

Kukka Ankeriasniemi  
Malgorzata German-Kinnari

# Ihobiopsioiden immunofluoresenssivärjäys Käsivärjäysmenetelmän ja Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatin vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

22.11.2012

Tekijät	Kukka Ankeriasniemi ja Malgorzata German-Kinnari
Otsikko	Ihobiopsioiden immunofluoresenssivärjäys. Käsivärjäysmenetelmän ja Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatin vertailu
Sivumäärä	53 sivua + 6 liitettä
Aika	22.11.2012
Tutkinto	Bioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja	Lehtori Terttu-Liisa Lindell Bioanalytikko Päivi Burakoff
<p>Immunofluoresenssin avulla voidaan määrittää antigeenin ja vasta-aineen välisiä vuorovaikutuksia solujen eri rakenteissa. Monissa ihotaudeissa immunofluoresenssitutkimus on välttämätön apuväline diagnostiikassa. Diagnostiikan kannalta on tärkeää saada mahdollisimman optimaalisia valmisteita, mutta nykyisin käytössä olevalla immunofluoresenssinäytteiden käsivärjäysmenetelmällä tähän ei ole aina pystytty. Opinnäytetyömme tarkoitus oli selvittää ihobiopsioiden immunofluoresenssivärjäysten eroja käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välillä. Vertailimme menetelmiä herkkyuden, fluoresenssivärin laadun ja säilyvyyden osalta sekä henkilöstönäkökulmien ja kustannusten kannalta. Työmme toimeksiantaja oli Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy (YML), patologian osasto.</p> <p>Värjäsimme näytteet käsimenetelmällä sekä Rochen Ventana BenchMark™ system (VBM™) -värjäysautomaatilla. Vertasimme menetelmien välisiä eroja herkkyudessa sekä niillä värjättyjen näytteiden fluoresenssivärin laadussa ja säilyvyydessä. Otimme huomioon myös reagenssien kustannusarviot sekä henkilökunnan toiveet ja mieltymykset.</p> <p>VBM™-automaatilla värjättyjen näytteiden fluoresenssivärin laatu osoittautui käsimenetelmää huomattavasti paremmaksi. Lisäksi VBM™ oli herkempi ja värjäysprosessi oli nopeampi kuin käsimenetelmä. Henkilökunta käyttäisi tämän tutkimuksen mukaan mieluummin VBM™-värjäysautomaattia kuin käsivärjäysmenetelmää. Fluoresenssin säilyvyys oli VBM™-automaatilla sekä kahden että neljän viikon säilytyksen jälkeen parempi kuin käsimenetelmällä värjättyillä näytteillä. Reagenssien kustannukset olivat kuitenkin automaattimenetelmällä suuremmat.</p> <p>VBM™-värjäysautomaatti sopii tämän tutkimuksen perusteella YML patologian osaston käyttöön, sillä näytteiden värjääminen automaatilla oli nopeaa, vaivatonta ja luotettavaa. Suosittelemmekin, että VBM™-värjäysautomaatti hankittaisiin YML patologian osastolle.</p>	
Avainsanat	immunofluoresenssi, ihobiopsia, vertailu, käsivärjäysmenetelmä, automaattivärjäysmenetelmä, herkkyys, laatu, säilyvyys, henkilökuntatarve

Authors	Kukka Ankeriasniemi and Malgorzata German-Kinnari
Title	Immunofluorescence Staining Methods for Skin Biopsies: Comparison of Manual Staining Method and Automated Ventana BenchMark™ system
Number of Pages Date	53 pages + 6 appendices 22 November 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor	Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer Päivi Burakoff, Biomedical Laboratory Scientist
<p>Immunofluorescence is a staining method that is used to demonstrate the presence of antibody bound to antigen in tissue. In many skin diseases, the evaluation of immunofluorescence in skin biopsies plays an essential role in diagnosing these diseases. To confirm accurate diagnoses, it is important to provide a consistent high-quality staining method. The main goal of our study was to compare the quality and stability of immunofluorescence staining performed by manual and automatic staining methods. The project was carried out at the Pathology Department of the United Medix Laboratories Ltd (YML), Helsinki, Finland.</p> <p>We stained the samples manually and with the automated Roche VentanaBanchMark™ System (VBM™). When staining was completed, we delivered the samples to the pathologist for interpretation. We compared the results from the perspective of sensitivity, staining quality, stability of immunofluorescence and easiness and usefulness for YML pathology laboratory. In addition, we compared the reagent cost estimates of both methods. As part of our comparison, we took into consideration the wishes and requirements of the laboratory personnel.</p> <p>We found that the VBM™ system was significantly more sensitive, far less time-consuming and provided staining with remarkably better quality than the manual method. In addition, the VBM™ system gained favour among the laboratory staff. The stability of immunofluorescence was better with the VBM™ system than with the manual method. However, the reagent expenses of the VBM™ system were relatively high.</p> <p>The results lead to the conclusion that the VBM™ system is in high demand at the laboratory. Thus, we recommend that the VBM™ system should be taken in use at the Pathology Department of YML.</p>	
Keywords	immunofluorescence, skin biopsy, comparison, manual staining method, automatic staining method, sensitivity, quality, stability, staff demands and needs

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Immunofluoresenssi	2
3	Ihon IF-biopsian näytteenottoaiheet	5
4	Työmenetelmät	11
4.1	Immunofluoresenssinäytteet ja niiden esikäsittely	12
4.2	Käsivärjäysmenetelmä	15
4.3	Rochen Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatti	17
4.4	Objektilasien tutkiminen	19
4.5	Ihobiopsioiden varastointi	20
4.6	Henkilöstönäkökulma ja kustannukset	20
4.7	Tilastollinen analysointi	22
5	Työtä ohjaavat kysymykset	22
6	Opinnäytteen suoritus	23
6.1	Näytemateriaali	24
6.2	Immunofluoresenssivärjäysten suoritus	26
6.3	Menetelmien herkkyyden määrittäminen	27
6.4	Valmisteiden värin laadun arviointi	28
6.5	Fluoresenssin säilyvyyden arviointi	28
6.6	Henkilöstönäkökulmat ja kustannukset	28
6.7	IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleenorganisointi	29
7	Tulokset	30
7.1	Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin erot	30
7.1.1	Menetelmien herkkyys	30
7.1.2	Valmisteiden värin laatu	31
7.1.3	Fluoresoivan värin säilyvyys	33
7.1.4	Työpanokseen käytettävä aika	35
7.1.5	Kustannukset	36
7.1.6	Henkilöstönäkökulmat	37
7.1.7	VBM™-värjäysautomaatin hankinnan kannattavuus	38
7.2	IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleenorganisointi	40

7.2.1	Ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysolosuhteet	40
7.2.2	Ihobiopsioiden varastointi	41
7.2.3	Värjäysaikataulu	42
8	Tulosten luotettavuuden arviointi	44
9	Pohdinta	47
	Lähteet	50

## Liitteet

Liite 1. Käsivärjäyksen työohje

Liite 2. Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatin värjäysohjelmat

Liite 3. Lomake tulosten tallentamista varten

Liite 4. Kaikkien näytteiden tulokset

Liite 5. Fluoresenssimikroskoopilla otettuja kuvia objektilaseista

Liite 6. Mielialuekyselylomake

## 1 Johdanto

Ihon immunofluoresenssi (IF) on oleellinen apuväline monen ihotaudin diagnostiikassa. Oikean diagnoosin saaminen on huomattavan tärkeää, sillä erityisesti ihon autoimmuuni- ja rakkulataudit ovat hyvin usein vaikeita ja niiden hoito on haastavaa. On huomattu, että IF-näytteiden käsivärjäysmenetelmällä ei ole aina kyetty saamaan diagnostiikan kannalta mahdollisimman optimaalisia valmisteita. Lisäksi tämä värjäysmenetelmä on osoittautunut työlääksi ja aikaa vieväksi. Kliinisissä laboratorioissa panostetaan automatisointiin, sillä automaation on huomattu säästävän henkilöstön aikaa ja resursseja. Automaation avulla saadaan tasalaatuisia lopputuotteita, laadun seuranta helpottuu ja työntekijöiden erilaisista työtavoista johtuva laadunvaihtelu jää pois (Ventana 2010: 2). Ennen automaatioon siirtymistä laboratorion on kuitenkin kyettävä varmistamaan tuottamiensa palveluiden diagnostinen laatu. Laboratorion onkin osoitettava, että uuden menetelmän saavuttamat hyödyt ovat suuremmat kuin sen hankintaan käytetyt panostukset. Aikaisemmin ei ole kuitenkaan ollut tiedossa, miten eri IF-värjäysmenetelmät eroavat toisistaan fluoresenssivärin laadussa ja henkilöstöresurssien käytössä.

Opinnäytetyömme toimeksiantaja on Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy (YML), patologian osasto. Tutkimuksemme perustuu histologisista ihobiopsioista tehtyjen jääleikkeiden värjäämiseen suoralla IF-menetelmällä. Värjäämme IF-näytteitä sekä käsivärjäysmenetelmällä että osastolle lainaksi saadulla Rochen Ventana BenchMark™ system (VBM™) -värjäysautomaatilla. Tämän jälkeen dosentti, ihotautien ja patologian erikoislääkäri Susanna Virolainen tutkii näytteet fluoresenssimikroskoopilla ja arvioi niiden teknisen onnistumisen, värin laadun sekä antaa diagnostiset lausunnot. Vertaamme näiden menetelmien välisiä eroja värjättyjen näytteiden fluoresenssivärin laadun ja säilyvyyden osalta sekä tutkimme värjäysten herkkyyttä eli sitä, onko värjäysmenetelmien välillä eroa positiivisen fluoresenssin löytymisessä. Lisäksi vertaamme menetelmiä kustannusten ja henkilökuntatarpeen näkökulmasta.

Opinnäytetyössämme esitämme lisäksi toimenpiteitä, jotka helpottavat mahdollisimman paljon laboratorion päivittäistä työkuormaa. Selvitämme, heikentääkö näytteen pitkä säilytys- ja kuljetusaika sen fluoresenssia ja otamme selvää vaihtoehtoisesta liuksesta ihobiopsioiden kuljetusta ja säilytystä varten. Lisäksi tutkimme, kuinka toimiva leikkattujen ihobiopsioiden nykyinen varastointimenetelmä on ja laadimme näiden tietojen poh-

jalta suosituksen leikattujen ihobiopsioiden varastointimenetelmästä diagnoosin saamisen jälkeen.

Yhtyneet Medix laboratorioden johto tekee opinnäytetyömme perusteella päätöksen VBM™-värjäysautomaatin hankinnasta. Rajaamamme tutkimuskysymykset perustuvatkin YML patologian osaston tarpeisiin. Opinnäytetyössämme suurimpana haasteena on objektiivisen, tutkittuun tietoon perustuvan ehdotuksen laatiminen värjäysautomaatin mahdollisesta hankintapäätöksestä. IF-värjäysmenetelmien vertailusta on olemassa niukasti aikaisempia tutkimuksia, ja nekin keskittyvät muihin erikoisaloihin kuten mikrobiologiaan ja hematologiaan. Ne eivät kuitenkaan sovellu ihobiopsioiden IF-värjäysmenetelmien vertailun taustatiedoksi.

Työmme ohjaajina toimivat Metropolia ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman lehtori Terttu-Liisa Lindell sekä YML patologian osaston opiskelijavastaava, bioanalytikko Päivi Burakoff. Opinnäytetyössämme on runsaasti valokuvia, joista osa on meidän itse ottamiamme.

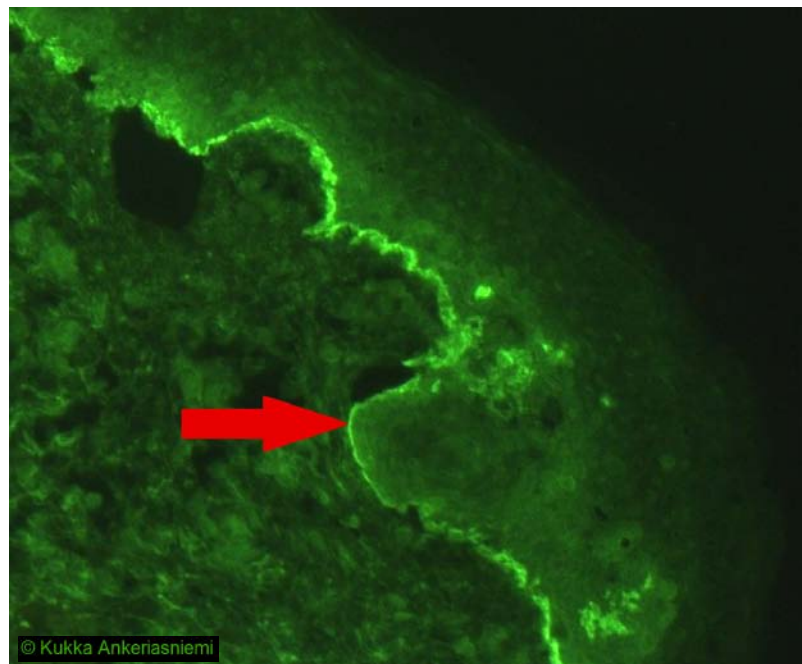
## **2 Immunofluoresenssi**

Fluoresenssi on valoa, jota syntyy elektronin viritystilan purkautuessa. Tietyn aallonpituuden omaavan fotonin osuessa atomiin se absorboituu ja luovuttaa energiaa elektronille, mikä virittää elektronin korkeammalle energiatasolle. Välittömästi tämän jälkeen viritystila purkautuu, minkä yhteydessä emittoituvalla fotonilla on matalampi energia ja täten suurempi aallonpituus kuin alkuperäisellä fotonilla. (Robinson – Sturgis – Kumar 2009: 61–62.)

Fluoresoivien väriaineiden eli fluorokromien atomien sisältämiä elektroneja voidaan virittää fluoresenssimikroskoopin voimakkaan elohopea- tai ksenonvalon avulla. Sen säteilemästä ultraviolettivalosta suodatetaan pois kaikki muut valon aallonpituudet paitsi kyseisen fluorokromin eksitaatioaallonpituus eli se aallonpituus, jossa fluorokromi parhaiten fluoresoi valoa. Tämä monokromaattinen valo saa aikaan näytteessä olevan fluorokromin virittymisen. Opinnäytetyössämme käyttämän fluoreseiinin eksitaatioaallonpituus on 495 nm. Koska suurin osa fluoreseiinista emittoituvasta valosta on aallonpituudeltaan noin 515 nm, se on näkyvän valon spektrissä ja täten helposti silmin havaittavissa hohtavana, vihreänä valona pimeää taustaa vasten (Robinson ym. 2009:

61–62; Davidson 2009). On muistettava, että fluoresoivat väriaineet on säilytettävä pimeässä, sillä luonnonvalon sisältämä UV-valo heikentää niiden fluoresenssia. (FITC Anti IgA 2008; FITC Anti IgG 2008; FITC Anti IgM 2008; FITC Anti C3 2008.)

Immunofluoresenssimenetelmää käytettiin ensimmäisen kerran vuonna 1941, ja siitä lähtien sitä on sovellettu laajasti (Hladik – White 2008: 517). Vuonna 1963 raportoitiin ensimmäisen kerran granulaarisesta IgG- ja C3-kerrostumasta dermo-epidermaalisessa junktiossa lupus erythematosusta sairastavilla potilailla (Mohan – Sathish – Raghavendra – Sripathi – Prabhu 2008: 415). Immunofluoresenssi on edelleen yleisesti käytössä, ja sillä voidaan tutkia erilaisissa nesteissä olevia soluja, viljeltyjä soluja sekä erilaisia kudospaloja (Ramdial – Bastian – Goodlad – McGrath – Lazar 2012: 37.) Sen avulla voidaan määrittää antigeenin ja vasta aineen välisiä vuorovaikutuksia solujen eri rakenteissa, kuten mitokondrioissa, mikrosomeissa tai pintaproteiineissa (Hladik – White 2008: 517). IF-tutkimuksissa käytetään vasta-aineita, jotka on leimattu fluoresoivalla väriaineella, fluoreseiini-isotiosyanaatilla (FITC). Nämä leimatut primaarivasta-aineet kiinnittyvät spesifisesti kohdeantigeeniin, jolloin antigeeni voidaan havaita fluoresoivilla menetelmillä (Robinson ym. 2009: 61–62; FITC Anti IgA 2008; FITC Anti IgG 2008; FITC Anti IgM 2008; FITC Anti C3 2008) (kuvio 1). Leimattuja soluja voidaan laskea esimerkiksi virtaussytometrillä, kun taas kudoksissa olevia leimattuja vasta-aineita tutkitaan yleisimmin fluoresenssimikroskoopilla (Robinson ym. 2009: 61).

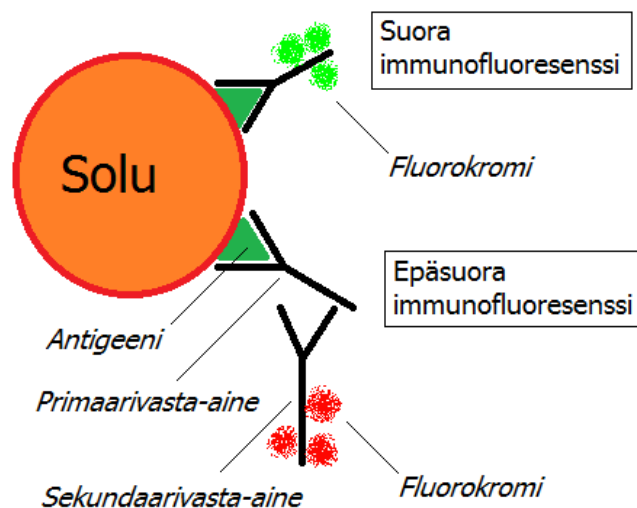


Kuvio 1. Positiivinen immunofluoresenssi tyvikalvolla (nuoli). Löydöksenä on nauhamainen IgG tyvikalvolla, jolloin diagnostinen muutos viittaa pemfigoidiin. Fluoresenssimikroskooppi, objektiivi 40x, FITC-filtteri.



IF-menetelmä on etulyöntiasemassa immunohistokemiaan nähden, sillä immunofluoresenssi tunnistaa antigeenin paljon herkemmin. Lisäksi IF-tutkimuksia varten kehitetyn erikoisfiksatiivin käyttö säilyttää muuten hankalasti löydettävissä olevia antigeeneja. (Ramidal ym. 2012: 35–36.)

Immunofluoresenssitutkimus voidaan tehdä joko suoralla tai epäsuoralla menetelmällä (kuvio 2) ja samasta näytteestä voidaan osoittaa useampia antigeeneja käyttämällä eri sekundaarivasta-aineita (Ilvesaro 2011: 22). Suoralla IF-menetelmällä on kuitenkin aina se haittapuoli, että jokaiselle vasta-aineelle on tehtävä oma valmiste. Useampaa vasta-ainetta ei voida käyttää samassa valmisteessa, sillä fluoresenssimikroskoopissa ne näkyvät samanlaisina. YML patologian osastolla käytetään suoraa IF-värjäystä, sillä vasta-aineiden saatavuus on parempi ja inkubointiajat ovat lyhyemmät kuin epäsuorassa IF-värjäyksessä (Robinson ym. 2009: 61).



Kuvio 2. Suora ja epäsuora immunofluoresenssi. Mukailtu Robinsonin ym. (2009) artikkelista.

Fluoresenssista tunnetaan kolme muotoa: spesifinen ja epäspesifinen fluoresenssi sekä autofluoresenssi. Spesifinen fluoresenssi tarkoittaa antigeenin ja fluoresoivalla väriaineella värjätyyn vasta-aineen välistä reaktiota. Epäspesifistä fluoresenssia syntyy, kun fluoresoiva väri tarttuu kudoksessa muualle kuin kohdeantigeeneihin. Autofluoresenssi on peräisin kudoksen luonnollisesta fluoresenssista, kun se altistuu ultraviolettille. (Aoki – Fukumori – Freitas – Sousa – Périgo – Oliveira 2010: 490.) Autofluoresenssi voi johtua myös kudoksenäytteen kuljetuksessa ja säilytyksessä tapahtuvista reaktioista erityisesti säilytettynä liian kauan kuljetusliuoksessa (Hladik – White 2008: 518).

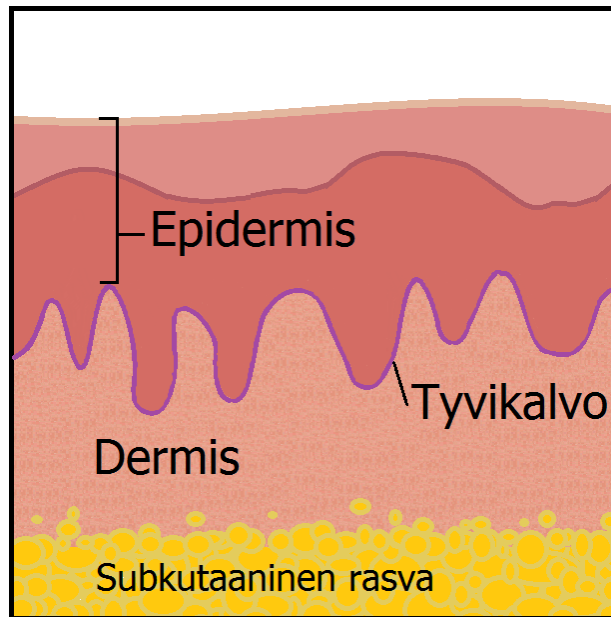
Immunofluoresenssin etuna tavanomaisiin immunologisiin menetelmiin (esimerkiksi ELISA) on se, että sen avulla pystytään paikantamaan antigeenin ja vasta-aineen välisen reaktion sijainti kudoksessa (Hladik – White 2008: 517). Ihottumadiagnostiikassa immunofluoresenssin tärkeys korostuu, sillä nimenomaan antigeenin ja vasta-aineen muodostaman kompleksin sijainnin paikantaminen on välttämätöntä oikean diagnoosin saamiseksi.

Immunofluoresenssin periaatteen ymmärtäminen on tärkeää koko opinnäytetyöprosessimme onnistumisen vuoksi. Värjäyksen aikana tehtävien pesujen tarkoitus sekä reagenssien ja valmiiden objektilasien pimeäsäilytyksen syyt on sisäistettävä, jotta voimme minimoida työn suorittajasta johtuvat virheet ja esimerkiksi mahdollisen epäspesifisen fluoresenssin syntymisen.

### **3 Ihon IF-biopsian näytteenottoaiheet**

Ihonäytteestä tehtävä IF-tutkimus on tärkeä esimerkiksi ihon autoimmuunirakkulatautiin, sidekudostautien ja vaskuliittien diagnostiikassa. IF-tutkimuksen ymmärtämiseksi on tärkeää tuntea ihon rakenne, sillä tutkimuksessa käytettävät vasta-aineet hakeutuvat kudoksen eri kohdissa esiintyviin antigeeneihin, taudista riippuen. Tässä luvussa kerromme ensin ihon rakenteesta ja jatkamme esittelemällä yleisimpiä tauteja, joiden diagnoosin perustana ihon IF-biopsiat ovat.

Iho koostuu kahdesta kerroksesta: epidermiksestä ja dermiksestä (kuvio 3). Epidermis eli orvaskesi on ihon uloin kerros, jonka paksuus on noin 75–150 µm. Se uusiutuu jatkuvasti tyvikerroksessa, jolloin tyvisolut vaeltavat hiljalleen pintaa kohti samalla kerrostuen ja keratinisoituen. Epidermis uusiutuu normaalisti 45–75 päivässä, eikä siinä ole verisuonitusta. (Oikarinen – Tasanen-Määttä 2003: 12–18.) Dermis eli verinahka koostuu pääasiassa kollageenista ja siitä kuroutuu epidermikseen sormimaisia nystyjä (Oikarinen – Tasanen-Määttä 2003: 12–18). Epidermiksen alla on tyvikalvo, joka kiinnittää epidermiksen ja dermiksen toisiinsa. Sen paksuus on 0,5–1 µm ja se koostuu kahdesta ohuemmasta kalvosta, *lamina lucidasta* ja *lamina densasta*. Tyvikalvovyön alapuolella on säiemäisiä rakenteita, ankkurifibrillejä, jotka kiinnittyvät tyvikalvon alla olevaan dermikseen. (Oikarinen – Tasanen-Määttä 2003: 12–18.) Ihonalainen rasvakerros alkaa dermiksen alapuolelta.



Kuvio 3. Ihon rakennetta havainnollistava piirros, jossa näkyy epidermiksen alapuolella tyvikalvo sekä dermiksestä kuroutuvat tyypilliset nystyt.

Ihon autoimmuunirakkula- ja sidekudostaudit sekä vaskuliitit ovat usein vaikeita, ja niiden hoito on haastavaa. Autoimmuunirakkulataudeissa IF-tutkimukset, histologiset tutkimukset, verikokeet ja kliininen status muodostavat yhdessä diagnoosin perustan. (Ramdial ym. 2012, Virolainen 2012.)

Ihon autoimmuunirakkulataudeista yleisimmin positiivisia IF-löydöksiä aiheuttaa pemfigoidi. Se on iäkkäiden, yleensä yli 70-vuotiaiden äkisti alkava autoimmuunisairaus, joka alkaa kovalla kutinalla. Vasta-aineet suuntautuvat ihon tyvikalvolle, jolloin orvaskesi irtaota verinahasta ja iholle syntyy erikokoisia kirkkaita rakkuloita (kuvio 4).



Kuvio 4. Vasemmalla: pemfigoidirakkuloita (Hannuksela-Svahn 2007). Oikealla: Pemfigoidiin liittyvä lineaarinen IgG-kertymä tyvikalvossa.

Rakkuloiden puhjetessa iholle jää verestäviä haavapintoja. (Hannuksela 2011.) Pemfigidia hoidetaan kortikosteroidilla, tarvittaessa sytostaatilla. Monesti hoito kestää kuuksia ja jopa vuosia. Uusia tautitapauksia todetaan vuosittain noin 200. (Reunala 2007.) Pemfigoidin tyyppilöydöksenä tyvikalvossa esiintyy IgG-vasta-aineita ja komplementtia (Huotari-Orava 2011a).

*Dermatitis herpetiformis* eli ihokeliakia on tavallisen keliakian erityismuoto, jota sairastaa Suomessa noin 5000 henkilöä (Hannuksela 2012a). Tautiin liittyvää voimakkaasti kutisevaa ihottumaa esiintyy pääasiassa kyynärpäissä, polvissa, pakaroissa, hartioilla ja hiuspohjassa. Rakkulat ovat usein pieniä, noin 2–6 mm:n kokoisia (kuvio 5). Voimakkaan kutinan vuoksi rakkulat on usein revitty rikki. Ihokeliakiadiagnoosi saadaan terveeltä ihoalueelta otetusta biopsiasta, jossa todetaan pienijyväinen IgA-vasta-ainekertymä tyvikalvossa (Reunala 2007; Huotari-Orava 2011a). Täydelliseen tutkimukseen kuuluu myös ohutsuolibiopsia, sillä on huomattu, että kaikilla ihokeliakiapotilailla on aina myös suolistokeliakia (Hannuksela 2012a).



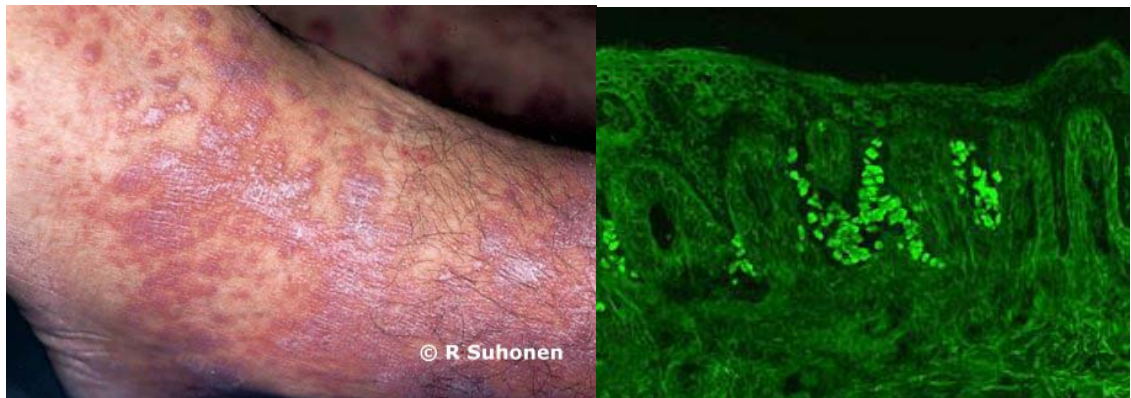
Kuvio 5. Vasemmalla: Dermatitis herpetiformis eli ihokeliakia polvissa (Suhonen 2008). Oikealla: Ihokeliakialle tyypillinen pienijyväinen IgA-kertymä papillaarisessa dermiksessä (Immunofluorescence 2010).

Ihon sidekudostaudeista yleisin on *lupus erythematosus*. Se on tauti, jossa potilaalla on autovasta-aineita DNA:lle ja tumen valkuaisaineille. Lupus on naisilla yleisempi kuin miehillä, ja sen oireina ovat erilaiset ihottumaläiskät tyypillisesti kasvolla ja ylävartalon alueella (kuvio 6). Diagnoosi perustuu kliiniseen kuvaan, IF-löydöksiin sekä vastaainetutkimuksiin. Hoitona käytetään aurinkosuoja- ja kortikosteroidivoiteita sekä aktiivisessa muodossa myös sisäistä kortikosteroidi- tai hydroksiklorokiinilääkitystä. (Reitamo 2007.)



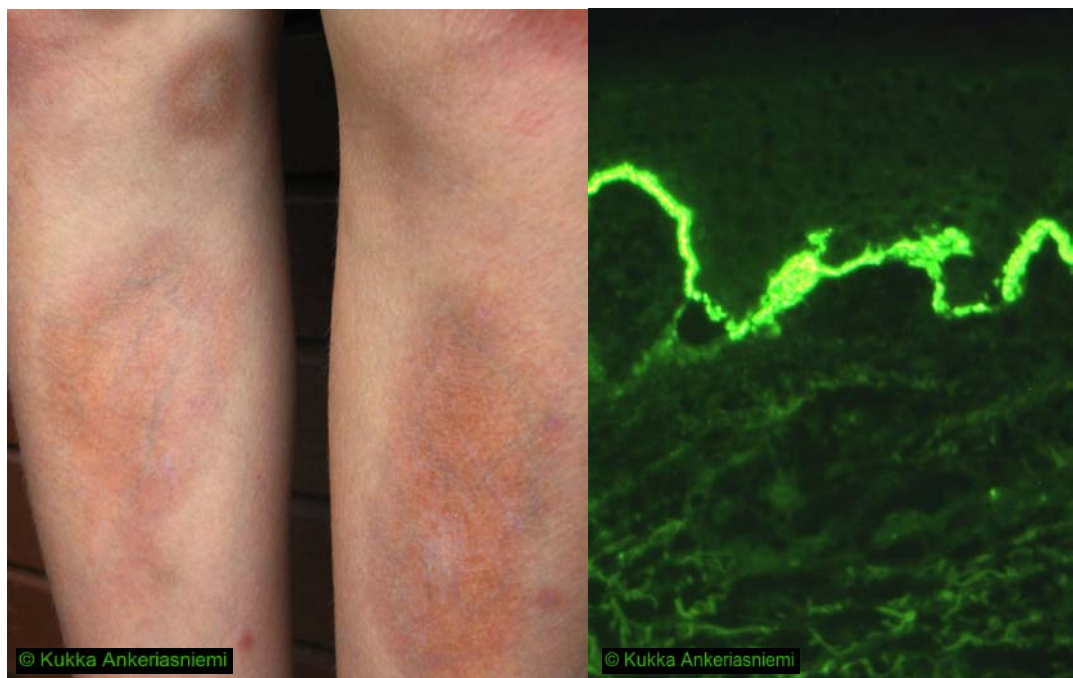
Kuvio 4. Vasemmalla: Lupus erythematosus (Reitamo 2007). Oikealla: Lupukseen liittyvä nauhamainen IgG-kertymä tyvikalvolla sekä tumavasta-ainekertymiä epidermiksessä (Histology 2006).

Lichen planus eli punajäkälä on melko yleinen iho- ja limakalvojen tulehduksellinen sidekudossairaus, jonka etiologiaa ei tunneta. Se voi alkaa missä iässä tahansa, useimmiten kuitenkin 20–60 vuoden iässä. (Hannuksela 2007.) Punajäkälä on krooninen tauti, jonka kesto on muutamasta kuukaudesta jopa vuosiin. Yleisimpänä oireena on 2–4 mm:n kokoinen tarkkarajainen papula, jotka ovat usein rykelmissä (kuvio 7). Papuloita on yleisimmin ranteissa, nilkoissa, pakaroissa, kyljissä ja ristiselässä. IF-löydöksenä on papillaaridermiksessä olevat kolloidikappaleet (*colloid body*). Ne ovat kuolleiden keratinosyyttien solunsisäisistä filamenteista syntyneitä tumattomia kappaleita, jotka sisältävät antigeenejä IgM ja C3 (Oikarinen – Tasanen-Määttä 2003: 12–18). Punajäkälää hoidetaan tavallisesti kortisonivoiteilla ja lääketieteellisellä valohoidolla (Hannuksela 2007).



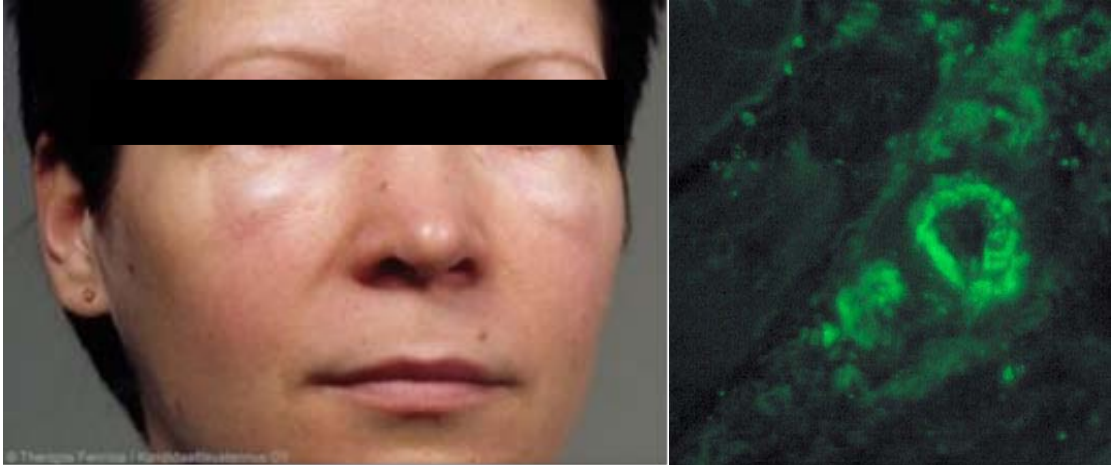
Kuvio 7. Vasemmalla: Lichen planus eli punajäkälä nilkassa (Hannuksela 2007). Oikealla: punajäkälälle tyypillinen kolloidikappalelöydös papillaaridermiksessä (Dermatology Services 2011).

Morfea on skleroderman eräs lokaalinen muoto. Se on ihon sidekudostauti, jonka yhteydessä kollageenin määrä lisääntyy ja verisuonet karsyvät. Iholle ilmestyy läiskäinen punoitus ja sen ympärille lilan värinen rengas. Myöhemmin rengas häviää, ja läiskä muuttuu ajan kuluessa keskeltä kovaksi ja kiiltäväksi (kuvio 8). (Hannuksela 2012b; Reitamo 2007.) Morfean syy on tuntematon, mutta suurimmassa osassa tapauksista sen on laukaissut jokin trauma (Yamanaka – Gibbs 1999: 29–32). Myös Borreliaosia on epäilty taudin syyksi (Hannuksela 2012b). Taudin immunohistokemiallinen diagnosointi on suhteellisen vaikeaa, sillä IF-löydöksenä nähdään vain joskus IgM tyvikalvolla (Huotari-Orava 2011a). Hoitona voidaan kokeilla kortikosteroidivoiteita, siklosporiinia ja UVA-valohoitoa (Reitamo 2007).



Kuvio 5. Vasemmalla: Morfean aiheuttamia ihomuutoksia säärissä. Oikealla: positiivinen immunofluoresenssi tyvikalvolla.

Dermatomyosiitissa iho-oireet esiintyvät kasvoissa silmien ympärillä ja poskissa. Siihen liittyy punoitusta, turvotusta sekä käsien ja kaulan alueella lilanpunertavia papuloita (kuvio 9). Lisäksi potilaalla voi esiintyä ihonalaisia kalkkikertymiä sekä lihasheikkoutta. Hoitona käytetään sisäistä kortikosteroidilääkitystä. (Reitamo 2007.) Dermatomyosiitin IF-löydöksenä on tyvikalvon heikko granulaarinen IgG, IgM ja C3. Lisäksi nähdään kolloidikappaleet (IgM ja IgA). (Huotari-Orava 2011a: 23.)



Kuvio 6. Vasemmalla: Dermatomyosiitin aiheuttamaa turvotusta silmien alapuolella (Reitamo 2007). Oikealla: C3-komplementtia kapillaarin seinämässä (Seidman 2011).

Immunofluoresenssitutkimuksella voidaan tutkia myös verisuonten seinämien tulehduksia eli vaskuliitteja. Varsinkin pienten suonten vaskuliiteissa erilaiset infektiot saattavat olla aiheuttavina tai laukaisevina tekijöinä. Käynnistyneen immuunivasteen seurauksena syntyy immuunikomplekseja, autovasta-aineita tai antigeenin ja vasta-aineen muodostamia komplekseja. Vaskuliitteja voidaan hahmottaa eri oireyhtymiksi niiden etiologian, laukaisevien infektioiden, potilaan iän, affinisoituvien suonten koon ja autovasta-aineiden perusteella. Tämän vuoksi myös oireiden vaikeusaste ja laaja-alaisuus vaihtelevat. (Konttinen 2007.) Pääasiassa pieniä verisuonia vaurioittava primaarinen vaskuliitti on Henoch-Schönleinin purppura. Se esiintyy lapsilla, ja sen laukaisee aiemmin sairastettu ylähengitystieinfektio. Iholla on punaisia, myöhemmin rusehtaviksi muuttuvia pilkkuja ja pallukoita, jotka aiheutuvat tulehtuneen verisuonen hajoamisesta (kuvio 10). (Suhonen – Cajanus 2007.) Tauti paranee itsestään, mutta saattaa uusiutua. Diagnoosi varmistetaan ihobiopsiasta, joissa löydöksenä on IgA kapillaarien seinämissä. (Konttinen 2007; Huotari-Orava 2011a: 23.) Kryoglobulinemia on kylmässä muodostuva vaskuliitti, jonka yhteydessä syntyy IgG- ja IgM-tyypin vasta-aineita sisältäviä patologisia immunokomplekseja. Nämä kryoglobuliinit sakkautuvat verisuonten seinämiin ja aiheuttavat purppuraa, ihonekroosia ja valkosormisuutta. (Pettersson – Karjalainen 2010: 1496–507; Konttinen 2007.)



Kuvio 10. Vasemmalla: Henoch-Schönleinin purppura sääriässä (Suhonen 2007). Oikealla: voimakasta IgA-kertymää ihokapillaarien seinämässä (Osman – McCreery 2000:69)

#### 4 Työmenetelmät

Opinnäytetyömme perustana on kahden IF-värjäysmenetelmän vertailu. Tutustumme yksityiskohtaisesti molempiin IF-värjäysmenetelmiin, niiden tutkimussisältöihin, menetelmien eroihin ja muihin vaatimuksiin, jotka johtavat onnistuneeseen värjäykseen. Osoitamme lisäksi mahdollisimman tarkasti ja puolueettomasti – sekä kustannus- että henkilöstöressurssien näkökulmasta – kannattaako VBM™-värjäysautomaattiin investoida nykyisellä IF-näytemäärällä.

Immunofluoresenssinäytteiden värjäys voidaan suorittaa ”perinteisellä” käsivärjäysmenetelmällä, sillä se ei ole itsessään monimutkainen. Se on nykyinen käytäntö YML patologian osastolla, mutta se on osoittautunut työlääksi ja aikaa vieväksi. Näytteiden valmistelu ja värjäys sitoo työpisteeseen yhden henkilön lähes koko päiväksi. Henkilömäärä on muutenkin rajallinen, ja henkilötyöpulan vuoksi perustyöt joudutaan monesti tekemään ylityönä. Menetelmässä käytetyt vasta-aineet on laimennettava käsin, mikä altistaa virheille. Lisäksi kaikki värjäyksessä tarvittavat puskuriliuokset valmistetaan YML:n välinehuollossa, mikä sitoo heidänkin työpanostaan.

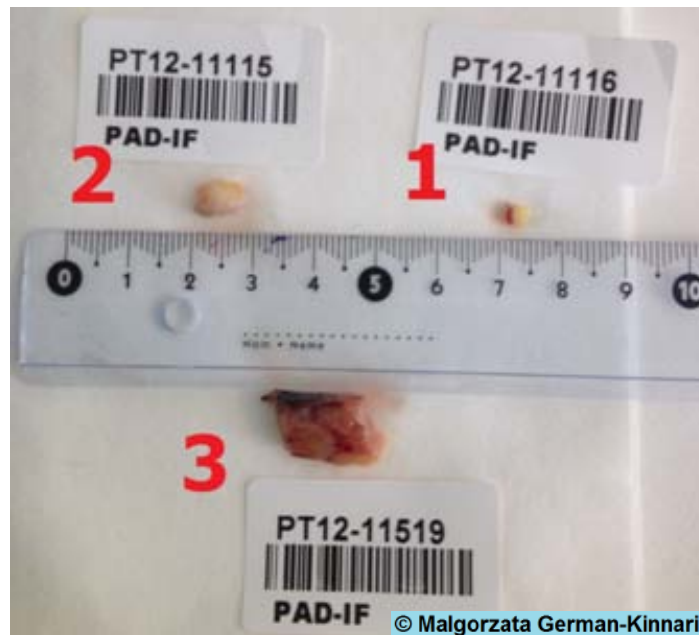
Kliinisissä laboratorioissa panostetaan nykyään automatisointiin, sillä automaatio säästää henkilöstön aikaa ja reagensseja. Automaation avulla saadaan tasalaatuisia lopputuotteita, laadun seuranta helpottuu ja työntekijöiden erilaisista työtavoista johtuva laa-



dunvaihtelu jää pois. (Boudreau 2010:2.) Testattavana värjäysautomaattina opinnäyte-työssämme on Rochen Ventana BenchMark™ system (VBM™) -värjäysautomaatti. Sen IF-värjäys on täysin automatisoitu ja sille tarkoitettut reagenssit ovat käyttövalmiita. VBM™-värjäysautomaatti on ollut Suomessa käytössä jo usean vuoden ajan, ja siitä on hyviä kokemuksia esimerkiksi HUSLABin Transplantaatiolaboratoriossa. VBM™-värjäysautomaatti on monikäyttöinen, sillä siihen voidaan ohjelmoida muitakin vaativia erikoisvärjäyksiä.

#### 4.1 Immunofluoresenssinäytteet ja niiden esikäsittely

Hyvälaatuinen biopsia on ehdoton edellytys näytteen värjäytyvyyden ja edelleen diagnoosin saamisen kannalta (Huotari-Orava 2011b: 25). Immunofluoresenssitutkimusta varten ihobiopsia otetaan tyypillisesti aivan tuoreen (pienen) rakkulan vierestä tai rakuloivan potilaan punoittavasta iholeesiosta (Ilvesaro 2011). Ihokeliakian diagnostiikassa ihobiopsia otetaan terveeltä iholta (Kuivanen – Jeskanen – Autio 2004: 765). Ihanteellinen biopsia on kooltaan noin 4 mm ja se on rakenteeltaan sopivan kiinteä ja napakka. Biopsian tulee olla otettu ihon koko syvyydeltä ihonalaiseen rasvakudokseen asti ja sen on sisällettävä ehjää epidermistä (katso myös kuvio 3: Ihon rakenne sekä kuvio 12: Jäädetytty ihobiopsia). (Kuivanen ym. 2004: 766.) YML patologian osastolle saapuvissa näytteissä on jonkin verran koon vaihtelua (kuvio 11).



Kuvio 7. Immunofluoresenssinäytteiden koon vaihtelua. Ihanteellinen biopsia on pieni ja kiinteä (1). Hieman suuremman ihonäytteen (2) leikkaaminen on jo haastavaa. Suuri leike (3) on ihon IF-tutkimusta ajatellen kelvoton, sillä se ei ole kunnolla fiksoitunut suuren kokonsa ja liian niukan fiksaatiivin vuoksi.

Näytteen suuri koko estää näytteen kunnollisen fiksoitumisen ja nopean jäätyksen, mutta se vaikeuttaa myös näytteen leikkaamista. Jos leike on huono, se ei myöskään värjäydy hyvin, jolloin leikkeen kokonaislaatu jää kehnoksi.

IF-tutkimusta varten otetut ihobiopsiat kuljetetaan tutkimuslaboratorioon mahdollisimman nopeasti tuoreena joko suolaliuoksessa tai erityisessä kuljetusnesteessä (Ilvesaro 2011). Formaliinin soveltuvuudesta IF-biopsioiden kuljetusnesteeksi on ristiriitaisia tuloksia. Abbott'n ym. (2010) mukaan formaliini rikkoo jääleikkeen antigeenin ja vasta-aineen välisiä sidoksia, eikä IF-värjäykseen tarkoitettu kudos saisi siksi altistua formaliinille. Kuitenkin formaliinifiksoiduista ja parafiiniprosessoiduista ihobiopsioista on onnistuttu tekemään diagnostisia IF-värjäyksiä (Ilvesaro 2011). YML patologian osasto käyttää Michel-liuosta kaikkien sinne saapuvien IF-näytteiden kuljetukseen ja säilytykseen. Michel-liuos ei ole varsinainen fiksaatiivi, joten sitä ei voi käyttää kuljetusliuoksena muille kuin IF-näytteille. Michel-liuoksen valmistusprosessi on pitkä, ja valmis liuos on käyttökelpoinen vain kaksi kuukautta jääkaapissa säilytettynä. IF-näytteitä säilytetään Michel-liuoksessa käytännössä joskus jopa kolme kertaa kauemmin kuin ohjeessa sallitaan. Usein syynä on näytteen pitkä toimitusaika laboratorioon sekä erityisesti se, että IF-näytteitä värjätään vain kerran viikossa.

Ihobiopsioiden säilyvyyteen liittyvää kirjallisuutta on vähän ja tulokset ovat ristiriitaisia. YML patologian osaston ohjekirjan mukaan IF-tutkimukseen tarkoitettu ihobiopsia säilyy Michel-liuoksessa 5 vrk +4 °C:ssa (IHC World 2011; Polysciences 2012; YML 2011), mutta näytteet kuljetetaan laboratorioon kuitenkin huoneenlämpöisinä. Vasta laboratorioissa näytteet siirretään jääkaappiin (+4 °C), jossa ne säilytetään tutkimuspäivään saakka. Huomioon otettava seikka on myös se, että nykyisen käytännön mukaan näytteet värjätään tiistaiamuisin, mikä johtaa siihen, että myöhemmin samana päivänä saapuvat näytteet värjätään vasta seuraavan viikon tiistaina. Näyte on lisäksi saatettu ottaa ennen viikonloppua, mikä on vastoin YML patologian antamia ohjeita. Tällöin näyte on ehtinyt olla Michel-liuoksessa jopa 10–12 vrk. Liian pitkä odotus ennen näytteen käsittelyä saattaa vaikuttaa näytteen laatuun. Lisäksi Michel-liuos on karsinogeeninen, ja sen työläs valmistaminen sitoo välinehuollon resursseja.

Edellä mainittujen seikkojen vuoksi esittelemme opinnäytetyössämme vaihtoehtoisen IF-näytteille tarkoitettun Histocon™-kuljetusliuoksen. Histocon™ on ollut käytössä vuodesta 1971 (Jonsson – Kristensson-Aas – Kutti 1978: 825). Sen pääominaisuudet ovat näytteen mikrobien kasvunesto, autolyysi- ja katalaasientsyymien inhibitio sekä sen

tuoma mahdollisuus suorittaa histologiset ja histokemialliset tutkimukset samasta näytteestä, myös jääleikkeiden valmistamisen jälkeen (Histocon 2000). Sen lisäksi Histocon™ on käyttövalmis, 500 ml astiassa toimitettava kuljetusliuos, jonka hinta on 32 euroa (Puomio 2012). Olemme myös selvittäneet, että Histocon™-liuosta on käytetty jo pitkään HUSLAB Transplantaatiolaboratoriossa ja siihen ollaan hyvin tyytyväisiä. Histocon™ nopeuttaa IF-näytettä varten otetun ihobiopsian prosessointia, eikä sitä tarvitse pestä pois. Tutkimusten mukaan Histocon™ säilyttää täydellisesti immunoglobuliinit, komplementin komponentit ja fibrinogeenin (Jonsson – Kristensson-Aas – Kutti 1978: 825), mutta näyte on leikattava viimeistään 48 h näytteenoton jälkeen ja kuljetuslämpötilan on oltava 0...+4 °C (Histocon 2000).

Näytteen saavuttua laboratorioon se numeroidaan QPati-järjestelmän mukaisesti ja pestään fosfaattipuskuroidussa NaCl-liuoksessa eli PBS-puskurissa (pH 7,6). Pesu kestää 10 minuuttia ja se suoritetaan kolme kertaa. IF-näytteet leikataan jäämikrotomilla. Valmiiksi jäädytetyn metallisen näyteistukan päälle lisätään Tissue-Tek OCT-compound -tukiainetta, jonka sisälle asetetaan tutkittava ihobiopsia. Näyte asetetaan tukiaineeseen kyljelleen siten, että koko ihobiopsia peittyy tukiaineella (kuvio 12). Samalla varmistetaan, että ihon kaikki kerrokset tulevat leikkeeseen. Tällä tavoin valmistettu näyte jäädytetään jäämikrotomin sisällä. On tärkeää, että jäädytys tapahtuu mahdollisimman nopeasti. Nopea biopsioiden jäädyttäminen ennen leikkaamista estää kudostuhoa ja vähentää siten vääriä negatiivisia tuloksia, joten sillä on suuri rooli laadukkaiden valmistusten saamisessa (Hladik – White 2008: 518). Jos jäädytys kestää kauan, kudospaloihin muodostuu suuria kiteitä, jotka rikkovat kudoksen (YML 2011). Jäädytetyistä näytteistä leikataan jäämikrotomilla 2–4 kpl 6 µm:n paksuisia leikkeitä Superfrost Plus -objektilasille. Leikkaaminen on lisäksi syytä tehdä huolellisesti, sillä repaleinen, kääntynyt tai reikäinen leike vaikeuttaa ja joskus jopa estää diagnoosin saamisen (Hladik – White 2008: 518).



Kuvio 8. Vasemmalla: kyljelleen asetettu ja jäädytetty ihobiopsia tukiaineessa metalli-istukassa. Huomaa biopsian kiilamainen muoto; vasemmassa reunassa on ihon pinta ja oikeassa reunassa näkyvä kiilan kärki ulottuu oikeaoppisesti subkutaaniseen rasvakerrokseen saakka. Pikkukuvassa havainnoidaan ihobiopsian rakennetta (vertaa kuvioon 3). Oikealla: näyteistukat jääleikemikrotomissa.

#### 4.2 Käsivärjäysmenetelmä

YML patologian osaston tähän saakka käytössä ollut IF-näytteiden värjäysmenetelmä on käsivärjäysmenetelmä (liite 1). Se tehdään tiistaisin, jolloin kaikki edellisen värjäyksen jälkeen saapuneet IF-näytteet leikataan ja värjätään. Näytteet esikäsitellään luvussa 4.1 esitetyn protokollan mukaisesti ennen värjäysprosessin aloittamista.

Käsivärjäys suoritetaan niille tarkoitetuissa telineissä, joissa voi värjätä 10 objektilasia kerrallaan. YML patologian osastolla on käytössä 5 telineitä, joten käytännössä on mahdollista värjätä kerralla 12 potilaan IF-näytteet. Käsimenetelmällä suoritettava IF-värjäys aloitetaan asettamalla objektilasit neljään eri telineeseen siten, että jokaisesta näytteestä tulee objektilasi kuhunkin telineeseen. Objektilasit huuhdellaan PBS-puskurissa (pH 8,0). Huuhtelun jälkeen objektilasit kiinnitetään yksitellen niille tarkoitettuihin inkubointikoteloihin ja nämä asetetaan kotelopidikkeeseen (kuvio 13). Kiinnityksessä on oltava huolellinen, sillä liian löysällä olevasta inkubointikotelosta puskurin huuhtoutuu pois liian nopeasti, kun taas liian kireällä olevassa kotelossa puskurin ei pysy liikkumaan. Samalla on huolehdittava siitä, että jokainen objektilasi tulee huuhdelluksi PBS-puskurilla useaan kertaan.



Kuvio 9. Vasemmalla: objektilasien laittoa inkubointikoteloihin. Oikealla: inkubointikotelot koteloidikkeessään.

Menetelmässä käytetään FITC-leimattuja jäniksestä peräisin olevia vasta-aineita: anti-IgA (Dako F0204), anti-IgG (Dako F202), anti-IgM (Dako F0203) ja anti-C3 (Dako F201) (YML 2011; FITC Anti IgA 2008; FITC Anti IgG 2008; FITC Anti IgM 2008; FITC Anti C3 2008). Ne laimennetaan 0,9-prosenttiseen NaCl-liuokseen ja tarvittava immunoglobuliinimäärä lasketaan taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. Immunoglobuliineista tehtävät laimennokset (YML 2011).

Vasta-aine	Objektilaseja, kpl	Immunoglobuliinia, $\mu$ l	NaCl, $\mu$ l
IgA (1:10)	6	100	900
	13	200	1800
	17	250	2250
IgG (1:20)	6	50	950
	13	100	1900
	17	125	2375
IgM (1:20)	6	50	950
	13	100	1900
	17	125	2375
C3 (1:50)	6	20	980
	13	40	1960
	17	50	1950

Jokaiseen inkubointikoteloon pipetoidaan 140  $\mu$ l laimennosta. Välittömästi pipetoinnin jälkeen kotelot peitetään ja niitä inkuboidaan valolta suojattuna 30 minuuttia. Värjätyt objektilasit pestään kahteen kertaan PBS-puskurilla (pH 8,0) muutaman minuutin ajan. Pesussa poistetaan sitoutumaton vasta-aine objektilasilta ja samalla poistetaan mah-

dollinen taustafluoresenssi. Värjättyjen objektilasien annetaan kuivahtaa valolta suojattuina pystyasennossa 5–10 minuuttia ja niiden päälle tiputetaan pisara Fluorescence Mounting Mediumia. Se on fluoresenssinäytteille tarkoitettu peitinaine, joka hidastaa fluoresenssin haalistumista säilyttäen sen tarkastelukelpoisena vähintään kuukauden ajan (Dako 2010). Peitinaineen päälle asetetaan peitinlasi. Valmiit objektilasit säilytetään pimeässä kylmähuoneessa (+5...+8 °C) seuraavaan päivään asti, jolloin ne toimitetaan patologille tutkittavaksi.

#### 4.3 Roche Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatti

Roche Ventana BenchMark™ system (VBM™) on värjäysautomaatti, jolla voi suorittaa immunohistokemiallisia, hybridisaatio *in situ*- ja IF-värjäyksiä histologisista kudosteikkäistä (Ventana 2010: 4) (kuvio 14). Se sisältää neljä yksikköä: värjäys- ja nesteyksiköt sekä jätesäiliön ja ohjauskeskuksen. Värjäysyksikössä on 20 lasi- ja 25 reagensipaikkaa. Nesteyksikkö sisältää 7 kanisteripaikkaa pesu- ja laimennusliuoksille. Ohjauskeskuksessa on LCD-näyttö, Pentium-pohjainen keskusyksikkö, väritulostin sekä viivakooditulostin EBAR™. VBM™-värjäysautomaatin toiminta perustuu sille luotuihin värjäysohjelmiin sekä näytekohtaisiin viivakooditarroihin, joiden avulla laite tarkistaa tarvittavien reagenssien saatavuuden ja käynnistää halutun värjäystoiminnan. (Ventana 2010: 3.)



Kuvio 10. Roche Ventana BenchMark™ system -värjäysautomaatti.

VBM™-värjäysautomaatti värjää yhdellä kerralla 1–20 objektilasia, ja koko prosessi kestää objektilasien lukumäärästä riippumatta noin 43 minuuttia. Jokaisesta IF-näytteestä värjätään 4 objektilasia, joten laitteeseen mahtuu viiden potilaan IF-näytteet. VBM™-värjäysautomaatilla suoritettavaan IF-värjäykseen käytetään pääasiassa valmiita reagensseja, joista tärkeimmät ovat FITC-leimatut anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM ja anti-C3. Ne ovat vuohesta peräisin olevia käyttövalmiita vasta-aineita, eivätkä ne vaadi laimennusta. Yhdessä annostelijassa oleva vasta-ainemäärä riittää 50 objektilasin värjäykseen. Reaktiopuskuri laimennetaan puhdistetulla laboratoriovedellä suhteessa 1:10. Värjäysprosessin aikana käytetään myös LCS-mineraaliöljyä (Liquid Coverslip™), joka muodostaa näytelasin päälle pienen reaktiokammion. LCS minimoi tarvittavien reagenssien määrän ja estää objektilasin kuivumisen värjäyksen aikana. Laitteen automaattiseen pesuun käytetään EZ Prep™ -konsentraattiliuosta, joka laimennetaan puhdistetulla laboratoriovedellä suhteessa 1:10.

Immunofluoresenssinäytteiden automaattivärjäys aloitetaan objektilasien koodaamisella. Onnistuneeseen värjäykseen tarvitaan objektilaseja, joissa on positiivinen varaus. VBM™-värjäysautomaatti on suunniteltu Superfrost® Plus -laseille. Muut lasit voivat aiheuttaa ongelmia esimerkiksi viivakooditarran tartumisessa ja puskurien toiminnassa (BenchMark Operator Manual 2009: 3). Ohjauskeskuksesta avataan oikea IF-värjäyksen ohjelma (liite 2), jonka mukaan tulostetaan tutkittavalle näytteelle neljä tarraa – jokaiselle vasta-aineelle omansa. Viivakooditarra kiinnitetään lasin mattapäähän siten, että viivakoodi on lasin yläreunan suuntaisesti. Viivakoodin tehtävänä on toimia halutun värjäyksen ja ohjelman tunnisteena, mutta tarra sinällään estää myös reagenssien valumisen objektilasilta värjäysprosessin aikana (BenchMark Operator Manual 2009: 3). Valmiit objektilasit kiinnitetään laitteeseen huolellisesti siten, että niiden viivakoodipäät tulevat laitteen keskustaa kohti. Seuraavaksi vasta-aineadapterit kiinnitetään karuselliin ja laite käynnistetään. Ohjauskeskus pyytää varmistamaan, ovatko kaikki tarvittavat reagenssit paikoillaan sekä ilmoittamaan, kuinka monta objektilasia laitteessa on. Laite tarkistaa objektilasien ja reagenssien viivakoodit, sekä vastaavatko objektilasien lukumäärä ja reagenssien tiedot ilmoitettuja tietoja. Tämän jälkeen värjäysprosessi käynnistyy.

Värjäysohjelman mukaiset inkubaatiovaiheet tapahtuvat tarkoin määritellyssä lämpötilassa ja aikataulussa. Reaktiot pysäytetään automaattisesti pesun avulla jokaisen inkubaatiovaiheen lopussa. Tällöin sitoutumaton vasta-aine huuhtoutuu objektilasilta, mikä vähentää taustafluoresenssia.

Käyttöoppaan (Ventana 2010: 4) mukaan VBM™-värjäysautomaatilla on neljä uudenlaista järjestelmää, jotka parantavat reaktion dynamiikkaa sekä tekevät värjäyksestä laadukasta ja luotettavaa käsivärjäykseen verrattuna. Ilmasekoittaja varmistaa reagenssien tasaisen jakautumisen objektilasilla, parantaa reaktion kinetiikkaa ja lyhentää reaktioaikaa. Mineraaliöljy minimoi tarvittavien reagenssien määrän ja estää lasien kuivumisen. Puskuroitu pesuohjelma eliminoi manuaalisen pesun tuoman vaihtelevuuden ja vähentää taustafluoresenssia. Lämmönjakojärjestelmä varmistaa lämmön tasaisen jakautumisen objektilasilla ja parantaa reaktion kinetiikkaa.

Värjäysohjelman päätyttyä objektilasit poistetaan laitteesta. Ne huuhdellaan juoksevilla vedellä ja astianpesuaineella, mikä poistaa niistä mikroskopointia häiritsevän mineraaliöljyn. Objektilasien annetaan kuivahtaa pystyasennossa 5–10 minuuttia, minkä jälkeen niiden valmistelu mikroskopointia varten jatkuu samalla tavoin kuin käsivärjäysmenetelmän jälkeen.

#### 4.4 Objektilasien tutkiminen

Leikkeiden sijainti merkitään objektilasille patologin työn helpottamiseksi. Värjätyt objektilasit säilytetään pimeässä ja viileässä seuraavaan päivään saakka, jolloin ne toimitetaan esitietoineen patologille. Patologi tutkii objektilasit fluoresenssimikroskoopilla ja antaa niistä lausunnon (taulukko 2). Hän tutkii näytteestä valmistetuilta objektilaseilta ihon eri rakenteet ja merkitsee taulukkoon fluoresenssituloksen. Vastausvaihtoehdot ovat negatiivinen (–), epävarma (+/) ja positiivinen (+). Patologi ilmoittaa tyvikalvon fluoresenssin osalta, onko se lineaarinen vai granulaarinen. Lisäksi patologi antaa tuloksesta aina kirjallisen lausunnon.

Taulukko 2. IF-näytteiden vastaamiseen käytettävä taulukko.

Sijainti	IgA	IgG	IgM	C3
Tyvikalvo				
Soluvälit				
Tumat				
Kapillaarit				
Colloid bodit				



#### 4.5 Ihobiopsioiden varastointi

Laboratorion työohjeen (YML 2011) mukaan ihobiopsian loppuosa, eli se osa biopsiasta, joka jää yli leikkeiden valmistuttua, sulatetaan huoneenlämpöön ja siirretään alkupe räiseen näyteputkeen. Nämä putket varastoidaan mahdollista lisäpyyntöä varten pakastettuina  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa tukiaineen (OCT Compound) ympäröimänä yhden kuukauden ajan. Lisäpyynnöt ovat hyvin harvinaisia. Niitä tehdään pääasiassa silloin, jos näyte on leikattu huonosti; leikkeessä on oltava näkyvillä kaikki ihon kerrokset, jotta diagnoosi voidaan antaa. Näytteiden säilyttäminen  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa ei perustu kirjallisuudessa esitettyihin tietoihin. Toistuva sulatus ja hidas pakastaminen aiheuttavat jään kiteytymistä, mistä seuraa kudismorfologian vääristymistä. Lisäksi antigeenin sitoutumiskohdan rakenne saattaa vaurioitua, jolloin antigeenin ja vasta-aineen välistä reaktiota ei tapahdu, ja tulos on virheellisesti negatiivinen. Kerran pakastetut näytteet voidaan säilyttää sulattamattomina syväjäädetytinä (alle  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa) ilmatiiviissä muovipussissa. (Hladik – White 2008: 517–518.) Laboratorion säilytystavan ja kirjallisuuden välisen ristiriitaisuuden vuoksi tutkimme opinnäytetyössämme YML patologian osastolla tällä hetkellä olevan säilytystavan toimivuutta.

#### 4.6 Henkilöstönäkökulma ja kustannukset

Ammattitaitoinen ja osaava työvoima on jokaisen liikeyrityksen suuri voimavara. Tiukka työaikataulu ja henkilöstön niukkuus lisää stressiä, mikä vaikuttaa työilmapiiriin negatiivisesti. Mikäli työntekijöiden määrä on liian pieni, stressin määrä kasvaa erityisesti silloin, kun osa työntekijöistä on sairaana. Tämän tyyppiset tilanteet ovat erittäin kuormittavia koko työyhteisölle, mikäli niihin ei pystytä vastaamaan. (Alhola – Lauslahti 2000: 334; Työturvallisuuskeskus 2012.)

YML patologian osaston henkilöstöresurssit ovat rajalliset. Osastolla on seitsemän kokopäiväistä työntekijää, jotka ovat sijoittuneet kuuteen työpisteeseen. Tiistaisin työpisteiden lukumäärä nousee IF-värjäyksen vuoksi seitsemään, sillä IF-näytteiden valmistelu ja värjäys sitovat yhden henkilön kokopäiväisen työajan. Osaston ryhmävastaava voi tarvittaessa auttaa päivittäisten rutiinitehtävien suorittamisessa, mutta tästä huolimatta suuri näytemäärä aiheuttaa usein tilanteen, jossa normaalit, työpäivään kuuluvat tehtävät joudutaan tekemään ylitöinä. Poikkeustilanteet, kuten yllättävät sairauspoissaolot, aiheuttavat suuria paineita muille työntekijöille. Lisäksi värjäysprosessi sisältää monta huuhtelu-, pesu- ja inkubointivaihetta, joten tekijän on oltava aina fyysisesti läs-

nä eikä hän voi irrottautua muihin työtehtäviin. Käsivärjäys vaatii suorittajalta tarkkuutta ja keskittymistä, kun taas värjäysautomaatti säästää tekijän aikaa ja estää eri tekijöistä johtuvia inhimillisiä virheitä. Värjäysautomaatti takaa värjäyksen korkean laadun ja sen toistettavuuden jokaisen värjäysprosessin aikana. (Ventana 2010: 2.) Näiden seikkojen vuoksi kiinnitimme opinnäytetyössämme huomiota eri menetelmillä tehtyjen värjäysten vaatimaan aikaan sekä selvitimme, vähentääkö VBM™-värjäysautomaatti IF-värjäykseen tarvittavia henkilöstöresursseja.

Kustannusnäkökulmat ovat yksi suurimmista investointipäätökseen vaikuttavista tekijöistä. Ihmisten tieto ja taito kehittyvät jatkuvasti, minkä ”sivutuotteena” kehitetään lukuisilla osa-alueilla uusia automaatteja. Tätä pidetään itsestään selvänä, sillä jatkuvaa kehitystä seuraa henkilöstön työpanoksen pienentäminen, ajansäästö ja usein myös huoli ympäristöstä. Toisaalta on pakko muistaa, että uusien laitteiden hankintakustannukset voivat olla liian suuria. Jokaisessa yrityksessä uuden laitteen hankinnasta päätetään hallituksessa, ja jokainen suuri ostos budjetoidaan etukäteen. Tämän vuoksi kustannuslaskenta on välttämätöntä. Jukka Pellisen (2006: 74) mukaan kustannuslaskennassa on kyse käyttökelpoisen tiedon tuottamisesta siten, että mitataan tietyn toiminnan kustannukset. Hänen mukaansa tämä edellyttää sitä, että kustannustiedolla on käyttäjiä sekä jokin tarkoitus, johon sitä käytetään. Kustannuslaskennassa otetaan huomioon erityisesti oston tai palvelun hankkimisen kannattavuus. Kannattavuuden määritelmä ei ole kuitenkaan yksiselitteinen. Perinteisesti sillä tarkoitetaan kykyä tuottaa positiivista tulosta määrätyn jakson aikana (Alhola – Lauslahti 2000: 51).

Palveluyrityksen toiminnan kannattavuus riippuu siitä, saako se riittävästi palveluiden laatuun ja erityisesti hintatasoon tyytyväisiä asiakkaita (Jyrkkiö – Riistama 2001: 80). Kustannukset voidaan jakaa muuttuviin ja kiinteisiin kustannuksiin. Muuttuvat kustannukset riippuvat tuotannon tai myynnin määrästä ja niihin lasketaan muun muassa raaka-aineiden saatavuus ja hinnat. Kiinteät kustannukset eivät riipu tuotannon määrästä, vaan tuotannon ylläpidosta. Perinteisiin kiinteisiin kustannuksiin kuuluvat vuokrat, vakuutusmaksut ja palkat. Kokonaiskustannuksen määrä saadaan lasketuksi muuttuvien ja kiinteiden kustannusten summasta. (Alhola – Lauslahti 2000: 55–57.)

#### 4.7 Tilastollinen analysointi

Menetelmän herkkyys tarkoittaa diagnostisessa kokeessa saatujen oikeiden positiivisten tulosten osuutta kaikista sairaista tutkittavista, joiden osalta tuloksen pitäisi olla positiivinen. Se tarkoittaa todennäköisyyttä, jolla sairas todetaan sairaaksi. (Duodecim 2011.) Herkkyys määritetään vertaamalla menetelmän tuloksia referenssimenetelmän tuloksiin. On otettava huomioon, että immunofluoresenssinäytteille ei ole referenssimenetelmää. Lisäksi kontrollinäytteiden saaminen immunofluoresenssinäytteille on erittäin vaikeaa, sillä jokaiselle testattavalle antigeenille tarvitaan erillinen näyte. Kaupallisia kontrollinäytteitä ei ole tarjolla, vaan jokaisen IF-näytteitä värjäävän laboratorion olisi valmistettava ne itse. Tätä vaikeuttaa se, että samassa kontrollileikkeessä olisi hyvä olla mukana sekä värjäytymätön negatiivinen alue että eritasoisia positiivisia alueita. (Lintunen 2012.)

McNemar-testi on riippuvien otosten testi, joka sopii käytettäväksi kaksiarvoisten, luokka-asteikollisten muuttujien kanssa. Nollahypoteesina ( $H_0$ ) on, että kahden muuttujan välillä ei ole eroja. Vaihtoehdohypoteesi ( $H_1$ ) voi olla joko kaksisuuntainen eli muuttujat poikkeavat toisistaan ( $\theta \neq \theta_0$ ), tai yksisuuntainen, jolloin muuttujien eron suunta voidaan saada selville havaintoaineistosta ( $\theta > \theta_0$  tai  $\theta < \theta_0$ ). (Taanila 2012.)

## 5 Työtä ohjaavat kysymykset

Opinnäytetyömme syntyi toimeksiantajamme tarpeesta selvittää ihonäytteiden immunofluoresenssin käsivärjäysmenetelmän ja VBM<sup>TM</sup>-värjäysautomaatin välisiä eroja. Työmme on monivaiheinen, joten helpottaaksemme prosessin organisoimista rakensimme työtämme ohjaavat tutkimuskysymykset. Selvitämme mahdollisimman perusteellisesti sekä käsivärjäysmenetelmällä että VBM<sup>TM</sup>-värjäysautomaatilla värjäytyjen valmisteiden laadun, leikkeiden ja ihobiopsioiden optimaalisen säilytysympäristön sekä työsuorituksiin vaadittavan ajan. Koska kyseessä on mahdollisesti uuden laitteen hankinta, haluamme osoittaa myös tämän päätöksen kannattavuuden. Lisäksi opinnäyteprosessin aikana kiinnitämme huomiota kaikkiin tarkkuutta vaativiin, inhimillisille virheille altistaviin kohtiin ja teemme suunnitelman laboratorion IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleen organisoimisesta. Opinnäytetyömme kautta haemme vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

1. Kuinka käsivärjäysmenetelmä ja VBM™-värjäysautomaatti eroavat toisistaan suhteessa
  - a. herkkyyteen?
  - b. leikkeiden värin laatuun?
  - c. fluoresoivan värin säilyvyyteen?
  - d. työpanokseen käytettävään aikaan?
2. Kumpi värjäysmenetelmä on
  - a. käyttökustannuksiltaan edullisempi?
  - b. monipuolisempi sekä henkilöstön kannalta mieluisampi ja käyttökel-  
poisempi?
3. Voidaanko laboratorion IF-näytteiden laboratorioprosessia parantaa
  - a. ihobiopsioiden kuljetuksen ja säilytyksen osalta?
  - b. leikattujen ihobiopsianäytteiden varastoinnin osalta?
  - c. IF-näytteiden värjäysprosessin osalta?

## 6 Opinnäytteen suoritus

Opinnäytetyömme koostuu käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin vertailusta herkkyyden, värin laadun, värin säilyvyyden ja kustannusten osalta sekä menetelmien erojen arvioinnista henkilökuntatarpeen näkökulmasta. Aloitimme opinnäytetyöprosessin keväällä 2012, jolloin keskustelimme ylilääkäri Tuula Kuukasjärven kanssa ja jäsensimme työaiheemme. Suoritimme opinnäytetyömme käytännön osuuden YML patologian osastolla 12.3.–17.4.2012. Pidimme sitä ennen suunnittelupalaverin Rochen laite-edustajan kanssa, jossa sovimme laitteen käyttökoulutuksesta, laina-ajasta ja muista käytännön asioista. Käyttökoulutuksessa kävimme läpi laitteen rakenteen, toimintaperiaatteet, reagenssien käyttöönottoimenpiteet, värjäysprotokollien ohjelmoinnit, värjäyksen suorittamisen sekä päivittäishuollot.

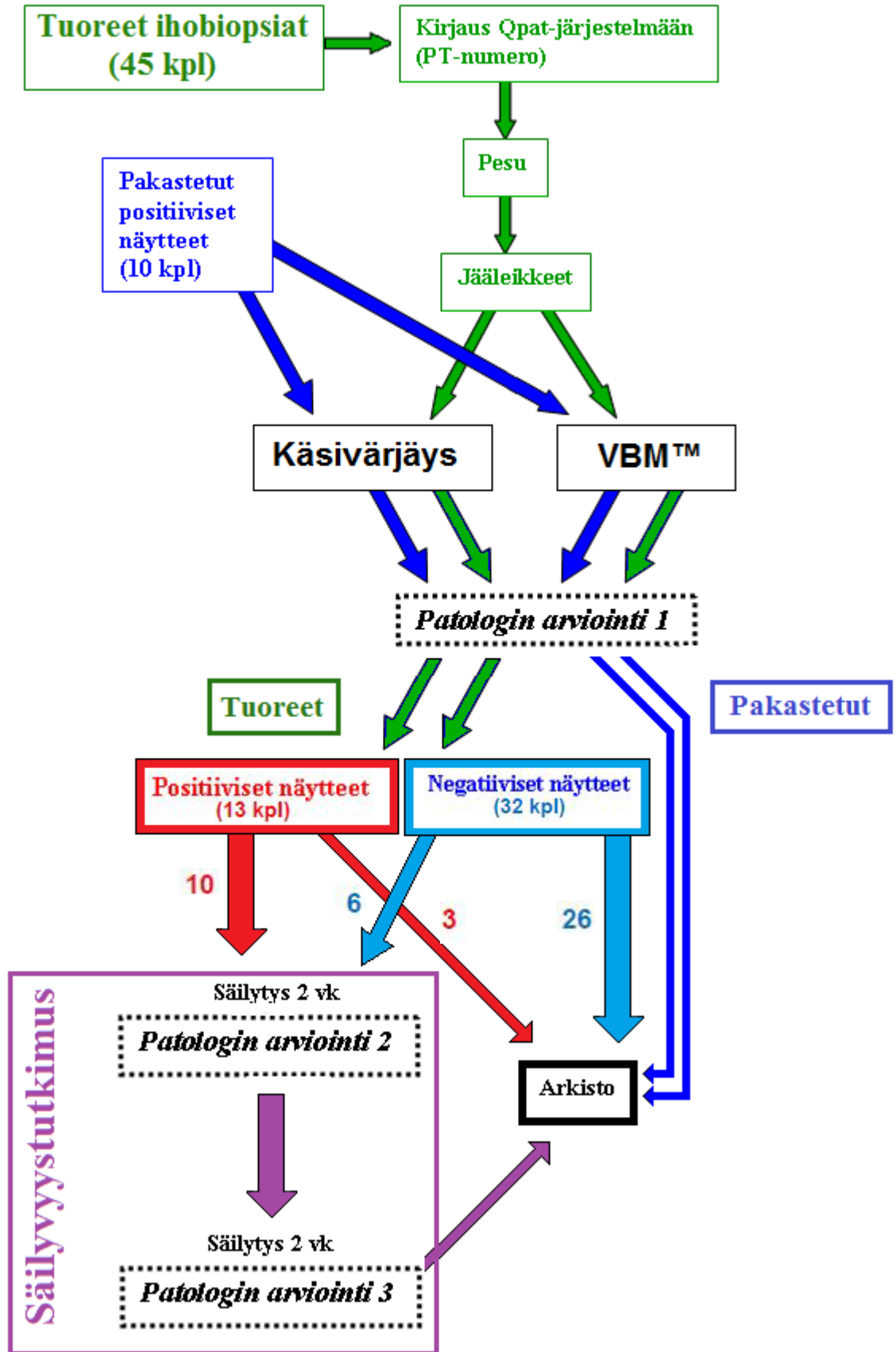
Varsinaiset opinnäytetyöhömmme liittyvät värjäykset suoritimme kaksi kertaa viikossa, maanantaisin ja torstaisin. Värjäsimme samat näytteet sekä käsivärjäysmenetelmällä että VBM™-värjäysautomaatilla. Värjäystä seuraavana päivänä patologi määrittä fluoressivärin laadun vastauslomakkeen mukaisesti (liite 3). Opinnäytetyössämme vertasimme menetelmien herkkyyttä eli sitä, kummalla menetelmällä värjätyistä objektilaseista löytyi herkemmin positiivinen fluoresenssi. Menetelmien kustannuseroja vertai-

limme salassapitosääntöjen vuoksi suhdelukujen avulla, kun taas henkilöstönäkökulmia vertailimme menetelmien vaatiman ajan suhteen sekä henkilöstön omien mielipiteiden avulla. Säilyvyystutkimuksessa kaikki positiiviset sekä kolme negatiivista objektilasia säilytettiin kaksi ja neljä viikkoa, minkä jälkeen fluoresenssivärin laatu määritettiin uudestaan. Henkilöstötarpeita unohtamatta tarkastelimme kyselyn avulla molempien menetelmien työvaiheiden kestoa sekä selvitimme henkilöstön mielipiteitä laitteen käyttökelpoisuudesta.

Laboratorion toiminnan uudelleenorganisointia varten selvitimme IF-näytteiden värjäysprosessin parannusmahdollisuuksia, myös siinä tapauksessa että YML:n johto ei puolla värjäysautomaatin hankkimista. Sitä varten tutkimme ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysajan vaikutusta fluoresenssivärin laatuun ja etsimme vaihtoehdoisen kuljetus- ja säilytysliuoksen. Mietimme lisäksi toimenpiteitä, jotka helpottaisivat laboratorion päivittäistä työkuormaa sekä sitä, miten leikatut ihobiopsiat kannattaisi varastoida IF-tutkimuksen jälkeen.

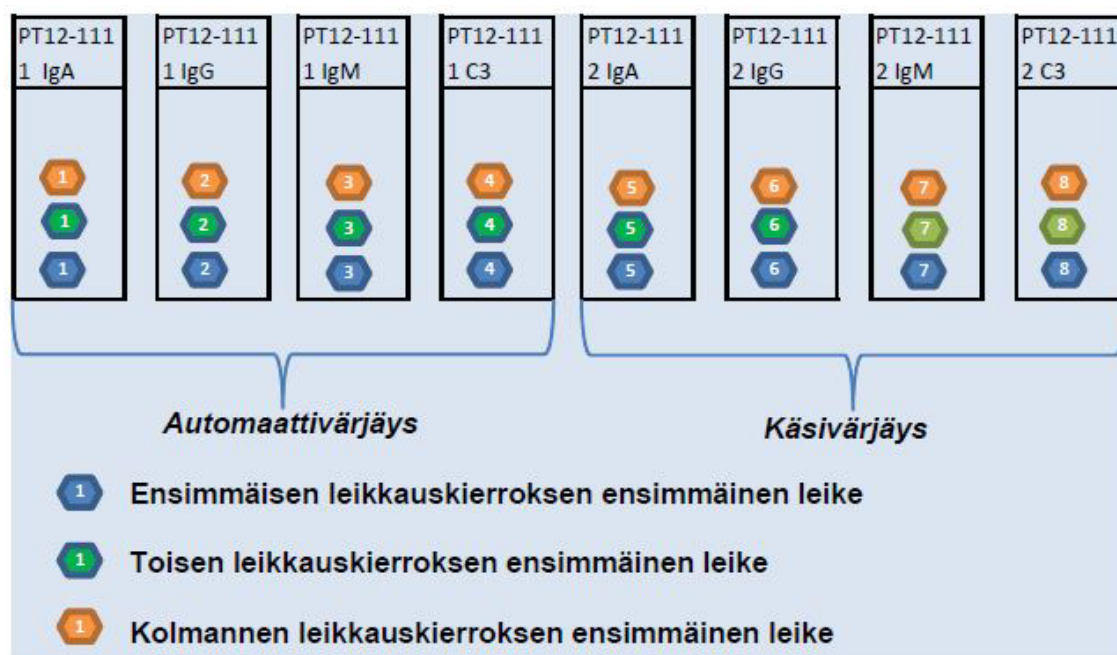
## 6.1 Näyttemateriaali

Opinnäytetyömme aineisto muodostui kaikista niistä ihobiopsianäytteistä, jotka lähetettiin YML patologian osastolle tutkimusjakson aikana (6.3.–17.4.2012). Näytteitä tutkittiin yhteensä 45 kpl. Kaikki näytteet numeroitiin QPati-järjestelmän mukaisesti ja niille tallennettiin lähettäjän tiedot sekä näytteen esitiedot, erityisesti diagnoosiepäilyn osalta. Lisäksi näytteinä oli kymmenen aiemmin positiiviseksi diagnosoitua näytettä, joita oli säilytetty pakastettuina (-23 °C:ssa). Työn objektiivisuuden varmistamiseksi koodasimme kaikki valmisteet juoksevalla numerolla, jotta patologi ei tietäisi, kummasta värjäysmenetelmästä on kyse. Opinnäytetyössämme emme tarvinneet tutkimuslupaa, sillä emme käsitelleet lainkaan potilastietoja. Lisäksi keräämämme aineisto koostui näytteistä, jotka olisi joka tapauksessa tutkittu laboratoriossa. Työmme vaiheet IF-näytteiden osalta etenivät kuvion 15 mukaisesti.



Kuvio 15. IF-näytteiden käsittelyvaiheiden prosessikaavio opinnäytetyössämme.

Opinnäytetyötämme varten teimme jokaisesta saapuneesta ihobiopsiasta kahdeksan valmistetta, kaksi jokaista vasta-ainetta varten. Ensimmäisellä leikkauskierroksella leikkasimme kullekin objektilasille yhden leikkeen. Tämän jälkeen toistimme kierroksen niin monta kertaa, että objektilaseilla oli tarpeeksi leikkeitä (kuvio 16). Lopputuloksena saimme valmisteen, jossa näytteen leikkeet oli otettu eri syvyyksiltä. Erottelimme objektilasit eri värjäysmenetelmille siten, että jokaisesta näytteestä värjäsimme neljä valmistetta (vasta-aineet IgA, IgG, IgM ja C3) käsivärjäysmenetelmän ja toiset neljä valmistetta VBM™-värjäysautomaatin avulla.



Kuvio 16. Immunofluoresenssinäytteiden leikkaaminen objektilaseille.

## 6.2 Immunofluoresenssivärjäysten suoritus

Aloitimme värjäysprosessin aina automaattimenetelmällä. Siinä vaiheessa kun automaattiohjelma käynnistyi, siirryimme käsivärjäykseen. Huuhtelimme objektilasit käsivärjäyksen jälkeen PBS-liuoksella, minkä jälkeen kiinnitimme objektilasit yksitellen niille tarkoitettuihin inkubointikoteloihin. Lisäsimme objektilaseille ohjeen mukaan valmistetut vasta-aineet ja inkuboimme niitä valolta suojattuina huoneenlämmössä 30 minuutin ajan.

Automaattimenetelmällä värjätyt näytteet valmistuivat sillä aikaa kun käsivärjäysmenetelmällä värjätyt objektilasit olivat inkuboitumassa. Automaattiohjelman jälkeen pesimme värjätyt objektilasit astianpesuaineella ja juoksevalla vedellä. Jos näytteitä oli enemmän kuin viisi, toistimme automaattivärjäysprosessin. Kolmessa tapauksessa suoritimme värjäysohjelman kahdesti ja yhdessä tapauksessa kolmesti. Näissä tapauksissa tarroitimme kuitenkin kaikki objektilasit samalla kerralla. Suurimman osan lopputoimenpiteistäkin teimme vain yhden kerran. Jokaisen värjäysohjelman jälkeen huuhtelimme objektilasit ja siirsimme seuraavat objektilasit värjäysautomaattiin.

Käsivärjäysmenetelmällä värjätyt objektilasit huuhtelimme inkuboinnin jälkeen PBS-liuoksella. Tästä eteenpäin molempien värjäysmenetelmien jatkotoimenpiteet olivat samat. Siirsimme huuhtelemamme objektilasit telineisiin ja annoimme niiden valua pystyasennossa 5–10 minuuttia. Seuraavaksi tiputimme objektilaseille pisaran Fluorescence Mounting Mediumia ja peitimme leikkeet peitinlasilla. Työohjeen (YML 2011) mukaan valmistaiden annetaan täysin kuivua (vähintään 2 h) ennen peittämistä, mutta tähän menettelyyn emme löytäneet perusteita. Otimme selvää muiden laboratoriodien käytännöistä ja päädyimme peittämään valmisteet vielä kosteina, 5–10 minuutin valuksen jälkeen. Seuraavaksi piirsimme objektilasien pohjalle ympyrän, jonka avulla patologi saattoi helposti löytää leikkeet objektilasilta. Leikkeet ovat värittömiä, läpinäkyviä ja siten paljain silmin hankalia löytää, varsinkin fluoresenssimikroskooppia varten pimennetyssä huoneessa. Siirsimme objektilasit kuljetuskoteloihin siten, että saman potilaan IF-näytteistä valmistetut kahdeksan objektilasia olivat peräkkäin antigeenien mukaisessa järjestyksessä. Tällä tavalla valmistetut objektilasit veimme kylmähuoneeseen (+5...+8 °C), jossa ne kuivuivat yön yli. Seuraavana päivänä toimitimme objektilasit, vastauslomakkeet ja potilaan esitietoja sisältävät lähetteet tutkittaviksi patologi Susanna Virolaiselle.

### 6.3 Menetelmien herkkyyden määrittäminen

Patologi tutki kaikista IF-näytteistä (N=55) valmistetuilta objektilaseilta fluoresenssituloksen ja vastasi sen joko positiivisena, negatiivisena tai epäselvänä (+/-). Näytteitä tutkiessaan patologi täytti vastauslomakkeen (liite 3), jonka tiedot kirjasimme Excel-ohjelmaan ja analysoimme SPSS-tilasto-ohjelmalla. Vertasimme McNemarin testin avulla menetelmien välisiä herkkyyseroja. Vertailupareina olivat saman potilaan näytteet, jotka värjäsimme samalla vasta-aineella mutta eri värjäysmenetelmää käyttäen. Herkkyyden määrittämistä varten otimme mukaan vain ne vertailuparit, jotka olivat ai-



nakin toisen värjäysmenetelmän kohdalla saaneet positiivisen tuloksen. Patologin toteaman epäselvän tuloksen luokittelimme negatiiviseksi, koska sillä ei ole diagnostista merkitystä.

#### 6.4 Valmisteiden värin laadun arviointi

Diagnostisen lausunnon lisäksi patologi arvioi opinnäytetyötämme varten objektilasien teknisen onnistumisen ja leikkeiden fluoresenssivärin laadun. Tekninen onnistuminen arvioitiin leikkeen repaleisuudesta ja ihon rakenteiden näkymisestä, ja patologi otti ne huomioon arvioidessaan sitä, voiko diagnoosia antaa. Värin laadun arvioinnin perustana oli värin tasaisuus sekä sameuden, taustafluoresenssin ja väriartefaktan kvalitatiivinen, subjektiivinen arviointi asteikolla ”hyvä” (1) tai ”huono” (2). McNemarin testin avulla selvitimme, kummalla värjäysmenetelmällä saadaan parempi värin laatu. Vertailupareina olivat saman potilaan näytteet, jotka värjäsimme samalla vasta-aineella mutta eri värjäysmenetelmää käyttäen.

#### 6.5 Fluoresenssin säilyvyyden arviointi

Vertailimme värjäysmenetelmien välisiä eroja fluoresenssivärin säilyvyyteen nähdessä McNemarin testillä. Vertailuparit olivat saman potilaan näytteet, josta valmistetut objektilasit värjäsimme samalla vasta-aineella mutta eri värjäysmenetelmää käyttäen. Säilytimme tuoreista positiivisista näytteistä (N=10) sekä negatiivisista näytteistä (N=6) valmistetut objektilasit kylmähuoneessa (+5...+8 °C). Lähetimme ne patologille uudelleen tutkittaviksi kahden ja neljän viikon kuluttua värjäyksestä (kuvio 17). Selvitimme näiden objektilasien avulla, onko menetelmien välillä eroja fluoresenssin laadussa, kun värjättyjä objektilaseja on säilytetty kaksi tai neljä viikkoa.

#### 6.6 Henkilöstönäkökulmat ja kustannukset

Mittasimme molempien menetelmien yhteydessä jokaisen työvaiheen keston. Laskimme tämän avulla yhden näytteen värjäämiseen keskimäärin kuluvan ajan ja päättelimme, säästäisikö VBM™-värjäysautomaatti henkilötyöaika nykyisillä näytemäärillä. Teimme huomioita molempien menetelmien kohdalla tarkkuutta vaativista ja virheille altistavista kohdista. Opinnäytetyötä varten laatomme kustannuslaskelmat perustuvat tärkeimpien tarvikkeiden ja reagenssien hintoihin sekä laskemiimme näytekohtaisiin

kustannuksiin. Rochen® hinnat ovat kuitenkin asiakaskohtaisia, ja ne ovat myös liikesalaisuuden piirissä. Olemme YML patologian osaston sekä Rochen® kanssa sopineet, että emme laita hintatietoja näkyville opinnäytetyössämme. Sen sijaan esitämme suhdelukuja vertailemaan käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välisiä kustannuseroja. Kustannuslaskennassa otimme siten huomioon ainoastaan ne reagenssit, joiden hintatiedot poikkeavat toisistaan eri menetelmissä. Emme ottaneet huomioon tarvikkeita, jotka olivat molemmille menetelmille samoja. Näitä olivat näytteiden kuljetusliuos (Michel), pesuliuos (PBS), tukiaine (OCT-compound) ja objektilasien hinnat. Lisäksi havainnoimme eri värjäysten suoritusvaikeutta ja menetelmien lisäkäyttömahdollisuuksia. Opinnäytetyössämme otimme kantaa siihen, onko värjäysautomaatin hankkiminen kannattavaa.

## 6.7 IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleenorganisointi

Opinnäytetyössämme laadimme laboratorion IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleen organisoimisesta suunnitelman, johon esitämme mahdollisimman paljon laboratorion päivittäistä työkuormaa helpottavia toimenpiteitä. Näiden toimenpide-ehdotusten pohjana ovat kirjallisuudesta löytämämme tutkimukset sekä opinnäytetyössämme saadut tulokset ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysolosuhteiden sekä pakastamisen vaikutuksesta fluoresenssiin.

Kirjasimme ylös jokaiseen näytteeseen liittyvät tiedot, esimerkiksi näytteenottopäivämäärän, näytteen saapumispäivämäärän, värjäyspäivämäärän sekä Michel-liuoksen viimeisen käyttöpäivämäärän. Selvitimme Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla, heikentyykö näytteen fluoresenssi, jos sitä säilytetään kuljetusliuoksessa yli 5 vrk. Lisäksi tarkistimme, saapuiko näytteitä vanhentuneessa Michel-liuoksessa. Vertasimme näitä tietoja patologin antamiin tietoihin esimerkiksi mahdollisesta taustafluoresenssista tai heikentyneestä fluoresenssista. Näiden tietojen pohjalta laadimme suosituksen toisen kuljetusnesteen käyttöön ottamisesta. Mikäli toimeksiantajamme haluaa kuitenkin pitää Michel-liuoksen käytössä, ehdotamme ratkaisua käytännön järjestelyihin, joiden avulla näytteet eivät joutuisi odottamaan jatkokäsittelyä liian kauan.

Leikkasimme ja värjäsimme kymmenen aiemmin positiiviseksi diagnosoitua ja pakastimessa (-23 °C) säilytettyä ihobiopsiaa. Niiden avulla selvitimme, vaikuttaako biopsian pakastaminen fluoresenssiin. Laadimme myös suosituksen leikattujen ihobiopsioiden varastointimenetelmästä.

## 7 Tulokset

Opinnäytetyömme tulokset jakautuvat kahteen osioon. Ensimmäisessä osiossa käsittelemme käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välisiä eroja. Toisessa osiossa annamme opinnäytetyömme tuloksiin sekä kirjallisuuteen perustuvia ehdotuksia YML patologian osaston IF-näytteiden käsittelyn uudelleenorganisoinniseksi.

Värjäsimme yhteensä 440 objektilasia, joista puolet (220) käsivärjäysmenetelmällä ja puolet VBM™-värjäysautomaatilla. Liitteessä 4 on kaikkien näytteiden tulokset. Positiivista fluoresenssia oli 15 näytteessä. Yhdessä positiivisessa näytteessä antigeenin ja vasta-aineen välinen reaktio tapahtui kahdessa ihon rakenteessa (tyvikalvolla ja kapillaareissa positiivinen C3). Diagnostinen löydös viittasi tällöin vaskuliittiin. Kaikissa muissa positiivisissa näytteissä löydös oli vain yhdessä paikassa, joista yleisimmät olivat C3 ja/tai IgG tyvikalvolla (8 näytettä), mitkä yhdessä potilaiden diagnostiseen statukseen viittasivat pemfigoidiin. Kolmessa näytteessä IF-löydös tuki dermatitis herpetiformiksen diagnoosia (granulaarinen C3 tyvikalvolla). Positiivista fluoresenssia oli näiden lisäksi kolmessa näytteessä, mutta niiden löydökset eivät olleet diagnostisia.

### 7.1 Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin erot

Tässä osiossa tutkimme käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välisiä eroja menetelmien herkkyydessä sekä värin laadussa ja säilyvyydessä. Vertailimme menetelmiä työpanokseen käytettävän ajan ja käyttökustannusten suhteen sekä siinä, kumpi menetelmä on henkilöstön kannalta mieluisampi ja käyttökelpoisempi. Lopuksi otamme kantaa siihen, onko VBM™-värjäysautomaatin hankkiminen kannattavaa nykyisellä näytemäärällä.

#### 7.1.1 Menetelmien herkkyys

YML patologian osastolle tutkimusjakson aikana saapuneista 45 näytteestä 13 osoitautui positiivisiksi ja loput 32 olivat negatiivisia. Vertailimme värjäysmenetelmien herkkyyttä McNemarin testin avulla. Vertailuparien suuri kokonaismäärä (N=250) selittyi sillä, että yhdestä objektilasista muodostui yhteensä viisi vertailukohtaa, sillä otimme huomioon kaikki ne ihon rakenteet, joista fluoresenssia tutkitaan. Tulokset ovat taulukossa 3. VBM™-värjäysautomaatti oli tilastollisesti merkitsevästi herkempi kuin käsivär-

jäysmenetelmä ( $p < 0,10$ ). Sen herkkyys korostui seitsemässä positiivisessa näytteessä, jotka käsivärjäysmenetelmällä osoittautuivat negatiivisiksi. Käsivärjäysmenetelmän herkkyys oli 69,6 %, kun taas VBM™-värjäysautomaatin herkkyys oli 91,3 % (taulukko 4). Positiivista fluoresenssia oli yhteensä 23 valmisteissa, joista 16 kpl oli värjätty käsivärjäysmenetelmällä ja 21 kpl VBM™-värjäysautomaatilla.

Taulukko 3. Värjäysmenetelmien väliset herkkyyserot (McNemar-testi).

Sitoutumispaikka ja vasta-aine	Käsimenetelmä	Roche VBM™		p-arvo <sup>1</sup>
		–	+	
Tyvikalvo IgG	–	44	1	0,750
	+	1	4	
Tyvikalvo C3	–	38	4	0,188
	+	1	7	
Kapillaarit C3	–	48	0	1,000
	+	0	2	
Colloid Bodit IgM	–	48	1	0,500
	+	0	1	
Colloid bodit C3	–	49	1	0,500
	+	0	0	
<b>Yhteensä</b>	–	<b>227</b>	<b>7</b>	<b>0,090</b>
	+	<b>2</b>	<b>14</b>	

<sup>1</sup>Tilastollinen merkitsevyys (tarkka), vaihtoehtohypoteesi yksisuuntainen

Taulukko 4. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin herkkyysien vertailu.

Menetelmä	Positiiviset <sup>1</sup>	Negatiiviset <sup>2</sup>	Herkkyys %
Käsivärjäysmenetelmä	16	234	69,6
Roche VBM™	21	229	91,3
<b>Yhteensä<sup>3</sup></b>	<b>23</b>	<b>227</b>	

<sup>1</sup>Menetelmällä värjättyistä valmisteista positiivisia, kpl

<sup>2</sup>Menetelmällä värjättyistä valmisteista negatiivisia, kpl

<sup>3</sup>Kaikki positiivisiksi tai negatiivisiksi todetut valmisteet

### 7.1.2 Valmisteiden värin laatu

Käsimenetelmällä värjättyjen valmisteiden värin laatu oli keskimäärin 1,41 (taulukko 5). Keskimäärin 59 % luokiteltiin väriltään hyväksi ja 41 % huonoiksi. VBM™-värjäysautomaatilla värjättyjen valmisteiden värin laatu oli keskimäärin 1,09, ja näistä valmisteista keskimäärin 91 % luokiteltiin väriltään hyväksi ja vain 9 % huonoiksi. Keskiarvoja vertailemalla näyttäisi siltä, että värjättyjen valmisteiden värin laatu oli parempi VBM™-värjäysautomaatilla kuin käsivärjäysmenetelmällä. Lisäksi käsivärjäysmenetelmällä viisi

näytettä oli niin huonoja, että fluoresenssi ei ollut lainkaan luettavissa ja diagnoosia ei voinut tehdä (liite 4). VBM™-värjäysautomaatilla tällaisia näytteitä oli yksi.

Taulukko 5. Käsivärjäysmenetelmällä ja VBM™-värjäysautomaatilla värjättyjen valmisteiden fluoresenssiväriin laatu.

Vasta-aine	N	Käsivärjäysmenetelmä			Roche VBM™		
		Väriin laatu <sup>1</sup>	Hyvät %	Huonot %	Väriin laatu <sup>1</sup>	Hyvät %	Huonot %
IgA	55	1,42	58	42	1,09	91	9
IgG	55	1,38	62	38	1,09	91	9
IgM	55	1,44	56	44	1,09	91	9
C3	55	1,40	60	40	1,07	93	7
<b>Keskiarvo</b>		<b>1,41</b>	<b>59</b>	<b>41</b>	<b>1,09</b>	<b>91</b>	<b>9</b>

N=valmisteiden lukumäärä

<sup>1</sup>Väriin laadun keskiarvo. Asteikko: 1=Hyvä, 2=huono

Vertailimme värjäysmenetelmien välisiä eroja fluoresenssiväriin laatuun nähden McNemarin testillä. Vertailuparit olivat saman potilaan näytteet, josta valmistetut objektilaset värjäsimme samalla vasta-aineella mutta eri värjäysmenetelmää käyttäen. Suurimmalla osalla valmisteista (N=147; 67 %) oli sama tulos eli käsivärjäysmenetelmällä ja VBM™-värjäysautomaatilla värjätty valmisteet olivat väriin laadultaan samanlaiset (taulukko 6). VBM™-värjäysautomaatilla värjätystä valmisteista 72 kpl (33 %) oli parempia väriin laadultaan kuin käsivärjäysmenetelmällä, kun taas käsivärjäysmenetelmällä vain yhden valmisteen väriin laatu oli parempi kuin VBM™-värjäysautomaatilla värjätty. Väriin laadun kannalta VBM™-värjäysautomaatti oli siis selvästi parempi kuin käsivärjäysmenetelmä (p=0,000). Liitteessä 5 on fluoresenssimikroskooppikuvia käsi- ja automaattimenetelmillä värjätystä objektilaseista.

Taulukko 6. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin erot valmisteiden väriin laadussa (McNemar-testi).

Vasta-aine	Käsimenetelmä	Roche VBM™		p-arvo <sup>1</sup>
		Hyvät	Huonot	
IgA	Hyvät	32	0	0,000
	Huonot	18	5	
IgG	Hyvät	33	1	0,000
	Huonot	17	4	
IgM	Hyvät	31	0	0,000
	Huonot	19	5	
C3	Hyvät	33	0	0,000
	Huonot	18	4	
<b>Yhteensä</b>	Hyvät	<b>129</b>	<b>1</b>	<b>0,000</b>
	Huonot	<b>72</b>	<b>18</b>	

<sup>1</sup>Tilastollinen merkitsevyys (tarkka), vaihtoehdot hypoteesi yksisuuntainen

### 7.1.3 Fluoresoivan värin säilyvyys

Opinnäytetyötämme varten patologi arvioi kymmenestä positiivisesta ja kuudesta negatiivisesta näytteestä valmistettujen objektilasien fluoresenssivärin laatua kahden ja neljän viikon kuluttua ensimmäisestä arvioimisesta. Kahden viikon säilytyksen jälkeen vain 43 % käsivärjäysmenetelmällä värjätystä valmisteista oli hyviä, kun vastaavasti VBM™-värjäysautomaatilla värjättyjen valmisteiden osuus oli 79 % (taulukko 7). Neljän viikon säilytyksen jälkeen vastaavat osuudet olivat 75 % ja 100 % (taulukko 8).

Taulukko 7. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin erot värin laadussa 2 viikon säilytyksen jälkeen.

Vasta-aine	N	Käsimenetelmä		Roche VBM™	
		Hyvät %	Huonot %	Hyvät %	Huonot %
IgA	14	43	57	79	21
IgG	14	43	57	79	21
IgM	14	43	57	79	21
C3	14	43	57	79	21

N=valmisteiden lukumäärä

Taulukko 8. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin erot värin laadussa 4 viikon säilytyksen jälkeen.

Vasta-aine	N	Käsimenetelmä		Roche VBM™	
		Hyvät %	Huonot %	Hyvät %	Huonot %
IgA	8	75	25	100	0
IgG	8	75	25	100	0
IgM	8	75	25	100	0
C3	8	75	25	100	0

N=valmisteiden lukumäärä

Vertailimme värjäysmenetelmien välisiä eroja fluoresenssivärin säilyvyyteen nähden McNemarin testillä. Suurimmalla osalla kaksi viikkoa säilytetyistä valmisteista (N=36; 64 %) oli sama tulos eli käsivärjäysmenetelmällä ja VBM™-värjäysautomaatilla värjätty valmisteet olivat värin laadultaan samanlaiset (taulukko 9). VBM™-värjäysautomaatilla värjättyistä valmisteista 20 kpl (36 %) oli värin laadultaan parempia kuin käsivärjäysmenetelmällä värjätty valmisteet. VBM™-värjäysautomaatilla värjätty valmisteet olivatkin kahden viikon säilytyksen jälkeen värin laadun kannalta parempia kuin käsivärjäysmenetelmällä värjätty (p=0,000).

Taulukko 9. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin ero yksittäisten näytteiden värin laadussa 2 viikon säilytyksen jälkeen (McNemar-testi).

Vasta-aine	Käsimenetelmä	Roche VBM™		p-arvo <sup>1</sup>
		Hyvät	Huonot	
IgA	Hyvät	6	0	0,031
	Huonot	5	3	
IgG	Hyvät	6	0	0,031
	Huonot	5	3	
IgM	Hyvät	6	0	0,031
	Huonot	5	3	
C3	Hyvät	6	0	0,031
	Huonot	5	3	
<b>Yhteensä</b>	Hyvät	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0,000</b>
	Huonot	<b>20</b>	<b>12</b>	

<sup>1</sup>Tilastollinen merkitsevyys (tarkka), vaihtoehdohypoteesi yksisuuntainen

Suurimmalla osalla neljä viikkoa säilytetyistä valmisteista oli sama tulos eli käsivärjäysmenetelmällä ja VBM™-värjäysautomaatilla värjätyt valmisteet olivat värin laadultaan samanlaiset (N=24; 75 %) (taulukko 10). VBM™-värjäysautomaatilla värjätyistä valmisteista 8 kpl (25 %) oli parempia värin laadultaan kuin käsivärjäysmenetelmällä. VBM™-värjäysautomaatilla värjätyt valmisteet olivatkin neljän viikon säilytyksen jälkeen värin laadun kannalta parempia kuin käsivärjäysmenetelmällä värjätyt (p=0,004).

Taulukko 10. Käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin ero yksittäisten näytteiden värin laadussa 4 viikon säilytyksen jälkeen (McNemar-testi).

Vasta-aine	Käsimenetelmä	Roche VBM™		p-arvo <sup>1</sup>
		Hyvät	Huonot	
IgA	Hyvät	6	0	0,250
	Huonot	2	0	
IgG	Hyvät	6	0	0,250
	Huonot	2	0	
IgM	Hyvät	6	0	0,250
	Huonot	2	0	
C3	Hyvät	6	0	0,250
	Huonot	2	0	
<b>Yhteensä</b>	Hyvät	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0,004</b>
	Huonot	<b>8</b>	<b>0</b>	

<sup>1</sup>Tilastollinen merkitsevyys (tarkka), vaihtoehdohypoteesi yksisuuntainen

#### 7.1.4 Työpanokseen käytettävä aika

Käsivärjäyksen suoritus kesti keskimäärin 77 minuuttia, ja inkubointiaikaa lukuunottamatta aktiivista työaikaa yhtä näytettä kohti kului keskimäärin 8 minuuttia (taulukko 11). Käsivärjäyksen eri osiin käytettävä aika vaihtelee kuitenkin kiireen, tekijän, näytemäärän ja muiden olosuhteiden mukaan. Kerrallaan värjättävä määrä näytteitä on korkeintaan 12 kpl, eikä prosessia voi ajoittaa siten, että turha odotusaika minimoitaisiin. Käsivärjäyksen inkubointiaika on niin rajallinen (30 min), että se on vaikea käyttää hyödyksi tekemällä muita töitä. Inkubointiaika on myös suhteellisen tarkka, joten seuraavaa pesua ei voi jättää odottamaan sopivaa hetkeä. Todellinen prosessiin käytetty aika yhtä näytettä kohti on siten jopa suurempi kuin 8 minuuttia.

Taulukko 11. Käsivärjäyksen käyttämämme aika eri värjäyskerroilla.

Käsivärjäys	1. pesu ja valmistelu <sup>1</sup>	Inkubointi <sup>1</sup>	2. pesu ja siivous <sup>1</sup>	Yhteensä <sup>1</sup>	N	Per näyte <sup>1,2</sup>
1	25	30	15	70	4	10
2	44	30	27	101	12	6
3	41	30	15	86	5	11
4	26	30	22	78	8	6
5	26	30	12	68	4	10
6	16	30	18	64	6	6
7	16	30	27	73	10	4
Keskimäärin				77	7	8

N=näytteiden lukumäärä

<sup>1</sup> Kesto minuutteina

<sup>2</sup> Laskukaava: (1. pesu ja valmistelu + 2. pesu ja siivous)/N.

Automaattivärjäyksen alkuvalmisteluihin laskimme mukaan automaatin käynnistämisen sekä objektilasien tarrojen tulostamisen ja kiinnittämisen. Lopputoimenpiteisiin otimme huomioon muun muassa laitteen pesuohjelman käynnistämisen sekä objektilasien huuhtelun juoksevalla vedellä ja astianpesuaineella. Automaattivärjäys kesti yhteensä keskimäärin 53 minuuttia (taulukko 12). Värjäysohjelma kesti keskimäärin 43 minuuttia, mutta siihen mahtuu yhdellä kerralla vain viiden potilaan objektilasit. Värjäysohjelman jälkeen suoritettavat lopputoimenpiteet kestivät näytteiden lukumäärästä riippuen 2–5 minuuttia. Aktiivista työaikaa yksi VBM™-värjäysautomaatilla värjätty näyte vei työsämme keskimäärin 1,6 minuuttia. Objektilasien poistaminen värjäyslaitteesta heti ohjelman päätyttyä ei ole välttämätöntä, joten tämä työvaihe voidaan ajoittaa sopimaan päivän muihin työtehtäviin.



Taulukko 12. Automaattivärjäykseen käyttämämme aika eri värjäyskerroilla.

Roche VBM™	Alku-valmistelut <sup>1</sup>	Ohjelman kesto <sup>1</sup>	Huuhtelu ja siivous <sup>1</sup>	Yhteensä <sup>1,2</sup>	N	Per näyte <sup>1,3</sup>
1	5	40	2	47	4	1,8
2	13	3 x 45	5	61	12	1,5
3	6	41	2	49	5	1,6
4	9	2 x 44	4	56	8	1,6
5	5	40	2	47	4	1,8
6	7	2 x 43	3	52	6	1,7
7	11	2 x 43	4	57	10	1,5
Keskimäärin	8	43	3	53	7	1,6

N=näytteiden lukumäärä

<sup>1</sup>Kesto minuutteina

<sup>2</sup>Yhden värjäysohjelman kesto alkuvalmisteluineen

<sup>3</sup>Laskukaava: (alkuvalmistelut + huuhtelu ja siivous)/N

### 7.1.5 Kustannukset

Laatimamme kustannuslaskelmat perustuivat tärkeimpien tarvikkeiden ja reagenssien hintoihin sekä laskemiimme näytekohtaisiin kustannuksiin. Rochen® hinnat ovat kuitenkin asiakaskohtaisia, ja ne ovat myös liikesalaisuuden piirissä. Olemme YML patologian osaston sekä Rochen® kanssa sopineet, että emme laita hintatietoja näkyville opinnäytetyössämme. Sen sijaan tässä opinnäytetyössä esitimme suhdelukuja vertailemaan käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välisiä kustannuseroja.

Laskimme sekä käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin aiheuttamat kustannukset siten, että mukana oli ainoastaan vasta-aineet. Tämä johtuu siitä, että käsivärjäykseen tarvittavat muut reagenssit (PBS, NaCl) valmistetaan YML:n liuosyksikössä yleiseen käyttöön hankituista valmistusaineista, joten niiden hinnan määrittäminen on hankalaa. IF-värjäyksen suorittaminen käsimenetelmällä aiheuttaa kustannuksia, joiden suhdeluvuksi annoimme 1,00. Tähän hintaan sisältyy kaikilla neljällä vasta-aineella (Dako) värjätyt objektilasit yhdestä potilasnäytteestä. VBM™-värjäysautomaatissa on mahdollista käyttää vain Rochen® käyttövalmiita vasta-aineita, ja niiden kustannuksen suhde käsivärjäyksessä käytettävien vasta-aineiden kustannuksiin on 5,07. Tähän sisältyy kuitenkin muutkin VBM™-värjäysautomaatin vaatimat tarvikkeet, kuten mineraaliöljy, puskurit ja tarrat. Käytettävissämme olevien tietojen perusteella laskimme, että VBM™-värjäysautomaatin hinta on noin 1200-kertainen yhden näytteen värjäämiseen käytettävien reagenssien hintoihin verrattuna. Lisäksi laite tarvitsee vuosihuoltoa, jota on kahta eri tyyppiä. Täyshuolto kattaa kaiken, ja sen vuosittaiset kustannukset ovat 24,8 % laitteen hankintahinnasta. Määräaikaishuollolla varmistetaan,

että instrumentin parametrit ja asetukset ovat direktiivien mukaisia. Sen vuosittaiset kustannukset ovat 12,8 % laitteen hankintahinnasta.

#### 7.1.6 Henkilöstönäkökulmat

YML patologian osastolla käytössämme olleen VBM™-värjäysautomaatin koekäyttöä jatkettiin myös opinnäytetyömme jälkeen. Sen käyttöön perehdytettiin kaksi vakituista työntekijää, jotka värjäisivät automaattilla kaikki osastolle saapuneet IF-näytteet. Teimme automaattivärjäystä käyttäneille työntekijöille kyselyn värjäysmenetelmien eroista (liite 6). Molemmat automaattivärjykseen perehdytetyt työntekijät olivat kyselyn perusteella sitä mieltä, että automaattivärjäys on sekä luotettavampi että mieluisampi (taulukko 13) kuin käsivärjäysmenetelmä. Käsivärjäysmenetelmän hyväksi puoliksi he mainitsivat sen, että se ei vaadi positiivisesti varautuneita Superfrost Plus -objektilaseja, vaan on mahdollista käyttää samoja objektilaseja kuin muissakin histologisissa näytteissä. Tavallisille objektilaseille on mahdollista tulostaa näytetiedot heti QPati-ohjelman sisäänkirjautumisvaiheessa. Käsivärjäys ei myöskään aiheuta huoltokustannuksia.

Käsivärjäyksessä on kuitenkin paljon haastavia puolia. Molemmat vastaajat mainitsivat pipetointi- ja muut virhemahdollisuudet sekä lasien sekaantumisvaaran suureksi. Ongelmaksi he mainitsivat myös sen, että valmiiksi laimennetut vasta-aineet eivät välttämättä riitä, jos näytteitä tulee värjäyspäivän aamuna vielä lisää. Tällöin vasta-aineiden laimennusprosessi pitää suorittaa uudestaan. Lisäksi käsivärjykseen liittyy vastaajien mukaan teknisiä ongelmia, kuten kyvettien epätasainen laatu, mikä johtaa vasta-aineinkuboinnin laadun suureen vaihteluun. Käsivärjäyksen virhemahdollisuutta lisää vielä UV-valoaltistus.

Taulukko 13. Kyselyyn pohjautuva yhteenveto värjäysmenetelmien hyvistä ja huonoista puolista.

	Käsimenetelmä	VBM™-värjäysautomaatti
Hyvää	Valmiiksi kirjoitetut objektilasit	Mukava, helppokäyttöinen laite Nopea ajo Ei pipetointi- tai laimennusvirheitä Tasalaatuisuus Tehokkaampi ajankäyttö
Huonoa	Työläs Vasta-aineiden laimennus Laimennoksen riittävyys Virhealttius Työaikaa vaikea arvioida	Objektilasien tarroitus Laitteen mahdolliset virheet Laitteen huolto

VBM™-värjäysautomaatin suuri etu käsivärjäysmenetelmään nähden oli vastaajien mukaan luotettavuus. Laimennus- ja pipetointivirheet jäivät pois ja työn jaksottaminen on helpompaa. Jos näytteiden määrä on suuri, työt voi jaksottaa siten, että ensin leikataan osa näytteistä ja laitetaan ne automaattiin värjäytymään. Sillä aikaa voidaan leikata seuraavia näytteitä, eikä työskentelyyn tule siten ylimääräisiä taukoja. VBM™-värjäysautomaatin huonoiksi puoliksi mainittiin työlääksi koettu objektilasien tarroitus, automaatin huoltoon vaaditut resurssit, liuosten valmistus ja automaatin mahdollisuus mennä epäkuntoon. Yhteenvetona vastaajat kertoivat, että he käyttäisivät käsivärjäyksen sijasta mieluummin VBM™-värjäysautomaattia, sillä se on mukava ja helppokäyttöinen. Heidän mukaansa VBM™-värjäysautomaattia käytettäessä ei myöskään tule turhia taukoja, jolloin ajankäyttö on maksimoitu.

#### 7.1.7 VBM™-värjäysautomaatin hankinnan kannattavuus

Opinnäytetyömme yksi tavoitteista oli ottaa kantaa siihen, onko VBM™-värjäysautomaatin hankkiminen kannattavaa nykyisellä IF-näytemäärällä. Otimme kannattavuuden pohdinnassa huomioon eri menetelmillä värjättyjen valmisteiden erot fluoresenssiväriin laadussa, menetelmien herkkyydessä ja fluoresoivan väriin säilyvyydessä. Lisäksi otimme huomioon värjäykseen kuluvan ajan, käyttökustannukset, muut käyttömahdollisuudet sekä henkilöstön näkökulmat. Taulukossa 14 korostuu suuret erot käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin välillä. Opinnäytetyömme tuloksista selvisi, että IF-näytteiden värjäminen automaattilla oli nopeaa, vaivatonta, luotettavaa ja tasalaatuista. Värjäysautomaattia voidaan käyttää IF-näytteiden värjäämisen lisäksi myös immunohistokemiallisiin värjäyksiin, joten laitteen käyttömahdollisuudet ovat laajat.

Taulukko 14. Yhteenveto käsivärjäysmenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin eroista.

Ominaisuus	Käsivärjäysmenetelmä	VBM™
Fluoresenssivärin laatu (hyvien valmisteiden osuus)	59 %	91 %
Fluoresoivan värin säilyvyys	Huono	Hyvä
Menetelmän herkkyys <sup>1</sup>	69,6 %	91,3 %
Värjäykseen kuluva aika yhtä näytettä kohti	8 min	1,6 min
Reagenssien hinnat	1	5
Muut käyttömahdollisuudet	Ei ole	Useita
Suoritus	Monivaiheinen, työläs	Helppo, automatisoitu
Virhemahdollisuus	Suuri	Pieni
Siivous	Paljon	Vähän
Huolto	Ei ole	Kallis

<sup>1</sup>Positiivisen fluoresenssin löytäminen; osuus kaikista positiivisista valmisteista

YML patologian osastolle saapui vuonna 2011 yhteensä 1459 IF-näytettä, eli keskimäärin 7 näytettä viikoittain. Vuoden 2012 tammi–elokuussa näytteitä saapui saman verran kuin viime vuoden vastaavaan aikaan, joten näytteiden määrän ennustetaan pysyvän jatkossakin samana.

Opinnäytetyössämme selvitimme, että ihobiopsioiden immunofluoresenssivärjäys VBM™-värjäysautomaatilla suoritettuna on nopeaa ja vaivatonta. Mikä tärkeintä, värjäystulos on aina tasalaatuista riippumatta värjäyksen suorittajasta. VBM™-värjäysautomaatti on herkempi kuin käsivärjäysmenetelmä, joten väärin negatiivisten näytteiden määrä pienenee huomattavasti. YML patologian osastolla ei käytetä IF-värjäyksessä lainkaan kontroleja, joten värjäyksen onnistumisesta ei voida olla varmoja missään vaiheessa. Tässä tapauksessa VBM™-värjäysautomaatilla on suuri etu käsimentelmään nähden. Lisäksi VBM™-värjäysautomaatin hankinnan myötä laboratorion palvelutarjonta laajenee, sillä voidaan käyttää myös immunohistokemiallisiin värjäyksiin, jotka tähän saakka on teetetty alihankintana. Opinnäytetyössämme esitettyjen tulosten pohjalta suosittelemme, että VBM™-värjäysautomaattiin kannattaa investoida sen kustannuksista huolimatta. Vaikka tutkimuksen kokonaiskustannus nousee, sen luotettavuus ja laatu paranee huomattavasti. Tämä on tärkeää korkeaan laatuun tähtäävälle laboratoriolle.

## 7.2 IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleenorganisointi

Esittelemme opinnäytetyömme tuloksia ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysolosuhteiden sekä pakastamisen vaikutuksesta fluoresenssiin. Tuomme esiin vaihtoehtoisen IF-näytteiden kuljetusluoksen, ja ehdotamme uutta toimintatapaa ihobiopsioiden säilytykseen leikkaamisen jälkeen. Lisäksi selvitämme saapuneiden näytteiden värjäysprosessin parantamismahdollisuuksia, myös siinä tapauksessa että YML:n johto ei puolla VBM™-värjäysautomaatin hankkimista.

### 7.2.1 Ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysolosuhteet

Ihobiopsioiden keskimääräinen kuljetus- ja säilytysaika ennen leikkaamista oli 6,9 vrk (N=45) Tämä tarkoittaa sitä, että näytteet olivat kuljetusluoksessa keskimäärin yli sallitun ajan, ja näytteistä peräti 76 % (N=35) saapui laboratorioon myöhemmin kuin viiden vuorokauden kuluttua näytteenotosta (taulukko 15). Näistä kaksi näytettä saapui vanhentuneessa kuljetusnesteessä.

Tutkimme kuljetus- ja säilytysajan vaikutusta fluoresenssivärin laatuun Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Lisäksi vertasimme kuljetus- ja säilytysaikoja patologin antamiin tietoihin esimerkiksi mahdollisesta taustafluoresenssista tai heikentyneestä fluoresenssista. Tuloksista selvisi, että pidentynyt aika näytteenotosta näytteen värjäämiseen heikentää värjättyjen valmisteiden värin laatua ( $r=0,285$ ;  $p=0,06$ ).

Taulukko 15. Kuljetus- ja säilytysajan vaikutus näytteen värin laatuun eri värjäysmenetelmillä.

Kuljetus- ja säilytysaika	N	Osuus	Käsivärjäysmenetelmä			Roche VBM™		
			Värin laatu <sup>1</sup>	Kommentit	kpl	Värin laatu <sup>1</sup>	Kommentit	kpl
≤5 vrk	10	24 %	1,1	Fluoresenssi ei luettavissa	1	1	–	
>6 vrk	35	76 %	1,4	Heikko fluoresenssi	3	1,07	Taustaa	1
				Fluoresenssi ei luettavissa	3		Roskia	1
				Väri samea	3			
				Väri utuinen	1			
				Taustaa, roskea taustalla	1			
Yhteensä	45	100 %	1,33			1,06		

N=näytteiden lukumäärä

<sup>1</sup>Asteikko: 1=Hyvä, 2=huono

Ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysolosuhteiden parantamiseksi suosittelemme YML patologian osastoa harkitsemaan Histocon™-kuljetusliuoksen ottamista käyttöön (kuvio 18). Sillä on selviä etuja Michel-liuokseen verrattuna. Se on käyttövalmis, edullinen, sitä ei tarvitse pestä pois ja siinä säilytetyistä näytteistä voidaan suorittaa IF-tutkimusten lisäksi myös histokemiallisia tutkimuksia. Histocon™-kuljetusliuoksen käyttöönotto YML patologian osastolle edellyttää kuitenkin laajempia tutkimuksia.

### 7.2.2 Ihobiopsioiden varastointi

Pakastettuina säilytetyistä (-23 °C) kymmenestä positiivisesta näytteestä ainoastaan kaksi oli uudelleen leikattuna ja värjätynä edelleen positiivisia (taulukko 16). Toisessa positiivisista näytteistä fluoresenssi oli heikko ja toisessa oli samea taustafluoresenssi. Värjäysmenetelmillä ei ollut tässä yhteydessä eroa herkkyydessä, vaan positiivinen fluoresenssi näkyi molemmilla menetelmillä. Pakastetuista näytteistä tehdyistä valmis-teista 45 %:ssa oli heikko fluoresenssi ja 55 %:ssa oli samea taustafluoresenssi. Lisäksi säilytyksen myötä toinen käsimenetelmällä värjättyistä näytteistä menetti fluoresenssiaan ja oli neljän viikon säilytyksen jälkeen negatiivinen. Toistuvien sulatusten ja hitaan jäädytyksen aiheuttama jääkiteiden muodostuminen oli ilmeisesti syynä siihen, että pakastimessa säilytettyjen, aiemmin positiivisesti diagnosoitujen ihonäytteiden uudelleen tutkiminen oli melkein mahdotonta.

Näiden tulosten perusteella emme voi suositella leikattujen ihobiopsioiden varastointia pakastettuina (-23 °C) sen jälkeen kun ne on heti leikkaamisen jälkeen sulatettu ja siirretty takaisin kuljetusputkeen. Mahdollista lisäpyyntöä varten ihobiopsioiden optimaalisin varastointitapa olisi syväjääditys (-70 °C) välittömästi leikkaamisen jälkeen. Tämän mahdollisuuden toteuttaminen vaatisi YML patologian osastolta kuitenkin kalliita ja työläitä erikoisjärjestelyitä. Sen vuoksi päädyimme suosittelemaan leikattujen ihobiopsioiden varastointia jäädytettyinä (-23 °C) ilman että niitä sulatetaan leikkaamisen jälkeen. Diagnoosin saamisen jälkeen ihobiopsiat voidaan vaihtoehtoisesti joko varastoida pakastimessa tai hävittää (kuvio 17).

Taulukko 16. Pakastettuina säilytettyjen positiivisten näytteiden värjäystulokset eri menetelmillä.

Näyte	Aika (vk)	Käsimenetelmä	Roche VBM™
6874	0	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>
	2	– <sup>2</sup>	– <sup>2</sup>
	4	–	–
6927	0	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>
	2	– <sup>2</sup>	– <sup>2</sup>
	4	–	–
3973	0	+ <sup>1</sup>	+
	2	+	+
	4	+	+
6334	0	– <sup>1</sup>	–
	2	– <sup>2</sup>	–
	4	–	–
6089	0	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>
	2	– <sup>2</sup>	–
	4	–	–
6189	0	– <sup>1</sup>	–
	2	– <sup>2</sup>	– <sup>2</sup>
	4	–	–
897	0	+	+
	2	– <sup>2</sup>	+
	4	–	+
10649	0	–	–
	2	–	–
	4	–	–
5756	0	– <sup>2</sup>	–
	2	–	–
	4	–	–
898	0	– <sup>2</sup>	–
	2	–	–
	4	–	–

<sup>1</sup>heikko fluoresenssi<sup>2</sup>samea tausta

### 7.2.3 Värjäysaikataulu

Suosittellemme, että näytteitä värjättäisiin YML patologian osastolla kaksi kertaa viikossa, mikä minimoisi kudostuho-riskiä kuljetusliuoksessa säilytetyssä ihobiopsiassa (kuviokuva 17). Lisäksi se helpottaisi värjäysprosessin suorittamista, sillä VBM™-värjäysautomaatilla voidaan värjätä yhdellä ajolla vain viiden potilaan IF-näytteistä valmistetut objektilasit. YML patologian osastolle saapuu keskimäärin 7 IF-näytettä viikoittain (vaihteluväli noin 2–15), joten yhden viikon aikana saapuvia IF-näytteitä ei välttämättä voitaisi värjätä VBM™-värjäysautomaatilla samanaikaisesti. Suurimpana hyötynä toimeksian-

tajamme asiakkaille kaksi kertaa viikossa suoritettavasta IF-näytteiden värjäyksestä olisi kuitenkin vastausajan lyheneminen ja samalla potilaan mahdollisen hoidon nopeampi aloittaminen. Lisäksi leikattujen ihobiopsioiden mahdollinen varastointi jääkaapissa (+4 °C) jäisi mahdollisimman lyhyeksi. Suosittelemme IF-näytteiden värjäystä kahdesti viikossa siinäkin tapauksessa, että YML patologian osasto haluaisi pitäytyä Michel-liuoksen käytössä. Mielestämme juuri nämä parannusehdotukset auttaisivat parhaiten ongelmana pidettyyn henkilöstöressurssien puutteeseen ja helpottaisivat laboratorion päivittäistä työkuormaa. Suosituksemme pohjautuvat omiin havaintoihimme opinnäytetyöprosessin aikana.

<b>Histocon™ -kuljetusliuos</b>	
<b>Hyvät puolet</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>★ Käyttövalmis</li> <li>★ Edullinen</li> <li>★ Ei tarvitse pestä pois</li> <li>★ Voidaan tehdä muitakin tutkimuksia</li> </ul>	<b>Huonot puolet</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>★ Säilyttää ihobiopsian vain 48 h</li> <li>★ Säilytys ja kuljetus &lt; +4 °C</li> </ul>
→ Tarvitaan jatkotutkimuksia: <ul style="list-style-type: none"> <li>★ Histoconin soveltuvuus YML patologian osastolle?</li> <li>★ IF-diagnostiikka formaliinifiksoiduista näytteistä?</li> </ul>	
<b>Ihobiopsioiden varastointivaihtoehdot</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Syväjääditys (-70 °C) välittömästi leikkaamisen jälkeen</li> <li>2. Pakastus (-23 °C) välittömästi leikkaamisen jälkeen</li> <li>3. Jääkaapissa (+4 °C) diagnoosin saamiseen saakka</li> </ol>	
<b>IF-näytteiden värjäysaikataulu: 2 krt/vk</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>★ Minimoisi kudostuho-riskiä</li> <li>★ Nopeuttaisi ja helpottaisi värjäysprosessin suorittamista</li> <li>★ Vastausajan lyheneminen</li> <li>★ Potilaan mahdollisen hoidon nopeampi aloittaminen</li> <li>★ Leikattujen ihobiopsioiden varastointiaika jäisi lyhyeksi</li> </ul>	

Kuvio 17. Ehdotuksemme IF-näytteiden laboratorioprosessin uudelleenorganisoinnista.



## 8 Tulosten luotettavuuden arviointi

Opinnäytetyömme luotettavuuden tarkastelussa arviomme, miten tutkimuksen tulokset vastaavat tutkimuskohdettamme. Selvitämme, vastaavatko tutkimuksen tulokset ja johdopäätökset alkuperäistä tutkimusaihetta ja -kysymyksiä. (Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2003.) Lisäksi tarkastelemme ja arvioimme muiden tässä opinnäytetyössä tuloksiin vaikuttavien seikkojen luotettavuutta. Opinnäytetyömme aineisto muodostui kaikista niistä ihobiopsianäytteistä, jotka lähetettiin YML patologian osastolle kuuden viikon tutkimusjakson aikana. YML patologian osasto arvioi saapuneiden ihobiopsioiden määrän ja laadun olevan riittäviä menetelmien vertailua varten. Suurin osa tutkituista näytteistä oli odotetusti negatiivisia ja vain pieni osa (15 kpl) positiivisia. Positiivisten näytteiden pienestä määrästä huolimatta olemme onnistuneet saamaan riittävästi tietoa vastaamaan kaikkiin tutkimuskysymyksiin.

Menetelmien herkkyysvertailussa mukana olivat vain ne vertailuparit, jotka olivat ainakin toisen värjäysmenetelmän kohdalla saaneet positiivisen tuloksen. Tutkimusprosessin aikana selvisi, että VBM™-värjäysautomaatti on herkempi kuin käsivärjäysmenetelmä. Tutkimuksemme luotettavuuden kyseenalaistaa kuitenkin se, että immunofluoresenssinäytteiden värjäyksessä ei käytetä positiivista kontrollia. Joten värjäyksen onnistumisesta ei voida olla varmoja missään vaiheessa. Tämän takia haluamme korostaa, että kontrollinäytteen puute vaikuttaa menetelmien herkkyyden vertailuun, joten tulokset ovat vain suuntaa antavia.

Valmisteiden värin laadun vertailuun otimme mukaan kaikki näytteet (N=55), myös pakastetut näytteet. Patologi arvioi leikkeiden värin laadun kvalitatiivisesti asteikolla ”hyvä” (1) ja ”huono” (2). Arviointi suoritettiin sokkona, joten patologi ei voinut tietää, kummalla menetelmällä valmiste oli värjätty eikä hänen mahdollinen subjektiivisuutensa vaikuttanut tuloksiin. Kaikki näytteet tutki vain yksi patologi, joten tuloksissa ei ole mikroskoipoijasta johtuvaa vaihtelua. Valmisteiden yhteismäärä oli suuri (yli 500 objektilasia), joten meillä ei ollut resursseja pyytää niiden arviointia toiselta patologilta. Valmisteet tutkineella patologilla on kuitenkin vankka kokemus IF-näytteiden tutkimisessa. Nämä seikat huomioon ottaen arvioimme, että saamamme tulokset ovat luotettavia.

Tutkimme fluoresoivan värin säilyvyyttä kahden ja neljän viikon säilytyksen jälkeen. Tähän tutkimukseen otimme mukaan kymmenen positiivista näytettä, joista kaksi oli pakastettuja. Lisäksi otimme mukaan kuusi negatiivista näytettä, joista viisi oli pakastet-

tuja. Koska näytteiden arvioiminen on hyvin työlästä, päädyimme rajaamaan näytemäärän näin pieneksi ottaen tietoisesti riskin siitä, että tulokset eivät välttämättä olisi luotettavia. Lisäksi patologin lomapäivien vuoksi kaikkia valmisteita ei voitu tutkia suunnitelman mukaisesti, joten osasta jäi arvioimatta värin säilyvyys joko kahden tai neljän viikon kohdalla. Säilyvyystutkimukseen ei saatu mukaan kaikkia positiivisia näytteitä, sillä osa positiivisista näytteistä tuli tutkittaviksi vasta tutkimuksen loppuvaiheessa, joten patologi ei ehtinyt enää arvioida niitä säilytyksen jälkeen. Otimme mukaan myös pakastetuista ihobiopsioista valmistettuja objektilaseja, jotta meille selviäisi niiden värin säilyvyys. Vain yksi negatiivinen näyte oli tuore. Säilyvyystutkimuksen tulokset ovatkin vain suuntaa antavia, mutta tässä tilanteessa se riittää, sillä objektilaseja ei ole tarkoituskaan säilyttää yli kahta viikkoa. Perusteena säilyvyystutkimukselle oli se, että mikäli patologille tulee ylitsepääsemätön este eikä hänelle saada sijaista, YML patologian osasto voi arvioida kuinka kauan objektilaseja voitaisiin säilyttää luotettavan diagnoosin saamista varten.

Teknisesti epäonnistuneita leikkeitä oli kolme (liite 4). Leikkeiden tekninen epäonnistuminen liittyi siihen, että ihobiopsia oli otettu pemfigoidisuspektipotilaalta rakkulasta, vaikka se pitäisi ottaa rakkulan vierestä terveeltä iholta (Ilvesaro 2011). Rakkulanäytteitä on hyvin vaikea leikata jääleikemikrotomilla, ja niiden rakenteesta on vaikeaa tai lähes mahdotonta arvioida mahdollisen fluoresenssin sijaintia. Lisäksi yksi näyte oli niin suuri, että se ei ollut kunnolla fiksoitunut ja sen leikkaaminen oli hyvin haastavaa. Tämän näytteen jouduimme pienentämään ja leikkaamaan uudestaan. Sen fluoresenssitulos oli uudelleen leikkaamisen jälkeen negatiivinen. Emme voi kuitenkaan pitää tuota tulosta luotettavana, sillä opinnäytetyössämme olemme osoittaneet, että positiivinen näyte on pakastamisen jälkeen uudelleen tutkittuna todennäköisesti negatiivinen.

Selvitimme VBM™-värjäysautomaatin soveltuvuutta YML patologian osastolle käytännöllisyyden, monipuolisuuden ja ajankäytön kannalta. Koko tutkimuksemme ajan automaatti toimi moitteettomasti ja luotettavasti. Sen käyttö oli helppoa, ja automaatti vähensi tekijästä johtuvat mahdolliset käyttövirheet olemattomiin. Mittasimme tarkasti sekuntikellon avulla molemmilla menetelmillä suoritettua värjäystä. Odotusten mukaisesti VBM™-värjäysautomaatilla suoritettu värjäys oli nopeampi kuin käsivärjäysmenetelmä, joten VBM™-värjäysautomaatin käyttäjille jäi aikaa muiden työtehtävien suorittamiseen värjäyksen aikana. Vertailu oli objektiivista, ja koska menetelmät olivat tässä suhteessa vertailukelpoisia, arvioimme saamamme tulokset luotettaviksi.

Menetelmien välisessä vertailussa otimme huomioon myös värjäyskustannukset. Tutkimuksemme kannalta oli järkevää laskea pelkästään vasta-aineiden hinnat, jotka muodostavat suurimman osan kustannuksista. Laskimme, että käsivärjäysmenetelmän käyttökustannukset ovat huomattavasti edullisemmat kuin VBM™-värjäysautomaatin käyttökustannukset. Kokonaiskustannuksia oli todella vaikea laskea, sillä niihin kuuluvat myös muut menot, kuten automaatin huolto. Saamamme kvantitatiiviset tulokset ovat kuitenkin luotettavia ja vertailukelpoisia. Mikäli YML patologian osastolle hankitaan VBM™-värjäysautomaatti, laitteen validointi olisi myös välttämätön, ja se voisi olla hyvä aihe seuraavalle opinnäytetyölle.

Selvitimme kyselyn avulla henkilökunnan näkemyksiä menetelmien eroista. Vastaajien pieni lukumäärä johtui siitä, että vain kaksi vakituista työntekijää on perehdytetty värjäämään IF-näytteitä myös VBM™-värjäysautomaatilla. Haluamme kuitenkin korostaa, että molemmat työntekijät vastasivat kyselyyn perusteellisesti ja saimme heiltä paljon käyttökokemuksia ja ideoita.

Värjäysmenetelmien vertailuun otetulla VBM™-värjäysautomaatilla saatavat hyödyt tulevat ilmi varsinkin objektilasien laadun parantumisella ja henkilöstöressurssien tehokkaammalla käytöllä. VBM™-värjäysautomaatilla voidaan suorittaa IF-värjäysten lisäksi myös *in situ* hybridisaatio- sekä immunohistokemiallisia värjäyksiä. *In situ* hybridisaatio-värjäykset eivät ole tällä hetkellä käytössä YML patologian osastolla, mutta immunohistokemiallisille värjäysmenetelmille olisi jo nyt käyttöä. Nykyään ne joudutaan hankkimaan ostopalveluna, mikä pidentää vastausviivettä ja suurentaa näytteiden käsittelystä aiheutuneita kuluja.

Ihobiopsioiden kuljetus- ja säilytysajan vaikutusta valmisteiden värin laatuun tutkimme vain tuoreista näytteistä (N=45). Rajasimme pakastettuina varastoidut, aiemmin positiiviksi diagnosoidut ihobiopsiat tämän vertailun ulkopuolelle. Tällä toimenpiteellä halusimme vähentää biopsian pakastamisesta aiheutuvaa mahdollista satunnaisvaihtelua värin laatuun, sillä pakastettujen näytteiden värin laatu osoittautui kehnoksi. Näytteitä oli kuitenkin liian vähän, jotta näiden menetelmien avulla saadut tulokset olisivat luotettavia. On lisäksi otettava huomioon, että tässä opinnäytetyössä myös kuljetus- ja säilytyslämpötila oli väärä, joten emme pysty tekemään johtopäätöstä pelkän kuljetus- ja säilytysajan vaikutuksesta värin laatuun.

Ihobiopsioiden vaihtoehtoisia kuljetus- ja säilytysliuoksia etsimme pääasiassa internetistä. Lisäksi otimme selvää muissa laboratorioissa käytettävistä liuoksista. Löytämämme Histocon™-liuoksesta oli hyviä kokemuksia esimerkiksi HUSLABin transplantaatiolaboratoriossa, mutta sen soveltuvuutta YML patologian osastolle tulisi kuitenkin tutkia tarkemmin esimerkiksi uuden opinnäytetyön avulla. Lisäksi Ilvesaron (2011) tutkimuksessa selvisi, että myös formaliinifiksoidut ja parafiiniprosessoidut ihobiopsiat soveltuvat IF-tutkimukseen. Tämäkin vaatii lisätutkimuksia joko opinnäytetyönä tai laboratorion sisäisenä tutkimuksena.

YML patologian osastolla nykyinen leikattujen ihobiopsianäytteiden varastointitapa ei ole ideaalinen. Selvitimme tässä opinnäytetyössä, kuinka sitä voitaisiin kehittää. Lisäksi ehdotimme toimenpiteitä, jotka helpottavat mahdollisimman paljon laboratorion päivittäistä työkuormaa. Nämä suositukset pohjautuvat aiheeseen liittyvään kirjallisuuteen, opinnäytetyömme tuloksiin sekä omiin havaintoihimme. Suositusten ottaminen käyttöön riippuu täysin YML patologian osaston näkemyksistä, ja niitä kannattaisi testata käytännössä esimerkiksi osaston sisäisillä selvityksillä tai bioanalyttikko-opiskelijoiden tutkimusprojekteilla.

Opinnäytetyöprosessin aikana perehdyimme myös tutkimusetiikkaan. Jokaiselta tutkijalta edellytetään eettistä vastuullisuutta, erityisesti jos kyseessä on potilasnäytteitä käsittelevä aihe. Tutkimustamme varten emme tarvinneet erillistä tutkimuslupaa, sillä keräämämme aineisto koostui näytteistä, jotka olisi joka tapauksessa tutkittu laboratoriossa. Lisäksi objektilasit oli koodattu juoksevalla numerolla ja merkattu QPatin PT-numerolla. Missään vaiheessa emme käyttäneet potilaiden nimiä emmekä henkilötunnuksia.

## 9 Pohdinta

Opinnäytetyössämme tutkimme histologisista ihobiopsioista tehtyjä jääleikkeitä suoralla IF-menetelmällä. Selvitimme näiden avulla käsivärjäysmenetelmän ja osastolle lainaksi saadun VBM™-värjäysautomaatilla värjättyjen valmisteiden eroja. Tulosten perusteella Yhtyneet Medix laboratorioden johto tekee päätöksen VBM™-värjäysautomaatin hankinnasta. Lisäksi tämän raportin tarkoituksena on toimia tärkeänä aineistona Roche Oy:lle koskien VBM™-värjäysautomaatin toimivuutta patologian laboratoriossa.

Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää ja osoittaa opiskelijan valmiuksia soveltaa tietojään ja taitojaan ammattiopintoihin liittyvässä käytännön asiantuntijatehtävässä (Valtioneuvoston asetus ammattikorkeakouluista 352/2003 § 7). Tämän opinnäytetyöprosessin aikana olemme soveltaneet koulutusohjelman aikana hankkimiamme tietoja ja taitoja. Olemme soveltaneet tietojen hankinta- ja käsittelytaitojamme, tutkimus- ja kehittämistyötaitojamme, projekti- ja viestintäosaamistamme sekä tietenkin oppimaamme teoriatietoa.

Työmme merkityksellisyys alamme kehittämisessä painottuu automatisointiin ja laboratorioprosessin uudelleen suunnitteluun. Työmme tuloksia voidaan soveltaa kliinisissä patologian laboratorioissa, kun suunnitellaan siirtymistä käsivärjäysmenetelmästä automatisointiin. Olemme opinnäytetyössämme osoittaneet, että vanhan ja työlään käsivärjäysmenetelmän tilalle suunniteltu VBM™-värjäysautomaatti pystyy tuottamaan diagnostisesti laadukkaita valmisteita. Havaintomme tukevat Ventanan (2010:2) käsitystä, että automaation avulla saadaan tasalaatuisia lopputuotteita ja henkilöstöresursseja säästyy muihin työtehtäviin. Vaikka VBM™-värjäysautomaatin hankinta- ja ylläpitokustannukset ovat suuremmat kuin käsivärjäysmenetelmän kustannukset, olemme mielestämme osoittaneet, että VBM™-värjäysautomaatin avulla saavutettavat hyödyt ovat suuremmat kuin sen hankintaan käytettävät panostukset.

Kohtasimme paljon haasteita opinnäytetyöprosessin aikana. Näistä suurin oli objektiivisen, tutkittuun tietoon perustuvan ehdotuksen laatiminen värjäysautomaatin mahdollisesta hankintapäätöksestä. Lisäksi haasteena oli esittää kirjallisuuteen ja opinnäytetyömme tuloksiin perustuvia ehdotuksia toimenpiteistä, jotka helpottavat mahdollisimman paljon laboratorion päivittäistä työkuormaa. Projekti osoittautui haastavaksi erityisesti alussa, sillä se vaati meiltä jääleikkeiden valmistamisen teknistä osaamista. Laadullisen leikkeen saaminen on edellyttänyt tuntien harjoittelua, ja koko prosessin ymmärtäminen on vaatinut perehtymistä immunofluoresenssitutkimukseen liittyviin taustatietoihin.

Työelämälähtöinen ja käytännönläheinen aihe on auttanut meitä kehittämään osaamistamme tutkimuksen suorittajina ja tulevina bioanalytikoina. Prosessin aikana olemme syventäneet bioanalytiikan prosessiosaamistamme, erityisesti patologian osalta. Hahmotamme, mitä selvityksiä ja toimenpiteitä uuden laitteen hankkimiseen liittyy sekä kuinka näytteiden laboratorioprosessi etenee. Teoriaosaamisemme syveni immunofluoresenssin osalta, ja prosessin aikana meille selvisi, kuinka laajassa käytössä tämä me-

netelmä on kliinisessä laboratorioanalytiikassa. Erilaisten ihosairauksien tuntemus kasvoi myös kohdallamme huomattavasti. Erityisen ilahduttavaa oli, kun pystyimme havaitsemaan opinnäytetyöprosessin aikana hankkimiemme tietojen perusteella omalla perheenjäsenellä jo vuosia kestäneen morfean, jota terveysalan ammattilaiset eivät olleet aikaisemmin tunnistaneet. Ilman tätä opinnäytetyötä perheenjäsenemme ei olisi ehkä pitkään aikaan saanut oikeaa diagnoosia.

Opinnäytetyöprosessi vaati meiltä kykyä syventyä teorianäyttöihin ja taitoa soveltaa niitä käytäntöön. Lisäksi se vaati meiltä tilastollisten analyysien osaamista sekä kykyä käsitellä suurta määrää tietoa. Kokonaisuuden hahmottaminen ei muodostunut hetkessä, vaan prosessin edetessä muovasimme sitä erilaisin mieliekartoin. Kriittisyyttä kehitimme osaltamme sekä teorianäyttöjen arvioimisessa että omien tulosten tulkinnessa. Opinnäytetyön aikana tarvitsimme myös luovaa kekseliäisyyttä, jotta pystyimme laatimaan ratkaisuehdotuksia käytännön ongelmiin. Työn edetessä huomasimme muutamia epäkohtia, joiden mahdolliset ratkaisut esittelimme raportissamme.

Opinnäytetyömme tehtävien määrä oli suuri, ja käytännön osa vei paljon aikaa. Opinnäyteprosessin alussa laadimme tarkan aikataulun, jossa otimme huomioon velvollisuuksia meidän molempien yksityiselämässämme. Lisäksi olimme jatkuvasti kontaktissa työelämäohjaajan kanssa, joka ongelmien ilmaantuessa oli aina valmis auttamaan. Loppuraportin kirjoittamisessa suurimpana apuna oli ohjaajamme, jonka perusteelliset ja objektiiviset huomautukset olivat korvaamattomia. Opinnäytetyöprosessi vaati kompromisseja sekä työ-, opiskelu- että yksityiselämässämme, mutta opimme yhdessä ja tuimme toisiamme koko opinnäytetyöprosessin aikana. Yhteisen tavoitteen saavuttamiseksi yhdistimme erilaiset vahvuutemme. Loistava yhteistyömme, sitoutuminen tehtävään ja motivaation pitäminen olivat syitä hyvään lopputulokseen ja työn onnistumiseen.

## Lähteet

Abbott, Jared – Anderson, Larry – Baldwin, Michael – Drevyanko, Timothy – Ellbroek, Renee – Graefe, Herman – Grzybowski, John – Hansen, Kathleen – Heller, Larry – Loeb, Edward – Maas, Robert – Pradhan, Ashok – Rissman, L. Jeffrey – Scupham, Richard 2010. Handling instruction for transport media for immunofluorescence studies. Iowa Pathology Associates. Verkkodokumentti.

<<http://www.iowapath.com/documents/IPA-Immunofluorescence-Specimen-Handling-Instructions.pdf>>. Luettu 16.9.2012.

Alhola, Kari – Lauslahti, Sanna 2000. Laskentatoimi ja kannattavuuden hallinta. Porvoo: WSOY.

Aoki, Valéria – Fukumori, Lígia – Freitas, Elder – Sousa, Joaquim Jr – Périgo, Alexandre – Oliveira, Zilda 2010. Direct and indirect immunofluorescence. An Bras Dermatol. 85:4, 490–500.

BenchMark Operator Manual 2009. Käyttöopas. Ventana Medical Systems Inc.

Boudreau, Lee 2010. Basic operating principles and features of the Ventana automated stainer. Verkkodokumentti. Päivitetty 16.2.2010.

<<http://www.path.queensu.ca/epu/PathLab2/Ventana%20Pamphlet/Ventana%20Pamphlet.pdf>>. Luettu 27.4.2012.

Dako 2010. Fluorescence Mounting Medium. Pakkausseloste. Edition 06/10.

Davidson, Michael 2009. Fluorescence Microscopy. Verkkodokumentti. Päivitetty 18.9.2009.

<<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>>. Luettu 23.8.2012.

Dermatology Services 2011. University of Utah, Health Care. Verkkodokumentti.

<[http://healthcare.utah.edu/dermatology/labservices/immunodermatology/lichenplanus\\_lichenoid\\_reactions.php](http://healthcare.utah.edu/dermatology/labservices/immunodermatology/lichenplanus_lichenoid_reactions.php)>. Luettu 9.9.2012.

Duodecim Terveyskirjasto 2011. Verkkodokumentti.

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Itt03075&p\\_haku=seksitiivisyys](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Itt03075&p_haku=seksitiivisyys)>. Luettu 10.10.2012.

FITC Anti C3 Primary Antibody 2008. Reagenssin käyttöohje. Ventana Medical Systems, Inc.

FITC Anti IgA Primary Antibody 2008. Reagenssin käyttöohje. Ventana Medical Systems, Inc.

FITC Anti IgG Primary Antibody 2008. Reagenssin käyttöohje. Ventana Medical Systems, Inc.

FITC Anti IgM Primary Antibody 2008. Reagenssin käyttöohje. Ventana Medical Systems, Inc.

Hannuksela, Matti 2007. Punajäkälä (lichen ruber planus). Verkkodokumentti. Päivitetty 11.2.2007.

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00476](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00476)>.  
Luettu 23.8.2012.

Hannuksela, Matti 2011. Pemfigoidi. Verkkodokumentti. Päivitetty 28.9.2011

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00594](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00594)>.  
Luettu 23.8.2012.

Hannuksela, Matti 2012a. Ihokeliakia (dermatitis herpetiformis). Verkkodokumentti. Päivitetty 24.9.2012.

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00266](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00266)>.  
Luettu 26.9.2012.

Hannuksela, Matti 2012b. Skleroderma iholla. Verkkodokumentti. Päivitetty 24.9.2012.

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00489](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00489)>.  
Luettu 2.11.2012.

Hannuksela-Svahn, Anna 2007. Pemfigoidirakkulat. Verkkodokumentti.

Päivitetty 23.11.2007.

<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ldk00147](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ldk00147)>.  
Luettu 30.8.2012.

Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2003. Tutki ja kirjoita. 6.–9. painos. Helsinki: Tammi.

Histocon 2000. Technical Data Sheet. Verkkodokumentti. Päivitetty 2.7.2001.

<<http://www.polysciences.com/SiteData/poly/Assets/DataSheets/225.pdf>>.  
Luettu 12.10.2012.

Histology 2006. Microscopic appearance of pathology specimens. Verkkodokumentti.

Päivitetty 9.6.2006.

<<http://www.flickr.com/photos/58937697@N00/sets/72157594394732592/>>.  
Luettu 9.9.2012.

Hladik, Christa – White, Charles 2008. Immunofluorescent Techniques. Teoksessa Bancroft, John – Gamble, Marilyn (toim.): Theory and Practice of Histological Techniques. Lontoo: Churchill Livingstone. 517–526.

Huotari-Orava, Riitta 2011a. Ihon immunofluoresenssitutkimukset: IF-löydöksistä diagnoosiin. Luentotiivistelmä. Laboratoriolääketiede ja näyttely 2011. Helsinki. 6.10.

Huotari-Orava, Riitta 2011b. Ihottumanäytteiden diagnostiikka. Luentotiivistelmä. Laboratoriolääketiede ja näyttely 2011. Helsinki. 6.10.

IHC World 2011. Michel's fluid for transporting cells or specimens. Verkkodokumentti.

Päivitetty 23.3.2011. <[www.ihcworld.com/\\_faq/histology-faq/fixation/f9.htm](http://www.ihcworld.com/_faq/histology-faq/fixation/f9.htm)>.  
Luettu 18.7.2012.

Ilvesaro, Joanna 2011. Immunofluoresenssivärjäykset histologisissa näytteissä.

Verkkodokumentti. Päivitetty 20.11.2011.

<[www.bioanalyttikkoliitto.fi/@Bin/180052/Joanna+Ilvesaro.pdf](http://www.bioanalyttikkoliitto.fi/@Bin/180052/Joanna+Ilvesaro.pdf)>. Luettu 15.7.2011.



Immunofluorescence 2010. Skin Pathology Laboratory. Verkkodokumentti. Päivitetty 7.10.2010.

<<http://www.skinpathlab.com/services/immunofluorescence.html>>. Luettu 9.9.2012.

Jonsson, Roland – Kristensson-Aas, Aud – Kutti, Jack 1978. Assessment of a tissue transport-medium in preservation of tissue-fixed immunoglobulins and complement demonstrated by direct immunofluorescence. *Journal of Clinical Pathology* 1978, 31: 823–826.

Jyrkkiö, Esa – Riistama, Veijo 2001. Laskentatoimi päätöksenteon apuna. 13.–14. painos. WSOY: Porvoo.

Konttinen, Yrjö 2007. Vaskuliitit. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.9.2007.

<<http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Vaskuliitit>>. Luettu 25.4.2012.

Kuivanen, Tiina – Jeskanen, Leila – Autio, Pekka 2004. Koepala ihosta – aiheet ja tekniikka. *Suomen Lääkärilehti* 8:765–767.

Lintunen, Minnamaija 2012. Immunofluoresenssivärjäykset ja niiden laadunvarmistus. Labquality, luentolyhennelmä 10.2.2012.

Mohan, Kudur – Sathish, Pai – Raghavendra, Rao – Sripathi, Handattu – Prabhu, Smitha 2008. Techniques of Immunofluorescence and their Significance. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 74:514–419.

Oikarinen, Aarne – Tasanen-Määttä, Kaisa. 2003. Ihon rakenne, tehtävät ja toiminta. Teoksessa Hannuksela, Matti – Karvanen, Jaakko – Reunala, Timo – Suhonen, Raimo (toim): *Ihotaudit*. Helsinki: Duodecim. 12–18.

Osman, Abdulfatah – McCreery, Charles 2000. Cardiac Vasculitis in Henoch-Schönlein Purpura. *Circulation* 101:69.

Pellinen, Jukka 2006. Kustannuslaskenta ja kannatavuusajattelu. 2. painos. Helsinki: Talentum. 74.

Pettersson, Tom – Karjalainen, Anna 2010. Pienten suonten vaskuliittien diagnostiikka ja hoito. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 126 (12). 1496–507.

Polysciences Inc. 2012. Michel's Buffer. Tuote-esittely. Verkkodokumentti.

<[http://www.polysciences.com/Catalog/Department/Product/98/categoryId\\_\\_130/PageIndex\\_\\_-1/productId\\_\\_1785/](http://www.polysciences.com/Catalog/Department/Product/98/categoryId__130/PageIndex__-1/productId__1785/)>. Luettu 18.7.2012.

Puomio, Jukka 2012. Myyntipäällikkö. Algol Pharma. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 17.7.

Ramdial, Pratista – Bastian, Boris – Goodlad, John – McGrath, John – Lazar, Alexander 2012. Specialized techniques in dermatopathology: Immunofluorescence. Teoksessa Calonje, Eduardo – Brenn, Thomas – Lazar, Alexander – McKee, Phillip. *McKee's Pathology of the Skin*. Edinburgh: Elsevier Saunders. 35–39.

Reitamo, Sakari 2007. Sidekudostaudit. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.9.2007.

<<http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Sidekudostaudit>>. Luettu 25.4.2012.

- Reunala, Timo 2007. Rakkulataudit. Verkkodokumentti. Päivitetty 11.9.2007  
<<http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Rakkulataudit>>. Luettu 25.4.2012.
- Robinson, Paul – Sturgis, Jennifer – Kumar, George 2009. Immunofluorescence. Teoksessa: Kumar, George – Rudbeck, Lars. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. Kalifornia: Dako North America. 61–65.
- Seidman 2011. Myositis. Verkkodokumentti. Päivitetty 6.4.2011.  
<<http://emedicine.medscape.com/article/1869808-overview#aw2aab6b5>>. Luettu 9.9.2012.
- Suhonen, Raimo 2007. Henoch-Schönleinin purppura. Verkkodokumentti. Päivitetty 15.10.2007. <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/ima/131.167.jpg>>. Luettu 31.8.2012.
- Suhonen, Raimo – Cajanus, Suvi 2007. Henoch-Schönleinin purppura säärissä. Verkkodokumentti. Päivitetty 15.10.2007.  
<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ima01972](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ima01972)>. Luettu 31.8.2012.
- Suhonen, Raimo 2008. Ihokeliakia. Verkkodokumentti. Päivitetty 27.9.2011.  
<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ldk00324](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ldk00324)>. Luettu 31.8.2012.
- Taanila, Aki 2012. Tilastollinen päättely. Verkkodokumentti. Päivitetty 14.4.2012.  
<<http://myy.haaga-helia.fi/~taaak/p/paattely.pdf>>. Luettu 10.10.2012.
- Työturvallisuuskeskus 2012. Psykososiaalinen työkuormitus. Verkkodokumentti.  
<[www.ttk.fi/tyosuojelu/psykososiaalinen\\_tyokuormitus](http://www.ttk.fi/tyosuojelu/psykososiaalinen_tyokuormitus)>. Luettu 30.8.2012.
- Valtioneuvoston asetus ammattikorkeakouluista 352/2003. Annettu Helsingissä 15.5.2003.
- Ventana 2010. Basic operating principles and features of the Ventana automated stainer. Työohje.
- Virolainen, Susanna 2012. Dosentti, ihotautien ja patologian erikoislääkäri. Helsinki. Haastattelu 16.5.2012.
- Yamanaka C.T. – Gibbs, Neil 1999. Trauma-induced linear scleroderma. *Cutis* 63:29–32.
- YML 2011. Työohje: Suora immunofluoresenssitutkimus jääleikkeille. Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy, patologian osasto. Helsinki.

## Käsivärjäyksen työohje

Suora immunofluoresenssivärjäys jääleikkeille

1. Otetaan esille sopiva määrä näytepidikkeitä ja merkitään kullekin vasta-aineelle oma teline.
2. Jääleikkeitä sisältävät objektilasit laitetaan näytepidikkeisiin ja huuhdellaan PBS-puskurissa.
3. Objektilasit laitetaan näytepidikkeissään niihin tarkoitettuihin trakkeihin.
4. Objektilaseja huuhdellaan PBS-puskurissa ja tarkistetaan, että pidikkeet ovat sopivasti kiinni ja PBS-puskuri pääsee valumaan sopivalla nopeudella pois pidikkeistä.
5. Lisätään PBS-puskuria 3-4 kertaa.
6. Valmistetaan vasta-ainelaimennokset:
  - a. kirjoitetaan muoviputkiin vasta-aineiden tunnistetiedot (IgA, IgG, IgM, C3)
  - b. pipetoidaan taulukon 1 mukaisesti NaCl-liuosta ja vasta-aineita muoviputkiin

Taulukko 1. Immunoglobuliineista tehtävät laimennokset (YML 2011).

Vasta-aine	Objektilaseja, kpl	Immunoglobuliinia, µl	NaCl, µl
IgA (1:10)	6	100	900
	13	200	1800
	17	250	2250
IgG (1:20)	6	50	950
	13	100	1900
	17	125	2375
IgM (1:20)	6	50	950
	13	100	1900
	17	125	2375
C3 (1:50)	6	20	980
	13	40	1960
	17	50	1950

7. Pidikkeissä olevien objektilasien päälle pipetoidaan immunoglobuliinilaimennosta noin 140 µl/lasi.
8. Objektilaseja inkuboidaan 30 minuuttia valolta suojattuina.
9. Värjätyt objektilasit pestään kahteen kertaan PBS-puskurissa muutaman minuutin ajan.
10. Objektilasit ilmakeivataan pystyasennossa valolta suojattuina.

**IgA**

Step No	Procedure Step
1	***** Start Timed Steps *****
2	Warmup Slide to 42 Deg C, and Incubate for 2 Minutes
3	***** Select Reaction Buffer *****
4	Rinse Slide +
5	Adjust Slide Volume
6	Rinse Slide +
7	Adjust Slide Volume
8	Apply One Drop of [FITC ANTI-IgA] ( Fluorescent Ab ), Apply Coverslip, and Incubate for [32 Minutes]
9	Rinse Slide +
10	Adjust Slide Volume
11	Apply Coverslip
12	***** Start Untimed Steps *****
13	Rinse Slide +

**IgG**

Step No	Procedure Step
1	***** Start Timed Steps *****
2	Warmup Slide to 42 Deg C, and Incubate for 2 Minutes
3	***** Select Reaction Buffer *****
4	Rinse Slide +
5	Adjust Slide Volume
6	Rinse Slide +
7	Adjust Slide Volume
8	Apply One Drop of [FITC ANTI-IgG] ( Fluorescent Ab ), Apply Coverslip, and Incubate for [32 Minutes]
9	Rinse Slide +
10	Adjust Slide Volume
11	Apply Coverslip
12	***** Start Untimed Steps *****
13	Rinse Slide +

\* one drop is one reagent dispense

## IgM

Step No	Procedure Step
1	***** Start Timed Steps *****
2	Warmup Slide to 42 Deg C, and Incubate for 2 Minutes
3	***** Select Reaction Buffer *****
4	Rinse Slide +
5	Adjust Slide Volume
6	Rinse Slide +
7	Adjust Slide Volume
8	Apply One Drop of [FITC ANTI-IgM] ( Fluorescent Ab ), Apply Coverslip, and Incubate for [32 Minutes]
9	Rinse Slide +
10	Adjust Slide Volume
11	Apply Coverslip
12	***** Start Untimed Steps *****
13	Rinse Slide +

\* one drop is one reagent dispense

**C3**

Step No	Procedure Step
1	***** Start Timed Steps *****
2	Warmup Slide to 42 Deg C, and Incubate for 2 Minutes
3	***** Select Reaction Buffer *****
4	Rinse Slide +
5	Adjust Slide Volume
6	Rinse Slide +
7	Adjust Slide Volume
8	Apply One Drop of [FITC ANTI-C3] ( Fluorescent Ab ), Apply Coverslip, and Incubate for [32 Minutes]
9	Rinse Slide +
10	Adjust Slide Volume
11	Apply Coverslip
12	***** Start Untimed Steps *****
13	Rinse Slide +

\* one drop is one reagent dispense

## Lomake tulosten tallentamista varten

Pvm	Nro	VA	Leike 1=hyvä 2=huono	Väri 1=hyvä 2=huono	Kommentit	Lausunto	IgA	IgG	IgM	C3
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
						Colloid bodit				
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
						Colloid bodit				
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
		HE				Colloid bodit				
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
						Colloid bodit				
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
		HE				Colloid bodit				
		IgA				Tyvikalvo				
		IgG				Soluvälit				
		IgM				Tumat				
		C3				Kapillaarit				
						Colloid bodit				



0 viikkoa		Tyvikalvo				Soluvälit				Tuma				Kapillaarit				Kolloidikappaleet				Yhteensä
		IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	
Käsi	pos		5		8												2			1		16
	pos/neg																					0
	neg	50	45	50	42	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	48	50	50	49	50	984
	Ei fluor.*	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	80
VBM™	pos		5		11												2			2	1	21
	pos/neg		3																			3
	neg	54	46	54	43	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	52	54	54	54	53	1058
	Ei fluor.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*Fluoresenssi ei luettavissa

2 viikkoa		Tyvikalvo				Soluvälit				Tuma				Kapillaarit				Kolloidikappaleet				Yhteensä
		IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	
Käsi	pos		2		3																	5
	pos/neg		1																			1
	neg	14	11	14	11	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	274
VBM™	pos	14	5		7																	26
	pos/neg		1																			1
	neg	14	8	14	7	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	267

4 viikkoa		Tyvikalvo				Soluvälit				Tuma				Kapillaarit				Kolloidikappaleet				Yhteensä
		IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	IgA	IgG	IgM	C3	
Käsi	pos				1															1		2
	pos/neg		1		1																	2
	neg	8	7	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	156
VBM™	pos		3	1	3															1		8
	pos/neg				1																	1
	neg	8	5	7	4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	151

Näyte	PT nr	Vrk*	menetelmä	tulos	Säilyvyystutkimus		Huomioitavaa	Löydös
					2 vk	4 vk		
1	7792	11	käsi	–				
2			VBM™	–				
3	7965	8	käsi	–				
4			VBM™	–				
5	7966	7	käsi	–				
6			VBM™	–				
7	8390	6	käsi	–				
8			VBM™	–				
9	8704	13	käsi	–				
10			VBM™	–				
11	8806	10	käsi	–	–	+ (samea)	otettu rakkulasta	C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
12			VBM™	+	+	+		
13	8808	9	käsi	–				
14			VBM™	–				
15	8984	9	käsi	+	+	+	C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin	
16			VBM™	+	+	+		
17	9008	9	käsi	–				
18			VBM™	–				
19	9130	7	käsi	–				
20			VBM™	–				
21	9152	8	käsi	– (utuinen)				
22			VBM™	–				
23	9154	8	käsi				fluoresenssi ei luettavissa	
24			VBM™	–				
25	9156	8	käsi	–			huonosti arvioitavissa	
26			VBM™	–				

\* Näytteen säilytysaika kuljetusluoksessa näytteenotosta värjäyspäivään (vrk)

Näyte	PT nr	Vrk*	menetelmä	tulos	Säilyvyystutkimus		Huomioitavaa	Löydös
					2 vk	4 vk		
27	9173	7	käsi				fluoresenssi ei luettavissa	
28			VBM™	–				
29	9174	7	käsi				fluoresenssi ei luettavissa	
30			VBM™	–				
31	9444	3	käsi				fluoresenssi ei luettavissa	
32			VBM™	–				
33	9701	7	käsi	+	+	+		IgG tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
34			VBM™	+ (tausta)	+	+		
35	9702	7	käsi	– (heikko fl)				
36			VBM™	–				
37	9857	6	käsi	– (heikko fl)				
38			VBM™	–				
39	9825	7	käsi				ei diagnostinen	
40			VBM™					
41	9856	6	käsi	– (heikko fl)				
42			VBM™	–				
43	6874	1	käsi	– (heikko fl)	– (samea)	–		
44			VBM™	– (heikko fl)	– (samea)	–		
45	6927	1	käsi	– (heikko fl)	– (samea)	–		
46			VBM™	– (heikko fl)	– (samea)	–		
47	3973	7	käsi	+ (heikko)	+	+		IgG ja C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
48			VBM™	+	+	+		
49	6334	8	käsi	– (heikko fl)	– (samea)	–		
50			VBM™	–	–	–		

\* Näytteen säilytysaika kuljetusliuoksessa näytteenotosta värjäyspäivään (vrk)

xx Pakastimessa varastoitu, positiivinen näyte

+ Pakastimessa varastoitu positiivinen näyte, joka uudelleen tutkimisen jälkeen oli edelleen positiivinen

Näyte	PT nr	Vrk*	menetelmä	tulos	Säilyvyystutkimus		Huomioitavaa	Löydös
					2 vk	4 vk		
51	6089	5	käsi	– (heikko fl)	– (samea)	–		
52			VBM™	– (heikko fl)	–	–		
53	6189	11	käsi	– (heikko fl)	– (samea)	–		
54			VBM™	–	– (samea)	–		
55	897	7	käsi	+	– (samea)	–		IgG ja C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
56			VBM™	+	+	+		
57	10109	7	käsi	–	–	–		
58			VBM™	–	–	–		
59	10110	7	käsi	–				
60			VBM™	–				
61	10263	6	käsi	–	– (samea)	– (samea)		C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
62			VBM™	+	+	+		
63	10493	3	käsi				epidermis puuttuu	Näyte ei diagnostinen
64			VBM™					
65	10649	3	käsi	–				
66			VBM™	–				
67	5756	6	käsi	– (samea)				alkuperäinen löydös viittaa pemfigoidiin
68			VBM™	–				
69	898	7	käsi	– (samea)				
70			VBM™	–				
71	1809	8	käsi	– (samea)				
72			VBM™	– (samea)				
73	10795	5	käsi	+	+	+		Gr. C3 tk:lla, viittaa d. herpetiformikseen
74			VBM™	–	+	+		

\* Näytteen säilytysaika kuljetusluoksessa näytteenotosta värjäyspäivään (vrk)

xx Pakastimessa varastoitu, positiivinen näyte

+ Pakastimessa varastoitu positiivinen näyte, joka uudelleen tutkimisen jälkeen oli edelleen positiivinen

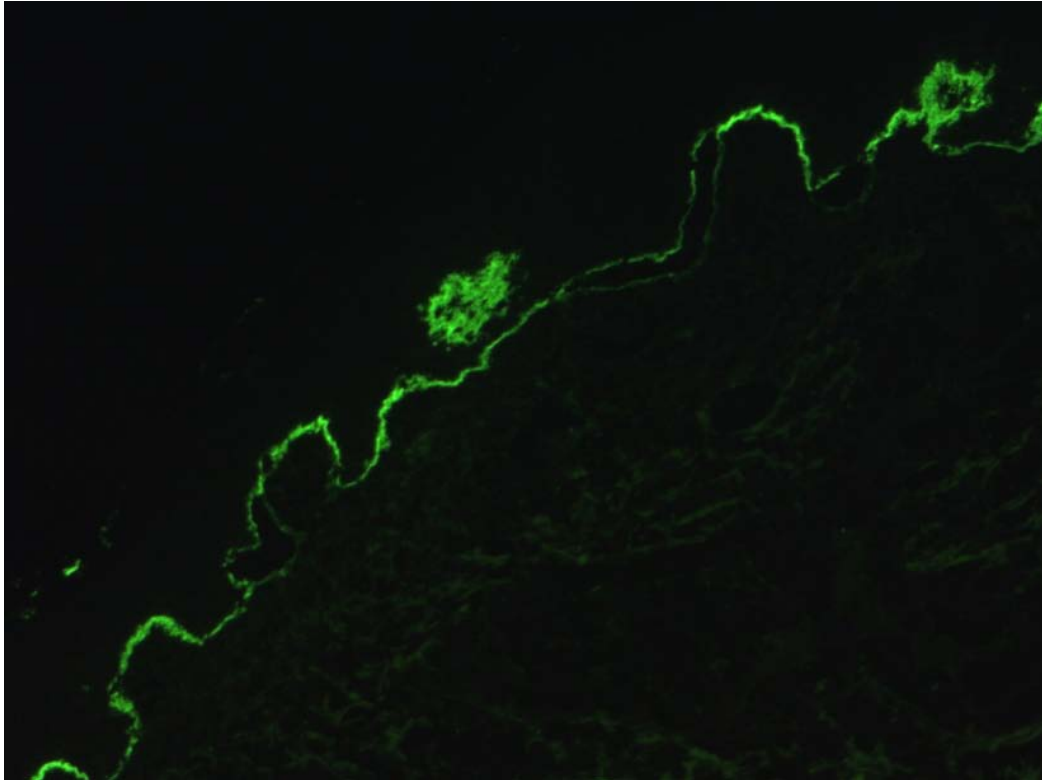
Näyte	PT nr	Vrk*	menetelmä	tulos	Säilyvyystutkimus		Huomioitavaa	Löydös
					2 vk	4 vk		
75	10796	5	käsi	+	-	-		Granulaarinen C3 tyvikalvolla, viittaa dermatitis herpetiformikseen
76			VBM™	+	-	-		
77	10797	4	käsi	-				
78			VBM™	-				
79	10798	5	käsi	-				
80			VBM™	-				
81	11115	10	käsi	- (samea)			Michel-liuos vanhentunut (5 vrk yli)	
82			VBM™	-				
83	11116	8	käsi	-				
84			VBM™	-				
85	11151	11	käsi	- (samea)	+	+		
86			VBM™	+	+	+		Löydös ei ole diagnostinen
87	11506	7	käsi	- (samea)	-	-		
88			VBM™	+	+	+		Gr. C3 tk:lla, viittaa d. herpetiformikseen
89	11507	7	käsi	-			Michel-liuos vanhentunut (5 vrk yli)	
90			VBM™	-				
91	11519	6	käsi	-				
92			VBM™	-				
93	11780	12	käsi	+				C3 tyvikalvolla ja kapillaareissa, viittaa vaskuliittiin
94			VBM™	+				
95	11973		käsi	+				IgG ja C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
96			VBM™	+				
97	12111	6	käsi	+				Löydös ei ole diagnostinen
98			VBM™	+				

\* Näytteen säilytysaika kuljetusliuoksessa näytteenotosta värjäyspäivään (vrk)

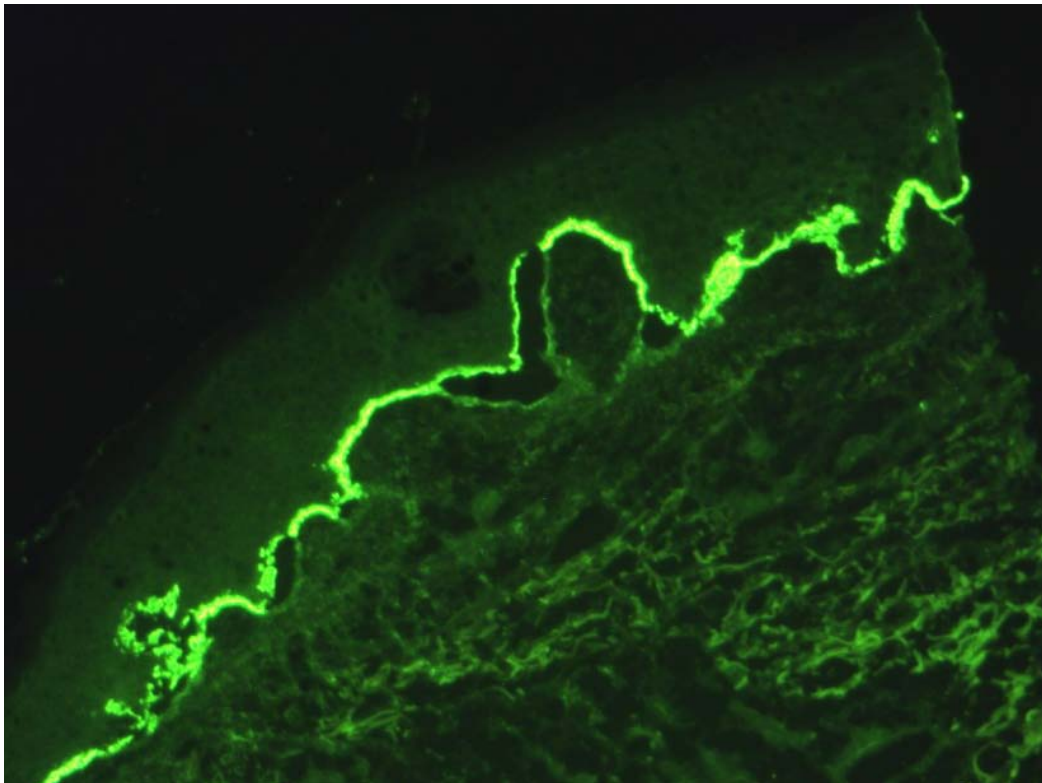
Näyte	PT nr	Vrk*	menetelmä	tulos	Säilyvyystutkimus		Huomioitavaa	Löydös
					2 vk	4 vk		
99	12113	6	käsi	–				
100			VBM™	–				
101	12136	6	käsi	–				
102			VBM™	–				
103	12137	6	käsi	–				
104			VBM™	–				
105	12038	5	käsi	–				
106			VBM™	–				
107	12484	4	käsi	+				Löydös ei ole diagnostinen
108			VBM™	+				
109	12486	1	käsi	+				IgG ja C3 tyvikalvolla, viittaa pemfigoidiin
110			VBM™	+				

\* Näytteen säilytysaika kuljetusliuksessa näytteenotosta värjäyspäivään (vrk)

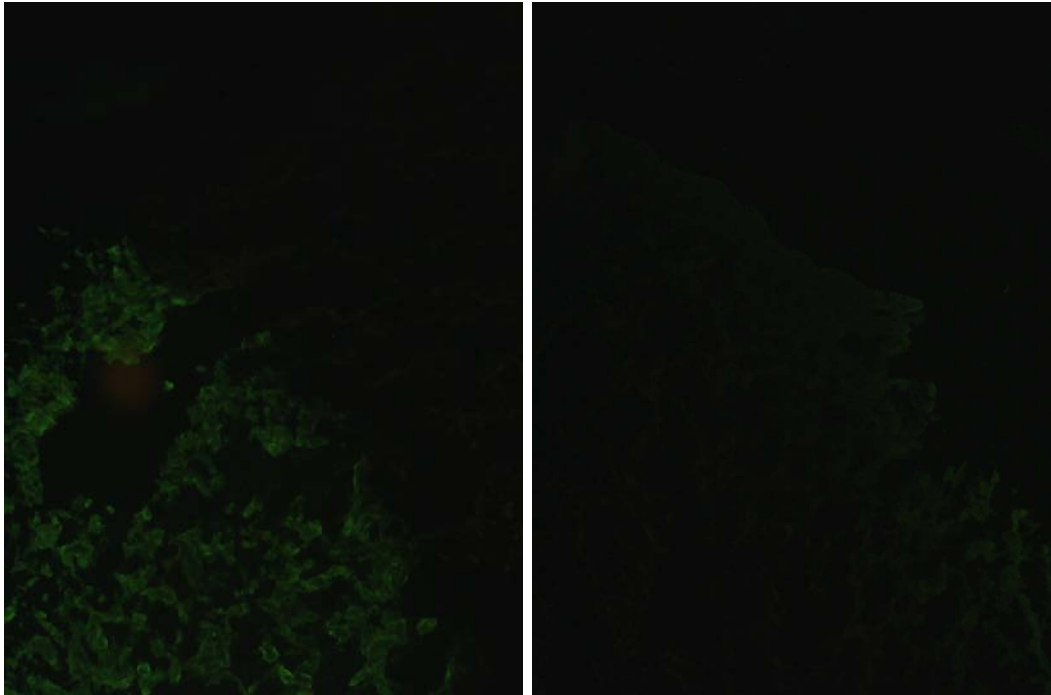
**Fluoresenssimikroskoopilla otettuja kuvia objektilaseista**  
(kaikki kuvat © Kukka Ankeriasniemi)



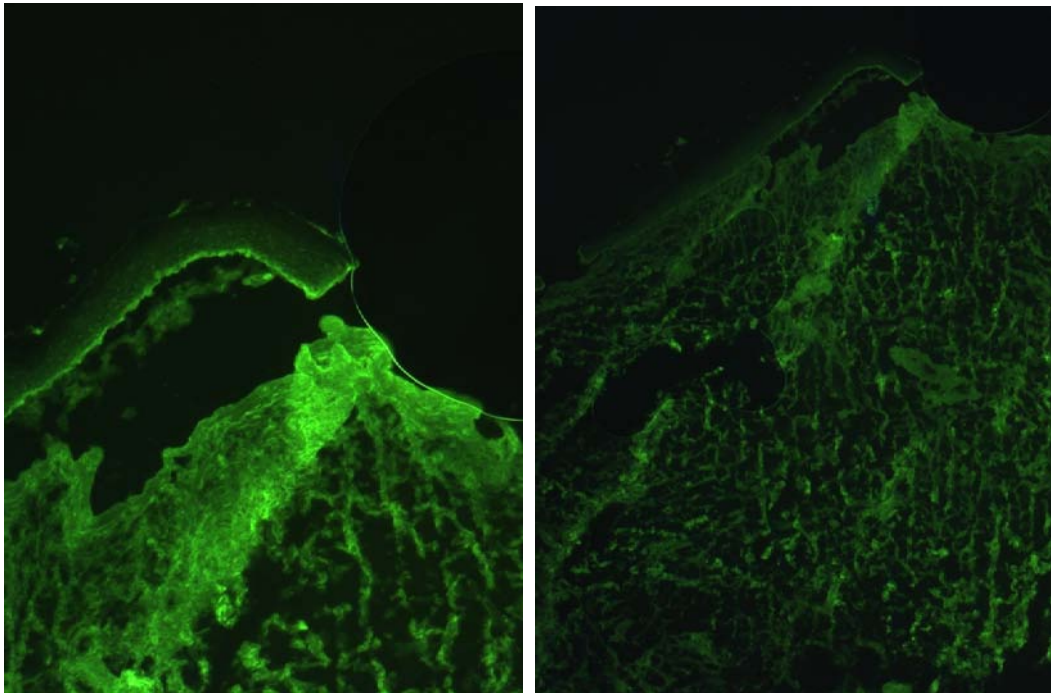
**Kuvio 1. PT12-12486, käsivärjäys. Tyvikalvolla IgG positiivinen.**



**Kuvio 2. PT12-12486, Automaattivärjäys. Tyvikalvolla IgG positiivinen.**

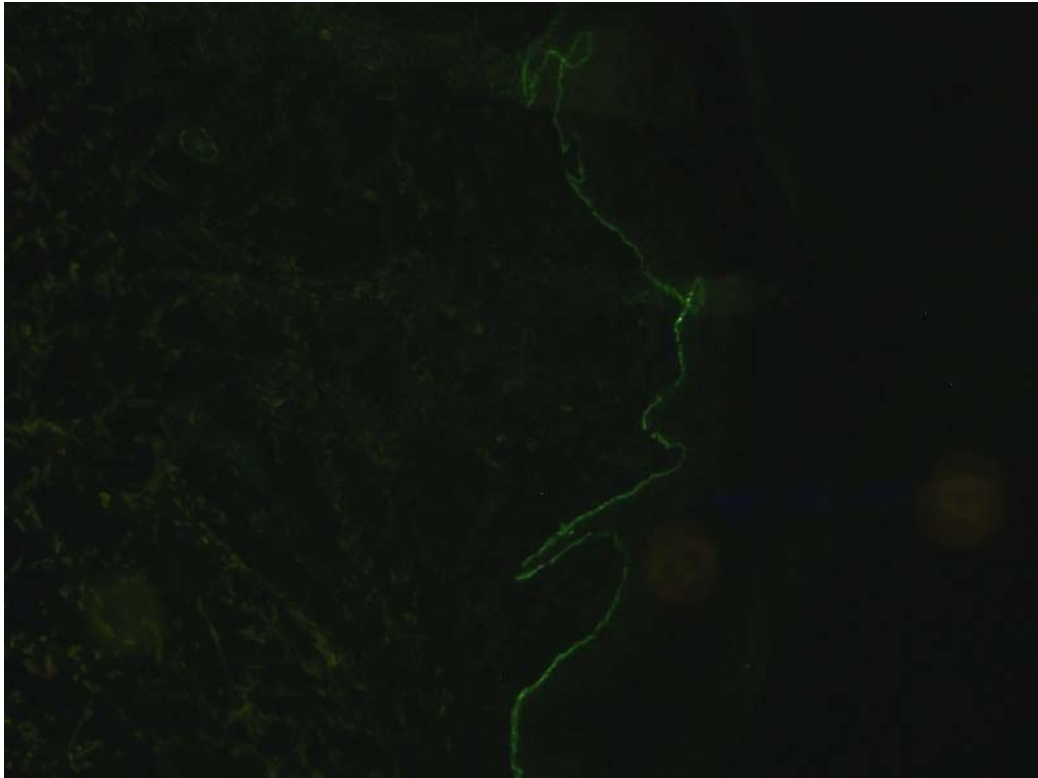


**Kuvio 3. PT12-8806. Käsivärjäys, IgG negatiivinen, väri huono, repaleinen leike rakkulasta.**

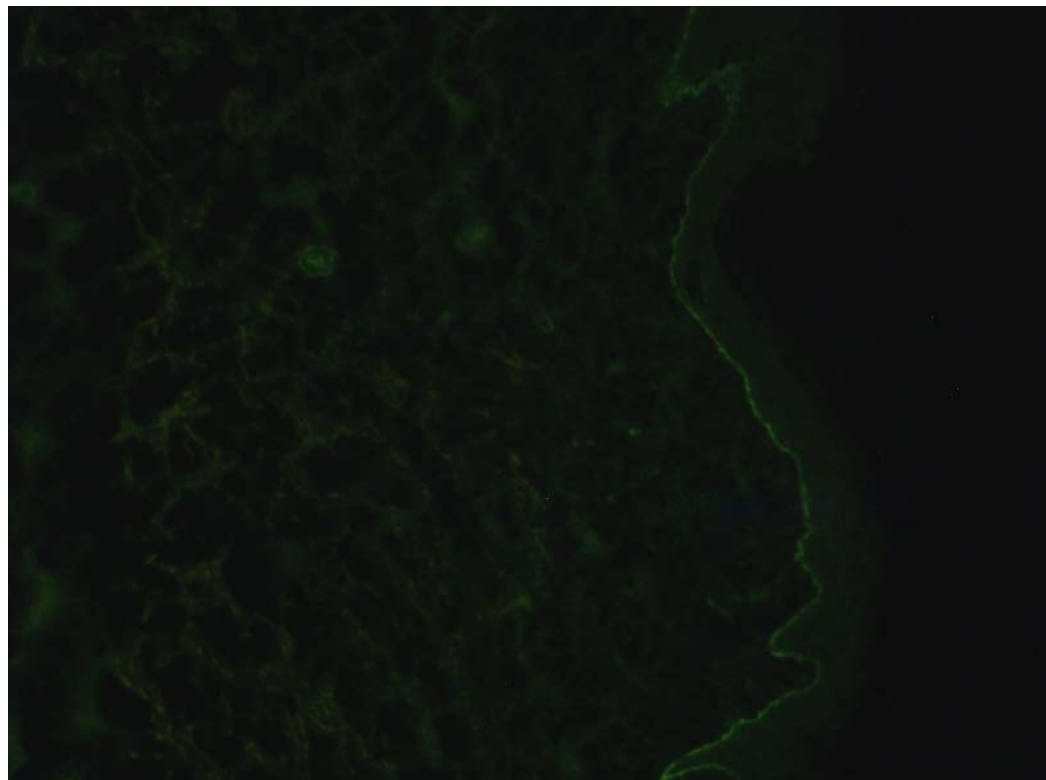


**Kuvio 4. PT12-8806. Automaattivärjäys, IgG tyvikalvolla positiivinen, väri hyvä, repaleinen leike rakkulasta.**

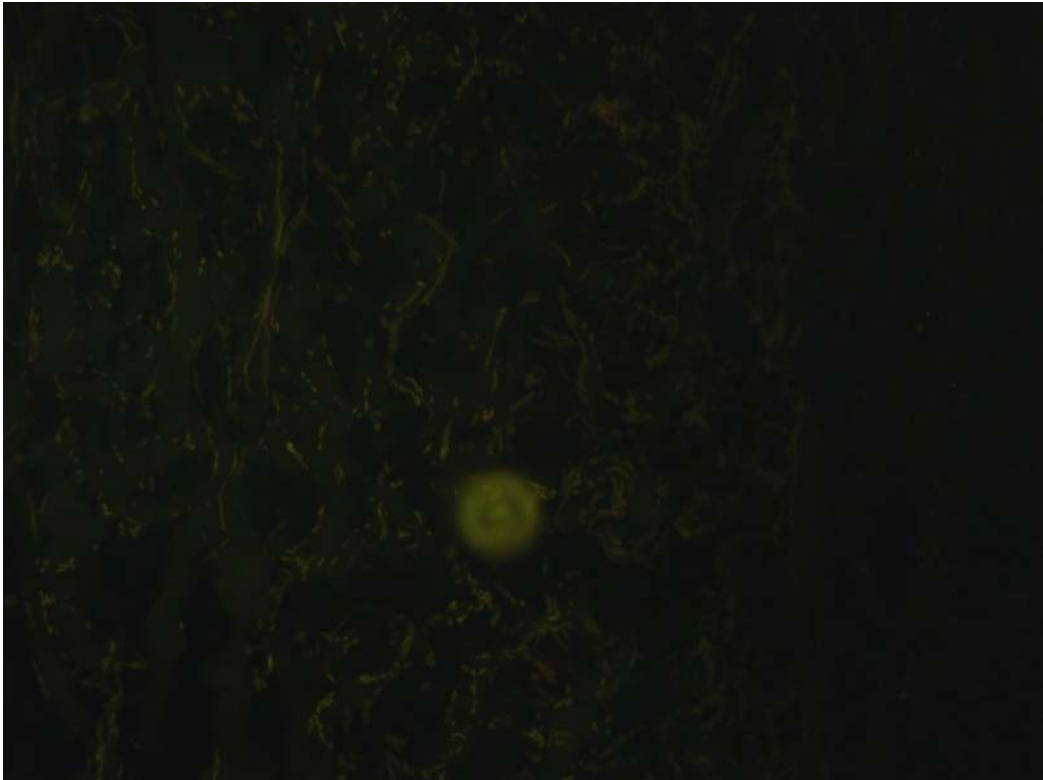




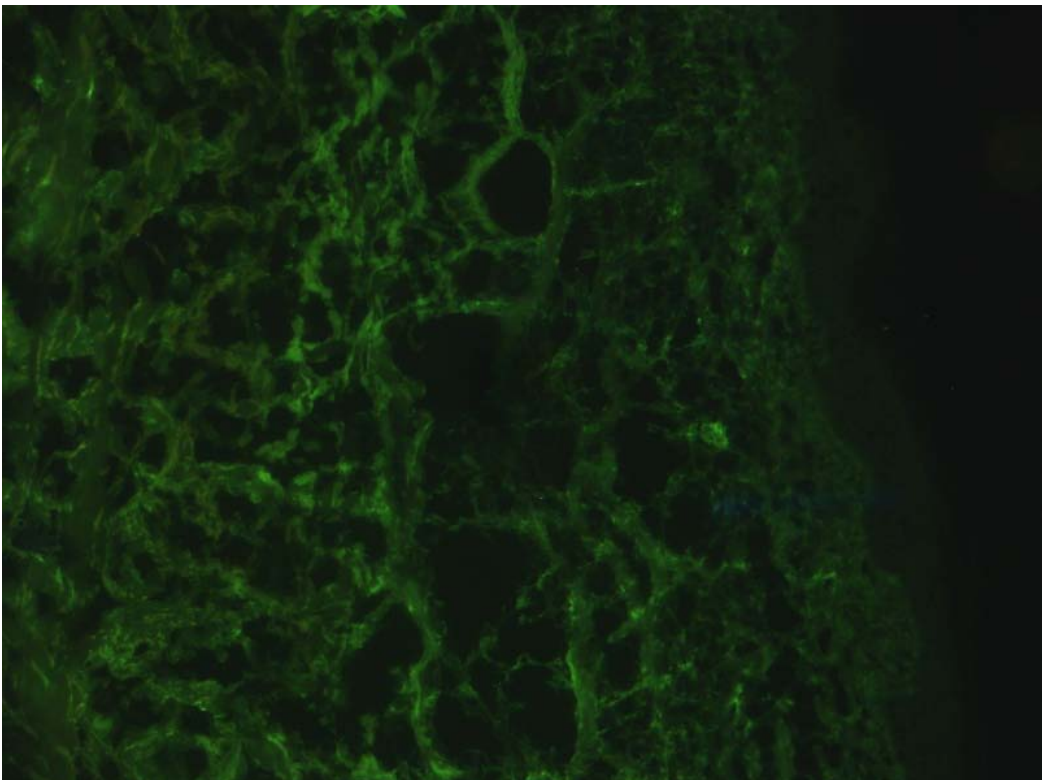
**Kuvio 5. PT12-8984. Käsivärjäys. Tyvikalvolla C3 positiivinen, väri hyvä.**



**Kuvio 6. PT12-8984. Automaattivärjäys. Tyvikalvolla C3 positiivinen, väri hyvä.**



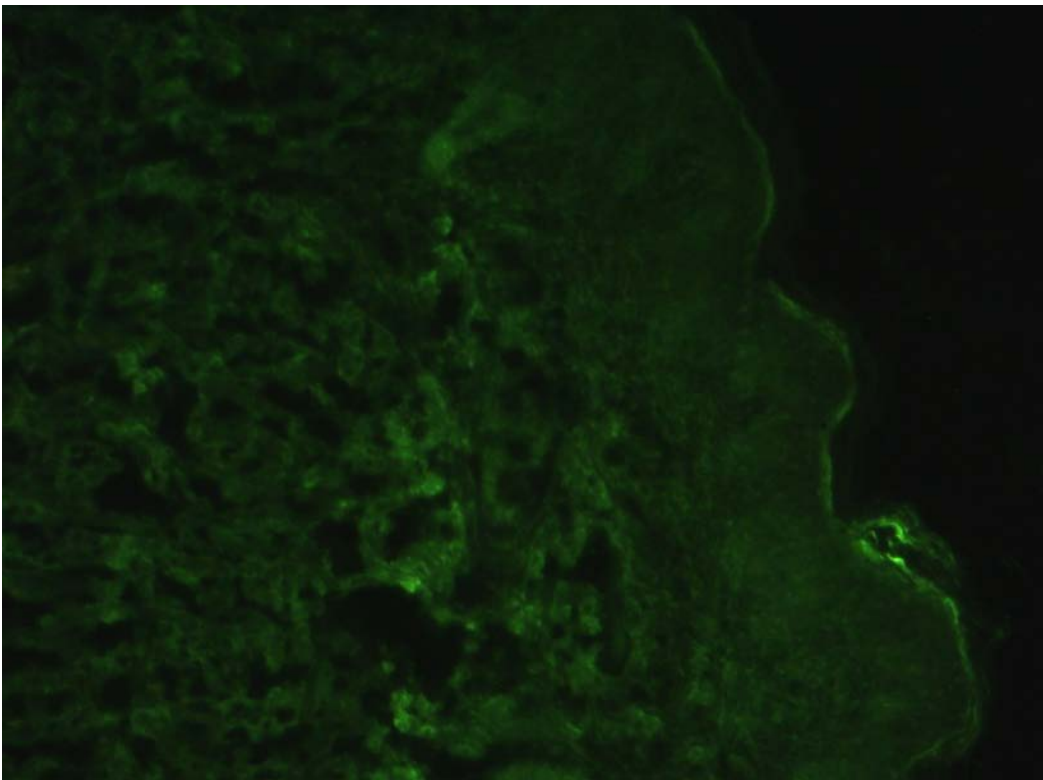
Kuvio 7. PT12-9152, Käsivärjäys. IgA negatiivinen. Väri huono, utuinen.



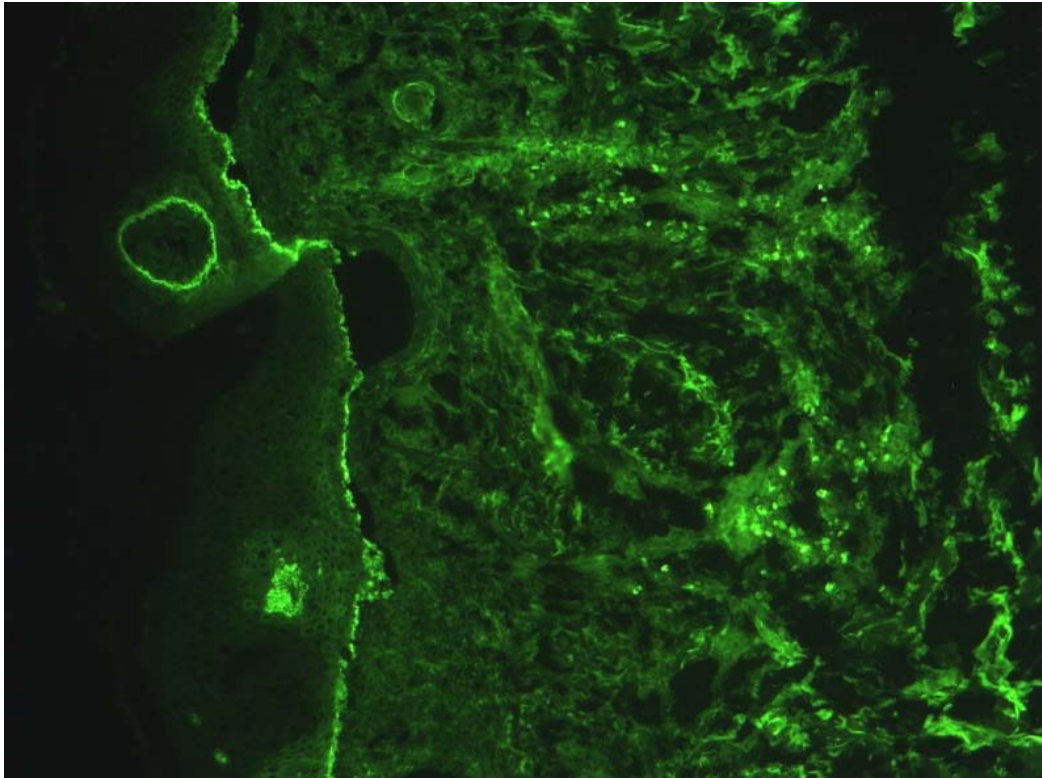
Kuvio 8. PT12-9152. Automaattivärjäys. IgA negatiivinen, väri hyvä.



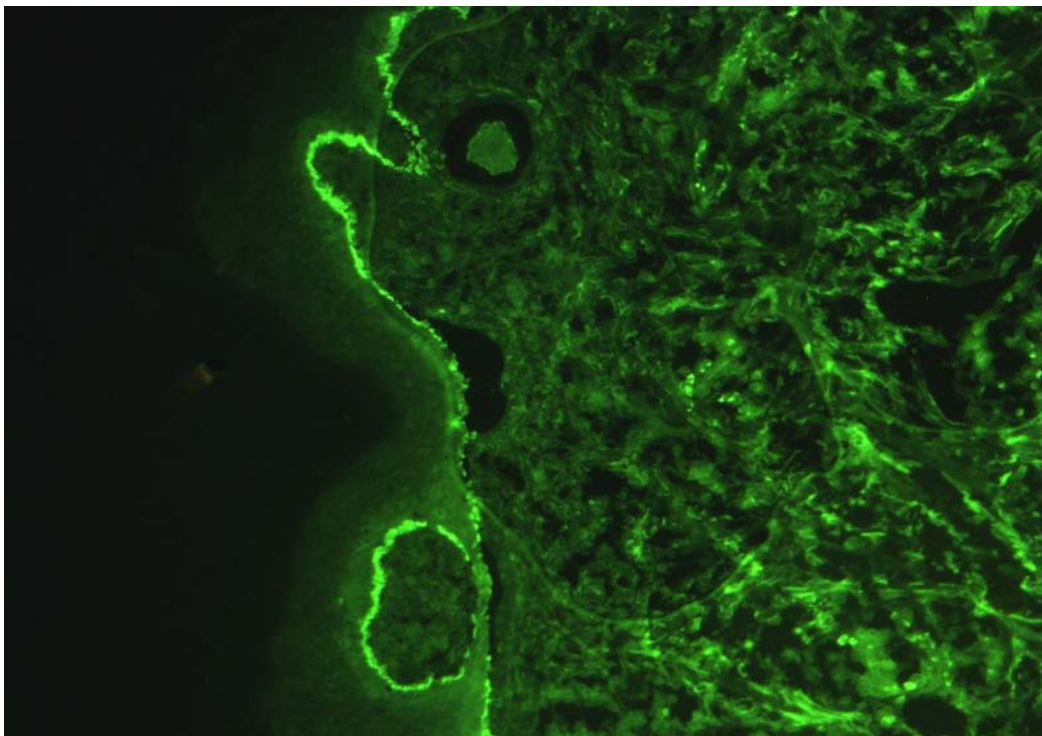
Kuvio 9. PT12-9154. Käsivärjäys. IgG ei arvioitavissa, fluoresenssi ei luettavissa.



Kuvio 10. PT12-9154. Automaattivärjäys. IgG negatiivinen. Väri hyvä.



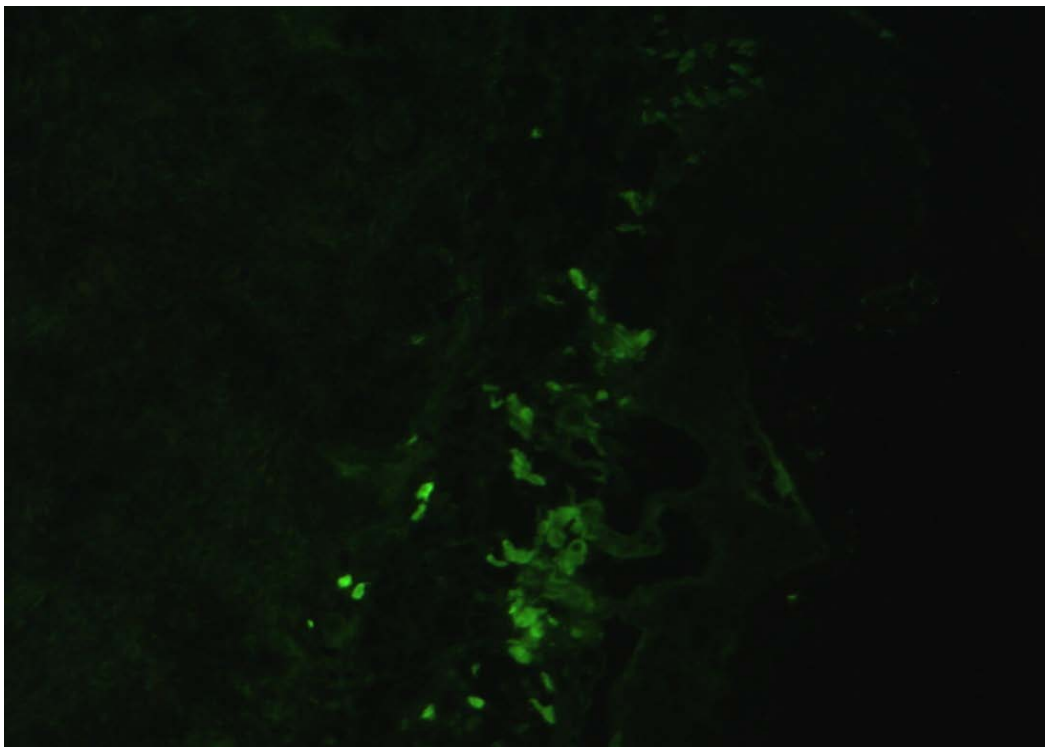
**Kuvio 11. PT12-3973, pakastettu positiivinen näyte. Käsivärjäys. Tyvikalvolla IgG positiivinen. Väri hyvä.**



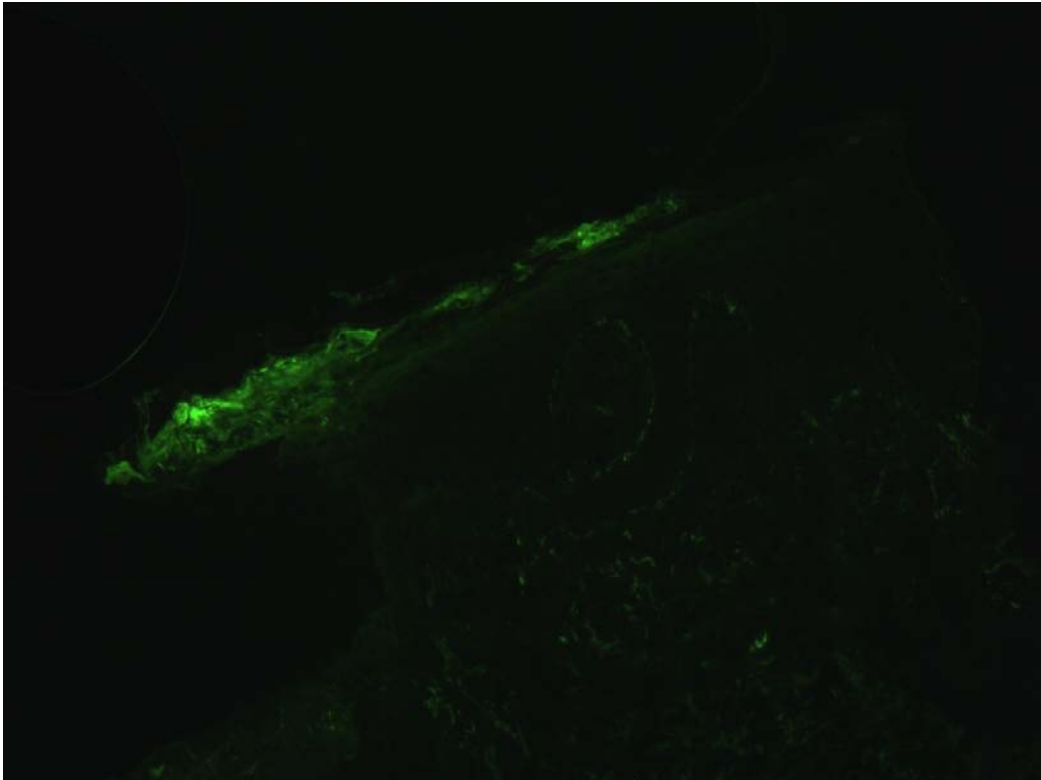
**Kuvio 12. PT12-3973, pakastettu positiivinen näyte. Automaattivärjäys. Tyvikalvolla IgG positiivinen. Väri hyvä.**



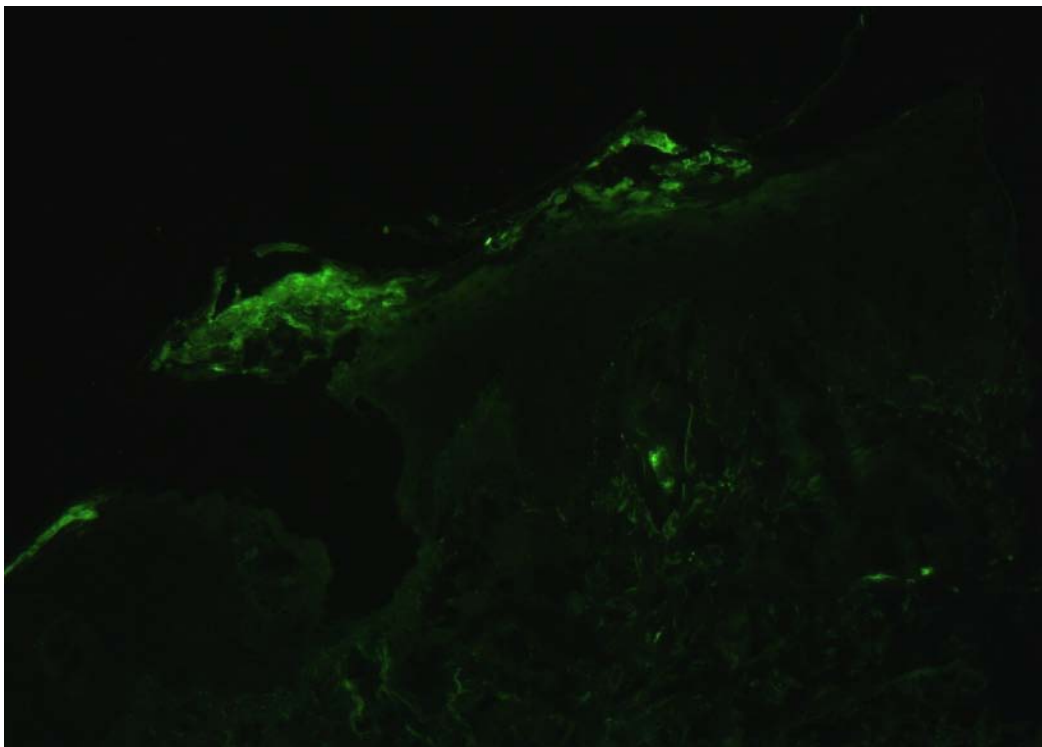
**Kuvio 13. PT12-5756, pakastettu positiivinen näyte. Käsivärjäys. IgM negatiivinen. Väri huono, fluoresenssi heikko, taustaa, samea.**



**Kuvio 14. PT12-5756, pakastettu positiivinen näyte. Automaattivärjäys. IgM negatiivinen. Väri hyvä.**



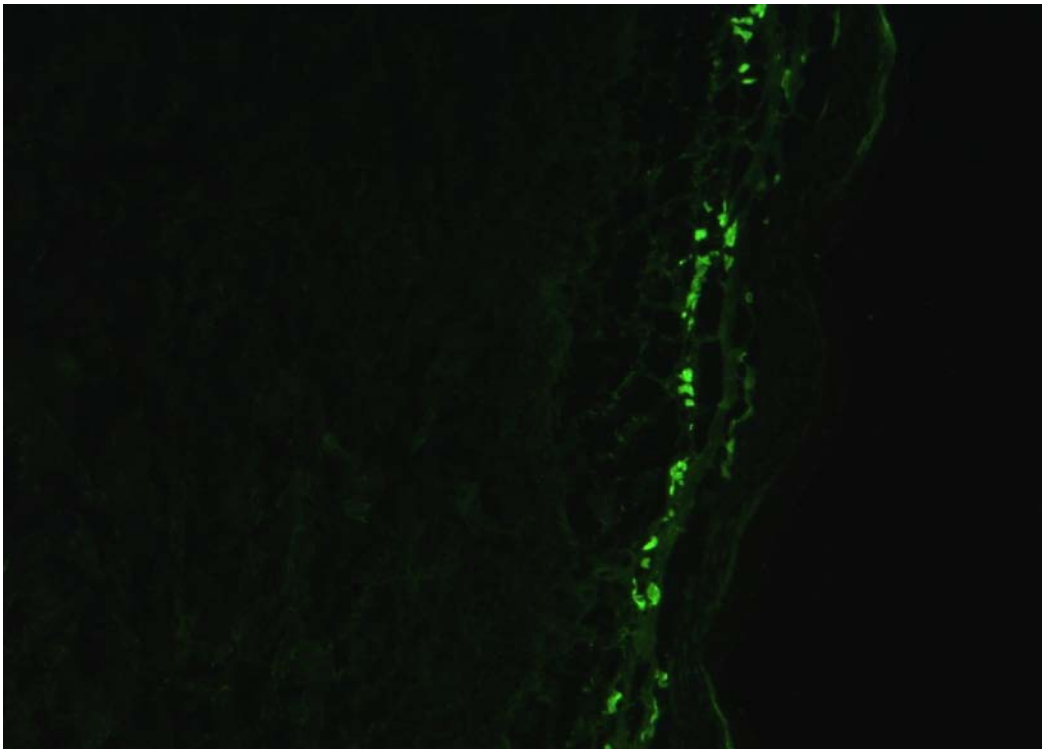
Kuvio 15. PT12-10795. Käsivärjäys. Tyvikalvolla positiivinen, granulaarinen C3. Väri hyvä.



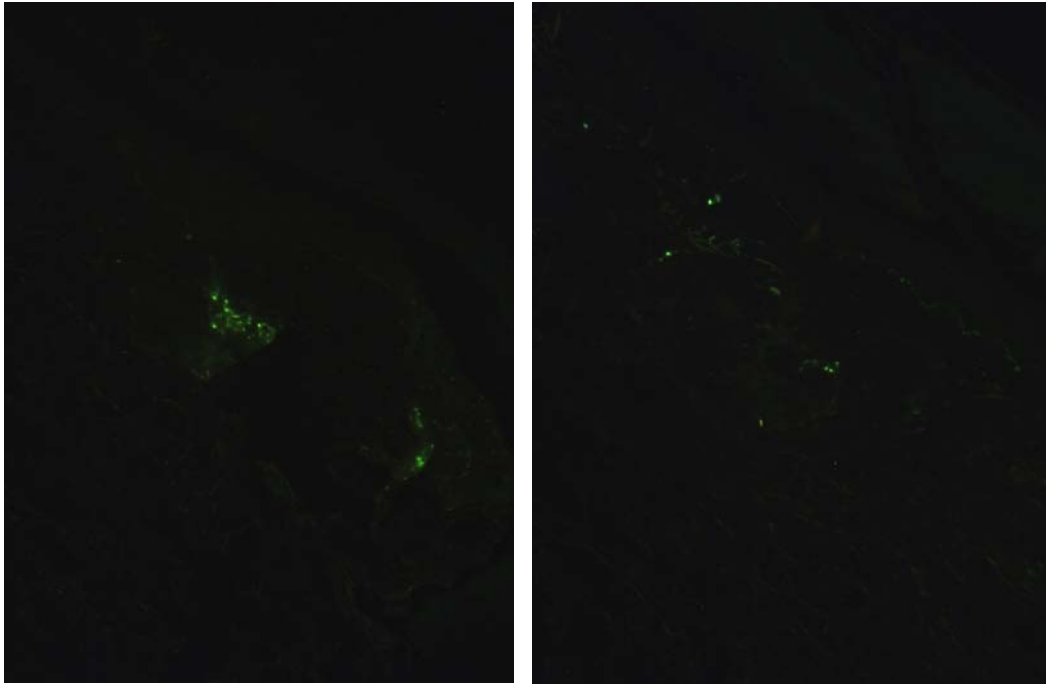
Kuvio 16. PT12-10795. Automaattivärjäys. C3 negatiivinen, mutta säilytyksen (2 vk) myötä muuttunut positiiviseksi, Väri hyvä.



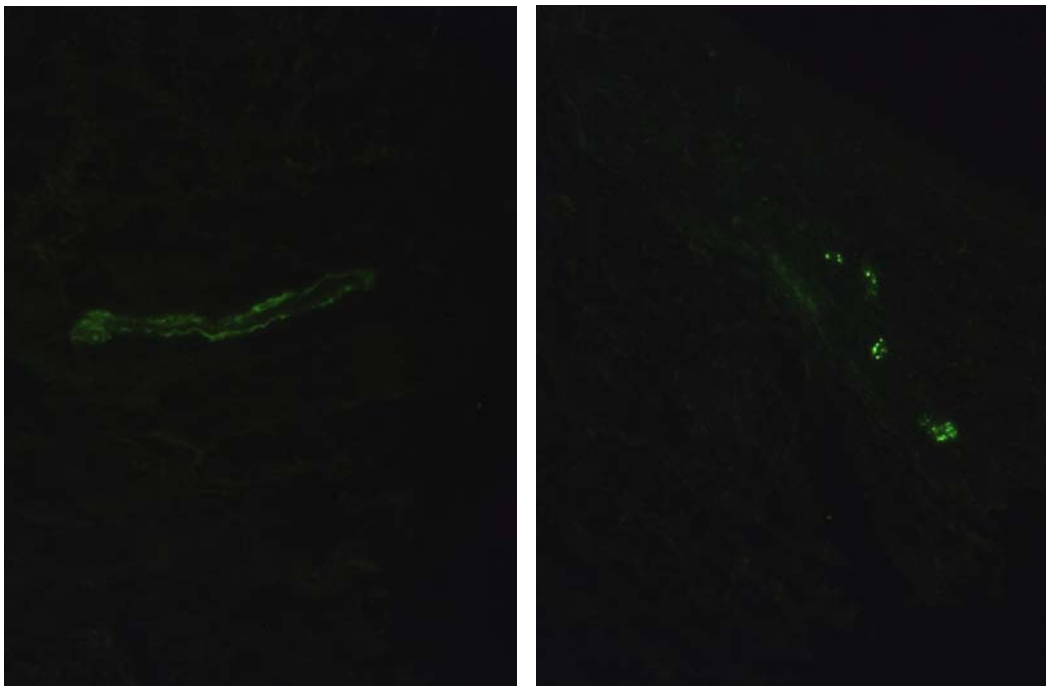
Kuvio 17. PT12-11151. Käsivärjäys. IgM negatiivinen. Väri huono, samea



Kuvio 18. PT12-11151. Automaattivärjäys, kolloidikappaleita, joiden IgM positiivinen. Väri hyvä.



**Kuvio 19. PT12-11780. Käsivärjäys. Kapillaareissa C3 positiivinen. Väri hyvä.**



**Kuvio 20. PT12-11780. Automaattivärjäys. Kapillaareissa C3 positiivinen. Väri hyvä.**



## Mielipidekysely käsimenetelmän ja VBM™-värjäysautomaatin eroista

	Käsimenetelmä	VBM™-värjäysautomaatti
Mikä on helppoa/hyvää?		
Mikä on vaikeaa/huonoa?		
Arvioi menetelmän virhemahdollisuudet.		
Mikä asia vaatisi parannusta?		
Kumpi on mielestäsi luotettavampi ? (laita ruksi)		
Kumpaa itse haluaisit käyttää? (laita ruksi)		
Kumpi menetelmä on ajankäytän näkökulmasta parempi? (laita ruksi)		
Muita huomioita?		