

SAVONIA

ammattikorkeakoulu

OPINNÄYTETYÖ - YLEMPI AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

PERIFEERISEN VEREN SOLUJEN TUNNISTUS, CELLAVISION DM1200 LAITTEEN VERIFIOINTI JA KÄYT- TÖÖNOTTO

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan kliinisen asiantuntijan tutkinto-ohjelma / Radiografian kliinisen asiantuntijan tutkinto-ohjelma	
Työn tekijä Hanna-Mari Bragge	
Työn nimi Perifeerisen veren solujen tunnistus, CellaVision DM1200 laitteen verifiointi ja käyttöönotto	
Päiväys 28.11.2023	Sivumäärä/Liitteet 49
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani SataDiag laboratorio, Diagnostiset ja kliiniset tukipalvelut, Satakunnan hyvinvointialue	
<p>Leukosyyttien erittelylaskenta sivelyvalmisteesta on tärkeä ja informatiivinen tutkimus, jonka suorittaminen vaatii paljon ammattitaitoa. Laadukkaasti toteutettuun erittelylaskentaan vaikuttaa moni tekijä, kuten esimerkiksi näytteen ja siitä valmistetun sivelyvalmisteen laatu, valmisteen oikeaoppinen värjäys ja vastaajan kokemus erittelylaskennan suorittamisesta. Monissa laboratorioissa käyttöön on otettu digitaalimikroskooppi, jonka tekemä solujen kuvaus ja esiluokittelu helpottaa ja nopeuttaa erittelylaskennan suorittamista.</p> <p>Validointi tarkoittaa valitun menetelmän ja laitteen soveltuvuuden varmentamista tiettyyn tarkoitukseen. Verifiointi on suppeampi kokonaisuus kuin validointi. Verifiointia käytetään silloin, kun otetaan käyttöön menetelmä tai laite, joka on jo käytössä muualla ja sille on suoritettu validointi esimerkiksi laitevalmistajan toimesta. Verifiointia voidaan tarvita myös silloin, jos muutos koskee esimerkiksi näytteen käsittelyä, analyysimenetelmää tai tietojärjestelmää.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennan mikroskooppisen tarkastelun uusi menetelmä CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia käyttäen. Verifiointi toteutettiin aikaisemmin laaditun verifiointisuunnitelman mukaan. Verifiointi koostui menetelmävertailusta ja toistuvuuden testaamisesta. Verifiointiprosessin tarkoituksena oli varmistaa, että CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla määritetyt leukosyyttien erittelylaskennan tulokset ovat luotettavia ja vastaavat manuaalimikroskopian tuloksia. Tavoitteena työlle oli laadun lisääminen perifeerisen veren sivelyvalmisteen leukosyyttien erittelylaskennassa CellaVision DM1200 laitetta käyttäen.</p> <p>Menetelmävertailun tuloksissa ei havaittu systemaattista poikkeavuutta menetelmien välillä. Toistuvuusmäärityksissä ei havaittu kliinisesti merkittäviä eroja ja tulosten eroavuudet selittyivät normaalilla tulostason hajonnalla. Verifiointinille asetetut tavoitteet saavutettiin. Verifiointin perusteella digitaalimikroskooppi otettiin käyttöön valkosolujen erittelylaskennassa rutiinianalytiikassa.</p> <p>Jatkotutkimuksena voitaisiin selvittää CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin ja Proficiency Softwaren avulla tehdyn leukosyyttien erittelylaskennan laaduntarkkailukierroksien toimivuutta osaamisen arvioimisessa pidemmällä aikavälillä uusilla ja jo kokeneemmilla työntekijöillä SataDiag:ssa.</p>	
Avainsanat Leukosyytit, leukosyyttien morfologia ja erittelylaskenta, CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppi, verifiointi ja laboratoriotutkimusten laatu.	

Field of Study Social Services, Health and Sports	
Degree Programme Master's Degree Programme in Biomedical Laboratory Science / Master's Degree Programme in Radiography	
Author Hanna-Mari Bragge	
Title of Thesis Detection of Peripheral Blood Cells, Verification and Commissioning of the CellaVision DM1200 Device	
Date 28 November 2023	Pages/Appendices 49
Client Organisation /Partners SataDiag laboratory, Diagnostic and clinical support services, The wellbeing services county of Satakunta	
<p>The differential count of leukocytes from the smear preparation is an important and informative study, which requires a lot of expertise to perform. Many factors affect a high-quality differential count, such as, for example, the quality of the sample and the smear preparation made from it, the correct coloring of the preparation and the respondent's experience in performing the differential count. In many laboratories, a digital microscope has been put into use, and the photography and pre-classification of the cells makes it easier and faster to carry out the leukocyte differential count.</p> <p>Validation means verifying the suitability of the selected method and device for a specific purpose. Verification is a narrower entity than validation. Verification is used when a method or device is introduced that is already in use elsewhere and has been validated by, for example, the device manufacturer. Verification may also be needed if the change concerns, for example, sample processing, analysis method or information system.</p> <p>The purpose of this thesis was to verify a new method of microscopic examination of the differential count of leukocytes using the CellaVision DM1200 digital microscope. The verification was carried out according to the previously prepared verification plan. Verification consisted of method comparison and repeatability testing. The purpose of the verification process was to ensure that the results of the differential count of leukocytes determined using the CellaVision DM1200 digital microscope are reliable and correspond to the results of manual microscopy. The goal of the work was to increase the quality of the differential count of leukocytes in the peripheral blood smear preparation using CellaVision DM1200.</p> <p>In the results of the method comparison, no systematic deviation between the methods was observed. No clinically significant differences were observed in the repeatability testing and the differences in the results were explained by the normal dispersion of the result level. The goals set for the verification were achieved. Based on the verification, the digital microscope was introduced in the differential count of white blood cells in routine analysis.</p> <p>As a follow-up study, the functionality of the quality control rounds of the leukocyte differential count made using the CellaVision DM1200 digital microscope and Proficiency Software could be investigated in assessing competence in the longer term with new and already more experienced employees at SataDiag.</p>	
Keywords Leukocytes, morphology and differential count of leukocytes, CellaVision DM1200 digital microscope, verification and the quality of laboratory tests	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	HEMATOPOIEESI JA LEUKOSYTTIEN MORFOLOGIA.....	8
2.1	Veren solujen synty eli hematopoieesi	8
2.2	Lymfopoieesin solut	10
2.2.1	Lymfoblasti	11
2.2.2	Prolymfosyytti	11
2.2.3	Pieni ja iso lymfosyytti	12
2.2.4	Plasmasolu ja karvasolu	13
2.3	Monopoieesin solut	14
2.3.1	Monoblasti	14
2.3.2	Promonosyytti	14
2.3.3	Monosyytti	15
2.4	Myelopoieesin solut.....	15
2.4.1	Myeloblasti.....	16
2.4.2	Promyelosyytti.....	16
2.4.3	Myelosyytti.....	17
2.4.4	Metamyelosyytti	18
2.4.5	Sauvatumainen ja liuskatumainen neutrofiili	18
2.4.6	Eosinofiili	20
2.4.7	Basofiili	20
3	LEUKOSYTTIEN ERITTELYLASKENTA JA CELLAVISION DM1200 DIGITAALIMIKROSKOOPPI. 22	
3.1	Leukosyyttien erittelylaskenta	22
3.2	Sivelyvalmisteen teko	23
3.3	Cellavision DM1200 digitaalmikroskooppi ja sen toiminta	24
4	VERIFIOINTI JA LABORATORIOTUTKIMUSTEN LAATU.....	27
4.1	Validointi ja verifiointi.....	27
4.2	Verifiointisuunnitelma.....	27
4.3	Lääketieteellisten laboratorioiden pätevyysvaatimusten standardi SFS-EN ISO 15189	28
5	TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	29
6	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	30
6.1	Tutkimusmenetelmä.....	30

6.2	Verifoinnin lähtökohdat.....	31
6.3	Aineiston keruu.....	31
6.4	Verifoinnin toteuttaminen	32
7	TULOKSET	34
7.1	Menetelmävertailun tulokset	34
7.2	Toistuvuusmääritysten tulokset.....	39
8	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	42
8.1	Tulosten tarkastelu	42
8.2	Opinnäytetyön luotettavuus ja eettisyys	44
8.3	Johtopäätökset ja jatkotutkimusehdotukset	45
	LÄHTEET	46

KUVALUETTELO

Kuva 1.	Hematopieesin vaiheet eri solulinjoissa (Ward, Cherian & Linden 2018).....	9
Kuva 2.	Kuvakollaasi lymfoblasteista (Bragge 2023, CC BY-SA)	11
Kuva 3.	Kuvakollaasi erilaisista lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA).....	12
Kuva 4.	Kuvakollaasi EVB-mononukleosin reaktiivisista lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	12
Kuva 5.	Kuvakollaasi kroonisen lymfaattisen leukemian atyyppisista lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	13
Kuva 6.	Kuvakollaasi plasmasoluista (Bragge 2023, CC BY-SA).....	13
Kuva 7.	Kuvakollaasi promonosyyteistä. (Bragge 2023, CC BY-SA)	15
Kuva 8.	Kuvakollaasi monosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	15
Kuva 9.	Kuvakollaasi myeloblasteista (Bragge 2023, CC BY-SA).....	16
Kuva 10.	Kuvakollaasi promyelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA).....	17
Kuva 11.	Kuvakollaasi myelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA).....	17
Kuva 12.	Kuvakollaasi metamyelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	18
Kuva 13.	Kuvakollaasi sauvatumaisista neutrofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	18
Kuva 14.	Kuvakollaasi liuskatumaisista neutrofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	19
Kuva 15.	Kuvakollaasi hyposegmentoituneista neutrofiileista (Bragge 2023, CC BY-SA)	19
Kuva 16.	Kuvakollaasi hypersegmentoituneista neutrofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	19
Kuva 17.	Kuvakollaasi eosinofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA).....	20
Kuva 18.	Kuvakollaasi basofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)	21
Kuva 19.	Veren sivelyvalmiste (mukailen Savolainen 2010, 72)	24

Kuva 20. CellaVision DM1200 (Cellavision 2022).....	25
Kuva 21. CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin käyttö (mukaillen Cellavision Concept Brochure 2019) .	25
Kuva 22. Määrällisen tutkimuksen vaiheet (mukaillen Vilkka 2021)	30
Kuva 23. Rümken taulukon 95 % luottamusväli (Rümke 1977, 42).....	33
Kuva 24. Blastien määrä verifointinäytteissä.....	34
Kuva 25. Promyelosyyttien määrä verifointinäytteissä	35
Kuva 26. Myelosyyttien määrä verifointinäytteissä	35
Kuva 27. Metamyelosyyttien määrä verifointinäytteissä.....	36
Kuva 28. Sauvatumaisten neutrofiilien määrä verifointinäytteissä	36
Kuva 29. Liuskatumaisten neutrofiilien määrä verifointinäytteissä	37
Kuva 30. Lymfosyyttien määrä verifointinäytteissä.....	37
Kuva 31. Monosyyttien määrä verifointinäytteissä.....	38
Kuva 32. Eosinofiilien määrä verifointinäytteissä.....	38
Kuva 33. Basofiilien määrä verifointinäytteissä	39
Kuva 34. Mittaustulosten yhteenveto	39
Kuva 35. Erittelylaskentojen tulokset, toistuvuus	40
Kuva 36. Variaatioprosenttien keskiarvot	40

1 JOHDANTO

Hematologian laboratorioissa tehtävä perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskenta on tärkeä ja informatiivinen tutkimus. Erilaiset sairaudet ja tulehdukselliset tilat voivat aiheuttaa muutosta leukosyyttien kokonaismäärään ja solujakaumaan. Mikäli analyysoija havaitsee näytteessä mahdollisia patologisia soluja tai muuta tarkastettavaa muutosta, kuten esimerkiksi monosytoosia tai eosinofiliaa, näytteestä tulee valmistaa laadukkaat sivelyvalmisteet. Sivelyvalmisteista suoritetaan leukosyyttien erittelylaskenta mikroskooppisesti. Veren solujen tunnistamiseen mikroskooppisesti vaaditaan paljon ammattitaitoa sekä ymmärrystä erilaisista hematologisista sairauksista ja muista tiloista, jotka voivat aiheuttaa muutoksia verenkuvaan. Yhdessä muiden veren solujen ominaisuuksia tutkivien tutkimusten kanssa perifeerisen veren sivelyvalmisteesta saatu tieto auttaa ymmärtämään paremmin hematologisten tautien etiopatogeneesia. (Pelliniemi 1998; Savolainen, Pelliniemi & Koski 2010, 87.)

Laboratorioissa uusien menetelmien käyttöönotossa noudatetaan SFS-EN ISO 15189 standardia, joka ohjeistaa laboratorioita validoinnin ja verifiointin osalta (Roelofsen-de Beer ym. 2019). Validointia käytetään, kun varmistetaan täysin uuden tai päivitetyn menetelmän käyttöönotto ja sen toimivuus suunnitellussa käyttötarkoituksessa. Verifiointia voidaan käyttää, mikäli menetelmä on jo validoitu aikaisemmin. Verifiointiin riittää yleensä validointia suppeampi varmennus. (Hägg 2016, 7.)

Opinnäytetyön aiheeksi valikoitui perifeerisen veren solujen tunnistus, CellaVision DM1200 laitteen verifiointi ja käyttöönotto. Digitaalimikroskooppi on ensimmäinen Satakunnan hyvinvointialueen SataDiag laboratorioissa (jatkossa SataDiag), ja verifiointi on kokonaisuudessaan iso projekti. Opinnäytetyöni toteutetaan yhteistyössä menetelmävastuuhenkilönä toimivan sairaalakemistin, hematologian tiiminvetäjän ja laitteen verifiointista vastaavan laboratorion ylilääkärin kanssa.

Opinnäytetyö toteutetaan kvantitatiivisena eli määrällisenä tutkimuksena. Kvantitatiivisen tutkimuksen lähtökohtana on tutkimusongelma, johon tutkimuskysymysten avulla haetaan ratkaisua tai vastausta (Kananen 2011, 21). Opinnäytetyön tarkoituksena on verifioida leukosyyttien erittelylaskennan mikroskooppisen tarkastelun uusi menetelmä CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia käyttäen. Opinnäytetyössä kuvataan verifiointiprosessi kokonaisuudessaan ja siihen vaikuttavia tekijöitä, kuten SFS-EN ISO 15189 standardia. Opinnäytetyön tavoitteena on laadun lisääminen leukosyyttien erittelylaskennassa CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia käyttäen. Opinnäytetyön kirjallisuuden pohjautuva teoriaosuus auttaa työpisteeseen perehtymässä olevia ja opiskelijoita kertaamaan hematopoeesin tärkeimpiä kohtia ja erityisesti leukosyyttien morfologiaa. Teoriaosuus yhdessä solukuvien kanssa tukee laboratoriohoitajan laadukasta leukosyyttien erittelylaskentaa ja opiskelijoiden solumorfologista oppimista.

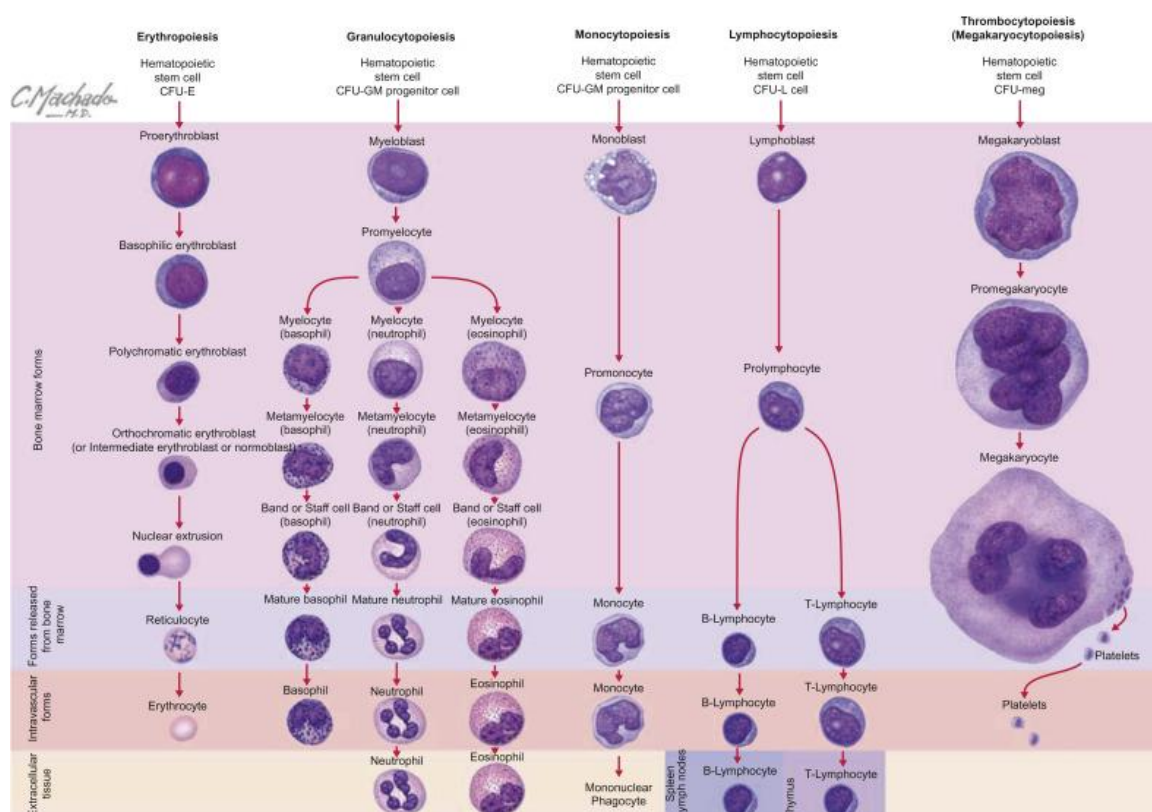
2 HEMATOPOIEESI JA LEUKOSYYTTIEN MORFOLOGIA

2.1 Veren solujen synty eli hematopoieesi

Veren solujen muodostuminen eli hematopoieesi alkaa sikiökaudella kolmannella raskausviikolla. Hematopoieesi käynnistyy alkion ruskuaispussin verisaarekkeissa ja jatkuu siellä raskausviikolle 19 saakka. (Matinlauri & Vilpo 2010, 247; Sainio & Sariola 2015, 283.) Kuuden ensimmäisen viikon aikana verenkierron solut ovat peräisin pääosin ruskuaispussista, ja sikiön ensimmäisissä verisuonissa kiertää lähinnä punasoluja. Sikiön punasolut sisältävät fetaalista hemoglobiinia, jonka affiniteetti eli kemiallinen vetovoima happeen on suurempi verrattuna aikuisen hemoglobiiniin. Tästä syystä happi siirtyy äidistä sikiöön istukan kautta tehokkaasti. (Sainio & Sariola 2015, 283.) Verenkierron soluja muodostuu raskauden ensimmäisillä viikoilla ruskuaispussin lisäksi istukassa ja aortan seinämässä (Siitonen & Koistinen 2015, 16).

Seuraava hematopoieesin pääpaikka on maksa, jossa solujen tuotanto tapahtuu raskausviikoilla 5–40. Hematopoieesia tapahtuu raskauden aikana myös pernassa, kateenkorvassa ja luuytimessä. Raskauskuukausina 5–6 hematopoieesin kaikkien komponenttien, eli punasolujen, verihiutaleiden, granulosityttien, lymfosityttien ja monosyyttien, tuotanto on käynnissä. Luuydin toimii pääasiallisena hematopoieesin tapahtumapaikkana vauvan syntymän aikaan, ja tästä eteenpäin luuydin on normaalisti ainoa paikka, jossa soluja muodostuu. (Hänninen & Mahlamäki 2003, 264; Matinlauri & Vilpo 2010, 247.) Luuytimen hematopoieesia kutsutaan medullaariseksi ja muualla tapahtuvaa ekstramedullaariseksi. Ekstramedullaarista hematopoieesia esiintyy aikuisilla vain poikkeuksellisesti, lähinnä luuytimen tuhoutumisen vuoksi. (Vilpo 2010a, 15.)

Kaikki verisolut kehittyvät ja erilaistuvat monikykyisistä hematopoieettisista kantasoluista (Hänninen & Mahlamäki 2003, 264; Howard & Hamilton 2008, 2–3; Matinlauri & Vilpo 2010, 247; Sainio & Sariola 2015, 283). Näitä soluja kutsutaan totipotentsiksi kantasoluiksi. Totipotentitiset kantasolut pystyvät sekä ylläpitämään niiden omaa määrää luuytimessä että luomaan tytär溶uista suuntautuneita kantasoluja. Suuntautuneiden kantasolujen jakaantuminen ja kypsyminen aikaansaa erilaistuneita verisoluja. (Hänninen & Mahlamäki 2003, 264; Matinlauri & Vilpo 2010, 247; Konieczny & Arranz 2018.) Prosessia on kuvattu kuvassa 1. Solujen kehittymisprosessissa on havaittavaa, että solun kehittyessä tumen koko soluissa pienenee, kromatiinirakenne tiivistyy, nukleoli(t) katoaa ja sytoplasma kypsyy solulinjalle tyypillisten ominaisuuksien mukaan. (Matinlauri & Vilpo 2010, 247.) Hematopoieettisten kantasolujen tutkimiseen voidaan käyttää virtausytometriaa. Virtausytometrian avulla voidaan tutkia soluista niiden pinnalla olevia antigeenirakenteita. Hematopoieettisten kantasolujen tutkimiseen käytetään CD34-antigeeniä, sillä suurin osa kantasoluista on positiivisia sen suhteen. Tarkempaan kantasolujen tutkimiseen voidaan myös CD38-, HLA-DR-, CD133- ja CD45-antigeeniä. (Siitonen & Koistinen 2015, 19.)



Kuva 1. Hematopoiesin vaiheet eri solulinjoissa (Ward, Cherian & Linden 2018)

Verisolujen tuotantoon vaikuttavat monet tekijät. Niitä ovat muun muassa erilaiset hormonit, vitamiinit ja hivenaineet. (Vilpo 2010a, 17–18; Arai 2018.) Iso vaikutus tuotantoon on hematopoeettisilla kasvutekijöillä (Howard & Hamilton 2008, 3). Nämä kasvutekijät ovat pieniä proteiineja tai polypeptidejä ja ne kuuluvat sytokiinien pääryhmään. Kasvutekijä toimii kohdesolussa vastaavan reseptorin kautta. (Vilpo 2010a, 17–18.) Siitosen ja Koistisen (2015, 21) mukaan kasvutekijöiden tehtävänä on muun muassa edistää solun pysymistä hengissä levovaiheisena, lisätä solun kasvua, edistää kypsymistä ja vahvistaa solun toimintaa. Monikykyisten kantasolujen pinnalla on useiden kasvutekijöiden reseptoreja. Reseptorikirjon määrä vähenee mitä erilaistuneempi solu on. (Siitonen & Koistinen 2015, 22.) Reseptoreja on kaksi päätyyppiä: sytokiinireseptorit, jotka muodostuvat yhdestä peptidistä, ja tyrosiinikinaasit, jotka itse toimivat reseptoreina (Vilpo 2010a, 17).

Eri solulinjoihin vaikuttavat eri kasvutekijät (Howard & Hamilton 2008, 3; Vilpo 2010a, 17–18). Punasolutuotantoon vaikuttaa muun muassa erytropoietiini (EPO), interleukiini IL-3 ja granulositytti-monosyytti-kasvutekijä (GM-CSF) sekä kit-ligandi (KL). Granulositytti- ja monosyyttituotantoon vaikuttaa IL-3 ja IL-6 sekä GM-CSF. Neutrofiilien tuotantoon vaikuttaa spesifisti G-CSF, eosinofiileihin IL-5 ja monosyytteihin M-CSF. Trombosyyttituotantoa stimuloivia kasvutekijöitä ovat GM-CSF, EPO, KL, IL-3, IL-6, IL-11 ja trombopoietiini. T- ja B-solutuotantoon vaikuttavat muun muassa IL-2, IL-3, IL-4 ja IL-7. (Vilpo 2010a, 17–18.) Verisolujen muodostukseen liittyvien kasvutekijöiden vaikutuksia on tutkittu eniten soluviljelymenetelmien ja koe-eläinten kautta. Hiirien avulla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että kasvutekijöiden monimutkaisessa kokonaisuudessa yksittäisen kasvutekijän puute voi mahdollisesti korvautua muiden kasvutekijöiden vaikutuksilla, jolloin hiirille ei aiheudu eri solulinjojen puutoksia. (Siitonen & Koistinen 2015, 22–23.)

Verta muodostavaa kudosta löytyy lapsilta kaikkien luiden luuydinonteloista. Aikuisella tuotanto on keskittynyt elimistön litteisiin luihin, kylkiluihin, nikamiin sekä reisiluiden ja olkavarren luiden proksi-maalipäihin. Rasvan määrä luuydinontelon sisällä kasvaa suhteessa ikään, mikä aiheuttaa hematopoeettisen kudoksen määrän vähenemistä. Rasvakudoksen määrä lapsen luuytimessä on noin 25 %, kun taas vanhuksella määrä voi olla jopa 70 %. (Siitonen & Koistinen 2015, 16.)

Luuytimen soluista noin puolet on granulosityttien esiasteita ja vajaa puolet erytrosyyttiesiasteita. 90–95 % koko elimistön granulopoieesin soluista sijaitsee luuytimessä. Ytimen varastosolut ovat siirrettävissä vereen muutaman tunnin sisällä esimerkiksi infektioissa, ja vuorokauden kuluttua granulosityttien määrä voi veressä moninkertaistua. (Vilpo 2010a, 18.) Neutrofiilit säilyvät verenkierrossa 6–24 tuntia. Lymfosityttien säilyvyys verenkierrossa vaihtelee 2 vuorokaudesta useisiin vuosikymmeneihin. (Matinlauri & Vilpo 2010, 248). Monosyytit ovat verenkierrossa 1–2 vuorokautta, jonka jälkeen ne siirtyvät kudoksiin makrofageiksi (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist 2014, 175).

Elimistön kaikista punasolulinjan soluista vain pieni määrä sijaitsee luuytimessä, joten sieltä ei ole mahdollisuus korvata menetettyjä soluja esimerkiksi vuodon yhteydessä. Uustuotannon alkamiseen tarvitaan 1–2 vuorokautta, ja tällä voidaan korvata vain 2–5 % vuorokaudessa veren normaalista punasolumäärästä. (Vilpo 2010a, 18–19.) Punasolut vapautuvat luuytimestä verenkiertoon retikulosyytteinä. Retikulosyyttien tunnusomainen verkkomainen värjäytyminen johtuu ribonukleoproteiineista, ja tämä vaihe kestää noin yhdestä kahteen vuorokauteen. Punasolujen elinikä verenkierrossa on noin 3–4 kuukautta. Megakaryosyyttejä eli trombosyyttejä tuottavia soluja on vain jokunen prosentti luuytimen soluista. Luuytimessä ei ole lainkaan varastotrombosyyttejä. Tarvittaessa veren tavanomainen trombosyyttimäärä pystytään tuottamaan muutamassa päivässä. Trombosyytit syntyvät megakaryosyyttien sytoplasmasta, eikä niillä ole omaa tumaa. Trombosyyttien elinikä verenkierrossa on noin 7–10 vuorokautta. (Matinlauri & Vilpo 2010, 248; Vilpo 2010a, 18–19.)

2.2 Lymfopoieesin solut

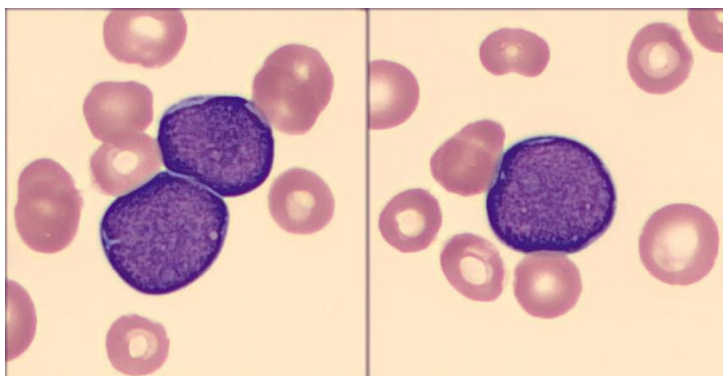
Lymfaattisten solujen kehittyminen alkaa luuytimen monikykyisestä hematopoeettisesta kantasolusta. Lymfaattiset solut voidaan jakaa T-soluihin, B-soluihin ja NK-soluihin. T- ja B-soluja ei voi valomikroskooppisesti erottaa toisistaan. NK- solut eli natural killer solut ovat kooltaan muita lymfositytteja hieman isompia. (Siitonen & Koistinen 2015, 27.) B-solujen kehitys jatkuu luuytimessä, mutta T-solujen erilaistuminen tapahtuu thymuksessa eli kateenkorvassa. (Siitonen & Koistinen 2015, 27; Hoffbrand & Moss 2016, 103.)

Lymfositytit ovat immunologisia soluja, joiden tehtävänä on avustaa fagosytoivia soluja infektioiden torjunnassa ja aktivoida spesifistä immuunipuolustusta. B-lymfosityttien tehtävänä on toimia immunologisen puolustusjärjestelmän vasta-aineita tuottavana haarana ja osana puolustusjärjestelmän säätelyä. Osa B-soluista toimii myös muistisoluina, niillä on esimerkiksi kyky valmistaa rokotteen avulla opetettuja vasta-aineita. T-solut vastaavat soluunsidotusta immuniteetista. T-solut voidaan jakaa vielä kahteen alaluokkaan: CD4+ auttajasoluihin ja sytotoksisiin CD8+ T-soluihin. T-solujen puute muodostaa infektiotoleranssin patogeneenien suhteen. (Vilpo 2010b, 25.) Verenkierrossa on n. 20–40 prosenttia lymfosityttejä kaikista veren valkosoluista, lapsilla osuus on suurempi. T-solujen

osuus näistä on noin 75 prosenttia. (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkvist 2014, 175; Siitonen & Koistinen 2015, 27; Hoffbrand & Moss 2016, 103.)

2.2.1 Lymfoblasti

Lymfoblastien morfologia vaihtelee veren sivelyvalmisteessa taudin mukaan. Akuutin lymfaattisen leukemian alaluokissa French-American-British- luokituksen eli FAB luokituksen mukaan L1 tyyppin lymfoblastit ovat pääosin pieniä, mutta koon vaihtelua voi olla, tuman kromatiini on pääosin homogeenistä, tuman muoto on säännöllisen pyöreä eikä nukleolia ole aina havaittavissa. Sytoplasman määrä L1 tyyppin lymfoblasteissa on vähäinen. L1 tyyppin akuuttia lymfoblastileukemiaa tavataan yleensä lapsilla (kuva 2). (Bain 2004, 88–89; Bain 2017, 54.)



Kuva 2. Kuvakollaasi lymfoblasteista (Bragge 2023, CC BY-SA)

L2 tyyppin lymfoblastit ovat kooltaan selkeästi isompia kuin L1 lymfoblastit, ja koko voi vaihdella saman solusarjan sisällä. Tuman koko vaihtelee ja tuman muodossa voi olla muun muassa halkeamia tai sisennyksiä. Kromatiini tumassa on heterogeenistä. Tumassa voi olla selkeästi havaittava isohko nukleoli. Sytoplasman määrä on usein runsas, ja sen basofiilisuus ja vakuolisoituneisuus vaihtelee. (Bain 2017, 54.)

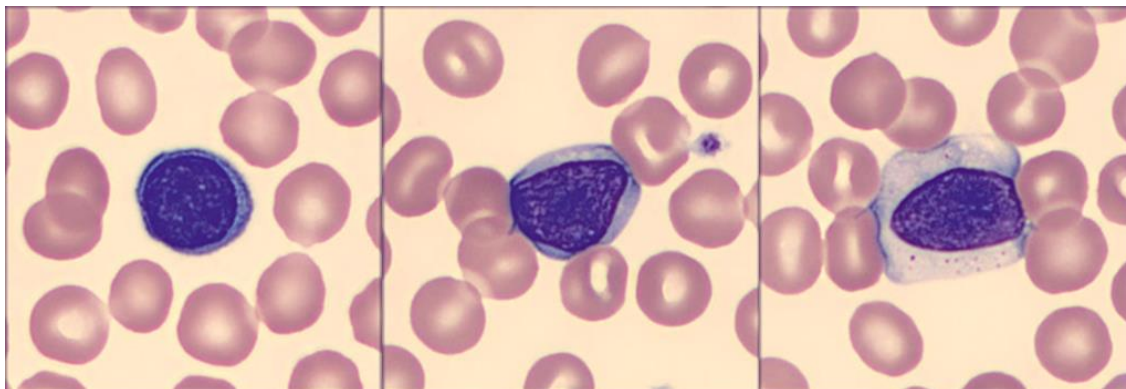
L3 tyyppin lymfoblastit ovat kooltaan isohkoja, ja tuman muoto säännöllisen pyöreä tai ovaali. Nukleoli on usein näkyvä ja tuman kromatiini on hienojakoista ja homogeenistä. Sytoplasman määrä on usein runsas ja vakuolisoitunutta. Sytoplasma on voimakkaan basofiilista. (Bain 2017, 54.)

2.2.2 Prolymfosyytti

Prolymfosyytit ovat kooltaan keskikokoisia tai isohkoja soluja. Prolymfosyyttien tuman kromatiinirakenne on paikoitellen kondensoitunut ja siinä näkyy selkeä nukleoli. Prolymfosyyteissä on hieman basofiilista sytoplasmaa. (Bain 2004, 85; Laribi, Lemaire, Sandrini & de Materre 2017.) Sytoplasmassa ei ole granulaa näkyvissä (Kuittinen & Remes 2015, 367). Kohonneita prolymfosyyttimääriä havaitaan esimerkiksi T-soiluisessa prolymfosyyttileukemiassa (T-PLL) (Remes 2013a, 779). T-PLL:n pienisoluisessa varianttimuodossa lymfosyytit ovat morfologialtaan kroonisen lymfaattisen leukemiasolun kaltaisia (Kuittinen & Remes 2015, 367).

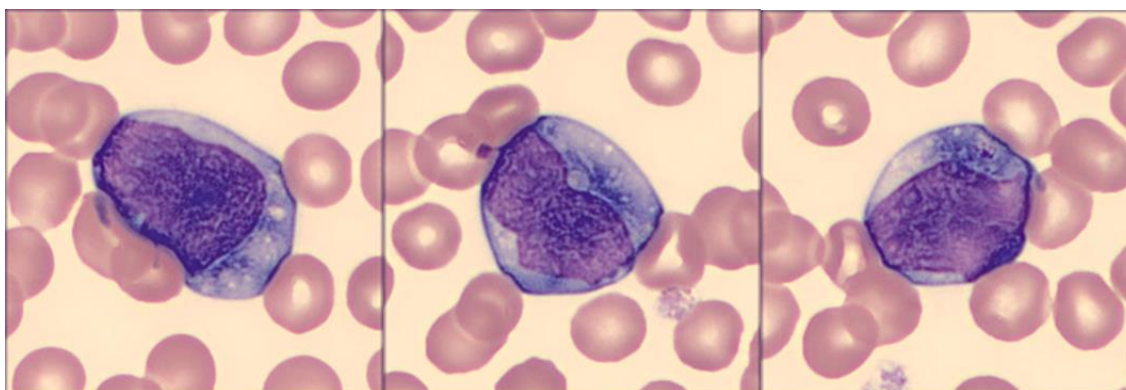
2.2.3 Pieni ja iso lymfosyytti

Suuri osa veren kypsistä lymfosyyteistä on pieniä, aktivoitumattomia lymfosyyttejä, joissa on vain vähän syvän sinistä sytoplasmaa. Solujen tuma on pyöreä ja se on kooltaan punasolun kokoinen. Osa verenkierron lymfosyyteistä on isompia LGL-lymfosyyttejä (large granular lymphocyte). Näissä soluissa on vaalea ja runsas sytoplasma, jossa on sinipunaista granulaa. LGL-lymfosyytit voivat olla B-lymfosyyttejä tai NK-soluja. (Vilpo 2010b, 24–25; Siitonen & Koistinen 2015, 27.) Kuvassa 3 on näkyvissä erilaisia lymfosyyttejä, joista vasemmalla on pieni lymfosyytti ja keskellä sekä oikealla isot lymfosyytit.



Kuva 3. Kuvakollaasi erilaisista lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

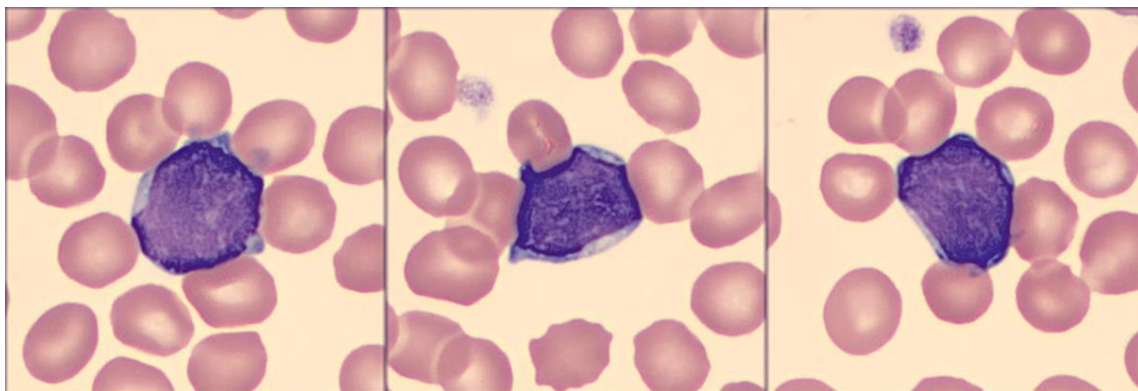
Erilaiset infektiot voivat vaikuttaa lymfosyyttien morfologiaan. Esimerkiksi Epstein-Barrin viruksen aiheuttama mononukleoosi saa verenkiertoon aktivoituneita T-lymfosyyttejä, joita tuotetaan immunologisena vasteena EBV-infektioituneille B-lymfosyyteille. Näille T-soluille on tyypillistä reaktiivinen, usein sininen tai siniharmaa sytoplasma. (Howard & Hamilton 2008, 95.) EVB-mononukleosisissa lymfosyyttien osuus saattaa olla yli 50 % valkosoluista ja niistä yli 10 % on reaktiivisia. (Kuittinen & Remes 2015, 366). Kuvassa 4 näkyy EVB-mononukleosin T-lymfosyyttejä, joissa infektiolle ominaisia piirteitä.



Kuva 4. Kuvakollaasi EVB-mononukleosin reaktiivisista lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

Kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (KLL) alkuvaiheen ensimmäisiä oireita on lymfosytoosi. KLL:ssä esiintyy paljon pieniä, kypsännäköisiä lymfosyyttejä (kuva 5). Lymfosyytit ovat kuitenkin

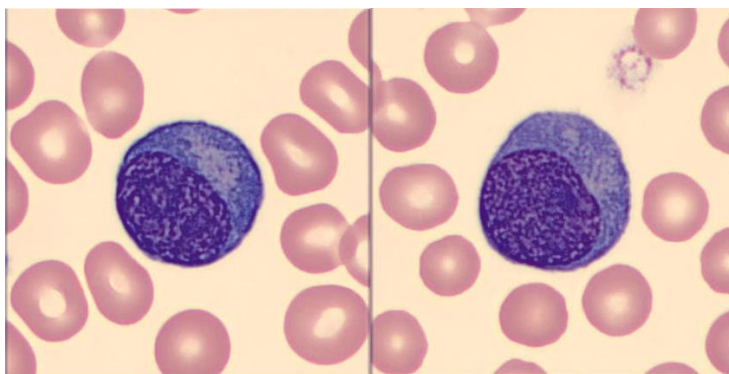
toiminnaltaan epäkypsiä B-soluja. Solujen morfologiassa saattaa olla atyyppisiä piirteitä. (Sinisalo 2010, 131–132.)



Kuva 5. Kuvakollaasi kroonisen lymfaattisen leukemian atyyppisistä lymfosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

2.2.4 Plasmasolu ja karvasolu

Plasmasolu on erilaistunut B-solu, joka tuottaa suuria määriä immunoglobuliineja. Ihmisillä suurin osa kiertävästä immunoglobuliinista tuotetaan luuytimen plasmasoluissa. (Pellat-Deceunynck & Defrance 2015, 5) Plasmasolu on isompi kuin pieni lymfosyytti. Tuma sijaitsee usein solun reunalla, ja kromatiini on karkeasti tiivistynyt. Sytoplasma on syvän basofiilista. (CellAtlas julkaisuaika tuntematon.) Kuvassa 6 kaksi esimerkkiä plasmasoluista, joissa morfologisesti tyypilliset piirteet.



Kuva 6. Kuvakollaasi plasmasoluista (Bragge 2023, CC BY-SA)

Karvasolut ovat B-lymfosyyttisarjan soluja. Karvasolu voi olla morfologialtaan vaihtelevan kokoinen. Siinä on pyöreä, munuaisen tai pähkinän muotoinen tuma ja kromatiinin rakenne on hienojakoista. Solussa on vaalean basofiilista sytoplasmaa ja siitä lähtee karvamaisia ulokkeita, jonka vuoksi solun ulkoreuna on epätasainen. Karvasoluja tavataan karvasoluleukemiassa (HCL, hairy cell leukemia). Karvasolujen määrä näytteessä on yleensä maltillinen. (Bain 2004, 86; Remes 2013b, 778; Porkka 2015, 393.) HCL on tyypillisesti keski-ikäisten miesten tauti, miehillä esiintyy tautia neljä kertaa enemmän kuin naisilla (Remes 2013b, 778; Porkka 2015, 393).

Karvasoluleukemiasta on olemassa myös varianttimuoto HCL-v, jossa tautisolut muistuttavat morfologialtaan prolymfosyyttejä, koska niissä on selkeä tumman nukleoli. Myös varianttimuodon soluissa

on karvamaiset ulokkeet. (Remes 2013b, 778.) HCL-v on hidaskulkuinen ja tautia esiintyy enimmäkseen iäkkäämmillä ihmisillä (Porkka 2015, 394).

2.3 Monopioeesin solut

Monosyytti ja granulosyyttilinjan yhteisestä progenitorisoluista syntyviä spesifejä monosyyttisarjan kantasoluja kutsutaan CFU-M soluiksi. Tästä seuraava kehittyneempi muoto on monoblasti. (Siitonen & Koistinen 2015, 25.) Blastisolujen, promonosyyttien ja epänormaalien monosyyttien erotusdiagnoosi on haastavaa, mutta erittäin tärkeää oikean diagnoosin ja hoidonvalinnan kannalta. (Bain 2017, 10.)

Kypsät monosyytit kulkeutuvat kudoksiin, joissa ne erilaistuvat makrofageiksi. Makrofagi tunnistaa poikkeavat patogeenit ja muokkaa antigeenien ja HLA-molekyylien avulla yhdistelmän, jonka T-lymfosyytti tunnistaa. Myös osa dendriittisoluista kehittyy monosyyteistä. Dendriittisolujen tehtävänä on herättää T-soluissa primaarivaste patogeeniä vastaan. (Vilpo 2010b, 23–24; Siitonen & Koistinen 2015, 25–26.) Dendriittisoluja nähdään verinäytteissä vain harvoin (Vilpo 2010b, 24).

2.3.1 Monoblasti

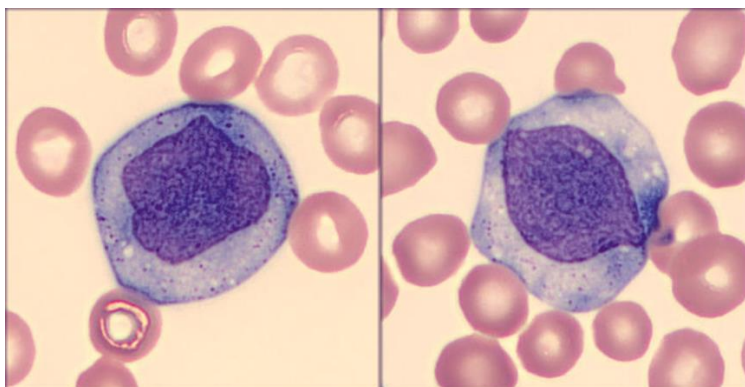
Monoblastit ovat kooltaan pääsääntöisesti isoja soluja ja niissä voi olla runsas sytoplasma. Sytoplasman basofiilisuus vaihtelee heikosta kohtalaiseen runsaaseen solusarjan sisällä. Sytoplasmassa voi esiintyä myös vakuolisaatiota. Monoblastien muoto voi vaihdella tasaisen pyöreästä epäsäännöllisempään muotoon. (Bain 2004, 92.)

Monoblastin tuma on yleisimmin pyöreä tai ovaalinmuotoinen. Tuman kromatiini on irrallista ja tumassa voi olla nähtävillä yksi selkeä nukleoli. (Bain 2017, 10.) Monoblastia ei voi varmuudella tunnistaa muista blasteista valomikroskooppisesti, vaan tunnistus tapahtuu muilla tutkimusmenetelmillä, kuten solujen ilmentämien antigeenien määrittämisellä virtausytometrisesti. (Siitonen & Koistinen 2015, 25, 140).

2.3.2 Promonosyytti

Promonosyytit ovat ensimmäisiä valomikroskooppisesti tunnistettavia monosyyttisarjan soluja. (Siitonen & Koistinen 2015, 25.) Promonosyyttien erotus monoblasteista tapahtuu lähinnä tuman muutoksien avulla. Monoblastin tuma on pääsääntöisesti säännöllisen pyöreä tai hieman ovaali, kun taas promonosyyttien tuman muoto on epäsäännöllisempi ja monosyyttisarjalle tunnusomaisempi, ja saman solusarjan solujen tumien välillä voi olla enemmän vaihtelua. (Bain 2017, 10.)

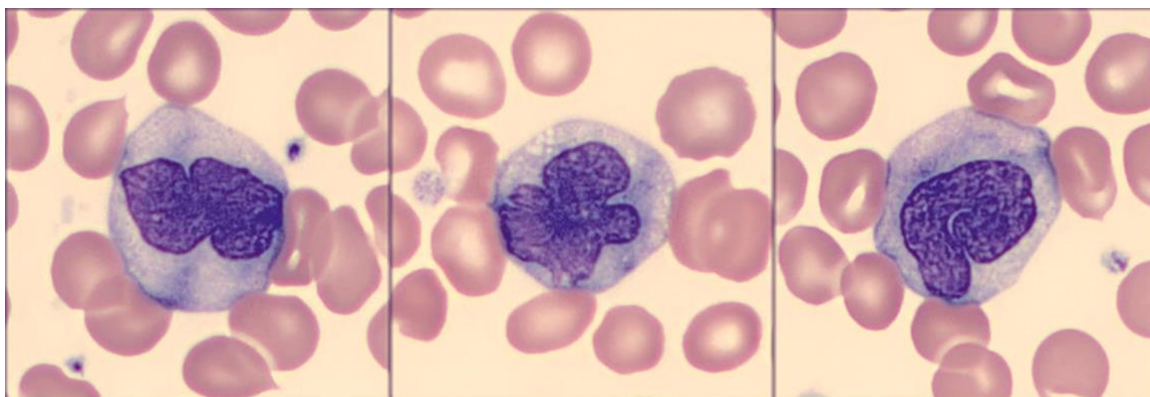
Promonosyytit ovat samankaltaisia soluja kuin promyelosyytit, mutta niiden sytoplasma sisältää vähemmän granulaa ja granula on hienojakoisempaa. (Siitonen & Koistinen 2015, 25.) Promonosyytit ovat kooltaan isompia soluja kuin kypsät monosyytit. Promonosyyteissä on monosyytteihin verrattuna basofiilisempi sytoplasma ja se sisältää enemmän solulinjalle tyypillisen muotoista granulaa (kuva 7). (Bain 2004, 93.)



Kuva 7. Kuvakollaasi promonosyyteistä. (Bragge 2023, CC BY-SA)

2.3.3 Monosyytti

Monosyytti on kooltaan 15–18 μm (Vilpo 2010, 23). Veren terveistä, kypsistä soluista monosyytit ovat isoimpia (Hoffbrand & Moss 2016, 89). May-Grünwald-Giemsa-värjäyksellä sytoplasmasta tulee tasaisen siniharmaa. Sytoplasmassa voi olla pieniä, punertavia jyväsiä. (Vilpo 2010, 23.) Monosyyteissä on usein hieman kaareva tuma, joka sijaitsee solun reunalla (kuva 8). Monosyytit ovat verenkierrossa 1–2 vuorokautta, jonka jälkeen ne siirtyvät muihin kudoksiin makrofageiksi hiussuonten seinämien läpi. Veressä monosyyttejä on normaalisti 2–10 %. (Nienstedt ym. 2014, 175.) Monosyyttejä on luuytimessä noin 3 % (Siitonen & Koistinen 2015, 26).



Kuva 8. Kuvakollaasi monosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

Monosyytti toimii yhtenä elimistön tärkeimpänä fagosytoivana soluna. Monosyytin erityisempi rooli immunologisessa puolustuksessa on enstymaattisesti käsitellä vieras antigeeni ja esitellä se lymfosyyteille. Tämä käynnistää mikrobin tuhoamiseksi tarkoitetun spesifisen immunologisen reaktion. (Vilpo 2010, 23.)

2.4 Myelopoieesin solut

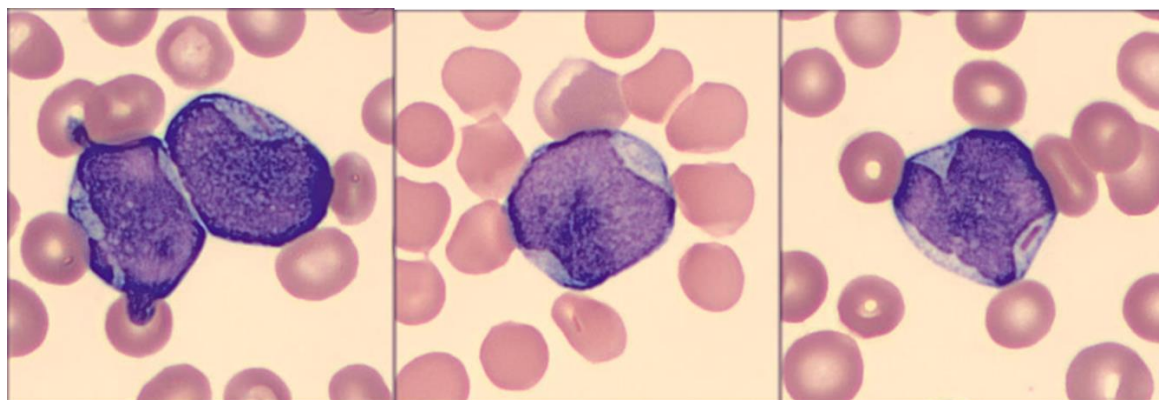
Varhaisen granulopoieesin esiastesolun kypsyminen neutrofiiliksi vie noin 10–14 päivää. Neutrofiilit kiertävät verenkierrossa 6–10 tuntia, jonka jälkeen ne siirtyvät kudoksiin, esimerkiksi keuhkoihin, suoleen tai pernaan, verisuonten seinämien läpi. Neutrofiilien osuus veren kaikista valkosoluista on noin 60 % aikuisella. Neutrofiilit ovat fagosytoivia soluja ja niiden tärkeimpänä tehtävänä on mikro-

bien tuhoaminen. Neutrofiilit tuhoutuvat apoptoottisesti 2–3 vuorokauden kuluttua kudoksiin siirtymisen jälkeen. (Bain 2004, 7; Vilpo 2010b, 22; Siitonen & Koistinen 2015, 24.)

Puhuttaessa vasemmalle siirtymisestä leukosyytien erittelylaskennassa havaitaan epäkypsiä soluja. Näytteessä voi näkyä sauvatunaisia neutrofiileja sekä metamyelosyyttejä tai myelosyyttejä. Voidaan puhua myös oikealle siirtymisestä, jolloin näkyvissä on yliliuskoittuneita neutrofiileja. (Bain 2004, 48–49.)

2.4.1 Myeloblasti

Varhaisin luuytimestä tunnistettava granulopoieesin solu on myeloblasti. Myeloblasti on kooltaan 15–20 µm, ja sen sytoplasma on basofiilistä. FAB luokituksen mukaan M1 tyyppin myeloblastissa sytoplasma on granulatton, ja M2 luokan myeloblasti sisältää niukan granulan. Sytoplasmassa voi olla myös Auerin sauva tai sauvoja (kuva 9). (Bain 2017, 7–8.) Myeloblastissa on suuri tuma, hienojakoinen kromatiini ja se sisältää kahdesta viiteen tumajyväästä. (Bain 2004, 91; Siitonen & Koistinen 2015, 24; Hoffbrand & Moss 2016, 89.) Tumassa voi olla sisennyksiä tai lohkokutumista. Myeloblastit voivat olla samassa näytteessä keskenään vaihtelevan muotoisia ja kokoisia, mutta yhteistä soluille on tumän suuri koko sytoplasmaan verrattuna ja tumassa sijaitseva nukleoli. (Bain 2017, 139.) Myeloblastien määrä luuytimessä on noin 3 % (Siitonen & Koistinen 2015, 24).

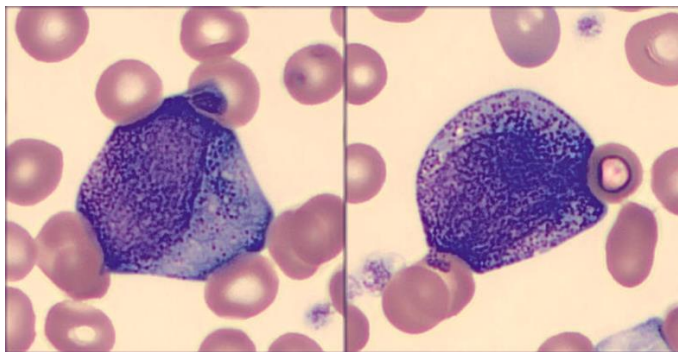


Kuva 9. Kuvakollaasi myeloblasteista (Bragge 2023, CC BY-SA)

Myeloblasteja ilmaantuu verenkiertoon akuutissa myelooisessa leukemiassa (AML), jossa blastien määrä on yli 20 % kaikista leukosyyteistä (Howard & Hamilton 2008, 40). Myeloblasteja voi esiintyä myös joissain myelodysplastisissa oireyhtymissä (MDS:t) ja myelodysplastis-myeloproliferatiivisissa neoplasioissa, joissa blastien osuus pysyy yleensä pienenä (Siitonen & Ebeling 2015, 285, 298–299).

2.4.2 Promyelosyytti

Promyelosyytit ovat hieman isompia soluja kuin myeloblastit, ja niihin on kehittynyt karkea primaari-granula sytoplasmaan, kuten kuva 10 soluissa (Siitonen & Koistinen 2015, 24; Hoffbrand & Moss 2016, 89). Promyelosyytin koko on noin 15–25µm (CellAtlas julkaisuaika tuntematon). Promyelosyyteissä voi olla eksentrisen nukleoli ja niissä voi olla Golgin laite. Promyelosyyteille on tyypillistä kaksi-lohkoinen tuma. (Bain 2004, 91.)



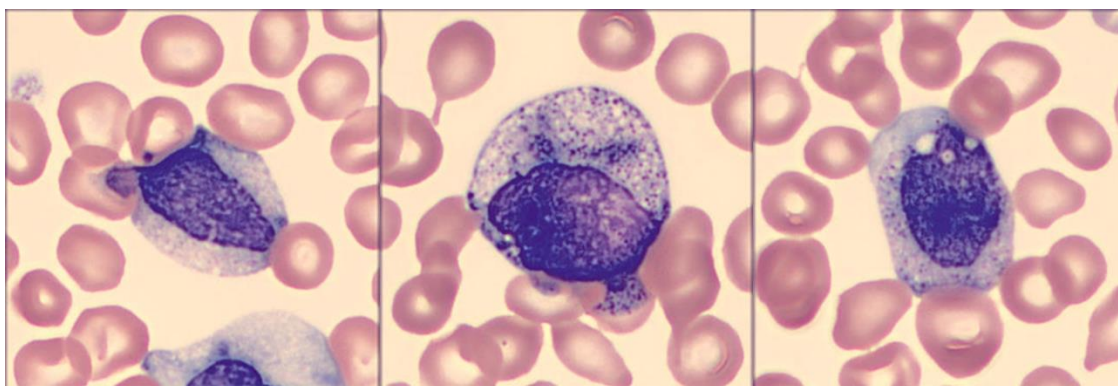
Kuva 10. Kuvakollaasi promyelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

Promyelosyyttileukemiaa epäiltäessä tulee olla yhteydessä heti hoitavaan lääkäriin tai päivystävään yksikköön, koska tila on hengenvaarallinen. Promyelosyyttileukemiaan liittyy intravaskulaaristen hyytymien riski ja lääkitys tulee aloittaa nopeasti. Promyelosyyttileukemiasta on olemassa variantimuoto, jossa soluista puuttuu tunnusomainen, azurofiilinen granula. Sen tilalla voi olla hienojakoista granulaa, sytoplasmassa voi olla hento vaaleanpunainen sävy tai se voi sisältää Auerin sauvan tai sauvakimppuja. (Bain 2004, 94.)

2.4.3 Myelosyytti

Myelosyytti on kooltaan pienempi solu kuin promyelosyytti, kooltaan noin 10-18 μ m (CellAtlas julkaisuaika tuntematon). Myös myelosyytin tuma on pienempi. Tuman kromatiitirakenne on tiivistynyt eikä tumassa olevien tumajyvästen erottaminen ole enää mahdollista. (Siitonen & Koistinen 2015, 24; CellAtlas julkaisuaika tuntematon.) Kuvassa 11 esitettynä myelosyyttejä.

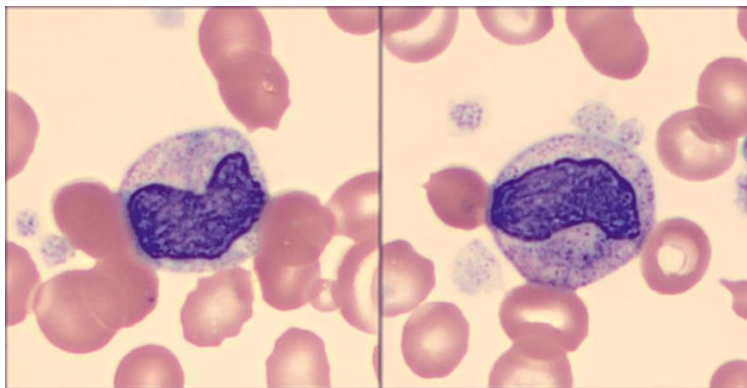
Sytoplasmassa on nähtävillä sekundaarigranulaa, joka kehittyessään alkaa näkymään neutrofiilisenä, eosinofiilisenä tai basofiilisenä. Solun jakautumiskyky loppuu myelosyyttitasolla. (Siitonen & Koistinen 2015, 24; CellAtlas julkaisuaika tuntematon.) Myelosyyttejä voidaan nähdä esimerkiksi kroonisessa myelooisessa leukemiassa (KML) tai myelodysplastisissa oireyhtymissä (MDS) (CellAtlas julkaisuaika tuntematon).



Kuva 11. Kuvakollaasi myelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

2.4.4 Metamyelosyytti

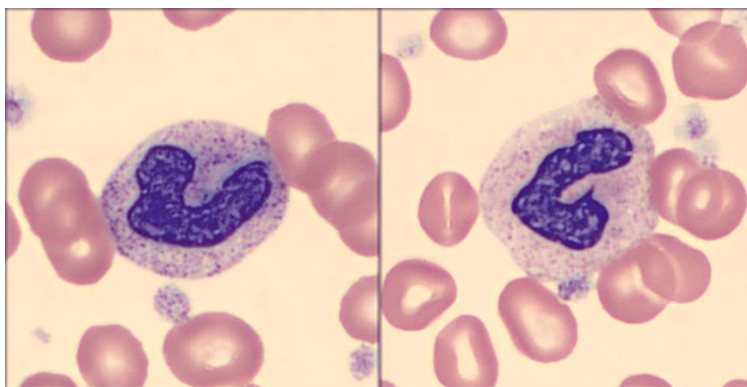
Metamyelosyytin tunnusomainen piirre on potku tai kaarevuus tumassa (Siitonen & Koistinen 2015, 24). Metamyelosyytin tumassa ei ole näkyvissä nukleolia. Sytoplasma sisältää neutrofiilisesti, eosinofiilisesti tai basofiilisesti erilaistunutta granulaa. Metamyelosyyttejä ei normaalisti ole nähtävillä verenkierrossa, mutta niitä voi vapautua luuytimestä verenkiertoon infektioissa, KML:ssä tai MDS:ssä. (CellAtlas julkaisuaika tuntematon.)



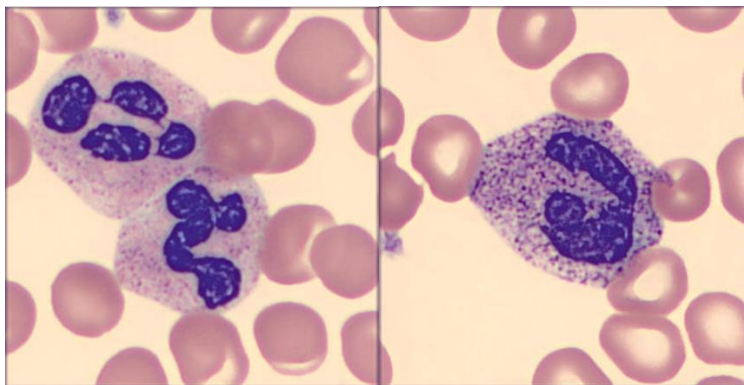
Kuva 12. Kuvakollaasi metamyelosyyteistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

2.4.5 Sauvatumainen ja liuskatumainen neutrofiili

Sauvatumaisen neutrofiilin tuma on muuttunut entistä tiiviimmäksi ja kromatiinirakenne paakkuuntunut. Tuman muoto on sauvamainen, jossa näkyy pientä kuroutumista liuskoihin (kuva 13). (Siitonen & Koistinen 2015, 24.) Kypsä, liuskatumainen neutrofiili on kooltaan noin 13 μ m ja solun tuma on liuskottunut kahdesta viiteen liuskaan (Vilpo 2010b, 22; Siitonen & Koistinen 2015, 24). Tuman liuskat ovat kiinni toisissaan tumamateriaalista koostuvan ohuen säikeen avulla, kuten kuvassa 14 näkyy. Tuman kromatiini on heterogeenistä ja saattaa sisältää tiivistymiä. Tuma värjäytyy MGG-värjäyksellä purppuran väriseksi. (Bain 2004, 5.) Neutrofiilin sytoplasma on hennon vaaleansinistä ja siinä on violetin tai vaaleanpunaisen sävyistä granulaa (Bain 2004, 7; Vilpo 2010b, 22).

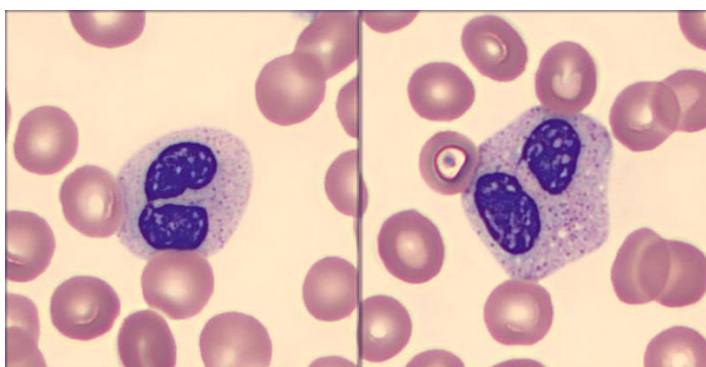


Kuva 13. Kuvakollaasi sauvatumaisista neutrofiileista (Bragge 2023, CC BY-SA)

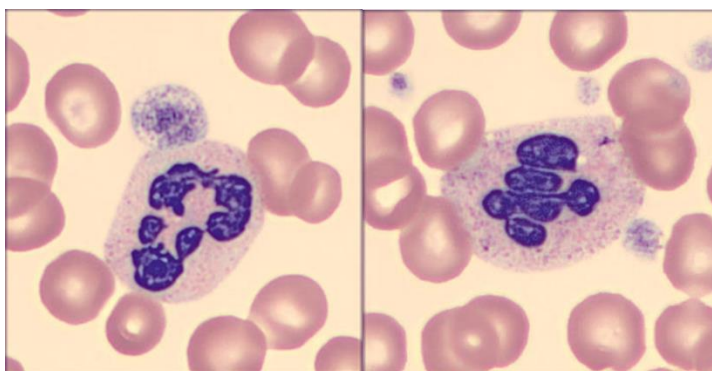


Kuva 14. Kuvakollaasi liuskatumaisista neutrofiileista (Bragge 2023, CC BY-SA)

Neutrofiilien aliliuskoittumista kutsutaan hyposegmentaatioksi. Hyposegmentaatiota on näkyvissä kuvan 15 soluissa. Pelger-Huët anomaliassa neutrofiilien ja mahdollisesti myös eosinofiilien tuma lohkottuu kahteen osaan ja tuman muoto on silmälasimainen tai pähkinämäinen. Hypersegmentaatiosta puhutaan, jos liuskoja on kuusi tai enemmän (kuva 16). Tästä voidaan käyttää myös termi oikealle siirtyminen. Hypersegmentaatiota voi ilmetä B12-vitamiinin tai foolihapon puutteissa. (Bain 2004, 49.)



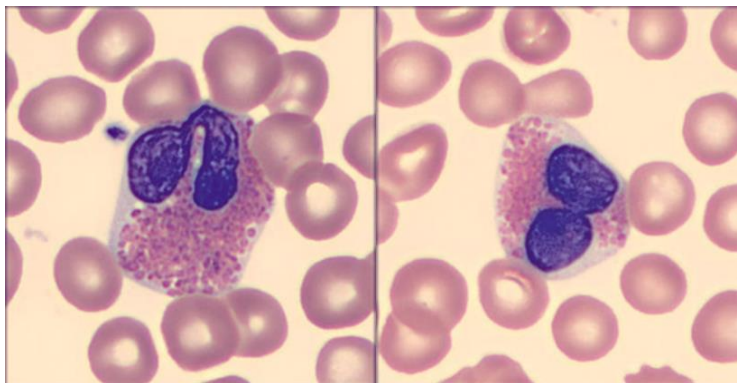
Kuva 15. Kuvakollaasi hyposegmentoituneista neutrofiileista (Bragge 2023, CC BY-SA)



Kuva 16. Kuvakollaasi hypersegmentoituneista neutrofiileista (Bragge 2023, CC BY-SA)

2.4.6 Eosinofiili

Eosinofiilisten eli asidofiilisten granulosyyttien määrä verenkierrossa on 1–6 % veren leukosyyteistä. Niiden sytoplasman jyvät sisältävät emäksisiä yhdisteitä, joilla on kyky sitoa happamia väriaineita, kuten eosiinia. (Nienstedt ym. 2014, 174.) Eosinofiilin tuma on yleensä kaksi- tai kolmelohkoinen, ja tumajyvät ovat värjäytyneet voimakkaan punaoransseiksi (kuva 17) (Howard & Hamilton 2008, 7). Eosinofiili on kooltaan 12-17 μm (Vilpo 2010b, 22).

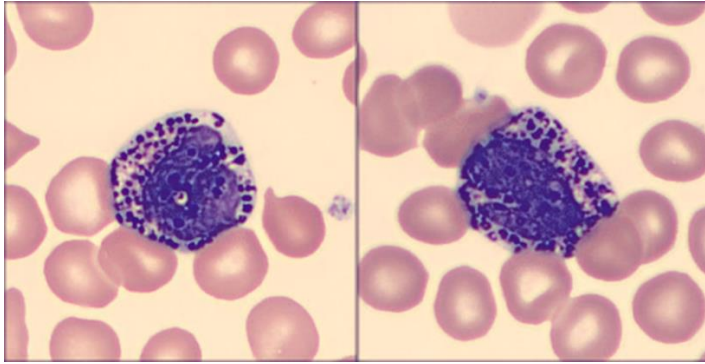


Kuva 17. Kuvakollaasi eosinofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

Eosinofiilit ovat fagosytoivia soluja. Eosinofiilien tehtävänä on myös hävittää loisia ja parasitteja, jotka ovat kooltaan liian suuria fagosytoitavaksi. Allergiset tilat ja astma nostavat eosinofiilien määrää verenkierrossa. (Vilpo 2010b, 22; Siitonen & Koistinen 2015, 25.) Eosinofiilien määrään vaikuttaa myös vuorokausivaihtelu. Eosinofiilien määrä on korkeimmillaan illalla ja matalimmillaan aamulla. Fyysisen rasituksen on todettu nostavan arvoja, kun taas stressi ja beetasalpaajien käyttö laskee niitä. Naisilla myös kuukautiset saattavat nostaa eosinofiilien määrää verenkierrossa. (Pelliniemi 2010, 104.) Muita eosinofiliaa aiheuttavia tiloja voivat olla lääkeyliherkkyys, erilaiset ihosairaudet ja sidekudoshäiriöt. Merkittävää eosinofiliaa nähdään myös hypereosinofiilisen oireyhtymässä ja toisinaan Hodgkinin lymfoomassa. (Howard & Hamilton 2008, 7.)

2.4.7 Basofiili

Basofiileja on määrällisesti vähiten verenkierron leukosyyteistä, niitä on normaalisti alle prosentti kaikista valkosoluista (Nienstedt ym. 2014, 174). Basofiilit ovat halkaisijaltaan 5–8 μm , ja niissä on tiivistynyt ja useammassa lohossa oleva tuma. Basofiilit erottaa muista leukosyyteistä tumman violettien tai sinertävien granuloiden ansiosta (kuva 18). Granulat värjäytyvät emäksisillä aineilla, kuten toluidiinisinisellä tai Alcian sinisellä. (Stone, Prussin & Metcalfe 2010.) Granulat sisältävät akuutin tulehduksen välittäjäaineita, muun muassa hepariinia ja histamiinia. (Stone, Prussin & Metcalfe 2010; Nienstedt ym. 2014, 174).



Kuva 18. Kuvakollaasi basofiileistä (Bragge 2023, CC BY-SA)

Basofiilien erilaistumista ohjaa sytokiineista voimakkaimmin IL-3 (Stone, Prussin & Metcalfe 2010). Basofiileilla on kyky fagosytoida, ja ne toimivat yhtenä osana allergisten reaktioiden välittämisessä ja parasiittien hävittämisessä (Vilpo 2010, 22). Basofiliaa on todettu myeloproliferatiivisissa sairauksissa, kuten kroonisessa myelooisessa leukemiassa, akuuttien infektioiden toipumisvaiheissa, tulehduksellisissa suolistosairauksissa ja kilpirauhasen vajaatoiminnassa. (Howard & Hamilton 2008, 7; Vilpo 2010, 107.) Basofiilien kaltaisia immunitetti- ja tulehdusreaktioita sääteleviä soluja kudoksissa kutsutaan syöttösoluiksi (Nienstedt ym. 2014, 174; Siitonen & Koistinen 2015, 25).

3 LEUKOSYTTIEN ERITTELYLASKENTA JA CELLAVISION DM1200 DIGITAALIMIKROSKOOPPI

3.1 Leukosyyttien erittelylaskenta

Leukosyyttien erittelylaskenta eli differentiaalilaskenta tarkoittaa leukosyyttien jakamista eri luokkiin, ja luokissa olevien solujen määrät ilmaistaan prosenttiosuuksina tai absoluuttisina osuuksina. Absoluuttista osuutta varten tarvitaan leukosyyttien kokonaislukumäärä. Mikäli leukosyyttien erittelylaskenta toteutetaan mikroskoopissa sivelyvalmisteesta, sitä kutsutaan manuaaliseksi differentiaalilaskennaksi tai manuaaliseksi erittelylaskennaksi. (Bain 2015, 23.)

Hematologian laboratorioissa voi olla eri kokoisia ja toiminnoiltaan erilaisia automaattisia verenkuvanalyysiaattoreita. Laboratorioiden näytemääristä ja laitteiden käyttöasteista johtuen on olemassa pieniä, yhden näytteen kerrallaan tutkivia laitteita suuriin, satojakin näytteitä tunnissa analysoiviin laiteyhdistelmiin. Valkosolujen differentiaalilaskentaa tekevät laitteet luokittelevat solut luotettavasti, kun näyte on terveestä henkilöstä, tai näytteessä on vain pieniä muutoksia normaalijakaumaan. (Savolainen, Pelliniemi & Koski 2010, 86–87.) Automatisoitujen analyysiaattoreiden tulosten toistuvuus on merkittävästi parempi verrattuna manuaaliseen erittelylaskentaan, koska automaattiset verenkuvanalyysiaattorit laskevat tuhansia soluja yhdestä näytteestä (Savolainen & Tienhaara 2015, 87).

Koneellisen differentiaalilaskennan luotettavuus pienenee, mikäli näytteestä löytyy patologisia soluja tai normaalijakaumasta poikkeavia soluja. Näitä voivat olla esimerkiksi reaktiiviset tai atyyppiset lymfositit, solujen varhaismuodot granulosityttisarjasta tai blasteiksi luokitellut solut. (Savolainen, Pelliniemi & Koski 2010, 86–87.) Analyysiaattorin ja laboratorioissa käytetyn järjestelmän välissä käytetään usein autoverifiointiohjelmistoa, jonka avulla normaalit ja tiettyjen vastausrajojen sisäpuolella olevat tulokset siirtyvät suoraan potilastietojärjestelmään. Autoverifiointisääntöjen ulkopuoliset tulokset tulevat ohjelmistoon tarkistettavaksi ja leukosyyttien erittelylaskenta suoritetaan tarvittaessa manuaalisesti. (Savolainen & Tienhaara 2015, 89.)

Manuaalisessa differentiaalilaskennassa poikkeamat todellisesta solujen jakaumasta voi johtua monesta syystä. Solujen oikeaoppinen tunnistus on avainasemassa. Pelliniemen (1998) mukaan veren sivelyvalmisteen morfologinen tutkimus on erittäin informatiivinen tutkimus kliinikolle. Luotettavan tuloksen saamiseksi tarvitaan asiantunteva ammattilainen. Solujen mikroskooppinen tarkastelu vaatii ammattitaitoa ja kattavaa teoriapohjaa eri sairauksista ja hyvää havainnointikykyä pienissäkin muutoksissa solujen morfologiassa. (Pelliniemi 1998.) Paras solumorfologinen kohta sivelyvalmisteessa on n. $\frac{2}{3}$ osa pisarapäästä katsottuna (Savolainen 2010, 72).

Sauvatumaisten neutrofiilien ja liuskatumaisten neutrofiilien erottelussa tulee useasti isoja eroja, ja tähän saattaa vaikuttaa aikaisempi koulutus ja kriteeristön variaatio laboratorioiden välillä. Monosyyttien erotus isoista lymfosyyteistä saattaa olla haastavaa, varsinkin jos lymfosyytti on reaktiivinen esimerkiksi infektion vuoksi. Myös solujen epätasainen jakautuminen sivelyvalmisteessa vaikuttaa laskennan lopputulokseen. Sivelyn häntäpäässä on isompi osuus neutrofiilejä kuin lymfosyyttejä, kun taas lymfosyyttien määrä kasvaa sivelyn paksummassa kohdassa. (Bain 2015, 24.) Bainin (2015, 24) mukaan monosyyttien osuus on melko tasainen koko sivelyssä, Savolaisen (2010) mukaan monosyyttien määrä sivelyn ohuessa päässä kasvaa hieman. Epäkypsät solut, kuten blastit ja promyelosyytit, jakautuvat usein enemmän sivelyvalmisteen reunoille kuin keskelle. Jakauman virheellisyys

korostuu liian ohuessa sivelyssä. Manuaalisen differentiaalilaskennan tulokseen vaikuttaa myös hajoaneet solut eli varjosolut. Solujen hajoaminen sivelyvalmistetta tehdessä muuttaa prosentuaalisia ja absoluuttisia arvoja. Varjosoluja muodostuu helposti merkittäviä määriä esimerkiksi KLL-potilaiden näytteissä (Bain 2015, 24.)

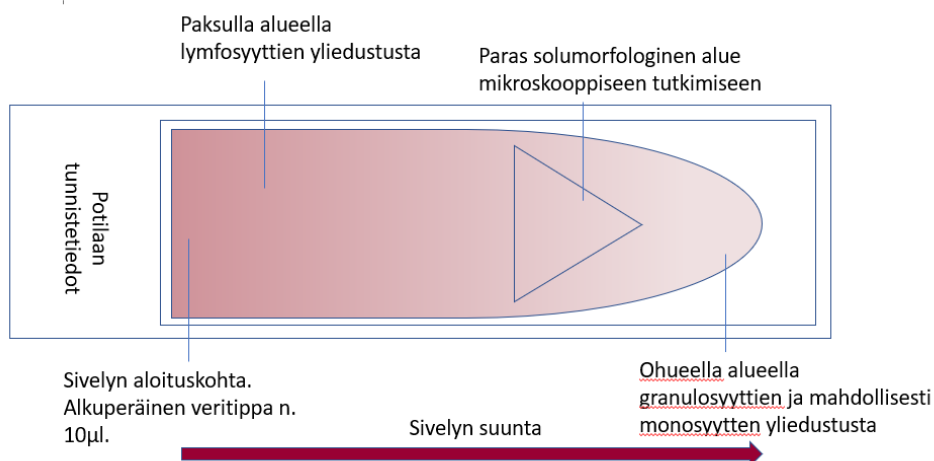
Veren valkosolujen erittelylaskennassa valomikroskoopissa yhtenä ongelmana on pieni otoskoko. Yleensä sivelyvalmisteesta lasketaan 100 solua ja tämä toistetaan kahdesta potilaan näytteestä tehdystä valmisteesta. Pienempi otoskoko aiheuttaa huonoa toistuvuutta ja tämän johdosta tulosten variaatio voi kehittyä suureksi. (Savolainen 2010, 72–73; Savolainen & Tienhaara 2015, 89.) Mitä enemmän soluja lasketaan ja tunnistetaan, sitä tarkemmaksi saatu tulos muodostuu (Rümke 1977, 40–41).

3.2 Sivelyvalmisteen teko

Veren sivelyvalmiste suositellaan tehtäväksi mahdollisimman tuoreesta EDTA-putkeen otetusta verinäytteestä. Solumorfologia on parhain tuoreessa näytteessä, pitkään säilytetyssä näytteessä morfologia saattaa olla vaurioitunut. Sivelyvalmiste suositellaan tehtäväksi viimeistään 3 tunnin kuluttua näytteenotosta luotettavimman lopputuloksen varmistamiseksi. (Mahlamäki 2004, 276; Savolainen & Tienhaara 2015, 89.) EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo on sopivin antikoagulantti verenkuvatuksiin. EDTA estää veren hyytymisen ja sen toiminta perustuu kalsiumin sitomiseen veressä. (Savolainen & Tienhaara 2015, 85.)

Veren sivelyvalmiste valmistetaan puhtaalle objektilasille. Näyte tulee olla hyvin sekoitettua ennen sivelyn tekoa. EDTA-putkeen otetusta verinäytteestä otetaan pisara joko kapillaarin tai tähän tarkoitettun korkinlävistäjän avulla lähelle objektilasin hiospäättä. (Mahlamäki 2004, 276–277.) Myös kapillaarinäyte suoraan sormenpäältä on laadullisesti ja solujen morfologian kannalta riittävä, mutta trombosyyttien aggregoituminen tulee ottaa huomioon sivelyvalmistetta tutkittaessa (Savolainen & Tienhaara 2015, 96). Pisara levitetään eli vedetään vetolasin avulla objektilasille sivelyvalmisteeksi. Sivelyvalmisteen paksuuteen vaikuttaa vetokulma, eli vetolasin ja objektilasin väliin jäävän kulman suuruus. Hyvä vetokulma on näytteestä riippuen noin 30–45°. Sivelyvalmisteen laatuun vaikuttaa merkittävästi valmisteen nopea kuivatus. (Mahlamäki 2004, 276–277.)

Sivelyvalmiste värjätään kuivumisen jälkeen. Yksi yleisimmin käytetyistä värjäyksistä on May-Grünwald-Giemsan värjäys. Värjäyksessä käytetään metyleenisiniä, atsuuria ja eosiniä, jotka osaltaan värjäävät eri komponentteja solujen rakenteissa. Emäksiset metyleenisini ja atsuuri värjäävät happamia tuman nukleiinihappoja ja nukleoproteiineja sekä sytoplasman proteiineja, kun taas hapan eosini värjää emäksisiä solun osia, kuten punasolujen hemoglobiinia ja eosinofiilien sytoplasman granuloita. (Mahlamäki 2004, 276–277.)



Kuva 19. Veren sivelyvalmiste (mukaillen Savolainen 2010, 72)

Mikäli digitaalimikroskoopi otetaan käyttöön SataDiag:n hematologian laboratoriossa, työpisteessä siirrytään käyttämään Sysmex SP-slides objektilaseja sivelyvalmisteiden tekoon. Sysmex SP-slides-lasien pinta on käsitelty toisiinsa kiinnittymistä vastaan, ja pinnoitus vähentää myös lasin liikuttamiseen liittyviä haasteita Cellavisionilla. Lasien kulmat ovat pyöristetty, ja hioksen osuus jatkuu lasien reunoilla. (Sysmex julkaisuaika tuntematon.) Hematologian laboratoriossa on mahdollisuus käyttää sivelyvalmisteiden tekoon kahta erikokoista vetolasia, joista kapeampi vetolasi ei osu Sysmex SP-slides lasien hiosreunoihin.

3.3 Cellavision DM1200 digitaalimikroskoopi ja sen toiminta

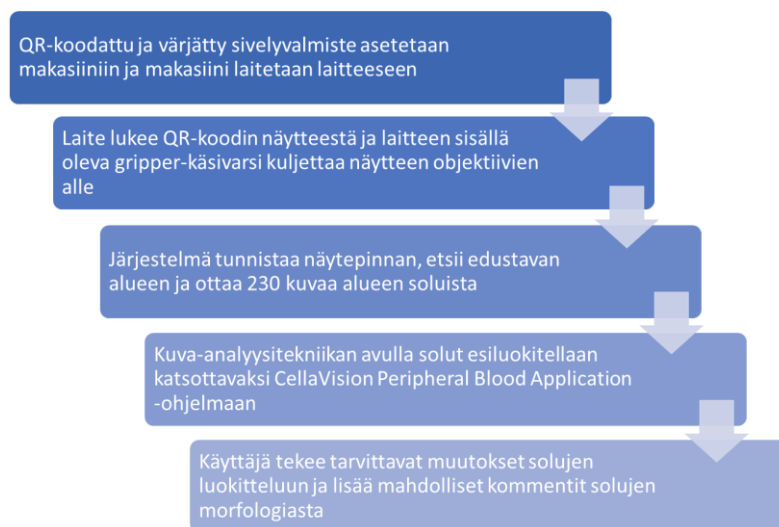
CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopi on valmistettu nopeuttamaan ja yksinkertaistamaan manuaalista mikroskopointia. CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin tuoma tuki täydentää manuaalimikroskopointia tukemalla soluanalyysia tekniikan keinoin. CellaVision-teknologia mahdollistaa uuden lähestymistavan solujen differentiaalilaskennan toteuttamiseen. (CellaVision Concept Brochure 2019.)

Perifeerisen veren sivelyvalmiste pitää olla tehtynä joko Sysmex SP-slides objektilaseille tai muille laitteen vaatimukset täyttävälle laselle. Objektilasien tulee olla joko leikatuilla tai pyöristetyillä reunoilla, jotta laitteen gripper-käsivarsi pystyy tarttumaan lasihin. Perifeerisen veren sivelyvalmiste QR-viivakooditarroineen työnnetään näytetelineeseen eli makasiiniin. Makasiini asetetaan CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopissa sille tarkoitetulle paikalle laitteen etuosaan. Laite lukee valmisteesta olevan viivakooditarran, ja siirtää sivelyvalmisteiden makasiinista tutkittavaksi. (CellaVision Concept Brochure 2019.)



Kuva 20. CellaVision DM1200 (Cellavision 2022)

CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopissa on digitaalinen kuvausjärjestelmä valomikroskoopin rinnalla. Digitaalinen kuvausjärjestelmä paikantaa optimaalisen kuvausalueen ja ottaa laadukkaita kuvia soluista valitulta alueelta. Valomikroskopiassa käytetään 10x ja 50x objektiiveja. Kuvien ottamisen jälkeen järjestelmän sisältämän esikatselun perusteella ohjelmisto kategorisoi leukosyytit jopa 17 erilaiseen solutyyppiin. Laitteen suorittama esiluokittelu tulee CellaVision Peripheral Blood Application -käyttöohjelmiston kautta näkyviin käyttäjälle, jonka tehtävänä on tarkastaa esiluokittelun tulos ja tehdä tarvittavat muutokset luokitteluun. Käyttöohjelmistossa on mahdollista antaa myös lisätietona käyttäjän määrittelemiä lausuntoja, kuten esimerkiksi monosyyteissä atypiaa tai muutamia reaktiivisia lymfosyyttejä. (CellaVision Concept Brochure 2019.)



Kuva 21. CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin käyttö (mukaillen Cellavision Concept Brochure 2019)

CellaVision DM1200 laitteeseen voi syöttää samanaikaisesti 12 sivelyvalmistetta makasiinissa. Laite pystyy analysoimaan noin 20 sivelyvalmistetta tunnissa riippuen näytteen solupitoisuudesta ja sivelyvalmisteen laadusta. CellaVision DM1200 laitteessa on automaattinen öljyannostelu, ja öljyn loppuessa uusi öljypakkaus on yksinkertaista vaihtaa. Laitteen tekemän analysoinnin laatua arvioidaan Cell Location tarkkuustestillä, ja testi suoritetaan kerran viikossa. Cell Location testin avulla pystytään seuraamaan solujen tunnistusherkkyyttä tai siihen tulevia muutoksia. (CellaVision Product Factsheet 2021.)

4 VERIFIOINTI JA LABORATORIOTUTKIMUSTEN LAATU

4.1 Validointi ja verifiointi

Validointi ja verifiointi ovat keskeisessä roolissa laboratoriossa, kun tarkoituksena on selvittää menetelmien ja analysointilaitteiden toimivuus eri tulosalueilla (Laitinen 2017, 34). Validoinnin ja verifiointin termien käyttö on muokkaantunut vuosien varrella ja termien käytössä on alakohtaisia eroja. Validointiin voidaan käyttää kuvausta, että se on tietyn toiminnan varmentamista ja kelpuutusta. Validoinnin avulla varmennetaan, että valittu menetelmä ja laite soveltuu suunniteltuun käyttötarkoitukseen. (Hägg 2016, 7; Laitinen 2017, 34; Helenius 2021.) Standardi SFS-EN ISO 15189 mukaan laitteen validoiminen on raskaampi prosessi, jossa osoitetaan uuden menetelmän sopivuus ja oikea suorituskyky suunniteltuun käyttötarkoitukseen (Labquality 2020).

Validoinnin kautta tuotetaan menetelmän luotettavuutta kuvaaville, ennalta määritellyille parametreille vertailuarvoja. Näiden arvojen perusteella määritetään täyttääkö menetelmä tai laite asetetut vaatimukset. Jokaiselle validoitavalle menetelmälle tai laitteelle asetetaan tapauskohtaisesti kriteerit, joiden täytyttyä varmennutaan tulosten oikeellisuudesta ja menetelmän laadusta. Validoinnin laajuus määräytyy analyysimenetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Kaikki uudet menetelmät, jotka laboratorio kehittää itse, tulee validoida ja dokumentoinnin tulee kattaa kaikki vaiheet. (Hägg 2016, 7.)

Verifiointi on suppeampi kokonaisuus kuin validointi. Verifiointia käytetään silloin, kun otetaan käyttöön menetelmä tai laite, joka on jo käytössä muualla ja sille on suoritettu validointi esimerkiksi laitevalmistajan toimesta. Verifiointi voidaan toteuttaa myös laboratoriossa validoituun menetelmään, johon on tehty muutos. Verifiointia vaativia muutoksia voivat olla esimerkiksi näytteen käsittelyssä, analyysimenetelmässä tai tietojärjestelmässä tapahtuneet muutokset. (Hägg 2016, 7–8; Helenius 2021.) Standardi SFS-EN ISO 15189 määrittelee laitteen verifiointin niin, että se on objektiiviseen näyttöön perustuvaa varmistumista siitä, että määritellyt vaatimukset on täytetty vaihtoehtoisesti laskelmin vertaamalla menetelmien spesifikaatioita, testaamalla ja koekäytöllä tai asiakirjojen katselmoinnilla (Labquality 2020).

4.2 Verifiointisuunnitelma

Verifiointiprosessi aloitetaan verifiointisuunnitelman rakentamisella. Verifiointisuunnitelman laadintaan tulee käyttää aikaa, jotta siinä kuvataan kaikki oleelliset asiat. Verifiointisuunnitelman laatii esimerkiksi menetelmävastuuhenkilö. Verifiointi tulee pohjautua ISO 15189 laatustandardiin. (Helenius 2021.)

Verifiointisuunnitelmassa tulee olla kirjattuna testattavat parametrit sekä laatukriteerit, joiden mukaan voidaan arvioida verifiointin hyväksyminen. Tärkeimmät asiat verifiointisuunnitelmassa on menetelmävertailu, toistettavuus ja oikeellisuus. Suunnitelmaan kirjataan myös prosessin aikataulusuunnitelma, verifiointin tarve, kuka tai ketkä verifiointin toteuttaa, verifiointin hyväksyjä ja tarkastaja sekä koska suunnitelma on hyväksytty. Verifiointisuunnitelmassa pitää olla mainittuna mahdolliset tietoliikennetestaukset. Suunnitelmassa voidaan myös ottaa kantaa riskien hallintaan ja kokonaisuvarmuuden määrittämiseen. (Helenius 2021.)

4.3 Lääketieteellisten laboratorioiden pätevyysvaatimusten standardi SFS-EN ISO 15189

Eurooppalainen standardi SFS-EN ISO 15189 on vahvistettu suomalaiseksi kansalliseksi standardiksi. Standardia käytetään lääketieteellisissä laboratorioissa ohjaamaan laboratorioiden toimintaa. SFS-EN ISO 15189 standardi on laaja ja se koskee montaa eri osa-aluetta lääketieteellisten laboratorioiden toiminnassa. Standardin yhtenäisellä käytöllä pyritään lisäämään hallintajärjestelmien tehokkuutta, vähentämään virheellisten tulosten riskiä ja vähentämään potilaille, laboratorion henkilöstölle ja ympäristölle mahdollisesti aiheutuvia haittoja. (SFS-EN ISO 15189:2012.)

Standardi sisältää laatua ja pätevyyttä koskevia vaatimuksia, joita sovelletaan henkilöstöön, laboratorioissa käytettäviin laitteisiin ja välineisiin, käytettäviin reagensseihin ja muihin tarvikkeisiin. Standardissa on myös omat vaatimukset tutkimus- ja testausprosessien kulkuun, laitteiden ja menetelmien validointiin ja verifiointiin, ja laadun varmistamiseen näissä prosesseissa. Myös prosessien dokumentointi ja muu tiedonhallinta on ohjeistettu SFS-EN ISO 15189 standardissa. Standardi velvoittaa laboratoriota dokumentoimaan laboratoriotointojen valikoiman, sisältäen myös muissa toimipisteissä tehtävät tutkimukset ja vierianalytiikan. (SFS-EN ISO 15189:2012.)

Standardi ei yksityiskohtaisesti kerro, miten verifiointi tulee toteuttaa tai millä laajuudella se toteutetaan. Organisaatioiden tehtävänä on itse määrittää riittävä ja tarpeenmukainen verifiointi, luoda sille verifiointisuunnitelma sekä aikatauluttaa se käytettävissä olevien resurssien mukaan. (Laitinen 2017, 34). Roelofsen-de Beerin ym (2019) mukaan standardin tehtävänä on ohjata työntekijää arvioimaan kriittisesti sitä laatua, mitä laboratorio tuottaa.

5 TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Opinnäytetyön tarkoituksena on verifioida uusi menetelmä perifeerisen veren sivelyvalmisteen leukosyyttien erittelylaskentaan käyttäen CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia SataDiag:in hematologian laboratorioon. Verifiointiprosessissa tarkoituksena on varmistaa, että CellaVision DM1200 -laitteelta tulevat leukosyyttien erittelylaskennat tulokset ovat luotettavia ja vastaavat manuaalimikroskopiin tuloksia. Verifiointi toteutetaan verifiointisuunnitelman mukaan, ja tuloksia tarkastellaan tilastollisin menetelmin Rümken taulukossa. Laboratorion ylilääkäri arvioi saatuja tuloksia ja päättää verifioinnin hyväksymisestä. Verifiointituloksista laaditaan verifiointiraportti, jossa saadut tulokset esitetään ja päätös verifioinnin lopputuloksesta kerrotaan.

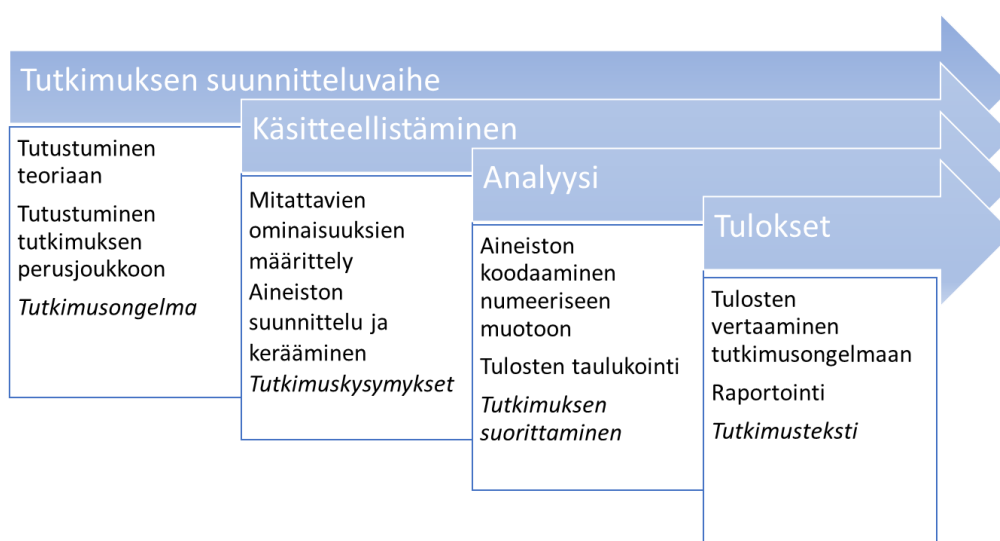
Työn tavoitteena on perifeerisestä verestä valmistetun sivelyvalmisteen leukosyyttien erittelylaskennan laadun lisääminen CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla. Laadun määrää lisää se, että näytteen analysointi ja solujen valokuvaus tapahtuu aina samalla lailla näytteestä riippumatta. Myös vakiolausuntojen määrää lisätään vastaamaan analysoinnin tarpeita. CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla analysoidut näytteet jäävät laitteen muistiin käyttäjän määräämäksi ajaksi, jolloin tuloksia voidaan tarvittaessa tarkastella myöhemmin uudestaan ja tarkistaa käyttäjän tekemät solujen tunnistukset. Erittelylaskennan laatuun pystytään vaikuttamaan myös CellaVision Proficiency Softwaren avulla, koska Proficiency Software ohjelmisto mahdollistaa esimerkiksi laboratorion sisäisten laaduntarkkailukierrosten järjestämisen.

Tämän työn tutkimuskysymykset ovat:

1. Miten vertailukelpoisia olivat digitaalimikroskoopin avulla määritetyt perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentojen tulokset valomikroskoopin avulla määritettyjen perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennan tuloksiin nähden?
2. Kuinka hyvin samasta näytteestä määritettyjen rinnakkaisten perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentojen tulokset vastaavat toisiaan käyttäen digitaalimikroskooppia?

6 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Työ toteutetaan kvantitatiivisena tutkimuksena. Kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimuksen lähtökohtana on pyrkiä yleistämään. Kvantitatiivinen tutkimus edellyttää tutkimukseen kuuluvien ilmiön tekijöiden, parametrien tai muuttujien tuntemista. (Kananen 2011, 17–18.) Määrällinen tutkimus vastaa esimerkiksi kysymyksiin kuinka paljon tai miten usein mitattava asia ilmenee, mutta myös miksi asia ilmenee niin kuin se tutkimuksessa tekee (Vilka 2021). Saadut numeeriset tulokset esitetään taulukoiden sijaan graafisten kuvaajien avulla, jotta ne olisivat selkeästi näkyvillä ja helposti tulkittavissa. Kuvassa 22 on esitetty määrällisen tutkimuksen eri vaiheet kohti tutkimuksen valmistamista.



Kuva 22. Määrällisen tutkimuksen vaiheet (mukaillen Vilka 2021)

6.1 Tutkimusmenetelmä

Kvantitatiivista tutkimusta voidaan kuvata prosessina, joka jaetaan selkeisiin vaiheisiin. Kvantitatiivisen tutkimuksen lähtökohtana on tutkimusongelma, johon prosessin aikana haetaan ratkaisua tai vastausta. Tutkimusongelman ratkaisuun tarvitaan tutkimuskysymyksiä. Kysymyksiä voidaan pitää ikään kuin mittareina, jonka avulla tutkimuksen kohteena olevaa ilmiötä arvioidaan. (Kananen 2011, 20–21.) Kysymysten laadintaan tulee käyttää aikaa ja huolellisuutta. On monia tapoja kysyä samaa asiaa, mutta kysymyksen muoto vaikuttaa prosessin kulkuun. Kysymyksen tarkalla asetelulla voidaan myös välttää mahdollisia virhetulkintoja. (Kananen 2011, 20–12; Vilka 2021.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa selvitettävää tutkimusongelmaa tutkitaan otoksen avulla. Otoksen valinta on tärkeä osa tutkimusprosessia, koska otoksen on tarkoitus olla kaikilta ominaisuuksiltaan pienoismalli koko perusjoukosta. Mikäli valittu otos ei vastaa perusjoukkoa, tutkimuksen tulokset ovat virheellisiä. Otoksen suhteen valinnassa harvoin päästään täydelliseen lopputulokseen, koska kriteereitä ja muuttujia otokselle on paljon. (Kananen 2011, 22.)

Kvantitatiiviseen tutkimukseen kuuluu työn luotettavuuden ja laadun arviointi. Sitä selvitetään reliabiliteetin ja validiteetin avulla. Validiteetilla tarkoitetaan tutkimusongelman kannalta oikeiden asioiden mittaamista ja tutkimista. Reliabiliteetti tarkoittaa tutkimustulosten pysyvyyttä, eli tutkimustulosten pysymisen samoina, vaikka samoja tuloksia mitattaisiin eri kerroilla ja eri henkilöiden toimesta. (Kananen 2011, 118; Valli 2015, 13.)

6.2 Verifiointin lähtökohdat

SataDiagin hematologian laboratoriossa oli Cellavision DM1200 digitaalimikroskoopin verifiointin aikaan käytössä kaksi Sysmex XN10 analysaattoria ja yksi Sysmex XN20 analysaattori. Laitteiden mitaustoiminnot perustuivat punasolujen ja trombosyyttien osalta impedanssimittaukseen, hemoglobiinin osalta fotometriseen mittaukseen, hematokriitin osalta kumulatiiviseen pulssinkorkeusmittaukseen ja leukosyyttien kokonaismäärän ja automaattisen leukosyyttien erittelylaskennan osalta virtaussytometriseen partikkelilaskentaan. Mikäli analysaattori havaitsi näytteessä jotain poikkeavaa esimerkiksi leukosyyttien morfologiassa ja jokin asetettu verifiointisääntö aktivoitui, näytteestä valmistettiin sivelyvalmisteet ja leukosyyttien erittelylaskennan tulos vastattiin valomikroskopian avulla tehdyn erittelylaskennan perusteella. (Satadiag 2023a.)

Manuaalista erittelylaskentaa varten hematologian laboratorion löytyi kaksi valomikroskooppia; Nikon Eclipse Ci ja Olympus BX51, jossa on opiskelijahoitukseen ja perehdytykseen apuna rinnakkaiset okulaarit. Työpisteestä löytyi myös Leitz Laborlux 12 mikroskooppi, jonka pääasiallinen käyttö on trombosyyttien natiivinäytetutkimuksessa. Mikroskooppiseen tarkasteluun päätyvät näytteet värjätettiin Mirastainer II värjäysautomaatilla. (Satadiag 2023b.) Työpisteeseen on sijoitettu myös uusi Cellavision DM1200 digitaalimikroskooppi.

6.3 Aineiston keruu

Tarvittava näyteaineisto verifiointin menetelmävertailuosiin toteuttamiseksi kerättiin SataDiag:in hematologian laboratorioon saapuneista potilasnäytteistä. Verifiointisuunnitelmassa määritelty näytemäärä oli vähintään 60 kappaletta, joista vähintään 40 näytettä olivat verenkvaltaan patologisia ja 20 verenkvaltaan terveen potilaan näytteitä. Verifiointiin sopivia näytteitä valikoitiin joulukuun 2021-helmikuun 2022 välisenä aikana. Potilaiden henkilötietoja ei otettu ylös, vaan näytteet kulkivat ennalta määrätyillä verifiointitunnisteilla.

Näytteitä kerättiin lopulta 69 kappaletta menetelmävertailua varten. Aineistoon kerättiin solumorfologialtaan mahdollisimman erilaisia näytteitä. Kerätyistä aineistosta kolmea näytettä CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppi ei pystynyt tulkitsemaan, joten ne jätettiin verifiointin ulkopuolelle. Aineistoksi muodostui lopulta 66 näytettä.

Verifiointisuunnitelmaan kuului myös toistuvuuden määrittäminen parinäytteiden avulla. Aineisto toistuvuuden testaamiseen kerättiin elokuun 2022 aikana. Verifiointisuunnitelmassa tavoitteena oli tehdä toistuvuusmääritykset kymmenellä näytteellä parinäytteinä. Näytteitä valittiin satunnaisotannalla SataDiag:in hematologialle saapuneista näytteistä. Potilaiden henkilötietoja ei tässä otettu ylös, vaan näytteet nimettiin verifiointitunnuksella. Näytteitä valittiin yhteensä kymmenen kappaletta.

6.4 Verifiointin toteuttaminen

Verifiointia varten kaikista verifiointiin valikoiduista näytteistä valmistettiin laadukkaat sivelyvalmisteet objektilaseille. Jokaisesta näytteestä valmistettiin kaksi sivelyvalmistetta. Objektilaseina oli CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppiin sopivat Sysmex SP-slides lasit. Sivelyvalmisteet värjättiin May-Grunwald-Giemsan värjäyksellä Mirastainer II värjäysautomaatilla.

Menetelmävertailu toteutettiin tulostasovertailun avulla. Tulostasovertailussa 20 potilaan näytteet olivat niin sanotusti terveiden potilaiden näytteitä. Tulostasovertailussa toinen värjätty sivelyvalmiste asetettiin analysoitavaksi CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppiin. CellaVision DM1200 kuvasi 230 leukosyyttiä ja niistä valmistui käyttöohjelmiston tekemä esiluokittelu. Esiluokittelu tarkastettiin ja tarvittaessa siihen tehtiin muokkauksia soluista otettujen kuvien perusteella. Käyttöohjelmisto lasi saaduista tuloksista automaattisesti prosentuaaliset osuudet. Toinen lasi tutkittiin valomikroskoopin avulla. Valomikroskooppisesti tarkastellusta sivelyvalmisteesta laskettiin 200 leukosyyttiä, ja tuloksista muodostettiin prosentuaaliset osuudet vastaamaan digitaalimikroskoopin avulla saatuja tuloksia.

Kaikki saadut tulokset kirjattiin Rümken taulukkoon Microsoft Excel taulukko-ohjelmaan. Tulosten vieminen Rümken taulukkoon mahdollistaa selvittämään kuinka yhteneväisiä rinnakkain määritetyt tulokset ovat. C.L. Rümken tekemän tutkimuksen mukaan tarkka ja oikea leukosyyttien erittelylaskennan tulos saadaan 9,93 % kerroista mikroskooppisella tarkastelulla. Rümken taulukko 3 (kuva 19) näyttää rajat hyväksytyille tuloksille, jos 95 % luottamusväliä käytetään. Rajat tiivistyvät mitä enemmän soluja otetaan mukaan erittelylaskentaan. Rümken mukaan tulosten variaatioon ei voida vaikuttaa edes erityisen huolellisella erittelylaskennalla, vaan variaatio johtuu näytteen ominaisuuksista. (Rümke 1977, 41.) Rümken taulukossa Microsoft Excel taulukko-ohjelmassa jokaisella tutkittavalla solulinjalla on oma välilehtensä, joihin saadut arvot lisättiin. Taulukko näytti, onko CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla saadut tulokset 95 % luottamusväliä verrattuna manuaalimikroskopian kautta saatuihin tuloksiin. Rümken taulukon Microsoft Excel-versiossa hyväksymisrajat ovat hieman tiukemmat kuin liitteessä olevassa taulukossa, mikä korostuu manuaalimikroskopiassa löytyneiden yksittäisten solujen kohdalla. Hyväksymisrajaksi jokaiselle solulinjalle oli taulukkoon asetettu 80 %, eli 80 % saaduista tuloksista tuli asettua 95 % luottamusvälille. Tämä hyväksymisraja ei ollut kuitenkaan ehtona verifiointin hyväksymiselle.

Table III
95%-CONFIDENCE LIMITS for various percentages of blood cells of a given type as determined by differential counts.

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000
0	0- 4	0- 2	0- 1	0- 1
1	0- 6	0- 4	0- 3	0- 2
2	0- 8	0- 6	0- 4	1- 4
3	0- 9	1- 7	1- 5	2- 5
4	1- 10	1- 8	2- 7	2- 6
5	1- 12	2- 10	3- 8	3- 7
6	2- 13	3- 11	4- 9	4- 8
7	2- 14	3- 12	4- 10	5- 9
8	3- 16	4- 13	5- 11	6- 10
9	4- 17	5- 14	6- 12	7- 11
10	4- 18	6- 16	7- 13	8- 13
15	8- 24	10- 21	11- 19	12- 18
20	12- 30	14- 27	16- 24	17- 23
25	16- 35	19- 32	21- 30	22- 28
30	21- 40	23- 37	26- 35	27- 33
35	25- 46	28- 43	30- 40	32- 39
40	30- 51	33- 48	35- 45	36- 44
45	35- 56	37- 53	40- 50	41- 49
50	39- 61	42- 58	45- 55	48- 54
55	44- 65	47- 63	50- 60	51- 59
60	49- 70	52- 67	55- 65	56- 64
65	54- 75	57- 72	60- 70	61- 68
70	60- 79	63- 77	65- 74	67- 73
75	65- 84	68- 81	70- 79	72- 78
80	70- 88	73- 86	76- 84	77- 83
85	76- 92	79- 90	81- 89	82- 88
90	82- 96	84- 94	87- 93	87- 92
91	83- 96	86- 95	88- 94	89- 93
92	84- 97	87- 96	89- 95	90- 94
93	86- 98	88- 97	90- 96	91- 95
94	87- 98	89- 97	91- 96	92- 96
95	88- 98	90- 98	92- 97	93- 97
96	90- 99	92- 99	93- 98	94- 98
97	91-100	93- 99	95- 99	95- 98
98	92-100	94-100	96-100	96- 99
99	94-100	96-100	97-100	98-100
100	96-100	98-100	99-100	99-100

n is the total number of cells counted, a the observed percentage of cells of the given type, 0 and 100 confidence limits are to be interpreted as nearly 0 and nearly 100.

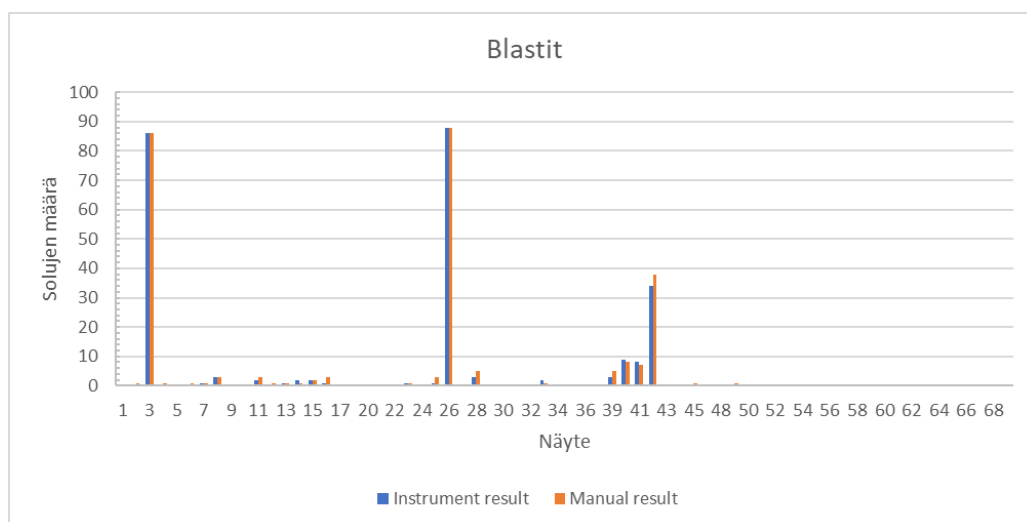
Kuva 23. Rümken taulukon 95 % luottamusvälit (Rümke 1977, 42)

Tuloksista laskettavia parametrejä olivat keskiarvo (KA), keskihajonta (s) ja variaatiokerroin. Keskiarvo ilmoittaa muuttujan jakauman keskikohdan. Keskihajonta mittaa miten havaintoarvot sijoittuvat muuttujan jakauman keskiarvon ympärille. Variaatiokertoimesta käytetään myös termiä variaatioprosentti (CV%). Variaatioprosentti kuvaa keskiarvoon suhteutettua hajontaa. (Tilastokeskus julkaisuaika tuntematon.) Saaduista variaatioprosenteista laskettiin myös variaatioprosenttien keskiarvo (CV% KA). Kaikki tilastollinen analyysi suoritettiin Microsoft Excel taulukko-ohjelman avulla valmiiden laskentatoimintojen kautta.

7 TULOKSET

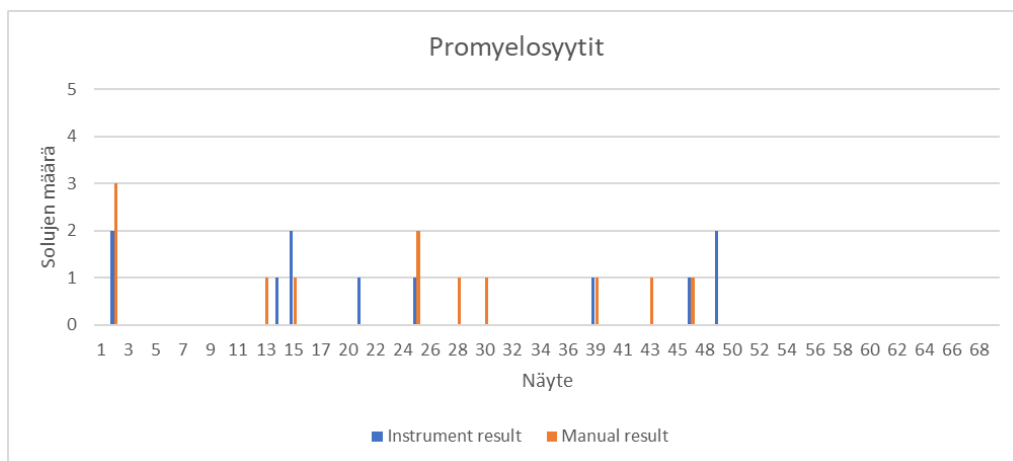
7.1 Menetelmävertailun tulokset

Pylväsdiagrammit (kuvat 24–36) ovat muodostettu tulosten perusteella Microsoft Excel taulukko-ohjelmalla. Kuvissa 24–33 pylväsdiagrammien X-akselilla olevat numerot ovat näytenumeroita, ja Y-akselilla on kyseessä olevien solujen määrä näytteessä. Sininen palkki (Instrumental result) kuvaa CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla saatua tulosta ja punainen palkki (Manual result) valomikroskoopilla mikroskopoidun rinnakkaisen sivelyvalmisteen tulosta. Lopuksi tuloksista on muodostettu mittaustulosten yhteenvetotaulukko (kuva 34).



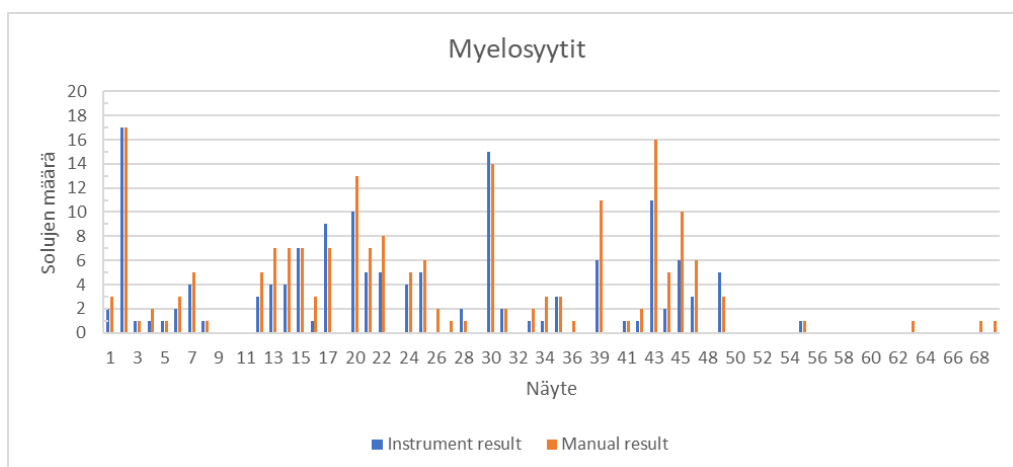
Kuva 24. Blastien määrä verifointinäytteissä

Blastien tunnistus digitaalimikroskoopilla vastasi hyvin valomikroskopiaa (kuva 24). Tulosten hajonta oli eri menetelmien välillä pientä, eikä merkittäviä eroja blastien luokittelussa muodostunut. Hyväksyttömät tulokset johtuivat joko yksittäisen blastin löytymisestä valomikroskooppilla ja CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla blastia ei havaittu, tai tulosten pyöristämisestä johtuvasta 95 %-luottamusvälin saavuttamattomuudesta.



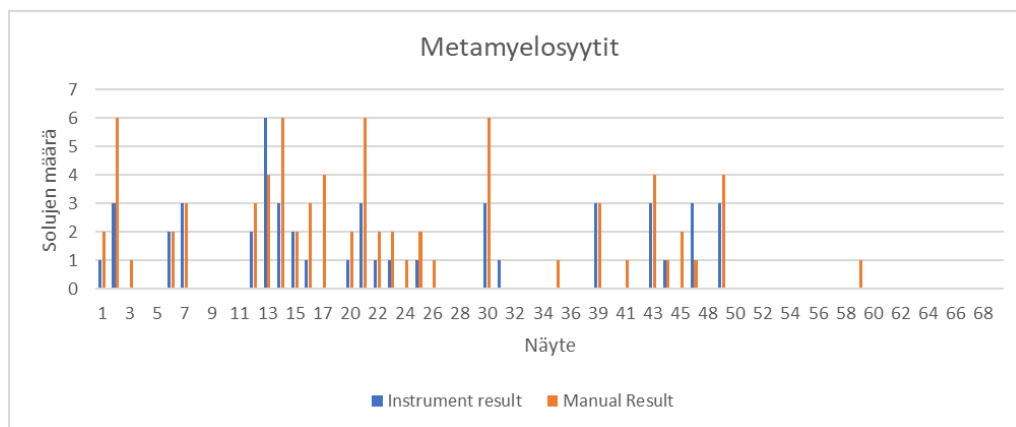
Kuva 25. Promyelosyyttien määrä verifiointinäytteissä

Verifiointinäytteissä promyelosyyttien määrä oli vähäinen, mikä näkyy kuvassa 25. Solujen tunnistus eri menetelmillä vastasi toisiaan. Eroja tuloksiin tuli joko yksittäisen promyelosyytin löytymisestä valomikroskopiassa, kun digitaalimikroskopian avulla ei promyelosyyttejä löytynyt, tai digitaalimikroskopian avulla löytyneistä kahdesta promyelosyytistä ja manuaalimikroskooppisessa tarkastelussa promyelosyyttejä ei löydetty.



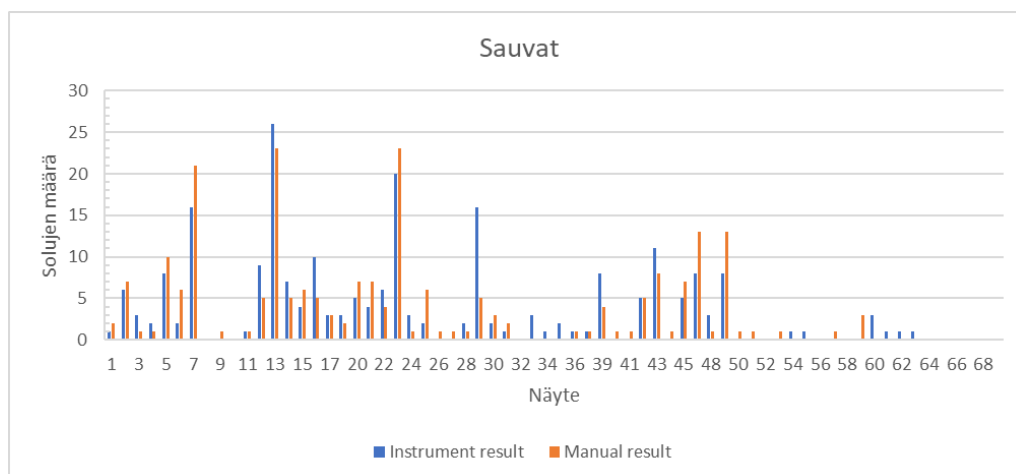
Kuva 26. Myelosyyttien määrä verifiointinäytteissä

Myelosyyttien tunnistus eri menetelmillä vastasi toisiaan. Myelosyyttejä löytyi verifiointinäytteistä runsaasti (kuva 26). Rümken taulukon mukaan hyväksymättömistä vertailuista kuudessa näytteessä oli löytynyt yksittäinen myelosyytti valomikroskopian avulla, kun digitaalimikroskopiolla myelosyyttejä ei havaittu. Muissa hyväksymättömissä tulosvertailuissa valomikroskopian avulla oli löytynyt enemmän myelosyyttejä kuin CellaVisionilla tutkituissa näytteissä.



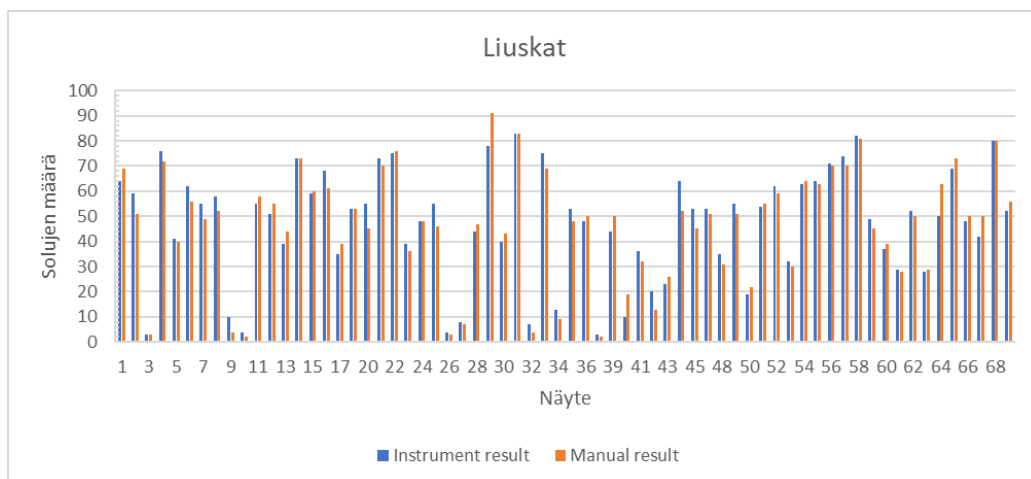
Kuva 27. Metamyelosyyttien määrä verifointinäytteissä

Metamyelosyyttien määrä verifointinäytteissä näkyy kuvassa 27. Metamyelosyyttien tunnistuksessa menetelmät vastasivat toisiaan, hyväksytyjä tuloksia oli Rümken taulukon mukaan 53 kappaletta 66:sta. Kuusi hyväksymätöntä vertailua aiheutui valomikroskopian avulla löytyneistä yksittäisistä metamyelosyytistä, kun taas digitaalimikroskopian avulla soluja ei löytynyt tai prosentuaalisesti määrä jäi alle 0,5 jolloin tulos pyöristyi 0. Loput hyväksymättömät tulokset aiheutuivat siitä, että valomikroskoopissa tutkituista näytteistä löytyi enemmän metamyelosyyttejä kuin CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla tutkituista näytteistä.



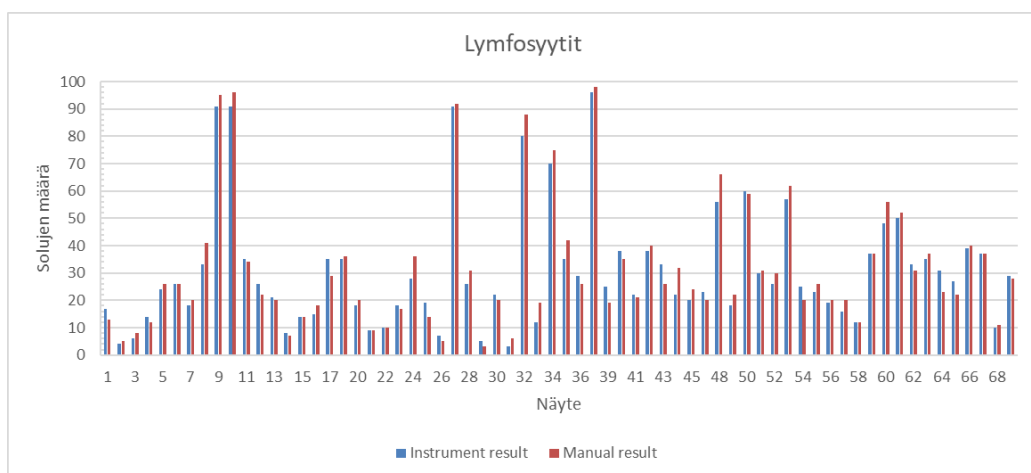
Kuva 28. Sauvatumaisten neutrofiilien määrä verifointinäytteissä

Sauvatumaisten neutrofiilien kohdalla hyväksytyjä tuloksia oli Rümken taulukon mukaan 47 kappaletta 66:sta. Kuuden näytteen kohdalla hyväksymättömyys aiheutui yksittäisen sauvatumaisten neutrofiilin löytymisestä valomikroskopian avulla, kun taas digitaalimikroskopian avulla niitä ei havaittu, tai prosentuaalinen määrä jäi alle 0,5 %, jolloin tulos pyöristyi 0. Muissa hyväksymättömissä tuloksissa ei ollut havaittavissa systemaattista poikkeavuutta menetelmien välillä. Tulostasokerot selittyvät normaalilla tulostason hajonnalla, lisäksi sauvatumaisten neutrofiilien tunnistuksessa tulee ottaa huomioon niin sanottu käsialaan liittyvä tulkinnan vaihtelevuus. Sauvatumaisten neutrofiilien määrä verifointinäytteissä näkyy kuvassa 28.



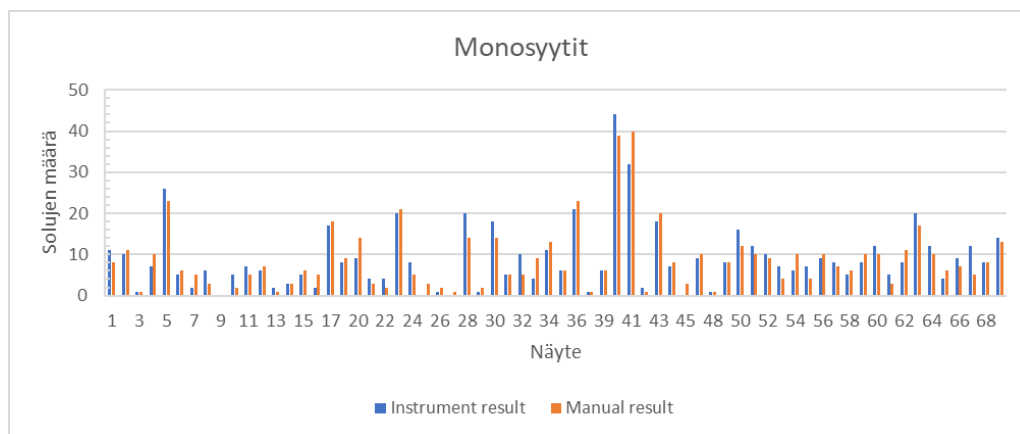
Kuva 29. Liuskatumaisten neutrofiilien määrä verifiointinäytteissä

Liuskatumaisten neutrofiilien erittelylaskennassa hyväksytyjä tuloksia oli Rümken taulukon mukaan 50 kappaletta 66:sta. Monessa näytteessä liuskatumaisten neutrofiilien määrä oli iso, ja saatujen tulosten erot selittyvät normaalilla tulostason vaihtelulla. Tuloksissa ei ole havaittavissa systemaattista poikkeavuutta menetelmien välillä. Liuskatumaisten neutrofiilien määrät verifiointinäytteissä näkyy kuvassa 29.



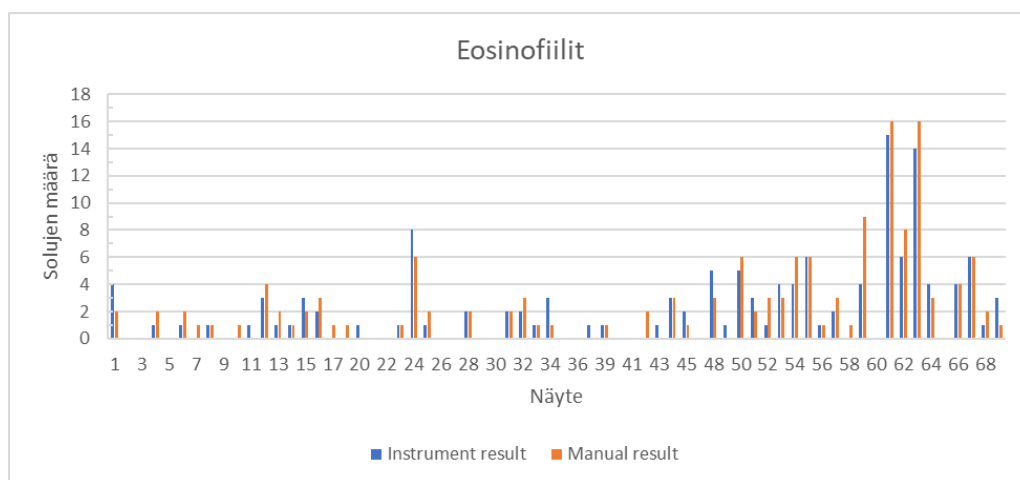
Kuva 30. Lymfosyyttien määrä verifiointinäytteissä

Lymfosyyttejä löytyi kaikista verifiointinäytteistä (kuva 30). Lymfosyyttien erittelylaskennat eri menetelmillä vastasivat hyvin toisiaan, hyväksytyjä tuloksia Rümken taulukon mukaan oli 52 kappaletta 66:sta. Kaksi hyväksymätöntä tulosta johtui arvojen pyöristämisestä tasalukuun taulukkoa varten, muut erot selittyvät normaalilla tulostason vaihtelulla. Lymfosyyteistä annetut lausunnot, jotka kuvaavat reaktiivisten tai atyyppisten solujen määrää, täsmäsivät hyvin eri menetelmien avulla annetuissa vastauksissa.



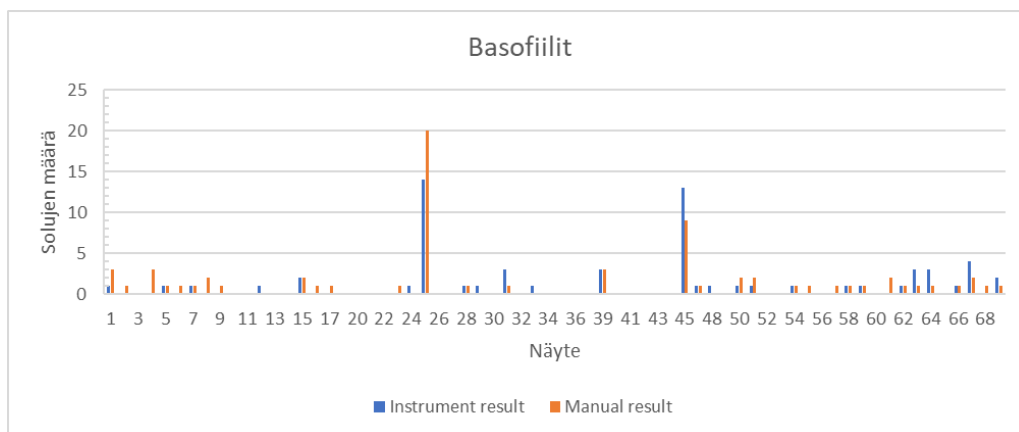
Kuva 31. Monosyyttien määrä verifiointinäytteissä

Monosyyttien tunnistuksessa yhteneväisiä tuloksia oli Rümken taulukossa 52 kappaletta 66:sta (kuva 31). Monosyyttien laskentaan vaikuttaa se, että ne sijaitsevat usein lähellä toisiaan sivelyvalmistees- sa, ja sivelyvalmisteen vedosta riippuen voivat päätyä valmisteen reunoille tai ohueen päähän, jol- loin leukosyyttien erittelylaskennassa voi tulla isojakin eroavaisuuksia riippuen tarkasteltavasta koh- dasta. Tuloksissa ei ollut havaittavissa systemaattista poikkeavuutta menetelmien välillä.



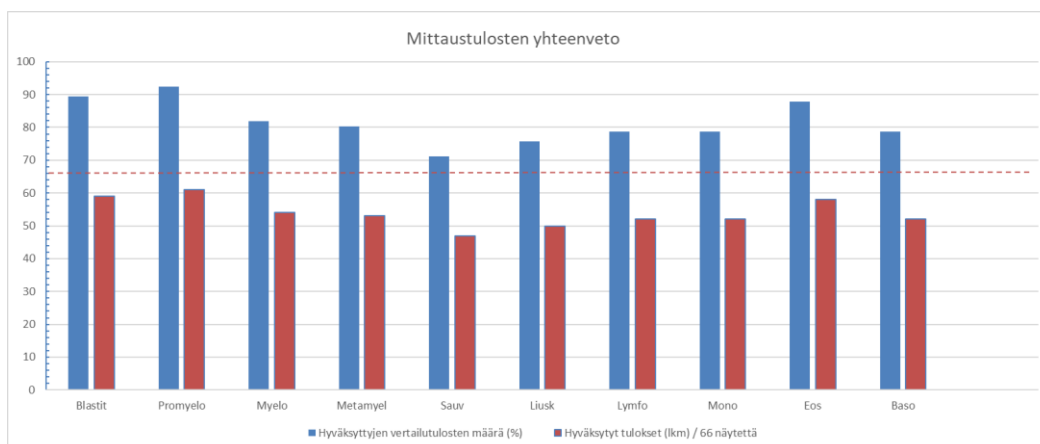
Kuva 32. Eosinofiilien määrä verifiointinäytteissä

Eosinofiilien kohdalla menetelmävertailussa ei havaittu isoja eroja menetelmien välillä (kuva 32), Rümken taulukon mukaan hyväksytyjä tuloksia oli 58 kappaletta 66:sta. Suurin osa hyväksymättö- mistä tulosvertailuista johtui yksittäisen eosinofiilin löytymisestä valomikroskopian avulla, kun digi- taalimikroskopian avulla niitä ei löytynyt tai prosentuaalinen määrä jäi alle 0,5 %, jolloin tulos pyö- risti 0.



Kuva 33. Basofiilien määrä verifointinäytteissä

Basofiileja oli verifointinäytteissä vähän, poikkeuksena 2 näytettä (kuva 33). Basofiilien tulosta-sovertailussa tulokset olivat yhteneväisiä, hyväksytyjä tuloksia oli 52 kappaletta 66:sta. Suurin osa hyväksymättömistä vertailutuloksista johtui yksittäisten basofiilien löytymisestä manuaalimikroskooppisessa tarkastelussa, kun CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla niitä ei löytynyt tai prosentuaalinen määrä oli alle 0,5 %, jolloin tulos pyöristyi 0.



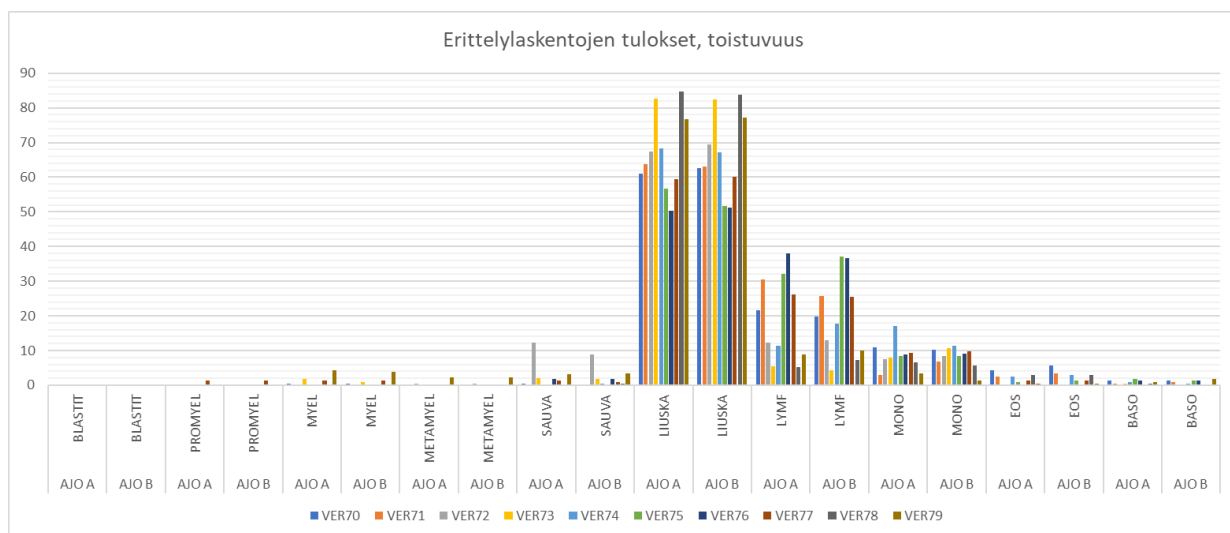
Kuva 34. Mittaustulosten yhteenveto

Mittaustulosten yhteenvetodiagrammissa (kuva 34) sinisellä palkilla on merkitty hyväksytyjen vertailutulosten määrä prosentuaalisesti ja punaisella palkilla hyväksytyjen tulosten lukumäärä. Punainen katkoviiva havainnollistaa verifointinäytteiden kokonaismäärän eli 66 kappaletta.

7.2 Toistuvuusmääritysten tulokset

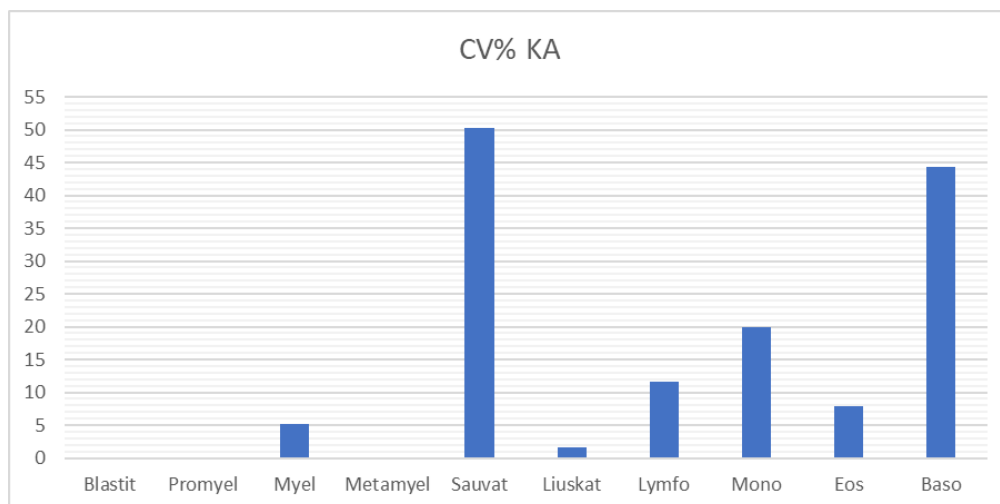
Toistuvuutta testattiin parinäytteiden analysoinnilla. Tähän verifointiin valittiin satunnaisotannalla 10 näytettä, joista tehty sama sivelyvalmiste analysoitiin kaksi kertaa CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla. Kuvassa 35 A ja B kuvaavat rinnakkaisia erittelylaskentoja CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla. Näytteet tähän verifointiosuuteen merkattiin numeroinnilla VER70-VER79. Veri-

fointiin valituista näytteistä ei löytynyt blasteja, ja vain yhdessä näytteessä oli promyelosyyttejä. Muita soluryhmän soluja havaittiin kahdessa tai useammassa näytteessä.



Kuva 35. Erittelylaskentojen tulokset, toistuvuus

Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti. Analysoiduista parametreistä saaduista variaatioprosenteista laskettiin myös variaatioprosenttien keskiarvo. Kuvassa 36 on näkyvillä variaatioprosenttien keskiarvot eri soluryhmissä.



Kuva 36. Variaatioprosenttien keskiarvot

Korkea variaatioprosentin keskiarvo sauvatumaisten neutrofiilien kohdalla muodostui siitä, että sauvatumaisia neutrofiileja oli verifointinäytteissä vain vähän, ja solumäärän pienikin hajonta vaikuttaa CV% KA arvoon. Saatuun sauvatumaisten neutrofiilien lukumäärään saattaa vaikuttaa niin sanottu käsialaan liittyvä tulkinnan vaihtelevuus. Verifointinäytteissä oli löydettävissä vain muutamia basofi-

leja, ja myös basofiilien kohdalla korkeaa CV% KA arvoa selittää yksittäisten basofiilien merkitys arvoon.

8 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

8.1 Tulosten tarkastelu

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida uusi menetelmä perifeerisen veren sivelyvalmisteen leukosyyttien erittelylaskentaan käyttäen CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia SataDiag:in hematologian laboratorioon. Verifiointiprosessin aikana selvitettiin, että ovatko CellaVision DM1200 -laitteen avulla määritetyt leukosyyttien erittelylaskennat tulokset luotettavia ja vastaavatko ne manuaalimikroskopoinnin tuloksia. Tutkimuskysymyksinä tässä opinnäytetyössä oli: 1. Miten vertailukelpoisia olivat digitaalimikroskoopin avulla määritetyt perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentojen tulokset valomikroskoopin avulla määritettyjen perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennan tuloksiin nähden? 2. Kuinka hyvin samasta näytteestä määritettyjen rinnakkaisten perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentojen tulokset vastaavat toisiaan käyttäen digitaalimikroskooppia?

Verifiointisuunnitelman mukaan toteutetuissa leukosyyttien erittelylaskennoissa tulokset olivat vertailukelpoisia, ja menetelmä voitiin hyväksyä käyttöön. Tulosten eroavaisuudet johtuivat suurimmalta osin näytteiden ominaisuuksista ja normaaleista vaihteluväleistä. Rümken (1977, 41) mukaan mikroskooppisessa perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennassa vain alle 10 % tuloksista on oikeita ja tarkkoja. Lee ym. (2013) ovat vertailleet CellaVision DM96 digitaalimikroskoopin ja valomikroskoopin kautta tutkittuja perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentojen tuloksia 359 näytteestä. Heidän tutkimuksessaan ilmeni, että CellaVision DM96 digitaalimikroskoopin avulla määritetyt tulokset vastasivat luotettavasti valomikroskoopin avulla määritettyjä tuloksia. Tutkimuksessa todettiin, että CellaVision DM96 soveltuu kliiniseen käyttöön. Aikaisempaa tutkimusta aiheesta ovat tehneet Rollins-Raval, Raval ja Contis (2012), jossa päädyttiin myös CellaVision DM96 digitaalimikroskoopin soveltuvan kliinisiin laboratorioihin perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentaan.

Opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä laatua perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskentaan käyttämällä CellaVision DM1200 digitaalimikroskooppia. Digitaalimikroskoopin avulla erittelylaskennan suorittaminen vakiintui, ja käyttäjästä riippuvaiset tekijät, kuten sivelyvalmisteesta tarkasteltavan kohdan paksuus ja laskettujen solujen määrä, väheni. Verifiointiprosessin yhteydessä myös solujen morfologiaa koskevia lausuntoja tarkasteltiin, ja laadun lisäämiseksi vakiolausuntoja lisättiin ja yhtenäistettiin. Brereton ym. (2015) tutkimuksessa havaittiin erityisesti morfologialtaan monimutkaisemmissa näytteissä osallistujien käyttäneen runsaasti erilaisia vakiokommentteja. Näissä näytteissä nimenomaan erikoispiirteiden priorisoinnin tärkeys nousee esille. (Brereton 2015, 1224–1225) Koska CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla eri soluryhmät saadaan rinnakkaisiin näkymiin tietokoneen näytölle, solujen morfologian muutoksia pystytään entistä tehokkaammin ja tarkemmin tunnistamaan. Tämä mahdollistaa laadukkaan tutkimuksen suorittamisen. Muita laatuun vaikuttavia tekijöitä CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin käyttöönotossa on ohjelmiston kautta tuleva solukirjasto, josta saa näkyville referenssisolukuvat jokaisesta soluryhmästä. Myös sisäisten laaduntarkkailukierrosten tekeminen Proficiency Softwaren kautta auttaa ylläpitämään osaamista ja selvittämään mahdollisia lisäpohdintatarpeita.

Menetelmävertailussa tulostasovertailun tulokset esitettiin Rümken taulukossa. Rümken taulukossa hyväksymisrajat on laskettu 95 % luottamustasolla. Rümken taulukon Microsoft Excel-ohjelmassa parametrikohtaisiksi hyväksymisrajaksi on asetettu 80 %, eli 80 % saaduista tuloksista tulee olla hyväksytyjä. Tämä raja ei kuitenkaan ollut mainittuna verifiointin hyväksymisen ehtona. Lopullisen päätöksen verifiointitulosten hyväksymisestä teki laboratorion ylilääkäri.

Tulostasovertailun tuloksissa ei havaittu systemaattista poikkeavuutta menetelmien välillä. Rümken taulukon Microsoft Excel-ohjelmistoversion vaatima tulosten pyöristäminen kokonaislukuihin muutti varsinkin matalia tuloksia niin, ettei pyöristetty tulos ollut enää 95 % luottamustasolla. Rümken taulukossa yksittäisen solun löytyminen valomikroskooppisessa tarkastelussa edellytti myös yksittäisen solun löytymiseen digitaalisessa tarkastelussa hyväksytyt vertailutulokset saamiseen. Hyväksytyt tulokset saavutettiin kuitenkin, vaikka yksittäinen solu löytyi digitaalimikroskooppisessa tarkastelussa ja valomikroskoopin avulla sivelyvalmisteesta sitä ei löydetty.

Toistuvuutta tarkastellessa verifiointinäytteistä määritettiin rinnakkaiset ajot CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopilla. Tuloksia analysoitiin tilastollisin tavoin määrittämällä niistä keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti. Saaduista variaatioprosenteista laskettiin myös variaatioprosenttien keskiarvo. Verifiointissa ei havaittu kliinisesti merkittäviä eroja ja tulosten eroavuudet selittyivät normaalilla tulostason hajonnalla.

Leukosyyttien erittelylaskennassa sivelyvalmisteesta on monta mahdollista tekijää, mitkä voivat vaikuttaa lopputulokseen. Näitä ovat muun muassa sivelyvalmisteen tutkittava kohta, sivelyvalmisteen laatu ja solujen jakautuminen lasilla. Sivelyvalmisteen tulkinnassa myös mikroskopijan ammattitaito ja oma käsiala vaikuttaa lopputulokseen. Horiuchi ym. ovat tutkineet vuonna 2011 CellaVision Competence Software laadunarviointiohjelman käytettävyyttä leukosyyttien erittelylaskennan laadunarvioinnissa sekä laboratoriohoitajien ammatillisessa kehittämisessä. Tulokset osoittivat ohjelmiston sopivan sekä laadunarviointiin että kouluttamiseen. (Horiuchi ym. 2011.) Horiuchi ym. tekivät jatkok tutkimuksen vuonna 2015, jossa todettiin, että CellaVision Competence Softwaren ja sen käytön tueksi kehitetty e-learning -ohjelman käyttö paransi heikosti kokemusta omaavien laboratoriohoitajien erittelylaskennan tuloksia vähemmän haastavissa näytteissä. Tulokset eivät olleet yhtä merkittäviä haastavammassa näytteissä. Paljon kokemusta omaavilla työntekijöillä oli parhaimmat tulokset. (Horiuchi 2016.) Myös Soppa (2021, 68) on opinnäytetyössään kertonut, että digitaalisten ratkaisuiden, kuten CellaVision-ohjelmistojen, hyödyntäminen toisi tuloksia laadunparantamisessa ja mahdollistaa laadunarviointia laboratorion ja henkilökunnan fyysisestä sijainnista riippumatta.

Valomikroskoopissa analysoitua näytettä tulee tutkia yleensä enemmän kuin 200 laskettua solua, jolloin yksittäisen tietyn solulinjan solun löytäminen on todennäköisempää. Esimerkiksi yhden blastin löytäminen ja sen vastaaminen edellyttää yleensä myös toisen blastin etsimistä ja löytämistä. Tällöin tulee käytyä läpi 500–1000 solua, riippuen näytteestä. CellaVision DM1200 laite on asetettu ottamaan kuvia 230 tumallisesta solusta. Näiden kuvien perusteella määritetään leukosyyttien erittelylaskenta. Mikäli digitaalimikroskoopin avulla luotettavaa analyysiä valkosolujen erittelylaskennasta ei saada, tai halutaan varmistaa solujen morfologiaa, näytettä on aina mahdollisuus arvioida valomikroskoopissa.

8.2 Opinnäytetyön luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyön kaikissa vaiheissa tulee ottaa huomioon hyvän tieteellisen käytännön periaatteet. Peruseriaatteet hyvässä tieteellisessä käytännössä ovat eurooppalaisen tutkimuseettisen ohjeistuksen mukaan vastuunkanto, arvostus, luotettavuus ja rehellisyys (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 11). Opinnäytetyön tutkimussuunnitelma tehtiin huolellisuutta käyttäen ennen opinnäytetyön aloittamista. Opinnäytetyön tekemiseen haettiin tutkimuslupa SataDiag:lta. Opinnäytetyössä pyrittiin esittämään vain vaadittavat SataDiag:ia koskevat tiedot, koska osa asioista kuului laboratorion sisäisiin tietoihin. Tästä syystä esimerkiksi laadittua verifiointisuunnitelmaa tai verifiointiraporttia ei julkaista osana julkisesta tietokannasta löytyvää opinnäytetyötä.

Opinnäytetyöhön käytetyt lähteet ja niiden sisäinen laatu vaikuttaa opinnäytetyön laatuun ja luotettavuuteen. Lähdekritiikin kautta tutkitaan lähteen laatua ja soveltuvuutta opinnäytetyön (Vilka 2021.) Tässä opinnäytetyössä pyrittiin käyttämään mahdollisimman tuoreita lähteitä. Lähdekritiikkiin kiinnitettiin huomiota, ja opinnäytetyöhön valittiin tarkasti sopivat lähteet. Työssä on käytetty muutamia vanhempia lähteitä, koska samaa tietoa ei ole ollut saatavilla tuoreemmista lähteistä. Opinnäytetyöhön käytettyjen lähteiden etsintään käytettiin erilaisia tietokantoja, kuten PubMed, Google Scholar ja Finna. Lähteitä pyrittiin valitsemaan monipuolisesti ja työssä pyrittiin hyödyntämään myös kansainvälisiä tutkimuksia.

Opinnäytetyön aineistoon käytettiin suunnitelmallista aineiston elinkaari -ajattelua. Vilkan (2021) mukaan aineiston elinkaari koostuu suunnitteluvaiheesta, käsittelyvaiheesta ja säilyttämisestä. Verifiointia varten tarvittavia näytteitä kerättiin SataDiag:iin tulleista potilasnäytteistä. Näytteitä kerättiin vain verifiointisuunnitelmassa vaadittaviin osioihin. Kerätyistä näytteistä henkilötietoja ei otettu missään vaiheessa ylös, ja näytteistä valmistetut sivelyvalmisteet kulkivat juoksevilla verifiointinumeroilla. Verifiointin aikana näytteistä määritetyt leukosyyttien erittelylaskennan tulokset tallennettiin Rümken taulukkoon Microsoft Excel -taulukko-ohjelmaan. Verifiointin hyväksymisen jälkeen sivelyvalmisteet hävitettiin.

Mäkisen (2006, 102) mukaan tutkimustulosten luotettavuuden ja yleistettävyyden selvittäminen on tutkimuksen tärkeimpiä eettisiä periaatteita. Tutkijan tulisi aktiivisesti koetella tutkimuksen luotettavuutta ja etsi mahdollisia virhelähteitä. (Mäkinen 2006, 102.) Tutkimuksen luotettavuutta voidaan käsitellä validiteetin ja reliabiliteetin avulla. Validiteetti merkitsee, että tutkimusongelman kannalta mitataan ja tutkitaan oikeita asioita. Validiteetin määrittämisen yhteydessä tulee pohtia muun muassa yleistettävyyttä, syy-seuraus-suhdetta ja teoreettisten käsitteiden operationalisointia. (Kananen 2011, 118–122.) Verifiointin kautta osoitettiin, että CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla määritetyt perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennat vastaavat referenssimenetelmän eli valomikroskoopin kautta määritettyjä perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennan tuloksia. Verifiointiin valittiin solukuvaltaan sekä normaaleja näytteitä että patologisia näytteitä, jotta valittu otos vastaisi mahdollisimman hyvin todellista perusjoukkoa.

Reliabiliteetti kuvastaa tutkimustulosten pysyvyyttä, eli tutkimustulokset ovat toistettavissa eri tutkimuseroilla (Kananen 2011, 118–119). Tulosten toistuvuutta testattiin analysoimalla näytteitä parimäärityksinä, eli sama näyte tutkittiin kahteen kertaan CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin avulla. Saadut tulokset olivat yhteneväisiä, eikä kliinisesti merkittäviä eroja havaittu.

8.3 Johtopäätökset ja jatkotutkimusehdotukset

Verifiointille asetetut tavoitteet saavutettiin ja verifiointin perusteella perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennan uusi menetelmä hyväksyttiin. Menetelmä otettiin käyttöön rutiinianalytiikassa 14.10.2022. Perehdytykset laitteen ja ohjelmistojen käyttöön toteutettiin laitevalmistajan ja laitteen pääkäyttäjien toimesta.

CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin toiminta tuli hyvin tutuksi verifiointiprosessin aikana. Verifiointien aikana kävin kollegani, hematologian työpisteen vastuuhenkilön ja toisen CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin pääkäyttäjän kanssa hyviä keskusteluja muun muassa solujen rakenteista, tyypillisistä ominaisuuksista ja eri tautitilojen aiheuttamista muutoksista solukuvassa. Kuvien tulkitseminen ja erittelylaskennan tekeminen yhdessä kollegani kanssa vahvisti omaa osaamistani tällä sektorilla. Tämän opinnäytetyön tekemisen aikana opin valtavasti uutta leukosyyttien erittelylaskennasta, solujen tunnistuksesta sekä näihin vaikuttavista tekijöistä.

Leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta on kiinnostanut minua bioanalyttikko-opinnoistani asti, ja yhtenä tavoitteenani on kehittää ammatillista osaamista juuri tällä osa-alueella. Halusin opinnäytetyön aiheen olevan itselleni merkittävä ja työnantajalle hyödyllinen. Keskustelin aiheesta Sata-Diag:n sairaalakemistin kanssa, ja päädyimme yhdessä tähän aiheeseen. Tämä verifiointi kokonaisuudessaan oli kaiken kaikkiaan yksi mielenkiintoisimmista työtehtävistä, johon olen päässyt osallistumaan työurani aikana. Erityisen hienoa oli, että pystyin yhdistämään tähän opinnäytetyön tekemisen. Osaamiseni verifiointiprosessin eri vaiheista, kuten suunnitelman laadinnasta, sen osa-alueiden toteuttamisesta ja verifiointiraportin kirjoittamisesta, kasvoi, ja koen olevani valmiimpi ottamaan vastaan uusia verifiointiin liittyviä työtehtäviä tulevaisuudessa.

Toivoisin tulevaisuudessa pystyväni itse kehittymään edelleen perifeerisen veren leukosyyttien erittelylaskennassa, ja erityisesti ohjaamaan ja tukemaan paremmin opiskelijoita ja perehdytettäviä kollegoita erittelylaskennan haasteissa. CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin ja Proficiency Softwaren avulla hematologian laboratorioon saadaan monia uusia työkaluja erittelylaskennan suorittamiseen ja laadun parantamiseen. Niitä ovat muun muassa referenssisoluista koostuva kuvakirjasto ja sisäisten laadunarviointikierrosten tekeminen. Jatkotutkimusaiheena tulevaisuuteen ehdotan, että selvitettäisiin CellaVision DM1200 digitaalimikroskoopin ja Proficiency Softwaren avulla tehdyn leukosyyttien erittelylaskennan laaduntarkkailukierroksien toimivuutta osaamisen arvioimisessa pidemmällä aikavälillä uusilla ja jo kokeneemmilla leukosyyttien erittelylaskentaa tekeillä työntekijöillä Sata-Diag:ssa.

LÄHTEET

- Arai, Fumio 2018. The regulatory signal for normal and abnormal hematopoiesis. *International Journal of Hematology*. Julkaistu 4.5.2018. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2460-0>. Viitattu 18.10.2022.
- Bain, Barbara 2017. *Leukaemia Diagnosis*. 5. painos. Lontoo: John Wiley and sons.
- Bain, Barbara 2015. *Blood Cells: A Practical Guide*. E-kirja. John Wiley and sons. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/savoniafi/detail.action?docID=1834782>. Viitattu 30.4.2023.
- Bain, Barbara 2004. *A Beginner's Guide to Blood Cells*. 2. painos. E-kirja. John Wiley and sons. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.savonia.fi/lib/savoniafi/reader.action?docID=233065>. Viitattu 28.4.2023.
- Brereton, Michelle, De La Salle, Barbara, Ardern, John, Hyde, Keith & Burthem, John 2015. Do We Know Why We Make Errors in Morphological Diagnosis? An Analysis of Approach and Decision-Making in Haematological Morphology. *EBioMedicine*; *EBioMedicine*.2(9), 1224–1234.
- CellAtlas julkaisuaika tuntematon. Hematopoiesis. Cellavision sovellus.
- Cellavision 2022. CellaVision DM1200. <https://www.cellavision.com/products/analyzers/cellavisionr-dm1200>. Viitattu 2.5.2023.
- CellaVision Concept Brochure 2019. https://www.cellavision.com/sites/default/files/media/file/2022-06/CellaVision-Concept-Brochure_0.pdf. Viitattu. 2.5.2023.
- CellaVision Product Factsheet 2021. <https://www.cellavision.com/sites/default/files/media/file/2023-04/CellaVision%20DM1200.pdf>. Viitattu 2.5.2023.
- Helenius, Mikko 2021. Verifiointi kliinisessä laboratoriossa. <https://www.labconsult.fi/laboratoriolaaketiede/verifiointi-kliinisessa-laboratoriossa/>. Viitattu 3.7.2023.
- Hoffbrand, Viktor & Moss, Paul 2016. *Hoffbrand's essential haematology*. 7. painos. Blackwell: Wiley and sons.
- Horiuchi, Yoki, Tabe, Yoko, Idei, Mayumi, Bengtsson, Hans-Inge, Ishii, Kiyoshi, Horii, Takashi, Miyake, Kazunori, Satoh, Naotake, Miida, Takashi & Oshaka, Akimichi 2011. The use of CellaVision competency software for external quality assessment and continuing professional development. *Journal of Clinical Pathology* 64(7), 610–617.
- Horiuchi, Yoki, Tabe, Yoko, Kasuga, Kanako, Maenou, Imiko, Idei, Mayumi, Horii, Takashi, Miida, Takashi & Ohsaka, Akimichi. 2016. The efficacy of an internet-based e-learning system using the CellaVision Competency Software for continuing professional development. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. *Clin Chem Lab Med* 54(4), 127–131.
- Howard, Martin & Hamilton, Peter 2008. *Haematology*. 3. painos. York: Churchill Livingstone Elsevier.
- Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>. Viitattu 17.5.2023.
- Hänninen, Auli & Mahlamäki, Eija 2003. Kliinisen hematologian tutkimukset. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Porvoo: WSOY, 263–337.
- Kananen, Jorma 2011. *Kvantti. Kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas*. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

- Kananen, Jorma 2015. Opinnäytetyön kirjoittajan opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.
- Konieczny, Joanna & Arranz, Lorena 2018. Updates on Old and Weary Haematopoiesis. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2567/htm>. Viitattu 18.10.2022.
- Kuittinen, Taru & Remes, Kari 2015. Muut lymfositit. Teoksessa Porkka, Kimmo, Lassila, Riitta, Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.) Veritaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 365–369.
- Labquality 2020. Validointi ja verifiointi. https://www.labquality.fi/sote-ammattilaisille/laadukas_vieritutkimus/vieritestisuositus/luotettava_vieritesti/validointi_verifiointi/. Viitattu 13.4.2022.
- Laitinen, Harri 2017. Validointi ja verifiointi tehokkaasti. *Moodi 2/2017*, 33–34.
- Laribi, Kamel, Lemaire, Pierre, Sandrini, Jeremy & de Materre Alix 2017. Advances in the understanding and management of T-cell prolymphocytic leukemia. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.savonia.fi/pmc/articles/PMC5732835/>. Viitattu 25.4.2023.
- Lee, Lik Hang, Mansoor, Adnan, Wood, Brenda, Nelson, Heather, Higa, Diane & Naugler, Christopher 2013. Performance of CellaVision DM96 in leukocyte classification. *Journal of Pathology Informatics* 4 (14). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709426/>. Viitattu 28.11.2023.
- Mahlamäki, Eija 2004. Veren kuvan tutkimukset. Teoksessa Penttilä, Ilkka. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 268–281.
- Matinlauri, Irma & Vilpo, Juhani 2010. Hematopoiesi ja sen tutkiminen. Teoksessa Niemelä, Onni & Pulkki, Kari (toim.) Laboriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandiattikustannus Oy, 247–253.
- Mäkinen, Olli 2006. Tutkimusetiikan ABC. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Nienstedt, Walter, Hänninen, Osmo, Arstila, Antti & Björkqvist, Stig-Eyrik 2014. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18.–19. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Pellat-Deceunynck & Defrance 2015. The origin of the plasma-cell heterogeneity. Teoksessa Pellat-Deceunynck, Catherine & Thierry Defrance. E-kirja. *Frontiers in Immunology*.
- Pelliniemi, Tarja-Terttu 2010. Eosinofilia ja basofilia. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.) Ilmari Palvan Veritaudit. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy, 104–107.
- Pelliniemi, Tarja-Terttu 1998. Veren sivelyvalmiste. *Duodecim* 114 (12). <https://www.duodecimlehti.fi/duo80261>. Viitattu 1.5.2023.
- Porkka, Kimmo 2015. Karvasoluleukemia. Teoksessa Porkka, Kimmo, Lassila, Riitta, Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.) Veritaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 393–395.
- Remes, Kari 2013a. T-soluinen prolymfosyyttileukemia. Teoksessa Joensuu, Heikki, Roberts, Peter, Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa, Jyrkkiö, Sirkku, Kouri, Mauri & Teppo, Lyly (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 779.
- Remes, Kari 2013b. Karvasoluleukemia. Teoksessa Joensuu, Heikki, Roberts, Peter, Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa, Jyrkkiö, Sirkku, Kouri, Mauri & Teppo, Lyly (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 777–779.
- Roelofsen-de Beer, Roseri, Wielders, Jos, Boursier, Guilaine, Vodnik, Tatjana, Vanstapel, Florent, Huisman, Willem, Vukasović, Ines, Vaubourdolle, Michel, Sönmez, Çiğdem, Linko, Solveig, Brugnoli, Duilio, Kroupis, Christos, Lohmander, Maria, Šprongl, Luděk, Bernabeu-Andreu, Francisco, Meško Brguljan, Pika & Thelen, Marc 2019. Validation and verification of examination procedures in medical

laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WGA/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-1053/html>. Luettu 3.7.2023.

Rollins-Raval, Marian, Raval, Jay & Contis, Lydia 2012. Experience with CellaVision DM96 for peripheral blood differentials in a large multi-center academic hospital system. *Journal of Pathology Informatics* 3 (29). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3445303/>. Viitattu 28.11.2023.

Rümke, C.L. 1977. The statistically expected variability in differential leukocyte counting. Teoksessa Koepke, John. *Differential leukocyte counting*. Aspen: College of American Pathologists, 39–45.

Sainio, Kirsi & Sariola, Hannu 2015. Sydän ja verisuonet. Teoksessa Sariola, Hannu, Frilander, Mikko, Heino, Tapio, Jernvall, Jukka, Partanen, Juha, Sainio, Kirsi, Salminen, Marjo, Thesleff, Irma & Wartiovaara, Kirsi. *Kehitysbiologia*. Soluista yksilöiksi. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 276–293.

Satadiag 2023a. Täydellinen verenkuvaa, sisältäen peruserenkuvan ja leukosyyttien erittelylaskennan. Päivitetty 24.3.2023. <http://webohjekirja.mylabservices.fi/SataDiag/index.php?test=3696>. Viitattu 1.5.2023.

Satadiag 2023b. Toiminnankuvaus ja perehdytyskortti, Hematologia, KLAB. Päivitetty 12.3.2023. Viitattu 1.5.2023.

Savolainen, Eeva-Riitta, Pelliniemi, Marja-Terttu & Koski, Tomi 2010. Hematologian analysointit. Teoksessa Niemelä, Onni & Pulkki, Kari. *Laboratoriolääketiede, kliininen kemia ja hematologia*. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 86–92.

Savolainen, Eeva-Riitta & Tienhaara, Anri 2015. Hematologiset laboratoriotutkimukset. Teoksessa Porkka, Kimmo, Lassila, Riitta, Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.) *Veritaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 84–100.

Savolainen, Eeva-Riitta 2010. Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, Onni & Pulkki, Kari. *Laboratoriolääketiede, kliininen kemia ja hematologia*. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 70–73.

Siitonen, Timo & Koistinen, Pirjo 2015. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Porkka, Kimmo, Lassila, Riitta, Remes, Kari & Savolainen, Eeva-Riitta (toim.) *Veritaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 16–30.

Sinisalo, Marjatta 2010. Krooninen lymfaattinen leukemia. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.) *Ilmari Palvan Veritaudit*. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy, 131–135.

Soppa, Kirsi 2021. Bioanalytiikan tekemän leukosyyttien mikroskooppisen erittelyn laatu. Opinnäytetyö YAMK. Tampereen ammattikorkeakoulu.

Stone, Kelly, Prussin, Calman & Metcalfe, Dean 2010. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *National Institutes of Health. Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2). doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017. Viitattu 19.10.2022.

Sysmex julkaisuaika tuntematon. SP Slides Microscopic Lenses. <https://katalog.sysmex.cz/katalog/produkt/mikroskopicka-skla-sp-slides-50-kusu>. Viitattu 17.5.2023.

Tilastokeskus julkaisuaika tuntematon. Käsitteet. <https://www.stat.fi/meta/kas/index.html>. Viitattu 21.8.2023.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan HTK-ohje 2023. https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf. Viitattu 12.9.2023.

Toikko, Timo & Rantanen, Teemu 2009. Tutkimuksellinen kehittämistoiminta. Näkökulmia kehittämisprosessiin, osallistamiseen ja tiedontuotantoon. 3. korjattu painos. Tampere: Tampereen yliopistopaino Oy.

Vilpo, Juhani 2010a. Hematopoieesi. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.) Ilmari Palvan Veritaudit. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy, 15–20.

Vilka, Hanna 2021. Näin onnistut opinnäytetyössä. E-kirja. Jyväskylä: PS-kustannus.

Vilpo, Juhani 2010b. Verensolujen rakenne ja funktiot. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.) Ilmari Palvan Veritaudit. 3. painos. Helsinki: Medivil Oy, 21–27.

Valli, Raine 2015. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: PS-kustannus.

Ward, Jerrold, Cherian, Sindhu & Linden, Michael 2018. Hematopoetic and lymphoid tissues. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoietic-tissue>. Viitattu 2.5.2023.