WC-pyttyyn ja vasta sitten näytepurkkiin. Näytettä tulisi purkissa olla vähintään 20 ml. Näyte säilyy huoneenlämpöisenä 2 tuntia, jonka kuluessa se tulee toimittaa laboratorioon. Huolehdi, että purkki on tiiviisti suljettu kuljetuksen ajan.

Suosittelavaa olisi näytteen säilymisen vuoksi, että pystyisitte antamaan näytteenne LKS:n näytteenotossa.

Nimi ja henkilötunnus ovat tärkeitä näytteen tunnistamiseksi.

TÄYTTÄKÄÄ SEURAAVAT TIEDOT:

Nimi: _____

Sosiaaliturvatunnus: _____

Virtsanäyte saatu _____ / _____ 20____ klo _____

Palauttakaa tämä lomake täytettynä näytepurkin mukana.

(mukaeltu LKS:n patologian laboratorion Sytoblock- ja Sytotek- työohjeesta)

Menetelmä: Alkoholifiksoidusta näytteestä tehdään aina kun mahdollista Sytoblock- valmiste (näytteessä näkyviä hippuja). Jäljelle jääneestä materiaalista tehdään Sytotek- valmiste.

Alkoholifiksoitu näyte lingotaan sytosentrifuugissa suoraan näytekammioista esikäsitellyn näytelasin rajatulle alueelle. Näyte kuivataan huoneenlämmössä seuraavaan aamuun (kiireelliset lämpökaapissa 30-60 min.), värjätään Papanicolaoun-värjäyksellä ja päällystetään peitinkalvoautomaatilla.

Sytoblokin valmistus:

Alkoholifiksoitu solunäyte suodatetaan tiiviin harsopussin läpi. Harso taitellaan, laitetaan kuduskuljetuskasettiin ja käsitellään kuten formaliinifiksoitu kudoksenäyte. Jäljelle jääneestä materiaalista tehdään sytotekvalmiste.

Sytotek- näytteen valmistus:

Näytekyvetiin (12 ml, 6 ml) kiinnitetään kyvetinkiinnikkeen avulla numeroitu SuperFrost Ultra Plus-lasi, jonka päällä on aukollinen muovinen tiiviste.

Pipetoi tai kaada kyvetiin sopiva määrä näytettä, näytteen paksuuden mukaan. Täytä kyveti merkkiin asti 50% alkoholilla. Sulje korkit, sekoita ja laita kyvetit sentrifuugiin.

Sentrifugoi 7 min / 2000 rpm.

Sentrifugoinnin jälkeen kaada neste pois ja laita kyveti alassuun valumaan sellun päälle (anna valua hetken rauhassa).

Aukaise kyvetinkiinnike ja irrota kyveti varovasti pois tiivisteestä ja lasin päältä. Aseta lasi kuivumaan tiivisteeseen kanssa tasaiselle alustalle. Irrota tiiviste, kun näyte on kuivahtanut.

Lasit värjätään seuraavana aamuna Papanicolaoun konevärjäyksellä ohjelmalla B (ei BAL- ja immunonäytteitä) ja peitellään peitinkalvoautomaatilla.

Käytetyt välineet laitetaan niille varattuun astiaan vetokaapissa.

KONEVÄRJÄYS TISSUE-TEK® DRS™ 2000

mukaeltu LKS:n papa-värijäysohjeestaB-OHJELMA

sytosentrifuginäytteet

| | | |
|------------------|----------|-----------------------------|
| 1. 96% | 1 min | |
| 2. 80% | 0.30 min | |
| 3. 50% | 0.30 min | |
| 4. Aqua | 0.30 min | |
| 5. Cole | 3 min | |
| 6. Aqua | 5 min | |
| 7. 0.05% HCl | pass | |
| 8. 0.5% Na-aset. | 2 min | |
| 9. Aqua | 0,30 min | |
| 10. 50% | 1,30 min | |
| 11. 70% | 1.30 min | |
| 12. 96% | 1.30 min | |
| 13. OG 6 | 2 min | |
| 14. 96% | 1.30 min | |
| 15. 96% | 1.30 min | |
| 16. EA 50 | 2 min | |
| 17. 96% | 1.30 min | |
| 18. 96% | 1.30 min | |
| 19. 96% | 1 min | |
| 20. Abs | 1 min | |
| 21. Abs | 1 min | |
| 22. Xyl | 2 min | |
| 23. Xyl | 2 min | värijäyksen kesto n.40 min. |

TAULUKKO 1. Vertailussa käytetyt fiksatiivit

| Fiksatiivi | Aineosat |
|----------------------|--|
| A | 50 % alkoholi |
| B | 50 % alkoholi (1:1) |
| C BD Vacutainer® | no additive |
| D BD Urinetube Plus® | 94% sodium propionate 5,6 % ethylparaben 0,4 % chlorhexidine |
| E Urofix® | etanoli 2-propanoli |

kriteerit:

- näytteet LKS/ UROPKL näytteistä
- näytettä oltava vähintään 80- 100 ml
- tuore virtsanäyte

näytelasien valmistaminen:

- ensin valmistetaan normaali tutkimusnäyte, mikäli materiaalia jää, tehdään tutkimusnäytteet
- näytteitä tarvitaan vähintään 10 kpl (voivat olla esim 3 x saman potilaankin)
- yhdestä näytteestä tehdään sytosentrifugilaseja 5 eri fiksointimenetelmällä (A,B,C,D,E)

A; normaali käytössä oleva menetelmä

- näytettä laitetaan 10 ml 4 eri sentrifugiputkeen sentrifugoidaan 1500 rpm ja sakka fiksoidaan 50% alkoholiin
- 1 vuorokauden aikana

B; alkoholifiksaatio 1:1 (15 ml näytettä+ 15 ml 50% alkoholia)

- näytettä laitetaan 2 eri sentrifugiputkeen
- 3 vrk:n kuluttua ja 5 vrk:n kuluttua
- 6 ml sytosentrifugikyvissä (ohje) ja sakka fiksoidaan 50% alkoholilla

C; vakuumputki, säilöntäaineeton

- näyte imetään 2 putkeen (BD Vacutainer®) valmisteet tehdään, 6 ml sytosentrifugikyvissä (ohje)
- 3 vrk:n kuluttua ja 5 vrk:n kuluttua

D; vakuumputki, säilöntäaineella

- näyte imetään 2 putkeen ((BD-Vacutainer®Plus UA Preservative Tube)
- valmisteet tehdään 6 ml sytosentrifugikyvissä (ohje)
- 3 vrk:n kuluttua ja 5 vrk:n kuluttua

E; Urofix-fiksatiivi

- 20 ml virtsanäytettä lisätään Urofix- fiksatiiviin
- valmisteet tehdään, 6 ml sytosentrifugikyvissä(ohje)
- 3 vrk:n kuluttua ja 5 vrk:n kuluttua

VALMISTEET ANNETAAN KUIVUA JA NE VÄRJÄTÄÄN LABORATORION VÄRJÄYS-OHJELMAN MUKAISESTI PAPANICOLAOUN MENETELMÄLLÄ

mukaeltu artikkeleista Kouri, Vuotari, Pohjavaara & Laippala, 2002; Aspevall, Hallander, Gant & Kouri, 2001

Valomikroskopia:

Arvioidaan erikseen seuraavien soluryhmien säilyvyys:

- punasolut
- liuskatumaiset leukosyytit
- levyepiteelisolut
- välimuotoiset epiteelisolut
- muut

Arvoasteikko

1. hyvin säilyneet
2. kohtalaisesti säilyneet
3. melkein hajonneet
4. kaikki hajonneet

NÄYTEKOHTAINEN SÄILYVYYSARVIO

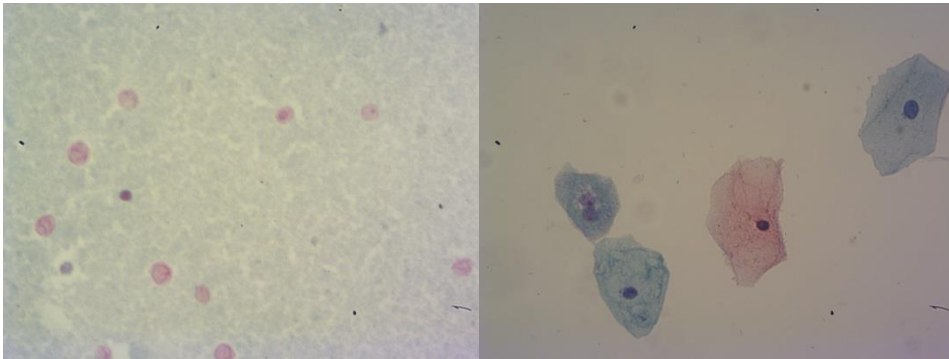
LIITE 9

NÄYTE:

| FIKSAT IIMI | NÄYTTEEN VALMISTAMINEN | MIKROSKOPOINTIJA SOLUJEN SÄILYVYYDEN ARVIOINTI | | | | |
|-------------|----------------------------------|--|---------------------|--------------------|----------------------------|------|
| | | punasolut | liuska- tumaiset | levy- epiteelit | välimuotoiset epiteelit | muut |
| A | 1 vrk aikana | | | | | |
| B | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| C | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| D | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| E | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |

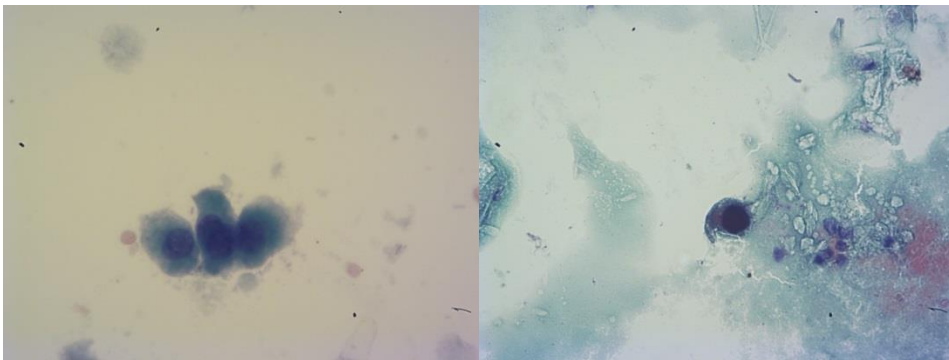
NÄYTE:

| FIKSAT IIMI | NÄYTTEEN VALMISTAMINEN | MIKROSKOPOINTIJA SOLUJEN SÄILYVYYDEN ARVIOINTI | | | | |
|-------------|----------------------------------|--|---------------------|--------------------|----------------------------|------|
| | | punasolut | liuska- tumaiset | levy- epiteelit | välimuotoiset epiteelit | muut |
| A | 1 vrk aikana | | | | | |
| B | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| C | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| D | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |
| E | 3 vrk kuluttua 5 vrk kuluttua | | | | | |



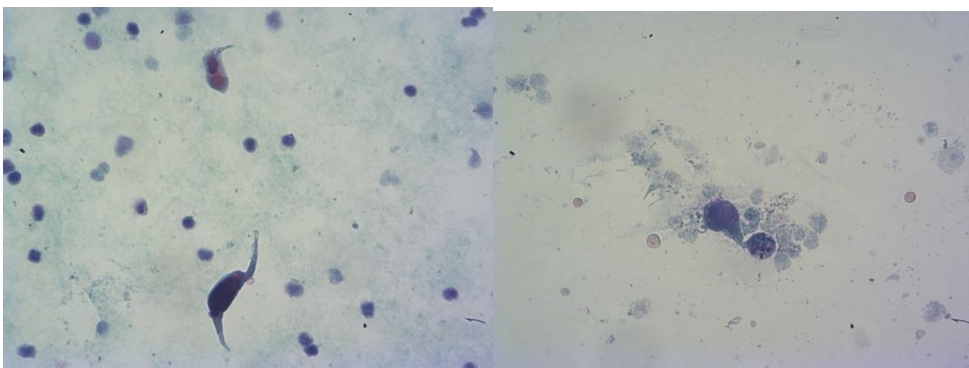
Punasolut, B-fiksatiivi, 3 vrk, 40x

Levyepiteelit, E-fiksatiivi, 3 vrk, 40x



*UroteelisoluT (hyvin säilyneet solut)
B-fiksatiivi, 3 vrk, 40x*

*Uroteelisolut (hyvin säilyneet solut)
B- fiksatiivi, 3 vrk, 20x*



*Uroteelisolut (hyvin säilyneet)
A-fiksatiivi, 3 vrk, 20x*

*Uroteelisolut (huonosti säilyneet)
D- fiksatiivi, 3 vrk, 20x*