



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Liida Lähde

Hukkumisdiagnoosin varmistamiseksi tehtävien piileväpreparaattien valmis- tusmenetelmän kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

24.9.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	lida Lähde Hukkimisdiagnoosin varmistamiseksi tehtävien piileväpreparaattien valmistusmenetelmän kehittäminen 39 sivua + 2 liitettä 24.9.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine	-
Ohjaajat	Laboratoriotutkija Johanna Virri Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeuslääketieteellisessä histologian laboratoriossa kesällä 2019. Työn tavoitteena oli kehittää hukkimisdiagnoosin varmistuksessa käytettävää piileväanalyysia.</p> <p>Vesistöillä on tyypillinen piilevälajisto, joka vaihtelee mm. vuodenajan mukaan. Tätä tietoa käytetään apuna esimerkiksi silloin, kun epäillään hukkimiskuolemaa tai vainaja löytyy vesistön läheisyydestä. Ihmisen hukkuessa elimistöön kulkeutuu piileviä ensin keuhkoihin ja siitä edelleen perifeerisen verenkierron mukana muihin elimiin. Vainajasta otetaan oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen yhteydessä näytteet keuhkoista, maksasta, munuaisista sekä aivoista. Lisäksi poliisi toimittaa usein vainajan löytöpaikalta otetun vesinäytteen. Piilevänäytteet keitetään keittokolveissa vahvassa typpihapon ja vetyperoksidin vesiliuoksessa, jotta orgaaninen aines hajoaa. Piilevien kitiinikuori kestää happokäsittelyn, ja levät ovat sentrifugoitavissa erilleen. Näytteistä valmistetaan mikroskoipoitavat piileväpreparaatit, jotka toimitetaan analysoitavaksi Helsingin yliopistolle.</p> <p>Tällä hetkellä piilevien keittämisestä vastaa oikeuslääkinnän yksikön obduktioteknikot ja preparaattien valmistuksesta histologian laboratorio. Vuonna 2021 oikeuslääkintäyksikkö muuttaa uusiin tiloihin, jolloin vastuu myös piilevänäytteiden keittämisestä siirtyy histologian laboratoriolle. Tämän vuoksi haluttiin kehittää nykyistä keittoprosessia sekä preparaattien valmistusmenetelmää ja tutustua vaihtoehtoihin piilevien eristysmenetelmiin. Projektin aikana kokeiltiin keittää piileviä ja huomattiin, että reagenssien määrää voidaan vähentää nykyisestä niin, että näyteliuoksen määrä pienenee ja näin ollen piileväsaanto paranisi. Keittäminen onnistui hyvin lämpölevyllä dekanterilasissa. Kokeita tehtiin myös preparaattien valmistuksessa ja tärkein havainto oli se, että nykyisellä menetelmällä kaikki kudospalassa olevat piilevät eivät päädy näytelasille.</p> <p>Tärkein tavoite tässä projektissa oli poistaa piileväanalyysin virhelähteitä ja parantaa piileväsaantoa. Koska kyseistä menetelmää ei ollut kehitetty sen käyttöönoton jälkeen, kaikki tässä työssä tehdyt havainnot koettiin hyödylliseksi ja ne antoivat arvokasta lisätietoa histologian laboratorion työntekijöille, mikä auttaa menetelmän toteuttamista uusissa tiloissa.</p>	
Avainsanat	piilevät, hukkimisdiagnoosi, happodigestio

Author Title Number of Pages Date	lida Lähde Production Method Development for Microscopic Diatom Slides to Confirm Drowning Diagnosis 39 pages + 2 appendices 24 September 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Professional Major	-
Instructors	Johanna Virri, Laboratory Scientist Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>This study was carried out in the forensic histology laboratory at the National Institute for Health and Welfare during summer 2019. The target of the study was to develop a diatom test method, which is exploited to confirm drowning cases.</p> <p>Bodies of water have typical species of diatoms which vary between different seasons. This information is employed when the police suspect death by drowning or a dead person is found in or nearby water. When a person inhales water while drowning, the diatoms that are present in the drowning medium first enter lungs and then other organs through the bloodstream. When performing the forensic autopsy, forensic pathologist collects tissue samples from lungs, liver, kidneys and brains for diatom test. Additionally, the police deliver a water sample collected from the body of water where the dead person was found. Diatom samples are boiled in round-bottom flasks with strong nitric acid, hydrogen peroxide and distilled water until organic material is dissolved. The silica frustule of diatoms is strong enough to tolerate the acid, so it is possible to centrifugate diatoms apart and make microscopic slides from the pellet. Slides are delivered to and analyzed at the University of Helsinki. Currently the autopsy technicians are in charge of boiling diatom samples. Slides are prepared in the histology laboratory. In 2021 the department of Forensic Medicine will be relocated and the histology laboratory takes charge of boiling diatom samples. Due to relocating, current boiling method and slide sample preparation insisted improvements. One goal was also to explore alternative digestion methods.</p> <p>During this study, diatom sample boiling was experimented and it was noticed that it is possible to decrease the quantity of chemicals, which leads to better yield of diatoms on the slides. Boiling was performed in the beaker on the hotplate and it worked well. Tests were performed also for preparing slides and the most valuable result was that the current method causes diatom loss while sample preparation.</p> <p>The main target in this project was to remove aberrations of the diatom test and increase the yield of diatoms. The current method has never been developed since adopted into use, so all observations during this study were experienced useful and gave valuable information for the histology laboratory to perform diatom test in the future.</p>	
Keywords	diatoms, drowning diagnostics, acid digestion

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Oikeuslääketieteellinen kuolinsyytutkinta ja histologia	2
3	Hukkumisdiagnostiikka	3
3.1	Hukkuminen	3
3.2	Tutinnan aloittaminen ja oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus	4
3.3	Piilevien keittomenetelmän kuvaus	6
3.4	Piileväpreparaattien valmistusmenetelmän kuvaus	7
3.5	Piileväanalyysin kontaminaatiolähteet	10
3.6	Muita piilevien eristysmenetelmiä	11
3.6.1	Suolahappodigestio	12
3.6.2	Happo-formaliinidigestio	13
3.6.3	Entsyymidigestio	13
4	Piilevät	14
4.1	Piilevistä yleisesti	14
4.2	Piilevien rooli hukkumisessa ja rikostutkinnassa	15
5	Nykyisen menetelmän haasteet	16
5.1	Piilevien keittomenetelmä	16
5.2	Piileväpreparaattien valmistusmenetelmä	16
6	Menetelmän kehitys projektin aikana	17
6.1	Preparaattien valmistusmenetelmän kehittäminen	17
6.1.1	Koe 1	17
6.1.2	Koe 2	17
6.2	Keittomenetelmän kehittäminen	18
6.2.1	Koe 1	18
6.2.2	Koe 2	25

7	Entsyymidigestio	30
8	Tulokset	31
8.1	Preparaattien valmistus	31
8.2	Keittomenetelmä	35
8.3	Muut parannukset	36
9	Yhteenveto	36
	Lähteet	38

Liitteet

Liite 1. Nykyinen ohje piilevänäytteidenottoon ja -käsittelyyn oikeuslääkäreille ja obduktioteknikoille

Liite 2. Nykyinen ohje piileväpreparaattien valmistukseen histologian laboratorion työntekijöille

Lyhenteet

SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksessa (THL) oikeuslääkinnän yksikössä histologian laboratorioissa. Projektin suunnitteluun ja toteuttamiseen osallistui histologian laboratorion työntekijöiden lisäksi oikeuslääkinnän yksikön obduktioteknikot sekä Helsingin yliopiston paleoekologian dosentti Jan Weckström.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Helsingissä sijaitsevan histologian laboratorion tehtäviin kuuluu pääasiassa oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa elimistä otettujen kudoksenäytteiden histologinen käsittely ja -värjäys sekä hukkumiskuolemien selvittämiseksi pyydettyjen piileväpreparaattien valmistus. Projektin tarkoituksena oli kehittää hukkumisdiagnostiikassa toteutettavaa piileväanalyysia. THL:n oikeuslääkinnän yksikkö Helsingissä on ainoa paikka Suomessa, jossa se on käytössä. Oikeuslääketieteen tohtori Antti Auer on kirjoittanut aiheesta väitöskirjan vuonna 1986, ja nykyiset menetelmäohjeet on luotu sen pohjalta. Kyseinen väitöskirja toimi tässä projektissa tärkeänä lähdetietona.

Vesistöillä on tyypillinen piilevälajisto, joka vaihtelee mm. vuodenajan mukaan. Tätä tietoa käytetään apuna esimerkiksi silloin, kun epäillään hukkumiskuolemaa tai vainaja löytyy vesistön läheisyydestä. Ihmisen vetäessä vettä henkeen elimistöön kulkeutuu piileviä ensin keuhkoihin ja siitä edelleen perifeerisen verenkierron mukana muihin elimiin. Piileväanalyysi tukee hukkumisdiagnoosia mutta ei yksinään riitä varmistamaan hukkumistausta, ja se on paljon kritisoitu menetelmä. Piileväanalyysia käytetään paljon mm. Etelä-Amerikassa, Japanissa ja Euroopassa. Se on kuitenkin täysin kvalitatiivinen menetelmä näytteiden monimuotoisen laadun takia. Suomessa hukkumistapausten tutkintaan osallistuu poliisi, oikeuslääkäri, Helsingin yliopiston tutkija, THL:n Helsingin toimipisteen oikeuslääketieteellisiä ruumiinavauksia suorittavat obduktioteknikot sekä histologian laboratorion henkilökunta.

Piileväanalyysi käynnistyy poliisin pyynnöstä, kun oikeuslääkäri kerää ruumiinavauksessa näytteet keuhkoista, maksasta ja munuaisista sekä aivoista, kun epäillään hukkumiskuolemaa. Poliisi antaa lyhyen lausunnon vainajan löytöpaikasta sekä kuolemaan liittyvistä tiedoista. Poliisi toimittaa usein myös hukkumisympäristöstä kerätyn

vesinäytteen, jonka piileväprofiilia voidaan verrata kudosnäytteiden piileväprofiilin kanssa. Näytteiden käsittelyn aloittaa obduktioteknikko, joka keittää ne typpihapon, vetyperoksidin ja tislattun veden seoksessa. Keittäessä kudus hajoaa ja sulaa nesteeseen, ja sen jatkokäsittely suoritetaan histologian laboratoriossa. Näytteet neutralisoidaan sentrifugoinnin ja tislattun veden avulla ja saadusta pelletistä tehdään mikroskopoitava preparaatti, joka toimitetaan Helsingin yliopistolle analysoitavaksi. Yliopistolla tapauksesta annetaan lausunto, jonka avulla oikeuslääkäri sekä poliisi saa mahdollisesti lisätietoa vainajan kuolinsyystä.

THL:n oikeuslääketieteen yksikkö on siirtymässä vuonna 2021 uusiin tiloihin. Vastuu piilevänäytteiden happokeittämisestä siirtyy obduktioteknikoilta histologian laboratorion työntekijöille, minkä vuoksi menetelmää haluttiin kehittää ja sen työturvallisuutta parantaa. Tarkoituksena oli myös tutkia vaihtoehtoisia piilevien eristysmenetelmiä erilaisten tieteellisten julkaisujen avulla. Piileväanalyysin kehittäminen koettiin tarpeelliseksi myös siksi, että se auttaa oikeuslääkäriä antamaan vainajan omaisille tarkempaa tietoa kuolinsyystä. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli poistaa piilevänäytteiden keittämisessä ja preparaattien valmistuksessa syntyviä virhelähteitä ja viedä tuloksia luotettavampaan ja toistettavampaan suuntaan.

2 Oikeuslääketieteellinen kuolinsyytutkinta ja histologia

THL:n oikeuslääkintäyksikkö vastaa oman alueensa oikeuslääketieteellisistä ruumiinavauksista, kuolinsyyn selvityksen ohjauksesta Suomessa, kuolinsyytodistusten tarkastuksesta, viranomaisten avustamisesta oikeudellisten sekä rikosoikeudellisten kysymysten ratkaisemisesta hammaslääketieteellisin keinoin, oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa elimistä otettujen kudosnäytteiden histologisesta käsittelystä sekä värjäyksestä, asiantuntijana toimimisesta oikeuslääkintään liittyvissä kysymyksissä, sekä alansa tutkimus- ja kehittämistoimintaan osallistumisesta. Samassa yksikössä tehdään myös oikeustoksikologisia määrittäyksiä ruumiinavauksessa kerätyistä näytteistä, kuten virtsasta ja verestä. Oikeuslääketieteellisiä ruumiinavauksia tehdään Suomessa viidellä paikkakunnalla: Helsingissä, Turussa, Tampereella, Kuopiossa sekä Oulussa. [1.]

THL:lla on Suomessa kaksi oikeuslääketieteellistä histologian laboratoriota, Turussa ja Helsingissä. Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yksikössä Ruskeasuolla. Histologian laboratorion tehtäviin kuuluu oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa elimistä otettujen kudoksenäytteiden histologinen käsittely ja -värjäys oikeuslääkärin tekemän lähetteen perusteella. Lisäksi Helsingin yksikön laboratorio vastaa hukkumiskuolemien selvittämiseen pyydettyjen piileväpreparaattien valmistuksesta ja obduktioteknikot piilevänäytteiden happokeittämisestä.

Tällä hetkellä Helsingin yksikön histologian laboratoriossa käsitellään 10-prosenttisessa formaliinissa fiksoitua kudospainetta, tuorekudoksenäytteitä sekä piilevänäytteitä. Näytteet otetaan oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa ja toimitetaan laboratorioon joko suoraan tai postitse. Näytteiden kulkuun laboratoriossa kuuluu esikäsittely, kudospainetta, parafiinivalu, leikkaaminen mikrotomilla, preparaattien värjäys, toimitus tutkijalle tai oikeuslääkärille sekä arkistointi. Piilevänäytteiden käsittelystä ja hukkumisdiagnostiikasta, joita opinnäytetyö käsittelee, on kerrottu tarkemmin hukkumisdiagnostiikkaa käsittelevässä luvussa 3.

3 Hukkumisdiagnostiikka

3.1 Hukkuminen

Hukkuminen on maailmassa kolmanneksi yleisin tahaton kuolinsyy ja käsittää 7 % kaikista onnettomuuden aiheuttamista kuolemista. Hukkumiskuolemia tapahtuu maailmanlaajuisesti arviolta 360 000 vuodessa. Maailman terveysjärjestö WHO:n mukaan hukkuminen on prosessi, jossa henkilö tukehtuu upotessaan tai hänet upotetaan veteen, mikä johtaa kuolemaan. Riskiryhmään kuuluu miehet, lapset, vesiturheilua harrastavat (veneily, kalastus), vesistöjen läheisyydessä asuvat, tulvien aiheuttamien onnettomuuksien uhrin ja vesiteitse matkustavat. Muita riskitekijöitä ovat mm. päihteiden käyttö vesistöjen läheisyydessä sekä sairauskohtaukset kuten epileptinen kohtaus tai sydänkohtaus. [2.]

Suomessa tapahtuneet kuolemaan johtaneet hukkumistapaukset vuosina 2017 ja 2018 ovat lueteltuina taulukossa 1 [3].

Taulukko 1. Suomen hukkumistilastot vuosina 2017 ja 2018 [3]

	2017	2018
vesiliikenne	20	21
uiminen	7	32
hukkuminen jäihin	15	16
hukkuminen sukeltaessa	2	1
veteen putoaminen	5	2
tuntematon syy	31	21
hukkuminen ulkomailla	3	1
yhteensä	83	94

Pahimmassa tapauksessa hukkumiseen voi riittää vain suun sekä nenäaukkojen jääminen nestepinnan alapuolelle. Tällaisiin tapauksiin liittyy yleensä tajuttomuus ja/tai päihitteet. Ihmisiä on hukkunut veden lisäksi mutaan, liejuun sekä olutsammioihin. Hukkuneelle tehdään mahdollisimman nopeasti löytymisestä ruumiin ulkotarkastus, jossa tehdään merkinnät mahdollisista vammoista sekä kuoleman jälkeisistä muutoksista. Hukkunut ruumis on yleensä vatsallaan ja suu- sekä sierainaukoissa on valkoista vaahtoa. Veden virtaus voi aiheuttaa ruumiin kulkeutumisen, ja ulkoiset vammat voivat johtua ruumiin kolhiutumisesta pohjaan, tukkeihin tai kiviin. Vainajan keuhkot ovat usein laajat, turpeat ja vaalentuneet. [4, s. 226–228.]

3.2 Tutkinnan aloittaminen ja oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus

Henkilön kuolinsyy selvitetään vainajaa koskevien sairaustietojen sekä elämän aikana tehtyjen ja ruumiiseen kohdistuneiden tutkimusten avulla. Suomessa vainajaa ei saa haudata ennen kuin kuolinsyy on selvillä. Kuolinsyytutkinnan vastuu on aina hoitavalla lääkäriellä sekä poliisilla. Tapauksissa, joissa vainaja ei ole ollut lääkärin hoidon alaisena ja epäillään, että kuolemaan on johtanut jokin muu syy kuin sairaus, tehdään vainajalle oikeuslääketieteellinen kuolinsyyn selvitys. Ensisijaisesti ruumis tarkastetaan vain ulkoisesti, mutta tarpeen vaatiessa sille tehdään oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus. Lopullisen kuolinsyyn päättely on lääkärin tehtävä, ja sen tehtyään tämän on annettava vainajalle hautaamislupa. [4, s. 76–83.]

Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus tehdään poliisin määräyksestä ilman omaisten suostumusta. Avauksen suorittaa oikeuslääkäri, joka saa ruumiinavausmääräyksen

mukana tarpeelliset tiedot vainajan henkilöllisyydestä, kuolinajasta, kuolinpaikasta, kuolinpaikkakunnasta, milloin vainaja on nähty viimeksi elossa ja kuka on todennut kuoleman. [4 s. 86–88.] Kuolinsyyselvityksen tavoitteena on varmistaa vainajan henkilöllisyys, arvioida kuoleman ajankohta, saada käsitys kuolinhetkellä vallinneista olosuhteista ja kuolontapahtumaan liittyvistä seikoista, määritellä kuolemansyy ja kuolemanluokka sekä laatia kuolemansyyn selvittämiseen liittyvät asiakirjat [5].

Vesistöstä tai sellaisen läheisyydestä löydetty vainaja on joko kuollut hukkumalla tai sitten ei. Tällaisen tapauksen selvittäminen vaatii vastauksen kahteen kysymykseen: mikä on kuolemaan johtanut syy ja millä tavoin henkilö on kuollut. Tällaisen tapauksen ratkaiseminen on usein vaikeaa, koska on selvitettävä, onko ruumiin veden kontrolloimaan mätänemisprosessiin johtanut hukkuminen ja vedessä oleminen vai jokin muu syy. Piileväanalyysi antaa lisätietoa vedestä löytyneen ruumiin kuolinsyystä, mutta ei yksinään voi varmistaa sitä. On mahdollista, että vesistöstä löydetyn vainajan kuolinsyy ei ole hukkuminen tai kuivalta maalta löydetty vainaja on nimenomaan kuollut hukkumalla. Tällaisissa tapauksissa kuolemaan on voinut johtaa jokin toinen syy, tai kuolema on ollut väkivaltainen ja kyseessä on murha tai tappo. Tämä johtaa siihen, että kuolinsyytutkinnassa on etsittävä vastauksia lisäksi seuraaviin kysymyksiin: tapahtuiko kuolema hukkumalla, hukkuiko vainaja sen löytöpaikalla, johtiko yksinään vedessä oleminen kuolemaan vai onko tilanteessa ollut läsnä muita merkittäviä tekijöitä, oliko ruumis upotettu veteen vasta kuoleman jälkeen ja onko kyseessä henkirikos. Koska hukkumisesta ruumiille aiheutuvat vammat ja muutokset vaihtelevat, kuolinsyyn selvittäminen vaatii erilaisia laboratorioanalyyssejä käyttäen ruumiinavauksessa otettuja näytteitä. Näistä ehdottomasti tärkein on piileväanalyysi. [6, s. 1–2.]

Vainajat, jotka löytyvät vedestä tai niiden epäillä hukkuneen, ovat joko voineet kuolla vedessä, tai ne ovat joutuneet sinne vasta kuoleman jälkeen jonkin syyn seurauksena. Tällaisten ruumiiden tausta on usein jokin seuraavista: vahingollinen ja itsemurhan aiheuttama hukkuminen, hukkumiseen johtanut henkirikos, vedestä pois siirtäminen tai ruumiin siirtäminen veteen kuoleman jälkeen. Vahingolliset ja itsemurhan aiheuttamat hukkumistapaukset johtuvat usein joko virkistystoiminnasta (vesiurheilu, uiminen, kalastus), sairauskohtauksesta (esim. sydänkohtaus) tai päihteistä (esim. alkoholimyrkytys tai yliannostus). Tällaisiin kuolemantapauksiin voi johtaa esimerkiksi risteilyaluksen uppoaminen tai lentokoneonnettomuus, jolloin hypotermialla on suuri rooli kuolinsyössä ja

hukumisessa. Hukkumiseen johtavissa itsemurhatapauksissa henkilö on usein psykoottisessa mielentilassa tai kärsii vakavista mielenterveysongelmista. Tällaiset uhrin saattavat esimerkiksi käyttää painavia esineitä, kuten kiviä apuna hukuttautumisessa. Hukkuneista ruumiista löytyy usein jälkiä väkivallasta, kun kyseessä on henkirikos. Yleisimmät vammat ovat päähän kohdistunut isku sekä kuristamisesta johtuvat jäljet uhrin kaulassa. On kuitenkin mahdollista, että ruumiissa ei ole jälkiä väkivallasta, mutta kyseessä on silti henkirikos. Tällaisten tapausten selvittämisessä auttaa usein löytöpaikan ympäristöstä löydetty johtolangat esimerkiksi murhan tekoväline. [6, s. 8–9.]

Hukkuminen kylvyssä voi johtua sairauskohtauksesta, lääkkeiden tai päihteiden yliannostuksesta. Kyseessä voi olla myös henkirikos tai itsemurha. Yleisin näistä kuolinsyistä on sairaskohtaus. Piileviä on talousvedessä hyvin vähän, joten piileväanalyysin merkitys tällaisten kuolemien tutkinnassa ei ole kovin merkittävä. Kylpykuolemien ratkaisemiseksi ruumiinavauksella ja vainajan sairaushistorialla on suurempi merkitys. [6, s. 12–13.]

Ruumiin löytäminen vedestä ei aina tarkoita sitä, että kyseisen vainajan kuolinsyy on hukkuminen. Tämä on voinut pudota veteen esimerkiksi yliannostuksen seurauksena tai henkirikoksen tekijä on siirtänyt ruumiin veteen. Henkirikostapauksissa ruumis on lähes tulkoon aina heitetty vesistöön ja siihen on voitu kiinnittää painoja uppoamisen varmistamiseksi. Lisätietoa tällaisista vainajista antaa ruumiista tehdyt toksikologiset tutkimukset, kuten huumausaine- ja alkoholipitoisuuden mittaaminen veri- tai virtsanäytteestä. On myös mahdollista, että kuivalta maalta löydetty ruumis on ollut kuoleman jälkeen vedessä. Ruumis on voitu siirtää vedestä maalle tai se on yritetty esimerkiksi polttaa. Tällöin ruumiinavauksen yhteydessä yleensä huomataan, että vainajalla on nestettä keuhkoissa ja/tai mahalaukussa. Myös tällaisissa tapauksissa piileväanalyysi antaa kuolinsyyistä arvokasta lisätietoa. [6, s. 13–14.]

3.3 Piilevien keittomenetelmän kuvaus

Tällä hetkellä piilevät eristetään kudokset sekä vesinäytteistä keittämällä ne typpihapon ja vetyperoksidin vesiliuoksessa. Typpihappo hajottaa kudoksen, ja vetyperoksidi hapettaa orgaanista materiaalia ja näin ollen kirkastaa näytteen, jotta piilevät erottuvat näytettä mikroskopoitaessa. Vetyperoksidilla on tutkittu olevan myös hiilipölyä sitova vaikutus happokeitossa [7].

Ruumiinavauksen yhteydessä obduktioteknikko ottaa vainajasta yleensä kolme eri kudoksenäytettä ja joissain tapauksissa otetaan myös luuydin- tai verinäyte. Kudoksenäytteitä otetaan 5–50 grammaa ja ne merkitään kirjaimin A, B ja C. A-näyte on keuhkoa ja se on näytteistä tärkein, sillä ensisijaisesti piileviä löytyy hukkuneen tai veteen uponneen vainajan keuhkoista. B-näytteeseen yhdistetään maksa sekä munuaiset ja C-näyte on otettu aivoista. Jokaista näytettä otetaan kaksi kappaletta, joista toinen siirretään talteen, jos näytteet joudutaan jostain syystä keittämään uudestaan.

Tällä hetkellä kudoksenäytteiden keittämisestä vastaavat obduktioteknikot noudattavat keittämistä varten laadittua ohjetta suurpiirteisesti. Jokaisella keittäjällä on työssä oma käsialansa, ja ohjeita annetaan lähinnä suullisesti kokemuksen pohjalta.

Näytteiden käsittely aloitetaan siirtämällä kukin näyte 0,5 litran keittokolviin, johon on merkitty tapausnumero ja se, onko kyseessä A, B vai C-näyte. Näytettä punnitaan alkuperäisen ohjeen mukaan 20–50 grammaa, mutta todellisuudessa määrät vaihtelevat 5–60 gramman välillä, sillä muilta avauspaikkakunnilta tulevat piilevänäytteet kerätään tällä hetkellä pieniin 50 ml:n näyterpurkkeihin. Jokaiselle kudoksenäytteelle käytetään omia instrumentteja kontaminaation välttämiseksi. Kolveihin lisätään silmämääräisesti noin 250 ml tislattua vettä kanisterista. Kolvit asetetaan lämmityspeisiin ja niihin lisätään silmämääräisesti arvioiden 20–60 ml vahvaa typpihappoa (65 %), sekä 100–150 ml vetyperoksidia (30 %) suoraan laboratoriopullostasta kaataen. Tämän jälkeen näytteitä keitetään +100 °C:ssa niin kauan, kunnes kaikki orgaaninen aines on hajonnut ja näyte on tarpeeksi kirkas. Keittämisen pituus vaihtelee suuresti, mutta yleensä se kestää kahdesta neljään tuntia. Obduktioteknikko vie valmiit näytteet histologian laboratoriossa olevaan vetokaappiin päivän päätteeksi. Tarkemmat ohjeet piilevänäytteiden keräämiseen ja näytteiden keittämiseen on liitteessä 1. Vesinäytteet keitetään samalla tavalla, jotta ne ovat vertailukelpoisia kudoksenäytteiden kanssa.

3.4 Piileväpreparaattien valmistusmenetelmän kuvaus

Tällä hetkellä tapauksia käsitellään rutiinisti vain yksi päivässä ja näytteitä on yleensä 3–5. Rutiininäytteiden lisäksi käsitellään usein myös poliisin vainajan löytöpaikalta ottama vesinäyte sekä 0-näyte (joka 10:n tapauksen jälkeen), jolla varmistetaan, että

laboratorion käyttämä tislattu vesi ei ole kontaminoitunut piilevillä. Näytteiden käsittely oikeuslääketieteellisessä histologian laboratoriossa alkaa piilevätutkimuspyynnön eli lähetteen vastaanottamisella. Lähetteestä otetaan ylös kyseisen tapauksen numero, vainajan nimi, paikkakunta, jossa kyseisen vainajan ruumiinavaus on suoritettu, sekä tutkimusta pyytävän oikeuslääkärin nimi.

Keittämisen suorittanut obduktioteknikko on tuonut näytteet edellisenä päivänä histologian laboratoriossa olevaan vetokaappiin, jotta piilevistä mahdollisimman suuri osa laskeutuisi keittokolvin pohjalle yön aikana. Histologian laboratorion työntekijä aloittaa näytteiden käsittelyn merkitsemällä kaikille näytteille oman 50 ml:n sentrigufiputken ja jokaiseen putkeen kyseisen tapauksen numeron. Piilevänäytteitä käsitellessä on noudatettava erityistä huolellisuutta ristikontaminaation välttämiseksi. Piileviä löytyy myös hanavedestä ja käsipaperien valmistuksessa käytettävästä sellusta, joten niiden joutumista näytteisiin on vältettävä.

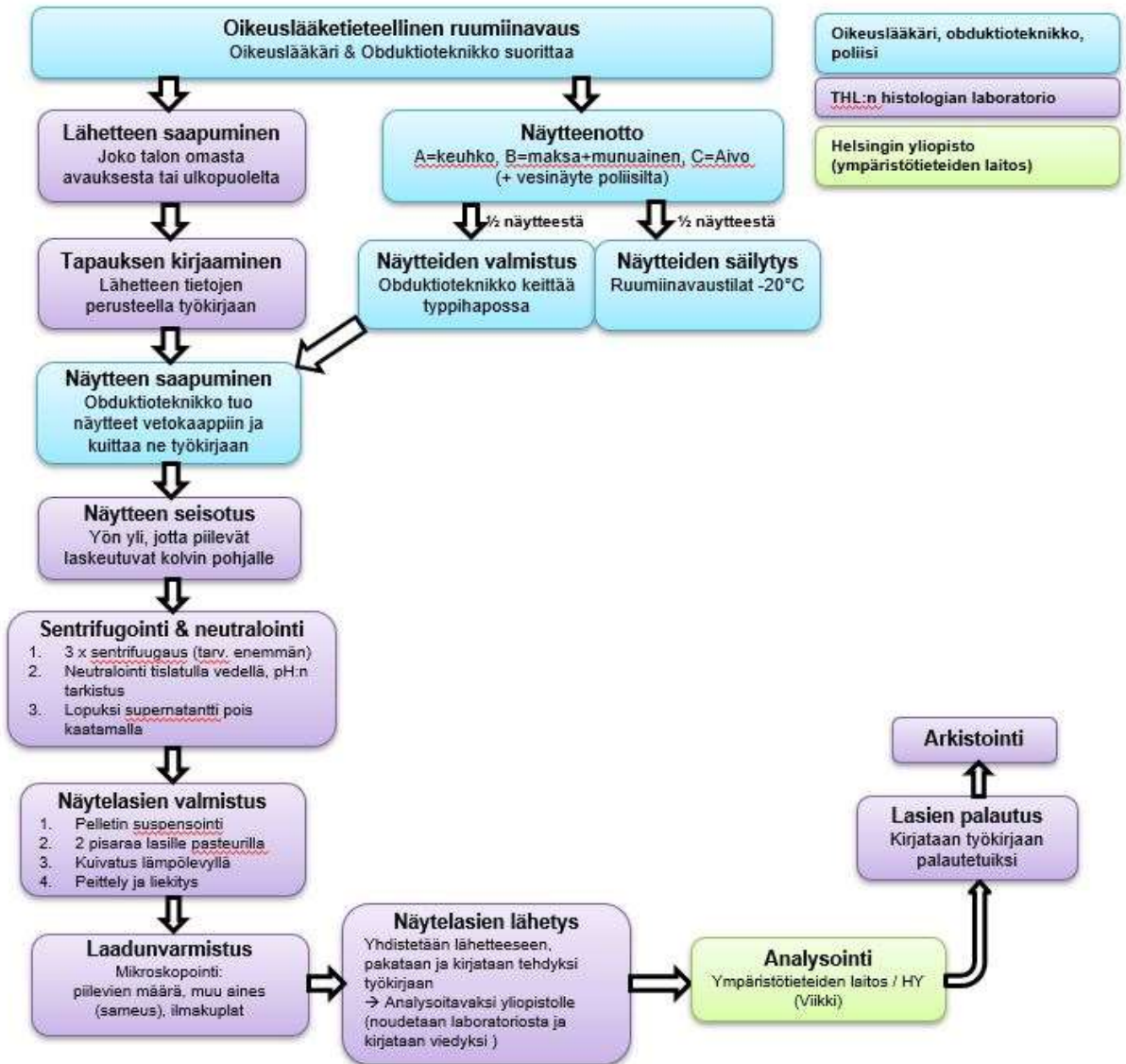
Tämän jälkeen näytekolvista kaadetaan silmämääräisesti nestettä vedellä täytettyyn neutralointiastiaan yhdellä kaadolla kolvia heiluttamatta. Tekijä arvioi silmämääräisesti, että kolvin pohjalle jäisi noin 20 ml näytettä ja siirtää tämän varovasti kaataen näytteelle merkittyyn 50 ml:n sentrifugiputkeen. Jos näytteitä on pariton määrä, yhdelle näytteelle täytyy ottaa tasapainoputki, joka täytetään hanavedellä sentrifugointia varten. Putket tasapainotetaan vaa'an avulla ja asetetaan sentrifugiin. Näytteitä sentrifugoidaan (7 min, 2600 x g), minkä jälkeen supernatantti kaadetaan neutralointiastiaan. Kolvit huuhdellaan tislatulla vedellä ja neste kaadetaan kutakin näytettä vastaavaan sentrifugiputkeen. Putket täytetään tislatulla vedellä, tasapainotetaan uudestaan ja sentrifugoidaan uudelleen. Tämän jälkeen supernatantti kaadetaan neutralointiastiaan ja putket täytetään ja tasapainotetaan jälleen tislatulla vedellä, minkä jälkeen sentrifugointi toistetaan kolmannen kerran. Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen supernatantin happamuus mitataan pH-paperilla ja näytteen ollessa neutraali supernatantti kaadetaan viemäriin, jolloin sentrifugiputkien pohjalle jää hieman vettä ja näytteessä olevat piilevät. Jos näytteet ovat vielä happamia, sentrifugointi toistetaan vielä kerran.

Mikroskooppipreparaattien valmistus aloitetaan laittamalla jokaiselle näytteelle oma, merkitty lasi lämpölevylle. Piileväanalyysissä käytetään objektilaseja, joiden keskellä on halkaisijaltaan 8 mm:n kaivo. Tällä spesifillä lasilla varmistetaan, että piilevät eivät karkaa

lasilta. Työn suorittaja pipetoi näytteet omille lasilleen käyttäen muovisia pasteur-pipettejä. Lasissa olevaan kaivoon pipetoidaan kaksia pisaraa suspensoitua näytettä ja sen annetaan kuivua kokonaan. Lopuksi lasit päällystetään Naphrax-liiman ja ohuen peitin-lasin avulla. Preparaattia kuumennetaan bunsen-liekillä, jotta ilmakuplat lähtevät ja liima kiinnittyy kunnolla.

Valmiita piileväpreparaatteja tarkastellaan valomikroskoopilla 40-kertaisella suurennoksella ja näin varmistetaan näytteen laatu. Lasit pakataan muovikoteloon, ja tekijä kuittaa niiden valmistuspäivän ylös. Jokaisen viikon päätteeksi Helsingin yliopiston tutkija hakee valmiit näytteet lähetteineen analysoitavaksi yliopistolle ja tekee niistä lausunnon tapauksesta vastaavalle oikeuslääkärille.

Käytetyt keittokolvit ja sentrifugiputket täytetään emäksisellä Deko-pesuaineella (pH=11,5) ja niiden annetaan liuota vähintään vuorokauden ajan. Tämän jälkeen ne pestään astianpesukoneessa. Liuotuksen tarkoituksena on puhdistaa lasiastiat piilevistä kontaminaation välttämiseksi. Neutralointiastiaan laitetaan natriumvetykarbonaattia, kunnes happo ei enää reagoi ja astia tyhjennetään viemäriin. Tarkemmat ohjeet piilevä-näytteiden käsittelyyn on liitteessä 2. Kuvassa 1 on virtauskaavio piileväanalyysin kuluista THL:n oikeuslääkinnän yksikössä.



Kuva 1. Piileväanalyysi THL:ssa

Koko piileväanalyysin toteuttamiseen ja tulkintaan osallistuu oikeuslääkäri, poliisi, obduktioteknikko, Helsingin yliopiston tutkija Jan Weckström sekä histologian laboratorion työntekijät.

3.5 Piileväanalyysin kontaminaatiolähteet

Piileväanalyysiin käyttöön hukkumisdiagnostiikassa kohdistuu paljon kritiikkiä. Yksi syy sen kyseenalaistamiseen johtuu suuresta määrästä kontaminaation lähteitä sen

toteuttamisen kaikissa vaiheissa. Kontaminaatio voi tapahtua joko ennen kuolemaa tai sen jälkeen. [8, s. 33–34.]

On mahdollista, että vainajan elimistöön on joutunut piileviä jo ennen kuolemaa. Jotkin elintarvikkeet, kuten salaatti, selleri ja äyriäiset, voivat sisältää niitä. Piileviä voi joutua asukkaiden elimistöön myös maissa, joissa juodaan esimerkiksi jokivettä, tai olut- ja viiniteollisuudessa käytetään piimaata sisältäviä suodattimia. Lisäksi piimaata saatetaan käyttää valmistusmateriaalina esimerkiksi maaleissa sekä paperissa ja se voi kulkeutua elimistöön hengitysteitse. [8, s. 33–34.]

Jos ruumis ehtii hajota vedessä pidemmän aikaa, kudokset voivat kontaminoitua niitä ympäröivän veden piilevillä. Kontaminaatio voi tapahtua myös näytteenottohetkellä. Mahdollisia kontaminaationlähteitä ruumiinavauksen aikana ovat esimerkiksi ilma, hanavesi, instrumentit, suojakäsineet sekä paperi. [8, s. 33–34.]

Lisäksi koko tutkinnan ajan ristikontaminaatio sekä eri tapauksen eri näytteiden (A, B, C ja vesi) välillä on mahdollista. Kontaminaatiota pyritään välttämään käyttämällä puhtaita instrumentteja ja välttämällä materiaaleja, joiden valmistusprosessissa saatetaan käyttää piileviä sisältäviä komponentteja. Jos vainaja on löytöhetkellä jo pitkälle mädäntynyt, piilevänäyte voidaan ottaa luuytimeestä. Se hajoaa muita kudoksia hitaammin, ja piilevät kulkeutuvat luuytimeen verenkierron mukana.

3.6 Muita piilevien eristysmenetelmiä

Piileväanalyysi hukkumistapausten tutkinnassa on otettu käyttöön jo 1900-luvun alussa. Tärkein tavoite analyysin onnistumisessa on hajottaa kudos siten, että mahdollisimman suuri osa piilevistä saataisiin eristettyä turvallisesti kontaminaatiota välttäen. Kokeiluja on tehty myös vesinäytteille. [9.]

Tässä luvussa on esitetty erilaisia piilevien eristysmenetelmiä, joita on kokeiltu esimerkiksi rikosanalyttisissä laboratorioissa ja yliopistoissa ympäri maailman. Osa näistä menetelmistä on aikaa vieviä, kalliita tai niistä löytyy liian vähän tietoa, joten ne jätettiin tämän opinnäytetyön toteutuksen ulkopuolelle. Koska tavoitteena oli kehittää piileväanalyysia, haluttiin kuitenkin ottaa selvää vaihtoehtoisista eristysmenetelmistä. Alla

mainittujen menetelmien lisäksi piileviä on koitettu eristää mm. membraanisuodatusmenetelmällä, Soluene 350 -menetelmällä sekä tuhkaamalla [9].

3.6.1 Suolahappodigestio

Italialaisessa yliopistossa testattiin suolahappodigestiota orgaanisen aineksen hajottamiseen piilevänäytteissä. Näytteet kerättiin teurastamolla olevista sioista. Näytteenkäsittely aloitettiin punnitsemalla yksi gramma näytettä dekantterilasiin, johon lisättiin 10 ml suolahappoa (10 %, 20 % tai 37 %). Näytteisiin lisättiin positiiviseksi kontrolliksi yksi millilitra mutaista, piilevärrikasta vettä. Näytteitä keitettiin 15 minuuttia +95 °C:ssa, kunnes kaikki orgaaninen materiaali oli hajonnut. Menetelmää kokeiltiin, koska haluttiin selvittää, onnistuuko digestio ilman erittäin vahvoja happoja. Laimeampien kemikaalien käyttö ei hajottaisi piilevien rakennetta niin helposti. [10.]

Laimeimmalla (10 %) suolahapolla digestoidut näytteet sisälsivät edelleen paljon orgaanista ainesta ja tämän vuoksi näytelasien tarkastelu valomikroskoopilla oli todella hankalaa. Piileviä kuitenkin havaittiin jonkin verran. 20 % vahvalla suolahapolla digestoitaessa orgaanista ainesta oli huomattavasti vähemmän, jolloin mikroskopointi helpottui. Lisäksi piilevät näkyivät lasilla paremmin. Myös vahvimalla suolahapolla digestointi onnistui kuten yllä. Orgaanisen aineen hajotessa lähes kokonaan näytelasilta oli helpompi tunnistaa, minkä lajin piileviä näytteessä on ja taksonominen analysointi helpottui. [10.]

Tässä tutkimuksessa näytemäärät olivat hyvin pieniä ja vaikka keittämiseen meni vain 15 minuuttia, on vaikea arvioida tarvittavaa keittoaikaa, kun kyseessä on suurempi määrä kudosta. Helsingin yliopiston tutkija Jan Weckström analysoi tällä hetkellä kaikki histologian laboratorion valmistamat piilevälasit ja kertoi kokeilleensa myös itse näytteiden digestointia. Hänen mukaansa tuhkaaminen, pelkän vetyperoksidin käyttö, suolahapon käyttö tai suolahappo ja vetyperoksidi yhdessä eivät tuottaneet yhtä hyviä tuloksia kuin digestointi typpihapolla sekä vetyperoksidilla. Näiden tietojen perusteella kyseisiä menetelmiä ei siis kokeiltu tämän opinnäytetyön aikana.

3.6.2 Happo-formaliinidigestio

Japanilaisessa lääketieteellisessä yliopistossa tutkittiin tapauksia, joissa vainaja on hukkunut kylvyssä. Hukkumistutkinnassa käytettiin apuna piileväanalyysia ja digestointi tehtiin typpi- ja rikkihapolla. Näytteiksi otettiin ruumiinavauksessa keuhkoa, pernaa, munuaista ja maksaa. Ne säilöttiin ensin 10 % formaliiniin useaksi päiväksi. Tämän jälkeen näytteet huuhdeltiin hanavedellä ja leikattiin 10 ja 20 gramman palasiin. Näytteet pestiin vielä tislattulla vedellä ja pilkottiin pienempiin osiin, annettiin olla huoneenlämmössä 15–30 minuuttia ja siirrettiin erlenmeyerihin. Kaikki erlenmeyerit asetettiin kuumaan hiekkahauteeseen ja jokaiseen lisättiin ensin 10 ml rikkihappoa ja kun näytteet olivat tummuneet, lisättiin vielä 10–15 ml typpihappoa. Näytteitä keitettiin, kunnes neste oli muuttunut kirkaaksi. Tutkimuksessa haluttiin tutkia piilevien osuutta kylpykulemista, koska oletuksena on, että talousvedessä on piileviä, mutta suhteellisen vähän. Digestointi kuitenkin onnistui, koska tutkimuksen tuloksissa oli pystytty laskemaan piilevien lukumäärä 100 grammassa kudosnäytettä. [11.]

Tätä menetelmää ei kokeiltu opinnäytetyön aikana, koska se on nykyistä menetelmää hitaampi ja olisi vaatinut liian kalliita hankintoja.

3.6.3 Entsyymidigestio

Opinnäytetyön edetessä perehdyttiin tarkemmin entsyymidigestioon ja selvitettiin, olisiko sen käyttäminen piileväanalyysissa tehokkaampaa kuin typpihappodigestion. Entsyymidigestiota tutkiessa apuna käytettiin chileläisen yliopiston tutkimusta sekä histologian tiiminvetäjän ja tämän opinnäytetyön ohjaajan Johanna Virrin kehittämää protokollaa piileväanalyysin kudosnäytteiden entsyymaattisesta digestoinnista. Kyseinen protokolla on kehitetty ranskalaisen mm. molekyylibiologiaan erikoistuneen professorin Bertrand Ludesin tutkimuksen pohjalta. Kyseistä digestiomenetelmää on tutkittu Ranskassa sekä Japanissa ja se on todettu toimivaksi ja turvallisemmaksi näytteenkäsittelymenetelmäksi kuin happodigestio.

Yliopiston tutkimuksessa vertailtiin happo- ja entsyymidigestiota keskenään. Näytteinä vertailussa käytettiin luuydintä ja vettä. Entsyymidigestioon käytettiin 0,5 U/ml proteinaasi K:ta ja 0,01 M Tris-HCl (pH=7,5) -puskuria, johon oli lisätty 2 %

natriumdodekyylisulfaattia (SDS). Reagenssien määrästä tai työvaiheista ei ollut tarkempaa tietoa kyseisessä julkaisussa. [12.]

Vuonna 1994 julkaistun tutkimuksen (Ludes ym.) mukaan entsyymidigestio on happokeittoa turvallisempi ja ympäristöystävällisempi menetelmä kudosten hajottamiseen ja piilevien eristämiseen. Tutkimuksessa vertailtiin happokeittoa ja entsyymidigestiota keskenään keräämällä vainajista 10 gramman kudoksenäytteet. [13.]

Johanna Virrin protokollan mukaan kudoksenäytettä punnitaan ensin 10 grammaa ja sitä huuhdellaan tislattulla vedellä. Kudoksenäyte sekoitetaan liuokseen, jossa on 500 µl proteinaasi K -entsyymiä (10 mg/ml) ja 100 ml Tris-HCl-puskuria (0,01 ml/l, pH 7,5), joka sisältää 2 % SDS-reagenssia. Seosta inkuboidaan yön yli lämpökaapissa (+50 °C) ja seuraavana päivänä siihen lisätään 500 µl proteinaasi K -entsyymiä, minkä jälkeen sitä inkuboidaan kahdeksan tunnin ajan. Kun kudos on digestoitunut, seos laimennetaan 100 ml:lla tislattua vettä ja näyte sentrifugoidaan (3000 rpm, 15 min). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadetaan jäteastiaan ja sedimentistä pipetoidaan objektilasille 100 µl näytettä. Preparaatti kuivataan lämpölevyllä ja peitinlasi kiinnitetään Naphrax-liiman sekä liekityksen avulla.

4 Piilevät

4.1 Piilevistä yleisesti

Piilevät ovat mikroskooppisen pieniä yksisoluisia kasveja, ja niiden tunnusomaisin piirre on niiden piihappoa sisältävä kova soluseinä. Soluseinä ja sen kuviot ovat erittäin symmetrisiä, ja tämän ominaisuuden avulla piileviä voidaan karakterisoida sekä jakaa eri luokkiin. Kyseisen luokittelun avulla piilevälajeja on löydetty jo kymmeniätuhansia. Piileviä löytyy luonnon omista vesistöistä, kuten järvistä, joista, meristä, ojista sekä lammi-koista. Levien kasvuympäristöjen fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ovat yksi tekijä niiden luokittelussa. On olemassa sekä suolaisen että makean veden piileviä. Jotkin piilevät taas suosivat kasvuympäristönään maaperää (piimaa) tai pienempiä vesistöjä. Maapallolla on elävien piilevien lisäksi myös piileväfossiileja, jotka muodostavat kokonaan oman luokkansa, ja niitä louhitaan kaupalliseen tarkoitukseen ja käytetään

esimerkiksi hiomapapereissa. Yksi tärkeä ominaisuus piilevillä on niiden kantojen monimuotoinen dynamiikka ja ekologia. Piileväkannat ovat jatkuvassa muutostilassa ja ne muokkaantuvat jaksoittain. Niiden kukintojen runsaus vaihtelee vuodenajasta riippuen. Veden lämpötila, happamuus sekä kerrostuneisuus vaikuttavat suoraan kyseisen vesistön piileväkonsentraatioon. Nämä edellä mainitut piileväkantojen ominaisuudet ovat suuressa roolissa, mitä tulee hukkumisdiagnostiikkaan. [6, s. 2–3.]

4.2 Piilevien rooli hukkumisessa ja rikostutkinnassa

Kun ihminen hukkuessaan vetää vettä henkeen, piilevät kulkeutuvat ensin keuhkoihin ja sydämen pumpatessa verta siitä edelleen perifeerisen verenkierron kautta muihin elimiin ja luuytimiin. Jos ruumis joutuu veteen kuoleman jälkeen, piileviä kulkeutuu vedellä täyttyvän suun ja henkitorven kautta keuhkoihin. Tässä tapauksessa sydän ei pumpkaa verta eteenpäin, joten piileviä ei löydy muista elimistä tai luuytimeistä. [6, s. 3–6.]

Kova piikuori tekee piilevistä kemiallisesti erittäin kestäviä, joten ne voidaan eristää ihmiskudoksesta helposti käyttäen vahvaa happoa ja sentrifugointia. Typpihappodigestion on tutkittu olevan tehokkain piilevien eristykseen käytettävä menetelmä. Eristämiseen on käytetty useita eri kudoksia, mutta sääriluusta otetun luuytimen on todettu olevan kaikista luotettavin piilevänäyte vainajasta. Piileväanalyysin luotettavuuden varmistamiseksi on verrattava vainajasta otetun näytteen piileväkonsentraatiota ja niiden morfologiaa vesinäytteeseen, joka on kerätty ruumiin löytöpaikalta tai oletetulta hukkumispaikalta. [6, s. 3–6.]

Oikeuslääketieteen patologit ympäri maailman ovat tulleet siihen tulokseen, että piileväanalyysi on luotettavin lähde selvittäessä hukkumistapauksia ja vedestä löydettyjen vainajien kuolinsyitä. Eräät tutkijat ovat kuitenkin esittäneet piilevien löytymisen myös ei-hukkuneista ruumiista. Väite on kuitenkin kumottu perustelemalla piileväanalyysin olevan validi menetelmä, kun verrataan kudoksenäytteitä ja oletetulta löytöpaikalta kerättyä vesinäytettä keskenään. [6, s. 3–6.]

Piileviä voidaan käyttää myös johtolankoina rikoksissa. Kassakaappien valmistusmateriaalissa voidaan käyttää piimaata. Eräässä tapauksessa kassakaappin ryöstäneiden miesten vaatteista löytyi jäänteitä piimaasta ja siinä olevat piilevät olivat samoja kuin ne

piilevät, joita löytyi kaapin valmistusmateriaalista. Tämä tieto vahvisti epäiltyjen syyllisyyden ja heidät tuomittiin varkaudesta. [6, s. 112.]

5 Nykyisen menetelmän haasteet

5.1 Piilevien keittomenetelmä

Opinnäytetyön alussa seurattiin obduktioteknikoiden suorittamaa piilevien keittomenetelmää ja listattiin nykyisen menetelmän haasteet ja heikkoudet, jotka vaativat kehittämistä:

- Piilevätutkimuspyynnön tullessa toiselta avauspaikkakunnalta, näytemäärä on usein hyvin pieni (5–15 grammaa) vaikka ohjeen mukaan näytettä pitäisi olla n. 30 grammaa.
- Lämmitysespeihin mahtuu kerralla kuusi keittokolvia, joten saman aikaisesti keitetään normaalisti vain yhden tapauksen näytteet, mikä ruuhkauttaa tapausten käsittelyä.
- Keittämisprosessissa on suuri työturvallisuusriski, sillä vahva typpihappo roiskuu keitettäessä kudosten reagoiessa kiehuvan happovesiliuoksen kanssa.
- Näytteisiin lisättävien reagenssien (65 % typpihappo ja 30 % vetyperoksidi) ja tislattun veden määrä vaihtelee tekijän mukaan, eikä käytössä ole kaavaa, jonka pohjalta näytteen paino määräisi reagenssien ja veden määrän.
- Keittämisestä vastaavat obduktioteknikot, joilla ei ole laboratorioalan koulutusta.

5.2 Piileväpreparaattien valmistusmenetelmä

Opinnäytetyön alussa pohdittiin histologian laboratorion henkilökunnan sekä yliopiston paleoekologian dosentti Jan Weckströmin kanssa piileväpreparaattien valmistukseen liittyviä haasteita sekä kehittämiskohteita:

- Kun kolvista kaadetaan aluksi ylimääräinen neste pois, menetetään näytteessä mahdollisesti olevia kevyempiä piileviä, jotka eivät laskeudu kolvin pohjalle.

- On lähes mahdotonta arvioida silmämääräisesti, että kolvin pohjalle jäisi 20 ml nestettä, minkä vuoksi näytemäärä, joka on suoraan verrannollinen saantoon, vaihtelee suuresti.

6 Menetelmän kehitys projektin aikana

6.1 Preparaattien valmistusmenetelmän kehittäminen

6.1.1 Koe 1

Kokeen 1 tarkoituksena oli selvittää, paraneeko saanto, jos näytteeksi kerätään keittokolvissa oleva näyteliuos kokonaan. Tällä pyrittiin välttämään mahdollisten kolvin pinnalla olevien piilevien joutuminen neutralointiastiaan. Koe tehtiin A-näytteestä ja se toistettiin kaksi kertaa, jotta näytteitä voitiin verrata keskenään.

A-näytettä varten otettiin useampi sentrifugiputki, joihin pyrittiin kaatamaan kaikkiin noin 20 ml kolvissa olevaa näyteliuosta. Kolvin ravistelua sekä heiluttamista vältettiin kaatamisen aikana ja kolvi pidettiin jokaisen kaadon välissä vaakatasossa sekoittumisen estämiseksi. Viimeisin sentrifugiputki edusti nykyisellä menetelmällä valmistettua näytettä. Tämän jälkeen näytteenkäsittelyssä noudatettiin nykyisen menetelmän ohjetta. Kokeen 1 ensimmäisessä vaiheessa A-näytteestä tehtyjä preparaatteja tuli yhteensä neljä ja toisessa vaiheessa kuusi. Kaikki näytteet mikroskoipoitiin valomikroskoopilla 40-kertaisella suurennoksella.

6.1.2 Koe 2

Kokeen 2 tarkoituksena oli vertailla keskenään kahta eri näytteenkäsittelymenetelmää mikroskooppipreparaatteja valmistettaessa. Tällä hetkellä obduktioteknikon keitettyä piilevänäytteet hän tuo ne iltapäivällä histologian laboratorion vetokaappiin. Näytteet odottavat jatkokäsittelyä seuraavaan päivään ja oletuksena on, että piilevät laskeutuisivat yön aikana kolvin pohjalle. Kun osa kolvissa olevasta nesteestä kaadetaan neutralointiastiaan, piilevien pitäisi jäädä loppuun nesteeseen, joka kaadetaan sentrifugiputkeen. Tässä kokeessa haluttiin selvittää, huononeeko piileväsaanto, jos kolvissa oleva neste

sekoitetaan ensin homogeeniseksi ja siitä kaadetaan suoraan noin 20 ml näytettä sentrifugiputkeen. Loppu neste, joka ei mahdu putkeen, voitaisiin kaataa neutralointiastiaan.

Koetta varten käytiin keräämässä vesinäyte mutaisesta lammesta. Oletuksena oli, että lammen vesistöissä olisi piileviä. Vesinäytteestä keitettiin rinnakkaisnäytteet (näyte 1 ja näyte 2) yhdessä obduktioteknikon kanssa. Keittäminen toteutettiin nykyisellä obduktioteknikoiden soveltamalla ohjeella. Vesinäytettä ja tislattua vettä laitettiin kolvin pohjalle suhteessa 1:1 niin, että kolvin pyöreä osa täyttyi puoleen väliin asti. Obduktioteknikko toi valmiit näytteet histologian laboratorion vetokaappiin ja seuraavana päivänä ne jatkokäsiteltiin. Näyte 1 sekoitettiin tasaiseksi kolvia heiluttaen ja näyteliuosta kaadettiin noin 20 ml sentrifugiputkeen. Loput näyteliuksesta kaadettiin neutralointiastiaan. Näytteestä 2 tehtiin mikroskooppipreparaatti nykyisen ohjeen mukaan, jotta sitä voitaisiin käyttää vertailussa. Sentrifugointi ja mikroskooppipreparaatin valmistus tehtiin nykyisen ohjeen mukaan. Näytteet olivat lasille pipetoitaessa niin tummat, että niistä tehtiin uudet lasit 1:1 laimennoksella (pasteur-pipetillä yksi pisara näytettä ja yksi pisara tislattua vettä).

6.2 Keittomenetelmän kehittäminen

6.2.1 Koe 1

Nykyisen keittomenetelmän ohjeen mukaan keittäminen tapahtuu keittokolvissa, kudoksenäytettä keitetään 20–50 grammaa, tislattua vettä laitetaan kolviin pyöreän osan puoleen väliin eli noin 250 ml ja typpihappoa sekä vetyperoksidia lisätään alussa 20 ml. Ohjeessa käsketään lisätä happoa keittämisen ajan siten, että näyte ei kuivu tai pala pohjaan nesteen haihtuessa ja lopuksi lisätään vielä 10 ml vetyperoksidia näytteen kirkastamiseksi. Obduktioteknikot, jotka vastaavat piilevien keitosta, siihen asti, kunnes koko yksikkö siirtyy uusiin tiloihin, noudattavat ohjetta suurpiirteisesti. Happoa lisätään heti aluksi noin 60 ml ja vetyperoksidia vain silmämääräisesti nokkapullostasta kaataen. Tämän kokeen tarkoituksena on tavoitella toistettavampaa ja tarkempaa näytteenkäsittelyä, jotta piileväanalyysistä saataisiin luotettavampia tuloksia ja todisteita hukkumiskuolemien selvitykseen.

Mikroskopoitavaa piileväpreparaattia valmistaessa histologian laboratoriossa, osa näytteestä kaadetaan pois ja jäljelle jää vaan noin 20 ml näyteliuosta, joka mahtuu 50 ml:n sentrifugiputkeen. Kokeessa 1 tavoiteltiin sellaista keittoprosessia, että jätettä ei syntyisi

preparaatin valmistuksen alkuvaiheessa ollenkaan, vaan kaikki kudospalassa olevat piilevät päätyisivät näytteeksi, eli sentrifugiputken pellettiin. Tarkoituksena siis oli kokeilla, onko näyte mahdollista keittää ”kasaan” tarpeeksi lyhyessä ajassa. Samalla yritettiin minimoida tarvittavien reagenssien määrää. Kokeen ensimmäisessä vaiheessa hankittiin tarvittavat reagenssit sekä mittavälineet keittämistä varten (taulukko 2) ja päätettiin käytettävien reagenssien määrät nykyistä ohjetta mukaillen.

Taulukko 2. Kokeilun 1 reagenssit, tarvikkeet ja mittavälineet

Reagenssit, tarvikkeet ja mittavälineet
Keittolevy (Bibby Scientific)
Erlenmeyeritä
Analyysivaaka (Fisher Scientific, SG-5001)
Pihdit
Tislattu vesi
Typpihappo 65 % (HNO ₃ , VWR Chemicals, Lot: 19A074019)
Vetyperoksidi 30 % (H ₂ O ₂ , EMD Millipore, Lot: K50671809838)
Kudosnäyte (A, B, C)

Keittomenetelmän kehitystä varten kerätyt kudospäytteet haettiin avaussalin kylmiöstä. Suojavarusteina käytettiin suojalaseja, paksuja suojakäsineitä, suusuojainta, laboratoriotakkia sekä muovista esiliinaa. Keittäminen tehtiin vetokaapissa.

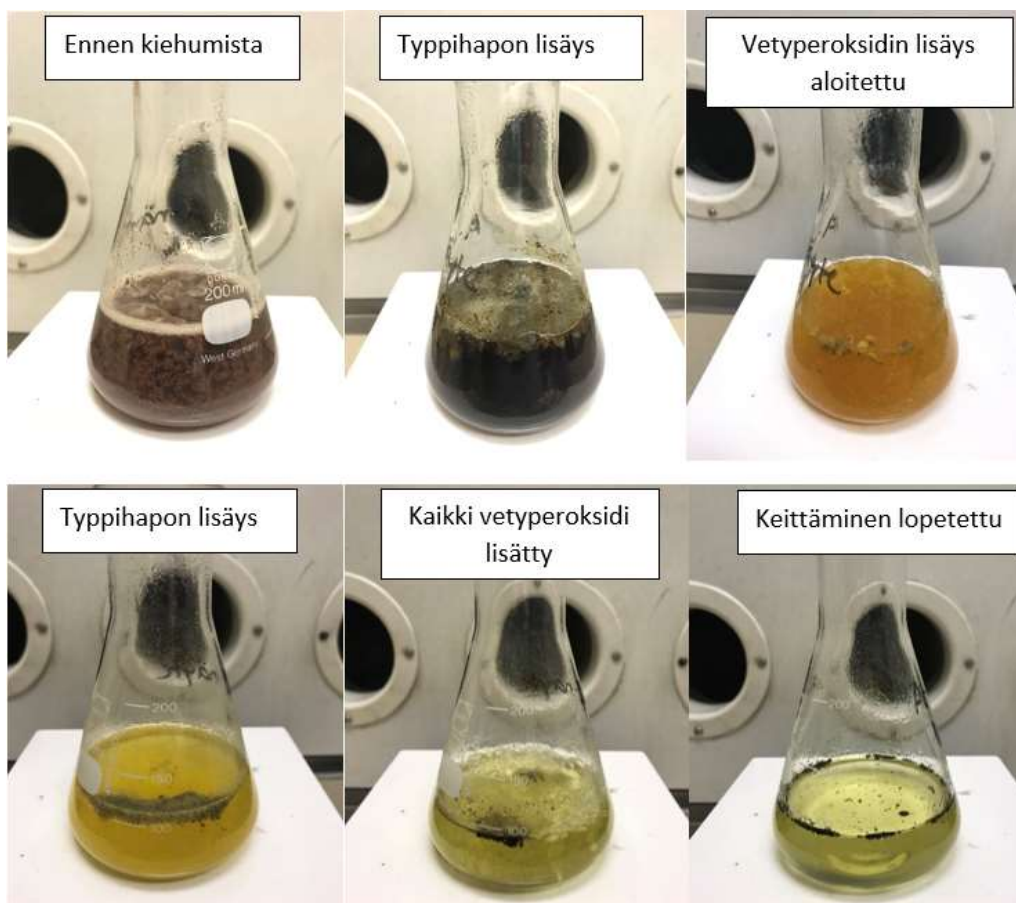
Keuhkonäytteen (A-näyte) keittäminen

Keuhkonäyte punnittiin suoraan 200 ml:n erlenmeyeriin ja sitä pilkottiin saksilla. Tämän jälkeen erlenmeyeriin lisättiin mittalasilla 100 ml tislattua vettä. Näyte laitettiin keittolevylle ja kun vesi alkoi kiehua, seokseen lisättiin pipetillä 20 ml typpihappoa. Vetyperoksidia alettiin lisäämään tunnin keittämisen jälkeen varovasti pasteur-pipetillä. Neste kiehui koko prosessin ajan hallitusti eikä se kuohunut erlenmeyerin reunojen yli kertaakaan. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 3.

Taulukko 3. A-näytteen keittämisen vaiheet (koe 1)

Keittämisen eteneminen	Kellon- aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	10:30			100 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	11:05	20 ml		
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	12:15			200 °C
Typpihappoa lisätty	12:20	10 ml		
Typpihappoa lisätty	14:15	10 ml		
Yhteensä 10 ml vetyperoksidia lisätty	14:30		10 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	14:45		10 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	14:50	yhteensä 40 ml	yhteensä 20 ml	
Näytteen paino: 20 g				
Tislattun veden määrä: 100 ml				

Keittämistä jatkettiin 4 h 20 min, jonka jälkeen seoksen annettiin hieman jäähtyä ja siihen lisättiin vielä 10 ml vetyperoksidia näytteen kirkastamiseksi. Alla olevassa kuvasarjassa havainnollistettuna keittämisen aikana tapahtuneet hajoamis- ja värimuutokset (kuva 2).



Kuva 2. Kuvasarja A-näytteen keittämisestä (koe 1)

Näyte jäi hieman kellertäväksi, mutta sen ei uskottu haittaavan jatkokäsittelyä. Näytteen lopputilavuus oli tässä vaiheessa noin 90 ml ja se jätettiin vetokaappiin jäähtymään yön yli.

Seuraavana päivänä näyte sekoitettiin homogeeniseksi ja jaettiin kahteen 50 ml:n sentrifugiputkeen. Näytteenkäsittely ja piileväpreparaattien valmistus tehtiin histologian laboratoriossa käytössä olevan ohjeen mukaan (liite 2). Laseja mikroskopoitaessa huomattiin, että näytteeseen oli jäänyt suhteellisen paljon ylimääräistä sakkaa, mikä häiritsi tulkintaa. Molemmilta laseilta oli kuitenkin havaittavissa muutamia piileviä. Tapaus käsiteltiin myös alkuperäisellä keittomenetelmällä obduktioteknikoiden toimesta. Alkuperäisellä menetelmällä käsitellystä näytteestä tehdyllä A-näytteen lasilla piilevät näkyivät selkeämmin ja sakkaa oli vähemmän.

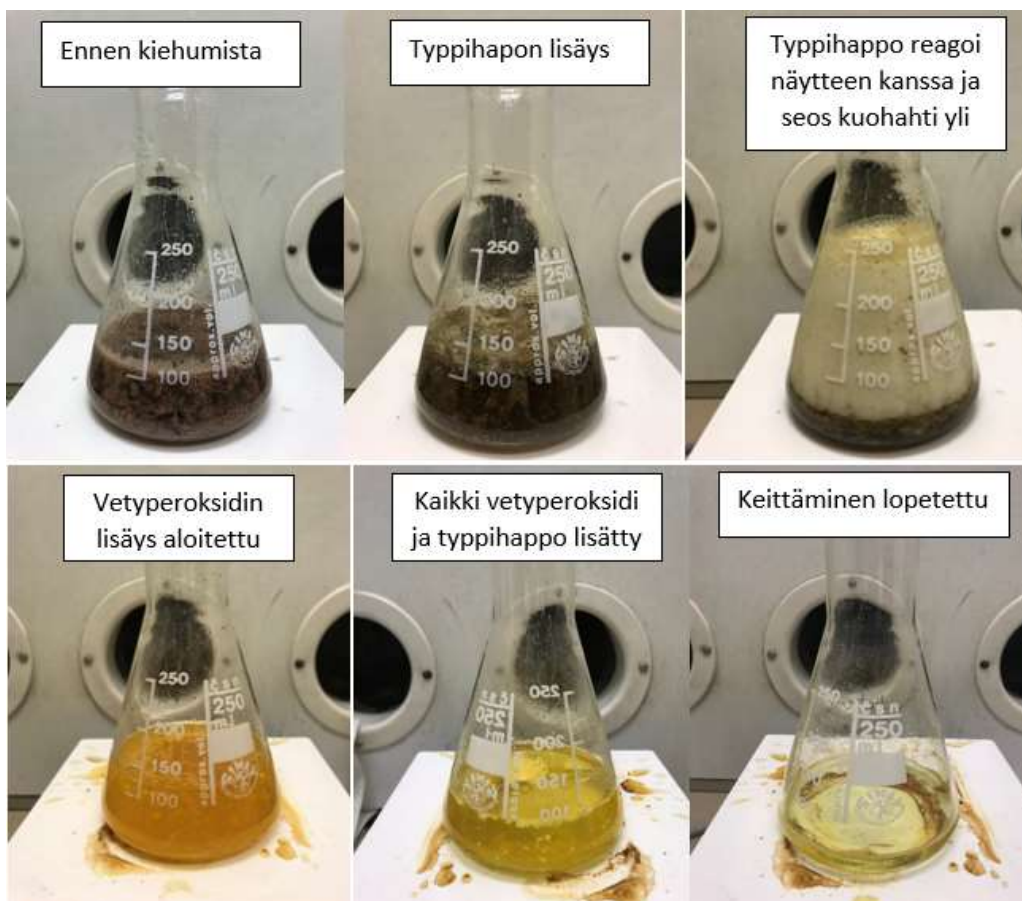
Maksa- ja munuaisnäytteen (B-näyte) keittäminen

B-näytteen keittämisessä käytössä oli samat reagenssimäärät kuin A-näytteellä. Vetyperoksidia alettiin lisäämään tunnin keittämisen jälkeen varovasti pasteur-pipetillä. Neste kuohahti erlenmeyerin reunojen yli ensimmäisen typpihapon lisäyksen jälkeen. Keittolevyn lämpötilaa laskettiin hieman, ja kiehuminen jatkui hallitusti keittämisen loppuun asti. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 4.

Taulukko 4. B-näytteen keittämisen vaiheet (koe 1)

Keittämisen eteneminen	Kellon-aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	10:15			200 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	10:50	20 ml		100 °C
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	11:50			200 °C
Typpihappoa lisätty	11:55	10 ml		
Typpihappoa lisätty	13:00	10 ml		
Yhteensä 10 ml vetyperoksidia lisätty	13:30		10 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	14:10		10 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	14:30	yhteensä 40 ml	yhteensä 20 ml	
Näytteen paino: 20 g				
Tislattun veden määrä: 100 ml				

Viimeinen happolisäys tehtiin tuntia aikaisemmin kuin keuhkonäytettä keittäessä. Yhteensä B-näytettä keitettiin 4 h 15 min. Alla olevassa kuvasarjassa havainnollistettuna keittämisen aikana tapahtuneet hajoamis- ja värimuutokset (kuva 3).



Kuva 3. Kuvasarja B-näytteen keittämisestä (koe 1)

Myös B-näyte jäi väriltään kellertäväksi ja sen pinnalla kellui rasvaa. Näytteen lopputilavuus oli noin 50 ml eli huomattavasti vähemmän kuin A-näytteellä. B-näyte keitettiin 250 ml:n erlenmeyerissä, joten nestettä on voinut haihtua enemmän kuin pienemmässä erlenmeyerissä keitetäessä. Lisäksi B-näyte kuohui kerran yli, jolloin näytettä roiskui keittotoleville, ja tilavuus pieneni. Näyte jätettiin vetokaappiin jäähtymään yön yli ja käsiteltiin kuten A-näyte. Laseja mikroskopoidessa huomattiin, ettei kummallakaan niistä ollut piileviä, ja lasille päätynyt hajoamaton rasva häiritsi tulkintaa jossain määrin. Myöskään alkuperäisellä menetelmällä tehdyllä B-lasilla ei ollut piileviä.

Aivonäytteen (C-näyte) keittäminen

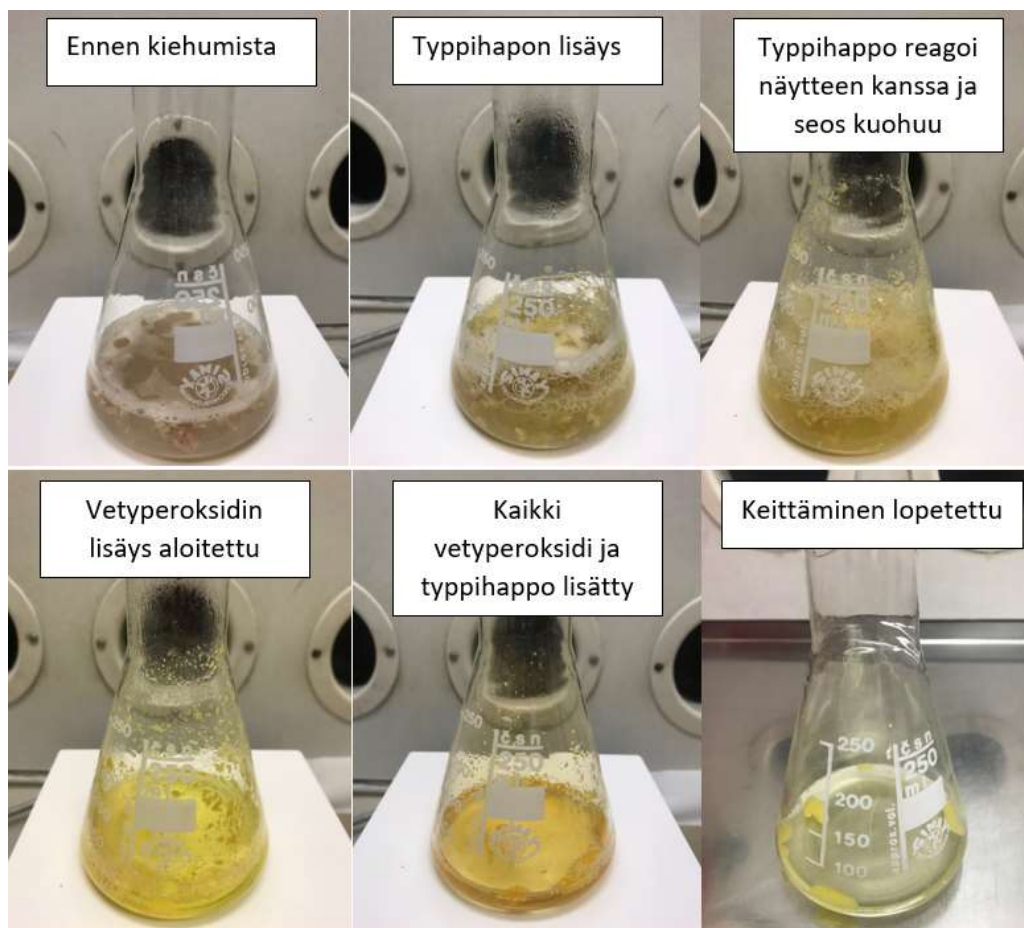
C-näytettä saatiin ruumiinavauksesta vain 13 grammaa, joten tislattun veden ja kemikaalien määrät piti suhteuttaa näytteen painoon. Erlenmeyeriin laitettiin tislattua vettä 70 ml, typpihappoa 28 ml ja vetyperoksidia 14 ml. Aivonäyte kuohui hieman ensimmäisen

typpihappolisäyksen jälkeen, mutta näytettä ei valunut erlenmeyerin reunojen yli. Keittolevyn lämpötilaa laskettiin, ja kiehuminen jatkui hallitusti keittämisen loppuun asti. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 5.

Taulukko 5. C-näytteen keittämisen vaiheet (koe 1)

Keittämisen eteneminen	Kellon-aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	10:15			200 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	10:25	14 ml		175 °C
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	11:20			200 °C
Typpihappoa lisätty	12:00	7 ml		
Typpihappoa lisätty	12:30	7 ml		
Yhteensä 7 ml vetyperoksidia lisätty	12:30		7 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	13:00		7 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	12:15	yhteensä 28 ml	yhteensä 14 ml	
Näytteen paino: 13 g				
Tislattun veden määrä: 70 ml				

Aivonäytteen keittäminen kesti kaiken kaikkiaan vain kaksi tuntia. Nopea digestoituminen johtui todennäköisesti pienemmästä näytemäärästä, sekä aivokudoksen pehmeudesta verrattuna muihin kudoksenäytteisiin. Alla olevassa kuvasarjassa havainnollistettuna keittämisen aikana tapahtuneet hajoamis- ja värimuutokset (kuva 4).



Kuva 4. Kuvasarja C-näytteen keittämisestä (koe 1)

Myös C-näyte jäi hieman kellertäväksi ja sen pinnalla kellui rasvaa. Näytteen tilavuus keittämisen jälkeen oli noin 40 ml. Jatkokäsittely tehtiin samalla tavalla kuin aiemmille näytteille. Näytteen pienestä tilavuudesta johtuen se mahtui yhteen 50 ml:n sentrifugi-putkeen, ja näin ollen siitä tehtiin vain yksi mikroskooppipreparaatti, mikä oli tässä kokeilussa alkuperäisenä tavoitteena. Lasia mikroskopitaessa tulokset olivat samat kuin B-näytteellä.

6.2.2 Koe 2

Toinen koe suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen, mutta näytemäärät pienennettiin 10 grammaan, jolloin myös reagenssien määrää voitiin pienentää. Ensimmäisessä kokeessa huomattiin, että C-näyte, joka painoi 10 grammaa, saatiin keitettyä tarpeeksi pienillä reagenssimäärillä, ja se mahtui yhteen 50 ml:n sentrifugi-putkeen. Näin ollen

näytteestä pystyttiin tekemään vain yksi preparaatti. Lisäksi kudoksenäytteet pyrittiin tällä kertaa pilkkomaan ennen keittämistä pienemmiksi kuin kokeessa 1, jotta ne hajoaisivat nopeammin.

Tässä kokeessa kudoksenäytettä punnittiin 10 grammaa, vettä laitettiin 50 ml, typpihappoa 20 ml ja vetyperoksidia 10 ml. Kaikki näytteet (A, B ja C) keitettiin yhden kerran. Kaikki kokeen 2 kudoksenäytteet keitettiin korkeassa dekantterilasissa, jotta nähtäisiin, haihtuuko nestettä paremmin kuin erlenmeyerissä keittäessä. Kokeessa 2 käytettiin samoja reagensseja ja mittavälineitä kuin kokeessa 1 (taulukko 2).

Keuhkonäytteen (A-näyte) keittäminen

Toinen keittokoe aloitettiin punnitsemalla A-näytettä 10 grammaa 400 ml:n dekantterilasiin ja lisäämällä sinne 50 ml tislattua vettä. Dekantterilasi laitettiin lämpölevylle ja kun neste alkoi kiehua, tehtiin ensimmäinen typpihapon lisäys (10 ml) pipetillä. Keittämisen aikana tehtiin typpihappo- ja vetyperoksidilisäyksiä. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 6.

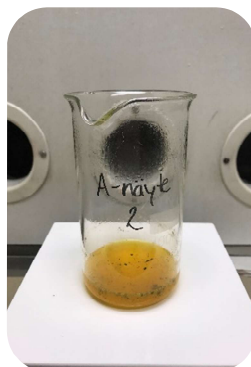
Taulukko 6. A-näytteen keittämisen vaiheet (koe 2)

Keittämisen eteneminen	Kellon-aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	10:40			200 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	10:50	10 ml		
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	11:40			
Typpihappoa lisätty	12:00	5 ml		
Typpihappoa lisätty	12:10	5 ml		
Yhteensä 5 ml vetyperoksidia lisätty	12:10		5 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	12:15		5 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	12:15	yhteensä 20 ml	yhteensä 10 ml	
Näytteen paino: 10 g				
Tislattun veden määrä: 50 ml				

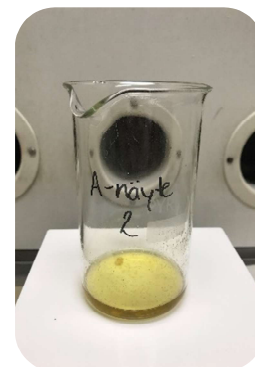
Kaiken kaikkiaan keittämiseen kului vain noin 1,5 h, mikä on huomattavasti vähemmän kuin kokeen 1 A-näytteen keittämiseen kulunut aika (4 h 20 min). Nestettä haihtui näytteestä paremmin keittäessä dekanterilasissa kuin erlenmeyerissa, ja näyte kiehui hallitusti. Alla olevassa kuvasarjassa havainnollistettuna keittämisen aikana tapahtuneet hajomis- ja värimuutokset (kuva 5).



**Typpihapon
lisäys**



**Vetyperoksidin
lisäys aloitettu**



**Keittäminen
lopetettu**

Kuva 5. Kuvasarja A-näytteen keittämisestä (koe 2)

Näytteen lopputilavuus oli noin 20 ml ja se mahtui hyvin yhteen 50 ml:n sentrifugiputkeen. Jatkokäsittely tehtiin nykyisen ohjeen mukaan. Näytteen neutralointiin tarvittiin kolme sentrifugointia. Lasia mikroskopoitaessa siltä löytyi muutama piilevä. Sitä verrattiin nykyisellä menetelmällä tehtyyn saman tapauksen A-näytteeseen. Kyseiseltä lasilta ei kuitenkaan löytynyt piileviä, mikä on todisteena siitä, että nykyisen menetelmän piileväsaanto on joissain tapauksissa heikko.

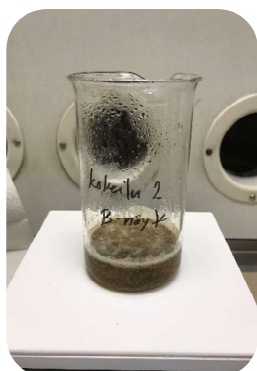
Maksa- ja munuaisnäytteen (B-näyte) keittäminen

Kokeen 2 B-näyte keitettiin samalla tavalla kuin A-näyte. Kudosta punnittiin 10 grammaa 400 ml:n dekanterilasiin, tislattua vettä lisättiin 50 ml, typpihappoa 20 ml ja vetyperoksidia 10 ml. Toisin kuin kokeessa 1, B-näyte ei kuohunut yli typpihappolisäyksen jälkeen. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 7.

Taulukko 7. B-näytteen keittämisen vaiheet (koe 2)

Keittämisen eteneminen	Kellon-aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	10:45			200 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	11:00	10 ml		
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	11:40			
Typpihappoa lisätty	11:55	5 ml		
Typpihappoa lisätty	12:00	5 ml		
Yhteensä 5 ml vetyperoksidia lisätty	12:00		5 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	12:10		5 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	12:10	yhteensä 20 ml	yhteensä 10 ml	
Näytteen paino: 10 g				
Tislattun veden määrä: 50 ml				

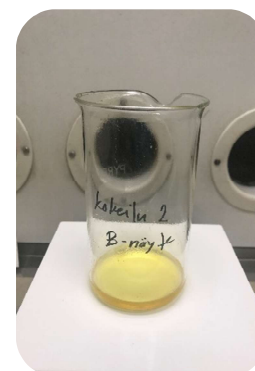
B-näytteen keittäminen kesti n. 1,5 tuntia, mikä on jälleen huomattavasti vähemmän kuin kokeessa 1. Alla olevassa kuvasarjassa havainnollistettuna keittämisen aikana tapahtuneet hajoamis- ja värimuutokset (kuva 6).



Typpihapon
lisäys



Vetyperoksidin
lisäys aloitettu



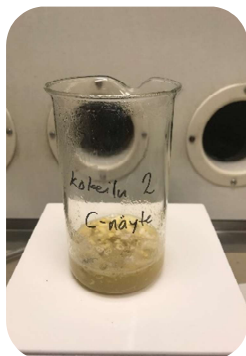
Keittäminen
lopetettu

Kuva 6. Kuvasarja B-näytteen keittämisestä (koe 2)

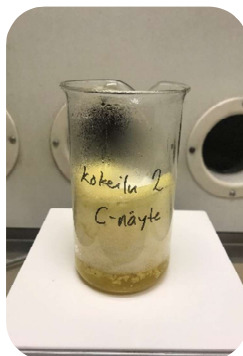
Näytteen lopputilavuus oli noin 20 ml ja se mahtui hyvin yhteen 50 ml:n sentrifugiputkeen. Jatkokäsittely tehtiin nykyisen ohjeen mukaan. Lasia mikroskopoitaessa siitä ei löytynyt piileviä. Sitä verrattiin nykyisellä menetelmällä tehtyyn saman tapauksen B-näytteeseen, jossa mikroskopoinnin tulos oli sama.

Aivonäytteen (C-näyte) keittäminen

C-näyte keitettiin kuten A- ja B-näyte. C-näytteen keittäminen epäonnistui, koska neste haihtui oletettua nopeammin ja näyte paloi pohjaan (kuva 7).



**Typpihapon
lisäys**



**Vetyperoksidi
n lisäys
aloitettu**



**Keittäminen
lopetettu**

Kuva 7. Kuvasarja C-näytteen keittämisestä (koe 2)

Keittäessä näytteitä näin pienillä nestemäärillä, on mahdollista, että kaikki neste pääsee haihtumaan ja näyte palaa pohjaan kiinni. Tämän takia näytettä on käytävä katsomassa noin puolen tunnin välein ja lisättävä typpihappoa tai vetyperoksidia tarvittaessa.

C-näytettä oli jäljellä vielä viisi grammaa, joten se keitettiin uudelleen. Vettä laitettiin 25 ml, typpihappoa 10 ml ja vetyperoksidia 5 ml. Keittämisen kulku ja sen aikana tehdyt happo- ja vetyperoksidilisäysten määrät sekä lisäysajat kirjattiin taulukkoon 8.

Taulukko 8. C-näytteen keittämisen vaiheet (koe 2)

Keittämisen eteneminen	Kellon- aika	Typpihappo	Vetyperoksidi	Keittolevyn lämpötila
Keittoprosessi aloitettu	12:10			200 °C
Typpihappoa lisätty (kun vesi alkoi kiehua)	12:20	5 ml		
Vetyperoksidin lisäys aloitettu	12:25			
Typpihappoa lisätty	12:35	2,5 ml		
Typpihappoa lisätty	12:45	2,5 ml		
Yhteensä 5 ml vetyperoksidia lisätty	12:45		2,5 ml	
Kiehumisen jälkeen lisätty vetyperoksidi	13:00		2,5 ml	keittolevy sammutettu
Keittoprosessi lopetettu	13:00	yhteensä 10 ml	yhteensä 5 ml	
Näytteen paino: 5 g				
Tislattun veden määrä: 25 ml				

Reagenssien lisäykset tehtiin C-näytettä keittäessä tiheämmin. Koska näytteen paino oli vain viisi grammaa, sen keittämiseen kului vain vajaa tunti. Näytteen lopputilavuus oli vain noin 10 ml. Jatkokäsittely tehtiin nykyisen ohjeen mukaan. Lasilta ei löytynyt mikroskoipoitaessa piileviä ja sama havainto tehtiin nykyisellä menetelmällä tehdyltä lasilta.

7 Entsyymidigestio

Typpihappodigestiokokeiden jälkeen haluttiin perehtyä paremmin entsyymidigestioon vaihtoehtoisena piilevieneristysmenetelmänä. Entsyymidigestion kokeilua varten tehtiin hintavertailu (taulukko 9). Typpihapon sekä vetyperoksidin ostohinta ja kulutus saatiin obduktioteknikoilta. Vertailuun otettiin mukaan myös keittomenetelmän kehityksen kokeilussa 2 käytetyt reagenssimäärät. Proteinaasi K:n hintaa tiedusteltiin VWR:ltä, ja kulutusarvio tehtiin luvussa 3.6.3 esitellyn julkaisun sekä valmiin protokollan perusteella.

Taulukko 9. Entsyymidigestion ja happodigestion hintavertailu

	65 % typpihappo (VWR)	30 % vetyperoksidi (EMD Millipore)	0,6 U/ml proteinaasi K (VWR)
hinta (1 l)	29,95 €	88,40 €	5 290 €
kulutus (1 näyte)	60 ml	n. 125 ml	200 µl
hinta (1 näyte)	1,80 €	11,05 €	3,20 €
hinta (3 näytettä)	5,40 €	33,15 €	9,55 €
kulutus (1 näyte, kokeilu 2)	20 ml	10 ml	
hinta (1 näyte, kokeilu 2)	0,60 €	0,88 €	
hinta (3 näytettä, kokeilu 2)	1,80 €	2,65 €	

Taulukon 9 perusteella typpihappodigestion hinta yhdelle näytteelle nykyisillä reagenssimäärillä on noin 13 € ja entsyymidigestiossa käytetyn proteinaasi K:n noin 5 €. Entsyymidigestion toteuttamiseen tarvittaisiin lisäksi Tris-puskuria sekä SDS-reagenssia. Ajallisesti se veisi huomattavasti enemmän työtunteja kuin nykyinen menetelmä. Jos reagenssimääriä vähennetään kokeilussa 2 käytettyihin määriin, happodigestion hinnaksi yhdelle näytteelle tulisi noin 1,50 €.

Tässä opinnäytetyössä päätettiin olla kokeilematta entsyymidigestiota, koska sen käyttöönotto vaatisi paljon aikaa, näytteiden vertailua sekä työntekijöiden uudelleen koulutusta. Lisäksi näyteastioita varten pitäisi hankkia uusi sentrifugi tai adapteri vanhaan sentrifugiin, sillä näytteen tilavuus olisi yli 50 ml, joka on tällä hetkellä käytössä olevien sentrifugiputkien tilavuus. Hintavertailusta koettiin kuitenkin olevan hyötyä, ja entsyymidigestiota voidaan mahdollisesti kokeilla tulevaisuudessa. Happodigestion ollessa toimiva piilevieneristysmenetelmä, päätettiin jättää entsyymidigestion kokeilu pois piileväanalyysimenetelmän kehityksessä ja keskittyä nykyisen menetelmän paranteluun.

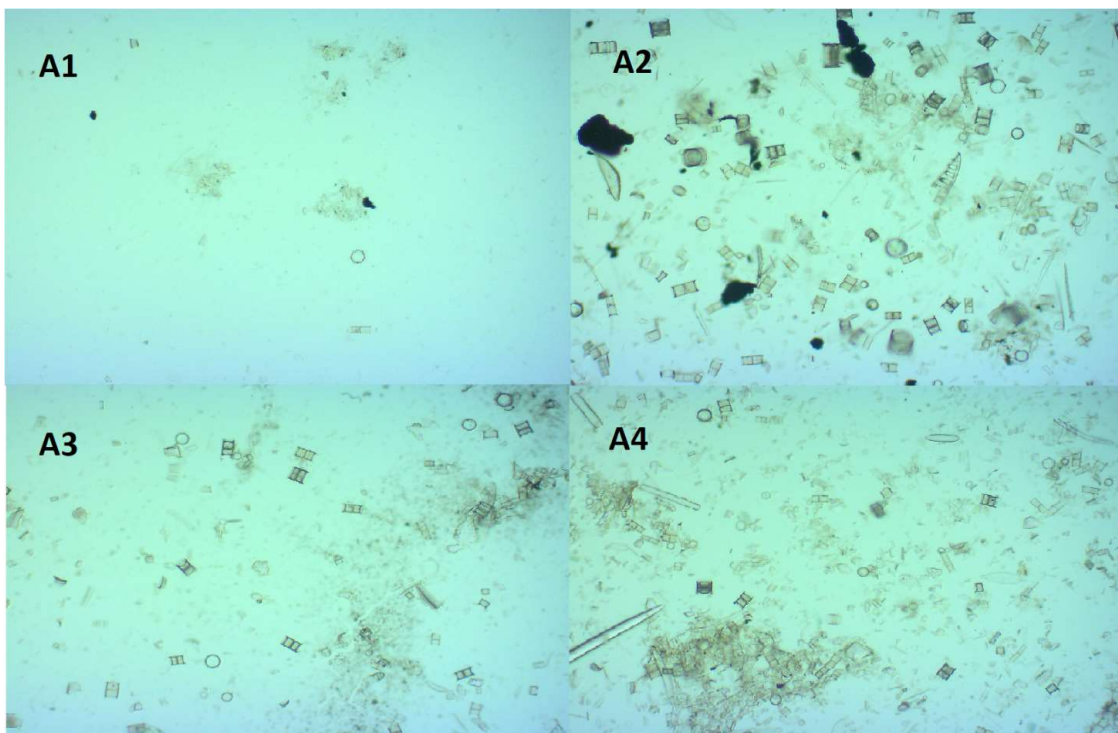
8 Tulokset

8.1 Preparaattien valmistus

Preparaattien valmistuksessa tehtiin kaksi eri koetta. Ensimmäisessä kokeessa kerättiin keittokolvissa olevasta näyteliuksesta piileväsaanto kokonaan. Kokeessa oltiin kiinnostuneita siitä, jääkö nykyisellä menetelmällä jätteeseen kaadettavaan liuokseen piileviä

vai painuvatko kaikki piilevät yön aikana kolvin pohjalle, ja päätyvät näytettä käsitellessä sentrifugiputkeen, johon loppuliuos (noin 20 ml) kaadetaan.

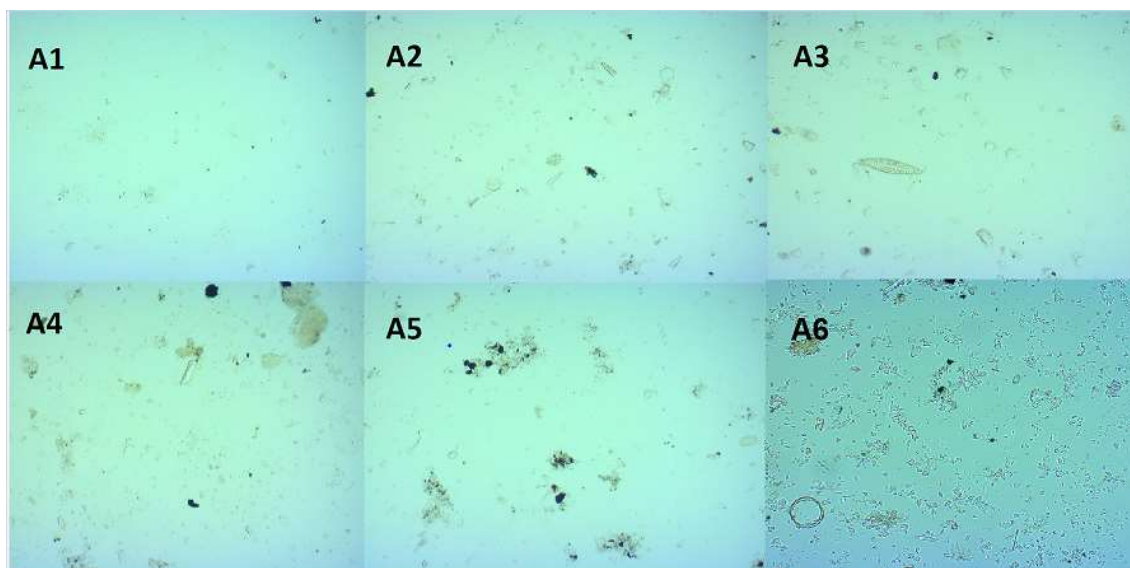
Kokeen 1 ensimmäisessä vaiheessa A-näytettä tuli yhteensä neljä preparaattia, joista A1-näyte on ensimmäinen kaato, A2-näyte toinen kaato ja niin edelleen. A4-näyte oli viimeinen kaato ja näin ollen edusti nykyisellä menetelmällä tehtyä A-näytettä. Laseja mikroskopoitaessa huomattiin, että piileviä oli havaittavissa kaikilla neljällä lasilla. A1-lasilla piileviä oli selkeästi vähemmän, joten tämän tapauksen A-näytteessä tuskin on ollut paljon kevyitä pintaleviä. A2-lasilla piilevien määrä kasvoi huomattavasti ensimmäiseen lasiin verrattuna. Piileviä löytyi myös A3-lasilta runsaasti. A4-lasilla piilevien määrä oli lähellä A2-lasin piilevä määrää, mutta lasilla oli niiden lisäksi paljon pohjasedimentistä irronneita fragmentteja ja näytteessä ollutta, kolvin pohjalle painunutta sakkaa. Kuvassa 8 havainnollistettuna hukkaan menevien piilevien osuus jatkoanalyysiin lähetettävästä näytteestä (A1, A2 ja A3).



Kuva 8. Lasit kuvattuna valomikroskoopilla (koe 1, osa 1)

Kokeen 1 toisessa vaiheessa A-näytettä tuli yhteensä kuusi preparaattia. A6-näyte oli viimeinen kaato ja näin ollen edusti nykyisellä menetelmällä tehtyä A-näytettä. Laseja mikroskopoitaessa huomattiin, että kyseessä oli tapaus, jossa piileviä oli muutenkin

vähän. Tässäkin kokeilussa piileviä löytyi myös muilta laseilta. Kuvassa 9 havainnollistettuna hukkaan menevien piilevien osuus jatkoanalyysiin lähetettävästä näytteestä (A1, A2, A3, A4 ja A5).



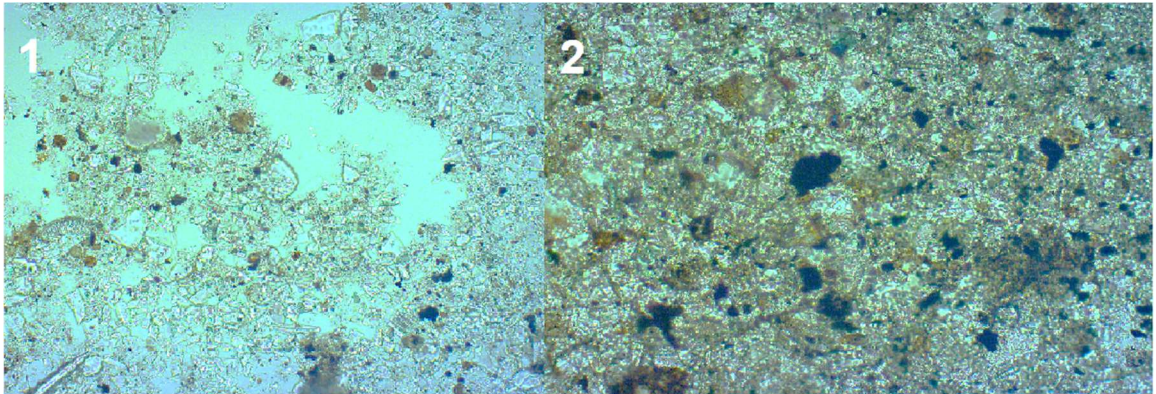
Kuva 9. Lasit kuvattuna valomikroskoopilla (koe 1, osa 2)

Kaikilla muilla paitsi lasilla A1 oli nähtävissä piileviä. Myös tässä erässä huomattiin, että piileviä jää jätteeseen kaadettavaan nesteeseen.

Molempien tapausten laseja mikroskoipoitaessa huomattiin, että läheskään kaikki piilevät eivät päädy jatkoanalyysiin lähetettävälle lasille. Hukkumistapausta selvitettäessä yliopistolla lasketaan mm. lasilla olevien piilevien määrä, joten nykyisellä menetelmällä tehtyjen lasien piileväkonsentraatio ei ole täysin luotettava. Tämän kokeen toteuttaminen oli kuitenkin aikaa vievää, ja oli vaikea arvioida kuinka monta 50 ml:n sentrifugiputkea kolvissa olevalle näytteelle tarvitsisi, jotta kaikkiin putkiin tulisi nestettä saman verran. Koska putkia tuli jo yhdelle näytteelle (A) 4–6, niiden sentrifugoimiseen kului huomattavasti enemmän aikaa verrattuna nykyiseen menetelmään. Lisäksi objektilaseja kului paljon enemmän kuin tavallisesti.

Kokeessa 2 keitettiin itse kaksi vesinäytettä, jotka oli kerätty samasta paikasta. Toisesta vesinäytteestä tehtiin piileväpreparaatti nykyisellä ohjeella ja toisesta vesinäytteestä preparaatti tehtiin sekoittamalla kolvissa oleva näyteliuos homogeeniseksi ja kaatamalla siitä noin 20 ml liuosta sentrifugiputkeen.

Näytteet olivat lasille pipetoitaessa niin tummat, että niistä tehtiin uudet lasit 1:1-laimennoksella (pasteur-pipetillä yksi pisara näytettä ja yksi pisara tislattua vettä). Valmiit lasit kuvattiin (kuva 10) saannon vertailemiseksi.



Kuva 10. Lasit kuvattuna mikroskoopilla

Laseja mikroskopoitaessa huomattiin, että nykyisellä menetelmällä tehdylle lasille päätyy piilevien lisäksi paljon enemmän kolvin pohjalla olevaa sakkaa kuin homogeenisestä näytteestä tehdylle lasille. Molemmilla laseilla piileviä oli runsaasti, mutta ne eivät näkyneet mikroskoopin kuvausohjelmassa kovin selkeästi sakan tummuudesta johtuen. Tämän kokeen laseja mikroskopoitaessa huomattiin, että sakkaisissa ja/tai mutaisissa näytteissä orgaaninen materiaali saattaa piilottaa alleen piileviä, jolloin niiden näkeminen mikroskopoitaessa on vaikeampaa. Kokeessa kuitenkin todettiin, että on todennäköisempää saada näytelasille enemmän piileviä, kun sentrifugiputkeen kaadetaan keittokolvin pohjalle jäävä liuos kuten nykyisessä ohjeessa.

Molemmissa kokeissa ongelmana oli se, että keittokolvissa olevaa näyteliuosta oli liikaa. Tämän vuoksi seuraavaksi tavoitteeksi otettiin piilevien keittomenetelmän kehittäminen. Tarkoituksena oli vähentää keittämisessä käytettyjen reagenssien ja tislattun veden määrää siten, että jäljelle jäävä näyteliuos mahtuisi kokonaisuudessaan yhteen 50 ml:n sentrifugiputkeen eikä liuosta jouduttaisi kaatamaan jäteastiaan ollenkaan. Näin ollen kaikki oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa kerätyssä kudoksenäytteessä olevat piilevät saataisiin näytteenkäsittelyn jälkeen objektilasille. Samalla otettiin huomioon happokeittämiseen liittyvä työturvallisuuden parantaminen. Tarkoituksena oli myös siirtä keittokolvien käytöstä sellaisiin astioihin, jotka sopisivat lämpölevyllä keittämiseen.

8.2 Keittomenetelmä

Keittomenetelmän kehityksen ensimmäisessä kokeessa sekä A- että B-näytteen keittämiseen meni suunnilleen yhtä kauan kuin obduktioteknikolla menee tällä hetkellä. C-näytteessä aikaa kului vähemmän, koska näytteen määrä oli pienempi, joten se hajosi lyhyemmässä ajassa. On kuitenkin otettava huomioon, että näytemäärä nykyisellä keittomenetelmällä on laskenut noin viiteen grammaan, joten voisi olettaa, että niin pieni kudospnäyte hajois nopeasti. Näytteiden pH jäi tässä kokeessa alhaisemmaksi, kuin nykyisellä menetelmällä, joten niiden neutraloiminen vaati kolmen sentrifugointi kerran sijaan neljä. Kaikki näytteet jäivät hieman kellertäväksi, mutta keltaisuus ei näkynyt lasseja mikroskopoitaessa. Näyteliuokseen jäänyt orgaaninen aines sen sijaan häiritsi mikroskopointia jonkin verran.

Oletuksena oli, että näytteitä keittäessä ne kuohuisivat rajusti yli ja aiheuttaisivat näin vaaratilanteen. Näin ei kuitenkaan käynyt kuin kerran B-näytettä keitettäessä. Kuohumisen kuitenkin ollessa todennäköistä vetokaapin ja keittovälineiden, kuten keittolevyn, tulisi kestää happoroiskeita. Lisäksi keittämisen aikana näytteestä haihtuvat höyryt vaativat vetokaapilta korkeatasoista suodatusjärjestelmää. Merkittävin havainto tässä kokeessa oli se, että kudospnäytteet hajoavat huomattavasti pienemmällä määrällä typpihappoa kuin nykyään käytetään. Esimerkiksi 20 gramman keuhkonäyte hajosi noin neljässä tunnissa, kun happoa oli 40 ml. Eli hapon ja kudospnäytteen suhde olisi 1:2. Nykyisellä menetelmällä se on 1:12 (viisi grammaa näytettä ja 60 ml typpihappoa). Koska tämän kokeen näytteet eivät keittämisen jälkeen mahtuneet yhteen 50 ml:n sentrifugiputkeen lukuun ottamatta C-näytettä, jota oli vain 13 grammaa, päätettiin keittämistä kokeilla uudestaan 10 gramman näytemäärillä (koe 2).

Kun näytteen paino oli vain 10 grammaa, sen keittämiseen kului paljon vähemmän aikaa kuin kokeessa 1 tai nykyisessä keittomenetelmässä kuluu. Näyteliuosta jäi jäljelle niin vähän, että se mahtui helposti 50 ml:n sentrifugiputkeen ja näin ollen sentrifugoidessa pellettiin päätyi oletettavasti kaikki piilevät, jota 10 gramman kudospalassa oli ja siitä pystyttiin tekemään vain yksi näytelasi. Koska näytteitä ei tarvinnut seisottaa yön yli, jotta piilevät laskeutuisivat kolvin pohjalle, sentrifugoinnin ja preparaatin valmistamisen pystyi suorittamaan saman päivän aikana heti kun neste oli jäähtynyt. Kokeessa 2 huomattiin lisäksi, että dekanterilasi toimi keittoastiana erlenmeyerä paremmin, sillä neste haihtui

nopeammin ja keittoaika sekä näytteen lopputilavuus pienenevät. Myös tässä kokeessa lopullinen näyteliuos jäi kellertäväksi, mutta se ei näkynyt valmiilla laseilla. Koska näyteliuos mahtui hyvin 50 ml:n sentrifugiputkeen, siihen voisi lisätä enemmän vetyperoksidia, jotta näytteestä saataisiin täysin kirkas.

Merkittävin havainto kokeessa 2 oli se, että piileviä löytyi koelasilta A, mutta ei nykyisellä menetelmällä tehdyiltä A-lasilta, joka lähetetään yliopistolle analysoitavaksi. Tämä voi olla vain sattumaa, mutta on hyvä esimerkki nykyisen menetelmän heikkoudesta.

8.3 Muut parannukset

Piilevien keittämisen siirtyessä vuonna 2021 histologian laboratorion työntekijöille, on työturvallisuuden oltava parempi kuin nykyään. Keittämisen aikana on käytettävä suojalaseja, paksuja suojakäsineitä sekä mahdollisesti haponkestävää esiliinaa ja suusuojainta. Keittämisen aikana vetokaapin luukku on pidettävä alhaalla, ja vetokaapin tason voi suojata esimerkiksi pahvisilla alustoilla. Happolisäykset tehdään pipetillä, ja näytteen kuohuessa yli, lisätään happoa vain muutama millilitra kerrallaan. Vetyperoksidia voi lisätä keittämisen edetessä erillisestä dekantterilasista pasteur-pipetillä tipoitain.

Jos tavoitteena on saada keitetty näyteliuos kokonaan 50 ml:n sentrifugiputkeen, kudoksen näytteen painon tulisi olla noin 10 grammaa. Tämän vuoksi ulkopuolelta tulevia kudoksenäytteitä pitäisi toimittaa histologialle vähintään 20 grammaa, jotta puolet näytteestä voidaan säilyttää keittämisen epäonnistumisen varalta. Tätä varten tulisi hankkia isompia näytepurkkeja, nykyisten 50 ml:n näytepurkkien sijaan.

9 Yhteenveto

Tämä opinnäytetyö oli suurimmaksi osaksi empiirinen tutkimus, jossa pyrittiin kehittämään piileväanalyysin tuloksia erilaisten kokeiden avulla. Analyysin haastavin osuus oli näyttemateriaali ja sen monimuotoisuus. Kudokset, joista piileväanalyysissä käytettävät näytteet kerätään ovat jokaisella vainajalla erilaiset. Esimerkiksi kudoksen digestioimiseen kuluvaan aikaan vaikuttaa se, kuinka paljon kyseinen kudoks on jo ruumiin

mädäntyessä hajonnut. Haasteeksi osoittautui myös se, että piileväanalyysi itsessään on harvinainen menetelmä, joten tiedon etsiminen oli vaikeaa.

Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella piilevien keittäminen voidaan toteuttaa lämpölevyllä, korkeassa dekantterilasissa niin, että kudoksen paino on noin 10 grammaa, typpihappoa käytetään noin 20 ml ja vetyperoksidia vähintään 10 ml, mutta enintään sen verran, että koko liuos mahtuu yhteen 50 ml:n sentrifugiputkeen. Näytteestä voidaan valmistaa preparaatti samana päivänä, kun se keitetään, kunhan näyteliuos on jäähtynyt. Keittämistä varten on hankittava joko yksi iso keittolevy tai useampi pieni keittolevy. Koska jotkin näytteet saattavat kuohua yli tai niistä saattaa roiskua näyteliuosta happolisäysten aikana, näyteastioiden tulee olla tarpeeksi kaukana toisistaan tai erotettu jonkinlaisilla väliseinillä. Vetokaapin ja lämpölevyn tulisi kestää happoroiskeita ja keittäessä haihtuvia kaasuja. Keittämisen aikana on käytettävä suojalaseja, paksuja suojakäsineitä sekä mahdollisesti haponkestävää esiliinaa ja suusuojainta. Jos tämä keittomenetelmä otetaan käyttöön, olisi hyvä suorittaa vielä lisää toistokokeita rinnakkain nykyisen menetelmän kanssa, jotta niitä voitaisiin vertailla keskenään. Tällä menetelmällä tehtyjä näytelaseja pitäisi analysoida yliopistolla ja varmistaa, että näytteiden laatu on hyvä ja reagenssimäärien vähentäminen ei häiritse tulosten tulkintaa.

Tärkein tavoite tässä projektissa oli poistaa piileväanalyysin virhelähteitä ja tehdä siitä turvallisempi ja luotettavampi menetelmä. Koska kyseistä menetelmää ei ollut kehitetty sen käyttöönoton jälkeen, kaikki tässä työssä tehdyt kokeet sekä havainnot koettiin hyödylliseksi. Vaikka kaikissa kokeissa ei saatu haluttua lopputulosta, jokainen niistä antoi arvokasta lisätietoa histologian laboratorion työntekijöille, mikä auttaa menetelmän toteuttamista uusissa tiloissa. Menetelmän kehittämistä olisi hyvä jatkaa tulevaisuudessa käyttäen tätä opinnäytetyötä apuna. Kehittämiskohteina on ainakin vesinäytteiden keittäminen sekä käytetyn vetyperoksidin määrä. Jos happodigestiosta päätetään luopua kokonaan, olisi seuraavaksi hyvä kokeilla entsyymidigestiota. Vaikka se on suhteellisen kallis ja hidas menetelmä, se on kuitenkin happodigestiota turvallisempi toteuttaa.

Lähteet

- 1 Oikeuslääkintä. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta>. Luettu 17.6.2019.
- 2 Drowning. Verkkoaineisto. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drowning>. Luettu 14.6.2019.
- 3 Hukkuneiden ennakkotilasto. Verkkoaineisto. Suomen Uimaopetus ja Hengenpelastus liitto. http://www.suh.fi/tiedotus/hukkumistilastot/hukkumiset_2018. Luettu 14.6.2019.
- 4 Penttilä, Antti (toim.); Hirvonen, Jorma (toim.); Saukko, Pekka (toim.) & Karhunen, Pekka J. (toim.). 2000. Oikeuslääketiede. 1. painos. Helsinki: Duodecim.
- 5 Kuolemansyyn selvittämisjärjestelyt. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittamisjarjestelmat>. Luettu 17.6.2019.
- 6 Pollanen, Michael S. 1998. Forensic diatomology and drowning. Toronto: University of Toronto, Department of Chemistry and the Forensic Science Program.
- 7 Auer, Antti. 1986. Pii-levät (Diatomeae) hukkumiskuoleman diagnostiikassa. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, oikeuslääketieteen laitos.
- 8 Lunetta, Philippe. 2005. Bodies found in water, epidemiological and medico-legal issues. Helsinki: Helsingin yliopisto, oikeuslääketieteellinen tiedekunta.
- 9 Department of Forensic science. Verkkoaineisto. Extraction methods of diatoms - a review. <https://pdfs.semanticscholar.org/2271/d1c78dacf31e4164be5abd0c4ed438b0daff.pdf>. Luettu 12.8.2019.
- 10 DiGiancamillo, Alessia; Domeneghini, Cinzia; Gibelli, Daniele & Cattaneo, Cristina. 2011. Diatom extraction with HCl from animal tissues: A technical note. Verkkoaineisto. Legal Medicine. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1344622311000769>>. Luettu 19.6.2019.
- 11 Ago, Kazutoshi; Hayashi, Takahito; Ago, Mihoko & Ogata, Mamoru. 2011. The number of diatoms recovered from the lungs and other organs in drowning deaths in bathwater. Verkkoaineisto. Legal Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565542>>. Luettu 20.6.2019.

- 12 Takeichi, Toshiaki & Kitamura, Osamu. 2009. Detection of diatom in formalin-fixed tissue by proteinase K digestion. Verkkoaineisto. Forensic Science International. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073809002096>. Luettu 1.7.2019.
- 13 Springer Link. Verkkoaineisto. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01247273>. Luettu 13.8.2019.

Nykyinen ohje piilevänäytteidenottoon ja -käsittelyyn oikeuslääkäreille ja obduktioteknikoille

Näytteiden otto-ohjeet

Ennen ruumiinavauksen aloittamista otetaan jokaista näytettä varten puhtaat instrumentit ja näytteiden säilytysastiat valmiiksi työpöydälle. Huomioi erityisesti puhtaus näytteiden otossa ja varo käyttämästä selluvanua lähettyvillä. Varo myös vesijohtovettä, älä käytä talkkikäsineitä.

Kallon avaus. Aivoja poistamatta otetaan vasemmalta puolelta aivokudoksen sisäosista puhtailla välineillä n. 50 g:n painoinen näytepala C:llä merkittyyn näyterasiaan, joka suljetaan. Mikäli aivot lähetetään neuropatologiseen tutkimukseen, otetaan näytteen tilalle luuydin näyte.

Rintakehän avaus. Keuhkoja poistamatta otetaan vasemman keuhkon ylä- tai alalohkosta puhtailla välineillä n. 50 g:n painoinen näytepala A:lla merkittyyn näyterasiaan, joka suljetaan.

Maksasta otetaan puhtailla välineillä n. 50 g:n painoinen näytepala B:llä merkittyyn näyterasiaan ja avauksen edetessä puolikas vasenta munuaista samoilla välineillä samaan rasiaan, joka suljetaan.

Poliisi toimittaa yleensä vainajan mukana **vesinäytteen** löytöpaikan vedestä (meri, järvi, lampi, joki, oja, jne.). Poliisi ei aina ota vesinäytettä, mutta se voidaan pyytää poliisilta jälkitoimituksena. Vesinäytettä pitäisi olla noin puoli litraa, joka laitetaan puhtaaseen lasi- tai muovipurkkiin tai -pulloon. Näyteastia tulee huuhdella näytteenottopaikan vedellä ennen näytteen ottamista.

Huom! Vesinäytettä ei oteta aivan pintavedestä, jos kyseessä on syvä vesi esim. meri, järvi, joki jne. vesinäyte otetaan 10-20 cm pinnan alapuolelta. Jos

kyseessä on oja tai lammikko missä on vähän vettä, pyritään vesinäyte ottamaan niin, että näytteeseen ei tulisi liikaa pohjakerrostumaa.

Luuydinnäyte otetaan, jos vainaja on luurankoasteella eikä sisäelimiä ole käytettävissä. Sahataan noin **10 cm:n pala reisiluuta, joka halkaistaan ja näyte otetaan halkaistusta putkiluusta kaapimalla luuydintä näyteastiin.**

Näytteiden merkinnät: **A = keuhkoa, B = maksaa ja munuaista, C = aivoa.** Kaikkiin piilevänäytteisiin laitetaan ruumiinavausnumeronimitarra.

Näytteet viedään ruumiinavaustilan käytävän kylmähuoneeseen n:o 51 piilevänäytteille varattuun lokeroon ja ne tulee kuitata vastaanotetuiksi. Piilevänäytelähete pannaan huoneeseen n:o 1036 histologian laboratorion näytteiden näytekärryyn.

Piilevä näytteiden keitto-, valmistus- ja varanäytteiden säilyttäminen

Vainajien luovutusvuorossa oleva obduktioteknikko saa vainajan nimen ja näytteen työnumeron histologian laboratorion. Näytteiden keittäminen aloitetaan aamuisin ennen vainajien luovutusta hautaustoimistoille (otto-ohje liitteenä 9/5).

Piilevien keittäminen tapahtuu ainoastaan keittämiseen tarkoitettussa huoneessa n:o K054. Näytteitä on yleensä kolmenlaisia; A = keuhko, B = maksa ja munuainen, C = aivo sekä lisäksi voi näytteenä olla luuydintä ja vesinäyte. Varataan erikseen jokaista näytettä varten omat puhtaat instrumentit (sakset ja suonipuristimet tai atulat). Haetaan näytteet ruumiinavaustilan käytävän kylmähuoneesta (n:o 51, +1 - +4°C). Laitoksen ulkopuoliset näytteet saapuvat postin kuljettamana oikeuskemian osastolle. Oikeuskemian osastolla piilevänäytteistä vastaava henkilö huolehtii näytteen ja lähetteen (liite 9/4) toimittamisen ruumiinavaustilan käytävän kylmähuoneeseen (n:o 51) piilevänäytteille varattuun paikkaan, jossa näytteet kuitataan tuoduiksi. Vastuuhenkilö huolehtii lähetteestä yhden osan histologian laboratorioon, jossa sille annetaan työnumero.

Kiireelliset henkirikostapaukset ilmoitetaan histologian laboratorioon ja ruumiinavaustoimintoihin ja niiden työstäminen aloitetaan välittömästi. **Henkirikostapausten piileviä valmistettaessa ei saa samanaikaisesti valmistaa muita piilevänäytteitä kontaminaation välttämiseksi.** Samoista jäljelle jääneistä näytteistä keitetään pyydettyinä rinnakkaisnäytteet seuraavana päivänä.

Pidetään huoli siitä, ettei näytteiden tai käytettävien instrumenttien lähelläkään ole missään vaiheessa selluvanaa, jonka pöly sisältää runsaasti piileviä. Selluvanun valmistuksessa käytetään joki- tai järvivettä lähes 2800 litraa/minuutti. Varotaan myös vesijohtovettä, jossa voi olla piileviä.

Laitetaan keittolevyt lämpiämään, enintään voimakkuusasteelle 7. Tarkistetaan, että vetokaappien huippuimuri on päällä. Mikäli vetokaappien toiminnassa on häiriöitä ei piileviä saa keittää, myrkyllisten kemikaalihuurujen takia. Merkitään pii-levähuoneessa olevaan keittopäiväkirjaan tarvittavat tiedot: työnumero, vainajan nimi, keitettävien näytteiden laatu (A/B/C/luuydin/vesi), keittopäivä, lääkäri, sekä valmistavan preparaattorin kuittaus. Jos postin kuljetamat näytteet ovat kontaminoituneet toisiinsa tai näyteastia on rikkoutunut, tehdään siitä merkintä keittopäiväkirjaan ja ilmoitus histologian laboratorioon. Kirjoitetaan keitossa käytettäviin kolveihin spriiiluokoisella tussilla näytteen ABC-koodi ja pii-levänäytteen järjestysnumero (P-XX). Vesinäyte tai luuydinnäyte kirjoitetaan kolviin.

Täytetään kolvit tislattulla vedellä siten, että noin puolet pyöreästä osasta täyttyy. Puhtaita kolveja ja tislattua vettä saa histologian laboratoriosta.

Lisätään kolveihin 20 - 50 g (noin puolet) kutakin näytettä pieniksi paloiksi pilkottuna. Jokaiselle elinnäytteelle käytetään omia puhtaita instrumentteja. Merkitään keittopäiväkirjaan käytetty näytemäärä, näytteestä säästetään aina pieni määrä varanäytteeksi. Reisiluun sisältä kaavitaan puhtaalla veitsen kärjellä luuydinnäyte. Jos näytettä on vähän, voidaan laittaa reisiluun palaset kokonaan kolveihin kiehumään.

Asetetaan kolvit keittolevyille ja laitetaan kolvin kaulaosa kumikaulukseen mahdollisesti ylikiehuvan nesteen pääsyn estämiseksi keittolevyille, käännettään kiinnitystanko kolvien kaulaosan päälle estämään kolvien hyppimisen ja rikkoutumisen keittovaiheen aikana.

Nesteen alkaessa kiehua lisätään siihen varovasti ensin noin 20 ml 65 % typpihappoa ja sen jälkeen 20 ml 30 % vetyperoksidia pöydällä olevista nokallisista, muovisista pikkupulloista. Lisätään typpihappoa ja vetyperoksidia aina tarpeen vaatiessa eli nesteen kiehuessa ja haihtuessa. Varotaan, ettei neste kiehu yli (keitin voi rikkoutua!) tai ettei seos kuivu tai pala pohjaan. Erityisesti C-näyte eli aivokudos kuohuu erittäin herkästi. Tarvittavien kemikaalien tilauksesta vastaa käyttötavaritilauksista vastaava obduktioteknikko. Typpihapon ja vetyperoksidin käyttöturvallisuustiedotteet ovat piilevien keittuhuoneessa.

Seos on valmis, kun neste on suhteellisen kirkasta ilman kudokappaleita. Neste ei tule aina täysin kirkkaaksi. Lopuksi kuumaan, mutta ei kiehuvaan liuokseen, lisätään noin 10 ml vetyperoksidia. Ajallisesti keittäminen kestää noin kahdesta neljään tuntia.

Vesinäytteet tulevat purkeissa tai pulloissa. Koska piilevät (useimmat kooltaan 10-80/1000 mm) ovat niiden pohjalla ja eräät lajit liimautuneina reunoihin on näyte sekoitettava huolellisesti ravistamalla. Mikäli näytteen liiallinen vesimäärä haittaa ravistamista on sitä estävä osa kaadettava pois. Mikäli samaan tapaukseen liittyy useampia vesinäytteitä, on ne lähetteen mukaisesti eriteltävä selvästi toisistaan (esim. löytö-/tapahtumapaikka, X metriä rannasta, numero X, jne.). Vesinäyte kaadetaan kolviin, johon kirjoitetaan vesinäyte, annetaan kiehahtaa, lisätään 20 ml 65 % typpihappoa sekä 20 ml 30 % vetyperoksidia ja jätetään jäähtymään. Kun näytteet ovat täysin jäähtyneet, ne viedään kolveissa kuljetukseen tarkoitetulla korilla histologian laboratorion huone n:o 2084 vetokaappiin ja kuitataan näytteet tuoduiksi. Piileviä ei saa keittää perjantaisin eikä juhlapyhien aattona, koska näytteet tulee jatkokäsitellä viimeistään seuraavana päivänä. Obduktioteknikko kuittaa keittopäiväkirjaan histologian laboratorioon viedyt näytteet.

Histologian laboratoriossa näytteet valmistetaan siten, että keittokolvissa olevasta näytteestä kaadetaan liika happo pinnalta pois ja jäljellä oleva liuos sentrifugoidaan 7 minuutin ajan, 2600 kierrosta/min. Piileväsakkaa pestään = sentrifugoidaan tislattulla vedellä 3-4 kertaa, kunnes pH on neutraali. Pesuvesi kaadetaan pois ja jäljellä oleva sakka putkissa toimitetaan histologian laboratorioon.

Histologian laboratoriossa näytteistä valmistetaan preparaattit siten, että objektilasi asetetaan lämpölevylle, lasille pipetoidaan sentrifugoitua näytettä, jonka annetaan kuivua ja peitinlasi kiinnitetään Naphrax:lla. Histologian laboratoriossa ilmoitetaan piilevänäytteiden tutkimisesta vastaavalle tutkijalle, joka suorittaa mikroskooppisen tutkimuksen.

Käytettyjen kolvien pesusta huolehtii histologian laboratorion henkilökunta. Jotta kolvit eivät pääse kuivumaan, ne laitetaan likoamaan vesijohtoveteen heti käytön jälkeen ja suoritetaan käsinpesu, sekä laitetaan 1 vuorokaudeksi emäksiseen pesetti -dekoliuokseen. Kolvit konepestään automaattiohjelmalla, jonka loppuhuuhdeltu tapahtuu tislattulla vedellä ja lämpödesinfektio suoritetaan +80°C:ssa. Kolvit laitetaan kuivumaan alassuin kuivauskaappiin.

Piilevä varanäytteiden säilytys ja hävitys. Varavesinäyte säilytetään piilevän keittuhuoneen hyllykössä. Keittopäivästä kuuden kuukauden kuluttua varavesinäyte hävitetään kaatamalla se lavuaariin, näyteasiat hävitetään sekajätteen mukana. Ennen hävittämistä astioista poistetaan vainajan henkilötiedot. Varakudosnäytteitä säilytetään pakastehuoneessa C (-10 - -18°C) puoli vuotta keittopäivästä ja ne hävitetään muiden kudoksenäytteiden hävityksen yhteydessä, tuhkaamalla krematoriossa. Varakudosnäytteisiin ja vesinäytteisiin merkitään mustalla tussilla piilevänäytteen järjestysnumero ja vuosiluku. Merkitseminen selventää vanhojen näytteiden hävitystä.

Piilevä asiantuntija tai oikeuslääkäri voi tarvittaessa, säilytysajan puitteissa, pyytää näytteiden säilyttämistä toistaiseksi. Tällöin näytteisiin merkitään maininta "SÄILYTETÄÄN".

Kontrollinäyte (0-näyte) keitetään erillisenä muista näytteistä joka kymmenennen valmistuskerran yhteydessä. Ennen varsinaisen piilevänvalmistusta laitetaan keittokolviin keitettävänä oleva piilevänumero sekä kolviin merkintä 0-näyte. Täytetään kolvi noin puoleen väliin tislattua vettä, annetaan veden kiehahtaa, lisätään typpihappo ja vetyperoksidi. 0-näyte valmistetaan kuten normaalisti vesinäyte ja viedään muiden keitettyjen näytteiden mukana oikeusbiologian laboratorioon. **Piileväasiantuntija antaa palautteen 0-näytteestä, joka merkitään piileväkeittokirjaan.** Laatuvastuuhenkilö kokoaa palautteesta yhteenvedon, joka käsitellään laatuauditoinnissa sekä johdon katselmuksessa.

Nykyinen ohje piileväpreparaattien valmistukseen histologian laboratorion työntekijöille

PIILEVÄNÄYTTEET

JOHDANTO

Luonnonvesissä kasvaa piileviä, jotka vettä hengitettäessä kulkeutuvat keuhkojen kautta verenkiertoon ja siten muualle elimistöön. Vedestä löydettyistä tai hukkuneiksi epäillyistä vainajista otetaan obduktion yhteydessä kudoksenäytteitä piilevien kvantitatiivista ja kvalitatiivista määrittystä varten vainajan kuoleman syyn ja -luokan selvittämiseksi. Näytteet keitetään ruumiinavausyksikössä typpihappoliuoksessa ja niihin lisätään vetyperoksidia. Näytteiden jatkokäsittely tapahtuu histologian laboratoriossa, jossa typpihappo pestään pois näytteestä. Tämän jälkeen näytteet siirretään objektilaseille mikroskooppista tutkimusta varten.

NÄYTTEIDEN VASTAANOTTO JA KIRJAAMINEN

Piilevänäytteiden valmistaminen histologian laboratoriossa alkaa läheteiden ja näytteiden vastaanotolla ja niiden kirjaamisella piilevänäytteiden työkirjaan (paperiversio).

Obduktioteknikko toimittaa edellisen päivän ruumiinavausten obduktionäytteiden ja histologian läheteiden mukana piilevä läheteet histologian laboratorioon. Piilevänäytteiden läheteessä on ainakin seuraavat tiedot: vainajan nimi, obduktionumero, obdusentin nimi/ lähettäjän nimi/ paikka, ruumiinavauspäivämäärä ja näytteiden laatu. Obduktioteknikko saa vainajan nimen ja näytteen työnumeron piilevänäytteiden työkirjasta.

Laitoksen ulkopuoliset näytteet saapuvat postitse oikeuskemian osastolle, jonka piilevänäytteistä vastaava henkilö toimittaa näytteen ja läheteen ruumiinavausyksikköön sekä yhden osan läheteestä histologian laboratorioon, jossa näytteelle annetaan työnumero.

NÄYTTEIDEN KIRJAAMINEN TYÖKIRJAAN

Piilevänäytteiden läheteestä ja näytekolveista kirjataan työkirjaan ainakin seuraavat tiedot:

- **PVM:** näytteiden vastaanottopäivämäärä
- **PIILEVÄ NRO:** annetaan näytteille juokseva numero **HUOM: P-nro ja vuosi kirjataan myös läheteen yläosaan** punakynällä (esim. P-XXX-yy)
- **OBDUKTIOTEKNIKON KUITTAUS** = Näytteiden keittäminen alkaa
- **NIMI:** vainajan sukunimi ja etunimi
- **OBDUSENTTI/LÄHETTÄJÄ/PAIKKA:** obdusentin/ lähettäjän nimi/paikka/laitos
- **HUOM: KIIREELLINEN**, muut huomiot
- **NÄYTTEEN LAATU:**
 - **A** = keuhkonäyte
 - **B** = maksa-, munuaisnäyte
 - **C** = aivonäyte
 - **Vesinäyte**

- **Luuydinnäyte**
- **0-näyte eli kontrollinäyte**, joka 10. kerta
- Muuta (erikoisnäytteiden merkinnät ilmoitetaan erikseen)
- **TEKIJÄ:** fuugauksen suorittaja kuittaa puumerkillä
- **NÄYTELASIT:** tekijän kuittaus valmistettujen näytelasien lukumäärästä
- **LASIEN MÄÄRÄ:** valmistettujen näytelasien lukumäärä
- **LASIT VALMIIT:** päivämäärä, tekijä kuittaa
- **LASIT HAETTU:** päivämäärä, tutkija kuittaa
- **LASIT TUOTU:** päivämäärä, tutkija kuittaa

Ristiriitaiset tiedot huomioidaan ja lähetteeseen ja/tai työkirjaan merkitään huomiot/puuttavat tiedot. Mikäli ristiriita ei tarkastelulla selviä, otetaan yhteys lähettäneeseen lääkäriin tai obduktioteknikkoon.

Piilevälähete säilytetään piilevä työkirjan välissä, kunnes pyydetty koelasit ovat valmiit. Lähete liitetään valmiiden piilevänäytelasien mukaan. Tutkija kirjaa/tutkijan ilmoittamat 0-näytteiden tulokset kirjataan piilevänäytteiden työkirjaan.

Materiaali

Aivo-, maksa-, munuais-, keuhko- tai luuydinnäyte typpihappoliuoksessa.

LAITTEET, VÄLINEET, LIUOKSET JA REAGENSIT

- Lasiset sentrifugiputket tylppä- ja teräväkärkiset (Laborex Oy, Ø28 mm, SV 2,8 mm, kartiopohjan pituus n.30 mm, putken pituus n. 115 mm)
- Putkiteline
- Taaraaja
- Sentrifugi Heraeus Multifuge 3S
- pH-paperia
- Haponkestävä 5 litran muovivälikäyttö, neutralointivälikäyttö
- Työn suoritus vetokaapissa (tai suojalasit, hengityssuojaimet 3M 7500)

LIUOKSET JA REAGENSIT

- Natriumvetykarbonaattia NaHCO_3
- tai natriumhydroksidia NaOH
- DDH_2O

TYÖN SUORITUS (vetokaapissa, kts. 3. Yleistä: Työturvallisuus ja työsuojelu)

Typpihapon pesu pois piilevänäytteistä

Obduktiotiloissa keitetyn näytteen tuo obduktioyksikön obduktioteknikko kolvissa huoneen 2084 vetokaappiin, missä sen annetaan jäähtyä ja seisoa yön yli.

1. Varaa kullekin kolville yksi sentrifugiputki. Merkitse putket samoilla teksteillä, kuin mitä keittokolveissa lukee. Jos näytteitä on pariton määrä, ota yksi samanlainen vastinputki.
2. Valuta 1-2 litraa kylmää vettä haponkestävään neutralointiastiaan.
3. Kolvissa olevasta näytteestä dekantoidaan ylimääräinen happo pois yhdellä kaadolla haponkestävään neutralointiastiaan, kunnes liuosta jäljellä n. 20 ml.
Vältä heiluttelua ja ravistelua, jotta (mahdolliset) piilevät pysyvät kolvin pohjalla.
4. Kaada loppuliuos sentrifugiputkeen.
5. Lisää muutama millilitra DDH_2O :ta kolviin vesipullolla huuhdellen, reunojen kautta pyöräyttäen. Pyöräytä/heiluta kolvia edestakaisin, jotta reunoillakin olevat mahdolliset piilevät saadaan mukaan. Kaada samaan putkeen.
6. Kun olet käsitellyt kaikki näytteet edellä mainitulla tavalla (kohdat 3-5), muodosta kahdesta putkesta pari (vastinputket). Aseta putket pari kerrallaan taaraajaan ja taaraa DDH_2O :lla täsmälleen saman painoisiksi. Merkitse parit ja nesteennpinnan korkeus putken kylkeen.
7. Vie näytteet sentrifugiin:
 - virta päälle ON/OFF nappulasta
 - aseta vastinputket vastakkain
 - sulje kansi
 - paina 1 (piilevä-ohjelma = 7 min. 2600 x g)
 - paina käynnistä ► . Sammuta laite end-piippauksen jälkeen ■.
8. Dekantoi neste varovasti kaatamalla viemäriin. Älä ravista putkea.
9. Lisää DDH_2O :ta reunoja pitkin pyöräyttäen merkkiin asti.
10. Kuivaa putken ulkopinta.
11. Sentrifugoi näytteet uudestaan samalla ohjelmalla.
12. Toista kohdat 8-11.
13. Testaa pH juuri fuugista otetuista näytteistä pH-paperilla, tuloksen pitää olla neutraali. Ellei neste ole neutraalia, jatka toistamalla kohtia 8-10 kunnes näytteiden pH on neutraali.
14. Dekantoi neste neutralointiastiaan.

PIILEVÄNÄYTELASIEN VALMISTAMINEN

- Huomioi erityisesti puhtaus näytteitä käsiteltäessä: puhtaat välineet, älä käytä lähettyvillä selluvanua tai vesijohtovettä ja älä käytä talkkikäsineitä (sisältävät piileviä)
- Jos postin kuljettamat näytteet ovat kontaminoituneet toisiinsa tai näyteastia on rikkoutunut, ilmoitetaan siitä histologian laboratorioon.
- Kiireelliset henkrikosepäilytapaukset ilmoitetaan ruumiinavausyksikköön ja histologian laboratorioon ja niiden työstäminen aloitetaan välittömästi. Henkrikosepäilytapauksen piilevänäytteitä valmistettaessa ei saa samanaikaisesti valmistaa muita piilevänäytteitä kontaminaation välttämiseksi.

VÄLINEET:

- Aluslasit, Thermo Scientific/Well tai Ring

- Lyijykynä (tarvittaessa tussi, permanent värit: vihreä tai punainen)
- Pasteur-pipetti (jokaiselle näytteelle oma)
- Lämpölevy n. 60 °C
- Naphrax-liima (laimennetaan tarvittaessa tolueenilla juoksevammaksi)
- Peitinlasit
- Bunsen-poltin ja vaihdettava kaasurasia (tarvittaessa ilmakuplien poistoon kuumentamalla liimaa)

TYÖN SUORITUS:

1. Aluslasin hieosaan kirjataan lyijykynällä näytteen tunnistetiedot ja muut huomiot:
 - tunnistetiedot: P-XXX/v
 - miten näyte on tehty: konsentroitu, laaja, sively, tippa(a)/lasi jne.
 - näyte: A, B, C, luuydin, vesi jne.
2. Näytettä sekoitetaan pasteur-pipetillä sentrifugiputkessa
3. **KOELASI**: aluslasille tiputetaan 2 tippaa näytettä pasteur-pipetillä, annetaan haihtua
4. Aluslasi päällystetään Naphrax-liimalla: tiputa liimaa aluslasille näytealueelle muutama tippa ja peitä päällyslasilla. Työn suoritus ja liiman kuivaus vetokaapissa
5. Avaa bunsen-poltin kaasuhana, sytytä virtaava kaasu sytyttimellä ja säädä liekki sopivaksi (pieni liekki riittää). Aloita kuumentaminen varovasti, liima voi leimahtaa liekkeihin. Kun liima kiehahtaa, ilmakuplat poistuvat lasien välistä. Varo roiskuvaa liimaa. Tolueeni voidaan haihduttaa kokonaan pois lasien välistä bunsen-polttimella tai lämpölevyllä 170 °C. Ilmakuplien haihduttamisen voi suorittaa vetokaapissa, jossa ei ole palavia aineita.
6. Valmistettujen lasien lukumäärä kirjataan piilevänäytteiden työkirjaan ja näytelasien mukaan liitetään pii-levälähete
7. Näytelaseja tutkiva tutkija voi pyytää lisälaseja ja antaa näytemääriin/lasi erilliset ohjeet (kts. tekniikat). Lasit valmistetaan kuten edellä kohdat 1-4 ja 6-8. Näytteet saa hävittää vain tutkijan ilmoitettua asiasta. Näytteet kerätään näyteputkiin ja säilytetään -20 °C pakastimessa. Sentrifugiputket viedään välinehuoltohuoneen 2070 tiskipöydälle konetiskattavaksi.

Erilaiset tekniikat valmistaa pii-levänäytelaseja:

- **Konsentroitu**: näytettä lasille esim. 2 tippaa enemmän kuin koelasiin, tarvittaessa käytetään koko näytemäärä
- **Laaja**: näytettä lasille sama määrä kuin koelasille, näytemäärä levitetään esim. 2-3 kertaa laajemmalle alueelle
- **Sively**: näytettä lasille vähemmän kuin koelasille esim. 1 tippa ja vedetään näyte kapillaari-ilmiöllä puhtaan alus- tai peitinlasin avulla aluslasille

Ylimääräisen happojätteen neutralointi

- Työn suoritus vetokaapissa (tai hengityssuojain ja suojalasit), varo roiskeita ja kiehumista.
- Mikäli neutralointiastiaan mahtuu, lisää siihen kylmää vettä, natriumvetykarbonaattia kuluu näin vähemmän eikä seos kiehu niin kiivaasti.

- Lisää natriumvetykarbonaattia tai natriumhydroksidia niin kauan, kunnes liuos on neutraali, testaa pH-paperilla.
- Kaada neutraloitu happojäte viemäriin, valuta reilusti kylmää vettä päälle.

Sentrifugiputkien ja keittokolvien pesu

- Poista putkista ja kolveista tussimerkinnot asetonilla.
- Kaada putkiin ja kolviin Dekoa. Anna vaikuttaa yön yli. (Dekoa voi käyttää uudestaan, kun se on vielä kirkasta, käytetty Deko kerätään keräysastiaan).
- Huuhtelee Deko ja pese putket ja kolvit DEKO 260 pesukoneella ohjelmalla 4.
- Puhtaat kolvit säilytetään välinehuoltohuoneen kaapissa ja putket huoneessa 2084.