



KYLMÄAGGLUTINIINIT

Näytteenotossa ja esikäsittelyssä

Heidi Mäki-Kuutti

Maarit Perttunen

Opinnäytetyö
Syyskuu 2013
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
10SBIO

HEIDI MÄKI-KUUTTI & MAARIT PERTTUNEN:
Kylmäagglutiniinit näytteenotossa ja esikäsittelyssä

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 6 sivua
Syyskuu 2013

Kylmäagglutiniinit eli kylmävasta-aineet ovat yleensä IgM-luokan vasta-aineita, jotka aiheuttavat punasolujen agglutinaation eli yhteenliittymisen ja komplementin sitoutumisen punasoluun lämpötilan laskiessa. Lämpötilan noustessa takaisin ruumiinlämpöön agglutinaatio purkaantuu, mutta komplementti pysyy kiinnittyneenä punasoluun kyeten aiheuttamaan komplementtivälitteistä hemolyysiä.

Kylmäagglutiniinit aiheuttavat erityispiirteitä verinäytteenotossa ja näytteiden esikäsittelyssä. Kylmäagglutiniininäytteet otetaan lämminnäytteenoton mukaisesti tutkittaessa kylmävasta-aineita tai kokoverta. Useimmat kliinisen kemian tutkimukset tehdään plasmasta tai seerumista, tällöin lämminnäytteenotto ei ole välttämätöntä kunhan plasma tai seerumi erotellaan mahdollisimman nopeasti. Erottelemattomassa näytteessä agglutinaatio voi purkautua esimerkiksi kuljetuksesta aiheutuvan värinän johdosta aiheuttaen hemolyysiä.

Opinnäytetyön aihe on työelämälähtöinen ja se on saatu Fimlab Laboratoriot Oy:ltä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa tiivis ja kattava selvitys kylmäagglutiniineista ja niiden aiheuttamista erityispiirteistä näytteenotossa ja esikäsittelyssä. Tarkoituksena oli myös tuottaa lämminnäytteenotto-ohje Fimlab Laboratoriot Oy:lle. Tavoitteena opinnäytetyöllä on parantaa tutkimustulosten luotettavuutta tarkentamalla näytteenotto- ja esikäsittelyohjeistusta, samalla kehittämällä omaa erikoisammattiosaamistamme.

Opinnäytetyö on toiminnallinen opinnäytetyö, jossa on myös piirteitä kirjallisuuskatsauksesta. Kirjallisuuden avulla on perehdytty kylmäagglutiniineihin ja niiden vaikutuksiin valituissa tutkimuksissa sekä näytteenottoon ja esikäsittelyyn. Tämän perusteella on tehty opinnäytetyön raporttiosio, joka toimii pohjana tuotokselle. Opinnäytetyön toiminnallisena osiona tehtiin SFS-EN ISO 15189 standardiin pohjautuvan kaksisivuisen lämminnäytteenotto-ohjeen Fimlab Laboratoriot Oy:lle.

Opinnäytetyön luotettavuutta lisää siinä käytetty lähdeaineisto, joka on pääasiassa 2000-luvulta. Suurin osa käytetyistä lähteistä on kansainvälisiä teoksia, joiden tekijöinä on alansa asiantuntijoita. Kylmäagglutiniininäytteissä lämminnäytteenoton merkityksen havainnollistamiseksi, työhön on lisätty liitteiksi kaksi verenkuvatulosta näytteistä, joissa on kylmäagglutiniineja.

Asiasanat: kylmäagglutiniini, lämminnäytteenotto, esikäsittely, vasta-aine

ABSTRACT

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

HEIDI MÄKI-KUUTTI & MAARIT PERTTUNEN:
Cold Agglutinins at Phlebotomy and Preanalytical Stage of Clinical Chemistry and Haematology

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 6 pages
September 2013

The objective of this study was to investigate through literature how cold agglutinins affect the blood drawing and preanalytical stage of specified clinical chemistry tests which were outlined to sodium and potassium, creatinine, C-reactive protein and haematology laboratory tests such as complete blood count and prothrombin time. The topic was provided by the clinical chemistry laboratory of Fimlab Medical Laboratories Ltd. Another objective was to compile a warm blood drawing instructions for company use.

Cold agglutinins or cold antibodies, as they are also referred to, are generally IgM-type antibodies. They cause the red cells to agglutinate through complement binding, at temperatures below the body temperature. Once the temperature rises back up to body temperature the agglutination resolves but the complement factor stays on the red cell surface causing haemolysis.

When investigating cold antibodies or whole blood sample, the blood must be drawn by warm blood drawing instructions. Most clinical chemistry laboratory tests are performed from either plasma or sera and therefore the blood drawing can be done without the special warm blood drawing instructions. The plasma or sera should be separated from red cells as soon as possible. After blood sample has cooled down and the agglutination has developed the sample should be handled with care in order to avoid resolving the agglutination because this can cause haemolysis, and therefore have an effect on some laboratory tests.

Key words: cold agglutinin, phlebotomy, preanalytics, antibody

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	KYLMÄAGGLUTINIINIT	7
2.1	Vasta-aineet ja komplementtijärjestelmä.....	7
2.2	Autoimmuunihemolyyttisissä anemioissa esiintyviä vasta-aineita.....	9
2.2.1	Lämminvasta-aineet	9
2.2.2	Kylmävasta-aineet.....	10
3	TUTKIMUKSET.....	13
3.1	Natrium ja kalium	13
3.2	Kreatiniini	14
3.3	C-reaktiivinen proteiini	15
3.4	Perusverenkuva	16
3.5	Tromboplastiiniaika	18
4	NÄYTTEENOTTO JA ESIKÄSITTELY.....	20
4.1	Verinäytteenotto.....	20
4.2	Esikäsitteily.....	23
4.3	Lämminnäytteenoton ja -esikäsitteilyn erityispiirteet.....	24
5	NÄYTTEENOTTOTOIMINNAN LAADUNVARMISTUS	27
5.1	Standardit ja akkreditointi.....	27
5.2	Standardin mukainen näytteenotto-ohje	28
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	29
7	OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	30
8	OPINNÄYTETYÖPROSESSI.....	32
9	TUOTOKSEN KUVAUS	34
10	POHDINTA.....	35
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET	45
	Liite 1. Sysmex XE-5000 tuloste ennen lämmitystä, näyte 1.....	45
	Liite 2. Sysmex XE-5000 tuloste lämmityksen jälkeen, näyte 1.....	46
	Liite 3. Sysmex XE-5000 tuloste ennen lämmitystä, näyte 2.....	47
	Liite 4. Sysmex XE-5000 tuloste lämmityksen jälkeen, näyte 2.....	48
	Liite 5. Tuotos	49

1 JOHDANTO

Kylmäagglutiniinit eli kylmävasta-aineet ovat komplementtia sitovia vasta-aineita, jotka sitoutumisen kautta aiheuttavat punasolujen agglutinaatiota eli yhteenliittymistä ruumiinlämpöä alemmissa lämpötiloissa. Näin ollen ne aiheuttavat erityistoimenpiteitä näytteenotossa ja näytteiden esikäsittelyssä. (Juvonen & Savolainen 2007, 208; Pettersson, Partanen & Vakkila 2007, 50.) Kylmävasta-aineet ovat melko harvinaisia, joten erillistä lämminnäytteenotto- tai esikäsittelyohjeistusta ei vielä Fimlab Laboratoriot Oy:llä ole. Näytteenoton akkreditoinnin myötä tarve näytteenotto-ohjeelle on syntynyt.

Opinnäytetyömme aiheen saimme Fimlab Laboratoriot Oy:n keskitettyjen laboratoriopalveluiden kliinisen kemia yksiköstä. Fimlab Laboratoriot Oy on Suomen suurin laboratorioalan yritys, joka tarjoaa terveysalan laboratoriopalveluja Pirkanmaan ja Kanta-Hämeen sekä Jämsän alueella. Fimlab laboratoriot Oy:n keskitetyt laboratoriopalvelut sekä hallinto sijaitsevat Tampereen yliopistollisen keskussairaalan vieressä, Biokatu 4:ssä. Muita toimipisteitä, kuten näytteenottopisteitä, on ympäri Pirkanmaata ja Kanta-Hämettä. Näistä toimipisteistä suurin osa näytteistä kuljetetaan analysoitaviksi keskitettyihin laboratoriopalveluihin. Fimlab Laboratoriot Oy on Pirkanmaan sairaanhoitopiirin ja Kanta-Hämeen kuntayhtymän omistama osakeyhtiö. (Fimlab 2013.)

Opinnäytetyössä käsittelemme kylmäagglutiniinien vaikutuksia kuuden määrittämisen osalta: natrium (P-Na), kalium (P-K), kreatiniini (P-Krea), C-reaktiivinen proteiini (P-CRP), perusverenkuva (B-PVK) ja tromboplastiiniaika (P-TT-INR). Nämä määrittämiset valitsimme yhdessä työelämäedustajien kanssa perustuen siihen, että ne ovat yleisimpiä kliinisen kemian ja hematologian automaatiolla tehtäviä tutkimuksia, ja ovat näin ollen aiheuttaneet eniten keskustelua oikeasta toimintatavasta. Määrittämisen käsittelyssä olemme ottaneet huomioon aikuisten viitearvot. Opinnäytetyömme ulkopuolelle on rajattu muun muassa ihopistonäytteenotto, vierianalytiikka, kryoglobuliinit ja verensiirtoserologiset tutkimukset.

Opinnäytetyömme tarkoituksena on tuottaa kattava informaatiopaketti kylmäagglutiniineista Fimlab Laboratoriot Oy:n käyttöön. Opinnäytetyömme tavoitteena on parantaa tutkimustulosten luotettavuutta lisäämällä tietoisuutta kylmäagglutiniinien vaikutuksista

laboratoriotutkimuksiin. Opinnäytetyömme on toiminnallinen opinnäytetyö, joka koostuu raporttiosioista ja tuotoksesta. Teorian raporttiosioon keräämme soveltaen kirjallisuuskatsausmenetelmää.

Tuotoksemme pohjautuu teoriaosuudessa esitettyihin lämminnäytteenoton ja -esikäsitteilyn erityispiirteisiin, näytteenottoiminnan laadunvarmistukseen sekä kylmäagglutiniinien rakenteeseen ja toimintaan. Näytteenottoiminnan laadunvarmistusta käsittelemme sitä koskevien standardien kautta.

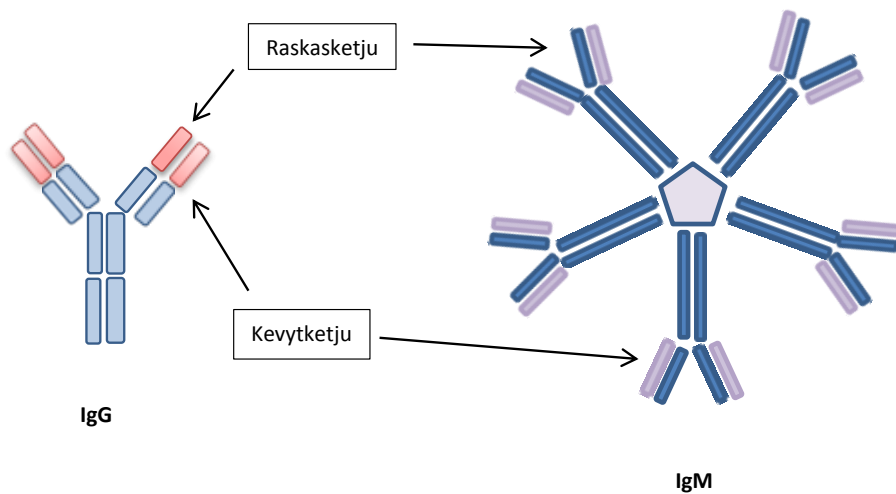
Kylmäagglutiniineista ei ole aikaisemmin tehty opinnäytetöitä, myös tutkimuksia aiheesta on tehty erittäin vähän. Löysimme vain yhden Suomessa tehdyn tutkimuksen (Kosme & Remes 1999) liittyen autoimmuunihemolyyttiseen anemiaan, jossa oli käsitelty myös kylmävasta-aineita. Kansainväliset tutkimukset, jotka liittyvät kylmäagglutiniineihin, tutkivat lähinnä kylmäagglutiniinien aiheuttamaa autoimmuunihemolyyttistä anemiaa ja sen hoitoa. Näin ollen suoraa tutkimusta kylmäagglutiniinien vaikutuksesta näytteenottoon tai esikäsitteilyyn ei ole tai emme ainakaan sellaista löytäneet. Tästä syystä opinnäytetyönä tekemämme selvitys on aiheellinen.

2 KYLMÄAGGLUTINIINIT

2.1 Vasta-aineet ja komplementtijärjestelmä

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit kuuluvat yhdessä veren luontaisen komplementtijärjestelmän kanssa humoraaliseen immunitettiin eli solunulkoisten nesteiden välityksellä vaikuttavaan immuunijärjestelmään. Immunoglobuliinit vastaavat vasta-ainevälitteisestä immunitetista. Vasta-aineiden avulla elimistön immuunipuolustus tunnistaa vieraita organismeja tai niiden osia niille spesifisten antigeenien perusteella. Antigeenit voivat olla rakenteita tai molekyyliä, jotka aikaansaavat immuunireaktion. Vasta-aineet kuuluvat hankittuun immunitettiin eli ne kehittyvät syntymän jälkeen elimistön kohdatessa uusia taudinaiheuttajia. Vasta-aineita syntyy myös rokottamisen seurauksena. Vasta-aineiden esiasteet toimivat B-lymfosyyttien pinnalla reseptoreina. B-lymfosyytin aktivoituessa siitä tulee plasmasolu, joka alkaa tuottaa reseptorinsa kaltaisia liukoisia vasta-aineita, jotka kulkeutuvat verenkierron mukana. (Hänninen 2011, 97; Jokiranta & Seppälä 2011, 101–102.)

Immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja. Niiden Y:n muotoinen perusyksikkö koostuu proteiinirungosta ja siihen liittyneestä hiilihydraattiosasta. Immunoglobuliinit rakentuvat neljästä polypeptidiketjusta: kaksi keskenään identtistä L-ketjua eli kevytketjua (light chain) ja kaksi keskenään identtistä H-ketjua eli raskasketjua (heavy chain). H- ja L-ketjut muodostuvat rakenteellisista perusyksiköistä eli domeeneista. Domeenit voivat sisältää paljon vaihtelua eli ovat niin sanottuja variaabeleita domeeneja, jotka kykenevät tunnistamaan antigeenin. Muut ketjun domeenit ovat varsin samanlaisia ja niitä kutsutaan C-alueeksi eli vakioalueeksi (constant region). H-ketjussa on yleensä neljä ja L-ketjussa kaksi domeenia. Kummassakin ketjussa on yksi variaabelidomeeni, mikä osallistuu antigeeniä sitovan kohdan muodostukseen. Loput domeenit kuuluvat vakioalueeseen. Näin ollen HL-ketjuparissa on kaksi kohtaa, jotka kykenevät sitomaan samanlaisen antigeenin. H-ketjujen vakioalueita eli proteiinin toiminnallisesti itsenäisiä osia on viittä päätyyppiä ja immunoglobuliinit jaetaan näiden perusteella eri luokkiin. Näitä luokkia ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Immunoglobuliinit voivat esiintyä mono- tai polymeereinä. Immunoglobuliinien rakennetta on esitetty kuvassa 1. (Judd 2009, 71; Jokiranta & Seppälä 2011, 102–106.)



KUVA 1. IgG ja IgM. IgM:ssä on violetilla merkittynä kevytketjut ja sinisellä raskasketjut. IgG:ssä on punaisella merkittynä variaabelidomeeni ja sinisellä vakiodomeeni. (Jawetz, Melnick & Adelberg 1982, 160–161, muokattu.)

Autovasta-aineilla tarkoitetaan elimistön omia kudoksia ja rakenteita kohtaan hyökkäviä vasta-aineita, jotka voivat olla luokkaa IgG, IgM tai IgA. Yksilöllä on lajille tyypillisiä antigeenejä, joita sanotaan alloantigeeneiksi. Jos yksilöltä puuttuu lajilleen ominaisia antigeenejä, voi elimistöön muodostua allovasta-aineita, jolloin kyseessä on immunisaatio. Immunisaatio voi olla seurausta esimerkiksi verensiirrosta tai raskaudesta. (Judd 2009, 71.)

Komplementti on ryhmä veren proteiineja, joiden pääasiallisena tehtävänä on tuhota ja poistaa kehoon joutuneita mikrobeja ja vieraita rakenteita. Komplementti kuuluu pääasiallisesti luonnolliseen immunitettiin, mutta auttaa myös vasta-aineita komplemen-toimalla eli täydentämällä niiden kykyä tuhota mikrobeja. Komplementti tuhoaa vasta-aineiden vieraksi tunnistamat kohteet vaiheittain etenevän reaktiosarjan avulla, jossa edellinen komponentti aktivoi seuraavan, joka jälleen aktivoi seuraavan komponentin. Reaktiosarja johtaa niin sanotun membraaneja tuhoavan kompleksin (MAC: membrane attack complex) muodostumiseen. MAC muodostaa kohdesolun pinnalle ioneja läpäisevän reiän ja aiheuttaa solun osmoottisen lyysautumisen. (Meri 2011, 53–60.)

Kylmäagglutiniinit ovat komplementtia sitovia, tyypillisesti IgM-luokan vasta-aineita. Kylmäagglutiniinit kykenevät sitoutumaan punasolujen pinta-antigeeneihin ruumiinlämpöä alemmissa lämpötiloissa aiheuttaen komplementin aktivoitumisen. IgM-luokan vasta-aineiden kiinnittymisestä seuraa punasolujen agglutinaatio. Kylmävasta-aineiden ja komplementin sitoutuminen lisääntyy lämpötilan laskiessa lähelle 0°C:ttä. Agglutinaatio purkaantuu, kun lämpötila kohoaa 37°C:een tai yli. Komplementti jää kuitenkin kiinni punasolun pinnalle lämpötilan jälleen noustessa. Hemolyysi tapahtuu komplementtivälitteisesti, yleensä maksassa makrofagien toimesta, agglutinaation jo purkauttua. Jäähtymisestä seuranneen komplementin aktivoitumisen hemolyyttinen teho on voimakkaimmillaan kuitenkin vasta uudelleen lämmitessä, 40°C:ssa. Kylmäagglutiniinien aiheuttaessa hemolyysiä elimistössä, on kyseessä autoimmuunihemolyyttinen anemia eli AIHA. (Juvonen & Savolainen 2007, 208; Pettersson ym. 2007, 50.)

2.2 Autoimmuunihemolyttisissä anemioissa esiintyviä vasta-aineita

Autoimmuunihemolyttisissä anemioissa (AIHA) elimistö tuottaa vasta-aineita yhtä tai useampaa punasolukalvon antigeeniä kohtaan. Tämä johtaa siihen, että kudosten makrofagit kykenevät tuhoamaan vasta-aineilla peittyneet punasolut aiheuttaen hemolyysiä ja siten anemiaa. Autoimmuunihemolyttinen anemia voi johtua joko lämmin- tai kylmävasta-aineista. (Cunningham & Silberstein 2005, 693, 699–700.)

2.2.1 Lämminvasta-aineet

Tyypillisimmin lämminvasta-aineet ovat IgG-tyypin vasta-aineita, jotka eivät kykene agglutinoimaan punasoluja, mutta kiinnittymällä punasoluihin lämpötilan ollessa 37°C tai yli, ne aktivoivat komplementin. Komplementin aktivoimisen kautta lämminvasta-aineet voivat aiheuttaa elimistössä hemolyysiä, jolloin kyseessä on autoimmuunihemolyysi, sillä vasta-aineet hyökkäävät elimistön omia kudoksia vastaan. (Bain & Winn 2012, 274–277.)

Lämminvasta-aineiden kiinnittymistä on vaikea estää, sillä se tapahtuu jo ruumiinlämmössä. Näin ollen lämminvasta-aineet, jotka kykenevät komplementin aktivoimisen

kautta hemolysoimaan punasoluja, aiheuttavat potilaalle erittäin vakavan hemolyyttisen tilan. Lämminvasta-aineita voi muodostua elimistöön idiopaattisesti tai sekundaarisesti eli liittyen toiseen tilaan. Sekundaarisesti lämminvasta-aineita voivat aiheuttaa esimerkiksi lymfoomat, autoimmuunitaudit, kuten SLE (systeminen lupus erythematosus) sekä eräät infektiot. (Bain & Winn 2012, 274–277.)

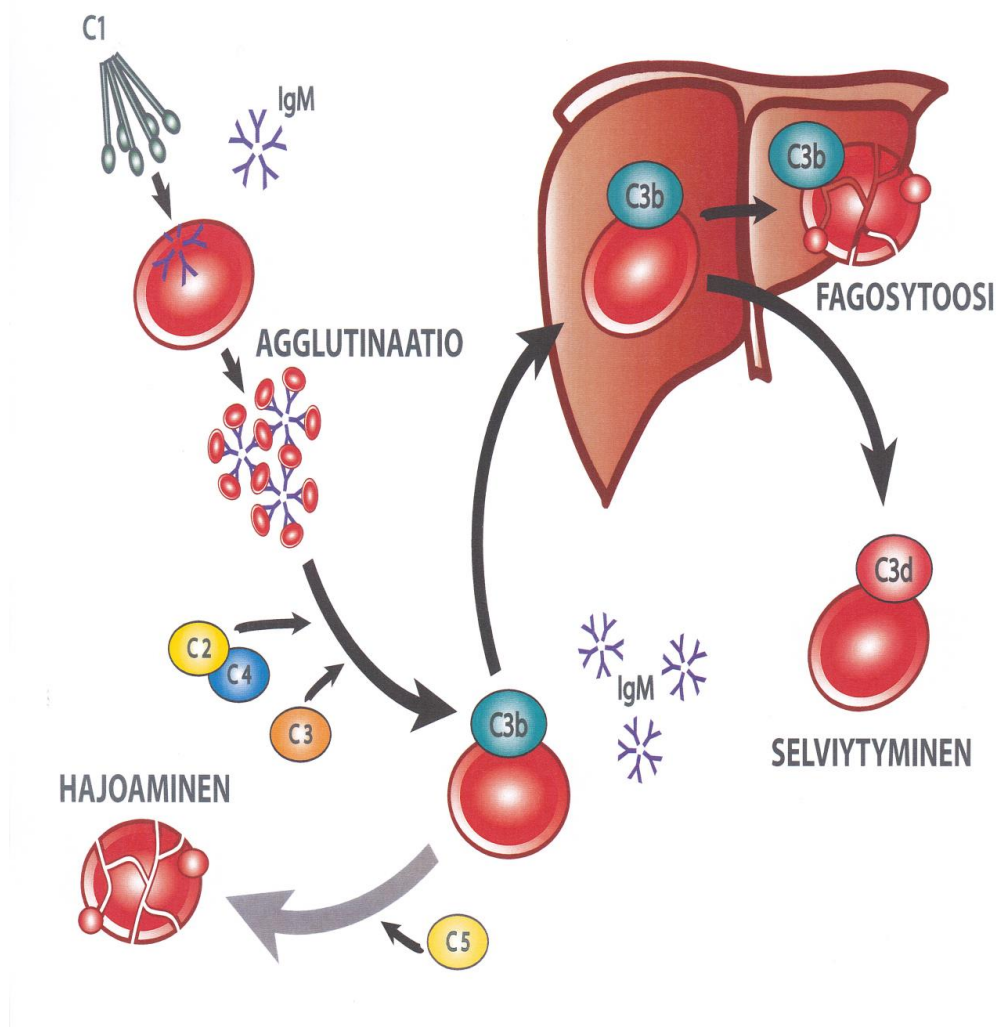
2.2.2 Kylmävasta-aineet

Kylmäagglutinaatio johtuu yleensä IgM-luokan vasta-aineista, jotka kohdistuvat punasolujen pinnalla olevia I/i-antigeenejä kohtaan. Kylmäagglutiniinit aiheuttavat punasolujen agglutinaation ruumiinlämpöä matalammissa lämpötiloissa. Ongelma muodostuu siinä vaiheessa, kun elimistön ääreisverenkierrassa lämpötila on matalampi kuin sentraalisessa verenkierrassa. Tällöin komplementti aktivoituu ja tämä puolestaan aiheuttaa solujen tuhoutumisen yleisimmin hepaattisessa verenkierrassa. Solujen tuhoutuminen johtaa autoimmuunihemolyyttisen anemian muodostumiseen. (Cunningham & Silberstein 2005, 693, 699–700.)

Titterillä tarkoitetaan seerumin korkeinta laimennosta, jossa reaktio on vielä havaittavissa. Serologiassa titteriarvo on yleisesti käytetty tapa ilmoittaa vasta-aineen pitoisuus. (Jawetz ym. 1982, 167; Tiilikainen, Vaara & Vaheri 1997, 920.) Kylmäagglutiniinien agglutinaatiokyky riippuu niiden titteriarvosta ja sitä kautta myös niiden vaatima lämpötila vaihtelee potilaittain. Joillakin agglutinaatio tapahtuu jo hieman alle 37°C:ssa, kun taas yleisemmin kylmäagglutiniinit tarvitsevat agglutinaatioon 28–31°C:n lämpötilan. (Cold Agglutinin Disease 2007.) Lämpötilan laskiessa riittävän alas, kiinnittyvät kylmäagglutiniinit punasolujen antigeeneihin (yleensä I/i) aiheuttaen punasolujen agglutinaation. Agglutinaation lisäksi, kylmäagglutiniinin kiinnittyminen aiheuttaa komplementtitekijä C1:n aktivoitumisen, mikä aktivoi edelleen komplementtitekijät C2 ja C4. C2:n ja C4:n aktivoituminen aiheuttaa C3:n muuttumisen punasolujen pintaan kiinnittyväksi C3b:ksi. Lämpötilan noustessa kylmäagglutiniinit irtoavat punasoluista, jolloin solut pääsevät jälleen irtoamaan toisistaan eli agglutinaatio purkautuu. (Stone 2010, 3119; Meri 2011, 53–56.)

Komplementtitekijä C3b pysyy kuitenkin yhä kiinnittyneenä punasolujen pintaan. C3b voi aiheuttaa komplementtitekijä C5:n aktivoitumisen, mikä johtaa MAC:n aktivoitumiseen aiheuttaen solujen intravaskulaarisen hemolyysin tuottamalla solukalvoon reiän. Solukalvon reiän vuoksi osmoottinen paine muuttuu aiheuttaen nestevirtauksen solun sisään, jolloin solu turpoaa ja hajoaa. (Stone 2010, 3119; Meri 2011, 53–56.)

Yleisimmin C3b:llä päällystetyt punasolut kuitenkin päätyvät maksaan, jossa niillä on kaksi vaihtoehtoa. Punasolut voivat tuhoutua maksan retikuloendoteliaalijärjestelmässä fagosytoivien solujen välityksellä, mikä aiheuttaa ekstravaskulaarista hemolyyysiä. Toisaalta C3b:llä päällystetyt solut voidaan myös palauttaa verenkiertoon muokkaamalla soluihin kiinnittynyt C3b C3d:ksi, jolloin solu ei tuhoudu elimistön immuunijärjestelmässä. (Stone 2010, 3119; Meri 2011, 53–56.) Kylmäagglutiniinien kiinnittymistä, komplementin aktivoitumista ja aktivoitumisen seurauksia on esitetty kuvassa 2.



KUVA 2. Kylmäagglutiniinien kiinnittyminen punasoluihin ja komplementtijärjestelmän aktivoituminen. (Kuva: Lasse Pekkala 2013, mukailten Stone 2010, 3119.)

Kylmäagglutiniineja voi kehittyä elimistöön sekä idiopaattisesti että sekundaarisesti. Kylmäagglutiniinit voivat esimerkiksi joskus olla seurausta infektiosta. Kylmäagglutiniineja voi esiintyä varsinkin teini-ikäisillä ja nuorilla aikuisilla esimerkiksi *Mycoplasma pneumoniae*- tai Epstein Barrin-virus-infektioissa. Tällöin on kyseessä väliaikainen kylmäagglutiniinien esiintyminen veressä, sillä infektion parantuessa myös kylmäagglutiniinit katoavat jonkin ajan kuluessa. Sekundaarisia kylmäagglutiniineja voi esiintyä myös esimerkiksi lymfoomien yhteydessä. Kylmäagglutiniinit ovat yleisiä myös terveillä henkilöillä. Tällöin kyseessä on matalan titterin omaavat vasta-aineet, jotka eivät kykene kiinnittymään punasoluihin tai aktivoimaan komplementtia yli 4°C:ssa, jolloin niillä ei ole yksilölle kliinistä merkitystä. (Cold Agglutinin Disease 2007; Duffy 2009, 322, 328; Hoffbrand & Moss 2011, 82.)

Paroksysmaalinen kylmähemoglobinuria (PCH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) johtuu myös kylmäagglutiniineista. Tämä AIHA:n muoto johtuu kylmässä reagoivasta IgG-luokan vasta-aineesta, jota kutsutaan Donath-Landsteiner vasta-aineeksi. PCH on kaikista AIHA:n muodoista harvinaisin. Tämä kylmäagglutiniini on tyypillisesti spesifi punasolun pinta-antigeeni P:tä kohtaan. Ennen on uskottu paroksysmaalisen kylmähemoglobinurian liittyvän syfilikseen, mutta nykyisin paroksysmaalista kylmähemoglobinuriaa esiintyy lähinnä lapsilla hengitysteiden virusinfektioiden kuten mononukleosisin yhteydessä. (Pettersson ym. 2007, 49–50; Duffy 2009, 331; Hod, Spitalnik, P. & Spitalnik, S. 2009, 103.)

Noin 7 %:lla AIHA-potilaista diagnostiset kriteerit täyttyvät sekä lämmin-AIHA:n että kylmäagglutiniinisyndrooman osalta. Näitä tapauksia kutsutaan yhdistelmä-AIHA:ksi (combined warm and cold AIHA). Yhdistelmä-AIHA potilaiden suora antiglobuliinitesti on positiivinen sekä IgG:n että C3:n tai C3d:n suhteen. Yhdistelmä-AIHA-potilaiden seerumista on löydettävissä IgM-luokan kylmähemagglutiniineja sekä IgG-luokan lämminvasta-aineita. Yhdistelmä-AIHA:ssa kylmäagglutiniinien reaktiolämpötila on muista kylmäagglutiniineista poiketen 30°C tai tätä korkeampi. (Petz 1997, 1024; Duffy 2009, 326; Bain & Win 2012, 277.)

3 TUTKIMUKSET

Analyyttillä tarkoitetaan analyysin eli tutkimuksen kohteena olevaa ainetta (Sivistys-sanakirja). Opinnäytetyön toimeksiantaja rajasi aiheemme koskemaan seuraavia analyyttejä: plasman/ seerumin natrium (P/S-Na), kalium (P/S-K) kreatiniini (P/S-Krea) ja C-reaktiivinen proteiini (P/S-CRP). Näiden analyyttien lisäksi aiheeseemme kuuluvat myös seuraavat määritykset: plasman tromboplastiiniaika (P-TT) ja kokoveren perusverenkuvatutkimus (B-PVK). Nämä määritykset toimeksiantaja perusteli sillä, että ne ovat yleisimpiä tutkimuksia kliinisen kemian ja hematologian automaatiolla. Näiden tutkimusten kautta keskustelu kylmäagglutiniinien aiheuttamista vaikeuksista näytteenotossa ja esikäsittelyssä on käynnistynyt. Veriryhmäserologiset tutkimukset on rajattu työmme ulkopuolelle, vaikkakin myös niihin kylmäagglutiniinien vaikutus on suuri.

3.1 Natrium ja kalium

Elektrolyytit ovat yhdisteitä, jotka elimistössä esiintyvät sähköisesti varautuneina eli ioni-muodoissa, kationeina eli positiivisesti varautuneina sekä anioneina eli negatiivisesti varautuneina. Elektrolyyteillä on monia tärkeitä tehtäviä elimistössä, kuten erilaisien nestetilojen tilavuuksien ja osmoottisen paineen sekä happo-emästasapainon ylläpito. Lisäksi elektrolyytit säätelevät hermo-, sydänlihaks- sekä luurankolihasolujen toimintaa ja osallistuvat monien aineenvaihduntareaktioiden säätelyyn. (Uotila 2010, 93.)

Yksi elektrolyyttien tärkeimmistä tehtävistä elimistössä on huolehtia neste- ja elektrolyyttitasapainosta. Vesi muodostaa ihmisen ruumiinpainosta noin 60 %, ja 66 % tästä vedestä on intrasellulaarista eli solun sisäistä vettä, ja 33 % ekstrasellulaarista eli solun ulkopuolella olevaa vettä. Vesi toimii elimistössä liuottimena erilaisille yhdisteille ja muodostaa elintärkeille reaktioille tapahtumaympäristön. (Marshall & Bangert 2008, 15; Uotila 2010, 9394.)

Ekstrasellulaarinnesteiden selvästi vallitsevin kationi on natrium (Na^+), jota on solun ulkoisen nesteen kationeista jopa yli 90 %. Plasma kuuluu solun ulkoisiin nesteisiin ja siitä määritettynä vapaan natriumin viitearvo on 137–144 mmol/l. Vapaata natriumia on

noin 70 % natriumin kokonaismäärästä, loput natriumista on kiinnittyneenä luukudokseen. Natriumin pitoisuus ekstrasellulaarinsteessä huolehtii siitä, että negatiivisesti ja positiivisesti varautuneiden ionien pitoisuudet pysyvät tasapainossa toisiinsa nähden. (Marshall & Bangert 2008, 15; Uotila 2010, 94–95; Fimlab: ohjekirja 2012f.)

Intrasellulaarisessa nesteessä vallitsevana kationina on kalium (K^+), jota on solun sisäisen nesteen kationeista 80 %. Kaliumin pitoisuus plasmassa on pieni verrattuna solunsisäiseen pitoisuuteen, mutta määritykset tehdään silti plasmasta helpomman saatavuuden vuoksi. Plasmassa kaliumin viitearvo on 3,3–4,8 mmol/l. Vapaata kaliumia on noin 90 % kaliumin kokonaismäärästä, loput kaliumista on sitoutuneena punasoluihin sekä luu- ja aivokudokseen. Kuten natrium ekstrasellulaarinsteessä, huolehtii kalium intrasellulaarinsteessä ionitasapainon säilymisestä. (Marshall & Bangert 2008, 16; Uotila 2010, 96; Fimlab: ohjekirja 2013b.)

Natrium ja kalium määritetään kliinisen kemian laboratoriossa potentiometrialla käyttäen ioniselektiivisiä elektrodeja. Näyttemateriaalina määrityksissä käytetään seerumia tai litiumhepariiniplasmaa. Hemolyysi vaikuttaa molempien analyyttien pitoisuuksiin. Kaliumin arvo nousee sen vapautuessa punasolujen sisältä plasmaan hemolyysin seurauksena. Kalium myös suositellaan määritettäväksi mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen, ettei kaliumvuotoa ehdi tapahtua solun sisältä tuloksia häiritsevästi. Natriumin arvo puolestaan laskee hemolyysissä johtuen hemolyysin laimentavasta vaikutuksesta näytteeseen. (Lippi ym. 2008, 766–768; Marshall & Bangert, 2008, 26.)

3.2 Kreatiniini

Lihaksissa on kreatiinia ja kreatiinifosfaattia, joita käytetään lihasten energiantuotannossa. Lihasten energia-aineenvaihduntareaktioissa kreatiinista muodostuu kreatiniinia, jota elimistö ei pysty käyttämään, vaan se pitää saada hävitettyä. Kreatiniini siirtyy tehokkaasti lihaksista verenkiertoon ja sitä kautta munuaissuodatuksen kautta virtsaan. Jos erittyminen on munuaistaudin vuoksi häiriintynyt, nousee kreatiniinin pitoisuus veressä. Plasman tai seerumin kreatiniinimääritys on sen edullisuuden vuoksi edelleen tavallisin munuaisten seulonta- ja seurantatutkimus, vaikka se heijastaa munuaismuutoksia vain 50 % herkkyydellä, jolloin muutokset havaitaan vasta viiveellä. Kreatiniini-

niarvoon vaikuttaa myös muun muassa potilaan lihassmassa ja ravitsemus. Normaalialueen tulos ei poissulje munuaisvauriota, mutta suurentunut arvo viittaa siihen. (Marshall & Bangert 2008, 72–73; Mustajoki & Kaukua 2008; Kouri 2010, 123.)

Plasman kreatiniinimääritykseen käytetään Fimlab Laboratoriot Oy:ssä entsyymattista substraattimääritystä. Näytteenä käytetään litiumhepariiniplasmaa. Kreatiniinin tuloksiin hemolyysi voi vaikuttaa kohottavasti, jos mitattava reaktiotuote absorboi valoa samalla aallonpituudella kuin hemoglobiini eli 415 nm. Kreatiniinin viitearvot ovat miehillä 60–100 µmol/l ja naisilla 50–90 µmol/l. (Thomas 2002; Fimlab: ohjekirja 2012d.)

3.3 C-reaktiivinen proteiini

Akuutin faasin reaktiolla tarkoitetaan proteiinimuutoksia, jotka liittyvät muun muassa infektioihin, kuduskuolioihin ja joihinkin autoimmuunisairauksiin, kuten nivelreumaan sekä Crohnin tautiin. Tällöin eräissä plasman proteiinien pitoisuuksissa tapahtuu nousua. Näistä proteiineista C-reaktiivinen proteiini (CRP) kohoaa hyvin nopeasti ja myös laskee nopeimmin tilanteen rauhoituttua. Tämän vuoksi CRP on kliinisesti eniten käytetty akuutin faasin osoittajaproteiini. (Marshall & Bangert 2008, 258; Irjala 2010, 137.)

Leukosyyttien liikkuvuus lisääntyy CRP:n vaikutuksesta. CRP myös tehostaa fagosytoosia sekä aktivoi komplementtijärjestelmän. CRP on epäspesifinen, sillä sen tuloksesta ei voida suoraan päätellä johtuuko arvon nousu infektiosta, autoimmuunisairaudesta vai jostakin muusta akuutin faasin reaktiosta. Epäspesifisyydestä huolimatta CRP:n määrittämistä käytetään paljon muun muassa virus- ja bakteeri-infektioiden erotusdiagnostiikassa. Lisäksi CRP-määrityksen indikaatioina ovat muun muassa leikkausten jälkeisten infektioiden osoittaminen sekä kudusvaurioiden suuruuden arviointi. (Marshall & Bangert 2008, 258; Irjala 2010, 137.)

Fimlab Laboratoriot Oy:ssä CRP määritetään immunokemiallisella menetelmällä litiumhepariiniplasma-näytteestä. CRP:n viitearvo on alle 10 mg/l. CRP-määrityksellä ei ole merkittävästi häiritseviä tekijöitä, mutta senkin arvoon hemolyysi voi vaikuttaa näytteen laimenemisen kautta. (Fimlab: ohjekirja 2012b.)

3.4 Perusverenkuva

Perusverenkuvatutkimus on käytetyimpiä terveydenhuollon laboratoriotutkimuksia. Perusverenkuvatutkimuksessa mitataan verinäytteestä punasolujen, trombosyyttien ja leukosyyttien määrät, hemoglobiinipitoisuus sekä punasolujen keskitilavuus (MCV). Näiden avulla lasketaan lisäksi veren hematokriittiarvo eli punasolujen tilavuusosuus sekä punasoluvakiot MCH eli punasolujen hemoglobiinin keskimassa sekä MCHC eli punasolujen hemoglobiinin keskimassakonsentraatio. (Mahlamäki 2004, 269; Matinlauri & Vilpo 2010, 249–250.) Perusveren kuvan viitearvot on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Perusveren kuvan viitearvot (Fimlab: ohjekirja 2012g)

	Leuk x10E9/l	Hb g/l	HKR osuus	Eryt x10E12/l	MCH pg	MCV fl	Trom x10E9/l
Naiset	3.4–8.2	117–155	0.35–0.46	3.9–5.2	27–33	82–98	150–360
Miehet	3.4–8.2	134–167	0.39–0.50	4.3–5.7	27–33	82–98	150–360

Hematokriitin (B-HKR) määrittystä käytetään veren hapenkuljetuskapasiteetin ja nestetasapainon arvioimisessa. Hematokriitin arvo ilmoittaa punasolujen osuuden koko veren osuudesta. Solulaskijoilla hematokriitti lasketaan punasolujen määrän ja keskitilavuuden avulla. Hemoglobiinipitoisuus ja hematokriitti korreloivat toistensa kanssa eli hemoglobiiniarvon noustessa myös hematokriittiarvo nousee ja toisinpäin. (Mahlamäki 2004, 270–271; Matinlauri & Vilpo 2010, 249–250.)

Hemoglobiini (B-Hb) on proteiini, jota on punasolujen sisällä vastaamassa hapenkuljetuksesta elimistössä. Hemoglobiinin määrittystä käytetään esimerkiksi anemioiden ja polysytemioiden diagnostiikkaan. Anemiassa hemoglobiiniarvo on pienentynyt ja polysytemiassa suurentunut. Hemoglobiinipitoisuus mitataan kolorimetrisesti syaanimet-hemoglobiini- tai lauryylisulfaattimenetelmällä 540 nm:n aallonpituudella. (Mahlamäki 2004, 270–271; Matinlauri & Vilpo 2010, 249–250.)

Veren punasolupitoisuus (B-Eryt) ilmoittaa, kuinka monta punasolua on litrassa verta. Punasolujen määrä mitataan verensolulaskimella erillisellä erytrosyyttikanavalla, joka erottelee punasolut trombosyyteistä sähkönsäätökyvyn muutosten avulla. Menetelmässä impulssin koko on verrannollinen solun kokoon eli erotus tapahtuu solun koon erotuk-

sen avulla. (Savolainen 2010, 71.) Punasolumäärän suora merkitys on kliinisesti vähäinen, mutta arvo on välttämätön toistettavien punasoluindeksien laskemiseen ja siksi B-Eryt määritetään solulaskijoiden avulla (Matinlauri & Vilpo 2010, 250).

Peruspunasoluindeksit ovat käytännöllisiä anemioita selviteltäessä. MCV eli punasolujen keskitilavuus kuuluu mitattaviin perusparametreihin ja MCH eli punasolujen hemoglobiinin keskimassa ja MCHC eli punasolujen hemoglobiinin keskimassakonsentraatio saadaan laskennallisesti muiden suureiden avulla. MCV kertoo punasolujen koon ja sillä voidaan esimerkiksi anemiat erotella mikro-, normo- ja makrosytäärisiin. MCH ja MCHC kertovat hemoglobiinin määrästä punasoluissa ja niiden avulla voidaan erotella punasoluja hypo-, normo- ja hyperkromisiin. (Matinlauri & Vilpo 2010, 250; Hoffbrand & Moss 2011, 27.) MCHC on yleensä tarpeeton parametri, joka joskus saattaa nousta sferosytoosissa (Fimlab Kanta-Häme: laboratorio-ohjeet). Huslab:n ohjekirjan (2013) mukaan MCHC:n viiteväli on 320–355 g/l sekä naisilla että miehillä (Huslab: ohjekirja 2013).

Veren leukosyyttimäärä (B-Leuk) ilmoittaa kuinka monta leukosyyttiä eli valkosolua on litrassa verta. Leukosyyttien määrä mitataan verensolulaskimella erillisellä leukosyyttikanavalla. Leukosyyttiarvo voi kohota esimerkiksi erilaisissa tulehdustiloissa sekä pahanlaatuisissa veritaudeissa. Pienentynyt leukosyyttiarvo voi viitata esimerkiksi luuydinkudoksen toksiseen tai maligniin vaurioon. (Mahlamäki 2004, 270–271; Matinlauri & Vilpo 2010, 250–251; Savolainen 2010, 71; Fimlab: ohjekirja 2012e.)

Veren trombosyyttimäärä (B-Trom) kertoo trombosyyttien kokonaismäärästä elimistössä. Verenkuvaa-analysointilaitteilla laskettaessa veren trombosyyttien määrittäminen tapahtuu luotettavasti ja toistettavasti. Hyvin matalat trombosyyttitulokset tarkistetaan manuaalisesti mikroskoopissa. Verenkuvaa-analysointilaitteet mittaa trombosyytit leukosyytti- tai erytrosyyttikanavalla perustuen niiden kokoeroon muihin soluihin nähden. Kohonneet trombosyyttiarvot voivat liittyä esimerkiksi kroonisiin tulehdustiloihin tai veren maligneihin sairauksiin. Laskeneet trombosyyttiarvot liittyvät puolestaan esimerkiksi hematopieettisen järjestelmän häiriöihin. (Mahlamäki 2004, 270–271; Fimlab: ohjekirja 2012i.)

Perusverenkuvan määrittämiseen käytetään yleisesti EDTA-kokoverta. Solulaskennassa ongelmia voivat muodostaa kylmäagglutiniinit, näytteen lipeemisyys, suuri leukosyyttimäärä sekä IgM-paraproteiini. AIHA-potilailla agglutinaatio aiheuttaa sen, että punasoluarvot eivät välttämättä ole luotettavia. Agglutinaatio voidaan havaita automaattisista solulaskentatuloksista esimerkiksi MCHC:n ja/tai MCV:n suurenemisena. Joillakin henkilöillä voivat trombosyytit agglutinoitua EDTA:n vaikutuksesta aiheuttaen virheellisen matalan trombosyyttiarvon. Tällöin kyseessä on pseudotrombosytopenia. Hyvin matalat trombosyyttiarvot tulisi tarkistaa mikroskoopilla agglutinaation varalta. (Mahlamäki 2004, 272–273; Matinlauri & Vilpo 2010, 250.) Agglutinaation havaitsemista ja vaikutuksia on esitetty liitteissä 1 ja 3.

3.5 Tromboplastiiniaika

Tromboplastiiniaikamäärityksellä (P-TT) mitataan K-vitamiinista riippuvien hyytymistekijöiden osuutta hyytymistapahtumassa. K-vitamiinista riippuvat hyytymistekijät ovat maksan syntetisoimia ja ne kuuluvat ulkoiseen eli kudostekijän kautta aktivoituvään järjestelmään. K-vitamiinista riippuvaisia hyytymistekijöitä ovat FII, FVII ja FX. Tromboplastiiniaikamääritystä käytetään varfariinilla toteutetun antikoagulanttihoidon seurantaan. Tromboplastiiniajalla voidaan saada tietoa myös K-vitamiinin puutoksesta sekä maksan proteiinisynteesin tilasta. (Mahlamäki 2004, 316–317; Fimlab: ohjekirja 2012h; Laffan & Manning 2012, 409–410.)

Määritykseen käytetään reagenssina kudostromboplastiinia, johon on lisätty fibrinogeeniä ja hyytymistekijä FV:sta. Reagenssissa on kaikkia muita hyytymistekijöitä ylimäärin, mutta siitä puuttuvat kokonaan tekijät FII, FVII ja FX, joita tutkimuksella määritetään. Jos tutkittavalla on vajausta kyseisissä hyytymistekijöissä, on hyytymisaika pidentynyt. (Joutsu-Korhonen & Koski 2010, 279; Laffan & Manning 2012, 409–410.)

Oraalisen antikoagulanttihoidon seurannassa käytetään kansainvälistä INR-tulostusta (P-TT-INR), joka yhdenmukaistaa tulostason, vaikka määritykset tehtäisiin eri valmistajien reagensseilla. P-TT-INR tuloksen tulee olla välillä 0,9–1,2 ilman antikoagulanttihoitoa. Antikoagulanttihoitoa saavilla viiteväli on 2–3. Muihin tutkimusindikaatioihin sopii paremmin tromboplastiiniajan prosenttitulostus (P-TT-SPA), jonka tulostason tu-

lee olla välillä 70–130 %. Alentunut prosenttiosuus voi viitata esimerkiksi K-vitamiinin vajaukseen tai maksan vajaatoimintaan. (Mahlamäki 2004, 317; Joutsu-Korhonen & Koski 2010, 280; Fimlab: ohjekirja 2012h.)

Näytteenä määrityksessä käytetään yleisesti sitraattilaimennettua plasmaa (1:9). Näyteputken tulee olla täytetty tarkasti merkkiviivan mukaisesti, jotta laimennussuhde on oikea ja tulokset luotettavia. Tulosten luotettavuutta lisää myös sitraatin tasainen sekoittuminen näytteeseen, jonka vuoksi näyte on sekoitettava huolellisesti heti näytteenoton jälkeen. Näyte säilyy 1–3 vuorokautta huoneenlämmössä. Näytettä ei saa säilyttää jääkaappilämpötilassa, sillä hyytymistekijät FVII, FXI ja FXII aktivoituvat. Näytteenotossa tulee välttää kiristyssiteen käyttöä ja näytteen tulee virrata vapaasti näyteputkeen, sillä hemolyysi saattaa häiritä määritystä. (Laffan & Manning 2012, 403–404, 410.)

4 NÄYTTEENOTTO JA ESIKÄSITTELY

Erilaisten näytteiden otto ja analysointi ovat pohjana hyvin monissa potilaan tilaa selvittävässä tutkimuksissa ja tautien diagnosoinnissa. Näytteenotto on merkittävä vaihe laboratoriotutkimusprosessia ja sen onnistumista. Oikeaan aikaan, oikeasta paikasta ja oikealta potilaalta otettu laadukas näyte on merkittävä osa luotettavan tuloksen saamista. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry: näytteenotto 2013.)

Laboratoriotutkimusprosessi jaetaan kolmeen vaiheeseen: preanalyyttiseen-, analyyttiseen- ja postanalyyttiseen vaiheeseen. Preanalyyttinen vaihe sisältää toimenpiteet ennen näytteen analysointia. Siihen kuuluvat esimerkiksi tutkimuksen tarpeen toteaminen, tutkimuspyynnön tekeminen, potilaan ohjaus tutkimukseen, näytteen ottaminen sekä näytteen säilytys, kuljetus ja esikäsittely. Analyyttinen vaihe sisältää tutkimuksen suorituvaiheen, huomioiden laadunvarmistukselliset vaatimukset. Postanalyyttinen vaihe seuraa analyyttistä vaihetta, siinä tutkimuksen tulos on jo saatu ja keskitytään analysoimaan sen luotettavuutta ja todenmukaisuutta. Postanalyyttiseen vaiheeseen kuuluvat myös esimerkiksi tulosten hyväksyminen ja tilaajalle toimittaminen sekä tulosten tulkin-ta, arviointi ja tuloksen pohjalta tehtävä hoitopäätös. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 7; Seppälä & Tuokko 2010, 23–24.)

4.1 Verinäytteenotto

Preanalyyttiseen vaiheeseen kuuluva oikein otettu näyte on merkittävä osuus laboratoriotutkimuksen laadukasta suorittamisesta. Luotettavan tuloksen saamiseksi tarvitaan oikealta potilaalta, oikeaan aikaan, oikeasta paikasta, oikealla tavalla otettu, laadukas näyte. Bioanalyttikon tehtäviin kuuluu päättää, täyttääkö otettu näyte tarvittavat laatuvaatimukset. Analyysimenetelmien ja -laitteiden kehityksestä ja analyysivaiheen hyvistä laadunhallintajärjestelmistä johtuen analyttinen vaihe on nykypäivänä hyvin hallinnassa. Preanalyyttiseen vaiheeseen liittyvät ongelmat muodostavat suurimman osan analyysien epävarmuuteen vaikuttavista tekijöistä. (Seppälä & Tuokko 2010, 24; Suomen Bioanalytikkoliitto ry: näytteenotto 2013.)

Viitearvot, joiden mukaan analyysiprosessissa saatua tulosta arvioidaan, perustuvat vakioituun näytteenottoon, jonka vuoksi oikeaoppisen näytteenoton merkitys on suuri, jotta tulos on luotettavasti verrattavissa viitearvoihin. Preanalyttisen vaiheen vakioimiseksi ja epävarmuuden poistamiseksi näytteenotossa tulee noudattaa selkeitä, voimassa olevia, standardien mukaisia menettelytapoja ja niiden valvontaa. (Seppälä & Tuokko 2010, 24; Suomen Bioanalytikkoliitto ry: näytteenotto 2013.)

Näytteenotto alkaa aina potilaan identifioinnilla eli henkilöllisyyden varmistamisella. Identifointi suoritetaan pyytämällä asiakasta kertomaan nimensä ja henkilötunnuksensa. Mikäli asiakas ei pysty henkilötietojaan itse kertomaan, varmistetaan henkilöllisyys henkilöllisyystodistuksesta, rannekkeesta tai hoitohenkilökunnalta. (Tuokko ym. 2008, 37–38; Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos 2011.)

Näytteenotossa edetään järjestelmällisesti vaiheittain. Jokaisessa vaiheessa on tärkeää suojata itseään sekä potilasta erilaisilta tartunnoilta. Potilaan suojaamiseksi on ehdottoman tärkeää, että näytteenottaja desinfioi kätensä huolellisesti jokaisen potilaan välissä. Näytteenottaja voi suojata itseään erilaisilla kertakäyttöisillä välineillä, kuten suojakäsineillä ja hengityssuojaimella. Tutkimuskohtaiset erityisvaatimukset esivalmisteluista, näytteenotosta, kuljetuksesta ja säilytyksestä sekä käsittelystä tulee tarkistaa laboratorion ohjekirjasta ennen näytteenottoa. Jotkut tutkimukset esimerkiksi vaativat potilaan paastoamista tai lääkkeettömyyttä ja jotkut tutkimukset tulee ottaa ilman kiristyssidettä, makuuasennossa tai esimerkiksi tiettyyn kellonaikaan. Esivalmistelujen noudattamatta jättäminen saattaa johtaa uuden näytteen ottoon tai virheellisiin tuloksiin ja sitä kautta virheellisiin hoitopäätöksiin. (Tuokko ym. 2008, 39; Seppälä & Tuokko 2010, 24; Fimlab: Tietoa laboratoriotutkimuksiin tulevalle 2013.)

Verinäytteenoton aluksi valitaan tarvittavat välineet. Laskimoverinäytteenottoon tarvitaan näyteneuloja, näyteputkia, neulanpidike, vanulappuja ja puhdistusainetta, kiristys-side, ihoteippiä sekä jätteasiat neuloille sekä muille jätteille. Näytteenottoputket valitaan pyydettyjen tutkimusten mukaan. Osa näyteputkista on lisäaineettomia ja joissakin on erilaisia lisäaineita esimerkiksi estämään näytteen hyytymistä, estämään näytteessä tapahtuvaa glykolyysia tai aktivoimaan hyytymisjärjestelmää. Tiettyä tutkimusta varten on olemassa tietty näyteputki ja väärässä näyteputkessa oleva näyte ei yleensä sovellu tutkimukseen. Näytteenottojärjestystä valittaessa tulee ottaa huomioon näyteputkien

sisältämät lisäaineet, sillä ne voivat siirtyä neulan välityksellä näyteputkesta toiseen, jonka seurauksena näyte ei enää välttämättä sovellu haluttuun tutkimukseen. Lisäksi joskus on tarpeen ottaa ensin hukkaputki, varsinkin jos samasta potilaasta otetaan vain yksi näyteputki. Lisäaineelliset näyteputket tulee myös täyttää tarkasti merkkiviivaan asti, jotta lisäainetta on näytemäärään nähden oikeassa suhteessa. Lisäaineelliset näyteputket tulee sekoittaa näytteenoton jälkeen huolellisesti, mutta hellävaraisesti, jotta lisäaine sekoittuu näytteeseen tasaisesti. NCCLS:n (National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute, nykyisin CLSI eli Clinical and Laboratory Institute) standardin H3–A4 perusteella suositellaan näytteenottojärjestykseksi seuraavaa:

- veriviljelypullot tai -putket (steriili näyte)
- seerumiputket, lisäaineeton
- sitraattiputket
- seerumiputket, joissa on näytteen hyytymistä aktivoivaa lisäainetta
- hepariiniputket
- EDTA-putket
- glykolyysi-inhibiittoria sisältävät putket, ns. sokeriputki

(Tuokko ym. 2008, 40–41; Seppälä & Tuokko 2010, 25–26; Kauppinen, Kemppainen & Polvinen 2011, 20–21.)

Laskimoverinäytteet otetaan yleensä kyynärtaipeen laskimoista huolellisen tunnustelun ja ihon puhdistuksen jälkeen. Puristussidettä voi yleensä käyttää apuna suonien etsimisessä, mutta se on löysättävä välittömästi veren alkaessa virrata näyteputkeen. Mahdollisia muita pistopaikkoja ovat kämmenselän sekä jalkapöydän laskimot, mutta nämä paikat ovat asiakkaalle kivuliaampia ja niihin voi helpommin liittyä komplikaatioita, kuten hermoon tai valtimeen pistäminen. Näytettä ei myöskään saa ottaa esimerkiksi kädestä, johon menee suonensisäinen lääkitys, turvonneelta tai mustelmaiselta alueelta tai raajasta, jossa on kipsi. Käytettävä neula ja sen koko valitaan laskimon mukaan, yleensä näyte saadaan vakuumineulalla, mutta ohuisiin suoniin tulee käyttää avo- tai siipineulaa, sillä voimakas vakuumin aiheuttama imu voi tukkia suonon, jolloin näytettä ei saada. (Tuokko ym. 2008, 42–43; Helin & Rissanen 2010, 10.)

Näytteenoton jälkeen neula poistetaan suonesta ja pistokohtaan asetetaan taitos, jonka läpi pistokohtaa painetaan muutama minuutti verenvuodon tyrehtyttämiseksi. Näyte-

putket identifioidaan asiakkaan tiedoilla ja näytteet tarkistetaan esimerkiksi hyytymien ja vajaatäyttyisyyden varalta. Näytteitä säilytetään ja kuljetetaan niiden vaatimalla tavalla, jotta näytemateriaali säilyy edustuskelpoisena ja antaa totuudenmukaisen kuvan asiakkaan senhetkisestä tilasta. Jos näytteet analysoidaan näytteenottopäivänä, säilyvät ne yleensä huoneenlämmössä. Osa näytteistä tulee ottaa lämpimään tai kylmään näyteputkeen, osa tulee suojata valolta heti näytteenoton jälkeen. Osaan tutkimuksista vaaditaan välittömästi eroteltu plasma tai seerumi. Tutkimuskohtaiset säilytys- ja kuljetusohjeet löytyvät ohjekirjoista, joihin näytteenottajien on syytä perehtyä jo ennen näytteenottoa. Pidempiaikainen säilytys tapahtuu jääkaapissa tai pakastimessa. Näytteiden kuljetuksen laboratorioon tulisi tapahtua mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen erillisissä laatikoissa, jotka tasaavat lämpöä laatikon sisällä. Näytteet eivät saa kuljetuksen aikana jäätyä ja tärinää pitää välttää. (Kauppinen ym. 2011, 27.)

4.2 Esikäsittely

Näytteiden virheellinen käsittely, kuljetus tai säilytys voi pilata hyvin otetun näytteen ja aiheuttaa suurenkin virheen analyysitulokseen sekä vaikeuttaa tulkintaa. Näytteen saapuessa laboratorioon, näytteenottoaika ja -tapa sekä säilytys- ja kuljetusolosuhteet on dokumentoitava siten, että tiedot ovat jäljitettävissä. Näytteelle tehdään vastaanottotarkistus, jolla arvioidaan näytteen analyysikelpoisuus. Jos näyte hylätään, pitää hylkäämiskriteerit kirjata. (Seppälä & Tuokko 2010, 32; Åkerman, Savolainen, Pelliniemi & Koski 2010, 80.)

Osa laboratorioanalytiikasta voidaan suorittaa suoraan kokoverinäytteestä, jolloin näytettä ei tarvitse esikäsitellä muuten kuin huolellisella sekoittamisella juuri ennen analysointia. Pääosin kliinisen kemian analytiikka tehdään plasmasta tai seerumista, hyytymistutkimukset tehdään pääsääntöisesti plasmasta. Erottelu tapahtuu sentrifugoimalla, jolloin verinäytteen eri komponentit eroavat toisistaan keskipakovoiman avulla. Solut ja niiden osat painuvat näyteputken pohjalle seerumin tai plasman jäädessä pinnalle. Seeruminäytteessä näyteputken pohjalle painuvat solujen mukana myös hyytymistekijät, plasmanäytteessä hyytymistekijät jäävät plasman sekaan. Sentrifugointivoimat ja -ajat vaihtelevat näyteputken sekä näytteen mukaan. Suosituksia sentrifugointiasetuksik-

si antavat niin reagenssivalmistajat kuin kansainväliset suosituksetkin. (Åkerman ym. 2010, 79–80.)

Osa analyyteistä vaatii kylmähauteen sekä kylmäseentrifugoinnin, sillä ne eivät säily elimistön ulkopuolella huoneenlämmössä. Kylmäsäilytyksen ja -seentrifugoinnin vaativat esimerkiksi ammonium-ioni (P-NH₄-ion) sekä insuliini (P-Insu). (Åkerman ym. 2010, 79–80; Fimlab: ohjekirja 2012a; Fimlab: ohjekirja 2013a.) Muita erityisesikäsittelyjä lämpötilan huomioimisen lisäksi ovat esimerkiksi näytteen suojaaminen valolta sekä näytteen erottelu tietyn aikarajan sisällä (Tuokko ym. 2008. 115–117).

4.3 Lämminnäytteenoton ja -esikäsittelyn erityispiirteet

In vitro-olosuhteissa kylmän tyyppin autovasta-aineet usein hajottavat normaaleja punasoluja 20–30°C:ssa, kun läsnä on myös tuore humaanikomplementti. Näin tapahtuu erityisesti silloin, kun näytteen pH on 6,5–7,0. Kylmäagglutiniinit vaativat erityiskäsittelyä niin näytteenotossa kuin esikäsittelyssäkin. Henkilöiltä, joilla on todettu kylmäagglutiniineja, tulee näytteet ottaa esilämmitettyihin näyteputkiin esilämmitetyillä näytteenottovälineillä. Näytteenottovälineiden esilämmittäminen voidaan tehdä esimerkiksi laittamalla välineet 30 minuutiksi 37°C:een inkubaattoriin. Esikäsittely tulee suorittaa 37°C:ssa, kunnes seerumi tai plasma on eroteltu. Erottelun jälkeen agglutinoituneet punasolut on poistettu, jolloin jäljelle jäänyttä seerumia tai plasmaa voidaan käsitellä normaalisti. (Bain & Win 2006, 242; Jury, Nagai & Tatsumi 2012, 6.)

Näytteenoton jälkeen näyteputkea pidetään lämpöhauteella 37°C:ssa, pystyasennossa, kunnes punasolut ovat painuneet näyteputken pohjalle. Tämän jälkeen pipetoidaan näytteen päälle erottunut seerumi uuteen, esilämmitettyyn näyteputkeen, joka vielä seentrifugoidaan, jotta päästään eroon kaikista näytteen punasoluista. Lämmin seentrifugointi voidaan tehdä esimerkiksi normaalissa seentrifugissa niin, että näyte asetetaan seentrifugiin astiassa, joka sisältää 37–40°C:ksi lämmitettyä vettä. Tällä menetelmällä saadaan hemolysoitumaton seerumi- tai plasmanäyte, sillä punasolut säilyvät käsittelyssä ehjänä. Näin tuotettu plasma- tai seeruminäyte voidaan lähettää eteenpäin sellaisenaan. (Bain & Win, 2012, 277–278; Jury ym. 2012, 6.)

Kokoverinäytteeseen suositellaan lisäävän sitraatti-antikoagulanttia, joko happositraattidekstroosia (ACD: Acid-Citrate-Dextrose) tai sitraatti-fosfaattidekstroosia (CPD: Citrate-Phosphate-Dextrose), jotka lisäävät punasolujen säilymistä jääkaappilämpötilassa. Sitraatti-antikoagulanttia suositellaan käytettävän erityisesti silloin kun kokoverta halutaan säilyttää pitkään esimerkiksi verensiirtotarkoituksessa tai silloin kun halutaan tutkia punasolujen entsyymivarianttien toimintaa esimerkiksi entsyymipuutos hemolyytisissä anemioissa. (Bain & Win 2012, 278; Jury ym. 2012, 6; Roper & Layton 2012, 260.)

Fimlab Laboratoriot Oy:n tämän hetkisessä lämpönäytteenotto-ohjeessa sanotaan, että näyteputket laitetaan näytteenoton ja sekoituksen jälkeen termoskannuun, jossa on lämpömittarilla 37⁰C:ksi varmistettua vettä. Lisäksi ohjeessa on huomioitu, että näyteputkia voi lämmittää jo etukäteen termoskannussa, mutta tämä ei ole ohjeen mukaan välttämätöntä. Näyte siis voidaan ottaa huoneenlämpöisillä näytteenottovälineillä, ainoastaan säilytys ja kuljetus tapahtuvat lämmitettynä. (Fimlab: ohjekirja 2012c.) Omien työelämäkokemuksiemme mukaan näyte voidaan uudelleen lämmittää myös vasta laboratoriossa ennen analysointia, jos näytettä ei ole otettu lämminnäytteenoton ohjeiden mukaan. Uudelleen lämmityksellä saattaa kuitenkin olla vaikutuksia tutkimustuloksiin, eikä agglutinaatio välttämättä purkaudu kokonaan. Katso liite 2, jossa manuaalimenetelmällä tehty hematokriittiarvo eroaa myös lämmitetyn näytteen solulaskintuloksesta.

Esimerkiksi teoksissa Dacie and Lewis Practical Haematology (2012, 6, 277) ja Rossi's Principles of Transfusion Medicine (2009, 330) on sanottu, että määritettäessä nimenomaan kylmähemagglutiniinejä (S-Kyhemag), niiden titteriä tai niiden reaktiolämpötilaa, tulee näyte ottaa ja säilyttää lämpimässä aina siihen asti, kun seerumi on saatu erotettua soluista. Samoissa lähteissä on myös mainintana, että näin tulee toimia myös silloin, kun tutkimukseen tarvitaan tutkittavan punasoluja, kuten veriryhmäserologiset tutkimukset sekä perusverenkuva. Teoksessa Dacie and Lewis Practical Haematology (2012, 526) on kuitenkin veriryhmäserologisten tutkimusten yhteydessä sanottu, että epäiltäessä kylmäagglutiniinejä, voidaan tutkimus uusia lämmitetyillä reagensseillä ja punasoluilla. (Rowley, Cantwell & Milkins, 2012, 526.)

Toisaalta joissakin löytämissämme näytteenottokirjoissa, kuten Garza & Becan-McBride (2008) koko lämminnäytteenotto ja -esikäsitely kuitataan sanomalla, että on

eräitä näytteitä, jotka tulee säilyttää 37⁰C:ssa, kunnes koko tutkimus on suoritettu. Tällaisiksi tutkimuksiksi mainitaan esimerkiksi kylmäagglutiniinit ja kryofibrinogeeni. (Garza & Becan-McBride 2008, 107.) Teoksessa *Kliiniset Laboratoriotutkimukset -opas* näytteiden ottoa varten on erityisesikäsittelyistä mainittu ainoastaan kylmiin ja jäädytettyihin näytteisiin liittyvä esikäsittely, lämpimässä suoritettavasta esikäsittelystä ei ole minkäänlaista mainintaa kyseisessä teoksessa (Tuokko ym. 2008, 116–117). Lämminnäytteenoton käsittely kirjallisuudessa vaihtelee siten, että näytteenoton oppikirjoissa aiheeseen puututaan hyvinkin yleisellä tasolla, kun taas esimerkiksi hematologian teoksissa aihetta käsitellään tarkasti.

5 NÄYTTEENOTTOTOIMINNAN LAADUNVARMISTUS

Kaikkiin laboratoriotutkimuksiin liittyy erilaisia virhelähteitä, jotka voidaan jakaa preanalyttisiin, analyttisiin ja postanalyttisiin virhelähteisiin. Suurin osa virheistä tapahtuu preanalyttisessä vaiheessa (46–68 %). Laboratoriotointia ohjaavat erilaiset kansainväliset ja kansalliset standardit, suositukset ja ohjeet, joilla pyritään vähentämään tutkimustulosten vaihtelua ja virheitä. Suomen standardisoimisliitto (SFS ry) vastaa Suomen standardikokoelmasta, joka vastaa maamme tarpeita ja sisältää myös kansainvälisten ja eurooppalaisten sopimusten edellyttämät kansalliset standardit. (Tuokko ym. 2008, 126.)

5.1 Standardit ja akkreditointi

Standardi on yhteinen menettelytapa, joka on luonteeltaan suositus, mutta viranomaiset saattavat vaatia niiden käyttöä. Suomessa vahvistetun standardin tunnus on SFS, EN tarkoittaa Euroopassa vahvistettua standardia ja ISO puolestaan kansainvälisesti vahvistettua standardia. Tunnusyhdistelmä SFS-EN ISO tarkoittaa standardia, joka on vahvistettu kaikissa kolmessa organisaatiossa (Suomen, Euroopan ja kansainvälinen standardisoimisliitto). Kliinistä laboratoriotointia Suomessa koskevat esimerkiksi standardit ”SFS-EN ISO/IEC 17025: 2005 testaus ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset.” sekä ”SFS-EN ISO 15189: 2003 Lääketieteelliset laboratoriot. Erityisvaatimukset laadulle ja pätevyydelle.” (Tuokko ym. 2008, 126; Suomen standardisoimisliitto SFS ry 2013.)

Akkreditoinnilla tarkoitetaan pätevyyden toteamista. Mittatekniikan keskuksen mukaan akkreditointi on ”kansainvälisiin kriteereihin perustuva menettelytapa, jonka avulla toimielimen pätevyys ja sen antamien todistusten uskottavuus voidaan luotettavasti todeta”. (Mittatekniikan keskus 2013.) Finnish Accreditation Service eli FINAS on Suomen kansallinen akkreditointielin, joka on itsenäinen osa Mittatekniikan keskusta. FINAS:n tehtäviin kuuluu muun muassa laboratoriotointiminnan pätevyyden toteaminen. (Finnish Accreditation Service 2013.)

Akkreditoidulta laboratoriolta vaaditaan erilaisia ominaisuuksia pohjautuen erilaisiin ohjeisiin, säädöksiin ja standardeihin. ”Fimlab Laboratoriot Oy on FINAS- akkreditoitupalvelun akkreditoima laboratorio. Pätevyysalueemme on osoitettu kansainvälisten standardien SFS-EN ISO 17025: 2005 ja SFS-EN ISO15189: 2007 vaatimusten mukaisesti. Pätevyysalueeseen kuuluu laaja valikoima kliinisen kemian, hematologian, mikrobiologian, patologian ja genetiikan keskuslaboratoriossa (Biokatu 4) tehtävää analytiikkaa sekä eri toimipisteiden näytteenottoa.” (Fimlab 2013.)

5.2 Standardin mukainen näytteenotto-ohje

SFS-EN ISO 15189 -standardin mukaan akkreditoidussa laboratoriossa tulee olla käytössä näytteenottoon ja käsittelyyn tarkat ohjeet. Ohjeiden tulee olla näytteenotosta vastaavien henkilöiden käytössä. Ohjeet tulee sisällyttää näytteenoton käsikirjaan. Standardissa on määritelty tarkoin kaikki näytteenoton käsikirjaan merkittävät asiat. (SFS-EN ISO 15189 2007, 44.)

SFS-EN ISO 15189 (2007) -standardissa on listattu muun muassa seuraavat näytteenottoon liittyvät vaatimukset:

- Potilaille annettavat tiedot ja ohjeet näytteenottoon valmistautumista varten
- Tiedot laboratoriopalvelujen käyttäjille tutkimusten lääketieteellisistä indikaatioista ja oikeasta tutkimusten valinnasta
- Menettelyt potilaan esivalmistelua varten (ohjeet hoitajille ja näytteenottajille)
- Menettelyt näytteenottoon ja kuvaus näytteenottoastioista ja kaikista tarvittavista lisäaineista
- Ohjeet otettavan näytteen tyypistä ja määrästä
- Ohjeet näytteenoton ajoituksesta tarpeen mukaan
- Ohjeet kaikkiin tarvittaviin käsittelyihin näytteenoton ja laboratorioon saapumisen välillä, kuten kuljetusvaatimukset, jäähdytys, lämmitys, välitön toimitus jne.
- Ohjeet näytteen merkintään
- Ohjeet potilaan yksityiskohtaiseen tunnistamiseen
- Ohjeet tutkittujen näytteiden säilyttämiseen
- Lisäksi käsikirjassa tulee olla ohjeet muun muassa kliinisen tiedon antamisesta esimerkiksi lääkkeiden osalta sekä ohjeet mahdollisiin lisätutkimuksiin

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyömme tarkoituksena on luoda kattava, selkeä ja yksinkertainen informaatiopaketti kylmäagglutiniineista. Informaatiopaketin avulla toimeksiantajan työntekijät saavat selkeän kuvan kylmäagglutiniineista, niiden aiheuttamista ongelmista sekä ratkaisuksista näihin ongelmiin näytteenoton ja esikäsittelyn osalta.

Opinnäytetyömme tarkoituksena on myös tuotoksen muodossa toteutettava lämminnäytteenotto-ohje. Lämminnäytteenotto-ohjeen teemme perustuen SFS-EN ISO 15189 standardin mukaisesti määriteltyihin vaatimuksiin akkreditoitun laboratorion näytteenotto-ohjeen osalta. Ohjeeseen kokoamme myös pienen ja kattavan paketin kylmäagglutiniineista, siitä mitä ne ovat, mistä ne johtuvat ja miten ne käyttäytyvät.

Opinnäytetyömme tavoitteena on parantaa tulosten luotettavuutta selkeän ja kattavan lämminnäytteenotto-ohjeen avulla. Opinnäytetyömme tavoitteena on myös parantaa omaa ammatillista erikoisosaamistamme.

7 OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Toiminnallisessa opinnäytetyössä yhdistyy toiminnallisuus, teoreettisuus, tutkimuksellisuus ja raportointi. Toiminnallisella opinnäytetyöllä tarkoitetaan opinnäytetyötä, jossa tarkoituksena on tavoitella käytännön toiminnan opastamista, ohjeistamista, järjestämistä tai järjeistämistä. (Vilka & Airaksinen 2003, 9–10, 16.) Opinnäytetyömme on toiminnallinen, koska tarkoituksenamme on tuottaa lisätietoa toimeksiantajalle kylmäagglutiniineista. Tämän tiedon avulla he voivat kehittää näytteenottoa ja esikäsittelyä.

Ammattikorkeakoulussa tehtävät opinnäytetyöt ovat käytännönläheisiä. Aiheet opinnäytetöihin saadaan yleensä työelämässä nousseiden tarpeiden pohjalta. Tällöin opinnäytetyö edistää opiskelijan ammatillista kasvua ja antaa lisäarvoa opinnäytetyölle. Lisäksi myös opinnäytetyön aiheen antaja hyötyy opinnäytetyöstä ja sen tuloksista. Opinnäytetyön avulla opiskelijan tulee kyetä osoittamaan omaavansa riittävät tiedot ja taidot opiskelemaltaan alalta. (Vilka & Airaksinen 2003, 10, 16.)

Toiminnalliseen opinnäytetyöhön kuuluu raporttiosio ja tuotos. Toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena on yhdistää ammatillinen teorettinen tieto käytännön työskentelyyn. Kirjallinen raporttiosio toimii pohjana tuotokselle. Tuotos voi olla esimerkiksi ohje tai ohjeistus, jolla pyritään opastamaan käytännön toimintaa. (Vilka & Airaksinen 2003, 9, 10, 16, 65.)

Opinnäytetyömme tarkoituksena on kartoittaa ja selvittää kylmäagglutiniinien aiheuttamia ongelmia näytteenotossa ja esikäsittelyssä. Työmme on kartoittava, sillä sen tarkoituksena on selvittää vähän tunnettua ilmiötä. Opinnäytetyöllä pyrimme teorian avulla perustelemaan näytteenotossa ja esikäsittelyssä käytössä olevia menetelmiä. Opinnäytetyömme on myös selvittävä, sillä sen avulla pyrimme tekemään selvityksen kylmäagglutiniinien aiheuttamiin ongelmiin. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 127–128.)

Opinnäytetyössä käytämme myös kirjallisuuskatsauksellisia menetelmiä. Salmisen (2011) mukaan kirjallisuuskatsaus antaa mahdollisuuden tuottaa uutta tietoa jo valmiiksi tutkitusta aiheesta. Kirjallisuuskatsaukset voidaan jakaa eri tyyppeihin. Näistä yleisimmin käytetään kuvailevaa kirjallisuuskatsausta. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus voidaan

jakaa narratiiviseen ja integroivaan muotoon. Narratiivinen kirjallisuuskatsaus on kaikkein kevyin muoto. Narratiivisella kirjallisuuskatsauksella voidaan antaa laaja-alainen kuva käsiteltävästä aiheesta, vaikka lähdemateriaalia ei ole käyty läpi systemaattisin keinoin. Integroivaa kirjallisuuskatsausta voidaan käyttää silloin kun tutkittavaa ilmiötä halutaan kuvata mahdollisimman monipuolisesti, sillä voidaan tuottaa myös uutta tietoa jo tutkitusta aiheesta. Integroiva kirjallisuuskatsaus antaa myös mahdollisuuden kirjallisuuden tarkasteluun, kriittiseen arvioimiseen ja syntetisointiin. (Salminen 2011, 6–8.)

Opinnäytetyömme raporttiosion teorian metodisena menetelmänä käytämme kirjallisuuskatsausta, joka on mahdollisimman kevyt ja laaja-alainen sekä antaa mahdollisuuden tutkittavan ilmiön monipuoliseen kuvailuun. Pohdinnassa pyrimme kriittisesti myös arvioimaan käyttämäämme aineistoa.

Teoreettista aineiston keruuta teemme lähdemateriaaleista, kuten artikkeleista ja aihetta käsittelevistä kirjallisista teoksista. Suomenkielistä materiaalia on saatavilla melko vähän, jonka vuoksi valtaosa lähteistä on kansainvälisiä. Lisäksi olemme saaneet käyttöömmme Fimlab Laboratoriot Oy:n materiaalia näytteenottoon ja laboratoriotointaan liittyvistä standardeista sekä nykyisestä näytteenotto- ja esikäsittelyohjeistuksista.

8 OPINNÄYTETYÖPROSESSI

Opinnäytetyön aiheen saimme syksyllä 2012 opinnäytetyöaiheseminaarin yhteydessä. Aihe kuulosti kiinnostavalta, sillä pohjatietoja kylmäagglutiniineista meillä kummallakaan ei tuolloin juuri ollut. Aihe myös oli selkeä ja pelkän otsikon perusteella pystyi jo melko pitkälle pääättelemään, mitä työllä halutaan selvittää. Lisäksi tuolloin ajattelimme, että aiheeseen kuuluisi tutkimusosio, minkä olisimme halunneet suorittaa. Myöhemmin meille selvisi, että tutkimuksen teko tästä aiheesta ei näissä aikarajoissa ole mahdollista.

Aiheen saamisen jälkeen työstimme viikon sisällä ideapaperin, johon kokosimme ajatuksiamme opinnäytetyön suhteen. Tuolloin aloimme työstämään myös opinnäytetyösuunnitelmaa saamamme otsikon perusteella. Työelämän edustajat, laboratorioesimiehet Merja Lammin ja Nina Isomäen Fimlab Laboratoriot Oy:stä, tapasimme lokakuun 2012 lopulla. Tuolloin meille selvisi aiheestamme enemmän, kuten suunnittelemamme tutkimusosion suorittamisen mahdottomuus näissä aikarajoissa. Tapaamisessa rajasimme myös työssämme käsiteltävät määritykset. Tapaamisen jälkeen teimme opinnäytetyösuunnitelman lähestulkoon alusta ja saimme sen valmiiksi joulukuussa 2012. Uudistettu opinnäytetyösuunnitelma yhdessä lupa- ja sopimuspaperien kanssa toimitettiin työelämään tammikuussa 2013. Luvan opinnäytetyöllemme saimme 8.1.2013.

Opinnäytetyötä pääsimme varsinaisesti aloittamaan huhtikuun 2013 puolivälissä, sillä alkuvuoden olimme ammattia edistävässä harjoittelussa eri paikkakunnilla. Ennen huhtikuuta olimme jo etsineet ja tutustuneet työhömmme liittyvään lähdeaineistoon. Opinnäytetyön teoriaosuutta tehdessä mietimme, mitä asioita sisällytämme teoriaosuuteen ja mitä jätämme pois. Samalla pohjustimme ajatusta tuotoksen sisällöstä. Päädyimme pitämään tuotoksen tiiviinä ja informatiivisena pakettina, johon sisällyttäisimme käyttöindikaatiot lämminnäytteenotosta sekä lämminnäytteenoton ja esikäsitteilyn erityispiirteet.

Teoriaosuuden havainnollistamiseksi halusimme liittää opinnäytetyöhön verenkuvanalysointitulosteita kylmäagglutiniininäytteistä, jotka on analysoitu ilman lämmitystä sekä uudelleen lämmitettynä. Kävimme pyytämässä tulosteita Fimlab Laboratoriot Oy:n hematologian automaatiolta. Tulosteet ovat opinnäytetyömme liitteet 1–4.

Ensimmäisessä ohjauskeskustelussa kävimme, kun teoriaosuus oli melko valmis. Ohjauskeskustelun jälkeen tarkensimme joitakin kohtia ja etsimme muutaman lähteen lisää. Teoriaosuuden saimme valmiiksi toukokuun 2013 alussa ja lähetimme sen työelämään kommentoitavaksi. Saamiemme kommenttien pohjalta teimme teoriaosuuteen pieniä korjauksia ja tarkennuksia. Teoriaosuuden valmistuttua suunnittelimme ja teimme standardin mukaisen tuotoksen, jonka jälkeen keskityimme opinnäytetyön pohdinnan tekemiseen ja hienosäätöön. Tuotoksen ja pohdinnan saimme valmiiksi toukokuun 2013 lopulla. Kävimme ohjaavien opettajien kanssa uudelleen ohjauskeskustelussa toukokuun 2013 lopulla.

Kesäkuun 2013 alussa olimme muokanneet opinnäytetyömme lopulliseen versioon. Kävimme vielä ohjauskeskustelussa ohjaavien opettajien kanssa, jonka jälkeen teimme pieniä muutoksia muun muassa opinnäytetyön tavoitteeseen ja tarkoitukseen sekä tuotokseen. Lähetimme opinnäytetyömme työelämän edustajille sisällön tarkistukseen kesäkuussa 2013.

Kesällä 2013 teimme opinnäytetyömme tiivistelmän sekä englanninkielisen abstraktin. Saimme elokuun 2013 alussa kommentit sisällön tarkistuksesta työelämästä. Lisäksi luetutimme opinnäytetyömme tuttavillamme ja luimme sen myös itse muutaman kuukauden tauon jälkeen uudelleen. Saamamme palautteen ja omien huomioidemme perusteella teimme viimeiset muutokset opinnäytetyöhömmme.

Ohjaavien opettajien kanssa kävimme viimeisessä tapaamisessa elokuussa 2013. Tämän jälkeen lähetimme opinnäytetyömme opponenteille luettavaksi. Valmiin opinnäytetyön palautimme arvioitavaksi syyskuussa 2013. Opinnäytetyön esitimme seminaarissa loka-kuussa 2013.

9 TUOTOKSEN KUVAUS

Tuotoksena olemme tehneet standardin mukaisen, kaksisivuisen lämminnäytteenotto-ohjeen, johon olemme tiivistäneet teoriaosiossa kuvaamamme vaiheet. Tuotoksen olemme jakaneet johdantoon, indikaatioihin, lämminnäytteenottoon ja näytteen säilytykseen, esikäsittelyyn ja kuljetukseen. Tuotoksen pohjalta toimeksiantaja voi itse soveltaa ohjetta omaan käyttöönsä sopivaksi.

Johdannossa käsittelemme yleisesti kylmäagglutiniineja, niiden vaikutuksia ja aiheuttajia. Indikaatioissa selvennämme milloin lämminnäytteenotto-ohjetta tulee noudattaa. Lämminnäytteenottoon olemme tiivistäneet näytteenoton teknisen suorituksen. Näytteen säilytykseen, esikäsittelyyn ja kuljetukseen olemme huomioineet eri näyttemateriaalien erityispiirteet.

Tuotos toimitetaan vain toimeksiantajalle ja näin sitä ei liitetä julkaistavaan opinnäytetyöhön. Yrityksen toimintamenetelmien ja muiden liikesalaisuuksien vuoksi tuotos on vain toimeksiantajan käytössä. Opinnäytetyömme liitteenä oleva tuotos on oma näkemysemme lämminnäytteenotto-ohjeesta. Tuotos toimitetaan toimeksiantajalle sähköisessä muodossa, jotta he voivat muokata ja päivittää ohjetta haluamaansa muotoon. Luovutuksen yhteydessä tuotoksen käyttöoikeus siirtyy toimeksiantajalle, mutta tekijänoikeudet säilyvät meillä.

Tuotosta suunnitellessa pohdimme kuvien käyttämistä tuotoksessa. Aluksi ajattelimme käyttää valokuvia tarvittavista välineistä. Pohdinnan jälkeen päädyimme kuitenkin jättämään valokuvat pois, sillä mielestämme ne eivät anna lisäarvoa tuotokselle, sillä uskomme välineiden olevan käyttäjille entuudestaan tuttuja.

10 POHDINTA

Opinnäytetyömme tavoitteena oli parantaa tulosten luotettavuutta tuottamalla selkeä informaatiopaketti kylmäagglutiniineista sekä niiden aiheuttamista ongelmista näytteenotossa ja esikäsittelyssä. Teoriaosuuteen olemme keränneet lähdemateriaaleista mielestämme kattavan paketin käsitellen vasta-aineita, autoimmuunihemolyyttisiä anemioita, annettuja määrityksiä, näytteenottoa sekä esikäsittelyä ja näytteenoton laadunvarmistusta. Tämän teoriaosuuden avulla voidaan parantaa työntekijöiden tietoisuutta kylmäagglutiniineista sekä niiden vaikutuksista, mikä puolestaan vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kirjallisuuden pohjalta pohtia Fimlab laboratoriot Oy:n lämminnäytteenotto-ohjeistusta, sen riittävyttä ja oikeellisuutta. Alkuperäinen lämminnäytteenotto-ohje oli liitetty ohjeistukseen erityiskäsittelyä vaativasta näytteenotosta, jossa lämminnäytteenottoa oli käsitelty hyvin suppeasti. Ohjeessa oli käsitelty ainoastaan lämminnäytteenoton suoritusta, erikseen ei oltu selvitetty milloin ja mistä syystä lämminnäytteenotto tulisi suorittaa tai millaisia virhelähteitä syntyy jos ohjetta ei noudateta. Lisäksi ohjeessa lämmön säilyttämiskeinoksi on mainittu vain termoskannu. Koimme, että lämminnäytteenotto-ohjetta voisi laajentaa ja tästä syystä päädyimme tekemään laajemman lämminnäytteenotto-ohjeen. Tuotoksen teossa olemme käyttäneet standardin mukaisia vaatimuksia. Tuotos toimitetaan työelämään opinnäytetyön raporttion mukana sekä sähköisenä että kansitettuna versiona.

Kylmäagglutiniinien vaikutus valittuihin tutkimuksiin

Kylmäagglutiniinit ovat tyypillisesti IgM-luokan vasta-aineita, jotka kykenevät sitoutumaan punasolujen pinta-antigeeneihin ruumiinlämpöä alemmissa lämpötiloissa. Sitoutuminen aiheuttaa punasolujen agglutinoinumisen sekä komplementin aktivoitumisen. Uudelleen lämmitessä IgM kylmävasta-aine irtoaa punasolusta, jolloin agglutinaatio purkautuu. Komplementtitekijä C3b pysyy kuitenkin kiinnittyneenä punasolun pinnalla aiheuttaen hemolyysin intra- tai ekstravaskulaarisesti lämpötilan noustessa ruumiinlämpöön tai korkeammalle.

Kirjallisuuden (Bain & Win 2006; Jury, Nagai & Tatsumi 2012) mukaan henkilöiltä, joilla on todettu kylmäagglutiniineja, näytteet tulee ottaa lämminnäytteenotto-ohjeiden mukaisesti. Tutkimuksesta riippuen näyte voidaan myös uudelleen lämmittää ennen analysointia. Kirjallisuudessa muun muassa Dacie and Lewis: Practical Haematology (2012) ja Rossi's Principles of Transfusion Medicine (2009) painotetaan lämminnäytteenottoa erityisesti silloin, kun tutkimuksen kohteena ovat nimenomaan kylmävastaaineet. Lähteiden mukaan näyte tulee pitää lämpimänä siihen asti kun plasma tai seerumi on eroteltu kokoverinäytteestä. Kokoverinäytteestä tehtävät määritykset puolestaan tulee tehdä lämpimässä, jotta kylmäagglutiniinit eivät vaikuttaisi lopputulokseen.

Löytämässämme lähdemateriaaleissa ei ole käsitelty kylmävasta-aineiden vaikutusta kliinisen kemian analyytteihin. Kliinisen kemian analyyteistä useimmat tutkitaan plasmasta tai seerumista. Kylmäagglutiniinit aiheuttavat punasolujen agglutinaation lämpötilan laskiessa ja komplementtivälitteisen hemolyysin lämpötilan noustessa. Seerumia tai plasmaa käsiteltäessä punasolujen agglutinaatio ei haittaa määrityksiä, joten näyte voidaan ottaa normaalisti huoneenlämmössä. Hemolyysi sen sijaan vaikuttaa moniin kliinisen kemiallisten analyyttien tuloksiin, joten näytteen uudelleen lämmittämistä tulisi välttää, kunnes plasma tai seerumi on eroteltu. Löytämämme kirjallisuuden perusteella olemme sitä mieltä, että tutkittaessa kliinisen kemian analyyttejä ja muita plasmasta tai seerumista tehtäviä tutkimuksia, lämminnäytteenotto ja -esikäsitely eivät ole tarpeellisia, kunhan varmistetaan ettei näyte pääse hemolysoitumaan.

Perusverenkuvatutkimus tehdään kokoverestä, jolloin tutkitaan myös punasoluja. Näin ollen punasolujen agglutinaatio häiritsee määrittystä. Liitteessä yksi on lämminnäytteenotto-ohjeiden mukaisesti otettu näyte, joka on kuitenkin päässyt jäähtymään ennen määrittystä, joten laite on hälyttänyt muun muassa punasolujen agglutinaatiota. Tämän vuoksi näyte on uudelleen määritetty puolen tunnin lämmityksen jälkeen. Lämmityksen vaikutus näkyy liitteessä kaksi. Tulosteita vertaillen nähdään, kuinka agglutinaatio osittain purkaantuu: punasolujen määrä kasvaa, hematokriittiarvo nousee ja MCH sekä MCHC pienenevät. Liitteeseen kaksi on merkitty myös manuaalisesti tehdyn hematokriitin arvo, joka eroaa kummastakin analysointituloksesta ja tästä syystä perusverenkuvatutkimus on vastattu vajaana. Liitteissä kolme ja neljä nähdään agglutinaation vaikutukset vielä selvemmin. Agglutinoitunut näyte voidaan yleensä uudelleen lämmittää perusverenkuvatutkimusta varten, kuten yllä on todettu. Tällöin punasolut eroavat toisistaan.

Uudelleen lämmittäminen ei kuitenkaan aina pura agglutinaatiota kokonaisuudessaan, mikä vaikeuttaa tulosten tulkintaa, kuten edellä (liite 2) esimerkiksi hematokriitin kohdalla on tapahtunut. Lisäksi näytteen hemolysoituminen uudelleen lämmityksessä vaikuttaa tuloksiin, jonka vuoksi perusverenkuva tutkittaessa on suositeltavaa, että näytteenotossa noudatetaan lämminnäytteenoton ohjeita. Näistä syistä laboratorion tulee harkita soveltuuko lämminnäytteenotto hajautettuun näytteenottoon.

Eettisyys ja luotettavuus

Opinnäytetyömme luotettavuutta lisää käyttämämme lähdeaineisto, joka on pääasiallisesti 2000-luvulta ja uusimmat julkaisut aivan viime vuosilta. Kylmäagglutiniineihin on kiinnitetty ensimmäisen kerran huomiota jo 1900-luvun alussa. Tästä syystä alkuperäisteokset ovat 1900-luvun alusta, mutta emme kokeneet tarpeelliseksi etsiä ja käyttää näitä alkuperäislähteitä, sillä uusimmat teokset sisältävät saman tiedon päivitettyinä nykyaikaan. Suurin osa käyttämistämme lähteistä on kansainvälisiä teoksia, koska suomenkielistä aineistoa ei juurikaan ollut saatavilla. Olemme pyrkineet käyttämään hyvää lähdesynteisiä, jotta teoriaosio olisi luotettavampaa. Lähteemme muodostuvat suurimmaksi osaksi kokoomateoksista, joiden tekijöinä on useita alansa asiantuntijoita. Oppikirjoja olemme pyrkineet välttämään, mutta esimerkiksi näytteenotosta ei oikeastaan ole tarjolla muuta kirjallisuutta kuin oppikirjoiksi tehtyjä teoksia. Laboratorioiden ohjekirjoja olemme myös pyrkineet välttämään, mutta esimerkiksi analyyttien viitearvoina halusimme käyttää Fimlab Laboratoriot Oy:n viitearvoja silloin, kun ne olivat käytettävissä.

Havainnollistaaksemme kylmäagglutiniinien vaikutusta perusverenkuvatutkimukseen saimme hematologian laboratorion Sysmex XE-5000 -solulaskimen tulosteet. Tulosteet ovat potilasnäytteistä, joten niistä on poistettu potilaan tunnistetiedot. Näin ollen potilaita ei voida identifioida tulosteiden perusteella.

Opinnäytetyössä käyttämämme kuvat on muokattu alkuperäisistä lähteistä ja tästä syystä emme tarvitse lupia kuvien käyttöön. Opinnäytetyömme eettisinä kysymyksinä esille nousivat toimeksiantavan yrityksen omat toimintamenetelmät sekä muut yrityssalaisuudet. Tästä syystä tuotostamme ei julkaista Internetissä vaan se on vain Fimlab Laboratoriot Oy:n käytössä.

Jatkoaiheet

Opinnäytetyötä tehdessämme jatkotutkimusaiheeksi nousi käytännön tutkimus kylmäagglutiniinien vaikutuksesta käsitelyihin määrityksiin, esimerkiksi vertailu lämpimässä ja huoneenlämmössä otettujen näytteiden välillä. Kylmäagglutiniininäytteitä tulee laboratorioon tutkittavaksi suhteellisen harvoin ja siksi opinnäytetyön aikarajoissa tutkimuksen toteuttaminen ei ole mahdollista. Esittäisimme kuitenkin, että aineistoa voitaisiin koota laajemmalla aikajanelalla ja tuloksien analysointi voitaisiin antaa tehtäväksi opinnäytetyönä. Mielestämme tämä voitaisiin toteuttaa siten, että esimerkiksi yrityksen intranetissä tai ryhmäsähköposteilla informoitaisiin näytteenottohenkilökuntaa tehtävästä tutkimuksesta ja ohjeistettaisiin heitä ottamaan potilailta, joilla on todettuja kylmäagglutiniineja, näytteet sekä lämminnäytteenotto-ohjeen mukaisesti että normaalisti huoneenlämmössä. Molemmat näytteet analysoitaisiin ja tulokset kerättäisiin vertailtavaksi.

Lisäksi kylmäagglutiniinien vaikutusta muihin tutkimuksiin, kuten verensiirtoserologisiin tutkimuksiin sekä spesifisiin kylmähemagglutiniini- ja kryoglobuliinitutkimuksiin voisi tutkia tarkemmin. Lisäksi jatkotutkimusaiheeksi nousivat ihopistonäyte ja siitä tehtävät tutkimukset, kuten vieritestit ja verikaasuanalyysit. Jatkoaiheena voisi lisäksi selvittää kylmäagglutiniinien vaikutusta tutkimuksiin, jotka tulee ottaa kylmänäytteenotto-ohjeita noudattaen, kuten ammonium-ionin määrittäminen. Näitä jatkotutkimusaiheita perustelemme sillä, että opinnäytetyömme pohjautuu vain kirjallisuuteen ja opinnäytetyömme ulkopuolelle rajattiin ihopistonäytteenotto, kryoglobuliinit, verikaasut, vierilaitteet sekä muut kuin työssä käsitellyt kliinisen kemian analyytit.

Kylmäagglutiniinien vaikutusta kliinisen kemian analyytteihin emme kirjallisuudesta löytäneet. Kirjallisuuden pohjalta päätelimme, että tutkittaessa plasmaa tai seerumia kylmäagglutiniinit eivät vaikuta tutkimustuloksiin, muutoin kuin mahdollisen hemolyyysin kautta. Tämä päätelmä pitäisi kuitenkin todistaa empiirisellä tutkimuksella. Kokove-
restä tehtävissä tutkimuksissa, kuten perusverenkuva, näyte tulee käsitellä lämpimässä, kunnes tutkimus saadaan tehtyä. Näytteen uudelleen lämmitys ei myöskään aina pura agglutinaatiota kokonaisuudessaan, jolloin se aiheuttaa virhettä tutkimustuloksiin. Jotta näyte pysyisi vakioidusti 37°C:ssa, mielestämme näyte tulisi pitää lämpökaapissa. Tämä puolestaan vaikeuttaa hajautettua näytteenottoa, näytteen kuljetusta sekä esikäsittelyä ja itse tutkimuksen suorittamista.

Oma oppimisprosessi

Opinnäytetyömme aiheen valitsimme siksi, ettei meillä ollut etukäteen kovinkaan paljon tietoa kylmäagglutiniineista tai niiden vaikutuksesta näytteenottoon ja esikäsittelyyn. Aluksi oletimme, että työhömmme kuuluisi tutkimusosio, jota ei kuitenkaan aikarajojen puitteissa ollut mahdollista suorittaa. Opinnäytetyömme oli kuitenkin myös ilman tutkimusosiota tarpeeksi laaja ja melko työläs, sillä lähdemateriaalia oli saatavilla melko niukasti, varsinkin koskien yksittäisiin tutkimuksiin liittyvää lämminnäytteenottoa ja -esikäsittelyä. Opinnäytetyöllämme oli selkeä tavoite ja tarkoitus, jonka pystyimme täyttämään. Myös tuotoksemme on merkittävä, sillä Fimlab Laboratoriot Oy:n lämminnäytteenotto-ohjeistus on tähän asti ollut hyvin suppea.

Opinnäytetyötä tehdessämme olemme oppineet paljon uutta niin vasta-aineista, komplementtoiminnasta, punasolujen pinta-antigeeneista kuin näytteenoton erityispiirteistä sekä standardien mukaisen laboratorion näytteenotto-ohjeistuksen vaatimuksista. Olemme oppineet myös etsimään tietoa eri lähteistä ja käyttämään niitä kriittisesti. Opinnäytetyöprosessin aikana olemme kyenneet hyödyntämään yhteistyötaitoja niin keskenämme kuin myös työelämäyhteyksien kanssa. Lisäksi olemme saaneet apua ystäviltämme esimerkiksi kuvitukseen.

LÄHTEET

Bain, B.J. & Win, N. 2006. Acquired Haemolytic Anaemias. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I. & Lewis, S.M. (ed.) Practical Haematology. 10th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 239–270.

Bain, B.J. & Win, N. 2012. Acquired Haemolytic Anaemias. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I., Laffan, M.A. & Lewis, S.M. (ed.) Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 273–300.

Cold Agglutinin Disease. 2007. Luettu 16.4.2013. www.coldagglutininidisease.org

Cunningham, M.J. & Silberstein, L.E. 2005. Autoimmune Hemolytic Anemia. Teoksessa Hoffman, R., Benz, E.J.Jr., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & Mc Qlawe, P. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 693–707.

Duffy, T.P. 2009. Autoimmune Hemolytic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Teoksessa Simon, T.L., Snyder, E.L., Solheim, B.G., Stowel, C.P., Strauss, R.G. & Petrides, M. (ed.) Rossi's Principles of Transfusion Medicine. 4th edition. Singapore: Wiley-Blackwell, 319–343.

Fimlab Laboratoriot Oy Kanta-Häme. Ohjekirja: Perusverenkuva +Trombosyytit 2013. Luettu 16.4.2013. www.khshp.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012a. Ohjekirja: Ammonium-ioni. Luettu 16.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012b. Ohjekirja: C-Reaktiivinen proteiini. Luettu 22.3.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy 2012c. Ohjekirja: Erityiskäsittelyä vaativa näytteenotto. Tulostettu 10.12.2012.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012d. Ohjekirja: Kreatiniini, kreatiniinin poistuma. Luettu 22.3.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012e. Ohjekirja: Leukosyytit (verestä). Luettu 12.8.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012f. Ohjekirja: Natrium. Luettu 20.3.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012g. Ohjekirja: Perusverenkuva ja trombosyytit. Luettu 16.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy 2012h. Ohjekirja: Tromboplastiiniaika, INR- tulostus. Luettu 16.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012i. Ohjekirja: Trombosyytit. Luettu 15.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratorio Oy. 2013. Luettu 24.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy 2013a. Ohjekirja: Insuliini. Luettu 16.4.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. 2013b. Ohjekirja: Kalium. Luettu 20.3.2013. www.fimlab.fi

Fimlab Laboratoriot Oy. Tietoa laboratoriotutkimuksiin tulevalle. Luettu 18.2.2013. www.fimlab.fi

Finnish Accreditation Service. 2013. Luettu 16.4.2013. www.finas.fi

Garzia, D. & Becan-McBride, K. 2008. *Phlebotomy Simplified*. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Haapala, A-M. 2010. Allergian ja autoimmuunisairauksien laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 161–166.

Helin, A. & Rissanen, A. 2010. ”Koulutusta tarvitaan, että pysytään ajan tasalla”- Kotona laskimoverinäytteitä ottavien hoitajien osaaminen ja koulutus Keski-Suomen sairaanhoitopiirin alueella. Sosiaali- ja terveysalan kehittämisen ja johtamisen koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2002. *Tutki ja kirjoita*. 6.–8. painos. Vantaa: Tummavuoren kirjapaino Oy.

Hod, E.A., Spitalnik, P.F. & Spitalnik, S.L. 2009. Carbohydrate Blood Groups. Teoksessa Simon, T.L., Snyder, E.L., Solheim, B.G., Stowel, C.P., Strauss, R.G. & Petrides, M. (ed.) *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. 4th edition. Singapore: Wiley-Blackwell, 89–108.

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

HUSLAB. 2013. Tutkimusohjekirja: Perusverenkuva, leukosyyttien erittelylaskenta, koneellinen, verestä. Luettu 16.4.2013. www.huslab.fi

Hänninen, A. 2011. Lymfosyyttien aktivaatio. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Immunologia*. Helsinki: Duodecim, 88–100.

Irjala, K. 2010. Proteiinitutkimukset. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 135–140.

Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. 1982. *Review of Medical Microbiology*. 15th edition. Los Altos: Lange Medical Publications.

Jokiranta, S. & Seppälä, I.J.T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Immunologia*. Helsinki: Duodecim, 101–137.

- Joutsu-Korhonen, L. & Koski, T. 2010. Hemostaasin tutkimukset. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 275–284.
- Judd, W.J. 2009. Red Cell Immunology and Compatibility Testing. Teoksessa Simon, T.L., Snyder, E.L., Solheim, B.G., Stowel, C.P., Strauss, R.G. & Petrides, M. (ed.) Rossi's Principles of Transfusion Medicine. 4th edition. Singapore: Wiley-Blackwell, 69–88.
- Jury, C., Nagai, Y. & Tatsumi, N. 2012. Collection and Handling on Blood. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I., Laffan, M.A. & Lewis, S.M. (ed.) Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 1–9.
- Juvonen, E. & Savolainen, E.-R. 2007. Hankinnaiset hemolyytiset anemiat. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 198–216.
- Kauppinen, K., Kemppainen, S. & Polvinen, T. 2011. Laskimoverinäytteenoton perheydytysmateriaali ISLAB:lle - Hoitohenkilöstön preanalyttisen osaamisen kehittäminen. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.
- Kosme, K. & Remes, K. 1999. AIHA- moni-ilmeinen anemia. Lääkärilehti 25/1999, 2889–2895.
- Kouri, T. 2010. Munuaiset ja virtsa. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 121–134.
- Laffan, M.A. & Manning, R. 2012. Investigation of Haemostasis. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I., Laffan, M.A. & Lewis, S.M. (ed.) Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 393–445.
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. J. & Plebani, M. 2008: Haemolysis: An Overview of the Leading Cause of Unsuitable Specimens in Clinical Laboratories. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 46 (6), 764–772.
- Mahlamäki, E.K. 2004. Kliinisen hematologian tutkimukset: Hemostaasi. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset Laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY, 310–321.
- Mahlamäki, E.K. 2004. Kliinisen hematologian tutkimukset: Veren kuvan tutkimukset. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset Laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY, 268–281.
- Marshall, W.J. & Bangert, S.K. 2008. Clinical Chemistry. 6th edition. Edinburgh: Mosby Elsevier.
- Matinlauri, I. & Vilpo, J. 2010. Hematopoieesi ja sen tutkiminen. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 247–254.

Meri, S. 2011. Komplementtijärjestelmä. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) *Immunologia*. Helsinki: Duodecim, 53–65.

Mittatekniikan keskus. Luettu 16.4.2013. www.mikes.fi

Mustajoki, P. & Kaukua, J. 2008. Senkka ja 100 muuta tutkimusta: Kreatiniini (fS-Krea). Luettu 22.3.2013. www.terveyskirjasto.fi

Petterson, T., Partanen, J. & Vakkila, J. 2007. Veritautien immunologiaa. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) *Veritaudit*. 3 uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 45–68.

Petz, L.D. 1997. Autoimmune Hemolytic Anemias. Teoksessa Rose, N.R., Conway de Macario, E., Folds, J.D., Lane, H.C. & Nakamura, R.M. (ed.) *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5th edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1070–1080.

Roper, D. & Layton, M. 2012. Investigation of the Hereditary Haemolytic Anaemias: Membrane and Enzyme Abnormalities. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I., Laffan, M.A. & Lewis, S.M. (ed.) *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 245–272.

Rowley, M., Cantwell, C. & Milkins, C. 2012. Laboratory Aspects of Blood Transfusion. Teoksessa Bain, B.J., Bates, I., Laffan, M.A. & Lewis, S.M. (ed.) *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th edition. London: Elsevier Churchill Livingstone, 519–547.

Salminen, A. 2011. Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyypeihin ja hallintotieteellisiin sovelluksiin. *Opetusjulkaisu* 62. Vaasa: Vaasan yliopisto.

Savolainen, E-R. 2010. Laboratorion perusmenetelmät: Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 70–73.

Sivistyssanakirja. 2013. Analyytti. Luettu 16.3.2013. www.suomisanakirja.com

Seppälä, E. & Tuokko, S. 2010. Potilas ja näyte. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 21–34.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2013. Näytteenotto. Luettu 24.4.2013. www.bioanalytikkoliitto.fi

Suomen standardisoimisliitto SFS: 2007. SFS-EN ISO 15189: lääketieteelliset laboratoriot. Erityisvaatimukset laadulle ja pätevyydelle. 2. painos.

Suomen standardisoimisliitto SFS ry. 2013. Luettu 16.4.2013. www.sfs.fi

Stone, M.J. 2010. Heating up Cold Agglutinins. *Blood*. American Society of Hematology. 116 (17), 3119–3120.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2011. Potilaan tunnistaminen oikein- back to basics. Luettu 18.2.2013. www.thl.fi

Tiilikainen, A.S., Vaara, M. & Vaheri, A. 1997. Lääketieteellinen mikrobiologia. 8. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim.

Thomas, L. 2002. Haemolysis as Influence and Interference Factor. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 13 (4).

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

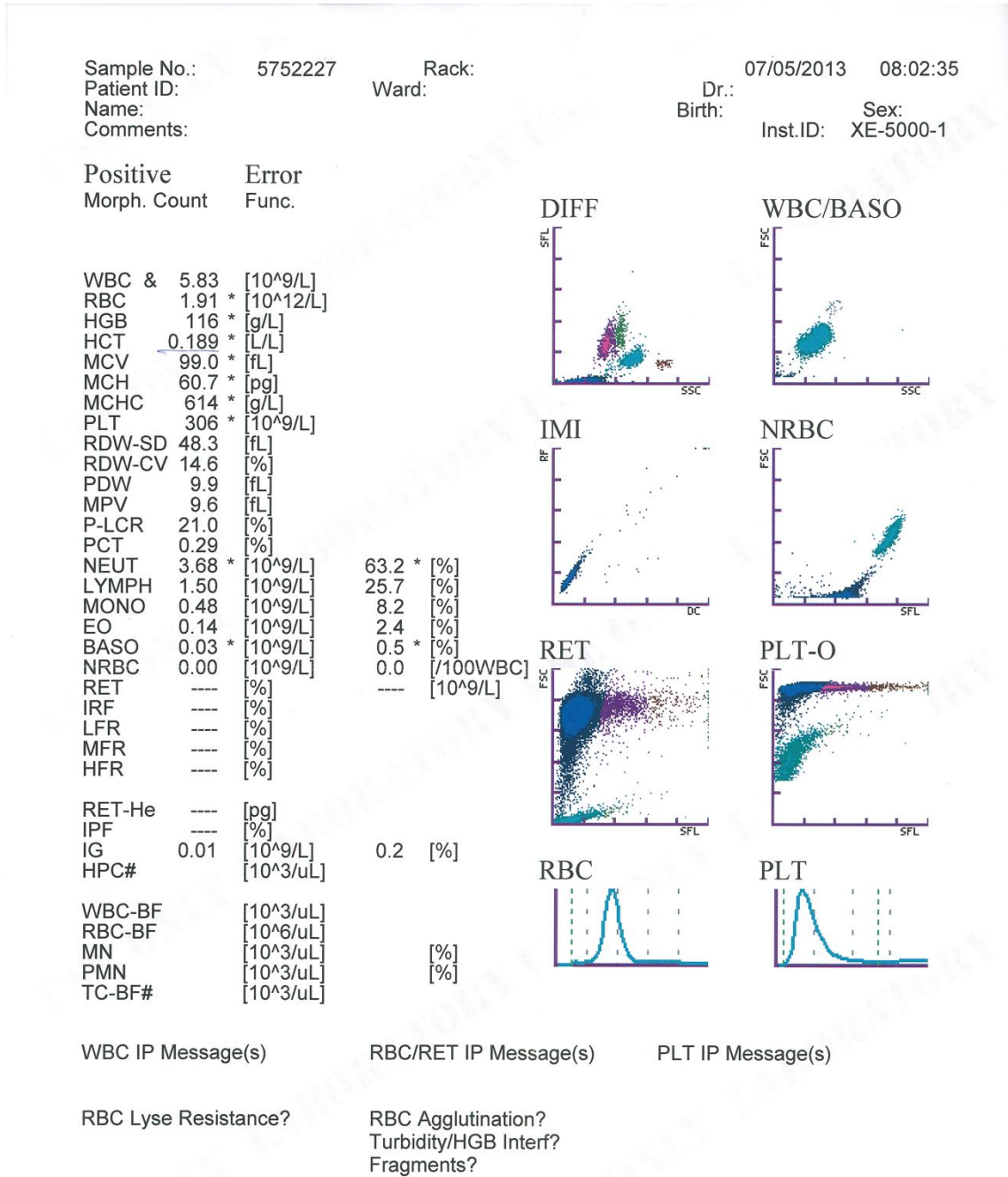
Uotila, L. 2010. Neste-, elektrolyytti- ja happo-emäspaino. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 93–120.

Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. 1.-2. painos. Helsinki: Tammi.

Åkerman, K., Savolainen, E.-R., Pelliniemi, T.-T. & Koski, T. 2010. Laboratoriolaitteet. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 79–92.

LIITTEET

Liite 1. Sysmex XE-5000 tuloste ennen lämmitystä, näyte 1.



Liite 2. Sysmex XE-5000 tuloste lämmityksen jälkeen, näyte 1.

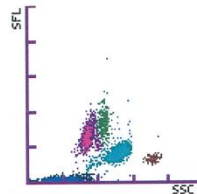
Sample No.: 5752227 Rack: Tube: 0 07/05/2013 08:36:01
 Patient ID: Ward: Dr.:
 Name: Birth: Sex:
 Comments: Inst.ID: XE-5000-1

Positive Morph. Count

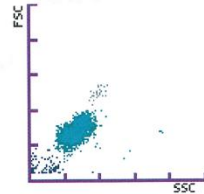
WBC 6.64 [10⁹/L]
 RBC 3.06 [10¹²/L]
 HGB 118 * [g/L]
 HCT 0.297 [L/L] *HK 0.34*
 MCV 97.1 [fL]
 MCH 38.6 * [pg]
 MCHC 397 * [g/L]
 PLT 288 [10⁹/L]
 RDW-SD 48.3 [fL]
 RDW-CV 14.4 [%]
 PDW 11.0 [fL]
 MPV 9.8 [fL]
 P-LCR 23.1 [%]
 PCT 0.28 [%]
 NEUT 4.39 [10⁹/L]
 LYMPH 1.52 [10⁹/L]
 MONO 0.55 [10⁹/L]
 EO 0.15 [10⁹/L]
 BASO 0.03 [10⁹/L]
 NRBC 0.00 [10⁹/L]
 RET 3.01 + [%]
 IRF 12.3 [%]
 LFR 87.7 [%]
 MFR 11.1 [%]
 HFR 1.2 [%]
 RET-He 37.6 [pg]
 IPF 2.8 [%]
 IG 0.02 [10⁹/L]
 HPC# [10³/uL]
 WBC-BF [10³/uL]
 RBC-BF [10⁶/uL]
 MN [10³/uL]
 PMN [10³/uL]
 TC-BF# [10³/uL]

66.0 [%]
 22.9 - [%]
 8.3 [%]
 2.3 [%]
 0.5 [%]
 0.0 [100WBC]
 92.1 + [10⁹/L]

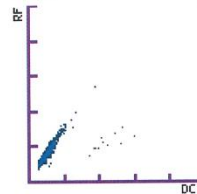
DIFF



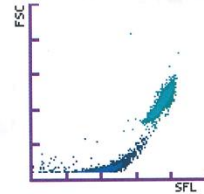
WBC/BASO



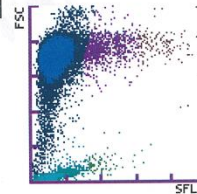
IMI



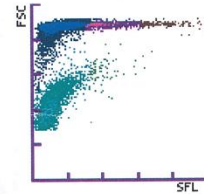
NRBC



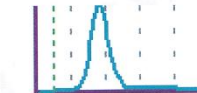
RET



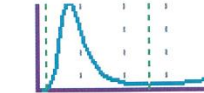
PLT-O



RBC



PLT



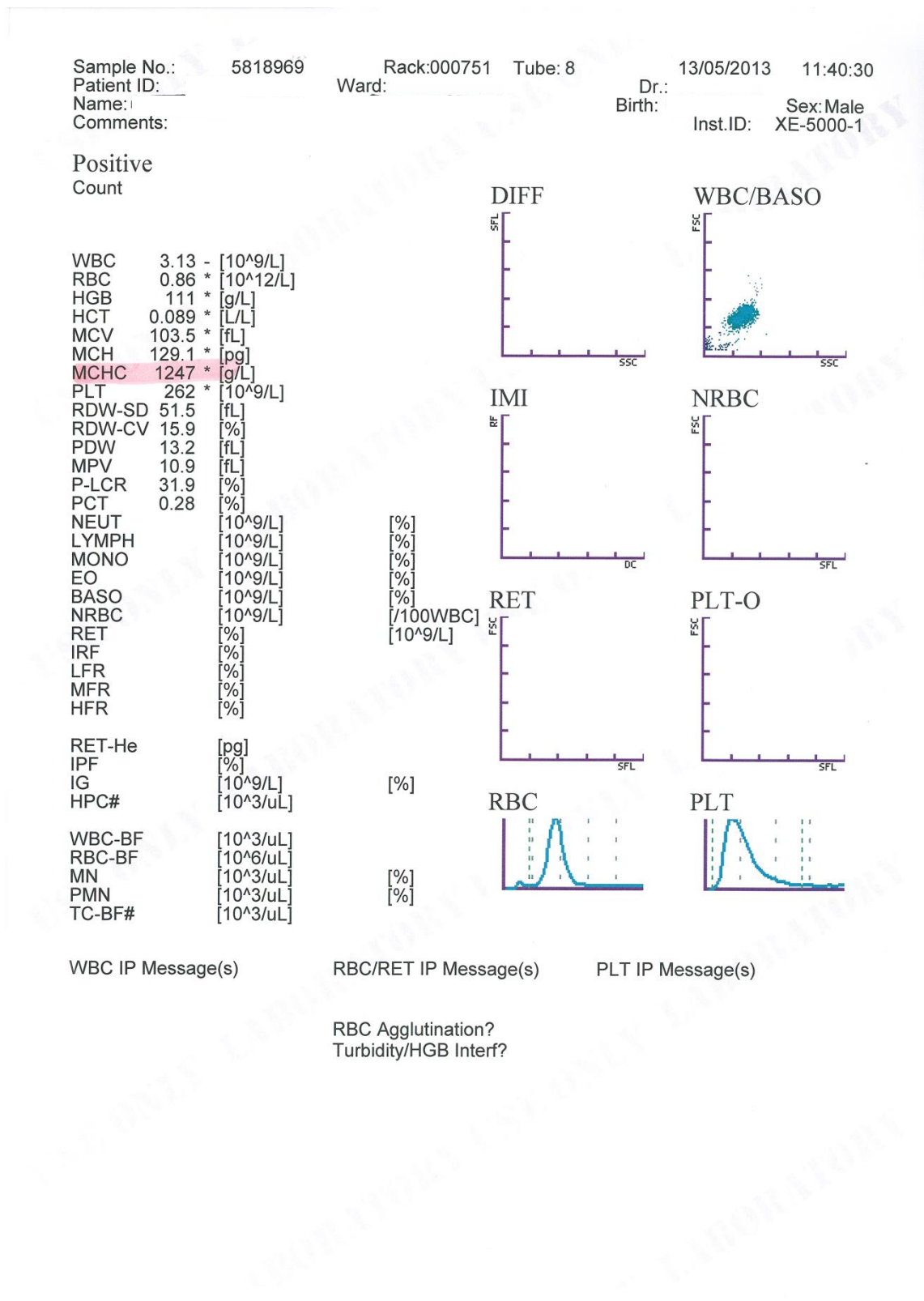
WBC IP Message(s)

RBC/RET IP Message(s)

PLT IP Message(s)

Turbidity/HGB Interf?
 Fragments?

Liite 3. Sysmex XE-5000 tuloste ennen lämmitystä, näyte 2.



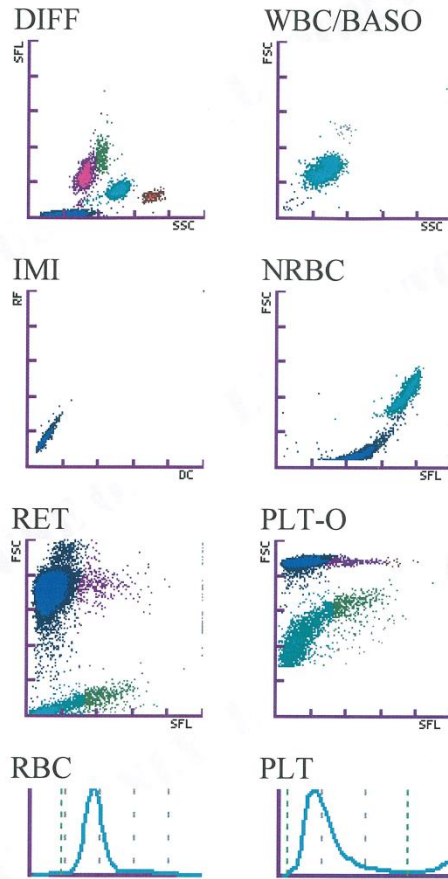
Liite 4. Sysmex XE-5000 tuloste lämmityksen jälkeen, näyte 2.

Sample No.: 5818969 Rack: Tube: 0 13/05/2013 13:12:26
 Patient ID: Ward: Dr.:
 Name: Birth: Sex:
 Comments: Inst.ID: XE-5000-3

Negative

WBC	4.97	[10 ⁹ /L]
RBC	3.75	[10 ¹² /L]
HGB	117	[g/L]
HCT	0.353	[L/L]
MCV	94.1	[fL]
MCH	31.2	[pg]
MCHC	331	[g/L]
PLT	246	[10 ⁹ /L]
RDW-SD	45.9	[fL]
RDW-CV	13.8	[%]
PDW	11.3	[fL]
MPV	11.0	[fL]
P-LCR	30.5	[%]
PCT	0.27	[%]
NEUT	1.90	[10 ⁹ /L]
LYMPH	2.25	[10 ⁹ /L]
MONO	0.48	[10 ⁹ /L]
EO	0.31	[10 ⁹ /L]
BASO	0.03	[10 ⁹ /L]
NRBC	0.00	[10 ⁹ /L]
RET	0.94	[%]
IRF	4.8	[%]
LFR	95.2	[%]
MFR	4.8	[%]
HFR	0.0	[%]
RET-He	34.9	[pg]
IPF	14.1	[%]
IG	0.00	[10 ⁹ /L]
HPC#		[10 ⁹ /L]
WBC-BF		[10 ³ /uL]
RBC-BF		[10 ⁶ /uL]
MN		[10 ³ /uL]
PMN		[10 ³ /uL]
TC-BF#		[10 ³ /uL]

38.2	[%]
45.3	[%]
9.7	[%]
6.2	[%]
0.6	[%]
0.0	[/100WBC]
35.3	[10 ⁹ /L]
0.0	[%]
	[%]



WBC IP Message(s)

RBC/RET IP Message(s)

PLT IP Message(s)

Liite 5. Tuotos

Lämminnäytteenotto-ohje

Lämminnäytteenotto-ohje on poistettu opinnäytetyön Theseus-versiosta toimeksiantajan pyynnöstä.