



**HemoCue[®] WBC DIFF –VIERITESTILAITTEEN
SOVELTUVUUDEN TESTAUS HEVOSNÄYTTEILLE**

Meri Laine

Miia Penttilä

Opinnäytetyö
Lokakuu 2014
Bioanalytikkokoulutus

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
11BIO

LAINEN, MERI & PENTTILÄ, MIIA:
HemoCue[®] WBC DIFF –vieritestilaitteen soveltuvuuden testaus hevosnäytteille

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Lokakuu 2014

Leukosyyteillä eli valkosoluilla on suuri merkitys ihmisten ja eläinten immuunipuolustuksessa sekä erilaisissa sairauksissa. Leukosyytien määrää ja niiden erittelyä voidaan käyttää hyväksi erilaisten sairauksien diagnostiikassa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, toimiiko HemoCue[®] WBC DIFF –vierestilaitteella hevosten näytteillä ja voitaisiinko sitä käyttää hevosten leukosyytien kokonaismäärän laskentaan ja erittelyyn. Tarkoituksena on lisäksi perehtyä hevosten leukosyyteihin ja selvittää laitteen mahdollisesti antamien virheliputusten syitä. Työn tavoitteena on perehtyä HemoCue[®] WBC DIFF –vierestilaitteen toimintaperiaatteeseen ja tuottaa lisätietoa HemoCue Oy:lle siitä, kuinka laitetta voitaisiin mahdollisesti hyödyntää myös eläinnäytteiden tutkimiseen.

Opinnäytetyö toteutettiin kokeellisena, vertailevana tutkimuksena. Tutkimusaineistona oli 12 hevosen verinäytettä, jotka analysoitiin HemoCue[®] WBC DIFF -vierestilaitteella. Hevosten verinäytteistä tehtiin lisäksi sivelyvalmisteita, joista tehtiin manuaalinen leukosyytien erittelylaskenta mikroskoopissa. Näitä tuloksia verrattiin HemoCue[®] WBC DIFF –laitteella saatuihin erittelytuloksiin. Neljästä näytteestä saatiin lisäksi Eläinlaboratorio Vetlabissa määritetty kokonaisleukosyyttitulokset, jonka avulla voitiin vertailla neljän näytteen kokonaisleukosyyttituloksia sekä eri leukosyyttityyppien absoluuttisia lukumääriä erittelylaskennassa.

Analysoitavien näytteiden pienen näytemäärän vuoksi johtopäätöksiä laitteen soveltuvuudesta hevosnäytteille ei voida tehdä, mutta laitteen moitteeton toiminta näytteiden analysoinnissa antaa lupaavia viitteitä siitä, että laite saattaisi soveltua myös hevosten leukosyytien kokonaismäärän laskemiseen ja erittelylaskentaan. Tämä vaatii kuitenkin vielä lisää tutkimuksia laajemmalla aineistolla.

Jatkotutkimusaiheiksi ehdotammekin tutkimuksen toistamista suuremmalla näytemäärällä ja siten, että kaikista näytteistä olisi saatavilla myös eläinlaboratoriossa määritetty kokonaisleukosyyttimäärä ja erittelytulos. Toiseksi jatkotutkimusaiheeksi ehdotamme laitteen soveltuvuuden testaamista myös muille eläimille, kuten koirille ja kissoille.

Asiasanat: HemoCue[®] WBC DIFF, leukosyytti, hevonen, vieritesti, sivelyvalmiste

ABSTRACT

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

LAINEN, MERI & PENTTILÄ, MIIA:
The Suitability of HemoCue® WBC DIFF Point-of-Care Analyzer for Equine Blood Samples

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 3 pages
October 2014

The objective of this study was to determine the operational principle of the HemoCue® WBC DIFF point-of-care analyzer and its suitability for equine blood samples. The purpose of this study was to test whether the HemoCue® WBC DIFF analyzer functions when used with equine blood samples and whether it can also determine a white blood cell count and five-part differential count.

This study was experimental and comparative in nature. The sample of the study consisted of 12 equine blood samples which were analyzed using the HemoCue® WBC DIFF analyzer. The blood samples were also used to make blood smears for a manual white blood cell differential. Four out of the 12 blood samples were also analyzed in a veterinary laboratory (Eläinlaboratorio Vetlab) to determine the white blood cell count. The results obtained with these various methods were compared.

The sample of this study was too limited to come to any one conclusion. The findings imply that the HemoCue® WBC DIFF point-of-care analyzer could be used for testing equine blood samples. Further studies with a larger sample are needed to prove whether the results are reliable.

Key words: HemoCue® WBC DIFF, leukocytes, equine, point-of-care testing, blood smear

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	6
3	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	7
4	VIERITUTKIMUKSET	9
5	HEVOSTEN LEUKOSYYTIT	11
	5.1 Neutrofiilit	12
	5.2 Lymfosyytit.....	14
	5.3 Monosyytit	16
	5.4 Eosinofiilit	17
	5.5 Basofiilit.....	18
6	VEREN SIVELYVALMISTE JA MAY-GRÜNWARD-GIEMSA-VÄRJÄYS.....	19
	6.1 Veren sivelyvalmiste ja sen tarkastelu	19
	6.2 May- Grünwald- Giemsa- värjäys	21
7	HemoCue® WBC DIFF -VIERITESTILAITE.....	23
	7.1 Kyvetit	24
	7.2 Toimintaperiaate	24
	7.3 Käyttö ja huolto	25
8	OPINNÄYTETYÖPROSESSI JA TYÖN TOTEUTUS	27
	8.1 Opinnäytetyön suunnittelu	27
	8.2 Opinnäytetyön toteutus	28
9	TULOKSET	31
	9.1 Kokonaisleukosyyttimäärä.....	31
	9.2 Erittelylaskenta	32
10	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	35
	10.1 Tulosten tarkastelu	35
	10.2 Luotettavuus ja eettisyys.....	35
	10.3 Pohdinta	37
	10.4 Johtopäätökset.....	39
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET	43
	Liite 1. HemoCue® WBC DIFF- laitteen ja manuaalisen leukosyyttien erittelylaskennan tulokset	44
	Liite 2. Manuaalisen leukosyyttien erittelylaskennan tulokset.....	47

1 JOHDANTO

Leukosyyteillä eli valkosoluilla on suuri merkitys ihmisten ja eläinten immuunipuolustuksessa sekä erilaisissa sairauksissa. Leukosyyttien määrää sekä niiden erittelyä voidaan käyttää hyväksi erilaisten sairauksien diagnostiikassa, esimerkiksi leukemioissa sekä erottamaan bakteeri- ja virusperäisiä infektiota toisistaan. Tätä tarkoitusta varten HemoCue Oy on kehittänyt vieritestilaitteen, joka laskee leukosyyttien kokonaismäärän ja suorittaa leukosyyttien erittelyn 5 minuutissa pienestä näytemäärästä (HemoCue Oy 2011b).

Opinnäytetyön aiheena on HemoCue® WBC DIFF –vieritestilaitteen soveltuvuuden testaaminen hevosten leukosyytilaskentaan ja –erittelyyn sekä laitteen toimintaperiaatteen perehtyminen. HemoCue Oy on kiinnostunut selvittämään, voisiko laitetta käyttää myös joidenkin eläinlajien leukosyyttien määrittämiseen. HemoCue Oy on vierestilaitteita terveydenhuollon tarpeisiin valmistava yritys, joka toimii maailmanlaajuisesti. Yritys kehittää, valmistaa ja markkinoi erilaisia nopeita ja helppokäyttöisiä vierimittauksina tehtäviä diagnostisia testejä. (HemoCue Oy 2011a.)

Työssä perehdytään hevosten leukosyytteihin ja siihen, voisiko kyseistä laitetta käyttää myös niiden leukosyyttien vieritutkimukseen. Raporttiosuudessa käsitellään hevosten leukosyyttejä ja niiden ominaisuuksia, vieritutkimuksia yleisesti, HemoCue® WBC DIFF- vieritestilaitetta ja sen toimintaperiaatetta sekä veren sivelyvalmisteita.

Aiheen valitsimme sen mielenkiintoisuuden vuoksi. Pääsemme opinnäytetyön tekemisen kautta tutustumaan tarkemmin eläinten laboriodiagnostiikkaan, sillä bioanalytiikan koulutuksessa keskitytään käsittelemään erilaisia tutkimuksia vain humaanipuolen näkökulmasta. Samalla syvennämme tietämystämme leukosyyteistä. Koska kyseinen laite on melko uusi ja sen käyttämä teknologia on uudenlaista ja poikkeuksellista vieritestilaitteelle, on myös siihen tutustuminen mielenkiintoista.

Alun perin tarkoituksena oli selvittää HemoCue® WBC DIFF –laitteen soveltuvuutta useampien eläinlajien, hevosten, koirien ja kissojen, leukosyyttien laskentaan ja erittelyyn, mutta verinäytteiden saanti osoittautui yllättävän vaikeaksi, joten päädyimme testaamaan laitetta vain hevosten verinäytteillä, joita saimme helpommin tutkittavaksi.

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Työn tarkoituksena on selvittää, toimiiko HemoCue[®] WBC DIFF –laite hevosten näytteillä ja voitaisiinko sitä käyttää hevosten leukosyyttien kokonaismäärän laskentaan ja erittelyyn. Tarkoituksena on lisäksi perehtyä hevosten leukosyytteihin ja selvittää laitteen mahdollisesti antamien virheliputusten syitä.

Opinnäytetyön tavoitteena on perehtyä HemoCue[®] WBC DIFF –vieritestilaitteen toimintaperiaatteeseen ja tuottaa lisätietoa HemoCue Oy:lle siitä, kuinka laitetta voitaisiin mahdollisesti hyödyntää myös eläinnäytteiden tutkimiseen. Opinnäytetyön valmistumisen myötä HemoCue Oy voi halutessaan jatkaa laitteen soveltuvuuden testaamista hevosille laajemmassa mittakaavassa ja/tai testata laitteen soveltuvuutta myös muille eläinlajeille, esimerkiksi koirille tai kissoille. Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää myös laitteen kehittämisessä ja markkinoinnissa.

3 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyö on menetelmältään kvantitatiivinen eli määrällinen, kokeellinen ja vertailtava tutkimus. Kvantitatiiviselle tutkimukselle on ominaista se, että mitattavia asioita on kyettävä analysoimaan ja esittämään matemaattisin keinoin (Tuomi 2007, 95). Samalla tutkimus kertoo mitattavien muuttujien välisistä suhteista ja niiden eroista. Tutkimuksen avulla voidaan myös vastata kysymyksiin kuinka paljon, kuinka usein ja kuinka moni. (Vilkkä 2007, 13–14.)

Tässä opinnäytetyössä aineiston keruu ja analysointi kuuluvat kvantitatiiviseen tutkimukseen. Mitattavana suureena toimivat leukosyyttimäärät kolmella eri menetelmällä mitattuna, joita ovat HemoCue[®] WBC DIFF –laitteen tekemä leukosyyttien erittely, manuaalisesti suoritettu erittelylaskenta mikroskoopissa sekä Eläinlaboratorio Vetlabissa analysoitu kokonaisleukosyytti (B-Leuk) –tulos.

Kokeellisessa tutkimuksessa tutkitaan kahden tai useamman muuttujan suhdetta toisiinsa. Mahdollisia häiriötekijöitä pyritään säätelemään tai eliminoimaan kokonaan. Lisäksi tutkittavaa muuttujaa analysoidaan olosuhteita muunnellen ja erilaisin koejärjestelyin. (Tuomi 2007, 102; Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134.)

Työssämme tätä toteutetaan siten, että vertailemme hevosten verinäytteistä saatuja tuloksia, jotka on saatu eri tutkimusmenetelmillä. Kiinnittämällä erityistä huomiota preanalyttisiin tekijöihin (esim. näytteiden esikäsittely, kuljetus ja säilytys) voidaan vähentää erilaisia häiriötekijöitä. Näytteiden ottotilanteeseen emme pysty vaikuttamaan, sillä emme ota näytteitä itse, vaan Tampereen Hevosklinikan henkilökunta huolehtii näytteiden ottamisesta.

Tutkimukseen tarvittava aineisto voidaan kerätä monella eri tavalla. Perusjoukko on tutkimuksen kohderyhmä, josta halutaan tutkimuksessa tehdä erilaisia päätelmiä ja saada tietoa. Otos on määritelty osa perusjoukosta ja sen tulisi edustaa perusjoukon ominaisuuksia ja ilmenemistapoja mahdollisimman hyvin. Otos voidaan valita erilaisilla menetelmillä, joita ovat esimerkiksi satunnaisotanta, systemaattinen otanta sekä ryväotanta. Tutkimukseen tarvittavan otoksen koko vaihtelee tutkimuksen ja analyysitapojen mukaan. (Vilkkä 2007, 51–57.) Otannon suorittaminen vaikuttaa tutkimuksen tulosten

edustavuuteen ja yleistettävyyteen (Tuomi 2007, 141). Tässä opinnäytetyössä tutkimusaineisto on kuitenkin niin pieni, että varsinaisesta otoksesta ei voida puhua. Sen sijaan tutkimusaineistoon viitattaessa voidaan puhua näytteestä.

Tutkimusaineistomme ovat hevosista saadut verinäytteet, jotka analysoidaan HemoCue[®] WBC DIFF -laitteella. Näytteet kerätään Tampereen Hevosklinikan avustuksella klinikalle saapuvista hevosista omistajien suostumuksella. Näytteitä ei valita mistään joukosta, vaan otamme tutkittavaksi kaikki saadut näytteet. Tutkittavana on 12 verinäytettä. Vertailemme HemoCue[®] WBC DIFF -laitteella saatuja tuloksia Eläinlaboratorio Vetlabissa tehtyihin kokonaisleukosyyttimääritystuloksiin (B-Leuk). Lisäksi teemme näytteistä sivelyvalmisteita mikroskoopin avulla tehtävää erittelylaskentaa varten ja vertailemme siinä saatuja leukosyyttien erittelylaskennan tuloksia HemoCue[®] WBC DIFF -laitteen erittelylaskentatuloksiin.

4 VIERITUTKIMUKSET

Vieritutkimukset käsittävät joukon sellaisia laboratorioalan tutkimuksia, joita käytetään sairauksien diagnostiikkaan tai sairauden hoidon seurantaan ja joita pääasiassa tehdään normaalin laboratorioympäristön ulkopuolella esimerkiksi potilaan vieressä tai odottaessa (Vieritetaus terveydenhuollossa 2009, 267). Vieritutkimuksia voidaan tehdä esimerkiksi osastoilla, vastaanotoilla, päivystyksessä, neuvoloissa tai kotisairaanhoidossa (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2009, 100). Eläinlääketieteessä vieritutkimusten tekopaikat ovat pitkälti samoja kuin ihmislääketieteessä: yksityiset eläinklinikat, päivystävät eläinlääkäriasemat, erikoisalojen klinikat, suurten eläinsairaaloiden tehohoitoyksiköt, syrjäisten alueiden pienet eläinlääkäriasemat sekä kotitaloudet (Flatland & Freeman 2013, 12). Vieritutkimuksina voidaan määrittää kymmeniä erilaisia analyyttejä useista eri näytemuodoista, kuten kokoveri, virtsa tai uloste (Vieritetaus terveydenhuollossa 2009, 284).

Vieritutkimuksien tulokset ovat suuressa roolissa esimerkiksi hoitopäätösten ja muiden potilaan hoitoon vaikuttavien tekijöiden osalta (Vieritetaus terveydenhuollossa 2009, 275). Oikein käytettynä ne esimerkiksi lyhentävät päätöksenteossa tapahtuvaa viivettä ja siten parantavat terveydenhuollon toimivuutta (Tuokko ym. 2009, 100). Vieritetauksella tulee kuitenkin aina olla selkeästi määritelty lääketieteellinen peruste, tutkimuksella on saatava luotettavaa tietoa potilaan tilasta ja tulosta on pystyttävä hyödyntämään potilaan hoidossa (Vieritetaus terveydenhuollossa 2009, 301).

Laadunvarmistus on suuri ja olennainen osa vieritutkimuksia. Laadunvarmistus kattaa kaikki erilaiset toimenpiteet, joilla varmistetaan että ennalta määritelty, tarvittava ja riittävä laatutaso saavutetaan. Tällaisia toimenpiteitä ovat muun muassa testien ja tulosten kontrollointi sekä ulkoinen laadunvarmistus. (Vieritetaus terveydenhuollossa 2009, 286–297.) Myös eläinlääketieteessä säännöllisesti suoritettu ulkoinen laadunarviointi on suositeltavaa, jotta laitteen ja reagenssien toimivuus sekä tulostason luotettavuus voidaan varmistaa (Flatland & Vap 2013, 9).

Laadunvarmistuksen laiminlyönti voi johtaa esimerkiksi väärään hoitoon, liialliseen viiveeseen päätöksenteossa ja kustannusten kasvuun (Price ym. 2004, 137). Vieritutkimusten laatuun voidaan vaikuttaa merkittävästi, kun niitä tekevät henkilöt on perehdy-

tetty ja koulutettu huolellisesti tutkimusten tekoon. Myös ammattitaidon ylläpitäminen on erittäin tärkeää laadun ylläpitämiseksi. (Tuokko ym. 2009, 102.)

Vieritestien etuja verrattuna tavalliseen laboratorioanalyysiin ovat tuloksen nopeampi valmistumisaika, potilaalle helpompi näytteenotto, pienempi näytemäärä sekä näytteen kuljettamisen ja käsittelyn aiheuttamien virheiden väheneminen. (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 282.) Eläinlääketieteessä suurimpia etuja ovat testien saatavuus eläinlääkäriaseman tai eläinlaboratorion normaalien aukioloaikojen ulkopuolella sekä laboratorioanalyysien mahdollistaminen sellaisilla alueilla, joilla matkaa lähimpään eläinlaboratorioon on paljon (Flatland & Freeman 2013, 10).

Haittoja tai riskejä puolestaan voivat aiheuttaa esimerkiksi näytteenotossa tapahtuvat virheet, testin soveltumattomuus käyttötarkoitukseen, tulosten väärä tulkinta sekä tulosten dokumentoimatta jättäminen. (Vieritestaus terveydenhuollossa 2009, 282.) Haitat ovat pitkälti samoja myös eläinlääketieteen puolella. Lisäksi väärin tulosten havaitsematta jääminen, tulosten vertailun vaikeus keskuslaboratoriossa suoritettuun analyysiin ja mahdollisesti korkeammat kustannukset voidaan lukea haitoiksi. (Flatland & Freeman 2013, 10.)

5 HEVOSTEN LEUKOSYYTIT

Leukosyytit voidaan jakaa karkeasti kahteen ryhmään: fagosyytteihin ja immunosyytteihin. Fagosyytteihin kuuluvat granulositytit ja monosyytit, immunosyytteihin kuuluvat lymfosyytit, niiden esiasteet sekä plasmasolut. Granulosyytteihin kuuluu kolmen tyyppiä soluja: neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit. (Hoffbrand & Moss 2011, 109–110.)

Tässä opinnäytetyössä keskitytään tarkastelemaan vain hevosten veren kuvassa normaalisti esiintyviä leukosyyttejä sekä niihin vaikuttavia tekijöitä.

Hevosten verisolujen vaihteluun vaikuttavat useat tekijät, kuten eläimen ikä, rotu, sukupuoli, fyysinen aktiivisuus, stressi tai tiineys. Yleisesti ottaen hevosten, ponien, aasien sekä muulien verisolut ovat hyvin samankaltaisia. Niille on kuitenkin määritetty omat viitearvorajat. Viitearvoja määritettäessä on pääsääntöisesti otettu huomioon eri rotujen tai sukupuolen aiheuttama vaihtelu, jolloin arvot sijoittuvat laajemmalle vaihteluvälille. (Järvinen 1998, 200; Dewitt & Grondin 2010, 821–822; Welles 2010, 314–315.)

Hevoset jaetaan rakenteensa perusteella lämminverisiin tai kylmäverisiin. Lämminverisiin rotuihin kuuluvat esimerkiksi englannintäysiverinen tai arabianhevonen. Lämminveriset hevoset ovat kevytrakenteisempia, vilkkaampia ja ketterämpiä. (Suomen Hippos ry 2004, 2; Dewitt & Grondin 2010, 825.) Suurin osa hevosista kuuluu lämminveristen ryhmään, myös esimerkiksi erilaiset roturisteytykset, vaikka niiden jalostuksessa olisikin käytetty myös kylmäveristä hevosta. Kylmäveriset hevoset ovat rakenteeltaan raskastekoisia ja yleensä erilaisia käyttötarkoitukseltaan työhevosia, kuten esimerkiksi suomenhevonen. Myös ponit lasketaan kylmäverisiksi. (Dewitt & Grondin 2010, 825.) Lämminveriset voidaan vielä jakaa alaryhmiksi täysi- ja puoliverisiin hevosiin. (Suomen Hippos ry 2004, 2.)

Lämminverisille sekä kylmäverisille hevosille on käytössä omat viitearvot. Lämminverisillä hevosilla arvot voivat olla hieman korkeampia kuin kylmäverisillä. (Dewitt & Grondin 2010, 825; Vetlab Oy 2014, 25–27.) Lämminveristen hevosten kokonaisleukosyyttimäärän viitearvot ovat $6,4\text{--}10,8 \times 10^9/l$ ja kylmäveristen $4,8\text{--}9,3 \times 10^9/l$. Leukosyyttien erittelylaskennassa viitearvot ovat samat sekä lämmin- että kylmäverisillä hevosilla. (Vetlab Oy 2014, 25–27.) Leukosyyttien erittelylaskennan viitearvot on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Leukosyyttien erittelylaskennan viitearvot hevosilla (Vetlab Oy 2014, 25–27)

Leukosyyttityyppi	Absoluuttinen lukumäärä, $\times 10^9/l$	Solutyyppin prosenttiosuus
Sauvatumaiset neutrofiilit	0-0,1	0–1
Liuskatumaiset neutrofiilit	3,2–6,0	44–70
Lymfosyytit	1,9–4,5	25–49
Monosyytit	0,3–0,6	2–6
Eosinofiilit	0,1–0,5	1–4
Basofiilit	0–0,1	0–1

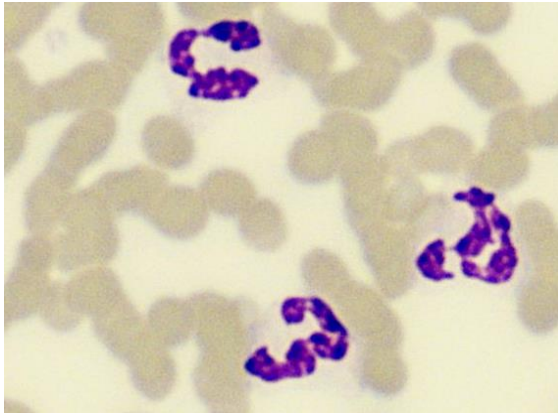
Nuorilla hevosilla tavataan yleensä vanhoja hevosia korkeampia leukosyyttiarvoja. Varsojen verenkuvasta poikkeaa erityisesti leukosyyttien osalta aikuisten hevosten verenkuvasta. Neutrofiilien määrä suhteessa lymfosyyttien määrään on 2,5- kertainen ja niiden absoluuttinen määrä on suurempi kuin aikuisilla hevosilla. Eosinofiilejä ei ole vastasyntyneellä varsalla lainkaan. Kun varsat ovat 3-4 kuukauden ikäisiä, niiden leukosyyttiarvot ovat kehittyneet aikuisten hevosten kaltaisiksi. (Dewitt & Grondin 2010, 821–822; Welles 2010, 314–315.)

5.1 Neutrofiilit

Hevosten neutrofiilien (kuva 1) tumat, kuten ihmistenkin, ovat liuskottuneita ja niiden kromatiini on pakkautunut tiiviisti. Tumalohkojen välisiä säikeitä ei yleensä nähdä. Neutrofiilien hypersegmentaatiota ei terveillä hevosilla ole. Hypersegmentaatioksi katsotaan yli viiteen osaan liuskoittunut tuma. Verinäytteiden liian pitkä säilytys voi kuitenkin aiheuttaa neutrofiileissä artefaktana hypersegmentaatiota. (Dewitt & Grondin 2010, 823.)

Neutrofiilien sytoplasma on väritön ja siinä olevat granulat värjäytyvät Dewittin ja Grondinin (2010, 823) mukaan vain joillakin värjäysmenetelmillä. Hevosilla ei yleensä nähdä neutrofiilien epäkypsiä muotoja, kuten sauvatumaisia neutrofiilejä, sillä niillä ei tapahdu niin sanottua kuvaajan vasemmalle siirtymistä tulehdustilojenkaan yhteydessä.

Ihmisillä ja muilla nisäkkäillä vasemmalle siirtymistä puolestaan tapahtuu esimerkiksi voimakkaiden tulehdusten yhteydessä, jolloin neutrofiilien varhaiset muodot (promyelosyytti, myelosyytti, metamyelosyytti ja sauvatumainen neutrofiili) ovat nähtävissä. Voimakkaiden tulehdusten yhteydessä neutrofiileissa voi esiintyä myös erilaisia toksisia muutoksia, kuten toksisia punertavia granuloita tai muutoksia tumassa ja/tai sytoplasmassa. (Järvinen 1998, 201; Dewitt & Grondin 2010, 823.)



KUVA 1. Kolme hevosen liuskatumaista neutrofiilia (Kuva: Miia Penttilä 2014)

Neutrofiilien tehtäviin kuuluu kehon puolustus mikro- organismeja tai tulehdusta vastaan sekä kudsvaurioissa. Ne kiertävät verenkierron mukana, josta ne kutsutaan tarvittaessa infektoituneeseen osaan kehoa, jossa ne voivat fagosytoida eli ottaa sisäänsä erilaisia vierasmateriaaleja, kuten mikrobeja. (Nabity & Ramaiah 2010, 263; Ramaiah, Walcheck, & Weiss 2010, 268; Weiser 2012a, 118.)

Neutrofiilien kyky fagosytoida bakteereja riippuu niiden solukalvon reseptoreista sekä granuloiden sisältämistä aineista. Granulat sisältävät erilaisia proteiineja, kuten proteaaseja sekä proteiineja joilla on antimikrobisia ominaisuuksia. Granuloiden sisältämät proteiinit on pakattu siten, että ne eivät aiheuta vauriota niitä kantaville soluille. (Nabity & Ramaiah 2010, 263.)

Neutrofiileissa on kolmen tyyppisiä granuloita: primääri-, sekundääri- sekä tertiäärigranuloita. Erilaisia granuloita tarvitaan, jotta niiden sisältämät aineet eivät reagoi keskenään, aiheuttaen ei-toivottuja reaktioita. Tällöin myös eri proteiinien käyttöönotto eri aikaan on mahdollista. Granulat muodostuvat neutrofiilin kypsymisen eri vaiheissa. Primäärigranulat muodostuvat jo promyelosyyttivaiheessa, sekundäärigranulat myelo-

syytti- sekä metamyelosyyttivaiheissa ja tertiäärigranulat vasta sauvatumaisessa ja kypsässä neutrofiilissä. (Nabity & Ramaiah 2010, 264–265.)

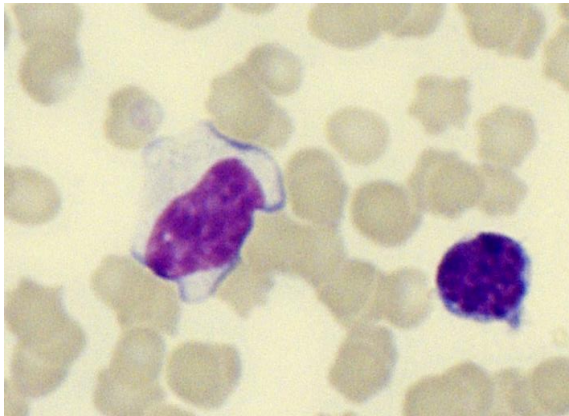
Leukosytoosi, eli leukosyyttien kokonaismäärän kohoaminen normaaliarvojen yläpuolelle voi johtua monesta eri syystä. Tavallisimmin kyseessä on neutrofiilien määrän lisääntyminen eli samalla myös neutrofilia, sillä terveillä hevosilla neutrofiilejä on veren leukosyyteistä eniten. Neutrofiilien määrä kasvaa esimerkiksi bakteeritulehduksessa, akuutissa verenvuodossa ja hemolyysissä, tulehduksellisissa sairauksissa tai stressin vaikutuksesta. Hevosilla stressi ja kiihtyminen voi helposti nostaa leukosyyttien totaalmäärää huomattavasti, joka täytyy ottaa huomioon erityisesti nuorten, käsittelyyn totumattomien eläinten kohdalla. (Järvinen 1998, 200–202; Kerr 2002, 53–54; Welles 2010, 317.)

Neutropenia eli neutrofiilien normaalia pienempi määrä tarkoittaa yleensä myös leukopeniaa neutrofiilien suuresta osuudesta johtuen. Neutropenia on merkittävä löydös ja sitä aiheuttavat tilat ovat usein akuutteja ja vakavia. Neutropenia voi aiheutua esimerkiksi lääkkeiden vaikutuksesta, virusperäisestä sairaudesta, voimakkaasti märkivästä tulehduksesta, neutrofiilien epätavallisen runsaasta tuhoutumisesta verenkierrossa tai liian vähäisestä tuotannosta luuytimessä. Neutropenia altistaa hevosen myös mahdolliselle sekundääriselle bakteeri-infektioille. (Järvinen 1998, 200–202; Kerr 2002, 53–54; Welles 2010, 314–315.)

5.2 Lymfosyytit

Lymfosyytit voidaan jakaa koon ja morfologian puolesta kahteen ryhmään: pieniin ja suuriin lymfosyytteihin. Pienet lymfosyytit ovat kooltaan granulosyyttisarjan soluja pienempiä. Niiden yleensä pyöreä tai soikea tuma värjäytyy hyvin tumman siniseksi ja kromatiini on karkeaa. Sytoplasmaa on hyvin niukasti ja sitä ei välttämättä ole näkyvisä lainkaan. Suurten lymfosyyttien koko voi vaihdella hieman, mutta pääsääntöisesti ne ovat granulosyyttien kanssa samaa kokoluokkaa ja selkeästi pieniä lymfosyyttejä kookkaampia. Suurten lymfosyyttien tuman kromatiini on hienojakoisempaa ja värjäytyy vaaleamman sinivioletiksi. Vaaleansiniseksi värjäytyvää sytoplasmaa näkyy solun ympärillä runsaasti ja sen ansiosta suuret lymfosyytit vaihtelevat muodoltaan paljon. (Dewitt & Grondin 2010, 824.) Reaktiivisia lymfosyyttejä ei yleensä tavata terveiden he-

vosten verenkuvassa, mutta sen sijaan suuret granulaiset lymfosyytit (LGL, large granular lymphocytes) ovat tavallisia. Suuret granulaiset lymfosyytit ovat suuria lymfosyyttejä, joiden sytoplasmassa esiintyy punertavia tai violettia vivahtavia granuloita. (Dewitt & Grondin 2010, 824; Weiser 2012a, 119–120.)



KUVA 2. Hevosien suuri ja pieni lymfosyytti (Kuva: Miia Penttilä 2014)

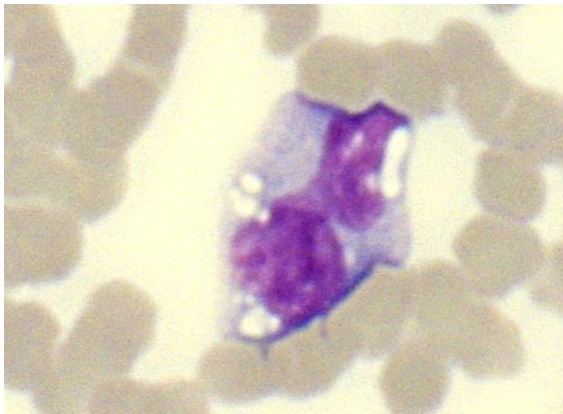
Lymfosyyttien tehtävänä on toimia elimistön humoraalisessa eli nestevälitteisessä immuunipuolustuksessa sekä soluvälitteisessä immunitetissa (Kerr 2002, 61). Lymfosyytit muun muassa tunnistavat elimistölle haitallisia antigeeneja ja tuottavat vasta-aineita erilaisia taudinaiheuttajia vastaan (Hoffbrand & Moss 2011, 127–129).

Lymfosyyttejä on eniten imusolmukkeissa, kateenkorvassa, pernassa ja luuytimessä. Vain pieni osa soluista kiertää verenkierron mukana. Eläinlajista riippuen näistä 50–75 % ovat T- lymfosyyttejä ja 20–35 % ovat B- lymfosyyttejä. Soluja ei voi erottaa toisistaan tarkasteltaessa niitä värjätystä veren sivelyvalmisteesta. (Harvey 2001, 65.)

Lymfosyttimäärän kasvua eli lymfocytoosia esiintyy muun muassa hetkellisesti rokotusten jälkeen immuunivasteen käynnistyessä, virus- ja bakteeritautien akuutin vaiheen jälkeen sekä erilaisissa immuunitauoissa (Järvinen 1998, 203–204). Hevosilla lymfocytoosia saattaa joskus esiintyä myös hyvin raskaan fyysisen suorituksen jälkeen (Welles 2010, 317). Lymfopenia puolestaan voi aiheutua muun muassa stressin seurauksena, virustulehdusten akuutissa vaiheessa ja erilaisissa tulehdustiloissa (Järvinen 1998, 203–204; Welles 2010, 318). Lisäksi vanhoilla hevosilla lymfosyyttien ja muidenkin leukosyyttien määrä laskee huomattavasti, joten lymfopenia voi johtua myös hevosen iäkkyydestä (Kerr 2002, 61).

5.3 Monosyytit

Hevosten monosyyttien tumat ovat kooltaan muita leukosyyttejä suurempia ja muodoltaan hyvin erinäköisiä: tuma voi olla lohkottunut kahteen tai kolmeenkin osaan, ovaalin tai hevosenkengän muotoinen. Sytoplasma on väriltään siniharmaa, jossa on pieniä atsu-rofiilisiä granuloita. Soluissa saattaa olla myös muutamia vakuoleja. (Dewitt & Grondin 2010, 824.) Monosyyttien morfologiassa ei juuri ole lajikohtaisia eroja (Weiser 2012a, 1209).



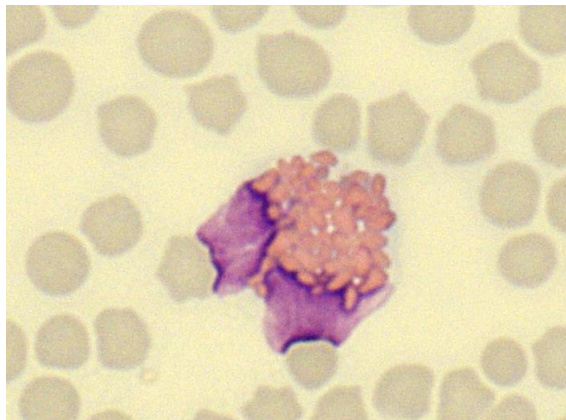
KUVA 3. Hevosen monosyytti. (Kuva: Miia Penttilä 2014)

Monosyytit kiertävät verenkierrossa joitakin kymmeniä tunteja, ennen kuin ne siirtyvät kudoksiin. Tämän jälkeen niitä kutsutaan makrofageiksi. Makrofagien tehtävät riippuvat paljon siitä kudostyypistä jossa ne sijaitsevat. Yleisesti ottaen makrofagit estävät erilaisen solun sisäisten mikro-organismien, kuten bakteerien, lisääntymisen. Makrofagit säätelevät myös immuunivasteita antigeenien esittelyn sekä sytokiinien erityksen avulla. Lisäksi makrofagit poistavat kuolleita soluja fagosytoimalla niitä sekä korjaavat vaurioitunutta kudosta. (Souza & Weiss 2010, 298–299, 301–303.)

Monosytoosia esiintyy hyvin monessa yhteydessä monosyyttien monipuolisten tehtävien vuoksi. Esimerkiksi akuutit ja krooniset tulehdukset, kudostuhoa aiheuttavat tilat, kasvaintaudit, verenvuodot ja hemolyysi sekä monosyyttiperäiset leukemiat aikaansaavat monosytoosia. Monosytopenialla ei puolestaan ole kliinistä merkitystä, sillä monosyyttien määrä veressä on pieni. (Järvinen 1998, 204; Kerr 2002, 59; Souza & Weiss 2010, 303; Weiser 2012b, 139.)

5.4 Eosinofiilit

Eosinofiilien ulkonäkö vaihtelee paljon eri lajien välillä. Hevosten eosinofiilit ovat helposti tunnistettavissa suurten granuloidensa ansiosta. Granulat värjäytyvät puna-oranssiksi ja niitä on usein niin paljon, että ne täyttävät sytoplasman sekä peittävät solun tumman pois näkyvistä. Sytoplasma on väriltään vaaleansininen ja tuma on lohkottunut. Solu vakuolisoituu jos siitä puuttuvat granulat mutta tällaiset eosinofiilit eivät kuulu terveen eläimen verenkuvaan. (Dewitt & Grondin 2010, 823–824; Weiser 2012a, 121.)



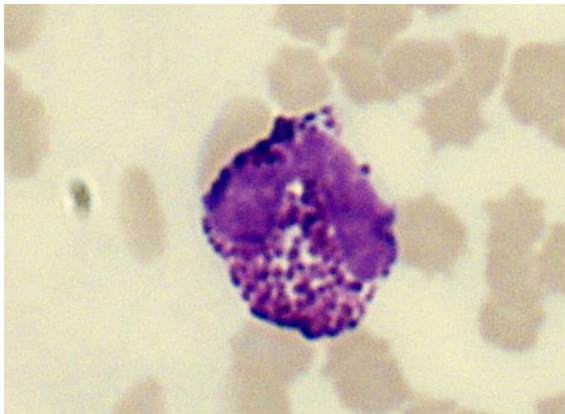
KUVA 4. Hevosen eosinofiili. (Kuva: Miia Penttilä 2014)

Eosinofiilejä löytyy eniten kudoksista, esimerkiksi ihosta, keuhkoista sekä suolistosta. Suurin osa eosinofiileistä kuitenkin löytyy luuytimeistä. Eosinofiilien tehtäviin kuuluu erityisesti suolistoparasiittien tuhoaminen sekä osallistuminen allergisen reaktion kulkuun. Eosinofiilit myös fagosytoivat. (Kerr 2002, 55; Meadows & Young 2010, 285–286.)

Eosinofiilien määrän kasvua eli eosinofiliaa voi esiintyä erilaisten loistartuntojen, allergisten reaktioiden, tietynlaisten syöpien ja kudostuhon yhteydessä. Myös kiima-aikana eosinofilia on mahdollista. Eosinofiilien vähentyneitä määriä eli eosinopeniaa tavataan stressin, pitkäaikaisen ja rankan liikuntasuorituksen tai -harjoituksen jälkeen, kortisoniterapian ja Cushingin taudin yhteydessä. Eosinopenia ei kuitenkaan ole eläinten kohdalla yleensä merkityksellistä (Järvinen 1998, 203; Kerr 2002, 55–56; Meadows & Young 2010, 288.)

5.5 Basofiilit

Basofiilit, kuten eosinofiilit, sisältävät selkeitä granuloita, joiden määrä, koko sekä muoto voi vaihdella suurestikin. Kooltaan basofiilit ovat kypsiä neutrofiilejä suurempia. Suuri määrä usein tummaksi värjäytyviä granuloita peittää alleen tuman. Tuma on vähemmän liuskoittunut verrattuna kypsiin neutrofiileihin. Sytoplasman väri vaihtelee kirkkaasta vaaleaan siniseen. (Dewitt & Grondin 2010, 824; Weiser 2012a, 121.) Basofiilien tehtävät ovat melko samankaltaisia eosinofiilien kanssa. Myös ne osallistuvat eriasteisiin kehon yliherkkyysoireisiin ja niillä on kyky fagosytoida. Basofiilit sisältävät myös histamiinia ja hepariinia (Pohlman 2010, 291.)



KUVA 5. Hevosen basofiili. (Kuva: Miia Penttilä 2014)

Basofiilien määrän kasvua eli basofiliaa tavataan eosinofiilien tavoin erilaisten loistartuntojen, allergisten reaktioiden ja tietynlaisten syöpien yhteydessä. Basofilia on kuitenkin nisäkkäillä melko harvinaista ja jos sitä ilmenee, eläimellä on yleensä myös eosinofilia. Basopenialla ei tiedetä olevan kliinistä merkitystä, sillä niiden määrä veressä on muutenkin hyvin pieni eikä niitä yleensä nähdä erittelylaskennassa lainkaan. (Järvinen 1998, 203; Pohlman 2010, 296; Weiser 2012a, 121.)

6 VEREN SIVELYVALMISTE JA MAY-GRÜNWARD-GIEMSA-VÄRJÄYS

6.1 Veren sivelyvalmiste ja sen tarkastelu

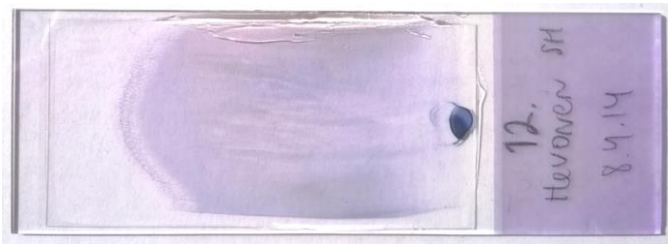
Värjätty veren sivelyvalmiste on oleellinen osa eri leukosyyttien osuuksien määrittämistä eli erittelylaskentaa sekä veren eri solujen morfologian tutkimista. Jotta sivelyvalmisteesta saadaan mahdollisimman luotettava ja todenmukainen tulos, vaatii niiden tekeminen kunnollisen tekniikan ja osaamisen, jotta valmisteesta saadaan oikean paksuinen eikä solujen jakauma vääristy. Jos sivelyvalmiste on huono, se saattaa sisältää runsaasti häiritseviä ja mikroskopointia vaikeuttavia artefakteja ja lisäksi solujen jakauma voi vääristyä. (Weiser 2012c, 8.) Tässä opinnäytetyössä sivelyvalmisteista tehtävällä leukosyyttien erittelylaskennalla on erittäin suuri merkitys työn onnistumisen ja tulosten luotettavuuden kannalta, sillä ilman manuaalisesti tehtyä erittelylaskentaa ei HemoCue® WBC DIFF –laitteen antamien tulosten luotettavuutta ja laitteen toimintaa hevosenäytteillä voida arvioida.

Sivelyvalmisteesta saadaan tietoa muun muassa erytrosyyttien eli punasolujen ulkonäöstä, koosta ja kypsyydestä, eri leukosyyttityyppien prosentiosuuksista sekä kypsyydestä ja mahdollisista patologisista soluista, karkea arvio trombosyyttien eli verihiutaleiden määrästä sekä niiden kokoeroista. Lisäksi sivelyvalmisteesta voidaan havaita mahdolliset parasitit. Erytrosyyttien ja leukosyyttien määrää on kuitenkin mahdotonta laskea sivelyvalmisteesta, vaikka se saattaakin antaa viitteitä solujen määristä. (Pelliniemi 1998, 1179; Kerr 2002, 276–277.)

Joitakin solujen morfologisia muutoksia, esimerkiksi neutrofiilien toksisia muutoksia tai parasitteja, ei voida havaita minkäänlaisilla automaattisilla analysaattoreilla, joten hyvälaatuisen sivelyvalmisteen arviointi ja tarkastelu on erittäin tärkeä osa hematologista tutkimusta myös tutkimustulosten luotettavuuden arvioinnin näkökulmasta. (Flatland & Vap 2013, 7.)

Näyttemateriaaliksi sopii joko kokoveri, jossa on antikoagulanttina EDTA tai ihmisillä kapillaariverinäyte (Pelliniemi 1998, 1177) Sivelyvalmisteen tekemiseen käytetyn verinäytteen tulisi olla mahdollisimman tuore, enintään kaksi tuntia vanhasta näytteestä saadaan laadukkaimmat sivelyvalmisteet. Näytteen pitkä säilytysaika sekä lämpötilojen

vaihtelut aiheuttavat soluihin morfologisia muutoksia, jotka vaikeuttavat niiden tulkin-
 taa. (Houwen 2000, 2.) Sivelyvalmisteet tehdään objektilasille tiputtamalla pisara hyvin
 sekoitettua verta lähelle objektilasin hiospäättä. Toinen vetolasi, jonka päät on hiottu,
 peruutetaan veripisaraan 30–45° kulmassa. Veripisaran annetaan levitä lasin reunan alle,
 jonka jälkeen vetolasia työnnetään kevyesti yhdellä liikkeellä eteenpäin siten, että veri-
 pisara leviää lasille riittävän ohueksi kerrokseksi. Säättämällä vetolasin kulmaa voidaan
 sivelyvalmisteiden pituuteen ja paksuuteen vaikuttaa. Erityisesti punasolujen morfologiaa
 arvioitaessa valmisteiden oikea paksuus on kriittinen. Jos veri on kovin ”ohutta” ja esi-
 merkiksi hemoglobiiniarvo on hyvin matala, voidaan vetolasin kulmaa suurentaa, jol-
 loin sivelyvalmisteesta tulee hieman lyhyempi ja paksumpi. Jos taas veri on hyvin vis-
 koosia, voidaan kulmaa pienentää, jolloin valmisteesta tulee pidempi ja ohuempi. Val-
 miit sivelyvalmisteet kuivataan heiluttelemalla niitä varovasti ilmassa. Lisäksi sively-
 valmisteet kiinnitetään metanolissa ja värjätään May-Grünwald-Giemsa (MGG) -
 värjäyksellä ennen tarkastelua mikroskoopissa. Tarvittaessa ne voidaan myös päällystää
 päällystysaineella ja peitinlasilla. (Pelliniemi 1998, 1177; Weiser 2012c, 8–9.)



KUVA 6. MGG-värjätty hevosen sivelyvalmiste (Kuva: Miia Penttilä 2014)

Kun sivelyvalmisteita tarkastellaan mikroskoopissa, on tarkastelu tehtävä oikealta alu-
 eelta. Erityisesti leukosyyttien erittelylaskennassa ja punasolujen morfologiaa arvioita-
 essa on erittäin tärkeää suorittaa tarkastelu ja laskenta oikean paksuiselta alueelta. Tämä
 alue sijaitsee ohuessa päässä, jossa solut ovat yhdessä kerroksessa ja jakaantuneet tasai-
 sesti. Jos solut ovat päällekkäin ja yksittäisiä soluja on vaikea erottaa, kohta on liian
 paksu. Liian paksussa kohdassa yksittäisen solun piirteitä on vaikea erottaa. Jos taas
 kohdassa näkyy niin sanottuja pääterisoja ja viiruja, on kyseessä liian ohut paikka. Liian
 ohuesta kohdasta laskettaessa leukosyyttien erittelylaskennan tulos vääristyy ja pu-
 nasolujen morfologian arviointi on vaikeaa, sillä niiden ominaispiirteet eivät säily. (Pel-
 liniemi 1998, 1179; Weiser 2012c, 9–10.)

Sivelyvalmisteen tarkastelu ja erittelylaskenta tulee suorittaa järjestelmällisesti. Mikroskoopin näkökentän voi aluksi etsiä käyttämällä 10x objektiivia ja erittelylaskentaan voidaan käyttää esimerkiksi 40x tai 50x objektiivin suurennosta. Erittelylaskennassa näkökentässä olevat leukosyytit luokitellaan omiksi tyypeikseen ja lasketaan. Leukosyytit jaetaan liuskatumaisiin neutrofiileihin, sauvatumaisiin neutrofiileihin, lymfosyytteihin, monosyytteihin, eosinofiileihin ja basofiileihin. Laskuihin sisällytetään tarvittaessa esimerkiksi solujen epäkypsemät muodot. Soluja lasketaan niin monta näkökenttää, että solujen yhteenlaskettu määrä on vähintään 100 solua. Varmempaan tulokseen päästään laskemalla useampi 100 solun sarja, esimerkiksi 200 soluun asti. Kun lasketaan 100 leukosyyttiä, jokaisen eri solutyypin kappalemäärä on prosenttiosuus kaikista lasketuista leukosyyteistä. (Weiser 2012c, 11–12.) Esimerkiksi 48 laskettua liuskatumaista neutrofiilia on yhtä kuin 48 % ja 12 monosyyttiä yhtä kuin 12 %. Jos halutaan laskea jokaisen solutyypin absoluuttinen lukumäärä, tarvitaan lisäksi näytteen kokonaisleukosyyttimäärä, joka kerrotaan laskettavan solun osuudella sadasta. (Weiser 2012c, 12.)

6.2 May- Grünwald- Giemsa- värjäys

May- Grünwald- Giemsa- värjäysmenetelmä on yksi useasta eri värjäysmenetelmästä joita voidaan käyttää, kun halutaan tarkastella verinäytteestä tehdyn sivelyvalmisteen sisältämiä soluja mikroskooppisesti. May- Grünwald- Giemsa kuuluu Romanowsky-tyyppisiin värjäysmenetelmiin. Näille värjäysmenetelmille on yhteistä se, että ne sisältävät sekä happaman että emäksisen värjäävän aineen. Hapan väri värjää solun emäksiset osat ja emäksinen väri puolestaan happamat osat. (Harvey 2001,11; Houwen 2000, 3–4.)

May- Grünwald- Giemsa- värjäysmenetelmässä käytettävät reagenssit ovat May- Grünwaldin liuos sekä Giemsan liuos. May- Grünwaldin lioksen värjäävät komponentit ovat eosiini ja metyleenisininen. Eosiini on hapan, kun taas metyleenisininen on emäksinen. Giemsan liuos puolestaan sisältää atsuuriväriä, joka koostuu atsuuri I: stä, eosiini G: stä sekä metyleenisinisestä. (Houwen 2000, 4; Reagen Oy 2003.) Silloinkin kun värjäykseen käytetään valmiita reagensseja, täytyy niitä laimentaa puskuroidulla vedellä ennen käyttöä (Reagen Oy 2003).

Varsinaisten värjäävien aineiden lisäksi värjäysprosessissa tarvitaan myös metanolia sekä puskuroitua vettä, joka on valmistettu sekoittamalla fosfaattipuskuria tislattuun veteen. Metanolin tehtävä on fiksoida solut objektilasille. Jos värjäystä ei tehdä heti sivelyvalmisteen tekemisen yhteydessä, vaan sivelyvalmisteita tarvitsee esimerkiksi lähettää eteenpäin, olisi tärkeää fiksoida sivelyvalmiste metanolissa, jotta myös värjäys onnistuisi hyvin eikä siihen syntyisi ylimääräistä taustavärjäytymistä. (Houwen 2000, 3.) Värjättävien sivelyvalmisteiden huuhteluun tarvittavan veden on oltava puskuroitua vettä tislattun veden sijasta, jotta värjäyksen pH säilyy oikealla tasolla. Liian hapan tai liian emäksinen vesi aiheuttaa värjäystuloksen vääristymistä joko liian punaiseksi tai siniseksi. Värjäyksen onnistuminen sekä värjäystulos kokonaisuudessaan riippuvat käytettävien reagenssien oikeasta pH-tasosta. (Harvey 2001, 11; Houwen 2000, 3–5; Reagena Oy 2003.)

Koko värjäysprosessin aikana on ehdottoman tärkeää varmistaa, etteivät lasit pääse kuivumaan kesken värjäyksen. Tämä aiheuttaa sivelyvalmisteisiin värjäysartefaktoja. (Houwen 2000, 4; Reagena Oy 2003.) Jos sivelyvalmiste on laadultaan heikko, voi myös värjäystulos olla epätasainen (Reagena Oy 2003). Käytettävien värjäysliuosten tulee olla tuoreita, sillä jos ne ovat olleet yli 4 viikkoa ilman kanssa kosketuksissa, metaanista alkaa muodostua metaanihappoa (Houwen 2000, 5). Värjäystä tehdessä tulee noudattaa värjäysohjeen mukaisia fiksointi-, värjäys- sekä pesuaikoja. Värjäystulos on epätasainen jos ajat ovat olleet liian lyhyitä tai pitkiä, tai pesuvaiheet on suoritettu väärin. (Houwen 2000, 5; Reagena Oy 2003.)

7 HemoCue[®] WBC DIFF -VIERITESTILAITE

HemoCue[®] WBC DIFF on ammattikäyttöön tarkoitettu vieritestilaite, jonka avulla määritetään leukosyyttien kokonaismäärä sekä saadaan selville leukosyyttien 5-osainen erittelylaskenta eli diffi. Leukosyyttien määrät ilmoitetaan sekä absoluuttisena lukumääränä ($10^9/L$) että prosenttiosuuksina. Näytteenä voidaan käyttää sekä kapillaari- että laskimokoverta. Näytteissä antikoagulanttina tulee olla EDTA. Analyysiin tarvittava näytemäärä on noin 10 μ l. (Hemocue Oy 2014a, 68–69; HemoCue Oy 2014b.)



KUVA 7. HemoCue[®] WBC DIFF -laite, kyvettipakkaus ja avattu kyvetti (Kuva: Meri Laine 2014)

Erittelylaskennan tulos sisältää neutrofiilien, lymfosyyttien, monosyyttien, eosinofiilien sekä basofiilien absoluuttiset lukumäärät sekä prosenttiosuudet. Laite kuitenkin tunnistaa neutrofiilien, lymfosyyttien, monosyyttien, eosinofiilien ja basofiilien lisäksi patologiset leukosyytit, kuten blastit ja epäkypsät granulosyytit. Jos näyte sisältää patologisia leukosyyttejä, laite antaa virheilmoituksen. (Lindberg, Jönsson, Nilsson, Johnsson, & Jonasson-Bjäräng 2014, 30).

Laitteen mittausalue on kokonaisleukosyyttimäärän osalta $0,3\text{--}30 \times 10^9/l$. Erittelylaskennan tulokset ilmoitetaan, jos kokonaisleukosyyttimäärä on vähintään $1,0 \times 10^9/l$ ja eri leukosyyttityypit ovat mittausalueella. (Kurvinen & Vanharanta 2012, 42.) Jos tulos on

korkeampi kuin mittausrajan yläraja $30 \times 10^9/l$, näyttöön tulee virheilmoitus ”HHH” ja jos tulos jää mittausalueen alarajan $0,3 \times 10^9/l$ alapuolelle, se ilmaistaan virheilmoituksella ”LLL” (HemoCue Oy 2014a, 64).

7.1 Kyvetit

Laitteessa käytetään kertakäyttöisiä HemoCue WBC DIFF Microcuvettes –kyvettejä (HemoCue Oy 2014b). Kyvetit toimivat samaan aikaan pipettinä, näyteastianä ja reaktiokammiona. Näyte imeytyy kyvetin onkaloon kapillaarivoiman avulla. (Lindberg ym. 2014, 28.) Jos halutaan mitata vain leukosyyttien kokonaismäärä, voidaan laitteessa käyttää myös HemoCue WBC Microcuvettes –kyvettejä (HemoCue Oy 2014a, 68).

HemoCue WBC DIFF Microcuvettes -kyvetit sisältävät erilaisia reagensseja, joista tärkeimmät ovat metyleenisininen ($< 20 \mu\text{g/g}$) ja saponiini ($< 500 \mu\text{g/g}$) (HemoCue Oy 2014b). Saponiini hemolysoi eli hajottaa näytteen punasolut ja metyleenisini värjää leukosyyttien tumat tunnistamista varten. (HemoCue Oy 2014b). Reagenssit ovat kyvetin onkalossa kuivina ja onkaloon imeytyvä näyte liuottaa ne (Lindberg ym. 2014, 28).

Kyvetit tulee säilyttää $15\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa ja kyvettien on annettava lämmitä $18\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilaan ennen käyttöä. Kyvetit ovat yksittäispakattuja ja kyvetti tulee käyttää 10 minuutin kuluessa pakkauksen avaamisesta. Kun kyvetti on täytetty, mittaus on aloitettava 1 minuutin kuluessa. Täytettyä kyvettiä ei saa mitata uudelleen ja kyvetit tulee käyttää ennen viimeistä käyttöpäivämäärää. (HemoCue Oy 2014b.)

7.2 Toimintaperiaate

Laitteen uudenlainen järjestelmä käyttää leukosyyttien laskentaan ja erittelyyn viimeisintä kuvantamisteknologiaa, joka perustuu manuaaliseen mikroskooppilaskentaan. Kun näyte on imeytynyt kapillaarivoimalla kyvetin onkaloon, veri liuottaa kyvetissä olevat kuivareagenssit. Tästä seuraa punasolujen hemolyysi ja leukosyyttien tumien värjäytyminen. Erillistä laimennusta ei tarvita. Näytteen mittaaminen alkaa automaattisesti kyvetin analysaattoriin asettamisen jälkeen. (Lindberg ym. 2014, 28–29.)

Laitteessa oleva moottoroitu kamera liikkuu kyvetin onkalon alueella pikkuhiljaa ja ottaa jokaisesta leukosyytistä yli 30 valokuvaa. Kuva-analyysitekniikalla laite valitsee tarkimmat valokuvat jokaisesta solusta. Valitut kuvat yhdistetään yhdeksi kuvaksi, joka sisältää solut tarkimpina kuvina. Tämän viimeisen kuvan perusteella solujen kokonaismäärä lasketaan ja solut jaotellaan neutrofiileihin, lymfosyytteihin, monosyytteihin, eosinofiileihin, basofiileihin, patologisiin soluihin ja muihin. Jokaiselle solulle on määritetty yli 30 matemaattiseksi algoritmeiksi käännettyä piirrettä, esimerkiksi koko, muoto, koostumus ja granulat; joihin laite vertaa kuvia ja joiden perusteella solujen tunnistaminen tapahtuu. (Lindberg ym. 2014, 30.) Näytteen analysointi kestää alle 5 minuuttia (HemoCue Oy 2014a, 68).

7.3 Käyttö ja huolto

Analysaattori on kooltaan 15x18x16cm ja helppokäyttöinen (Lindberg ym. 2014, 28). Laite käynnistetään ja odotetaan, kunnes automaattinen tarkistus on valmis. Ennen näytteen ottamista painetaan ”potilastesti”-näppäintä, jonka jälkeen näyttöön tulee teksti ”Aseta kyvetti”. Laite on tällöin valmis mittaamaan. Näyte voidaan ottaa kyvettiin suoraan sormenpästä tai kantapästä. Jos näyte on otettu EDTA-putkeen, hyvin sekoitetusta näytteestä siirretään pisara verta vettähyllivälle alustalle, esimerkiksi parafilmille. Kyvetin kärki viedään suorassa veripisaraan, jolloin kyvetin onkalo täyttyy kapillaarivoiman avulla. Jotta vältytään ilmakuplilta näytteessä, kyvetin tulee täyttyä yhdellä kertaa yhdestä pisarasta. Täytetyn kyvetin reunat pyyhitään, kyvetti asetetaan analysaattorin kyvettipidikkeeseen ja pidike työnnetään varovasti laitteeseen. Mittauksen jälkeen käytetty kyvetti hävitetään asianmukaisesti. (Kurvinen & Vaharanta 2012, 42.)

Laitteessa on sisäänrakennettu laadunvalvontajärjestelmä, joka tarkistaa automaattisesti laitteen elektroniikan ja ohjelmistosovelluksen toimivuuden, optisten osien puhtauden sekä mikroskoopin valon intensiteetin. (Kurvinen & Vanharanta 2012, 43.) Laite varmistaa lisäksi jokaisen mittauksen yhteydessä, että kyvetti on täyttynyt kunnolla (ei ilmakuplia), näytteessä ei ole hyytymiä, kyvetti on hyvin paikallaan ja puhdas, reagenssit ovat toimineet oikein ja että näytteen solut ovat jakautuneet tasaisesti. Jos jokin näistä ei toteudu, laite antaa virheilmoituksen. (Lindberg 2013; Lindberg ym. 2014, 30.)

Laite on tehdaskalibroitu, eikä vaadi uudelleenkalibroitua. Myös huoltojen tarve on vähäinen. Käyttäjän tekemiä huoltoja ovat päivittäinen kyvettipidikkeen puhdistaminen ja tarvittaessa (1–4 kertaa vuodessa) tehtävä optiikan puhdistaminen. Jos laitteen optiikka vaatii puhdistamista, laite ilmoittaa siitä virheilmoituksella. Optiikan puhdistamiseen käytetään laitteen mukana tulevaa puhdistusspaattelia. (Kurvinen & Vanharanta 2012, 43; Lindberg ym. 2014, 30.)

Laitteelle ei ole tällä hetkellä saatavilla sisäistä laaduntarkkailua varten kontrolliliuoksia, joilla leukosyyttien erittelylaskennan tulosten oikeellisuutta voitaisiin seurata. Labquality Oy:llä on kuitenkin tarjolla ulkoisen laadunarvioinnin koekierros HemoCue® WBC DIFF –laitteen leukosyyttien erittelylaskentaa varten (Labquality Oy 2014).

8 OPINNÄYTETYÖPROSESSI JA TYÖN TOTEUTUS

8.1 Opinnäytetyön suunnittelu

Opinnäytetyöprosessi lähti käyntiin syyskuussa 2013 aiheiden valinnalla. Alkuperäinen aihe oli HemoCue[®] WBC DIFF -vierilaitteen toimintaperiaatteen selvitys ja laatukäsikirjan mukainen ohjeisto bioanalytiikan koulutusohjelman käyttöön. Saimme kuitenkin kuulla, että HemoCue Oy olisi kiinnostunut testaamaan laitetta eläinlääketieteen käytössä. Tästä innostuneena halusimme ottaa laitteen testaamisen eläinnäytteillä osaksi työtämme.

Aloimme työstää ideapaperia pian aiheen valinnan jälkeen. Ideapaperien esitysseminaarissa syyskuussa kävi kuitenkin ilmi, että yhdistämällä eläinnäytteiden testaamisen muuhun työhön, työstä tulee liian laaja ja vaikeaselkoinen. Neuvottelimme asiasta ohjaavien opettajien kanssa ja päädyimme tekemään opinnäytetyön pelkästään WBC DIFF -laitteen soveltuvuuden testaamisesta eläinkäyttöön. Aihe olikin erittäin mielenkiintoinen, sillä vastaavaa ei ollut vielä tehty.

Aiheen tarkentumisen jälkeen aloimme kirjoittaa opinnäytetyösuunnitelmaa. Suunnitelman ensimmäinen versio valmistui jo lokakuussa, jolloin se esitettiin suunnitelmaseminaarissa muulle ryhmälle. Seminaarissa annetun palautteen jälkeen sitä vielä hiottiin ja paranneltiin. Teimme lokakuussa myös pienen esikokeen laitteen soveltuvuudesta eläinnäytteille. Tutkimme neljä näytettä neljästä erirotuisesta koirasta, jotka kuuluvat opiskelutovereillemme. Näytteiden ottajana toimi pieneläinhoitaja, sillä meillä ei ole oman koulutuksemme puolesta tarvittavaa osaamista eläinnäytteiden ottamiseen. Tämä esikoe toteutettiin Tampereen ammattikorkeakoulun opetuslaboratoriossa ja näytteet analysoitiin koulutusohjelmamme omalla Sysmex XS-1000i -laitteella sekä HemoCue[®] WBC DIFF -laitteella.

Esitutkimuksessa tulokset olivat vaihtelevia. Yhdestä koiranäytteestä saimme kolmella määrittyskerralla HemoCue[®] WBC DIFF -laitteella kaksi rinnakkaista tulosta. Lopuista kolmesta näytteestä saimme vain erilaisia virheliputuksia. Teimme näytteistä myös siveilyvalmisteet, joista tehtiin manuaalinen erittelylaskenta ja jonka tuloksia verrattiin HemoCue[®] WBC DIFF -laitteen saamiin tuloksiin.

Vaikka tulokset olivat vaihtelevia, totesimme, että työtä kannattaa jatkaa, sillä myös se että näytteistä ei HemoCue® WBC DIFF –laitteella saada mahdollisesti tulosta, on jo tulos sille, voiko laitetta käyttää eläinleukosyyttien mittaamiseen ja erittelyyn. Esikokeen jälkeen aloimme kysellä hevosten, koirien ja kissojen verinäytteiden saamista eri eläinklinikoilla. Lopulta opinnäytetyö päätettiin tehdä vain hevosten verinäytteillä, sillä kissojen ja koirien verinäytteiden saaminen osoittautui erittäin vaikeaksi ja hevosten verinäytteitä puolestaan saatiin helpommin.

Pidimme marraskuussa myös tapaamisen HemoCue Oy:n yhteyshenkilön, Anja Rautajoen kanssa. Tapaamisessa keskustelimme opinnäytetyön suunnitelmasta ja toteutuksesta. Lopullinen suunnitelma valmistui ja hyväksyttiin joulukuussa 2013. Saimme kuitenkin joulukuun alkupuolella kuulla, että työmme yhteyshenkilö tulisi muuttumaan. Uudeksi yhteyshenkilöksi HemoCue Oy:stä tuli maajohtaja Janne Kovalainen. Lopullinen lupa opinnäytetyön tekemiseen saatiin helmikuussa 2014.

8.2 Opinnäytetyön toteutus

Otimme maaliskuussa 2014 yhteyttä myös laitteen kehittäjään, Stellan Lindbergiin, joka työskentelee Ruotsissa HemoCue AB:n johtavana lääkärinä (Medical Director). Kerroimme hänelle opinnäytetyöstämme ja saimme materiaalia työtämme varten, kuten laitteeseen liittyviä artikkeleita sekä postereita.

Käytännön osuus suoritettiin huhtikuussa 2014. Määritykset tehtiin Tampereen Hevosklinikalla, josta saatiin opinnäytetyötämme varten 12 EDTA- putkiin otettua verinäytettä eri hevosista. Jokainen hevosenäyte määritettiin mukana tuodulla HemoCue® WBC DIFF –laitteella kahdesti peräkkäin rinnakkaistulosten saamiseksi. HemoCue Oy:ltä saimme 50 kappaletta kyvettejä määritysten tekemistä varten.

Määrityksiä tehtäessä kyvetit täytettiin suoraan hyvin sekoitetuista EDTA- putkista kallistamalla putkea varovasti siten, että veri saatiin lähelle putken suuta. Kolmen näytteen, numerot 1, 4 ja 9, kohdalla määritys tehtiin kolmesti. Näytteiden numero 1 ja 4 toisella määrityskerralla laite antoi virheilmoituksen. Molemmilla kerroilla virheilmoitus oli sama, Err01, joka HemoCue® WBC DIFF –laitteen käyttöohjeen mukaan tarkoittaa

”Osaa kuva-alueesta ei voida analysoida”. Mahdollisia syitä tähän ovat näytteessä olevat ilmakuplat, näytteen väärä käsittely tai epänormaali näyte. (HemoCue Oy 2014a, 65.) Näytteen numero 1 kohdalla tiedettiin, että kyveti ei ollut täyttynyt kerrasta kunnolla, joten virheilmoitus oli odotettavissa. Näytteen nro 4 osalta selkeää syytä ei löytenyt. Näytteiden määrittäminen toistettiin uudella kyvetillä, jolloin saatiin tulokset normaalisti kummastakin näytteestä. Näytteen nro 9 määrittäminen uusittiin varmuuden vuoksi, koska kaksi ensimmäistä tulosta erosivat toisistaan huomattavan paljon enemmän kuin muiden näytteiden kohdalla.

Näytteistä tehtiin lisäksi sivelyvalmisteita erittelylaskennan mikroskoopissa suorittamista varten. Jokaisesta näytteestä tehtiin useita sivelyvalmisteita, joista valittiin 2–4 parasta, jotka fiksoitiin eli kiinnitettiin paikan päällä metanolissa noin 10 minuutin ajan.

Neljän hevosen näytteitä, numerot 7, 10, 11 ja 12 lähetettiin Tampereen Hevosklinikan toimesta myös eläinlaboratorioon tutkittavaksi, jossa niistä määritettiin muun muassa kokonaisleukosyyttimäärä (B-Leuk). Saimme näistä neljästä näytteestä leukosyyttitulokset muutaman päivän kuluttua sähköpostilla Hevosklinikan henkilöstön välityksellä. Valitettavasti muiden hevosten näytteistä ei ollut tehty B-Leuk-tutkimuspyyntöä ja sen vuoksi enempää näytteitä ei lähetetty tutkittavaksi eläinlaboratorioon.

HemoCue[®] WBC DIFF –laitteella saadut tulokset kirjattiin ensin käsin laitteen mukana tuleviin vastauskaavakkeisiin (kuva 8), joista ne sitten siirrettiin Excel-taulukkoon tietokoneelle (liite 1). Kirjasimme ylös myös hevosen tyyppin, sillä leukosyyttien kokonaismäärän viitearvot eroavat hieman sen mukaan onko hevonen lämminverinen vai suomenhevonen.

ID..... 31.....

WBC

DIFF **10⁹/L** **%**

NEU

LYM

MON

EOS

BAS

HemoCue[®] WBC DIFF
www.hemocue.com

HEMOCUE
A Quest Diagnostics Company

KUVA 8. Vastauskaavake. (HemoCue Oy 2014)

Opinnäytetyön raporttiosuuden kirjoittaminen alkoi huhti-toukokuussa 2014. Sivelyvalmisteet värjättiin May-Grünwald-Giemsan (MGG) -värjäyksellä ja päällystettiin Depex-päällystysaineella toukokuussa 2014. Manuaalista erittelylaskentaa suoritettiin kesäkuussa ja syyskuussa 2014. Erittelytulokset koottiin Excel-tilukkaan helpommin luettavaan muotoon. Tulosten analysointi tehtiin heinä-syyskuussa 2014.

Tulosten analysoinnin avuksi tehtiin Excel-tilukoita. Yhteen tilukkaan kirjattiin kaikki kokonaisleukosyyttitulokset, jotka saatiin HemoCue[®] WBC DIFF -laitteella ja eläinlaboratoriossa. Tilukkaan laskettiin myös pienimmän ja suurimman kokonaisleukosyyttimäärän erotus. Erittelylaskennan tuloksista tehtiin kaksi erillistä tilukkoa: yksi solujen prosentiosuuksien ja yksi solujen absoluuttisten lukumäärien vertailua varten. Tilukkojen selkeyttämiseksi jokaisen näytteen erittelyvastauksista laskettiin keskiarvot sekä absoluuttisille lukumäärille että solujen prosentiosuuksille. Tilukoihin laskettiin lisäksi HemoCue[®] WBC DIFF -vastausten ja manuaalierittelyvastausten keskiarvojen erotus, josta nähdään helposti onko manuaalierittelyvastaus HemoCue[®] WBC DIFF -laitteen vastausta suurempi (positiivinen erotus) vai pienempi (negatiivinen erotus). Tilukoissa tuloksia voidaan analysoida helposti vertailemalla tuloksia ja niiden eroja keskittyen yhteen asiaan, kokonaisleukosyyttimäärään, erittelylaskennan solujen absoluuttiseen lukumäärään tai solujen prosentiosuuksiin, kerrallaan.

Raporttiosuuden kirjoittaminen jatkui kesä-heinäkuusta aina syyskuuhun 2014 asti.

Solukuvat hevosten leukosyyteistä otettiin elokuussa 2014 Tampereen ammattikorkeakoulun Olympus DP20-mikroskooppikameralla. Kuvien ottamisessa käytettiin mikroskoopin objektiivin suurennoksia 40x ja 60x, jolloin kokonaissuurennokset olivat 400x ja 600x. Opinnäytetyöprosessin aikana käytiin myös ohjaavien opettajien kanssa ohjauskeskusteluja, joissa käytiin läpi muun muassa työn etenemistä ja teoriasisältöä. Opinnäytetyön raporttiosuus valmistui syyskuun lopussa 2014, jolloin se myös palautettiin tarkastettavaksi ja arvosteltavaksi.

9 TULOKSET

Kaikkien HemoCue® WBC DIFF –laitteella määritettyjen näytteiden sekä niistä manuaalisesti tehtyjen erittelylaskentojen tulokset koottiin yhteen Excel-taulukkoon (liite 1) tulosten vertailun helpottamiseksi. Näytteiden kokonaisleukosyyttimäärät ja niiden erot koottiin myös omaksi Excel-taulukokseen. Lisäksi niistä neljästä näytteestä, joista saatiin myös Eläinlaboratorio Vetlabissa määritetty kokonaisleukosyyttimäärä, pystyttiin laskemaan manuaalisen erittelylaskennan tulosten perusteella eri leukosyyttien absoluuttiset lukumäärät, joita voitiin vertailla HemoCue® WBC DIFF –laitteen saamiin tuloksiin.

9.1 Kokonaisleukosyyttimäärä

HemoCue® WBC DIFF- laitteella ja Eläinlaboratorio Vetlabissa määritetyt kokonaisleukosyyttitulokset sekä tulosten erot on esitetty taulukossa 2. Kaikkien näytteiden, pois lukien näyte numero 1, kokonaisleukosyyttimäärä oli hevosen tyyppi huomioon ottaen viitearvoissa. Näytteen 1 leukosyyttitulokset olivat hieman alle viitearvojen alarajan. Lisäksi näytteen 6 ensimmäinen määrittystulos on hieman yli viitearvon ylärajan, mutta toinen määrittäys oli viitearvojen sisällä.

TAULUKKO 2. HemoCue® WBC DIFF -laitteella ja Eläinlaboratorio Vetlabissa määritetyt kokonaisleukosyyttitulokset ja tulosten erot

Näyte-numero	Hevosen tyyppi	HemoCue® WBC DIFF, x10 ⁹ /l			B-Leuk, Vetlab	Suurimman ja pienimmän tuloksen ero
		Määrittäys 1	Määrittäys 2	Määrittäys 3		
1	LV	4,8	Error01	4,9		0,1
2	LV	7	7,9			0,9
3	LV	5,9	5,5			0,4
4	SH (KV)	8,3	Error01	8		0,3
5	PV	7,6	7,8			0,2
6	LV	10,9	10,4			0,5
7	LV	6,9	6,9		9,2	2,3
8	SH (KV)	8,2	8,1			0,1
9	LV	9,8	8,7	9,4		1,1
10	LV	9,9	10,1		10	0,2
11	LV	6,9	7,2		7,3	0,4
12	SH (KV)	6,5	6,4		6,8	0,4

LV = Lämminverinen hevonen, SH = Suomenhevonen, KV = Kylmäverinen hevonen PV = Puoliverinen hevonen

Tarkasteltaessa HemoCue[®] WBC DIFF –laitteen saamia kokonaisleukosyyttimääriä havaittiin että rinnakkaistulosten välinen ero vaihteli välillä 0–1,1 x10⁹/l. Näytteen numero 7 kohdalla vertailutulos erosi huomattavan paljon HemoCue[®] WBC DIFF –laitteella saaduista tuloksista. Kumpikin määrittys WBC DIFF –laitteella antoi tulokseksi 6,9 x 10⁹/l ja vertailutulos oli 9,2 x 10⁹/l, näin ollen eroa tulosten välillä on peräti 2,3 x 10⁹/l. Muiden näytteiden, joista saatiin vertailutulos, suurimman ja pienimmän tuloksen erotukset vaihtelivat 0,2 x 10⁹/l ja 0,4 x 10⁹/l välillä.

9.2 Erittelylaskenta

Vertailtaessa erittelylaskennan absoluuttisia lukumääriä ja solujen prosenttiosuuksia, HemoCue[®] WBC DIFF –laitteella analysoidut rinnakkaistulokset ovat varsin yhtenevät, vaikka pieniä eroavaisuuksia löytyy.

Kun verrataan manuaalisen erittelylaskennan tuloksia WBC DIFF –laitteen erittelytuloksiin (taulukko 3), erot ovat selkeästi suuremmat. Manuaalisen erittelylaskennan yhteydessä voidaan verrata vain solujen prosenttiosuuksia, sillä absoluuttisia lukumääriä ei voida laskea kuin neljälle näytteelle. Solujen prosenttiosuuksista on laskettu keskiarvot vertailun helpottamiseksi ja selkeyttämiseksi.

TAULUKKO 3. Leukosyyttien erittelylaskennan prosenttiosuuksien keskiarvot ja niiden erot

Näyte- numero	WBC DIFF -tulosten keskiarvo		Manuaalierittelytuloste n keskiarvo		Keskiarvojen ero
	% -osuus		% -osuus		% -osuus
1	NEU	45	NEU	67	22
	LYM	39	LYM	28,2	-10,8
	MONO	9	MONO	3,2	-5,8
	EOS	0,5	EOS	1,2	0,7
	BASO	0	BASO	0,2	0,2
2	NEU	42,5	NEU	57	14,5
	LYM	48,5	LYM	36	-12,5
	MONO	6	MONO	5,5	-0,5
	EOS	3	EOS	1,5	-1,5
	BASO	0	BASO	0,3	0,3

3	NEU	49,5	NEU	61	11,5
	LYM	41	LYM	35,7	-5,3
	MONO	7	MONO	2	-5
	EOS	2	EOS	1	-1
	BASO	0	BASO	0	0
4	NEU	45	NEU	58,6	13,6
	LYM	45,5	LYM	33,8	-11,7
	MONO	7	MONO	4,8	-2,2
	EOS	2	EOS	0,7	-1,3
	BASO		BASO	0,2	0,2
5	NEU	49,5	NEU	55,5	6
	LYM	40,5	LYM	38,8	-1,7
	MONO	9	MONO	4,8	-4,2
	EOS	1	EOS	0,7	-0,3
	BASO	0	BASO	0,2	0,2
6	NEU	50	NEU	60,1	10,1
	LYM	39,5	LYM	34,4	-5,1
	MONO	8,5	MONO	3,9	-4,6
	EOS	1,5	EOS	1,3	-0,2
	BASO	0	BASO	0,3	0,3
7	NEU	44	NEU	57,4	13,4
	LYM	48	LYM	40,4	-7,6
	MONO	7	MONO	0,8	-6,2
	EOS	1	EOS	1,4	0,4
	BASO	0	BASO	0	0
8	NEU	48,5	NEU	67,2	18,7
	LYM	43,5	LYM	28,4	-15,1
	MONO	8	MONO	3,2	-4,8
	EOS	0	EOS	0,8	0,8
	BASO	0	BASO	0,4	0,4
9	NEU	44,7	NEU	54,3	9,6
	LYM	45,3	LYM	41,6	-3,7
	MONO	9	MONO	3,9	-5,1
	EOS	1	EOS	0	-1
	BASO	0	BASO	0,3	0,3
10	NEU	42	NEU	50	8
	LYM	51	LYM	44,8	-6,2
	MONO	4	MONO	2,6	-1,4
	EOS	3	EOS	2	-1
	BASO	0	BASO	0,2	0,2
11	NEU	51	NEU	69,2	18,2
	LYM	40,5	LYM	27,7	-12,8
	MONO	7,5	MONO	2,7	-4,8
	EOS	1	EOS	0,5	-0,5
	BASO	0	BASO	0	0
12	NEU	47,5	NEU	66,5	19
	LYM	43	LYM	30,2	-12,8
	MONO	9	MONO	2,5	-6,5
	EOS	0,5	EOS	0,7	0,2
	BASO	0	BASO	0,2	0,2

NEU = neutrofiili, LYM = lymfosyytti, MONO = monosyytti, EOS = eosinofiili, BASO = basofiili

Kaikkien näytteiden osalta neutrofiilien osuus on manuaalisessa erittelyssä korkeampi kuin WBC DIFF –laitteen tuloksissa. Lymfosyyttien ja monosyyttien osuudet puoles-

taan ovat manuaalierittelyssä matalammat kuin WBC DIFF –laitteella saaduissa tuloksissa. Eosinofiilien osalta tulokset olivat hyvin vaihtelevia, sillä niitä löytyi myös näytteistä hyvin vaihtelevia määriä. Basofiilejä löytyi manuaalisessa erottelulaskennassa vain osasta näytteitä ja nämäkin olivat yksittäisiä löydöksiä. WBC DIFF –laite ei löytänyt näytteistä yhtäkään basofiilia.

Niiden neljän näytteen, joista saatiin myös eläinlaboratorion analysoimat vertailutulokset, voidaan vertailla myös leukosyyttien absoluuttisia määriä (taulukko 4). On kuitenkin otettava huomioon se, että leukosyyttien absoluuttiset määrät on laskettu leukosyyttien vertailutuloksia käyttäen. Koska vertailutulokset ja WBC DIFF –laitteella saadut kokonaisleukosyyttitulokset erosivat toisistaan, myös absoluuttisissa määrissä on eroa. Tulokset mukailevat kuitenkin pitkälti prosentiosuuksien tuloksia: neutrofiilien absoluuttiset lukumäärät ovat manuaalierittelyssä laitteen tuloksia korkeammat, lymfosyyttien ja monosyyttien puolestaan matalammat. Eosinofiilien osalta erot vaihtelevat. Näytteessä 7 manuaalierittelyn tulos on laitteen vastausta suurempi, mutta näytteen 10 osalta manuaalierittelyn vastaus on hieman pienempi.

TAULUKKO 4. Leukosyyttien erittelylaskennan absoluuttiset lukumäärät ja niiden erot.

Näyte- numero	WBC DIFF -tulosten keskiarvo		Manuaalierittelytulosten keskiarvo		Keskiarvojen ero
	10 ⁹ /l		10 ⁹ /l		
7	NEU	3,1	NEU	5,3	2,2
	LYM	3,3	LYM	3,7	0,4
	MONO	0,5	MONO	0,1	-0,4
	EOS	0,1	EOS	0,1	0
	BASO	0	BASO	0	0
10	NEU	4,3	NEU	5	0,8
	LYM	5,1	LYM	4,5	-0,6
	MONO	0,4	MONO	0,3	-0,1
	EOS	0,3	EOS	0,2	-0,1
	BASO	0	BASO	0	0,0
11	NEU	3,6	NEU	5,1	1,6
	LYM	2,9	LYM	2	-0,9
	MONO	0,6	MONO	0,2	-0,4
	EOS	0,1	EOS	0,1	0,1
	BASO	0	BASO	0	0,0
12	NEU	3,1	NEU	4,5	1,5
	LYM	2,8	LYM	2,1	-0,7
	MONO	0,6	MONO	0,2	-0,4
	EOS	0,1	EOS	0	-0,1
	BASO	0	BASO	0	0

NEU = neutrofiili, LYM = lymfosyytti, MONO = monosyytti, EOS = eosinofiili, BASO = basofiili

10 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

10.1 Tulosten tarkastelu

Tulosten välisiä pieniä eroja on vaikea selvittää tarkasti, sillä niihin vaikuttavat monet tekijät. Esimerkiksi näytteen sekoittaminen, vertailunäytteen analysoinnissa tapahtuva viive näytteenoton jälkeen sekä solujen jakautuminen näytteessä aikaansaavat eroja. Myös menetelmän epätarkkuudella voidaan selittää tulosten välisiä eroja, kun kyseessä on vieritestilaite.

Pyrimme opinnäytetyötä tehdessämme vaikuttamaan niihin tekijöihin joihin pystyimme, mutta emme esimerkiksi tiedä tarkkaan, koska eläinlaboratorioon lähetetyt näytteet analysoitiin ja kauanko näytteet joutuivat odottamaan analyysiä.

10.2 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyötä tehdessämme pyrimme varmistamaan tulosten ja samalla koko työn luotettavuuden erilaisin keinoin. Opinnäytetyössämme merkittävänä luotettavuutta lisäävänä tekijänä toimii se, että jokaisesta näytteestä tehtiin huolelliset rinnakkaismääritykset, eikä luotettu vain yhteen vastaukseen. Myös eläinlaboratoriossa määritetyt leukosyyttitulokset mahdollistivat tulosten laajemman analysoinnin ja siten luotettavimmat tulokset. Vaikka vertailutulokset saatiin vain neljästä näytteestä, on se silti parempi kuin se, että vertailutuloksia ei olisi saatu lainkaan. Toisaalta kuitenkin tulosten luotettavuutta heikentävänä tekijänä voidaan pitää sitä, että HemoCue[®] WBC DIFF –laitteelle ei ole tätä opinnäytetyötä tehdessä olemassa kontrolliliuoksia, joilla tulosten oikeellisuutta voitaisiin seurata.

Manuaalista erittelylaskentaa varten tehdyt sivelyvalmisteet ovat kaikki yksilöllisiä, mikä saattaa aiheuttaa lievää hajontaa tuloksiin. Sivelyvalmisteita tehdessä näytteitä todennäköisesti myös sekoitettiin eri määrät, mikä on voinut vaikuttaa leukosyyttien jakautumiseen näytteessä ja siten myös objektilasilla. Kohta objektilasilla josta erittelylaskenta on kustakin sivelyvalmisteesta suoritettu, on vaihdellut muun muassa sivelyvalmisteiden paksuudesta tai laskennan suorittajasta johtuen. Tällöin myös saman näyt-

teen eri sivelyvalmisteista suoritetuista erittelylaskennoista on saatu vaihtelevia tuloksia. Jotta vaihtelevista tuloksista aiheutuvaa virhettä voitiin ehkäistä, käytettiin tulosten analysoinnissa vain eri määrityskertojen keskiarvoja.

Manuaalinen erittelylaskenta suoritettiin siten, että jokaisesta näytteestä tehtiin useita sivelyvalmisteita, joista valittiin 2–4 parasta. Jokaisesta valitusta sivelyvalmisteesta laskettiin erilaisten leukosyyttien määrät siten, että yhteenlaskettu määrä oli 100 solua. Yhteensä yhdestä näytteestä laskettiin siis 200–400 leukosyyttiä. Manuaalisen erittelylaskennan ja tulosten luotettavuutta lisää se, että opinnäytetyön molemmat tekijät suorittivat sivelyvalmisteista erittelylaskennat eri kerroilla. Näin ollen myös erittelylaskentojen tuloksia on voitu vertailla ja jokaisesta näytteestä on saatu useita erittelytuloksia. Saaduista tuloksista laskettiin keskiarvo, jota käytettiin tulosten taulukoinnissa sekä absoluuttisten lukumäärien laskennassa. Keskiarvot on esitetty yhden desimaalin tarkkuudella. Manuaalisen erittelylaskennan Excel-taulukkoon siirretyt tulokset on esitetty liitteessä 2. Eri solutyypin absoluuttisten lukumäärien laskemisessa käytettiin hyväksi vertailutulosten kokonaisleukosyyttimäärää. Näin ollen absoluuttiset lukumäärät voitiin laskea vain niistä neljästä näytteestä, joista saimme vertailutuloksen, eli näytteet 7, 10, 11 ja 12. Eri solujen absoluuttiset lukumäärät laskettiin jokaiselle solutyypille erikseen siten, että jokaisen leukosyyttityypin prosentiosuus jaettiin sadalla prosentilla ja kerrottiin kokonaisleukosyyttimäärällä.

Sivelyvalmisteen laadukkuuden lisäksi manuaalisen erittelylaskennan tuloksiin vaikuttavat omat mikroskopointitaitomme. Vaikka koimme, että humanipuolen hematologian tietämyksen pohjalta mikroskopointi ei tuottanut kummallekaan opinnäytetyön tekijälle ongelmia, on silti mahdollista että yksittäisiä soluja on tunnistettu väärin. Yksittäisten solujen tunnistuksen merkitys kokonaisuuden kannalta on toki melko vähäinen.

Opinnäytetyön teoriaosuuden luotettavuutta lisäävät luotettavat ja ajantasaiset lähteet. Kolmea lähdettä lukuun ottamatta kaikki lähteet olivat enintään 10 vuotta vanhoja. Yli 10 vuotta vanhojen lähteiden rinnalla käytettiin myös uudempia lähteitä, sillä samaa aiasisältöä löytyi myös muista lähdeoteoksista. Lähteinä käytettiin monipuolisesti sekä suomen- että englanninkielisiä lähteitä. Lisäksi monista lähteistä löytyi samaa tietoa, joten lähdekritiikkiä voitiin tehdä luotettavasti ja eri lähteitä vertaillen.

Eettisyys on opinnäytetyössämme huomioitu siten, että hevosten nimien sijaan näytteistä on käytetty vain näytenumeroa. Hevosen tyyppin (lämminverinen tai suomenhevonen) olemme ottaneet mukaan siksi, että kokonaisleukosyyttimäärän viitearvot eroavat toisistaan lämminverisen ja suomenhevosen kohdalla. Hevosen tyyppi ei kuitenkaan ole millään tavalla sellainen tieto, josta tietyn hevosen voisi tunnistaa. Lisäksi opinnäytetyötämme varten otettaviin verinäytteisiin oli aina hevosen omistajalta lupa. Luvan kysymisestä huolehti Hevosklinikan henkilökunta. Teimme varmuuden vuoksi myös suostumuslomakkeen, jota ei kuitenkaan käytetty.

10.3 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata HemoCue[®] WBC DIFF –vieritestilaitteen soveltuvuutta hevosnäytteille. Tarkoituksena oli lisäksi perehtyä hevosen leukosyytteihin ja selvittää laitteen mahdollisesti antamien virheliputusten syitä. Opinnäytetyön tarkoitukset täyttyivät, sillä laitteen soveltuvuutta hevosnäytteille saatiin testattua ja samalla perehdyimme hevosen leukosyytteihin. Virheliputusten syitä emme päässeet selvittämään, sillä niitä ei tullut kuin kaksi kappaletta samaa virheilmoitusta. Toisen virheilmoituksen syyksi tiesimme oman, näytteen kyvetteiin ottamisessa tapahtuneen virheen, mutta toiselle emme löytäneet selkeää syytä.

Opinnäytetyön hankalimmaksi vaiheeksi osoittautui hieman yllättäen verinäytteiden saaminen tutkittavaksi. Pelkästään hevosten näytteiden tutkimiseen päädyttiin, koska niitä oli parhaiten saatavilla ja pystyimme näin keskittymään vain yhdestä eläinlajista koostuvaan otokseen. Toki vieläkin isompi otos olisi lisännyt tutkimuksen luotettavuutta mutta sen toteuttamiseen meillä ei ollut tarpeeksi aikaa. Olisimme tällöin tarvinneet myös enemmän laitteen käyttämiä kyvettejä, joita oli käytössämme vain rajallinen määrä.

Hevosnäytteiden saaminen, käsitteleminen ja analysointi HemoCue[®] WBC DIFF –laitteella sujui hyvin. Koska laite itsessään on erittäin helppo käyttää, ei sen käytön opettelemiseen mennyt juurikaan aikaa ja näytteet saatiin analysoitua nopeasti. Saimme hevosnäytteitä Tampereen Hevosklinikalla tasaiseen tahtiin, joten näytteet päästiin analysoimaan aina lähes saman tien, eikä näytteiden tarvinnut odottaa analysointia muutamaa minuuttia kauempaa. Näyteputkia sekoitettiin huolellisesti ennen näytteen ottamista

kyvettiin, mutta koska tekijöitä oli kaksi, eikä näytteille ollut sovittuna mitään tiettyä sekoitusmäärää, saattoivat eri tekijöiden toimesta sekoitetut näytteet olla sekoitettu hieman eri lailla, mikä on saattanut vaikuttaa tuloksiin.

Sivelyvalmisteiden teossa koimme hieman alkukankeutta, sillä edellisestä sivelyvalmisteiden tekokerrasta oli kulunut aikaa parista kuukaudesta puoleen vuoteen. Sen vuoksi jouduimme alkuun hieman harjoittelemaan ja palauttamaan mieliin oikeat otteet, ennen kuin saimme aikaiseksi riittävän hyviä sivelyvalmisteita, jotka kelpuutettiin erittelylaskentaan. Näytemateriaalina hevosen veri ei juurikaan eroa ihmisen verestä ja sivelyvalmisteiden teossa emme huomanneet olevan eroa ihmisten ja hevosten verinäytteiden välillä.

Lähdemateriaalin kerääminen eläinlääketieteeseen liittyen oli toinen merkittävä haaste opinnäytetyötä tehdessämme. Monia mahdollisia lähdeiteoksia ei ollut saatavissa kirjastoista ja teosten lukumäärä ylipäättään osoittautui suppeammaksi kuin olimme toivoneet. Mielestämme saimme kuitenkin monipuolisesti lähteitä kasaan ja pyrimme teoksia valitessamme etsimään mahdollisimman uutta tietoa.

Opinnäytetyötä ja sen esitutkimusta varten tehdyt sivelyvalmisteet hevosten ja koirien verinäytteistä jäävät Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikkakoulutuksen käyttöön. Tällöin niitä voidaan hyödyntää esimerkiksi bioanalytiikko-opiskelijoiden opetuksessa, kun halutaan tutustua muiden kuin ihmisten verisoluihin tai antaa opiskelijoille mikroskoipoitavaksi ihan mielenkiinnosta tai siten, että opiskelijat eivät tiedä mikroskoipoivansa hevosen tai koiran sivelyvalmistetta.

Koko opinnäytetyöprosessi on ollut hyvin mielenkiintoinen ja antoisa. Työn tekemisen mielekkyyttä on lisännyt se, että uskomme työstä olevan konkreettista hyötyä HemoCue Oy:lle. Olemme päässeet pois mukavuusalueeltamme perehtyessämme hevosten leukosyytteihin ihmisten sijaan ja sen myötä syventäneet osaamistamme leukosyyteistä. Opinnäytetyön tekeminen on pääosin sujunut hyvin, vaikka vaikeudet verinäytteiden ja lähdemateriaalin saamisessa ja suunnitellusta aikataulusta kiinni pitämisessä on ollut omat haasteensa.

Jatkotutkimusaiheiksi ehdotamme tutkimuksen toistamista suuremmalla näytemäärällä ja siten, että kaikista näytteistä olisi saatavilla myös eläinlaboratoriossa määritetty ko-

konaisleukosyyttimäärä ja erittelytulos. Toiseksi jatkotutkimusaiheeksi ehdotamme laitteen soveltuvuuden testaamista myös muille eläimille, joiden hoidossa siitä voi olla hyötyä, kuten koirille.

Haluamme lisäksi kiittää Tampereen Hevosklinikan henkilökuntaa, jotka mahdollistivat hevosten verinäytteiden käytön opinnäytetyössämme ja keräsivät meille tarvitsemamme määrän näytteitä.

10.4 Johtopäätökset

Koska analysoitavien näytteiden määrä on erittäin pieni, ei niiden perusteella voi tehdä varsinaisia johtopäätöksiä laitteen soveltuvuudesta hevosten verinäytteille. Voidaan kuitenkin todeta, että laite toimi moitteettomasti kahdentoista hevosenäytteen analysoinnin aikana, lukuun ottamatta kahden virheilmoituksen saamista, jotka mitä todennäköisimmin olivat seurausta omasta toiminnastamme ja näytteiden käsittelystä eivätkä itse laitteen toiminnasta. Näin ollen opinnäytetyön tuloksia voidaan pitää erittäin lupaavina ja laitteen soveltuvuutta hevosenäytteille kannattaa ehdottomasti tutkia lisää.

LÄHTEET

Dewitt, S. & Grondin, T. 2010. Normal Hematology of the Horse and Donkey. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) Schalm's Veterinary Hematology. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 821–828.

Flatland, B. & Freeman, K.P. 2013. Section 1 – Intro. ASVCP Guidelines: Quality Assurance for Point-of-Care Testing in Veterinary Medicine. American Society for Veterinary Clinical Pathology. Luettu 19.8.2014.
<http://www.asvcp.org/pubs/qas/newQas/PDF/ASVCP%20POCT%20QA%20Guideline%20May%202013.FINAL.pdf>

Flatland, B. & Vap, L.M. 2013. Section 3 - Recommendations for Point-of-Care Hematology Testing in Domestic Mammals. ASVCP Guidelines: Quality Assurance for Point-of-Care Testing in Veterinary Medicine. American Society for Veterinary Clinical Pathology. Luettu 19.8.2014.
<http://www.asvcp.org/pubs/qas/newQas/PDF/ASVCP%20POCT%20QA%20Guideline%20May%202013.FINAL.pdf>

Harvey, J. 2001. Atlas of Veterinary Hematology. Blood and bone marrow of domestic animals. USA: W. B. Saunders Company.

HemoCue Oy. 2011a. Tietoa HemoCuesta. Luettu 7.8.2014.
http://hemocue.fi/Tietoa_HemoCuesta-623.html

HemoCue Oy. 2011b. HemoCue® WBC ja WBC DIFF –järjestelmät. Luettu 7.8.2014.
<http://hemocue.fi/Tuotteet/Valkosolut-604.html>

HemoCue Oy. 2014a. HemoCue® WBC DIFF. Käyttöohje.

HemoCue Oy. 2014b. HemoCue® WBC DIFF Microcuvettes. Käyttöohje.

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

Hoffbrand, A.V. & Moss, P.A.H. 2011. Essential Haematology. 6th edition. Wiley-Blackwell.

Houwen, B. 2000. Blood Film Preparation and Staining Procedures. Laboratory Hematology 6. Carden Jennings Publishing Co., 1–7.

Järvinen, A-K. 1998. Veren valkosolukuvan tulkinnan perusteet. Suomen Eläinlääkäriliiton luentokokoelma. Eläinlääkäripäivät 98. Oulu: Osakeyhtiö Kaleva, 198–205.

Kerr, M.G. 2002. Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Biochemistry and Haematology. 2.painos. Blackwell Science.

Kurvinen, K. & Vanharanta, R. 2012. HemoCue WBC DIFF –vieritestausanalysointimen koestus. KliinLab 29 (3), 41–47.

- Labquality Oy. 2014. Valkosolujen erittelylaskenta, vieritestit. Luettu 14.8.2014. <http://www.labquality.fi/fi/laatu-ulkoinen-laadunarviointi/kierroskuvaukset/hematologia/solulaskenta-ja-solumorfologia/4190-valkosolujen-erittely/>
- Lindberg, S. 2013. Unique built-in QC in a POCT WBC and 5-Part Diff system. Poster. Euromedlab Milano 2013.
- Lindberg, S., Jönsson, I., Nilsson, M., Johnsson, E., & Jonasson-Bjäräng, T. 2014. A Novel Technology for 5-Part Differentiation of Leukocytes Point-of-Care. *Point of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology* 13 (2), 27–30.
- Meadows, R. & Young, K. 2010. Eosinophils and Their Disorders. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 281–289.
- Nabity, M. & Ramaiah, S. 2010. Neutrophil Structure and Biochemistry. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 263–267.
- Pelliniemi, T-T. 1998. Veren sivelyvalmiste. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim* 114 (12), 1177–1184.
- Pohlman, L. 2010. Basophils, Mast Cells, and Their Disorders. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 290–297.
- Price, C.P., St John, A. & Hicks, J.M. 2004. *Point-of-Care Testing*. 2nd edition. Washington DC: AACCPress.
- Ramaiah, S., Walcheck, B. & Weiss, D. 2010. Neutrophil Distribution and Function. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 268–274.
- Reagens Oy. 2003. May- Grünwald- Giemsa -värjäysliuokset. Käyttöohje.
- Souza, C. & Weiss, D. 2010. Monocytes and Macrophages and Their Disorders. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 298–306.
- Suomen Hippos ry. 2004. Lämminverisen ravihevosen jalostusohjesääntö. Luettu 20.8.2014. http://www.hippos.fi/files/1455/jalohje_lv_net.pdf
- Tuokko, S., Rautajoki A. & Lehto L. 2009. *Kliiniset laboratorionäytteet - opas näytteiden ottoa varten*. 1.–2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Tuomi, J. 2007. *Tutki ja lue. Johdatus tieteellisen tekstin ymmärtämiseen*. 1.–2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Vetlab Oy. 2014. *Eläinlaboratorio Vetlab. Laboratoriokäsikirja 2014*.
- Vieritestaus terveydenhuollossa. 2009. Labqualityn asiantuntijasuositus. Moodi 6/2009.

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

Weiser, G. 2012a. Introduction to Leukocytes and the Leukogram. Teoksessa Thrall, M.A., Weiser, G., Allison R.W. & Campbell T.W (ed.) 2012. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2nd edition. Wiley-Blackwell, 118–126.

Weiser, G. 2012b. Interpretation of Leukocyte Responses in Disease. Teoksessa Thrall, M.A., Weiser, G., Allison R.W. & Campbell T.W (ed.) 2012. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2nd edition. Wiley-Blackwell, 127–140.

Weiser, G. 2012c. Laboratory Technology for Veterinary Medicine. Teoksessa Thrall, M.A., Weiser, G., Allison R.W. & Campbell T.W (ed.) 2012. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2nd edition. Wiley-Blackwell, 3–33.

Welles, E. 2010. Interpretation of Equine Leukocyte Responses. Teoksessa Wardrop, K. & Weiss, D. (ed.) Schalm's Veterinary Hematology. 6th edition. Blackwell Publishing Ltd, 314–320.

LITTEET

Näyte- numero	WBC DIFF -tulokset 1			WBC DIFF -tulokset 2			WBC DIFF -tulokset 3			Manuaalierittely			
	10 ⁹ /l	%-osuus	Err01	10 ⁹ /l	Err01	Err01	10 ⁹ /l	Err01	Err01	10 ⁹ /l	Err01	Err01	%-osuus
1	NEU LYM MONO EOS BASO	2,4 1,9 0,4 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	51 39 9 1 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	2,5 1,9 0,4 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	51 39 9 1 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	67 28,2 3,2 1,2 0,2
2	NEU LYM MONO EOS BASO	2,9 3,4 0,4 0,3 0	NEU LYM MONO EOS BASO	41 49 6 4 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	3,5 3,8 0,5 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	44 48 6 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	57 36 5,5 1,5 0,3
3	NEU LYM MONO EOS BASO	2,9 2,4 0,4 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	49 41 7 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	2,8 2,2 0,4 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	50 41 7 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	61 35,7 2 1 0
4	NEU LYM MONO EOS BASO	3,7 4 0,5 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	44 48 6 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	3,7 3,4 0,7 0,2 0	NEU LYM MONO EOS BASO	46 43 8 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	58,6 33,8 4,8 0,7 0,2
5	NEU LYM MONO EOS BASO	3,8 3,1 0,7 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	49 41 9 1 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	3,9 3,1 0,7 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	50 40 9 1 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	55,5 38,8 4,8 0,7 0,2
6	NEU LYM MONO EOS BASO	5,5 4,4 0,9 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	50 40 8 1 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	5,2 4,1 0,9 0,2 0	NEU LYM MONO EOS BASO	50 39 9 2 0	Err01 Err01 Err01 Err01 Err01	NEU LYM MONO EOS BASO	60,1 34,4 3,9 1,3 0,3

tulokset

1(2)

(jatkuu)

2 (2)

Näyte- numero	WBC DIFF -tulos 1		WBC DIFF -tulos 2		WBC DIFF -tulos 3		Manuaalittisesti			
	10 ⁹ /l	%-osuus	10 ⁹ /l	%-osuus	10 ⁹ /l	%-osuus	10 ⁹ /l	%-osuus		
7	NEU LYM MONO EOS BASO	3 3,3 0,6 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	43 48 8 1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	3,1 3,3 0,4 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	5,2 3,7 0,1 0,2 0	NEU LYM MONO EOS BASO	57,4 40,4 0,8 1,4 0
8	NEU LYM MONO EOS BASO	4,3 3,4 0,5 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	52 41 7 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	3,6 3,7 0,7 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	NEU LYM MONO EOS BASO	NEU LYM MONO EOS BASO	67,2 28,4 3,2 0,8 0,4
9	NEU LYM MONO EOS BASO	4,6 4,4 0,7 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	46 45 7 1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	3,9 3,9 0,7 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	4,1 4,3 1 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	54,3 41,6 3,9 0 0,3
10	NEU LYM MONO EOS BASO	4,2 5 0,4 0,3 0	NEU LYM MONO EOS BASO	42 51 4 3 0	NEU LYM MONO EOS BASO	4,3 5,1 0,4 0,3 0	NEU LYM MONO EOS BASO	5,3 4,2 0,3 0,2 0	NEU LYM MONO EOS BASO	50 44,8 2,6 2 0,2
11	NEU LYM MONO EOS BASO	3,5 2,8 0,5 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	51 41 7 1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	3,6 2,9 0,6 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	5,1 2,1 0,1 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	69,2 27,7 2,7 0,5 0
12	NEU LYM MONO EOS BASO	3,1 2,8 0,5 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	48 43 8 1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	3 2,8 0,6 0 0	NEU LYM MONO EOS BASO	4,5 2,1 0,1 0,1 0	NEU LYM MONO EOS BASO	66,5 30,2 2,5 0,7 0,2

Liite 2. Manuaalisen leukosyyttien erittelylaskennan tulokset.

Näyte- numero	Neutrofiilit					keski- arvo	Lymfosyytit					keski- arvo	Monosyytit					keski- arvo	Eosinofiilit					keski- arvo	Basofiilit					keski- arvo	Yhteensä %								
	70	66	68	64	64		28	33	26	27	27		33	32	32	32	32		31	30	34	34	35		32	32	32	32	32			30	30	30	30	30	30	30	30
1	70	66	68	64	64	67	28	33	26	27	27	28,2	1	1	4	4	6	6	6	6	3,2	1	0	2	1	2	1,2	0	0	0	1	0,2	100						
2	53	57	54	63		57	37	40	35	32		36	8	2	8	4					5,5	1	1	3	1		1,5	1	0	0	0,3	100							
3	67	63	59	52	64	63	61	30	37	38	45	34	30	2	2	2	4	4	4	2,0	1	0	1	1	0	3	1,0	0	0	0	0	100							
4	55	62	61	57	58		58,6	37	29	34	34	35	5	2	4	8	6	6	6	5,0	3	6	0	1	1		2,2	0	1	1	0,4	100							
5	61	47	56	56	64	49	55,5	36	49	36	39	30	43	3	6	5	4	8	8	4,8	0	1	2	0	1	0	0,7	0	0	0	1	0,2	100						
6	61	62	64	61	65	55	60,1	30	33	32	32	32	39	43	3	6	3	4	2	3,9	4	0	1	1	0	2	1	1,3	0	1	0	0,3	100						
7	55	61	54	55	62		57,4	43	37	41	45	36			0	3	0	1		0,8	2	2	2	0	1		1,4	0	0	0	0	100							
8	67	67	66	70	66		67,2	27	27	28	27	33			6	4	3	2	1	3,2	0	2	2	0	0		0,8	0	0	1	1	0,4	100						
9	56	55	57	57	46	59	50	54,3	38	41	41	38	50	37	46	6	4	2	5	3,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	100						
10	57	55	47	45	48		50	39	40	46	50	49			3	2	3	2		2,6	0	3	4	2	1		2,0	1	0	0	0	0,2	100						
11	66	77	66	64	72	70	69,2	29	22	34	32	22	27		3	1	0	4	5	2,7	2	0	0	0	1	0	0,5	0	0	0	0	0	100						
12	66	68	65	74	62	64	66,5	31	30	31	24	33	32		1	2	2	2	5	2,5	1	0	2	0	0	1	0,7	1	0	0	0	0,2	100						