



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Elise Juntunen ja Karoliina Keinänen

Manuaalisen värjäysmenetelmän ja Thermo Scientific™ Gemini AS vär- jäysautomaatin vertailu

Gram-, May-Grünwald-Giemsa ja Papanicolaou värjäykset

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.11.2020

Tekijä(t) Otsikko	Elise Juntunen ja Karoliina Keinänen Manuaalisen värjäysmenetelmän ja Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatin vertailu – gram-, May-Grünwald-Giemsä ja Papanicolaou värjäykset
Sivumäärä Aika	38 sivua 17.11.2020
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Heidi Malava
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla manuaalisesti ja automaattilla värjättyjen preparaattien laatukriteereitä, värjäykseen kuluvaan aikaan sekä työturvallisuutta. Tavoitteena oli löytää vastaukset asetettuihin tutkimuskysymyksiin eli eroavatko preparaattien laatukriteerit, ajankäyttö ja työturvallisuus manuaalisesti tai automaattilla värjättyinä toisistaan. Opinnäytetyö suoritettiin yhteistyössä Metropolia Ammattikorkeakoulun kanssa.</p> <p>Preparaatit värjättiin manuaalisesti sekä Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatilla käyttäen gram-, May-Grünwald-Giemsä ja Papanicolaou värjäyksiä. Manuaalisesti tehtävät värjäykset suoritettiin Metropolian työohjeiden mukaisesti ja automaattilla värjättäessä käytettiin ohjelmoituja protokollia.</p> <p>Gram-värjättyjen preparaattien laatukriteereissä ei ollut suuria eroja manuaalisen ja automaattilla tehtävän värjäyksen välillä. Värjäysautomaatti suoritti huuhtelut nopeammin kuin bioanalyttikon tekemänä, jolloin automaattilla värjättyissä gram-negatiivisissa preparaateissa oli intensiivisempi väri. Värjäysautomaatilla värjättyissä MGG-preparaateissa osa punasoluista jäi sinertävämmäksi, muuten laatukriteereissä ei ollut suuria eroja. Papanicolaou värjäyksen tulokset eivät olleet laadukkaita, joten tuloksia ei olleenkaan analysoitu opinnäytetyössä. Ajallisesti värjäysmenetelmät eivät eronneet toisistaan huomattavasti. Työturvallisuuden kannalta manuaalinen värjäys oli turvallisempi, koska kemikaaleja ei tarvinnut siirtää pois vetokaapista.</p>	
Avainsanat	gram-värjäys, May-Grünwald-Giemsä värjäys, vertailu, laatukriteerit

Author(s) Title	Elise Juntunen and Karoliina Keinänen Comparison of manual staining and Thermo Scientific™ Gemini AS automated slide stainer – Gram, May-Grünwald-Giemsa and Papanicolaou stains
Number of Pages Date	38 pages 17 November 2020
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Heidi Malava: Principal Lecturer
<p>Abstract</p> <p>The purpose of this thesis was to compare the quality criteria of manually and automatically stained slides, the time spent on the staining and work safety. The aim was to find answers to the following research questions: are there any differences in quality criteria, time-use or work safety between manually and automatically staining. The thesis was completed in collaboration with Metropolia University of Applied Sciences.</p> <p>The slides were stained manually and on a Thermo Scientific™ Gemini AS automated slide stainer using Gram, May-Grünwald-Giemsa and Papanicolaou staining. Manual staining was executed using Metropolia's directives and programmed protocols were used in the automated stainer.</p> <p>There were no major differences in quality criteria between manual and automated staining at Gram-stained slides. The automated stainer performed rinses faster than the biomedical laboratory scientist, resulting a more intense colour in the automated stained Gram-negative slides. In the automated stained MGG slides some of the erythrocytes remained more bluish but there were no major differences in the quality criteria. The results of Papanicolaou stained slides were not good quality, so the results were not analysed in this thesis at all. Time-wise the staining methods did not differ significantly. From a work safety point of view, manual staining was safer, because the chemicals did not have to be moved out of the fume hood.</p>	
Keywords	Gram stain, May-Grünwald-Giemsa stain, comparison, quality criteria

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Värjäysmenetelmät	2
2.1	Gram-värjäys	2
2.2	May-Grünwald-Giemsa värjäys	4
2.3	Papanicolaou värjäys	4
3	Värjäyspreparaattien laatu	6
3.1	Gram-värjäys preparaattien laatu	6
3.2	MGG-värjättyjen preparaattien laatu	8
3.3	Papanicolaou värjäys preparaattien laatu	9
4	Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatti	10
5	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	11
6	Opinnäytetyön menetelmät	12
6.1	Aineiston keruumenetelmät	12
6.2	Aineiston analysointimenetelmä	12
7	Suoritus	14
7.1	Gram-värjäyksen suorittaminen manuaalisesti	14
7.2	Papanicolaou värjäyksen suorittaminen manuaalisesti	15
7.3	MGG-värjäyksen suorittaminen manuaalisesti	15
7.4	Analysaattorilla värjääminen	16
8	Tulokset	17
8.1	Laatukriteerien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu gram-värjäyksessä	18
8.2	Laatukriteerien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu MGG-värjäyksessä	20
8.3	Laatukriteerien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu Papanicolaou värjäyksessä	23
8.4	Käytetty aika	24
8.5	Työturvallisuus	24
8.6	Virhelähteet	25
9	Pohdinta	25
9.1	Johtopäätökset	26
9.2	Kehittämisehdotukset	27

9.3	Ammatillinen kehitys	27
10	Eettisyys ja luotettavuus	28

1 Johdanto

Värjäyksillä on suuri merkitys laboratoriodiagnostiikassa. Bioanalytiikolla on värjäysprosessissa suuri vastuu, sillä hän tekee värjäyksen alusta loppuun. Sandlen mukaan suurimmat virhelähteet liittyvät lasien tulkintaan ja värjäyksen tekniseen suoritukseen. Yleisin virhelähde gram-värjäyksessä on sekoittaa gram-positiivinen bakteeri gram-negatiiviseen bakteeriin. Esimerkiksi gram-värjäyksen virheellinen värjäytyvyys tai virheellinen tulkinta voi olla potilaalle kohtalokas. Jos bakteeri tulkitaan väärin värjäytyvyyden perusteella ja tämän seurauksena potilaalle määrätään esimerkiksi väärä antibioottilääkitys. Joissain tapauksissa tämä voi olla kohtalokasta, sillä uuden värjäyksen valmistuminen voi viedä aikaa ja esimerkiksi verenmyrkytys eli sepsis voi johtaa muutaman tunnin viiveelläkin komplikaatioihin tai jopa kuolemaan. Virheitä voidaan ehkäistä bioanalytiikoiden hyvällä koulutuksella. (Lumio 2019; Sandle 2020; Thairu – Nasir – Usman 2014.)

Värjäysmenetelmiä on useita, mutta tähän opinnäytetyöhön valikoitui kolme värjäysmenetelmää, jotka ovat gram-, May-Grünwald-Giemsa eli MGG-värjäys ja Papanicolaou värjäys. Näytteet värjättiin manuaalisesti sekä Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatilla. Preparaateissa huomioitiin värjäykseen liittyviä laatukriteereitä. Gram-värjäyksessä tarkasteltiin bakteerien asettautumista lasille, morfologiaa sekä kuinka hyvin bakteerit ovat tunnistettavissa muotonsa perusteella. MGG-värjäyksessä laatukriteereinä olivat erytrosyyttien, leukosyyttien ja trombosyyttien muoto, koko ja erottuvuus. Leukosyyteissä laatukriteereinä olivat tuman, sytoplasman ja granuloiden muoto, koko ja erottuvuus. Papanicolaou värjäyksessä keskityttiin lieriö-, epiteeli- sekä tubulussolujen sytoplasman sekä tuman erottuvuuteen. Papanicolaou värjäyksellä värjätyt preparaattit eivät kuitenkaan olleet laadukkaita, joten jätimme niiden arvioinnin tästä opinnäytetyöstä pois.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla manuaalisesti ja automaattilla värjättyjen preparaattien laatukriteereitä, värjäykseen kuluvaan aikaan sekä työturvallisuutta. Tavoitteena oli löytää vastaukset asetettuihin tutkimuskysymyksiin eli eroavatko preparaattien laatukriteerit, ajankäyttö ja työturvallisuus manuaalisesti tai automaattilla värjättyinä. Opinnäytetyö suoritettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun Myllypuron kampuksella.

2 Värjäysmenetelmät

Värjäykset ovat osa kliinistä laboratoriotutkimusta ja niillä saadaan nopeasti ja edullisesti diagnosoitua näytteitä. Gram-värjäys on tehokas kliinisen mikrobiologian tekniikka, jossa värjäys voidaan tehdä suoraan bakteerinäytteestä. May-Grünwald-Giemsa värjäystä taas käytetään yleisimmin perifeerisen veren sivelyvalmisteiden tarkastelussa tai luuydindiagnostiikassa, jotka ovat hematologian perustutkimuksia. Värjäys sopii myös sytologisille näytteille, kuten imusolmukediagnostiikkaan. Gynekologisessa sytologiassa käytetään Papanicolaou värjäystä, joka tuo paremmin esille näytteestä levyepiteelin sytoplasman. Värjäykset toimivat myös rinnakkain, joka voi helpottaa diagnostiikkaa. (Aho 2000:142,147; Carlson – Koskela 2011; Pelliniemi 1998.)

2.1 Gram-värjäys

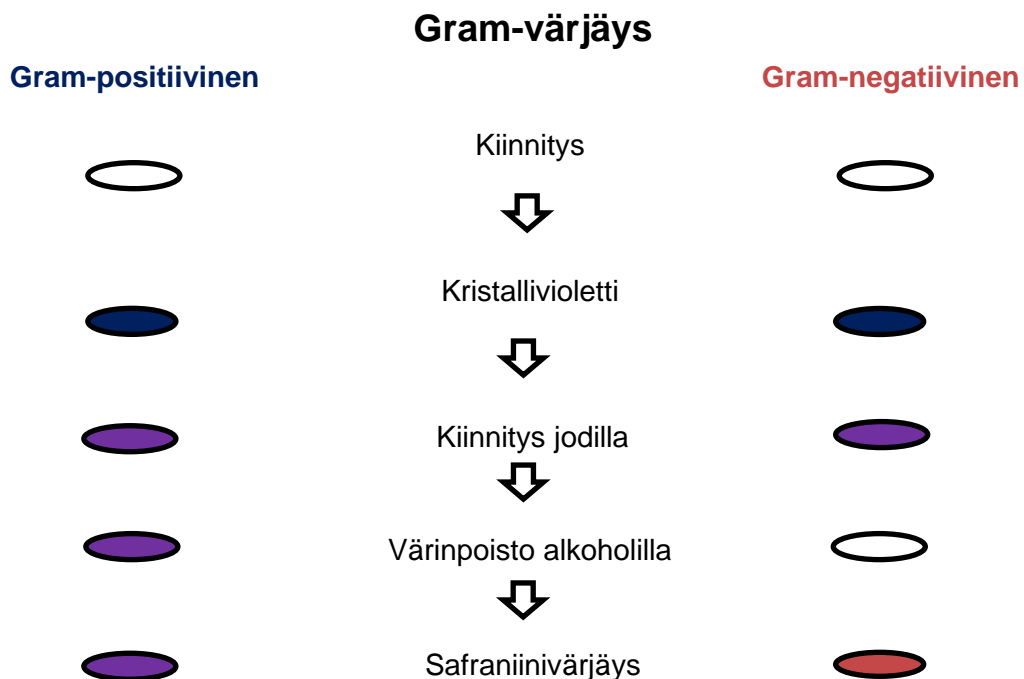
Tanskalainen Hans Christian Gram kehitti yli sata vuotta sitten gram-värjäyksen, joka perustuu bakteereiden soluseinän rakenne-eroihin. Bakteerit voidaan tämän perusteella jakaa gram-positiivisiin ja -negatiivisiin bakteereihin. Gram-negatiivisella bakteerilla on ylimääräinen ulkomembraani, eli sen soluseinässä on ylimääräinen kerros, kun taas gram-positiivisen bakteerin soluseinä on paljon paksumpi, mutta sillä ei ole ylimääräistä ulkomembraania. Soluseinä eli mureiinikerros koostuu peptidoglykaanista. Gram-positiivisella bakteerilla tämä kerros koostuu kymmenistä päällekkäisistä peptidoglykaanikerroksista, kun gram-negatiivisella bakteerilla niitä on vain muutama. (Carlson – Koskela 2010; Vaara – Skurnik – Sarvas 2010:21-22.)

Gram-värjäystä käytetään pikadiagnostiikassa, jolloin tulokset ohjaavat potilaan hoitoa vakavissa infektioissa. Näissä tapauksissa primaarivärjäys tehdään suoraan potilasnäytteestä, jonka avulla voidaan päätellä tulehduksen aiheuttaja ja määrätä oikea antimikrobitilääkitys. Yleisimmin gram-värjäys tehdään, kun halutaan tunnistaa bakteereja. Värjäyksessä käytetään jo valmiiksi kasvatettuja bakteeripesäkkeitä. (Liimatainen 2000:126.)

Gram-värjäys tulee tehdä puhtaille ja kuiville preparaattilaseille. Työtä helpottaa, kun lasit on merkitty ennen toimenpiteiden aloittamista. Fiksatiivina voidaan käyttää 95-prosenttista metanolia tai lasin liekittämistä. Kun gram-värjäys tehdään suoraan näytteestä, on tärkeää, että näyte levitetään näytelasille mahdollisimman nopeasti. Näyte tulisi levit-

tää lasille mahdollisimman ohuesti, jotta bakteerit asettuvat vierekkäin, eivätkä ole paksuissa kasoissa, tämä helpottaa värjäystä ja lasin mikroskopointia. Bakteeripesäkkeestä värjättäessä, voidaan näytettä ottaa suoraan puutikulla lasille tai sekoittaa lasin päällä olevaan keittosuola pisaraan. Jälkimmäinen menetelmä on hieman hitaampi, sillä keittosuolaliuoksen kuivumiseen menee enemmän aikaa. Molemmissa tapauksissa bakteeripesäke levitetään lasille puutikkua käyttäen. (Liimatainen 2000:126.)

Gram-värjäyksen periaate on yksinkertainen ja se on nopea tehdä. Ensimmäisessä vaiheessa bakteerit värjätään violetiksi kristallivioletin avulla, tämän jälkeen preparaatti huuhdellaan nopeasti vesijohtovedellä, jolloin gram-negatiivisista bakteereista huuhtoutuu ylimääräinen kristallivioletti pois ja gram-positiiviset bakteerit jäävät violeteiksi niiden usean peptidoglykaanikerroksen ansiosta. Tämän jälkeen kristallivioletti kiinnitetään jodilla. Huuhtelu tapahtuu vielä kerran alkoholilla, joka kiinnittää kristallivioletin tiukemmin peptidoglykaanikerrokseen. Samalla alkoholi hajottaa gram-negatiivisen bakteerin ulkomembraanin, jättäen sen peptidoglykaanikerroksen paljaaksi safraniinia varten. Kun safraniini lisätään, se tarttuu gram-negatiivisiin bakteereihin, värjäten ne punertaviksi. Lopuksi preparaattit huuhdellaan nopeasti vesijohtovedellä ja kuivataan imupaperilla. (Liimatainen 2000:127; Rissanen 2016:39; Sandle 2020.)



Kuvio 1. Gram-värjäyksen kulku (mukaillen Meurman 2010:54).

2.2 May-Grünwald-Giemsä värjäys

May-Grünwald-Giemsä värjäys perustuu kahteen polykromaattiseen liuokseen. May-Grünwald-liuos sisältää eosini Y:tä ja metyleenisiniä. Giemsa-liuos sisältää atsuuri B:tä, eosini Y:tä ja metyleenisiniä. Eosiini on sytoplasmaväri ja metyleenisini tarttuu solun happamiin osiin kuten tuman kromatiiniin. Väriliuoksien jälkeen tehdään vesihuuhte-luita ja ilmakuivaus. Ilmakuivauksen jälkeen näytteet kannattaa värjätä nopeasti. Lasin täytyy antaa kuitenkin kuivua, sillä muuten solut eivät värjäydy kunnolla. Värjäyksessä tumat värjäytyvät punertaviksi tai sinisiksi sekä tumajyväset värjäytyvät sinisiksi. Sytoplasma voidaan erottaa sinipunaisena. Punasolut erottuvat punaisina. Neutrofiilien granulat näkyvät punertavina. (Aho 2000:146.)

Värjättävä lasi valmistellaan ensin metanolissa, jonka jälkeen se käsitellään May-Grünwald-liuoksessa, jossa eosini on sytoplasmaväri ja metyleenisininen tiatsiiniväri. 10 minuuttia kestävä Giemsa värjäys voidaan tehdä välittömästi tämän jälkeen. Metanolia käytetään värjäysliuoksessa liuottimena ja glyserolia stabiloijana. Väriliuosten jälkeen tehdään vesihuuhtelu, jota seuraa muutaman minuutin erottelu fosfaattipuskurissa. Fosfaattipuskurin on hyvä olla pH:lta 6.8, hieman happamampi liuos tekee lopputuloksesta punaisemman. Vastaavasti pH:n nosto korostaa metyleenisinistä. Värjäyksen jälkeen lasit ilmakuivataan ja mikäli on tarvetta, ne peitetään. (Aho 2000:146.)

Tumat värjäytyvät punertaviksi tai sinisiksi ja tumajyväset sinisiksi. Sytoplasma värjäytyy harmaaksi tai sinipunaiseksi. Basofiilisten solujen sytoplasma värjäytyy voimakkaan siniseksi, mikä johtuu siitä, että ne sisältävät runsaasti happamia valkuaisaineryhmiä sekä ribonukleinihappoa. Kypsät lymfosyytit jäävät harmaaksi niukan sytoplasmansa ansiosta. Hemoglobiinin ja emäksisten ryhmien takia punasolut värjäytyvät punaisiksi. Leukosyyttien eriaisteiset jyväset värjäytyvät atsuurilla ja lima sekä rustoinen väliaine tulevat punertaviksi. (Aho 2000:146.)

2.3 Papanicolaou värjäys

Papanicolaou värjäyksen kehitti kreikkalainen tohtori George Nicholas Papanicolaou vuonna 1947, jonka jälkeen sitä on käytetty värjäystekniikkana muun muassa kohdunkaulan syövän seulonnassa. Tekniikka sopii erityisen hyvin tähän, sillä solujen tumien rakenne tulee erinomaisesti esiin. Tekniikasta on kehitetty ajan kuluessa myös monia eri muunnelmia. Papanicolaou värjäyksellä voidaan värjätä sekä gynekologisia että ei-gy-

nekologisia näytteitä. Värjäys perustuu värjäysreaktioon, jossa nähdään tarkkapiirteisesti tuma ja sytoplasma. Erityisesti levyepiteelin sytoplasma saadaan värjäyksellä esiin, jolloin gynekologiseen sytologiaan Papanicolaou värjäys on erinomainen. Soluväliaineen värjäämiseen Papanicolaou värjäys ei sovellu. (Aho 2000:142; Raju 2016.)

Papanicolaou värjäysprosessi on jaettu kolmeen päävaiheeseen: tumavärjäykseen, ensimmäiseen sytoplasmavärjäykseen ja toiseen sytoplasmavärjäykseen. Värjäysten lisäksi menetelmään kuuluu erilaisia huuhteluita ja erotteluita, joiden tarkoituksena on huuhtoa ylimääräinen väri pois lasilta. Tumavärjäyksessä tuma värjätään hematoksyliinillä ja sytoplasmavärjyksissä OG-6 (orange-G-6-fosfovolframihappo) ja EA (eosiiniatsuuri) väreillä. Sytoplasmavärjäyksessä myös mahdolliset mikro-organismit tulevat näkyviin. Happamuusaste määrittää kumpi väreistä hallitsee sytoplasman värjäytävyyttä. (Aho 2000:143-145.)

Papanicolaou värjäys on polykromaattinen eli värjäys sisältää useamman eri värjäysvaiheen. Kokonaisuudessaan värjäys kestää 20-40 minuuttia, tämä voi vaihdella hyvinkin paljon, koska jokainen laboratorio määrittää omat värjäyksensä. Määritykset määritellään kokeellisesti kunkin laboratorion oloihin sopivaksi. (Aho 2000:142-143.)

Näyte on yleensä fiksoitu näytelasille Cytotek-solusentrifugin avulla. Tumavärjäyksessä näyte dehydroidaan laskevan etanolisarjan avulla, jolloin se voidaan värjätä vedellisessä ympäristössä. Hapetettu hematoksyliini eli hematiini toimii värinä ja se pysyy kohteessaan vain peitattuna. Peittäusaineena käytetään metallisuoloja, jolloin positiivisesti varautuneet metallisuolat toimivat siltana negatiivisen hematiinin ja negatiivisesti varautuneiden tuman nukleiinihappojen fosforiryhmien välillä. Peittäusaineena käytetään yleisimmin alumiinin suoloja. Seuraava tumavärjäyksen vaihe on sinistys, joka tapahtuu emäksisessä vedessä sekä sitä seuraava erottelu, joka tehdään laimeassa suolahaossa (pitoisuus 0.25-0.5%). Erottelu poistaa lasilta ylimääräisen tumavärin. Tumavärjäyksen lopuksi näyte dehydroidaan nousevassa etanolisarjassa sopivaksi etanoliympäristöön sytoplasmavärjäystä varten. (Aho 2000:142-144.)

Sytoplasmavärjäykseen käytetään kahta eri sytoplasmaväriä; OG-6 eli orange-G-6-fosfovolframihappoa ja EA eli eosiiniatsuuria. OG-6 on hapan väri, joka edistää EA:n tarttumista. Happamuusaste vaikuttaa siihen, kumpi väreistä hallitsee sytoplasman värjäytävyyttä. Fosfovolframihappo kiinnittää värin valkuaisaineisiin, jolloin keratiini värjäytyy

oranssiksi. Positiiviset vetyionit reagoivat aminohappojen kanssa ja negatiivisesti varautunut OG tarttuu valkuaisaineisiin, myös eosinofiilien jyvät sekä levyepiteelin pintasolut värjäytyvät. (Aho 2000:144-145.)

EA muodostuu kahdesta tai kolmesta väristä, riippuen valmistajasta. Se sisältää eosini Y:tä ja light green-väriä. Bismark brown on kuulunut alkuperäiseen koostumukseen, mutta se on nykyään useimmista kaupallisista väreistä jätetty pois. Bismark brown ostaa fosfovolframihappoa ja vaikuttaa siihen värjäytykö sytoplasma enemmän eosini Y:llä vai light greenillä. Light green on hapan väri, joka värjää aineenvaihdunnallisesti aktiiviset solut, levyepiteelin intermediaanisolut, parabasaalisolut, lieriösolut, metaplastiset solut, histiosyytit, leukosyytit, adenokarsinoomasolut ja erilaistumattoman karsinooman solut. Myös eosini on hapan väri, joka värjää punaiseksi levyepiteelin pintasolut, punasolut ja värekarvat. EA väriin on myös mahdollisuus lisätä fast greenia, jolloin lopputuloksessa sytoplasma on voimakkaan vihreä. Jos sytoplasman sisäinen keratiniisaatio on epätasainen, jolloin se voi värjäytyä punaiseksi tai sinivihreäksi. Näin käy yleensä papillomavirusinfektioissa. Värjäysajat vaihtelevat molemmissa 1–5 minuutin välillä. Huuhteluihin käytetään 94–95% etanolia. Viimeisenä tulee absoluuttinen etanoli ja ksyleeni, jonka jälkeen lasi peitetään. (Aho 2000:144-145.)

3 Värjäyspreparaattien laatu

Laatu määritellään yleensä korkealaatuisena tai korkeana asteena, mutta terveydenhuollossa laatu voi olla hankala määritellä. Terveydenhuollossa laatu voi olla parhaimman hoidon saamista, kun samalla minimoidaan sivuvaikutusten ja haittatapahtumien riskit. Yhdysvaltojen lääketieteen instituutti määrittää terveydenhuollon laadun asteeksi, jolloin terveydenhuollon palvelut lisäävät toivottujen tuloksien todennäköisyyttä ja tulokset ovat yhdenmukaisia ammatillisen tiedon kanssa. Laadun parantamisessa täytyykin ottaa huomioon koko laboratorioprosessin vaiheet eli preanalytiikka, analytiikka ja postanalytiikka. Potilasturvallisuuteen liittyy myös raportointi, analysointi ja lääketieteellisten virheiden ennaltaehkäisy. (Lippi – Plebani – Simundic 2010.)

3.1 Gram-värjäys preparaattien laatu

Gram-värjäyksessä keskitytään gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteereiden värjäytyvyyden laatuun ja siihen, että ne pystytään tunnistamaan ja erottamaan. Gram-värjät-

tyjä bakteereita tarkasteltaessa ensimmäisenä kiinnitetään huomiota näytteen laadukkuuteen ja kelvollisuuteen. Lasia tarkastellaan pienellä kokonaissuurennuksella, jolloin haetaan lasista laadukkaat kohdat tarkasteltavaksi. Tämän jälkeen kohtia tarkastellaan mikrobien järjestäytyvyyden ja rakenteen mukaan. Edustavassa näytteessä mikrobit eivät ole päällekkäin, niissä on selkeät rajat sekä ne ovat keskenään samankokoisia. Seuraavaksi tunnistetaan mikrobi sen värjäytyvyyden mukaan eli tarkastellaan kristallivioletin ja safraniinin tarttuvuutta bakteerin soluseinässä. Gram-positiivinen bakteeri värjäytyy kristallivioletin ansiosta sinertäväksi, sillä bakteerin soluseinä ei päästä väriä pois alkoholi-huuhtelun jälkeen. Gram-negatiivisista bakteereista kristallivioletti huuhtoutuu pois ja viimeisessä vaiheessa safraniini tarttuu tilalle. Näin pystymme erottamaan gram-positiiviset ja -negatiiviset bakteerit toisistaan. Suurin laatuun vaikuttava virhe on tarkastella lasia liian paksusta kohdasta, jolloin gram-negatiiviset bakteerit ovat voineet massansa vuoksi värjäytyä gram-positiivisiksi. Tämän vuoksi lasin tarkastelu tulee aloittaa sillä, että etsitään edustava kohta. Viimeisenä tarkastellaan bakteerin muoto, jonka avulla erotetaan kokit ja sauvat toisistaan. (Meurman 2010: 54-55.)

Gram-värjäyksessä voi tapahtua monia virheitä. Gram-värjäyksessä bakteerisolujen määrän on oltava riittävä ja bakteerit ovat otettu lasille puhtaasta pesäkkeestä. Suurin virhe on tulkita gram-positiiviset bakteerit gram-negatiivisiksi tai toisinpäin. Jos gram-positiivinen bakteeri värjäytyy gram-negatiiviseksi voi syynä olla liian ohut valmiste, antibioottihoito, jolloin bakteerit ovat vaurioituneet, stationaarinen kasvuvaihe, liika kuuminus kiinnitysvaiheessa, bakteerit ovat hangattu lasille, jolloin bakteerit vaurioituvat, vesihuuhtelut ovat liian pitkiä, jodiliuos on vanhentunut, jolloin jodiliuos on väriltään keltaista eikä ruskeaa tai värinpoistoliuoksessa on vettä. Näistä syistä voi johtua se, että gram-positiiviset bakteerit menettävät kykynsä säilyttää kristalliviolettiä soluseinässään kiinni ja ne värjäytyvät gram-negatiivisiksi. Jos gram-negatiivinen bakteeri värjäytyy gram-positiiviseksi voi syynä olla liian paksu valmiste, kristalliviolettiä on värinpoistoliuoksessa, lasi on liian kuiva ennen värin poistamista, värinpoistoliuoksessa on jodia tai näytteessä on detergenttiä. Ongelmaksi voi muodostua myös ylivärjäytyminen, johon vaikuttaa liuottimen vaikutuksen kesto värinpoistovaiheen aikana. Jos altistus on liian pitkä tai lyhyt, voi väri huuhtoutua pois bakteereista jopa kokonaan tai preparaattissa voi esiintyä sekä gram-negatiivisia että -positiivisia bakteereja. Tähän voi syynä olla myös ikääntyvät solut, joiden kasvu on keskeytynyt peptidoglykaanikerroksen ohenemisen vuoksi. Virheitä syntyy myös, kun kontrolleja ei käytetä. (Meurman 2010: 54-56; Sandle 2020.)

Gram-värjättyjen preparaattien tarkastelu kannattaa aloittaa 100x suurennoksella eli 10-kertaisella objektiivilla, jolloin saadaan lasista hyvä yleiskatsaus ja löydetään edullisin kohta tarkempaa tarkastelua varten. Lähempi tarkastelu tehdään 100-kertaisella objektiivilla immersioöljyn kanssa. Bakteerien morfologiaan ja värjäytyvyyteen vaikuttavat monet tekijät. Potilaalla voi olla näytteenottohetkellä menossa antimikrobilääkitys, joka muokkaa bakteeria. Lasin laatuun vaikuttavat myös näytteen tuoreus, preparaatin valmistelu, sekä värjäyksen onnistuminen. Gram-värjäyksen tulkintaan vaikuttaa myös tarkastelijan perustiedot bakteerien morfologiasta ja värjäytyvyydestä. Koulutuksen tärkeys korostuu gram-värjäyksen tulkinnassa. (Liimatainen 2000: 127-128.)

3.2 MGG-värjättyjen preparaattien laatu

Veren morfologinen tutkiminen tehdään yleensä aluslasille vedetystä näytteestä eli sivelyvalmisteesta. Sivelyvalmisteen näytteeksi soveltuu EDTA-putkeen otettu laskimoveri tai kapillaariveri. Morfologian kannalta kapillaariveri sopii hyvin näytteeksi, tosin trombosyytit voivat aggregoitua helposti. Tuore EDTA näyte on myös hyvä näyte morfologian kannalta, mutta jos näytettä täytyy varastoida morfologia voi kärsiä. Sivelyvalmiste täytyisikin tehdä välittömästi näytteenoton jälkeen, mutta kuitenkin 1–3 tunnin viive sallitaan. Vetolasin avulla pisara verta levitetään aluslasille. Varsinkin punasolumorfologian kannalta valmisteen paksuus on olennainen seikka. Punasoluja täytyy tarkastella tarpeeksi ohuelta alueelta, jolloin punasolut ovat erillään toisistaan. Normaalit punasolut ovat pyöreitä ja tasakokoisia sekä niiden keskellä on pyöreähkö kalpeampi alue. Jos näyte on aneeminen punasolujen koko ja muoto vaihtelevat. Veressä näkyviä valkosoluja ovat neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit, lymfosyytit ja monosyytit. Trombosyytit esiintyvät veressä yksittäin, mutta voivat myös muodostaa trombosyyttikasoja. Harvoin trombosyytit ovat kookkaita. Peitinlasi sivelyvalmisteen päällä mahdollistaa sen, että näytettä voidaan esitarkastella mikroskoopilla pienellä objektiivilla. Näin mahdolliset artefaktat voidaan sulkea pois, etsiä laadullisesti hyvät kohdat ja luoda yleissilmäys näytteestä. Veren sivelyvalmisteen morfologisessa tutkimuksessa täytyy ottaa huomioon siis mahdolliset artefaktat, tarpeeksi ohuen alueen löytäminen, leukosyyttien määrä, trombosyyttien määrä sekä yleissilmäys. Punasolumorfologiassa keskitytään punasolujen ryhmytykseen ja muotoon. (Pelliniemi 1998; Savolainen – Tienhaara 2015.)

MGG-värjäys on altis virheille, jolloin värjäyksessä on noudatettava laboratorion ohjeita, jotta morfologinen tutkimus onnistuu. Jos värjäystulos on vaihteleva voi siihen syynä olla,

että värjäysliuosten alkoholi on haihtunut, eosini-atsuurivärit ovat sakkautuneet tai hapettuneet tai Giemsa on laimennettu väärin. Jos värjäys on sinivoittainen, voi siihen olla syynä, että huuhtelupuskurin pH on liian alhainen, värjäysastioissa on jäänteitä pesuaineista, väriaineet ovat hapettuneet, värjäysaika on liian pitkä, huuhtelut ovat liian lyhyitä tai liian tehottomia, kiinnitys on liian lyhytkestoinen, kiinnitysmetanoli on huonolaatuista tai sivelyvalmisteet ovat menneet vanhaksi. Jos taas värjäystulos on liian punavoittainen, voi syynä olla liian hapan huuhtelupuskurin pH, pitkä tai tehokas huuhtelu, valmisteiden epätasainen tai hidas kuivuminen tai liian lyhyt värjäysaika. Näytteiden tulisi kuivua ennen värjäystä kunnolla, koska liian kosteat näytteet aiheuttavat sen, että väri ei tartu kunnolla soluihin ja ne jäävät hailakoiksi. Värit konsentroituvat helposti, kun metanoli haihtuu, sekä syntyy sakkaa. Tämän vuoksi pullot tulee säilyttää suljettuina. Näytteet voivat myös yli värjäytyä, mikä johtuu liian pitkästä tai lyhyestä huuhtelusta. Liian lyhyt kiinnitys metanolilla tai metanoli on huonolaatuista voi johtaa siihen, että tumakromatiinin rakenne on homogeenistä. Vesipeiliartefakti syntyy, jos kiinnitysmetanolissa on vettä. (Aho 2000:146; Savolainen – Tienhaara 2015.)

3.3 Papanicolaou värjäys preparaattien laatu

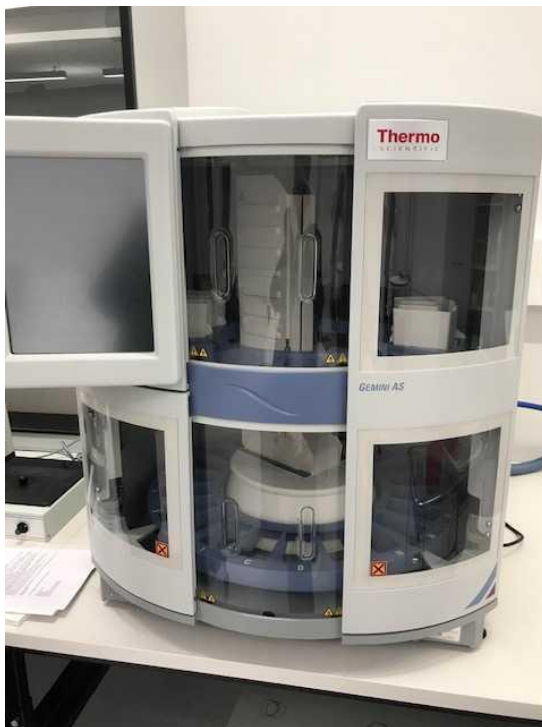
Virtsassa voi esiintyä monenlaisia erilaisia partikkeleja. Jotta partikkelit pystytään havaitsemaan virtsasta, täytyy virtsa konsentroida. Peitinlasimenetelmän etu verrattuna kammiolaskentaan on se, että löydökset ovat helpompi värjätä sekä eritellä, koska peitinlasin alle jää ohut nestekerros. Punasolujen eli erytrosyyttien näkyminen mikroskoopin näkökentässä on normaalisti alle kolme kappaletta. Valkosoluja eli leukosyyttejä voi olla näkökentässä normaalisti maksimissaan neljä kappaletta. Yleensä virtsassa näkyvät valkosolut ovat granulosityyttejä. Munuaistiehyistä ja virtsateiden seinämistä virtsaan voi erittyä myös levyepiteelisoluja ja lieriösoluja sekä virtsanäytteissä voi olla myös bakteereja. Levyepiteelisoluja voi näkökentässä olla 1-2 kappaletta. Yleensä lieriösoluja tai bakteereja ei esiinny terveiden henkilöiden näytteissä. Kiteet ja sakka ovat myös virtsanäytteen löydöksiä. Laadun kannalta paksut solukasat voivat värjäytyä keskeltä voimakkaasti eosiinilla punaiseksi ja reunat vihertäviksi. Jos näyte on epätäydellisesti fiksoitunut, tällöin kuivuneet solut värjäytyvät eosiinilla light greenin sijaan. (Aho 2000:145; Eskelinen 2016; Kouri ym. 1999:11,12,15,16.)

Papanicolaou värjäyksissä keskitytään virtsan partikkelien näkymiseen mikroskoopissa. Keskitymme opinnäytetyössä virtsan partikkeleiden erottumiseen laadun kannalta edus-

tavasti manuaalisen ja automaattilla värjäyksen jälkeen, mutta emme laske niitä kammi-
ossa. Erytrosyyttien, leukosyyttien ja bakteerien värjäytyvyyden laadun arvioinnissa käy-
tetään samoja kriteerejä mitä gram- ja MGG-värjäyksissä. Tarkastellaan myös levyepi-
teeli-, lieriö- ja tubulussolujen tuman ja sytoplasman värjäytyvyyttä.

4 Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatti

Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatti on tarkoitettu sytologian ja histologian
laboratorioissa kiinteiden kudus- tai solunäytteiden värjäämiseen (kuvio 2). Thermo
Scientific™ Gemini AS on monipuolinen värjäysautomaatti, jolla pystytään värjäämään
suuria määriä näytelaseja kerrallaan ja tehokkaasti. Gemini AS pystyy värjäämään
useita telineitä sisältäen 20 näytelasia käyttämällä 26 reagenssiastiaa, kuutta juoksevan
veden pistettä sekä viittä kuivavarastoa. Näytelasit ladataan Gemini AS-aluslasikoreihin.
Värjäyksen aikana Gemini AS siirtää näytetelineet automaattisesti värjäysvaiheiden läpi.
Värjäysautomaatin mukana tulevat esimääritetyt protokollat, jotka on optimoitu Thermo
Scientificin värjäyksiä ja reagensseja varten. Protokollat ovat tehty helpottamaan käyt-
töä, mutta käyttäjä joutuu mahdollisesti muokkaamaan niitä omaa käyttöönsä varten.
(Thermo Scientific Gemini AS Käyttöopas 2017:15.)



Kuvio 2. Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatti (Karoliina Keinänen 2020).

Lasit ladataan aluslasikoreihin ja varsi poimii korit ja siirtää ne reagenssilta toiselle, kunnes värjäys on valmis. Lasit ladataan aluskoreihin varovasti, korin kahva käännetään ylös, jolloin se lukittuu ja näytelasit pysyvät korissa paikoillaan. Näytelasien lataamisen jälkeen ne voidaan värjätä jollakin tietyllä värjäysprotokollalla. Ensimmäinen on ladattava protokollaryhmä ja tarvittavat reagenssit. Tämän jälkeen aluslasikorit voidaan laittaa oikeaan latausluukkuun. (Thermo Scientific Gemini AS Käyttöopas 2017:46,50.)

Protokollat ovat ohjesarjoja, joiden avulla laite suorittaa värjäyksen. Gemini AS laitteessa on valmiiksi ladattuna yleisesti käytössä olevia värjäysprotokollia. Protokolla voi koostua enintään 50 vaiheesta ja järjestelmään voidaan luoda enintään 50 protokollaa. Protokollien täytyy alkaa latausvaiheesta ja loppua purkuvaiheeseen. Esi-värjäys, värjäys- ja jälkivärjäysvaiheet määritetään protokollissa niin, että näytelasit siirretään reagenssien läpi. (Thermo Scientific Gemini AS Käyttöopas 2017:70.)

Gemini AS on suunniteltu niin että se on turvallinen sekä käyttäjälle, että näytteille. Käyttäjää on suojattu kaasujen poistolla hiilisuodattimen läpi. Sisäinen LED-valaistus suojaa virheiltä reagensseja vaihdettaessa. Protokollat pystytään suojaamaan salasanalla. Ergonomiassa on mietitty tilaa ja kustannuksia säästäviä menetelmiä. Tilankäyttö minimoidaan integroidulla kosketusnäytöllä sekä virtalähteellä. Kosketusnäyttö on värillinen sekä akunvarmistus on 40 minuuttia. USB portin avulla tietoa pystyy siirtämään helposti esimerkiksi tietokoneelle. (Gemini AS brochure 2013.)

5 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla veri-, bakteeri- ja virtsanäytteitä manuaalisesti sekä Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatilla värjättyinä. Näytteet mikroskojettiin ja näytteiden värjäytymisen laatua verrattiin toisiinsa. Näytteistä otettiin myös kuvamateriaalia kirjallisten tuloksien tueksi. Tarkoituksena oli myös vertailla menetelmiin kuluvaa aikaa sekä työturvallisuutta. Tavoitteena oli löytää vastaukset tutkimuskysymyksiin eli oliko laadullisia eroja manuaalisesti ja automaattilla värjättyjen preparaattien laatukriteereissä, ajankäytössä ja työturvallisuudessa.

Tätä opinnäytetyötä ohjasivat tutkimuskysymykset, joihin opinnäytetyön prosessin aikana pyrittiin löytämään vastaukset. Tutkimuskysymykset ohjasivat myös opinnäytetyön prosessin toteutumisesta.

1. Vertaillaan manuaalisesti ja värjäysautomaatilla värjättyjä näytteitä.
 - a. Eroavatko gram-värjäyksellä värjättyjen näytteiden laatukriteerit?
 - b. Eroavatko MGG värjäyksellä värjättyjen näytteiden laatukriteerit?
 - c. Eroavatko Papanicolaou värjäyksellä värjättyjen näytteiden laatukriteerit?
2. Vertaillaan manuaalista värjäystapaa sekä värjäysautomaattia.
 - a. Onko eroja ajankäytössä?
 - b. Onko eroja työturvallisuudessa?

6 Opinnäytetyön menetelmät

6.1 Aineiston keruumenetelmät

Bakteerinäytteet viljeltiin Myllypuron kampuksella Metropolia Ammattikorkeakoulun kasvatusmaljoilta elokuussa 2020 tuoreille lammasveri- ja suklaamaljoille. Bakteerit kasvoivat lämpökaapissa yhden yön yli. *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluva bakteeri *Escherichia coli* on gram-negatiivinen sauva, joka viljeltiin lammasverimaljalle. Gram-positiivisena sauvanäytteenä oli difteroidi bakteerit, jotka viljeltiin suklaamaljalle. *Streptococcus*-sukuun kuuluva C-ryhmän streptokokki on gram-positiivinen kokki, joka viljeltiin lammasverimaljalle. Gram-negatiivisena kokki näytteenä oli *Moraxella catarrhalis*, joka viljeltiin suklaamaljalle. Kontrollilasin bakteereina olivat *Staphylococcus aureus*, joka on gram-positiivinen kokki sekä gram-negatiivinen sauva *E.coli*. Veren sivelyvalmisteet tekivät opettaja Jaana Anttila ja opiskelija Elise Juntunen Metropolian preanalytiikan kurssin verinäytteistä. Virtsanäytteinä käytettiin keväällä 2020 opiskelijoiden tekemiä sytotec-preparaatti laseja.

6.2 Aineiston analysointimenetelmä

Aineisto merkittiin numeroin ja manuaalisesti ja analysaattorilla värjättävät näytteet eriteltiin kirjaimilla A ja B. Manuaalisesti värjättyt näytteet olivat merkitty kirjaimella A ja automaattilla värjättyt näytteet kirjaimella B. Aineiston kuvaamisen käytettiin Metropolian

Myllypuron kampuksella olevaa Nikon Eclipse 50i mikroskooppia, jossa on kuvaus ominaisuus kahden megapixelin digitaalikameralla, jossa oli Nikon DS-L2 kamerakontrolleri. Kuvat siirrettiin USB-tikkua käyttämällä tietokoneelle. Virtsanäytteissä ei pystytty vertaamaan samaa näytettä keskenään, koska näytteistä ei pystynyt sanomaan ovatko ne samaa näytettä. Analysointia suoritettiin Metropolian Myllypuron kampuksen työtilassa 1013, joka varattiin kyseiseen tarkoitukseen. Kuvat näytteistä heijastettiin isolle näytölle. Kaikki preparaattit mikroskopoiitiin ja preparaateista katsottiin lasien kelpoisuutta ja edullisuutta. Laatuksiteereitä tarkasteltiin ensisijaisesti värjäytyvyyden näkökulmasta. Jokaisen värjäyksen preparaateille on myös omat laatuksiteerinsä ja tässä opinnäytetyössä tarkasteltavat kriteerit esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1. Preparaateista vertailtavat laatuksiteerit

Laatuksiteerit	Gram-värjättyt preparaattit	MGG-värjättyt preparaattit	Papanicolaou värjättyt preparaattit
Mikrobien esiintyminen (mikrobien asettautuminen lasille, muoto, koko)	X		X (jos näytteessä on bakteereja)
Gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien tunnistus (värjäytyvyys)	X		X (jos näytteessä on bakteereja)
Morfologia (kokki, sauva)	X		X (jos näytteessä on bakteereja)
Erytrosyytit (muoto, koko)		X	X (jos näytteessä on erytrosyyttejä)
Leukosyytit (tuman muoto, koko ja erottuminen, sytoplasman muoto, koko ja erottuminen, granuloiden erottuminen)		X	X (jos näytteessä on leukosyyttejä)
Trombosyytit (erottuminen)		X	
Levyepiteelisolut, (tuman ja sytoplasman erottuminen)			X
Lieriö- ja tubulussolut (tuman ja sytoplasman erottuminen)			X

Mikroskoopilla bakteeripreparaatteja katsottiin ensin 10-kertaisella objektiivilla, jolloin saatiin preparaattista yleissilmäys. Lopuksi preparaattia katsottiin 100-kertaisella objektiivilla immersioöljyn kanssa. Sivelyvalmisteita katsottiin ensin 10-kertaisella objektiivilla ja edustavin kohta etsittiin 40-kertaisella objektiivilla ilman immersioöljyä. Edustavin kohta löytyy yleensä sivelyvalmisteen ohuemmasta päästä, joten sieltä otimme kuvat tätä opinnäytetyötä varten. Virtsan sytotec-preparaatti laseista katsottiin yleissilmäys ensin 10-kertaisella objektiivilla. Edustavimmista kohdista otettiin kuvat käyttäen 50-kertaisista objektiivia. Virtsan partikkeleja ei katsottu mikroskoopissa faasilla.

7 Suoritus

7.1 Gram-värjäyksen suorittaminen manuaalisesti

Näytelaseille kirjoitettiin tunniste lyijykynällä. Lasit desinfioitiin etanolissa ennen bakteerien kiinnittämistä lasille. Bakteerinäytteet olivat kasvaneet hyvin lämpökaapissa yön yli. Desinfioinnin jälkeen lasille tiputettiin pisara steriiliä vettä ja silmukan avulla bakteerinäytettä siirrettiin lasille. Lasit ilmakeivattiin ja bakteerinäytteet kiinnitettiin lasille lämpölevyn avulla. Värit vaihdettiin uusiin. Näytelasit värjättiin manuaalisesti Metropolian ohjeen mukaan vetokaapissa (taulukko 2). Värjäys kelloitettiin.

Taulukko 2. Gram-värjäyksen värjäyskaavio.

STEP nro.	Reagenssi	Aika
1	Kristallivioletti	1:00
2	Nopea huuhtelu vesijohtovedellä	
3	Lugolin jodidi	1:00
4	Nopea huuhtelu vesijohtovedellä	
5	Asetoni-etanoli	0:05
6	Nopea huuhtelu juoksevalla vedellä	<0:05
7	Safraniini	0:30
8	Nopea huuhtelu juoksevalla vedellä	<0:05
9	Ilmakeivaus	

7.2 Papanicolaou värjäyksen suorittaminen manuaalisesti

Käytettävät alkoholit laimennettiin absoluuttisesta alkoholista niin, että saimme 96% alkoholia sekä 70% alkoholia. Vetokaapissa värit kaadettiin värjäysastioihin ja näytetelinetä siirrettiin manuaalisesti Metropolian ohjeen mukaan reagenssista toiseen (taulukko 3). Värjäys kelloitettiin ja värjäyksen loppuksi lasit ilmakeivattiin vetokaapissa.

Taulukko 3. Papanicolaou värjäyskaavio.

STEP nro.	Reagenssi	Aika
1	96% etanoli	10:00
2	70% etanoli	5:00
3	50% etanoli	2:00
4	Aqua	0:15
5	Hematoksyliini	2:00
6	Juokseva vesi	3:00
7	Sinistys	0:30
8	Juokseva vesi	3:00
9	70% etanoli	2:00
10	80% etanoli	2:00
11	96% etanoli	2:00
12	OG	2:30
13	96% etanoli	2:00
14	96% etanoli	2:00
15	EA	2:30
16	96% etanoli	2:00
17	96% etanoli	2:00
18	Ksyleeni	

7.3 MGG-värjäyksen suorittaminen manuaalisesti

Värit valmistettiin Metropolian ohjeiden mukaan. Värit täytyy laimentaa käyttäen fosfaattipuskuroitua vettä, joka valmistettiin mittapulloon lisäämällä 50 millilitraa fosfaattipuskuria ja 950 millilitraa aquaa. May-Grünwald valmistettiin kaatamalla mittalasiin 120 millilitraa May-Grünwald- reagenssia ja 80 millilitraa puskuroitua vettä. Giemsa valmistettiin

kaatamalla mittalasiin 28 millilitraa Giemsa reagenssia ja 172 millilitraa puskuroitua vettä. Valmistetut värit kaadettiin värjäysastioihin vetokaapissa. Näytekelkkaa kuljetettiin värjäysastioissa Metropolian ohjeen mukaisesti (taulukko 4).

Taulukko 4. MGG-värjäys kaavio.

STEP nro.	Reagenssi	Aika
1	Metanoli	10:00
2	May-Grünwald	5:00
3	Giemsa	12:00
4	Huuhtelu puskuroidussa vedessä	2:00
5	Huuhtelu puskuroidussa vedessä	5:00
6	Huuhtelu puskuroidussa vedessä	2:00
7	Ilmakuivaus	

7.4 Analysaattorilla värjääminen

Analysaattorilla värjääminen suoritettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatilla Myllypuron kampuksella syyskuussa 2020. Värjäykseen käytettiin yksi päivä. Värejä ei ollut valmiina kemikaalivarastossa, joten koko prosessi aloitettiin sillä, että värit sekoitettiin vetokaapissa.

Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaattia oli helppo käyttää. Alussa oli kuitenkin ongelmana se, että analysaattori ei meinannut käynnistyä. Käytössä oli suomenkielinen opas ja siitä tehty pikaopas, joka oli helppolukuinen ja tiivistä analysaattorin käyttöohjeet. Analysaattorista valittiin värjäysprotokolla eli ohjelma, joka sinne oli syötetty valmiiksi. Ohjelma näytti kullekin reagenssiastialle oikean paikan. Reagenssiastiat täytettiin valmiiksi vetokaapissa, josta ne siirrettiin kukin vuorollaan analysaattoriin. Kun kaikki reagenssiastiat olivat analysaattorissa, kone pysyi näytelasit asetettavaksi näytekorissa analysaattoriin. Tämän jälkeen luukut laitettiin kiinni ja ohjelma käynnistettiin. Analysaattorin näytöltä näkyi selkeästi kokonaisvärjäykseen kuluva aika, sekä yksittäisessä reagenssiastiassa kulutettu aika. Näytöltä pystyi myös seuraamaan värjäyksen etenemistä niin, että nähtiin missä reagenssiastiassa lasit ovat ja mihin ne menevät seuraavaksi.

Kun analysaattori oli valmis, ilmoitti se merkkiäänellä ohjelman päätyemisestä. Lasit voivat kuivua myös telineessä, jossa ne värjättiin, mutta nostimme ne imupaperille kuivumaan ja odottamaan mikroskopointia. Lopuksi reagenssiastiat nostettiin pois ja kemikaalit hävitettiin ohjeiden mukaisesti. Ohjaajamme Heidi Malava oli koko ajan tavoitettavissa, jos ongelmia ilmeni.

Papanicolaou värjäystä tehtäessä analysaattori jätti yhden 96%-etanolireagenssiastian paikan tyhjäksi. Tarkasteltaessa ohjeita huomattiin, että analysaattoria ohjelmoitaessa Papanicolaou värjäyksestä oli yksittäinen huuhteluvaihe jäänyt ohjelmoimatta. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut tulokseen. Analysaattorin vedenpoistoletku oli myös kiinnitetty huonosti, vedet valuivat lattialle osittain. Gram-värjäyksen kanssa oli hieman ongelmia, sillä analysaattori ei meinannut sen kohdalla lähteä käyntiin. Ohjelma saatiin kuitenkin päälle ja värjäys onnistui.

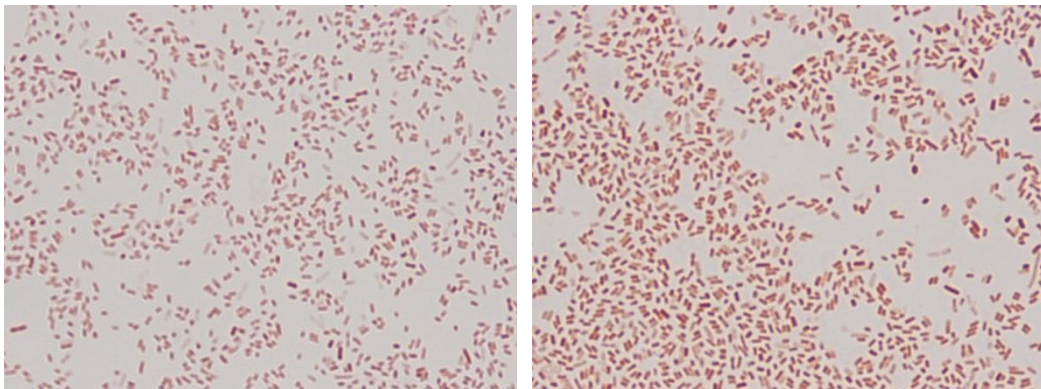
8 Tulokset

Tässä opinnäytetyössä suoritettut manuaaliset sekä automaattilla tehdyt värjäykset suoritettiin samoilla väreillä, jotka valmistettiin Metropolian työhjeita noudattaen. Värjäysautomaatille oli ohjelmoitu samat värjäysprotokollat, joita käytettiin myös manuaalisissa värjäyksissä. Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaatti eroaa manuaalisesta värjäyksestä siinä, että automaatti siirtää itse näytekelkan värjäysastiasta toiseen. Manuaalisessa värjäysmenetelmässä näytekelkan siirtää bioanalyttikko. Manuaalisessa värjäysmenetelmässä bioanalyttikko joutuu myös itse pitämään huolta siitä, että ajallisesti värjäys onnistuu, kun taas automaattilla tästä ei tarvitse huolehtia. Manuaalisessa menetelmässä kemikaalit ovat vetokaapissa ja bioanalyttikko suorittaa värjäykset. Automaatilla värjätessä bioanalyttikon ei tarvitse olla paikalla koko ajan, koska automaatti suorittaa värjäykset ohjelmoidun protokollan mukaan.

Ajallisesti preparaattien värjäyksessä ei ollut huomattavia eroja. Aikaa kuluu myös reagenssien valmistamiseen, värjäysastioiden täyttämiseen sekä siivoamiseen. Automaatin käyttöön tarvitsee myös perehtyä ennen kuin aloittaa käytön. Manuaalisissa värjäyksissä kemikaaleja käsiteltiin turvallisesti vetokaapissa. Automaatilla värjätessä kemikaalit käsiteltiin myös vetokaapissa, mutta ne täytyi kuljettaa huoneen poikki reagenssiastiassa värjäysautomaatille, joka on työturvallisuusriski. Tuloksissa esitetyt kuvat ovat järjestyksessä niin, että manuaalisesti värjätyt preparaattit ovat vasemmanpuoleisia kuvia ja automaattilla värjätyjen preparaattien kuvat ovat oikealla.

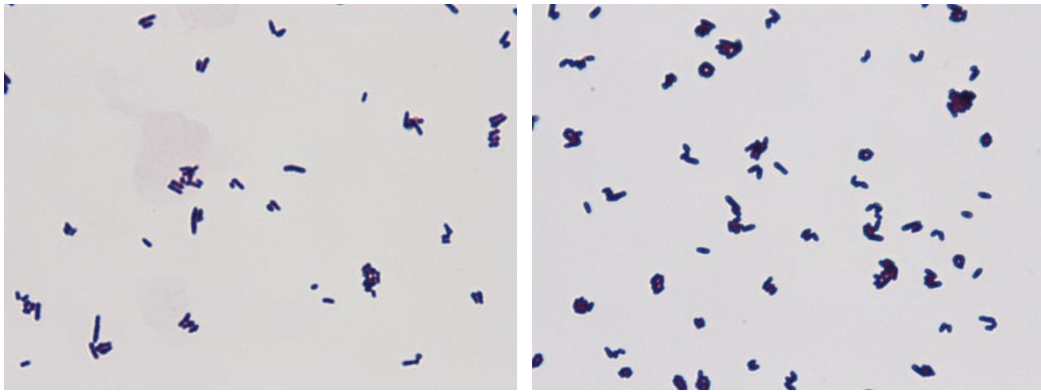
8.1 Laatumerkkien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu gram-värjäyksessä

Gram-värjäykseen tehty kontrollilasi oli laadukas ja bakteerien morfologia sekä värjäytyvyys oli selkeästi nähtävissä. Kuvion 3 preparaateista on havaittavissa, että näyte on gram-negatiivinen sauva eli värjäytyvyys on hyvin onnistunut. Gram-positiivisia eli siniseksi värjäytyneitä mikrobeja ei ollut lasilla. Bakteerinäytteenä oli *E.coli*. Mikrobit ovat asettautuneet hyvin laseille. Sauvamainen muoto on selkeästi näkyvä, mutta muutama pallomainen sauva näkyy molemmissa preparaateissa. Gram-negatiiviset sauvat ja varsinkin *E.coli* voivat joskus olla kokkimaisia ja lyhyitä (Meurman 2010:56). Automaattilla värjätyssä preparaattissa punainen väri eli safraniini on intensiivisempi eli safraniini on tarttunut paremmin bakteerin soluseinään. Värjäysautomaatti suorittikin huuhtelut todella nopeasti, mistä saattaa johtua intensiivisempi väri preparaattissa.



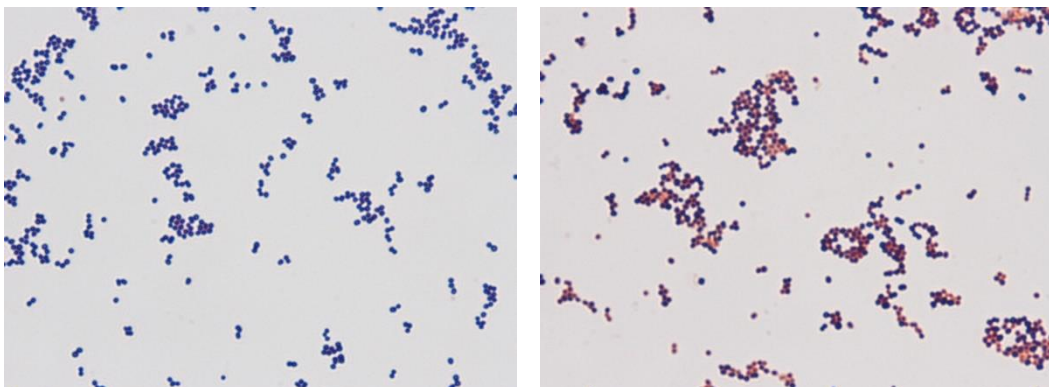
Kuvio 3. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys *E.coli* bakteerista.

Difteroidi bakteerit ovat pleomorfisia eli erilaisia variaatioita on olemassa. Difteroidit järjestäytyvät yleensä L tai V kirjaimen muotoon. Järjestäytymistä sanotaan myös "kiinalaisiksi kirjaimiksi". Difteroidit voivat olla myös nuijamaisen muotoisia, jolloin toinen tai molemmat päät ovat hieman turvonneita. (Tiwari–Wharton 2018.) Tutkimissamme preparaateissa difteroidit ovat sauvamaisia ja kuvista 4 voidaan havaita, että bakteeri on gram-positiivinen. Mikrobit ovat asettautuneet ryhmiin molemmissa preparaateissa. Mikrobikasojen keskelle on molemmissa preparaateissa jäänyt safraniinia, joka ei ole huuhtoutunut kunnolla pois. Preparaateissa ei ollut nähtävillä gram-negatiivisia sauvoja. Laadullisesti ei ole havaittavissa eroja laatumerkkeissä.



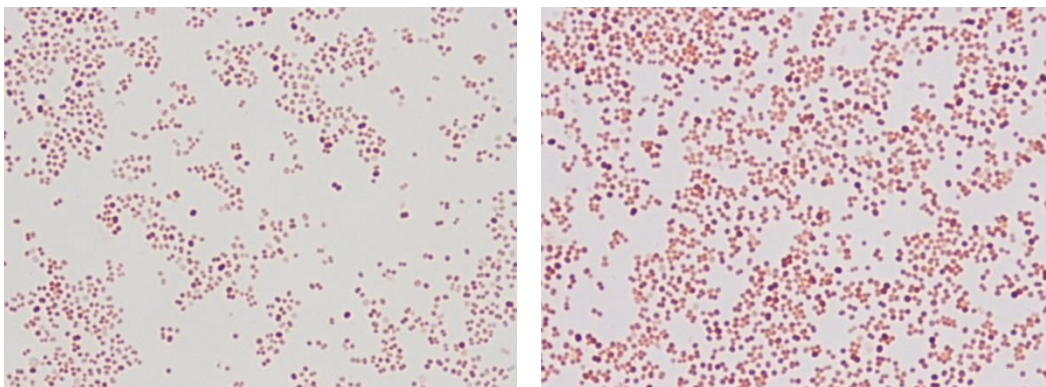
Kuvio 4. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys difteroidi bakteerista.

Näytteenä oli gram-positiivinen streptokokki, joka asettuu ketjuihin tai ryhmiin (Patterson 1996). Mikrobit olivat asettautuneet lasille hieman paksuihin kasoihin, joka johtuu liian paksusta preparaattista. Kuvio 5 nähdään, että molemmissa preparaateissa on näkyvässä kokkimainen muoto ja kyseessä on gram-positiivinen bakteeri. Manuaalisesti värjätty preparaatti oli paremmin värjäytynyt kuin automaattilla värjätty, koska manuaalisesti värjätty preparaatti oli ohuempi kuin automaattilla värjätty. Koska automaattilla värjättyssä preparaattissa on havaittavissa myös gram-negatiivisia kokkeja, se voi johtua liian ohuesta preparaattista, mikä ei kuitenkaan ole todellinen syy, koska preparaatti oli paksu. Bakteerit ovat voineet myös vaurioitua preparaatin tekohetkellä. Liian pitkät huuhtelut saattavat värjätä bakteerit myös gram-negatiivisiksi, mutta silmämääräisesti automaatin tekemät huuhtelut olivat nopeita. Lugolin jodidin vanhentumisesta voi myös johtua gram-positiivisten bakteerien värjäytyminen gram-negatiiviseksi, mutta tässä tapauksessa Lugolin jodidi oli laadullisesti kunnossa. Bakteerien ikä vaikuttaa myös värjäytyvyyteen, sillä vanhemmat bakteerikannat voivat menettää gram-positiivisen piirteensä (Patterson 1996). Tässä opinnäytetyössä kasvatusmalja sekä bakteerit olivat tuoreita ja näytteet preparaateille oli otettu samalta maljalta.



Kuvio 5. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys C-ryhmän streptokokki bakteerista.

Molemmat preparaatiit olivat paksuja. Näytteenä oli bakteeri *Moraxella catarrhalis*. *Moraxella catarrhalis* on morfologialtaan pyöreä, hieman karheahkon näköinen diplokokki ja se värjäytyy ruskeanvaaleanpunaiseksi (CDC 2017). Kuvioista 6 voidaan havaita morfologialtaan selkeästi gram-negatiivinen kokki. Jotkut kokit ovat selkeästi suurempia kuin toiset. Preparaatissa ei ole havaittavissa gram-positiivisia bakteereja. Automaatilla värjätyn preparaatin väri on intensiivisempi kuin manuaalisesti värjätyn, mikä saattaa johtua liian lyhyistä huuhteluista aivan kuten myös *E.coli* preparaateissa.

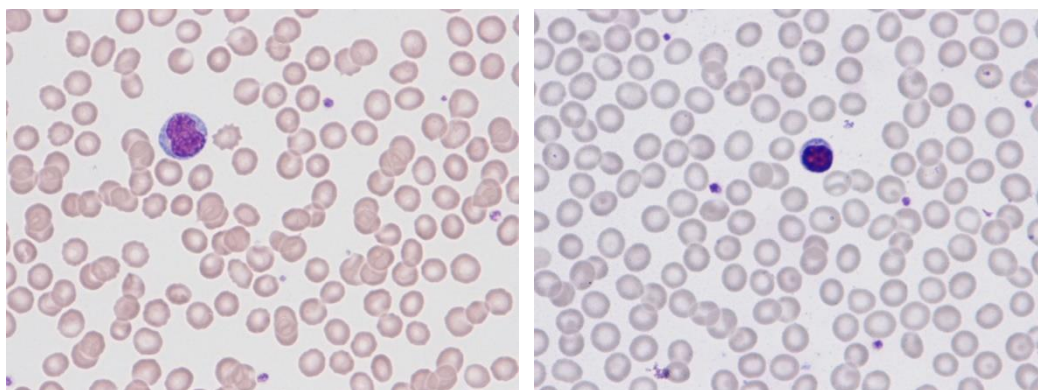


Kuvio 6. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys *Moraxella catarrhalis* bakteerista.

8.2 Laatuksiteerien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu MGG-värjäyksessä

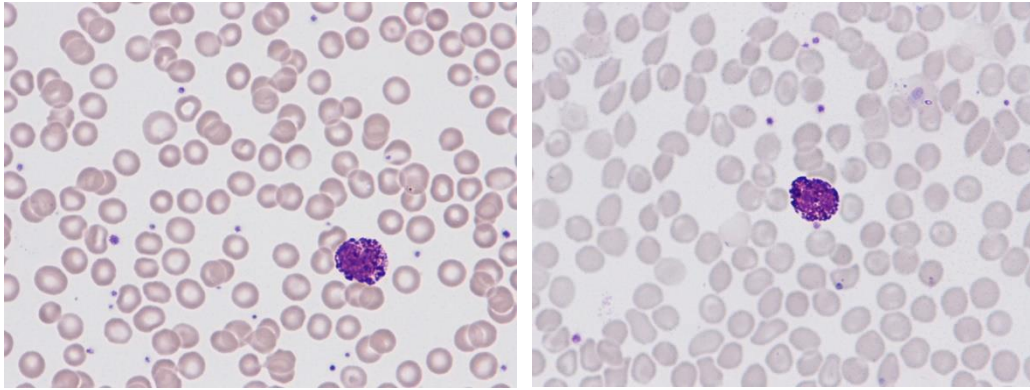
Kaikkia preparaatteja tarkasteltiin kokonaisvaltaisesti ja kuvat on otettu preparaattien ohuesta päästä. Erytrosyyttejä eli punasoluja oli molemmissa preparaateissa runsaasti ja ne olivat normokromisia. Kypsä punasolu on normokrominen ja sen sytoplasma värjäytyy vaaleanpunaiseksi. Kolmasosa punasolun keskiosasta kuuluu olla vaaleampaa kuin solun reumat. Kuvioista 7 voidaan havaita, että manuaalisesti värjätty preparaatti on hailakampi/sinertävämpi kuin automaattilla värjätty. Molemmissa preparaateissa nähdään hyvin värjäytynyt lymfosyytti, trombosyyttejä sekä erytrosyyttejä. Lymfosyytit eroavat kokonsa puolesta sekä ne värjäytyvät hieman eri tavalla. Syynä tähän on se, että automaattilla värjättyssä on pieni lymfosyytti. Pienemmät lymfosyytit värjäytyvät tummanvioletiksi tiiviiksi pakkautuneen kromatiininsa ansiosta, kun taas isommassa lymfosyytissä se on pakkautunut löyhemmin ja on väriltään hieman vaaleampi. Kromatiinin väleihin jäävät ohuemmat alueet ovat värjäytyneet vaaleamman violetiksi, jolloin rakenne on helppo erottaa. Sytoplasma on värjäytynyt molemmissa lymfosyyteissä siniseksi. Trombosyytit erottuvat hyvin molemmista preparaateista ja niissä on nähtävissä epäsäännöl-

linen sytoplasman reuna, joka on värjäytynyt basofiilisen sinertäväksi. Trombosyytin keskelle tai koko solun sytoplasmaan levittäytyy hienorakenteista punasinertäväksi värjäytyvää azurofiilistä granulaa. (Verisolujen tunnistusaapinen 2009:18,19,49,56,68.)



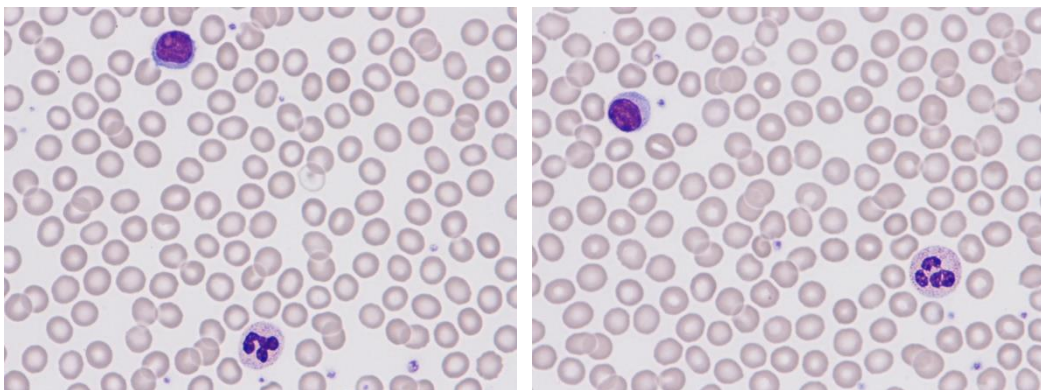
Kuvio 7. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys verisoluista.

Kuviossa 8 erytrosyytit ovat jääneet automaatti värjäyksessä hieman sinertäviksi. Automaattivärjäys on jättänyt myös osan erytrosyyteistä hailakoiksi, jopa hyperkromisiksi. Haalea väri voi myös johtua näytteen vedosta lasille, jos siinä vaiheessa solut ovat vaurioituneet, jonka vuoksi myös niiden muoto on muuttunut. Automaattivärjäyksessä näkyy kuitenkin myös selkeästi "värittömiä" soluja. Preparaateissa näkyy hyvin basofiilisen liuskatumaisen granulosityin värjäytyvyys. Liuskatumaisen basofiilin tuma ei ole kovin karkearakenteista ja se värjäytyy tummanvioletiksi. Basofiilin sytoplasma on värjäytynyt vaaleansinipunertäväksi. Basofiilin tumaa sekä sytoplasmaa verhoava runsas spesifinen granula, joka peittää ne alleen. Kuvissa on hyvin erotettavissa spesifinen granula, joka koostuu pienistä ja isommista fragmenteista. Granulan määrä vaihtelee ja se värjäytyy voimakkaan purppuranvioletiksi tai mustanpunaiseksi. Molemmissa preparaateissa basofiili on värjäytynyt hyvin ja se on tarkka. Trombosyytit ovat värjäytyneet hyvin jopa automaatilla värjättyssä preparaatissa ja ne olivat intensiivisen värisiä ja selkeitä, vaikka erytrosyytit olivat jääneet hailakoiksi. Manuaalinen värjäys oli tämän preparaatin kohdalla kaiken kaikkiaan onnistuneempi. Preparaatissa lymfosyytit ja trombosyytit olivat värjäytyneet normaalisti eli värjäys oli epäonnistunut ainoastaan erytrosyyttien kohdalla automaatilla värjätessä. Automaattivärjäykseen tehty fosfaattipuskuri voi olla myös liian hapan, jolloin tulos on jäänyt sinisemmäksi. Se ei kuitenkaan selitä hailakoita erytrosyyttejä. (Verisolujen tunnistusaapinen 2009:33,49,68.)



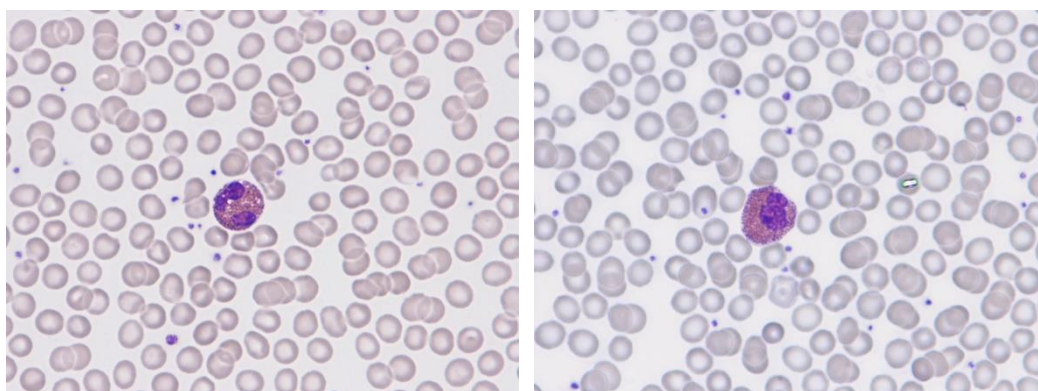
Kuvio 8. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys verisoluista.

Kuviossa 9 molemmat preparaattit olivat hyvin värjäytyneet. Kuviiin valittiin samankaltaiset kuvat, joissa näkyi pieni lymfosyytti, neutrofiilinen liuskatumainen granulositytti sekä trombosyytit ja erytrosyytit. Molemmissa preparaateissa pienet lymfosyytit olivat värjäytyneet hyvin, niiden tuma oli tiivis ja värjäytynyt tummanvioletiksi, molemmissa myös sytoplasma on värjäytynyt siniseksi. Kromatiini on asettunut hyvin, jolloin nähdään vaaleammaksi värjäytyneet alueet. Neutrofiiliset liuskatumaiset granulosityttien tumat ovat värjäytyneet tummanvioleteiksi ja niiden kokkareinen rakenne on hyvin näkyvillä. Neutrofiilien sytoplasmat värjäytyivät vaaleanpunertaviksi, jonka saa aikaan lukuisat pienet spesifiset vaaleanpunaiset granulat, jotka ovat vaaleansinisessä sytoplasmassa. Sytoplasmassa on havaittavissa myös yksittäisiä sinipunaisia azurofiilisiä primaarigranuloita. Trombosyytit olivat värjäytyneet kauttaaltaan hyvin, eikä niistä löytynyt poikkeuksia. Erytrosyytit olivat värjäytyneet molemmissa suhteellisen hyvin. Niiden sytoplasma oli värjäytynyt vaaleanpunaiseksi ja kolmasosa solusta oli jäänyt vaaleammaksi. Pääosin lasit olivat kuitenkin värjäytyneet hyvin, eikä värjäämättömiä erytrosyyttejä löytynyt koko lasilta. Erytrosyytit olivat normokromisia. (Verisolujen tunnistusaapinen 2009:32,49,68.)



Kuvio 9. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys verisoluista.

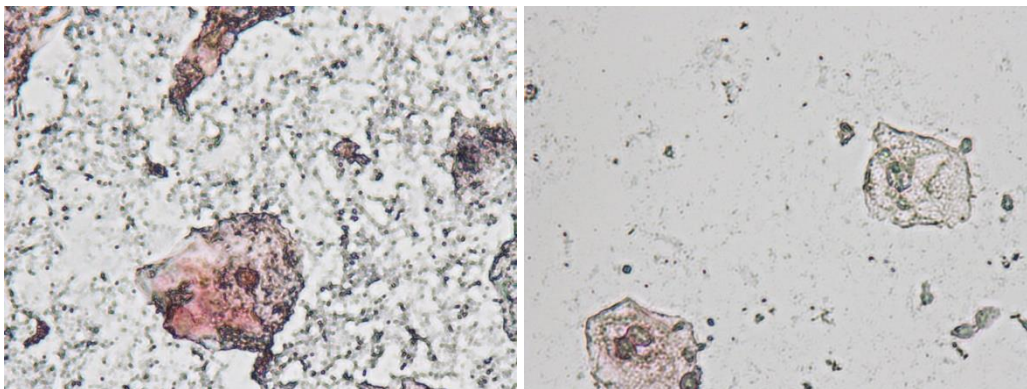
Kuvion 10 preparaateissa on nähtävissä eosinofiilinen liuskatumainen granulosyytti. Erytrosyytteja oli runsaasti ja näytteet olivat paksuja. Eosinofiilinen liuskatumainen granulosyytti oli värjäytynyt molemmissa näytteissä hienosti. Sen karkearakenteinen kromatiini värjäytyy tummanvioletiksi, joka näkyy selkeästi granuloiden takaa. Eosinofiilissä on runsaasti homogeenisiä pyöreitä spesifejä granuloita, jotka värjäytyvät punertavanoransseiksi ja peittävät melkein koko sytoplasman. Sytoplasman tulisi värjäytyä vaaleansinipunertavaksi, mutta sitä on hankala nähdä. Trombosyytit ovat värjäytyneet hyvin. Erytrosyytit ovat normokromisia, mutta automaattilla värjättyllä lasilla erytrosyytit ovat hialakampia. Automaattilla värjättyssä preparaattissa erytrosyytit ovat normokromisia, vaikka värjäytyvyyden perusteella ne voitaisiin tulkita polykromaattisiksi, jos solu värjäytyisi näin se viittaisi epäkypsyyteen, joka näkyisi tällöin myös manuaalisessa värjäyksessä. (Verisolujen tunnistusaapinen 2009:32,33,49,68.)



Kuvio 10. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys verisoluista.

8.3 Laatuksiteerien arviointi ja mikroskooppinen tarkastelu Papanicolaou värjäyksessä

Papanicolaou värjäys ei onnistunut odotusten mukaisesti, joten tulosten raportointi jätettiin kokonaan pois opinnäytetyöstä. Värjäyksen epäonnistumiseen ei ole tarkkaa syytä, mutta voidaan pohtia, onko kemikaalien laadussa tai vesijohtoveden pH:ssa poikkeamia. Syyksi on pohdittu myös värien suodatusta, mutta se vähentäisi vain preparaattien roskaisuutta eikä vaikuttaisi värien intensiteettiin. Syy sumeille näytteille voi olla myös diffaus. Kuvioista 11 nähdään, että näytteet olivat poikkeuksetta roskaisia sekä epiteelisolujen sytoplasma oli erittäin haaleasti värjäytynyt. Tuman rakennetta oli myös hankala erottaa.



Kuvio 11. Vasemmanpuoleinen kuva manuaalinen värjäys ja oikeanpuoleinen kuva automaattivärjäys virtsan soluista.

8.4 Käytetty aika

Gram-värjäykseen kului manuaalisesti 4 minuuttia 30 sekuntia. Automaatilla värjäykseen kului 4 minuuttia, jolloin automaatti on ihmistä hieman nopeampi. Papanicolaou värjäyksissä käytetty aika oli sama eli 47 minuuttia. MGG-värjäyksessä manuaalisesti aikaa kului 45 minuuttia kun taas automaatilla 46 minuuttia, jolloin manuaalisesti värjäys suoritettiin hieman nopeammin. Manuaalinen värjäys ja automaattinen värjäys olivat siis samantuisia Papanicolaou värjäyksessä. MGG-värjäyksessä ero oli ajallisesti yksi minuutti ja gram-värjäyksessä ero oli 30 sekuntia.

8.5 Työturvallisuus

Värjäyksiä tehtäessä käytetään paljon erilaisia kemikaaleja, joista useat ovat ärsyttäviä tai jopa syövyttäviä. Kaikki kemikaalit on merkitty varoitusmerkein, jolloin käyttöturvallisuustiedotteista pystytään katsomaan oikeat käsittelyohjeet. Käyttöturvallisuustiedotteista selviää myös ensiapuohjeet, sekä siitä pystyy myös tarkastamaan oikean hävitystavan. Väriä sisältävät kemikaalit värjäävät herkästi ihoa sekä ympäristöä, mikäli sitä roiskuu työskennellessä. Kemikaaleja käsiteltäessä tulee suojautua oikein, pitkähihainen työtakki sekä hanskat riittävät. Näytelaseja käsiteltäessä sormista voi irrota rasvaa sekä mikrobeja, joten hanskat suojaavat sekä työntekijää, että näytettä. Kemikaaleja tulee käsitellä laminaari- tai vetokaapissa, jolloin voimakkaan hajuiset tai kaasuuntuvat aineet eivät leviä huoneeseen vaan poistuvat kaapin kautta suoraan ulkoilmaan. Kaapin lasi tulee pitää alhaalla, kuitenkin niin että siitä mahtuu työskentelemään. Suurin osa kemikaaleista, etenkin väreistä, on ympäristölle haitallisia, joten ne kerätään erilliseen keräysastiaan ja merkitään mitä kyseinen astia sisältää. Lopuksi kädet tulee pestä hyvin kemikaalien käsittelyiden jälkeen. (Solunetti 2006; Työturvallisuuskeskus.)

Metropolia Ammattikorkeakoulun Myllypuron kampuksella on käytössä vain vetokaappeja, joten värit laimennettiin niissä. Kaikki kemikaalit käsiteltiin vetokaapissa, sillä etenkin ksyleeni on haitallista hengitettynä. Ksyleeni aiheuttaa myös ihoreaktioita, jonka seurauksena ihoa voi kirvellä ja se voi alkaa punoittaa. (Työterveyslaitos 2015.) Kun käsitelimme kemikaaleja, suojauduimme hyvin hanskoilla sekä työtakilla.

Papanicolaou värjäystä tehtäessä analyytikööri ehdotti ensimmäiseksi lisättäväksi kemikaaliksi ksyleeniä, mikä aiheutti työturvallisuusriskin. Kun ksyleeni on ensimmäisenä lisättävänä, ehtii sen voimakas tuoksu haihtua analyytiköörin läheisyyteen ja näin ollen vaikuttaa bioanalytiikan työturvallisuuteen. Kun analyytiköörin luukut olivat kiinni, haju ei levinnyt ympäristöön. Muita reagenssiastioita laittaessa analyytikööriin, tuoksu ehtii kuitenkin haihtua ilmaan niin, että se saattaa aiheuttaa lievää päänsärkyä. Manuaalisessa värjäyksessä ksyleeni oli koko ajan vetokaapissa, jolloin ksyleenin haju ei levinnyt ympäristöön.

8.6 Virhelähteet

Virhelähteet johtuivat suuremmaksi osaksi bioanalytiikoista eikä automaattista tai värien huonosta laadusta. Bakteeripreparaatit olivat liian paksuja, joka näkyi mikroskoopilla tarkasteltaessa, jolloin laadukasta kohtaa oli vaikea löytää. Kummallakaan opinnäytetyöntekijällä ei myöskään ollut paljon kokemusta manuaalisesti tai automaattilla värjäämisestä. Opinnäytetyöntekijöillä ei myöskään ollut paljoa kokemusta bakteerien ja verisolujen tunnistamisesta. Värjäyksissä tapahtuvien virhelähteiden mahdollisuutta tarkasteltiin värjäysprosessien ajan.

9 Pohdinta

Tässä opinnäytetyössä verrattiin manuaalista värjäysmenetelmää ja Thermo Scientific™ Gemini AS värjäysautomaattia gram-, May-Grünwald-Giemsa ja Papanicolaou värjäyksissä. Preparaateista huomioitiin tiettyjä laatukriteerejä. Vertailtiin myös menetelmiin kuluvaa aikaa sekä työturvallisuutta. Tässä opinnäytetyössä korostui värjäyksien onnistumisen tärkeys tulkinnan kannalta. Koska värjäyksissä voi tapahtua monia virheitä, on värjäyksien onnistumisella ja tekijän ammattitaidolla suuri merkitys. Liimatainen totesi artikkelissaan, että koulutuksella on suuri tärkeys gram-värjäyksen tulkinnan kannalta. Jouduimmekin opinnäytetyön aikana kehittämään omaa ammattitaitoamme ja syventy-

mään värjäyksien mahdollisiin virhelähteisiin sekä värjäyksien toteuttamiseen. Esimerkiksi virheitä tapahtuu jo preparaattien valmistuksessa, jonka huomasimme mikroskoopin aikana, että bakteeripreparaatit olivat liian paksuja. Monissa artikkeleissa todetaan värjäyksien tärkeyden merkitys potilaan hoidon kannalta. Tämä korostui opinnäytetyön toteutuksessa, vaikka emme keskittyneetkään näytteiden diagnostiseen merkitykseen. Värjäyksien onnistumiseksi näytteiden täytyy olla tuoreita, värien laadukkaita ja olla selkeä käsitys siitä, että mitä tehdään ja mitä työohjeita noudatetaan. Värjäyksistä, värjäysten virhelähteistä sekä värjäyksien merkityksestä löytyy paljonkin tietoa, mutta manuaalisen värjäysmenetelmän ja automaattisen värjäysmenetelmän vertailusta gram- ja MGG-värjäyksissä materiaalia on yllättävän vähän. Opinnäytetyön aikana huomasimme, että manuaalisella värjäysmenetelmällä ja Thermo Scientific™ Gemini AS automaattilla tehdyillä värjäyksillä ei ollut suuria eroja toisistaan.

Opinnäytetyön toteutuksessa ilmeni myös haasteita. Värjäykset olivat suunniteltu toteutettavaksi keväällä 2020. Covid-19 pandemian vuoksi värjäykset jouduttiin siirtämään syksyille 2020. Värjäykset myöhästyivät myös siksi, että Myllypuron kampuksella ei ollut vetokaappeja vielä keväällä 2020. Opinnäytetyön prosessia hankaloitti myös aikataulujen yhteen sovittaminen, koska olimme molemmat vuorotyössä opinnäytetyönprosessin aikana. Värjäämisaikataulu täytyi sovittaa myös niin, että luokassa ei ole sillä hetkellä opetusta ja opettaja on paikalla. Näytteiden hankinnassa ilmeni myös hankaluuksia ja jouduimmekin käyttämään virtsanäytteinä aikaisemmin tehtyjä sytotec-preparaatteja, jolloin näytteiden laatua ei voinut kunnolla verrata toisiinsa. Verinäytteet olivat ainoastaan terveistä ihmisistä, joten preparaattien solut olivat aika yksipuolisia. Näyttemateriaali olisi voinut olla monipuolisempaa, jolloin myös värjäyksissä olisi näkynyt paremmin eri variaatioita ja tulokset olisivat olleet monipuolisemmat. Aikaisempia tutkimuksia aiheesta on hankala löytää.

9.1 Johtopäätökset

Gram-värjättyjen preparaattien laatuksiteereissa ei ollut suuria eroja manuaalisen värjäysmenetelmän ja automaattilla tehtävän värjäyksen välillä. Gram-negatiiviset preparaatit olivat väriltään intensiivisempiä kuin manuaalisesti värjättyt. Syy tähän voi olla se, että automaatti suoritti huuhtelut silmänmääräisesti nopeammin kuin manuaalisessa värjäyksessä bioanalyttikko itse. MGG-värjäyksessä ei myöskään ollut suuria eroja laatuksiteereissa. Näyttemateriaali oli terveiltä ihmisiltä, joten tuloksia esimerkiksi aneemisten punasolujen laatuksiteereista ei saatu. Verisolut ja niiden osat värjäytyivät selkeästi ja ne olivat

erotettavissa. Erytrosyytit olivat osassa automaattilla värjätyistä preparaateista sinertävämpiä kuin manuaalisesti värjättyinä. Solut eivät kuitenkaan olleet epäkypsiä, sillä silloin myös manuaalisesti värjättyt erytrosyytit olisivat olleet sinertäviä. Pohdimme myös automaattivärjäystä varten tehtyä fosfaattipuskurin pH:n vaikutusta erytrosyyttien värjäytyvyyteen, mutta jos fosfaattipuskuri olisi liian hapan, olisivat muutkin preparaatit sinertäviä.

Papanicolaou värjäys epäonnistui ja tulokset olivat huonoja, joten tulosten analysointi jätettiin opinnäytetyöstä kokonaan pois. Ajallisesti värjäysmenetelmät eivät eronneet toisistaan huomattavasti. Manuaalisissa värjäyksissä kemikaaleja käsiteltiin vetokaapissa, joten kemikaaleja ei tarvinnut värjäyksien aikana siirrellä vetokaapista pois ja bioanalyytikko ei altistunut kemikaaleille. Automaattilla värjätessä jouduimme siirtämään reagenssiastiat huoneen toiselta puolelta vetokaapista värjäysautomaatin luokse. Värjäysautomaatin asettelu huoneen toiselle puolelle altistaa bioanalyytikon kemikaalien höyryille sekä on riskialtista kuljettaa täysinäisiä reagenssiastioita huoneen poikki, sillä esimerkiksi ksyleenin läikkyminen lattialle altistaisi kaikki huoneessa olijat kemikaalille. Joten tässä opinnäytetyössä manuaalinen värjäystapa oli työturvallisuuden kannalta turvallisempi värjäysmenetelmä. Johtopäätöksenä voi sanoa, että pääsimme tavoitteeseen eli saimme vastaukset tutkimuskysymyksiin gram- ja MGG-värjäyksen osalta. Valitettavasti Papanicolaou värjäyksen kohdalla emme saaneet vastauksia tutkimuskysymykseen laatu-kriteerien kohdalla.

9.2 Kehittämisehdotukset

Jatkotutkimusaiheena esitämme värjäysautomaatin ongelmien selvittelyä Papanicolaou värjäyksen osalta Metropolia Ammattikorkeakoululla. Voisi selvittää, että onko esimerkiksi vesijohto veden pH:lla vaikutusta värjäyksien onnistumiseen vai onko kyse käytettävistä väreistä.

9.3 Ammatillinen kehitys

Olemme soveltaneet omia tietoja ja taitojamme sekä kehittyneet ammatillisesti. Olemme syventyneet värjäysmenetelmiin ja solujen tunnistamiseen sekä analysointiin. Prosessin aikana olemme kehittyneet bioanalyytikon työssä tehtävistä patologisista värjäyksistä niin manuaalisesti kuin automaattillakin tehtynä. Opinnäytetyöprosessi haastoi meitä syventymään teoriaan ja toteuttamaan sen käytännössä. Opinnäytetyön aikana esiintyikin haasteita, mutta saimme ongelmat ratkaistua. Opinnäytetyö on vienyt paljon aikaa ja

siksi olimmekin laatineet aikataulun. Opinnäytetyöprosessin aikana olimme yhteydessä vastaavaan opettajaan sekä näimme häntä kampuksella värjäyksiä suorittaessa. Ongelmien ilmaantuessa olemme heti kysyneet neuvoja. Opinnäytetyön loppuun saaminen johtui pitkälle hyvästä yhteistyöstämme ja mahdollisuudesta keskustella avoimesti pohdittavista asioista sekä sitouduimme opinnäytetyön tekemiseen yhdessä.

10 Eettisyys ja luotettavuus

Etiikka on konkreettista ja käytännöllistä kun on kysymys terveydestä. Terveydenhuollon ammattiryhmät ovat käyttäneet eettisiä ohjeita jo kauan. Etiikka kuvaa ja perustelee oikeita ja hyviä tapoja, kuinka toimia ja elää maailmassa muiden ihmisten kanssa. Etiikassa yhdistyy arvot, ihanteet ja periaatteet, jotka koskevat oikeaa ja väärää sekä hyvää ja pahaa. Terveydenhuollon ammattiryhmien eettiset ohjeet perustuvat yhteisiin arvoihin. Ihmisarvon ja itsemääräämisen kunnioittaminen, ihmiselämän suojeleminen sekä terveyden edistäminen ovat eettisten ohjeiden keskeisiä asioita. Eettiset periaatteet terveydenhuollossa ovat oikeus hyvään hoitoon, ihmisarvon kunnioitus, oikeudenmukaisuus, itsemääräämisoikeus, hyvä ammattitaito ja hyvinvointia edistävä ilmapiiri sekä yhteistyö ja keskinäinen arvonnanto. (ETENE; Sihvo 2018;56).

Tutkijaa ohjaavat yleiset eettiset periaatteet tieteenalasta riippumatta. Periaatteisiin kuuluu tutkittavan ihmisarvon, itsemääräämisoikeuden, yksityisyyden ja muiden oikeuksien kunnioittaminen. Tutkimuksesta ei saa aiheutua tutkimuskohteille haittoja, riskejä tai vahinkoja. Opinnäytetyöprosessin aikana bioanalyttikko noudattaa eettisiä ohjeita. Bioanalyttikko pyrkii hyvään ammattitaitoon sekä edistävään ilmapiiriin, jotka ovat jokaisen bioanalyttikon velvollisuus ja oikeus. Velvollisuus on ylläpitää ja kehittää omaa toimintaa ja omaksua tieteellisesti tutkittuja menetelmiä ja toimintatapoja. Opinnäytetyön aikana perehdyttiin prosessin aikana tarvittaviin säädöksiin, määräyksiin ja standardeihin. Näytteiden analysoinnissa hankittiin vain tarvittavan tieto ja kunnioitettiin henkilöiden yksityisyyttä. Tutkimusprosessin vastuu oli opinnäytetyön tekijöillä opinnäytetyön laadusta sekä luotettavuudesta. Opinnäytetyön aikana pyrittiin ylläpitämään ammatin luottamusta sekä ammatillista kehitystä. (Metropolia Ammattikorkeakoulu 2020; Bioanalyttikkoliitto ry 2017.)

Tietosuojalain ja tietosuoja-asetuksen periaate on oikeuksien turvaaminen, jolloin opinnäytetyön aikana täytyy kiinnittää huomiota henkilötietojen käsittelyyn ja henkilösuojan toteutumiseen (Arene Ry 2020:7). Opinnäytetyössä huomioimme tämän erittäin tarkasti

ja opinnäytetyön aikana ei käsitelty henkilötietoja ja näytteet nimettiin täysin anonymisti numeroilla ja kirjaimilla. Näytteitä ei säilytetty opinnäytetyöprosessin jälkeen ja ne hävitettiin asianmukaisesti. Opinnäytetyö ajettiin plagiaatintunnistusjärjestelmän läpi ja käytetyt lähteet olivat luotettavia, ajankohtaisia ja tarkistettuja. Käytimme lähteinä esimerkiksi tieteellisiä artikkeleja, joita pyydettiin Labquality Oy:lta sähköpostitse. Etsimme tietoa myös erilaisista tietokannoista kuten PubMed ja Terveysportti.

Opinnäytetyön luotettavuus ilmeni monellakin tapaa prosessin aikana. Värjäyksiä suorittaessa noudatimme tarkasti Metropolian työohjeita sekä huolehdimme työturvallisuudesta. Gram-värjäykseen teimme kontrollilasin, jossa bakteerinäytteinä olivat *Staphylococcus aureus*, joka on gram-positiivinen kokki sekä toisena näytteenä oli gram-negatiivinen sauva *E.coli*. Kontrollilasin preparaattit olivat selkeitä ja hyvin värjäytyneitä, jolloin morfologia ja värjäytyvyys olivat selkeästi nähtävissä. MGG-värjäyksessä tuloksien luotettavuutta lisäsi se, että meillä oli sivelyvalmisteita useamman henkilön näytteestä ja näin ollen pystyimme vertailemaan samaa näytettä manuaalisesti sekä automaattilla värjättynä. Opinnäytetyötä varten tehtiin tarvittavat sopimukset Metropolia Ammattikorkeakoulun kanssa. Perehdyimme aiheeseen sekä hyvään tieteelliseen käytäntöön perusteellisesti.

Lähteet

Aho, Heikki 2000. Sytologiset värjäykset. Moodi 2000 (4-5), 142-147.

Arene Ry 2020. Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Verkko-dokumentti. <http://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%C3%84YTET%C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?_t=1578480382>. Luettu 14.10.2020.

Carlson, Petteri — Koskela, Markku 2011. Bakteriologian perustekniikat. Duodecim Oppiportti. Verkkodokumentti. <https://www.oppiportti.fi/op/isa00302/do?p_haku=gramv%C3%A4rj%C3%A4ys#q=gramv%C3%A4rj%C3%A4ys>. Luettu 4.2.2020.

Centers for disease control and prevention 2017. Moraxella catarrhalis. Verkkodokumentti. <<https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/mcat.htm>>. Luettu 28.10.2020.

Ek, Annakaisa 2009. Verisolujen tunnistusaapinen. Kankaanpää: MESSON.

ETENE. Terveysthuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet. ETENE-julkaisuja 1. Verkkodokumentti. <<https://etene.fi/documents/1429646/1559098/ETENE-julkaisuja+1+Terveysthuollon+yhteinen+arvopohja%2C+yhteiset+tavoitteet+ja+periaatteet.pdf/4de20e99-c65a-4002-9e98-79a4941b4468/ETENE-julkaisuja+1+Terveysthuollon+yhteinen+arvopohja%2C+yhteiset+tavoitteet+ja+periaatteet.pdf>>. Luettu 25.10.2020.

Kouri, Timo — Anttinen, Jorma — Icen, Arto — Ikäheimo, Risto — Irijala, Kerttu — Kontiainen, Sirkka — Koskimies, Olli — Lipponen, Pertti — Penttilä, Ilkka — Siitonen, Anja — Siukola, Aino 1999. Suositus virtsan perustutkimuksia ja bakteeriviljelyä varten. Moodi 1999 erillisjulkaisu 7, 11,12,15,16.

Liimatainen, Oili 2000. Gramvärjäys. Moodi 2000 (4-5), 126-128.

Lippi, Giuseppe — Plebani, Mario — Simundic, Ana-Maria 2010. Quality in laboratory diagnostics: from theory to practise. Biochemia Medica Issue 2. Verkkodokumentti. <https://biochemia-medica.com/assets/images/upload/xml_tif/Lippi_G__et_al_-_Quality_in_laboratory_diagnostics_from_theory_to_practice.pdf>. Luettu 2.11.2020.

Lumio, Jukka 2019. Verenmyrkytys eli sepsis. Lääkärikirja Duodecim 2019. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00604>. Luettu 16.10.2020.

Metropolia Ammattikorkeakoulu 2020. Kirjaston hankepalvelut: Hyvä tieteellinen käytäntö ja tutkimusetiikka. Verkkodokumentti. <https://libguides.metropolia.fi/hankepalvelut/hyva_tieteellinen_kaytanto>. Luettu 3.11.2020.

Meurman, O. 2010. Gramvärjykset. Moodi 2010 (1), 54-56.

Patterson, Maria Jevitz 1996. Streptococcus pyogenes, other Streptococci, and Enterococcus. National Center for Biotechnology Information. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>>. Luettu 28.10.2020.

Pelliniemi, Tarja-Terttu 1998. Veren sivelyvalmiste. Aikakausikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo80261>>. Luettu 17.3.2020.

Raju, Kalyani 2016. Evolution of Pap Stain. Biomedical Research and Therapy. Verkkodokumentti. <<http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/80>>. Luettu 5.2.2020.

Rissanen, A-M. 2016. Gramvärjäytymisen salaisuus kietoutuu bakteerin seinärakenteeseen. Suomen Sairaalahygienialehti 2016 (1), 39. <http://sshy.fi/data/documents/lehdet/16_1.pdf>. Luettu 8.10.2020.

Sandle, Tim. 2020. Assessing Gram-stain error rates within the pharmaceutical microbiology laboratory. EJPPS European Journal of parentral and pharmaceutical sciences. Verkkodokumentti. <https://www.researchgate.net/publication/340538133_Assessing_Gram-stain_error_rates_within_the_pharmaceutical_microbiology_laboratory>. Luettu 24.10.2020.

Sarvas, Matti – Skurnik, Mikael – Vaara, Martti 2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Teoksessa K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri & M. Vaara (toim.) Infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 25-27, 1.

Savolainen, Eeva-Riitta — Tienhaara, Anni 2015. Morfologiset tutkimukset. Duodecim Oppiportti. Verkkodokumentti. <https://www.oppiportti.fi/op/ver00502/do?p_haku=mgg-v%C3%A4rj%C3%A4ys#q=mgg-v%C3%A4rj%C3%A4ys>. Luettu 17.5.2020.

Sihvo, Sinikka 2018. Kaipaavatko eettiset periaatteet päivitystä? Sosiaali- ja terveystieteiden eettiset periaatteet – ovatko ne valideja tulevaisuudessa? ETENE-julkaisuja 46. Verkko-dokumentti. <<https://etene.fi/documents/1429646/12259990/ETENE+julkaisu+46+Eettiset+perusteet%2C+kausijulkaisu/5a137eb6-6e68-8f50-96bb-ac844397343e/ETENE+julkaisu+46+Eettiset+perusteet%2C+kausijulkaisu.pdf>> Luettu 25.10.2020.

Solunetti 2006. Työturvallisuus. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tyoturvallisuus/>>. Luettu 25.9.2020.

Solunetti 2006. Vaaralliset aineet. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/vaaralliset_aineet/>. Luettu 25.9.2020.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Verkkodokumentti. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Luettu 14.10.2020.

Thairu, Yunusa – Nasir, Idris Abdullahi – Usman, Yahaya 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. Sub-Saharan African Journal of Medicine. Verkkodokumentti. <<https://www.ssajm.org/article.asp?issn=2384-5147;year=2014;volume=1;issue=4;spage=168;epage=174;au-last=Thairu>>. Luettu 16.10.2020.

Thermo Scientific 2013. Gemini AS brochure. Verkkodokumentti. <<https://assets.thermo-fisher.com/TFS-Assets/APD/brochures/Gemini%20AS%20brochure.pdf>>. Luettu 27.9.2020.

Thermo Scientific Gemini AS Käyttöopas A81510100 painos 12. 2017.

Tiwari, Tejpratap S.P. – Wharton Melinda 2018. Diphtheria Toxoid. Science direct. Verkkodokumentti. <<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/corynebacterium-diphtheriae>>. Luettu 28.10.2020.

Työterveyslaitos 2015. Ksyleeni. Verkkodokumentti. <<https://www.ttl.fi/ova/ksyleeni.html>>. Luettu 8.10.2020.

Työturvallisuuskeskus. Kemialliset tekijät. Verkkodokumentti. <https://ttk.fi/tyoturvallisuus_ja_tyosuojelu/tyoturvallisuuden_perusteet/tyoymparisto/kemialliset_tekijat>. Luettu 25.9.2020.