



SAVONIA

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

FETAALIHEMOGLOBIININ MITTAUS SYTOKEMIAALLISESTI JA SPEKTROFOTOMETRISESTI

Menetelmävertailu Islabin Puijon kemian ja hematologian
laboratorioon

TEKIJÄT: Riina Rissanen
Maiju Räsänen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Riina Rissanen, Maiju Räsänen	
Työn nimi Fetaalihemoglobiinin mittausta sytokemiallisesti ja spektrofotometrisesti: menetelmävertailu Islabin Puijon kemian ja hematologian laboratorioon	
Päiväys	22.4.2014
Sivumäärä/Liitteet	54/5
Ohjaaja(t) Lehtori Jaana Hoffrén, TtM	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Vastasyntyneen pääasiallinen hemoglobiini muoto on fetaalihemoglobiini (HbF). Fetaalihemoglobiinitutkimusta käytetään, kun epäillään fetomaternaalivuotoa tai perinnöllisiä tauteja, joissa fetaalihemoglobiini on koholla. Fetaalihemoglobiinivärjäys on sytokemiallinen menetelmä, ja sitä käytetään fetomaternaalivuodon (FMH) osoittamiseen. Fetomaternaalivuoto on sikiöstä äitiin suuntautuva massiivinen verenvuoto, johon liittyy lähes aina lapsen vakava vammautuminen tai kuolema. Äidin verenkierrossa voidaan todeta sikiön punasoluja jopa 50 %:ssa raskauksista. FMH voidaan määrittää äidin veren sisältämän fetaalihemoglobiinin pitoisuudesta.</p> <p>Opinnäytetyön tilaajana oli Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Puijon klinisen kemian ja hematologian laboratorio. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa menetelmävertailu spektrofotometrisen ja sytokemiallisen menetelmän välillä. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli saada tutkimustuloksia fetaalihemoglobiinimittauksen kahdesta eri menetelmästä. Fetaali-Hb-näytteitä mitattiin automaattisella menetelmällä ABL835 FLEX-verikaasuanalyysaattorilla, joka sijaitsi Kuopion yliopistollisen sairaalan vastasyntyneiden teho-osastolla. Manuaalinen menetelmä eli hemoglobiinin fetaalivärjäys suoritettiin Islabin klinisen hematologian laboratoriotiloissa syksyllä 2013. Opinnäytetyön tavoitteena oli arvioida automaattisen menetelmän luotettavuutta. Opinnäytetyön tavoitteena oli toteuttaa menetelmävertailu laboratorioprosessin laatuvaatimusten mukaisesti.</p> <p>Opinnäytetyössä käytettiin kokeellista, vertailevaa tutkimusmenetelmää. Tutkimusnäytteet koostuivat 18 vastasyntyneen näytteestä (n=18), jotka analysoitiin kahdella eri menetelmällä. Tutkimustulokset käsiteltiin tilastollisesti regressioanalyysin, keskiarvon, keskihajonnan ja variaatiokertoimen avulla. Opinnäytetyössä saaduilla tuloksilla selvitettiin, saadaanko verikaasuanalyysaattorilla tarpeeksi luotettavia fetaalihemoglobiinituloksia diagnostiseen käyttöön. Tutkimustulosten perusteella verikaasuanalyysaattorin tulostaso oli matalampi kuin fetaalihemoglobiinivärjäyksen tulostaso. Tutkimuksessa saadut mittaustulokset eivät vaihdelleet merkittävästi menetelmien välillä, joten manuaalisen ja automaattisen menetelmän tulokset ovat keskenään vertailukelpoisia.</p>	
Avainsanat sytokemia, spektrofotometria, fetaalihemoglobiini	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Riina Rissanen, Maiju Räsänen			
Title of Thesis Measurement of fetal hemoglobin with cytochemical and spectrophotometric techniques: comparison of different techniques to Department of Clinical Chemistry and Hematology at Eastern Finland Laboratory Centre Joint Authority Enterprise			
Date	22.4.2014	Pages/Appendices	54/5
Supervisor(s) Senior Lecturer Jaana Hoffrén, MHS			
Client Organisation /Partners Eastern Finland Laboratory Centre Joint Authority Enterprise (Islab)			
<p>Abstract</p> <p>Fetal hemoglobin (HbF) is the main hemoglobin component in newborns. The measurement of fetal hemoglobin is used to investigate suspected fetomaternal hemorrhage or hereditary disorders where fetal hemoglobin is increased. Fetal hemoglobin staining is a cytochemical technique and it is used to detect fetomaternal hemorrhage. Fetomaternal hemorrhage is a massive bleeding from the fetus to the maternal circulation and it is nearly always associated with severe maternal morbidity or mortality. The detection of fetal erythrocytes in maternal blood is associated with 50 % of pregnancies. FMH is measured from the maternal blood by calculating the concentration of fetal cells.</p> <p>The subscriber of this thesis was the Department of Puijo's Clinical Chemistry and Hematology at Eastern Finland Laboratory Centre Joint Authority Enterprise (Islab). The purpose of the study was to carry out a comparison between spectrophotometric and cytochemical techniques. The purpose of the study was to have research results from fetal hemoglobin measurement with two different techniques. The fetal hemoglobin samples were measured with the automatic technique at the ABL835 FLEX blood gas analyzer which was located in the newborns' intensive care unit at Kuopio University Hospital. The manual technique was carried out in the fall of 2013 at the laboratory of clinical hematology (Islab). The aim of the thesis was to evaluate the reliability of the automatic technique. The aim of the thesis was to carry out a comparison of two different techniques with the quality requirements of the laboratory process.</p> <p>This thesis was empirical and comparative in nature. The study included 18 neonatal blood samples which were analyzed with two different techniques. The research results were processed statistically by using the regression analysis, arithmetic mean, standard deviation and coefficient of variation. With the results of this study it was attempted to find out if it is possible to get reliable fetal hemoglobin results with the blood gas analyzer for diagnostic use. These results suggest that the level of the result is smaller in the blood gas analyzer than in the fetal hemoglobin staining. The measurement between two different techniques didn't vary significantly so the results of the manual and automatic techniques are comparable.</p>			
Keywords cytochemistry, spectrophotometry, fetal hemoglobin			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	AIKUISEN HEMOGLOBIINI JA SIKIÖKAUDEN HEMOGLOBIINI.....	8
2.1	Fetaalihemoglobiini.....	9
2.2	Fetaalihemoglobiinin merkitys sairauksien diagnostiikassa.....	10
3	FETAALIHEMOGLOBIININ TUTKIMUSMENETELMÄT.....	15
3.1	Sytokemiallinen menetelmä.....	15
3.1.1	Sivelyvalmisteen teko.....	16
3.1.2	Kleihauer-Betke-testi.....	18
3.2	Spektrofotometrinen menetelmä.....	19
3.2.1	Verikaasuanalysaattori.....	19
4	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT	21
5	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT.....	22
5.1	Tutkimusmenetelmä.....	22
5.2	Tulosten analysointi.....	22
5.3	Luotettavuus	23
5.4	Laatu laboratoriossa	24
6	TUTKIMUKSEN KULKU	25
6.1	Tiedonhaku	26
6.2	Aiemmat tutkimukset.....	26
6.3	Tutkimuksen valmistelu.....	27
6.4	Laitteet, reagenssit ja työvälineet.....	27
6.5	Näytemuodot.....	29
6.6	Fetaalihemoglobiinin määrittäminen verikaasuanalysaattorilla	30
6.7	Fetaalihemoglobiininivärijäys ja näytteiden mikroskopiointi.....	31
7	TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	36
8	POHDINTA.....	42
8.1	Tutkimustulosten tarkastelu.....	42
8.2	Menetelmävertailu.....	43
8.3	Tulosten luotettavuus	44
8.4	Tutkimuksen eettiset vaatimukset	47
8.5	Opinnäytetyöprosessin tarkastelu.....	47

8.6 Ammatillinen kasvu	48
8.7 Jatkotutkimusehdotukset.....	49
LÄHTEET	50
LIITE 1: TUTKIMUSLUPA.....	55
LIITE 2: KÄYTTÖTURVALLISUUSTIEDOTE TUTKIMUKSESSA KÄYTETYISTÄ KEMIKAALEISTA	58

Opinnäytetyössä käytettyjä termejä:

AALLONPITUUS	kahden vierekkäisen ja samassa vaiheessa olevan aallon välinen etäisyys
ABSORBANSSI	luku, joka kuvaa valon imeytymistä aineeseen
ANTIAGOAGULANTTI	veren hyytymistä estävä aine
AB-VEKAASL	valtimoverestä tehtävä laaja verikaasututkimus
B -PVK + T	perusverenkuva + trombosyytit antaa yleiskuvan verisoluis- ta ja hemoglobiinista
B -TVK	täydellinen verenkuva sisältää perusveren kuvan lisäksi val- kosolujen erittelylaskennan
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo on veren hyytymistä estä- vä aine, jota käytetään näytteenotto-putkissa
EOSIINI B	väriliuos, joka värjää punasolut punaiseksi
ERYTROPOIEESI	punasolujen muodostuminen
FETAALIHMOGLOBIINI	sikiökaudella pääasiainen hemoglobiinimuoto
FETAALIOKSIHMOGLOBIINI	verikaasulaitteella mitattava parametri, jonka spektrin avul- la voidaan laskea fetaalihemoglobiinin määrä
FMH (Fetomaternaalivuoto)	sikiöstä äitiin suuntautuva massiivinen verenvuoto
HAPPIAFFINITEETTI	kyky sitoa happea
HEMATOKSYLIINI	väriliuos, joka värjää solun tuman sinimustaksi
HEMOLYYSI	punasolujen hajoaminen
HEPARIINI	veren hyytymisenestoaine, jota käytetään näytteenotto- putkissa
HPFH	Hereditary persistence of fetal hemoglobin on perinnöllinen tila, jossa fetaalihemoglobiini on koholla
NM (nanometri)	aallonpituuden yksikkö
RELIABILITEETTI	kuvaa tutkimuksen toistettavuutta ja tarkkuutta
SIRPPISOLUANEMIA	krooninen hemolyyttinen tauti
SPEKTROFOTOMETRI	laite, joka mittaa valon intensiteettiä eri aallonpituuksilla
SYTOKEMIA	tutkii solujen kemiallista rakennetta
TALASSEMIA	periytyvä hematologinen tautiryhmä
VALIDITEETTI	pätevyys, kuvaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri si- tä, mitä on tarkoitus mitata
VB-VEKAASL	laskimoverestä tehtävä laaja verikaasututkimus
VEREN SIVELYVALMISTE	kokoverinäyte, joka on sivelty objektilasille
VÄRJÄYSARTEFAKTA	värjäystuloksessa esiintyvä häiriö

1 JOHDANTO

Fetaalihemoglobiini on vastasyntyneiden pääasiallinen hemoglobiinimuoto. Fetaalihemoglobiinia tutkitaan, kun epäillään vakavaa raskauskomplikaatiota eli fetomaternaalivuotoa. Fetaalihemoglobiinin mittaaminen on kliinisesti hyödyllinen myös perinnöllisessä taudissa, jossa fetaalihemoglobiini on koholla. Maahanmuuttajien mukana Suomeen on tullut useita hematologisia perinnöllisiä sairauksia, joita ei esiinny suomalaisessa tautiperimässä. Näiden sairauksien tunnistaminen ja diagnostointi on erittäin tärkeää potilaan hoidon ja geneettisen neuvonnan toteuttamiseksi. Tärkeimpiä näistä sairauksista ovat muun muassa talassemiat ja sirppisoluanemiat, joiden diagnosoinnissa käytetään apuna fetaalihemoglobiinitutkimusta. (Mosca, Paleari, Leone & Ivaldi 2009; Salmi 2010, 210-214; Ulander, Ämmälä, Sjöberg & Lehtovirta 2002.)

Tämän opinnäytetyön tilaajana oli Itä-Suomen laboratorikeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Puijon laboratorio. Bioanalytytöt määrittävät Islabin kliinisen hematologian laboratoriossa fetaali-Hb-tutkimuksen vain silloin, kun epäillään fetomaternaalivuotoa. Hemoglobiinin fetaalivärjäys on sytokemiallinen menetelmä, jossa mikroskopoidaan äidin kokoverinäytteestä fetaalihemoglobiinisoluja. Äidin sivelylvalmisteiden värjäytyneiden solujen osuus ilmoittaa fetaalihemoglobiinituloksen, jonka avulla voidaan arvioida sikiöstä äitiin siirtyneen veren tilavuus. (ISLAB 2014c.) Hemoglobiinin fetaalivärjäys on työläs ja aikaa vievä, minkä vuoksi Islab selvittää automaattisen menetelmän mahdollisuutta fetaalihemoglobiinitutkimuksessa. Kuopion yliopistollisen sairaalan (KYS) vastasyntyneiden teho-osastolla on Islabin verikaasuanalysointilaboratorio, jonka avulla fetaalihemoglobiinin mittaaminen voitaisiin toteuttaa automaattisesti spektrofotometrisellä menetelmällä. Tämä opinnäytetyö oli menetelmävertailu, jossa vastasyntyneiden verinäytteitä analysoitiin rinnakkain verikaasuanalysointilaboratoriossa ja hemoglobiinin fetaalivärjäyksellä. Tässä opinnäytetyössä hemoglobiinin fetaalivärjäys tehtiin vastasyntyneiden verinäytteistä, jotta saatiin korkeita fetaalihemoglobiinituloksia.

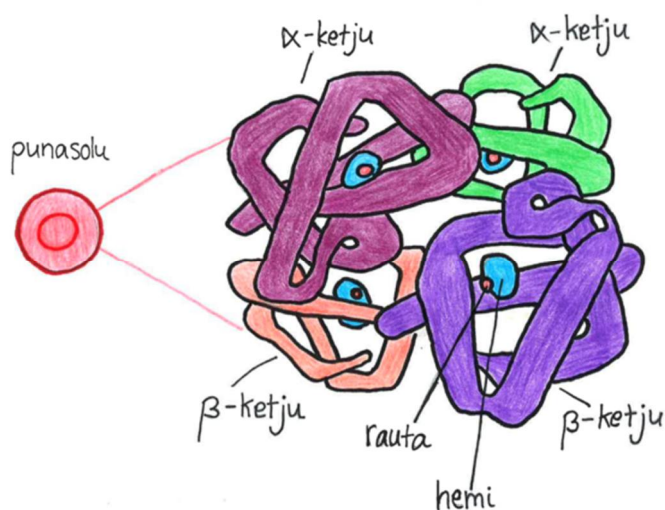
Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa menetelmävertailu spektrofotometrisen ja sytokemiallisen menetelmän välillä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli saada tutkimustuloksia fetaalihemoglobiinin mittaamisen kahdesta eri menetelmästä. Fetaali-Hb-näytteitä mitattiin automaattisella menetelmällä ABL835 FLEX-verikaasuanalysointilaboratoriossa, joka sijaitsee Kuopion yliopistollisen sairaalan vastasyntyneiden teho-osastolla. Manuaalinen menetelmä eli hemoglobiinin fetaalivärjäys suoritettiin Islabin kliinisen hematologian laboratoriotiloissa, jossa mikroskopoidaan värjättyjä fetaalisoluja. Tutkimuksessa käytettiin Kuopion yliopistollisen sairaalan vastasyntyneiden teho-osastolta saatuja hepariiniirruksinäytteitä, jotka analysoitiin rinnakkain verikaasuanalysointilaboratoriossa ja hemoglobiinin fetaalivärjäyksellä. Opinnäytetyössä verrattiin verikaasuanalysointilaboratorion ja mikroskopoinnin saatuja tuloksia toisiinsa. Tutkimus tehtiin Itä-Suomen laboratorikeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Puijon kliinisen kemian ja hematologian laboratorioon.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli arvioida automaattisen menetelmän luotettavuutta. Opinnäytetyön tavoitteena oli toteuttaa menetelmävertailu laboratoriossa laatuvaatimusten mukaisesti. Opinnäytetyömme tulosten perusteella Islab voi käynnistää jatkotutkimuksia siitä, saadaanko automaattisella menetelmällä tarpeeksi luotettavia tuloksia diagnostiseen käyttöön.

2 AIKUISEN HEMOGLOBIINI JA SIKIÖKAUDEN HEMOGLOBIINI

Itä-Suomen laboratorionkeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) klinisen hematologian laboratoriossa määritetään muun muassa perifeerisen veren verenkuvatutkimuksia, verisolujen morfologiaa ja solujen erikoisvärjäyksiä. Yksi näistä hematologian erikoisvärjäyksistä on fetaali-Hb-värjäys. Hemoglobiinia (Hb) taas määritetään verenkuvan (B -PVK, B -PVK+T ja B -TVK) yhteydessä. Hemoglobiinipitoisuutta tutkitaan anemian ja erytroosin diagnostiikassa tai nestetasapainon seurannassa. (ISLAB 2014b; ISLAB 2014d.) Hemoglobiinipitoisuudet vaihtelevat iän mukaan. Vastasyntyneillä ovat korkeimmat hemoglobiinipitoisuudet. Syntymän vaiheilla hemoglobiinin keskimääräinen pitoisuus on noin 200 g/l, mutta syntymän jälkeen erytropoieesi eli punasolujen muodostuminen hidastuu, jolloin hemoglobiinipitoisuus laskee 6-8 viikon ikään saakka ja saavuttaa tason 90-120 g/l. Siitä lähtien erytropoieesi käynnistyy uudelleen ja veren hemoglobiinipitoisuus alkaa kasvaa 8-10 ikävuoteen asti saavuttaen aikuisten naisten tason. Murrosiän puolivälissä poikien hemoglobiinipitoisuus alkaa uudelleen kasvaa saavuttaen miesten tason 16–18-vuoden ikäisenä. (Punnonen, Remes & Siimes 2007, 160.)

Veren punasolu muodostuu vedestä, hemoglobiinista sekä proteiineista, hiilihydraateista ja lipideistä. Noin 60 % punasolun tilavuudesta on vettä ja noin 30 % on hemoglobiinia. Hemoglobiini eli konjugoitunut proteiini muodostuu neljästä värittömästä proteiinosasta eli globiinista sekä neljästä punaisesta pigmenttiosasta eli hemistä (kuva 1). Elimistössä olevasta raudasta noin 70 % on sitoutunut hemoglobiiniin. Veren kyky sitoa happea perustuu melkein kokonaan hemoglobiinissa olevaan rautaan. Hemoglobiinin pääasiallinen tehtävä on kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin, mutta hemoglobiini osallistuu myös hiilidioksidin kuljetukseen kudoksista keuhkoihin. Lisäksi hemoglobiini osallistuu veren puskuroimiseen. (Hänninen & Mahlamäki 2004, 265; Sand, Sjaastad, Haug & Bjälle 2011, 319.)

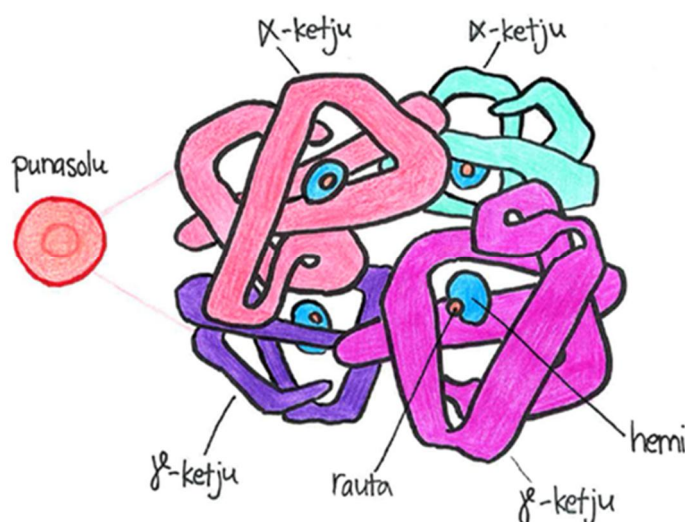


KUVA 1. Hemoglobiini A:n rakenne, joka muodostuu kahdesta alfa (α)-ketjusta ja kahdesta beeta (β)-ketjusta © Koskinen, Rissanen & Räsänen 2014

Aikuisella on normaalisti kolmea eri hemoglobiiniketjua: HbA, HbF ja HbA₂. Globiiniketjujen synteesiä säätelee ryhmä geenejä, jotka jaetaan alfa- ja beeta globiinigeeneihin. Alfa-ketjun geenit sijaitsevat kromosomi 16:n lyhyessä haarassa ja beeta-ketjun geenit sijaitsevat kromosomi 11:n lyhyessä haarassa. 95 % hemoglobiinista on hemoglobiini A:ta (HbA), joka muodostuu kahdesta alfa (α)-ketjusta ja kahdesta beeta (β)-ketjusta. Jokaisen ketjun hydrofobisessa taskussa sijaitsee yksi hemiryhmä. 1-3 % aikuisen hemoglobiinista on HbA₂:ta, joka sisältää kaksi alfa- ja kaksi deltaglobiiniketjua. Fetaalihemoglobiini (HbF) sisältää kaksi alfa (α)- ja kaksi gamma (γ)-globiiniketjua, ja sen osuus aikuisen hemoglobiinista on alle 0,1 % (kuva 2). (Mosca ym. 2009; Lehtinen 1996, 146-148; Rajamäki & Salmi 2007, 224.)

2.1 Fetaalihemoglobiini

Sikiökaudella pääasiallinen hemoglobiini on fetaalihemoglobiini (HbF). Sikiökaudella ruskuaispussin seinämässä muodostuvat hemoglobiinit Gower I, Gower II ja Portland I. Kuudennen raskausviikon ja loppuraskauden sikiövaiheessa fetaalihemoglobiini korvaa alkion hemoglobiinit. Alkion solujen hävittyä maksassa sekä myöhemmin pernassa alkaa varsinainen erytropoiesi, joka syntymän aikoihin siirtyy pysyvästi luuytimeen. Syntymän jälkeen HbF-synteesi laskee nopeasti ja fetaalihemoglobiinin määrä vähenee verenkierrosta viiden vuoden sisällä aikuisikää vastaavalla tasolle korvautuen aikuisen hemoglobiini A:lla. Normaalisti aikuisilla fetaalihemoglobiini on heterogeneettisesti erotettu erytrosyyteistä, mutta sen synteesi on rajoitettu pieneen määrään soluja, joita kutsutaan F-soluiksi. Noin 3-7 % punasoluista on F-soluja, jotka sisältävät 20-25 % fetaalihemoglobiinia. (ISLAB 2014c; Lehtinen 1996, 146-147; Mosca ym. 2009.)



KUVA 2. Fetaalihemoglobiinin rakenne, joka muodostuu kahdesta alfa (α)-ketjusta ja kahdesta gamma (γ)-ketjusta © Koskinen, Rissanen & Räsänen 2014

Syntymähetkellä fetaalihemoglobiinin osuus hemoglobiinista on noin 50-90 % (Sigma-aldrich 2005). Ensimmäisen kahden elinvuoden jälkeen äärisverenkierrosta löytyy aikuiselle luonteenomainen hemoglobiini ja alle 1 % fetaalihemoglobiinia (Mosca ym. 2009). Alle 2-vuotiailla lapsilla HbF-arvo on

0-4 % ja yli 2-vuotiailla lapsilla fetaalihemoglobiinia on vain 0-2 % (Sigma-aldrich 2005). Aikuisella HbF-arvo voi nousta fysiologisten syiden vuoksi, kuten raskauden, mutta myös perinnöllisten syiden vuoksi. Raskauden aikana HbF-arvo nousee 1-5 %. (Stephens, Angastiniotis, Baysal, Chan, Davis, Fucharoen, Giordano, Hoyer, Mosca & Wild 2012.) Fetaalihemoglobiini eroaa toiminnallisesti aikuisen hemoglobiinista (Mosca ym. 2009). Fetaalihemoglobiinilla on suurempi happiaffiniteetti eli suurempi hapen kuljetuskyky kuin aikuisen hemoglobiinilla. Tämä tunnusomaisuus tekee hapen kuljetuksen istukan läpi helpommaksi ja antaa sikiölle paremman pääsyn happeen äidin verenkierrosta. (Hänninen & Mahlamäki 2004, 266; Mosca ym. 2009.)

2.2 Fetaalihemoglobiinin merkitys sairauksien diagnostiikassa

Fetaalihemoglobiinitutkimusta käytetään aikuispotilailla yleensä fetomaternaalivuodon osoittamiseen ja hemoglobiнопатиadiagnostiikan tukena (Uotila & Itkonen 2012). Islab määrittää fetaalihemoglobiinia ainoastaan epäiltäessä fetomaternaalivuotoa (ISLAB 2014c). Maahanmuuttajien mukana Suomeen on tullut useita hematologisia perinnöllisiä sairauksia, joita ei esiinny suomalaisessa tautiperimässä. Näiden sairauksien tunnistaminen ja diagnostointi on erittäin tärkeää potilaan hoidon ja geneettisen neuvonnan toteuttamiseksi. Tärkeimpiä näistä sairauksista ovat muun muassa talassemiat ja sirppisoluanemiat. (Salmi 2010, 210-214.) Normaalin hemoglobiinin synteesihäiriö tai rakenteeltaan poikkeavan hemoglobiinin muodostuminen ovat syyt hemoglobiinisairauksien syntymiseen. Talassemiat aiheutuvat normaalin hemoglobiinin synteesihäiriöstä, kun globiinigeenien mutaatioiden seurauksena syntyy liian vähän globiinimolekyylejä. Hemoglobiнопатiat aiheutuvat rakenteeltaan poikkeavan hemoglobiinin muodostumisesta, kun globiinigeenien mutaation seurauksena muodostuu poikkeavia globiinimolekyylejä. (Rajantie 2010; Siitonen 2010, 86.)

Fetaalihemoglobiinin mittaaminen on kliinisesti hyödyllinen joidenkin globiinigeenivirheiden tutkimuksissa ja diagnoosissa (taulukko 1). Näissä HbF-taso voi vaihdella merkittävästi. Hoitotason näkökulmasta HbF:n tiedetään estävän poikkeavan hemoglobiinin, HbS:n polymeriasaatiota, mutta myös erilaisilla taudinaiheuttajilla on kyky nostaa HbF-tuotantoa. (Mosca ym. 2009.) Talassemian kantajilla voidaan tarvita lisätutkimuksia perinnöllisyysneuvontaa ja prenataalidiagnostiikkaa varten. Jos potilaan lähisukulaisella on spesifinen talassemia-diagnoosi ja potilas on oireeton, lisätutkimuksia ei tarvita. Alfa- ja beetatalasemiaa ei voi erottaa toisistaan verenkuvan perusteella. (Rajantie 2010.)

TAULUKKO 1. Sairaudet ja tilat, joissa fetaalihemoglobiiniarvo on kohonnut

Sairaudet ja tilat, jossa HbF on koholla	Käytetty menetelmä	HbF-arvo
Fysiologiset syyt:		
Vastasyntyneet	Ei kliinistä merkitystä	50-90 %
Alle 2-vuotiaat lapset	Ei kliinistä merkitystä	0-4 %
Yli 2-vuotiaat lapset	Ei kliinistä merkitystä	0-2 %
Aikuiset	Ei kliinistä merkitystä	< 0,1 %
Raskaus	Ei kliinistä merkitystä	1-5 %
Perinnölliset syyt:		
HPFH	Sytokemiallinen menetelmä Virtausytometria	2,5-100 %
Sirppisoluanemia	Korkeapainenestekromatografia	Hydroksiureahoidossa lääkeaineen vaikutuksen mittari
Delta- beetatalassemia	Korkeapainenestekromatografia Isoelektrinen fokusointi ja Ioninvaihtonestekromatografia	5-20 %
Beetatalassemia major	Korkeapainenestekromatografia Isoelektrinen fokusointi ja Ioninvaihtonestekromatografia	40-90 %
Beetatalassemia intermedia	Korkeapainenestekromatografia Isoelektrinen fokusointi ja Ioninvaihtonestekromatografia	10-30 %
Beetatalassemia minor	Korkeapainenestekromatografia Isoelektrinen fokusointi ja ioninvaihtonestekromatografia	0-5 %
Muut tilat:		
Fetomaternaali vuoto	Sytokemiallinen menetelmä Korkeapainenestekromatografia	> 1 %

Talassemiat. Noin 200 miljoonaa ihmistä maailmassa sairastaa eri talassemioita, ne ovatkin yleisin periytyvä tautiryhmä. Taudin kliininen vaikeus vaihtelee suuresti. Talassemiat aiheutuvat mutaatioista, joiden seurauksena globiiniketjun lähetti-RNA:n tuotanto vähentyy. Lopulta useiden eri mekanismien avulla globiinin määrä pienentyy, mutta globiinin rakenne pysyy normaalina. (Rajamäki & Salmi 2007, 226.) Talasemioiden diagnostiikassa potilaan etninen tausta ja suvun sekä perheen hematologiset sairaudet ovat tärkeitä tietoja. (Salmi 2010, 210-214). Talassemiat aiheutuvat normaalin hemoglobiiniketjun synteesihäiriöistä. Talasemiaa esiintyy Välimeren maista Indonesiaan saakka ulottuvalla vyöhykkeellä. Talasemia on harvinainen syntyperäisellä suomalaisella, mutta Suomessa niitä esiintyy maahanmuuton lisääntymisen vuoksi. (Siitonen 2010, 86.)

Alfatalassemia. Nykyään on jo kuvattu yli 30 mutaatiota, mitkä aiheuttavat rakenteellisen poikkeavuuden tai geenin puuttumisen, minkä lopputuloksena on puutteellinen alfaketjutuotanto. Tauti jaetaan neljään ryhmään oireiden vaikeuden perusteella: hydrops fetalis, HbH-tauti, talassemia minor ja oireeton kantaja. Alfatalasemiassa vaikuttaa merkittävästi se, kuinka monta neljästä alfaketjusta on vaurioitunut. Mikäli taudinkuvana on hydrops fetalis, kaikki alfaketjua koodavat geenit puuttuvat ja kaikki hemoglobiiniketjut ovat gammaketjuja. Tällöin sikiö ei yleensä ole elinkelpoinen, vaan menehtyy. (Rajamäki & Salmi 2007, 226-229.)

HbH-taudin myötä henkilöllä on yksi toimiva alfaketjugeeni, jolloin potilaalla on krooninen hemolyytinen anemia. Talassemia minoria sairastavalla potilaalla taas alfaketjugeeneista toimii kaksi. Tällöin anemia on lievä, mutta punasoluindeksit ovat mikrosyyttiset ja hypokromiset. Oireettomalla kantajalla toimii kolme geeniä, sekä hän on hematologisesti normaali. (Rajamäki & Salmi 2007, 226-229.) Alfatalassemian kantajalla HbA₂ ja HbF ovat normaalit. Alfatalassemian diagnostiikassa DNA-tutkimuksen merkitys on korostumassa yhä enemmän. Diagnoosi varmistuu DNA-tutkimuksella silloin, kun kyseessä on valtamutaatio. DNA-tutkimuksessa saatu normaali tulos ei kuitenkaan poissulje alfatalasemiaa. Tämän vuoksi diagnoosi voidaan otaksua potilaan etnisen taustan ja verenkuvan perusteella. Alfatalasemiadiagnoosi on todennäköinen silloin, kun beetatalasemia minor, hemoglobiнопатiat ja raudanpuute ovat poissuljettuja diagnooseja. (Rajantie 2010; Rajantie 2013.)

Beetatalasemia. Mutaatioita, jotka aiheuttavat beetatalasemiaa on todettu noin 350. Nämä mutaatiot aiheuttavat geenien ilmentymisen tai säätelyn häiriön. Mikäli henkilön toinen geeni on terve, ei hänellä juuri ole kliinisiä oireita tai merkittäviä laboratoriolöydöksiä. Kliininen kuva beetatalasemiassa vaihtelee suuresti, joten sairaus jaetaan eri kliiniseen muotoon: major, intermedia, minor ja minima. (Rajamäki & Salmi 2007, 227.) Beetatalasemiassa hemoglobiinin isoelektrinen fokusointi on tärkeä tutkimus. Tutkimuksessa saadaan tieto HbA:n, HbA₂:n ja HbF:n suhteellisista osuuksista. (Salmi 2010, 210-214.) Beetatalassemian diagnosointi perustuu potilaan ja hänen vanhempiansa verenkvalölöydöksiin, mutta tarvittaessa nestekromatografialla voidaan osoittaa korostuneet HbA₂ ja HbF (Rajantie 2013). Beetatalasemia intermediassa fetaalihemoglobiiniarvo on 10-30 %. Beetatalasemia minorissa fetaalihemoglobiiniarvo on 0-5 %. (Nayak, Rai & Gupta 2012, 64.)

Talassemioiden vaikein muoto on talassemia major. Potilas ei pysty lainkaan tuottamaan normaalia HbA:ta, koska molemmat sen tuottoa koodaavat geenit ovat vaurioituneet. Potilaalla on veressä vähän HbA₂:ta ja pääosan muodostaa HbF. Beetatalasemia majorissa fetaalihemoglobiiniarvo on 30-90 %. Vastasyntyneenä beetatalasemia ei aiheuta kliinisiä oireita, koska sikiökauden pääosa hemoglobiinista on juuri HbF:ää. Potilas alkaa anemioitua noin kuuden kuukauden iästä lähtien. Potilas muuttuu kalpeaksi, maksa ja perna suurentuvat, kehitys kärsii ja kasvu pysähtyy. (Nayak ym. 2012, 64; Mosca ym. 2009; Rajamäki & Salmi 2007, 226-229.)

Delta-beetatalasemiat ja gamma-delta-beetatalasemiat. Beeta-, delta- ja gammaketjut kuuluvat samaan perheeseen, joten ne voivat korvautua toisillaan. Beetatalasemiassa nämä ketjut korvautuvat toisillaan, jolloin HbA₂:n ja HbF:n määrä lisääntyy. Delta-beetatalasemiassa kummankin globiiniiniketjun synteesi on vähentynyt tai puuttuu kokonaan, ja gammaketjusynteesi lisääntyy. Fetiaalihemoglobiinin pitoisuus on korkea ja homotsygooteilla hemoglobiini on kokonaan HbF:ää. Delta-gamma-beetatalasemioissa puuttuu koko beetageenikompleksi tai se on inaktivoitunut. (Rajamäki & Salmi 2007, 228.)

HPFH. Hereditary persistence of fetal hemoglobin on periytyvä tila, jossa globiinisynteesin säätely on poikkeavaa. Fetiaalihemoglobiinin synteesi jatkuu aikuisikään saakka, jolloin syntyy epäsuhte al-faketjujen ja muiden ketjujen välillä. HbF-arvot vaihtelevat HPFH:ssa riippuen siitä, onko tauti heterotsygoottisesti vai homotsygoottisesti periytyvä. Heterotsygoottisessa HPFH:ssa HbF-arvo on noin

2,5-30 %, kun taas homotsygoottisessa HPFH:ssä HbF-arvo voi olla 100 %. HPFH:n määrittämiseen voidaan käyttää joko sytokemiallista menetelmää tai virtausytometriaa. (Stephens ym. 2012.) Potilaalla ei ole yleensä kliinisiä oireita, ja osa potilaista on oireettomia, jolloin hematologisia poikkeavuuksia ei voida osoittaa (Rajamäki & Salmi 2007, 231).

Sirppisoluanemia. Sirppisoluanemia on krooninen hemolyyttinen tauti (Juvonen & Savolainen, 2013). Sirppisoluanemiassa yleisin poikkeava hemoglobiini on HbS, jota esiintyy erityisesti päiväntasaajan alueelta kotoisin olevilla ihmisillä. Yksi glutamiini HbS beettaketjusta on korvautunut valiinilla, josta johtuva polymeerimuodostus on syynä sirppisolutaudin moninaiisiin ilmenemismuotoihin. (Rajamäki & Salmi 2007, 235.)

Taudinkuvaan kuuluu anemia sekä verisuonien tukkeutumisesta aiheutuvat kriisit ja elinvauriot. Oireet ilmenevät ensimmäisen ikävuoden loppupuolella, mutta lievä hemolyyttinen anemia on todettavissa jo 3 kuukauden iässä. HbF:n pitoisuus pienenee rinnan anemian kanssa. (Rajamäki & Salmi 2007, 235.) Taudin vaikeissa muodoissa potilaan hoidossa käytetään hydroksiureahoitoa (Duodecim 2012). Hydroksiurea-lääke nostaa HbF-arvoa, joka vaihtelee suuresti potilaasta riippuen. Fetaalihemoglobiiniarvoa on syytä tarkkailla koko hoidon aikana, sillä hydroksiurea-lääke on lievästi karsinogeeninen, minkä vuoksi jokaiselle potilaalle pyritään löytämään pienin vaikuttava lääkeannos. Potilaan fetaalihemoglobiiniarvoa voidaan tarkkailla joko elektroforeesin tai korkeapainenestekromatografian avulla. (Schumacher & Randolph 2012.)

Fetomaternaalivuoto. Fetomaternaalivuoto (FMH) eli sikiöstä äitiin suuntautuva massiivinen verenvuoto on vakava raskauskomplikaatio, johon liittyy lähes aina lapsen vakava vammautuminen tai kuolema. Äidin verenkirrossa voidaan todeta sikiön punasoluja jopa 50 %:ssa raskauksista. Massiivisessa FMH:ssä vuodon määrä on vähintään 150 ml tai puolet sikiön kokonaisverestä ja se voi johtaa sikiön menehtymiseen 12 %:ssa tapauksista. Fetaalihemoglobiini (HbF) tutkimusta voidaan käyttää silloin, kun on epäily kroonisesta FMH:sta tai sikiöllä on havaittu anemia. Sikiön kuoleman yhteydessä HbF tulisi aina määrittää. (Ulander ym. 2002.)

Fetomaternaalivuotoa voidaan määrittää äidin veren sisältämän fetaalihemoglobiinin pitoisuudesta. Fetaalihemoglobiinin pitoisuus voidaan määrittää joko korkeapainenestekromatografialla tai Kleihauer-Betke-testillä, joka perustuu sytokemialliseen menetelmään. Korkeapainenestekromatografia on tarkempi menetelmä fetaalihemoglobiinin määrittämiseen kuin Kleihaer-Betke-testi. Raja-arvoja voi esiintyä ilman fetomaternaalivuotoa, siksi HbF tulisi määrittää vain, jos on vahva epäily sikiön anemiasta. Äidin fetaalihemoglobiinin osuus kokonaihemoglobiinista on normaalisti 0,2-1,0 %. (Tarvonen, Ulander, Süvari & Teramo 2011.) Islab määrittää äidin verestä fetaalihemoglobiinin pitoisuuden sytokemiallisella menetelmällä, jossa 1 % HbF-arvo merkitsee noin 50 ml:n vuotoa sikiöstä äitiin (ISLAB 2014c).

Fetomaternaalivuodon ilmaantuvuus on suurin viimeisellä raskauskolmanneksella. Vuoto voi tulla ennen synnytystä tai synnytyksen aikana. Yleisin syy fetomaternaalivuotoon on äidin kaatuminen tai kohdun alueelle osunut isku. Tärkeää olisikin, että äiti kävisi tarkistuksessa, mikäli hän on esimerkik-

si liukastunut ulkona. Vuoto voi myös tapahtua raskauden aikaisten toimenpiteiden seurauksena, kuten kohdunsisäisen näytteenoton yhteydessä (lapsivesipunktio, istukkabiopsia ja napasuonipunktio) sekä istukkasyövän seurauksena. Diagnosoiduista tapauksista jopa 80 % jää vaille selkeää altistavaa syytä. (Tarvonen ym. 2011.)

Fetomaternaalivuodon seurauksena on ensisijaisesti anemia. Vuodon tiedetään lisäävän myös merkittävästi sikiön neurologisen vammautumisen sekä kohtukuoleman riskiä. Yleisin oire fetomaternaalivuodossa on sikiön liikkeiden vähentyminen tai kokonaan loppuminen. Osassa tapauksista sikiön kuolema tai vaurioituminen on ennättänyt jo tapahtua. Sikiön anemiasta ja akuutista tai kroonisesta hapenpuutteesta viitteitä voivat antaa sikiön poikkeava sykekäyrä (KTG) tai kaikukuvauksella todettu vaimea bioprofiili, etenkin jos ne liittyvät aiemmin tapahtuneeseen tapaturmaan. Tärkeä osa sikiön anemiadiagnostiikka on myös keskimmäisen aivovaltimon systolisen huippuvirtauksen kuvantaminen. Fetomaternaalivuodon vakavuus riippuu vuodon määrästä sekä nopeudesta. Eläinkokeista saatujen tietojen perusteella on todettu, että mikäli vuoto sikiöstä äitiin tapahtuu hitaasti usean tunnin tai vuorokauden aikana on sikiöllä varsin hyvä kyky sopeutua jopa massiiviseen fetomaternaaliseen vuotoon. Mikäli samansuuruisen verivolyymien menetys tapahtui nopeasti kymmenen minuutin kuluessa, sikiöistä menehtyi 30 %. (Tarvonen ym. 2011.)

3 FETAALIHEMOGLOBIININ TUTKIMUSMENETELMÄT

ICSH:n (International Committee for Standardization in Haematology) suositukset fetaalihemoglobiinin määrittämiseen ovat alkaneet jo vuodesta 1979. Fetaalihemoglobiinin tutkimiseen on kehitetty useita analyttisiä menetelmiä, joita ovat korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC), kapillaariväyhyke-elektroforeesi, kapillaari-iselektrinen fokuointi, sytokemiallinen menetelmä, virtaussytometri, emäksen denaturointi kahdessa minuutissa sekä radiaalinen immunodiffuusio. (Stephens ym. 2012.) Fetaalihemoglobiinia on tutkittu myös hemoximetrilla, mutta tätä menetelmää ei ole vielä hyvin validoitu. Tämän menetelmän näytemuotona olivat vastasyntyneiden verinäytteet, joista fetaalihemoglobiinia on mitattu määrittämällä P50 HbO₂:n lineaarisesta dissosiaatiokäyrästä. Tällä menetelmällä on kuitenkin saatu merkittävästi suurempia arvoja kuin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. (Mosca ym. 2009.)

Tässä opinnäytetyössä fetaalihemoglobiinin tutkimusmenetelmiä olivat sytokemiallinen menetelmä eli hemoglobiinin fetaalivärjäys sekä spektrofotometrinen menetelmä eli fetaali-Hb-määritys verikaasuanalysointilaitteella. Manuaalisessa menetelmässä eli hemoglobiinin fetaalivärjäyksessä mikroskopoidaan käsinvärjättyjä HbF-soluja, kun taas automaattisessa menetelmässä verikaasuanalysointilaitteella mitataan HbF-arvon fetaalioksihemoglobiinin avulla.

3.1 Sytokemiallinen menetelmä

Sytokemia tutkii solujen kemiallista rakennetta joko entsyymaattisesti tai ei-entsyymaattisesti. Perifeerisen veren ja luuytimen solumorfologia antaa alustavaa diagnoosia potilaan tilasta. Erityisesti solujen sytokemialliset värjäykset ovat helpottaneet solujen erittelylaskentaa hematopieettisissa sairauksissa, kuten akuuteissa leukemioissa. Sytokemiallisiin menetelmiin sopii näytemuodoksi luuydin, imusolmuke, perna ja perifeerinen veri. Sytokemiallisia värjäyksiä ovat muun muassa PAS-värjäys (periodic acid-Schiff), SBB-värjäys (Sudan black B) ja fetaalihemoglobiininvärjäys. (Rodak 2012, 436.)

Fetaalihemoglobiinin määrittämiseen käytetty sytokemiallinen menetelmä on semikvantitatiivinen (Stephens ym. 2012). Tämä sytokemiallinen menetelmä perustuu Kleihauer-Betke-menetelmään, jossa fetaalihemoglobiinin tunnistaminen perustuu sen haponkestävyyteen (Swirsky & Bain 2001, 275). Fetaalihemoglobiinia tutkitaan mikroskopoimalla punasoluja, jotka sisältävät fetaalihemoglobiinin lisäksi aikuisen hemoglobiinia (Mosca ym. 2009). Tämän sensitiivisen menetelmän avulla voidaan mikroskopoida yksittäisiä HbF-soluja, vaikka niitä olisi läsnä vain muutamia (Swirsky & Bain 2001, 275).

Islab määrittää (ISLAB 2014c) fetaalihemoglobiinin kokoverinäytteestä sytokemiallisella menetelmällä. Fetaalihemoglobiinin määrittämistä varten verinäyte otetaan äidiltä 3 ml EDTA-putkeen, mutta sikiö- ja kohtuveden näytteet otetaan hepariiniiruiskuun, mistä se siirretään EDTA-putkeen. Näytteenotto ei vaadi paastoa, eikä muita erityisvalmisteluja. Fetaalihemoglobiininvärjäys aloitetaan sivelyvalmisteen teolla, minkä jälkeen sivelyvalmiste värjätään hemoglobiinin fetaalivärjäyksellä. Värjättyjä sivelyvalmisteita mikroskopoidaan niin, että värjäytyneiden solujen osuus ilmoittaa fetaalihemoglobiinitulok-

sen. Fetaalivärjäys tehdään yleensä, kun halutaan osoittaa sikiön mahdollinen verenvuoto äitiin. Kun tiedossa on äidin punasolujen määrä ja veren tilavuus sekä fetaalihemoglobiinia sisältävien punasolujen osuus, voidaan sikiöstä äitiin siirtyneen veren tilavuus arvioida karkeasti kaavasta:

$$\text{Sikiön veri (ml)} = \text{HbF} - \text{solut (\%)} \times 50$$

3.1.1 Sivelyvalmisteen teko

Veren sivelyvalmisteesta tutkitaan punasolujen, valkosolujen ja verihiutaleiden ryhmitystä, kokonaismääriä, määrasuhteita sekä yksittäisten solujen morfologiaa (Savolainen, Haapajarvi & Mikkonen 2012). Mikroskopointia käytetään eniten valkosolujen erittelylaskennassa ja retikulosyyttien eli nuorten punasolujen laskennassa. Retikulosyyttien manuaalinen laskenta tehdään vitaalivärjäytyistä perifeerisen veren sivelyvalmisteista, missä nuorten punasolujen ribonukleinihapot värjäytyvät. Tasaotantamenetelmällä saadaan luotettavin laskentatulokset, ja siinä retikulosyyttejä lasketaan vähintään sata kappaletta ainakin 30 näkökentästä. (Savolainen 2007, 92.)

Näytteeksi sivelyvalmisteeseen otetaan tavallisesti laskimoverinäyte tai kapillaariverinäyte. Laskimoverinäyte tulisi ottaa antikoagulanttia sisältävään EDTA-putkeen (etyleenidiamiinitetraetikkahappo). Hyytymistä estävä vaikutus perustuu etyleenidiamiinitetraetikkahappoon (EDTA) siten, että EDTA sitoo plasman kalsiumin, jolloin hyytyminen estyy. Veren sivelyvalmisteissa EDTA:a käytetään myös, koska se säilyttää parhaiten verisolujen koon sekä muodon. (Hemminki & Pelttari 2011; Savolainen ym. 2012.) Sivelyvalmiste tulee tehdä mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Näytteitä saa säilyttää huoneenlämmössä korkeintaan 6 tuntia, koska sen jälkeen tehtävissä sivelyvalmisteissa esiintyy usein artefaktoja. (Mellanoura 2008, 13.)

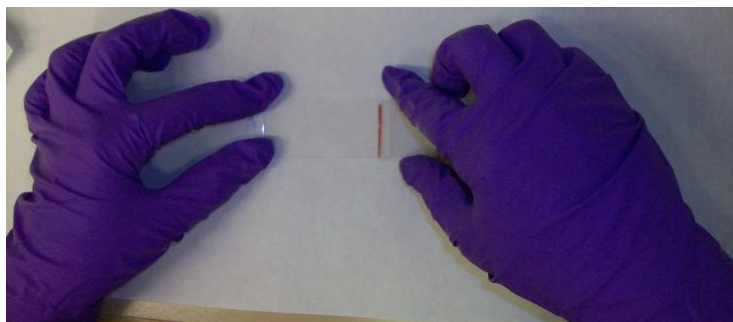
Sivelyvalmisteen tekeminen aloitetaan sekoittamalla näyteputket huolellisesti. Laadukkaan sivelyvalmisteen takaa puhtaat ja pölyttömät välineet. Mikäli objektilasi on rasvainen, värit voivat saostua ja solut kasaantua. Huokoinen objektilasi voi taas aiheuttaa taustavärjäytymisen lisääntymistä. Vetolasin tulee olla puhdas ja ehjä, ja sen tulee olla objektilasia kapeampi. Jos vetolasissa on pieniäkin rikkoutumia, voivat solut jakautua epätasaisesti ja sivelystä voi tulla epätasainen. Vetolasin ollessa likainen voi se aiheuttaa sivelyvalmisteeseen reikiä ja viiruja. On suositeltavaa tehdä useita sivelyvalmisteita samasta näytteestä. (Hemminki & Pelttari 2011; Mellanoura 2008, 12-13.)

1. Laita puhdas objektilasi pöydälle ja tiputa näytettä (5-10 μl) noin senttimetrin päähän hiospäästä (kuva 3). Sivelyvalmisteen tekeminen on aloitettava välittömästi, sillä jos sivelyn tekeminen viivästyy, isot solut, kuten neutrofiilit ja monosyytit sijaitsevat sivelyvalmisteen häntäpäässä epäsuhteisesti. (Hemminki & Pelttari 2011; Mellanoura 2008, 13.)



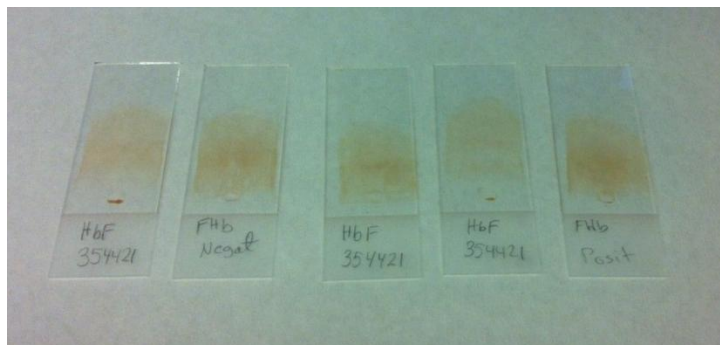
KUVA 3. Veripisaran sijainti objektilasilla © Rissanen & Räsänen 2013

2. Aseta vetolasi veripisaran eteen (vasemmalle puolelle) noin 30-45 asteen kulmassa. Vedä vetolasi veripisaran päälle, jolloin veri leviää tasaisesti vetolasin reunan alle (kuva 4). Työnnä vetolasi kevyesti objektilasin toiseen päähän. Kiinnitä huomiota myös, että veto tehdään oikealla nopeudella, koska liian hidas veto vaikuttaa solujen jakautumiseen sivelyssä. Sivelystä tulee noin 3 cm pitkä, mikäli veripisara on oikean kokoinen ja sivelyn tulisi loppua noin 1 cm ennen objektilasin päätyä. Onnistunut sivelyvalmiste ohenee tasaisesti loppua kohti ja sivelyvalmisteeseen syntyy pyöreästi loppuva häntäalue. Vetolasin kulmaa, vetonopeuden sekä veripisaran kokoa muuttamalla voidaan vaikuttaa sivelyvalmisteen paksuuteen ja pituuteen. Ohuen sivelyvalmisteen saa, mikäli veto on hitaampaa ja vetokulma on pienempi. Lyhyt ja paksu sivelyvalmiste saadaan, mikäli veto on nopeampaa ja vetokulma on suurempi. (Mellanoura 2008, 12-13; Savolainen ym. 2012.)



KUVA 4. Sivelyn vetäminen objektilasille © Rissanen & Räsänen 2013

3. Kuivaa sivelyvalmiste välittömästi joko kevyesti ilmassa heiluttelemalla tai puhaltimen alla. Mikäli sivelyvalmistetta ei kuivata riittävän nopeasti solut saattavat kutistua, tumarakenne muuttua ja sytoplasma vakuuloitua. (Mellanoura 2008, 13.)
4. Merkitse huolellisesti sivelyvalmisteseen tunnistetiedot objektilasin hiospään lyijykynällä tai värjäyksen kestäväällä tussilla tai tarralla (kuva 5) (Hemminki & Pelttari 2011, 13).



KUVA 5. Sivelyvalmisteet värjäystä varten © Rissanen & Räsänen 2013

3.1.2 Kleihauer-Betke-testi

Kleihauer-Betke-testi on käytetyin menetelmä äidin fetomaternaalivuodon osoittamiseen. Vuonna 1957 Kleihauer, Bauer ja Betke kuvasivat Kleihauer-Betken happoeluointi-testin, joka perustuu punasolujen sisältämän fetaalihemoglobiinin haponkestävyyteen, kun taas punasolujen sisältämä aikuisen hemoglobiini on herkkä hapolle. Happokäsittelyssä aikuisen hemoglobiini liukenee pois punasoluista, jolloin haponkestävä fetaalihemoglobiini jää soluihin. (Kim & Makar 2012; Mehta & Keohane 2012, 403.) Kun sivelyvalmiste värjätään hematoksyliinillä ja eosiinilla, fetalisolut värjäytyvät tumman vaaleanpunaisiksi, kun taas äidin punasolut näkyvät lasilla värittöminä solubarjoina (Kim & Makar 2012).

Fetomaternaalivuodon määrä voidaan laskea fetalisolujen prosentuaalisen määrän avulla:

$$FMH (ml) = \frac{\text{Kleihauer - Betke - testistä saadut fetalisolut (\%)} \times 5000 \text{ ml}}{100}$$

Vuosien aikana alkuperäisestä Kleihauer-Betke-testistä on tehty useita muunnelmia. Esimerkiksi Sigma Aldrichin Fetal hemoglobiini-käyttöohjeessa Kleihauer-Betke-testistä on kehitetty muunnos, jossa reagensseina käytetään sitraattifosfaattipuskuria ja etanolia sekä väriainoksina hapanta hematoksyliiniliuosta ja eosini B -liuosta. Tässä menetelmässä äidin veren sivelyvalmiste kiinnitetään etanolilla, minkä jälkeen sivelyvalmiste upotetaan 37 °C:seen sitraattifosfaattipuskuriin. Happokäsittelyn jälkeen sivelyvalmiste värjätään mikroskooppista tutkimusta varten. (Sigma Aldrich 2005.)

Tässä opinnäytetyössä fetaalihemoglobiinvärjäyksen aikana käytettiin väriainoksina hematoksyliiniä ja eosini B -liuosta. Hematoksyliini- ja eosini-väriainoksia käytetään tavallisesti HE-värjäyksessä eli hematoksyliini-eosini-värjäyksessä. HE-värjäys on eniten käytetty histologinen värjäys maailmassa.

HE-värjäyksessä hematoksyliini värjää solun tumman sinimustaksi, kun taas eosini värjää solun sytoplasman ja sidekudoksen säikeet vaaleanpunaisen, oranssin ja punaisen vaihtelevilla sävyillä. Hematoksyliini on luonnonväri, jonka värjäävä muoto on hematoksyliinin hapettumistuote hemateiini. HE-värjäyksen lisäksi hematoksyliiniä käytetään monien erilaisten värjäysten kanssa, sillä siitä on monia modifikaatioita. (Naukkarinen 2008, 38.) Eosiini on taas ksantiiniväri, jota on saatavana kaupallisesti seuraavina väreinä: eosini Y, etyyli eosini ja eosini B. Eosinilla voidaan myös värjätä punasolut ja eosinofiilien granulat punaiseksi, kun näytettä ylidiffataan. (Bancroft & Layton 2013, 173-174.)

3.2 Spektrofotometrinen menetelmä

Fetaalihemoglobiinin määrittämiseen käytetty spektrofotometrinen menetelmä on kvantitatiivinen eli vastaus ilmoitetaan lukuarvona (Åkerman & Jokela 2010, 49). Fotometriksi kutsutaan laitetta, joka mittaa absorboitunutta tai transmittoitunutta valoa. Spektrofotometrillä voidaan mitata valon intensiteettiä jatkuvasti säädettävän monokromaattorin (prisma tai hila) avulla halutulla aallonpituudella yleensä UV-alueelta infrapuna-alueelle saakka. (Halonen 2004, 66-67.) Opinnäytetyössämme käytetyn ABL835 FLEX-verikaasuanalysaattorin toiminta perustuu 128 aallonpituudella mittaavaan spektrofotometriin. Verikaasuanalysaattorin mittausaallonpituusalue on 478-672 nm. Spektrofotometri on liittynyt optisen säikeen avulla yhdistettyyn hemolysaattoriin ja mittauskammioon. (Radiometer 2006.)

Spektrofotometrin toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin, jossa yhdisteen mitattu absorbanssi on suoraan verrannollinen yhdisteen konsentraatioon ja valon näytteessä kulkemaan matkaan. Yhdisteen mitattu absorbanssi määritellään niin, että logaritmi lasketaan valon intensiteetin suhteesta ennen ja jälkeen yhdisteessä kulkevan matkan. (Radiometer 2006.) Koska tutkittava näyttemateriaali sisältää usein fotometristä mittausta häiritseviä tekijöitä eli ikterisyyttä, sameutta, ja hemolyyysiä, näitä häiriötekijöitä on pyritty poistamaan kahden aaltopituuden mittaustekniikalla (Halonen 2004, 56).

3.2.1 Verikaasuanalysaattori

Bioanalytiikot tekevät verikaasuanalyseja potilasnäytteistä Islabin Kuopion aluelaboratorion kliinisen kemian laboratoriossa (ISLAB 2014e). Verikaasuanalysaattorilla voidaan analysoida arteria-, kappilaari- ja venakokoverta. (ISLAB 2014a; ISLAB 2014d). Laboratorio ottaa laskimo- ja ihopistosnäytteet, kun taas valtimoverinäytteet ja keskuslaskimonäytteet ottavat hoitoyksikön henkilökunta (Hedberg, Koivula, Hallikainen, Kaila, Kuopus, Natri & Huotari 2013).

Laskimosta otettaviin näytteisiin käytetään kalsiumtitratulla hepariinilla käsiteltyä ruiskua. Laskimonäytteenotossa voidaan käyttää joko ruiskua ja neulaa tai ruiskua ja siipineulaa tai ruiskua ja vakuumputken ohjainta. (Hedberg ym. 2013.) Näytteenoton jälkeen on tärkeää, että ruisku sekoitetaan välittömästi, koska se sisältää hyytymisenestoainetta eli hepariinia. Näytteen sekoittaminen on erityisen tärkeää, sillä hyytynyttä näytettä ei voi analysoida. Jopa pienet mikrohyytymät likaavat laitteen, mikä aiheuttaa ongelmia laboratorioissa ja viivästyttää verikaasuvastauksia. Sekoittamisen jäl-

keen ilmakuplat poistetaan näytteestä, koska jopa pienet ilmakuplat vaikuttavat pO₂-arvoihin. Verikaasunäyte säilyy huonosti, minkä vuoksi huoneenlämmössä säilytetty näyte on analysoitava 10-15 minuutin sisällä näytteenotosta. Näyte voidaan jäähdyttää heti näytteenoton jälkeen jääkaappilämpöisen kylmägeelin välissä, jolloin se voidaan analysoida tunnin sisällä näytteenotosta. (Hedberg ym. 2013; Väisänen, Metsävainio & Romppanen 2006, 122.)

Verikaasuanalysointorit mittaavat happo-emästasetta kuvaavien parametrien lisäksi hapen kuljetukseen ja kudoksiin luovutukseen liittyviä parametrejä, elektrolyytti- ja metaboliittikonsentraatioita. Analysoitavia hapenkuljetukseen liittyviä parametrejä ovat hapen osapaine pO₂, kokonaishemoglobiini, karboksihemoglobiini, fetaalihemoglobiini, methemoglobiini ja hematokriitti. Näistä johdetaan monia laskennallisia parametrejä, jotka kuvaavat kudoksen kykyä käyttää happea hyväkseen. Hemoglobiini mitataan joko fotometrisesti tai se lasketaan johtokykyyn perustuvan hematokriittimittauksen perusteella. (Laitinen 2004, 65-66.) Verikaasututkimuksissa valtimo- eli arteriakokoverestä tutkittavasta laajasta aB-verikaasuanalyysistä (aB-VeKaasL) voidaan selvittää potilaan happoemästasapainon ja kudosten hapetustilaa. Laskimo- eli venaverestä tutkittavasta laajasta vB-verikaasuanalyysistä (vB-VeKaasL) voidaan selvittää myös samoja indikaatioita kuin laajasta aB-verikaasuanalyysistä. (ISLAB 2014a; ISLAB 2014d.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSONGELMAT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa menetelmävertailu spektrofotometrisen ja sytokeemiallisen menetelmän välillä. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli saada tutkimustuloksia fetaali-hemoglobiinimittauksen kahdesta eri menetelmästä. Fetaali-Hb-näytteitä mitattiin automaattisella menetelmällä ABL835 FLEX-verikaasuanalysaattorilla, joka sijaitsee Kuopion yliopistollisen sairaalan vastasyntyneiden teho-osastolla. Manuaalinen menetelmä eli hemoglobiinin fetaalivärjäys suoritettiin Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) klinisen hematologian laboratoriotiloissa, jossa mikroskojoiitiin värjättyjä fetaalisoluja. Tutkimuksen näytemuotona olivat Kuopion yliopistollisen sairaalan vastasyntyneiden teho-osastolta saadut hepariiniruiskunäytteet, jotka analysoitiin rinnakkain verikaasuanalysaattorilla ja hemoglobiinin fetaalivärjäyksellä. Opinnäytetyössä verrattiin verikaasuanalysaattorista ja mikroskopoinnista saatuja tulostasoja toisiinsa.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli arvioida automaattisen menetelmän luotettavuutta. Opinnäytetyön tavoitteena oli toteuttaa menetelmävertailu laboratorioprosessin laatuvaatimusten mukaisesti. Työn tilaajana oli Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymän (Islab) Puijon laboratorio. Opinnäytetyömme tulosten perusteella Islab voi käynnistää jatkotutkimuksia siitä, saadaanko automaattisella menetelmällä tarpeeksi luotettavia tuloksia diagnostiseen käyttöön.

Opinnäytetyön tutkimuskysymyksiä ovat:

1. Ovatko manuaalisen ja automaattisen menetelmän tulokset keskenään vertailukelpoisia?
2. Onko automaattinen menetelmä luotettava fetaalihemoglobiinin määrittämiseen?

5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

5.1 Tutkimusmenetelmä

Opinnäytetyömme tutkimusote on määrällinen eli kvantitatiivinen tutkimus, jonka keskeisinä piirteinä ovat perusjoukko, perusjoukosta valittu otos, taulukkomuotoon muodostetut muuttujat sekä tilastollisesti käsiteltävä aineisto (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 136). Tutkimuksen perusjoukkona ovat vastasyntyneet, joiden otokseksi olimme valinneet 18 vastasyntyneen verinäytettä. Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla voidaan selvittää lukumääriin ja prosenttiosuuksiin liittyviä kysymyksiä. Tutkittavia asioita kuvataan numeroiden avulla ja tulokset havainnollistetaan kuvioin ja taulukoin. (Heikkilä 2008, 16.) Tämän jälkeen tutkimuksesta saadut numeraaliset tulokset tulkitaan ja selitetään sanallisesti (Vilkkä 2007, 14). Opinnäytetyössä fetaalihemoglobiinin mikroskopoinnin ja verikaasuanalysaattorin antamat vastaukset saadaan prosentteina, mitkä kokoamme Excel-taulukkoon ja teemme niistä selventäviä kuvioita, jotka tarkastelemme sanallisesti.

Empiirinen tutkimus on havainnoivaa tutkimusta, joka perustuu teoreettisen tutkimuksen perusteella kehitettyihin menetelmiin. Empiirisessä tutkimuksessa voidaan testata, toteutuuko käytännössä jokin teoriasta johdettu hypoteesi. Tutkimusongelmana voi olla myös jonkin käyttäytymisen syiden tai ilmiön selvittäminen tai ratkaisun löytyminen siihen, miten jokin asia pitäisi toteuttaa. Empiiriset tutkimukset jaetaan eri tyyppeihin esimerkiksi tarkoituksen, tutkimusotteen tai tiedonkeruumenetelmän mukaan. (Heikkilä 2008, 15.) Opinnäytetyömme on kokeellinen, vertaileva tutkimus, joka kuuluu empiirisiin tutkimuksiin. Kokeellinen tutkimusmenetelmä tutkii tietyn ilmiön vaikutusta johonkin kontrolloidussa olosuhteissa. Tutkimus on systemaattista ja kontrolloitua havaintojen tekoa. (Anttila 2005, 183-184.) Opinnäytetyössä on kokeellisen tutkimuksen piirteitä, koska siinä tutkitaan kahden eri menetelmän vaikutusta saman näytteen fetaalihemoglobiiniarvoon laboratorio-olosuhteissa. Vertailevan tutkimuksen tavoitteena on paremmin ymmärtää tutkittavaa asiaa kahden tai useamman tutkimuskohteen avulla. Vertailevan tutkimuksen myötä asioiden väliset erot tulevat selkeämmin esille. (Vilkkä 2007, 21.) Opinnäytetyössä on vertailevan tutkimuksen piirteitä, koska siinä verrataan fetaalihemoglobiinin mittausta kahdella eri menetelmällä. Opinnäytetyössä tutkitaan sitä, ovatko verikaasuanalysaattorin ja fetaalivärijäyksestä saadut tulokset keskenään vertailukelpoisia.

5.2 Tulosten analysointi

Tutkimusaineiston keräämisen jälkeen tutkimusaineisto käsitellään niin, että sitä voidaan tutkia numeraalisesti taulukko-ohjelman avulla. Tallennusvirheiden välttämiseksi aineiston käsittelyssä tulee olla huolellinen, jotta tulokset syötetään oikein. Tietojen tallennuksesta johtuvat mittausvirheet vaikuttavat tutkimustulosten luotettavuuteen. Määrällisen analyysin perusmenetelmiä, joita ovat muun muassa tunnusluvut, hajontaluvut ja korrelaatiokerroin käytetään aineiston analysoinnissa. (Vilkkä 2007, 106, 114, 118.)

Keskiarvo on jakauman sijaintia kuvaava tunnusluku ja keskiluku. Keskiarvo lasketaan jakamalla muuttujan arvojen summa havaintoaineiston määrällä. Keskiarvon käyttäminen edellyttää välimatka-

tai suhdeasteikkoista aineistoa. Keskiarvo on herkkä aineiston poikkeaville arvoille, jos aineistossa on muutama muista arvoista selkeästi poikkeava arvo. (Heikkilä 2008, 82-83; Tähtinen ym. 2011, 71-72.)

Keskihajonta ja variaatiokerroin ovat hajontalukuja, joiden avulla voidaan ilmaista sitä, kuinka paljon mittaustulokset vaihtelevat. Mitä lähempänä mittaukset ovat keskimääräistä arvoaan tai toisiaan, sitä pienempi hajonta niissä on. Keskihajonnan avulla voidaan kuvata sitä, kuinka hajallaan muuttujien arvot ovat keskiarvon ympärillä. Keskihajonnalla voidaan laskea ainoastaan välimatka- ja suhdeasteikon tasoisia muuttujia. Opinnäytetyössä tutkimustulosten keskihajonnan laskemisessa käytettiin otoskeskihajonta-funktiota. CV % eli variaatiokertoimen avulla voidaan verrata eri suuruusluokkaa olevien muuttujien arvojen hajontaa. Variaatiokerroin ilmoittaa muuttujien suhteellista hajontaa, ja sillä voidaan laskea ainoastaan suhdeasteikon tasoisia muuttujia. Variaatiokerroin on keskihajonnan ja keskiarvon suhde, ja se ilmaistaan prosentteina. (Heikkilä 2008, 85-88.)

Regressioyhtälön avulla voidaan kuvata muuttujien välistä lineaarista yhteyttä. Regressiosuoran yhtälö on $y = a + bx$. Yhtälössä a osoittaa suoran ja y -akselin leikkauspistettä ja b osoittaa regressiosuoran kulmakerrointa. (Tähtinen ym. 2011, 149.)

Kahden muuttujan välistä riippuvuutta voidaan ilmaista korrelaatiokertoimen avulla. Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla voidaan osoittaa lineaarisen riippuvuuden suuruus välimatka-asteikon tasoisissa muuttujissa. Kerroin voi olla välillä -1 ja $+1$, missä arvo -1 kuvaa täydellistä negatiivista korrelaatiota, kun taas arvo $+1$ kuvaa täydellistä positiivista korrelaatiota. Korrelaatio on negatiivista silloin, kun muuttujan X kasvaessa muuttuja Y pienenee. Korrelaatio on positiivista silloin, kun muuttujan X kasvaessa myös muuttuja Y kasvaa. Lineaarista riippuvuutta ei ole, jos korrelaatiokertoimen arvo on 0 . Muuttujien välillä on lineaarinen riippuvuus, kun arvo poikkeaa selvästi nolasta. Kahden muuttujan välillä olevan tilastollisen riippuvuus on voimakasta, kun korrelaatiokerroin on suurempi tai yhtä suuri kuin $0,7$. (Heikkilä 2008, 203-204; Tähtinen, Laakkonen & Broberg 2011, 140-142.)

5.3 Luotettavuus

Kaikissa tutkimuksissa tulee arvioida tehdyn tutkimuksen luotettavuutta, vaikka tutkimukset pyritään aina tekemään niin, ettei virheitä tapahdu. Reliabiliteetti ja validiteetti ovat käsitteitä, joilla voidaan kuvata tutkimuksen luotettavuutta. Kun mittaamisessa on vähän satunnaisvirheitä sekä otos edustaa perusjoukkoa, tutkimuksen luotettavuus on hyvä. (Hirsjärvi ym. 2007, 226; Vilka 2007, 152.) Reliabiliteetti tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta ja tarkkuutta. Reliabiliteetti arvioi tutkimustulosten pysyvyyttä mittauksesta toiseen, eivätkä tulokset saa olla sattumanvaraisia. Mikäli tutkimuksen otoskoko on kovin pieni, tulokset ovat sattumanvaraisia (Heikkilä 2008, 30). Tutkimustulokset voidaan todeta reliaabeleiksi esimerkiksi silloin, kun kaksi arvioijaa päätyy samaan tulokseen (Hirsjärvi ym. 2007, 226; Vilka 2007, 30). Reliabiliteettia tarkastellaan myös tutkimuksen jälkeen mittaamalla samaa asiaa kahden kysymyksen avulla ja lasketaan niiden välinen korrelaatiokerroin. Luotettavassa tutkimuksessa korrelaatio on lähellä ykköstä. (Heikkilä 2008, 187.)

Validiteetti eli pätevyys tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä sen on myös tarkoitus mitata (Hirsjärvi ym. 2007, 227). Mikäli tutkimukselle ei ole asetettu täsmällisiä tavoitteita, tutkitaan helposti vääriä asioita. Tutkimuksen validiteetti tulee varmistaa etukäteen huolellisesti tarkoin harkitulla tiedonkeruulla ja suunnittelulla. Tutkimuksen jälkeen validiteettia on hankala enää tarkastella. (Heikkilä 2008, 29-30.) Validiteetti liittyy sovellusalueen teoriaan sekä sen käsityksiin. Sisäisellä validiteetilla tarkoitetaan, vastaavatko tutkimuksen mittaukset teoriaosassa esitettyjä käsitteitä. Ulkoinen validiteetti tarkoittaa, että muut tutkijat tulkitsevat tutkimustulokset samalla tavoin. (Heikkilä 2008, 186). Vilkan mukaan tutkimuksen validiteetti on hyvä, mikäli tutkimuksen aikana tutkija ei ole joutunut käsitteiden tasolla harhaan sekä systemaattiset virheet puuttuvat. Tutkijan tulisi tarkastella validiteettia koko tutkimuksen aikana sekä pitää samanaikaisesti tutkimuspäiväkirjaa. (Vilka 2007, 150-152.)

5.4 Laatu laboratoriossa

Laboratoriotutkimusten virhelähteet voidaan jakaa preanalyttisiin, analyttisiin ja postanalyttisiin ongelmiin. Preanalytiikka jaetaan tutkimuksen pyyntövaiheeseen, näytteenottoon sekä näytteen kuljetukseen ja säilytykseen. Näissä jokaisessa vaiheessa voi tapahtua virheitä, jotka voivat johtaa tilanteeseen, jossa tutkimustulos on merkityksetön. Analytiikkaan vaikuttavia virhelähteitä ovat muun muassa heikkotasoinen mittausmenetelmä, väärä tekniikka sekä viallinen laite. Analytiikkaan liittyviä ongelmia ovat virheet pipetoidussa tilavuuksissa, analysointilämpötiloissa, standardien punnituksissa sekä mittausprosessissa. Määritysmenetelmän väärä vakiointi voi johtaa liian mataliin tai liian korkeisiin arvoihin. Menetelmien analyysitasoa ja laitteistojen kuntoa tuleekin jatkuvasti seurata laadunvarmistuksen avulla. (Penttilä 2004, 35-37.)

Laboratorioiden laadunvarmistuksen toteutumista valvotaan lainsäädännön kautta. Kliinisissä laboratorioissa laadunvalvonnan merkitys on korostunut. Toiminnan oikeellisuudesta voidaan näin varmistua. Suomessa Labquality Oy järjestää kaikilla laboratorioaloilla laadunvarmistuskierroksia. Labquality Oy:n toiminta jaetaan sisäiseen ja ulkoiseen laadunohjaukseen. Sisäisessä laadunohjauksessa jokaisen laboratorion tulee jatkuvasti tutkia omien näytteiden tai kaupallisten tuotteiden avulla omien menetelmiensä tasoa. Tavoiterajojen avulla laboratorio pyrkii siihen, että pystyisi toistamaan analyysin kerrasta toiseen hyvän analyttisen kokonaisvirheen rajoissa. Labquality Oy järjestää kierroksia, joilla valvotaan ulkoista laadunohjausta. Laboratoriot voivat päätellä omien menetelmien tasoa vertailemalla omia tuloksia muiden saamiin arvoihin. (Penttilä 2004, 36-38.)

6 TUTKIMUKSEN KULKU

Päätimme valita tämän opinnäytetyön aiheen syksyllä 2012. Keväällä 2013 tutustuimme lähdemateriaaleihin tekemällä kirjallisuushakuja eri tietokannoista ja etsimällä kirjallisuutta koulun kirjastosta. Kevään aikana teimme opinnäytetyön aihekuvauksen, minkä jälkeen tapasimme ohjaavan opettajamme Jaana Hoffrenin sekä Islabin laboratoriossa työskentelevän sairaalakemistin Mikko Mätön. Keskustelimme opinnäytetyön etenemisestä sekä saimme käyttöömmme fetaalihemoglobiinimittauksen työhöjeen sekä verikaasuanalysaattorin toimintaa käsittelevän materiaalin. Kesällä 2013 vierailimme KYS:n tieteellisellä kirjastolla etsimässä kirjallisuutta opinnäytetyötä varten. Suunnittelimme kesän aikana tulevan syksyn ja kevään aikataulua ja työstimme opinnäytetyön työsuunnitelmaa. Jotta tutkimuksessa saatiin korkeita fetaalihemoglobiiniarvoja, tutkimusnäytteiksi valittiin vastasyntyneiden verinäytteitä. Tavallisesti fetaalihemoglobiinia määritetään äidin EDTA-verestä, mutta tässä opinnäytetyössä fetaalihemoglobiinia tutkittiin vastasyntyneiden hepariiniruiskunäytteistä. Tutkimusta suunniteltaessa pohdimme, vaikuttaako hepariiniveri fetaalivärjäytyvyyteen, koska tavallisesti näytemuotona on EDTA-veri.

Elokuussa 2013 lähetimme työsuunnitelman arvioitavaksi opinnäytetyömme ohjaavalle opettajalle Jaana Hoffrenille. Elokuun aikana pidimme koululla suunnitelmaseminaarin, josta saimme tarpeellisia neuvoja opinnäytetyötä varten. Lisäksi olemme allekirjoittaneet opinnäytetyön ohjaus- ja hankkeistamissopimuksen sairaalakemistin Mikko Mätön ja ohjaavan opettajamme Jaana Hoffrenin kanssa. Islab on myöntänyt opinnäytetyön toiminnallista osuutta varten tutkimusluvan (liite 1). Koska tutkimuksessa käytetään ylijäämänäytteitä, emme tarvitse tutkimuseettisen toimikunnan lausuntoa.

Toiminnallinen osuus suoritettiin vuonna 2013 loka-marraskuun aikana. 10.10–14.10.2013 harjoittelimme fetaalivärjäyksen suorittamista. Tutkimusnäytteitä kerättiin 5.11–15.11.2013, jolloin varsinainen tutkimusnäytteiden analysointi tapahtui. Tutkimuksemme eteni keräämällä tutkittavia näytteitä vastasyntyneiden teho-osastolla sijaitsevasta keräyslaatikosta. Tutkimuksen aikana kokonaisnäytemääräksi kertyi 18 näytettä. Yhden päivän tutkittavien näytteiden määrä oli 1-4 näytettä. Mikäli näytteitä saapui vielä iltapäivällä, päätimme kiinnittää näytteet ja värjätä ne vasta seuraavana päivänä.

Verikaasuanalysaattorin määrittämät tulokset otettiin laitteen muistista niin, että hepariiniruiskussa olevaa näytenumeroa verrattiin laitteessa olevaan tuloslistaan. Jokaiselle tutkimusnäytteelle tulostettiin verikaasulaitteen muistista tuloslista, josta näkyi verikaasulaitteen määrittämä HbF-arvo. Tutkimusnäytteen samaa näytenumeroa käytettiin fetaalihemoglobiinivärjäyksessä, jotta varmistuttiin siitä, että tutkimusnäytteiden tulokset eivät sekoittuneet keskenään. Toiminnallisen osuuden suorittamisen jälkeen kokosimme tutkimustulokset Excel-taulukoihin, jotka sairaalakemisti Mikko Mättö tarkasti. Opinnäytetyön kirjallisessa osuudessa esittelemme tutkimuksen työvaiheet, tutkimuksen tulokset sekä tarkastelemme saatuja tuloksia sekä tulosten luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä. Kirjallinen osuus on valmis huhtikuussa vuonna 2014, minkä jälkeen opinnäytetyö siirtyy arvioitavaksi opettajille. Toiminnallisen osuuden aikana kustannuksia kertyi ainoastaan fetaalihemoglobiinivärjäyksestä. Tutkimusta varten tutkimusnäytteitä ei analysoitu enää verikaasukaasulaitteella, koska tut-

kimusnäytteiden näytemäärä oli hyvin pieni. Hemoglobiinin fetaalivärjäyksessä materiaaleja kului muun muassa peitinlasien, kapillaarien ja väriliuosten käytöstä. Verikaasuanalysaattorin toiminta olisi vaatinut kontrollien ja reagenssien käyttöä. Työn vaatimia resursseja olivat myös laboratorion henkilökunnan käyttämä aika opinnäytetyön toiminnallisen osuuden suunnitteluun ja ohjaamiseen.

6.1 Tiedonhaku

Opinnäytetyötä varten haimme lähdeaineistoa seuraavista tietokannoista: PubMed, CINAHL, Medic ja Terveysportti. Löysimme englanninkielisiä lehtiartikkeleita taulukon 2 mukaisesti. Suomenkielisiä lähteitä löytyi hyvin vähän, ainoastaan Medic- ja Terveysportti -tietokannoista. Koska osassa hakutulosissa hakutulosten määrä oli suuri, rajasimme hakua kokotekstiversioihin ja 2000-luvun julkaisuihin. Hakusanoilla hemoglobiini OR fetal löytyi runsaasti lähdeaineistoa 2000-luvulta, joten hakutulosten rajaaminen julkaisuvuoden avulla ei auttanut. Tarkastelimme sellaisia lähteitä, joissa otsikko kuvasi hyvin opinnäytetyön aihetta.

TAULUKKO 2. Tiedonhaku

Tietokanta	Hakusanat	Hakutulosten määrä
PubMed	hemoglobiini AND fetal	9805
	hemoglobiini OR fetal	514690
	hemoglobiini F	7982
	haemoglobiini F	7982
	fetal hemoglobiini AND measure	353
CINAHL	hemoglobiini AND fetal	266
	hemoglobiini OR fetal	29303
	hemoglobiini F	14
	haemoglobiini F	8
	fetal hemoglobiini AND measure	1
Medic	hemoglobiini AND fetal	4
	hemoglobiini OR fetal	524
	hemoglobiini F	91
	haemoglobiini F	6
Terveysportti	fetaalihemoglobiini	11

6.2 Aiemmat tutkimukset

Fetaalihemoglobiinin määrittämisestä eri menetelmillä on tehty monia kansainvälisiä tutkimuksia. Menetelmävertailua sytokemiallisen ja spektrofotometrisen menetelmän välillä fetaali-Hb-mittauksessa ei ole kuitenkaan aiemmin tehty. ICSH:n (International Committee for Standardization in Haematology) suositukset fetaalihemoglobiinin määrittämiseen ovat alkaneet jo vuodesta 1979. Fetaalihemoglobiinin tutkimiseen on kehitetty useita analyttisiä menetelmiä, joita ovat korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC), kapillaarivyoikelektroforeesi, kapillaari-iselektrinen fokusointi, sytokemiallinen menetelmä, virtausmittaus, emäksen denaturointi kahdessa minuutissa sekä radiaalinen immunodiffuusio. (Stephens ym. 2012.)

Schumacher ja Randolph (2012, 212-218) ovat julkaisseet Yhdysvalloissa tehdyn tutkimuksen, jonka tarkoituksena oli kehittää yksinkertainen ja edullinen menetelmä kvantitatiiviseen HbF-tutkimukseen, jota käytettäisiin kehitysmaissa määrittämään sirppisoluanemiapotilaan herkkyyttä hydroksiurea-hoitoon. Menetelmäkehittämisen aikana näytemuodoiksi valittiin normaaleja kokoverinäytteitä (HbA), napaverinäytteitä (HbF) sekä näiden kahden näytemuodon 50:50-sekoitusta. Tutkimuksessa käytettiin samaa Fetal Hemoglobin-kittiä kuin tässä opinnäytetyössä. Tutkimuksessa käytetty menetelmä perustuu Kleihauer-Betke-menetelmään, jossa kokovereen lisätään heikkoa sitruunahappopuskuriliuosta, minkä jälkeen punasoluista eluoidun HbA:n määrä mitataan spektrofotometrisesti. HbF:n prosentuaalinen osuus voitiin laskea HbA:n ja HbF:n käänteisestä suhteesta. Tutkimuksessa onnistuttiin määrittämään fetaalihemoglobiini tutkimusnäytteistä. Tutkimuksen avulla saatiin perusta sille, että tätä spektrofotometristä menetelmää voisi hyödyntää jatkossa sirppisoluanemiaa sairastavien potilaiden hydroksiureahoidossa, vaikka kyseisessä tutkimuksessa käytetyt näytteet eivät olleet sirppisoluanemiaa sairastavia potilaiden näytteitä.

6.3 Tutkimuksen valmistelu

Opinnäytetyön toiminnallinen osuus vaati etukäteen suunnittelua näytteiden keräämisessä ja analysoinnissa. Tutkimus alkoi tutkimusnäytteiden keräämisellä, joka toteutettiin yhteistyössä KYS:n vastasyntyneiden teho-osastolla työskentelevän henkilökunnan kanssa. Sairaalakemisti Mikko Mättö ohjeisti henkilökuntaa säilyttämään aiemmin verikaasukaasulaitteella analysoidut hepariinirisku-näytteet näytelaatikkoon. Tutkimuksen aikana haimme tutkimusnäytteet tästä näytelaatikosta.

Tutkimuksen valmistelusta lähtien kiinnitimme erityistä huomiota työturvallisuuteen, sillä tutkimme potilasnäytteitä, jotka saattavat olla tartuntavaarallisia. Tutkimuksen valmistelussa käsitelimme myös haitallisia kemikaaleja, minkä vuoksi reagenssien valmistelun aikana käytimme vetokaappia ja suojahanskoja (liite 2). Tutkimuksen aikana huolehdimme jätteiden hävittämisestä laboratorion ohjeita noudattaen ja kestävän kehityksen mukaisesti. Hävitimme terävät ja pistävät esineet sekä biologiset jätteet niille tarkoitettuihin jäteastioihin. Käytimme reagensseja ja väriliuoksia tutkimuksen onnistumisen kannalta tarvittavan määrän.

6.4 Laitteet, reagenssit ja työvälineet

Opinnäytetyömme toiminnallisen osuuden suorittamiseen tarvittavat työtilat olivat Islabin klinisen hematologian solumorfologian yksikkö sekä KYS:n vastasyntyneiden teho-osaston laboratoriotila. Tutkimusnäytteet oli analysoitu ABL835 FLEX-verikaasuanalysointilaitteella, joka sijaitsee KYS:n vastasyntyneiden teho-osastolla. Sytokemialliseen menetelmään käytettävät mikroskoopit olivat Islabin klinisen hematologian laboratoriotiloissa. Lisäksi käytimme Savonia-ammattikorkeakoulun Kuopion terveysalan mikroskooppeja, joilla kuvasimme tutkimusnäytteitä opinnäytetyötä varten. Tutkimuksessa käytetyt työvälineet on esitetty taulukossa 3.

Fetaalivärjäystä varten valmistimme 80 % etanolin ja sitraattifosfaattipuskuriliuoksen värjäyskippeihin Islabin Hemoglobiinin fetaalivärjäys -työohjeen mukaisesti. Hematoksyliiniliuos ja eosini B -liuos

olivat valmiita käyttöliuoksia. Värjäyksen aikana käytimme luokan II laboratoriovettä, joka on asennettu tulemaan suoraan toisesta hanasta. Fetaalivärjäyksessä näytelaseja voidaan huuhdella joko suoraan hanaveden alla tai värjäyskipoissa heiluttamalla näytelaseja. Valitsimme värjäystä varten värjäyskipoissa huuhtelun, jotta solut eivät irtoa näytelasista niin helposti.

Laboratoriossa käytetään yleensä puhdistettua vettä, joka saadaan, kun vesijohtovedestä poistetaan suolat ja orgaaniset aineosat. Laboratoriovesi jaetaan eri tyyppiluokkiin puhdistusasteen mukaan. NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) luokittelee laboratorioveden kolmeen eri luokkaan (I, II, III) veden ominaisvastuksen mukaan. Kun veden suolapitoisuus vähenee, ominaisuusvastus kasvaa. Höyrytisläus on tyypillinen vedenpuhdistusmenetelmä, millä kertaalleen suoritettuna saadaan luokan III vettä. Höyrytisläus vaatii runsaasti raakavettä ja energiaa jonka vuoksi se on nykyisin korvattu käänteisosmoosimenetelmällä. Tällä menetelmällä poistetaan sähkövirran ja suodatuksen avulla vesijohtovedestä 90-97 % suoloista ja 95-99 % bakteereista ja orgaanisista partikkeleista. Kyseinen vesi vastaa luokan III laboratoriovettä. Tätä vettä voidaan käyttää laboratoriovälineiden pesussa ja reaktiokyvettien huuhtelussa, mutta luokan III vesi ei kelpaa laboratorioanalyysiin, vaan sitä tulee puhdistaa lisää. Puhdistus tapahtuu poistamalla vedestä käytännöllisesti katsoen kaikki suolat ja ionisoituneet yhdisteet ionivaihtohartsilla, bakteerit ja partikkelit membraanisuodattimella ja liuenneet orgaaniset aineet aktiivihiehillä. Näin saadaan luokan I laboratoriovettä, jota käytetään vakioliuosten, reagenssien ja laaduntarkkailuliuosten valmistamiseen. (Åkerman & Jokela. 2010, 52-53.)

Sitraattifosfaattipuskuriliuos valmistettiin mittaamalla mittalasilla 10 ml sitraattifosfaattipuskurikonentraattia ja 90 ml puhdistettua vettä, jotka kaadettiin värjäyskippon. Sitraattipuskuriliuoksen lämpötila tuli säätää 37 °C:seen, joten laitoimme liuoksen lämpömittarin kanssa lämpöhauteeseen jo heti fetaalivärjäyksen alussa. Koska sitraattifosfaattipuskuriliuos haihtuu lämpötilan noustessa, laitoimme parafilmin kipun suojaksi. 80 % etanoli valmistettiin 100 ml mittalasiin, joka kaadettiin lopulta värjäyskippon. Aluksi lisäsimme mittalasin ja automaattipipetin avulla 83,3 ml 96 % etanolia mittalasiin, minkä jälkeen kaadoimme siihen puhdistettua vettä 100 ml asti. Koska etanoli on haihtuva kemikaali, pidimme värjäyskipon päällä kantta.

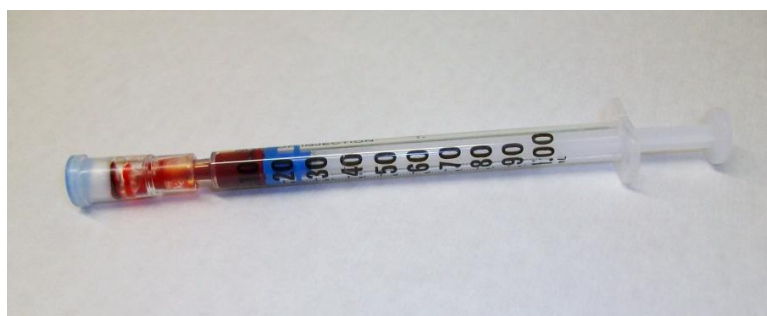
TAULUKKO 3. Tutkimuksessa käytetyt työvälineet

Työvaihe	Työvälineet
Sivelyvalmisteen teko	lasikapillaareja
	objektilasit
	vetolasit
	suojakäsineet
Hemoglobiinin fetaalivärjäys	värjäyskipot ja kannet
	suojakäsineet
	mittalasis
	muovipipetit, automaattipipetit ja pipetinkärjet
	parafilmi
	lämpömittari
	sekuntikello
	pinsetit
	imeytyspaperia
	suppilo
	Mikroskopointi
peitinlasit	
solulaskijat	
mikroskoopin puhdistusvälineet	
särmäisjäteastia objektilaseille ja peitinlaseille	

6.5 Näytemuodot

Tutkimukseen valittujen näytteiden näytemuoto oli heparinisoitu kokoveri (kuva 6). Hepariniiruisku-näytteet olivat peräisin vastasyntyneiden teho-osastolta, ja niistä oli aiemmin tutkittu muun muassa aB/vB- VekaasL-verikaasuanalyysinä. Tutkimusnäytteet olivat joko arteria- tai venaverta. Valitsimme tutkimukseen vain sellaisia näytteitä, joiden näytteenotosta oli kulunut alle vuorokausi.

Hepariinin antikoaguloiva vaikutus perustuu siihen, että hepariini toimii antirombiinina eli se estää fibriniin muodostumisen fibrinogeenista ja näin estää veren hyytymisen. Hepariniä on elimistössä luonnostaan, joten se on teoreettisesti paras hyytymisenestoaine. Se ei muuta näytteen pH-arvoa eikä hemolysoi eli hajota punasoluja. Hyytymisen esto, jonka hepariini aiheuttaa, kestää vain 24 tuntia. Yleensä hepariniä käytetään plasmanäytteissä esimerkiksi plasman kalium-, proteiini- tai kolesterolimäärityksissä. Hepariniilla on taipumus aiheuttaa valkosolujen aggregaatiota, joten se ei sovellu valkosolulaskennan antikoagulantiksi. (Matikainen, Miettinen & Wasström 2010, 76; Savolainen 2007, 87.)



KUVA 6. Hepariniiruisku © Rissanen & Räsänen 2013

Verikaasuanalysointilaitteilla voi ajaa vain kapillaarinäytteitä ja ruiskunäytteitä. EDTA:n käyttö verikaasuanalysointilaitteissa analysoidujen näytteiden antikoagulanttina ei ole suositeltavaa, koska ne saattavat vioittaa kalium- ja glukoosi-elektrodien ioniselektiivisiä kalvoja. Lisäksi EDTA vaikuttaa voimakkaasti muun muassa veren pH-, ionisoidun kalsium- ja oksimetrituloksiin. (Radiometer 2006; Siemens.) Tämän vuoksi EDTA-veri oli ainoastaan fetaalihemoglobiinivärjäyksessä positiivisen ja negatiivisen kontrollin näytemuotona. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit otettiin hematologian laboratorioripisteestä, jossa näytteistä oli aiemmin analysoitu muun muassa verenkuvatutkimuksia.

6.6 Fetaalihemoglobiinin määrittäminen verikaasuanalysointilaitteilla

Sairaalakemisti Mikko Mättö oli jättänyt näytelaatikon vastasyntyneiden teho-osaston laboratoriohuoneeseen, jonne osaston sairaanhoitajat varastoivat aiemmin analysoidut näytteet. Tutkimustamme varten valitsimme näytelaatikosta vain sellaisia ruiskuja, joissa oli näytenumero tallella. Tämän näytenumeron avulla saimme verikaasulaitteen muistista HbF-tuloksen (kuva 7).



KUVA 7. ABL835 FLEX-verikaasuanalysointilaitteisto © Rissanen & Räsänen 2013

ABL835 FLEX-verikaasuanalysointilaitteella työskenneltäessä verinäyte siirretään aluksi hemolysaattorisessa olevaan kyvetiin, jonka lämpötila on säädetty 37 °C:seen. Punasolujen seinämien rakenne hajotetaan 30 kHz:n taajuudella hemolysoimalla 1 µl näytettä ultraviolettivalolla. Punasolujen sisältö sekoittuu veren plasman kanssa muodostaen kirkkaan liuoksen. Koska punasolut eivät sisällä bilirubiinia, hemolysin jälkeen punasolujen intrasellulaarinen neste laimentaa plasman bilirubiinin. Välttääkseen näytteessä olevia ilmakuplia ja parantaakseen hemolysointia, ilman ylipainetta ylläpidetään koko hemolysin ja mittauksen ajan. (Radiometer 2006.)

Halogeenilamppu lähettää valoa kyvetiin infrapunafilterin ja kaksoiskuperan linssin läpi. Valo siirtyy kyvetin läpi optisen säikeen ohjaamana. Valo kulkee raon läpi ohjaten sen suoraan yhdistetyn peilin ja koveran ristikon kautta. Ristikko erottelee valon 128 eri aallonpituudelle, jolloin peili tarkentaa 128 valosignaalia fotodiodimatriisiin. (Radiometer 2006.)

Fotodiodimatriisiin jokaisella 128 diodilla tai pikselillä on oma aallonpituutensa, minkä ansiosta monokromaattisen valon signaalit muuttuvat sähkövirraksi. Valon signaalien intensiteetti ja sähkövirta mitataan jokaisella 128 diodilla, mikä muodostaa tutkittavan näytteen absorptiospektrin. Spektri lähetetään analysaattorin tietokoneelle, jossa oksimetrin parametriarvot lasketaan. (Radiometer 2006.)

Näytteessä oleva HbF voidaan havaita fetaalioksihemoglobiinin, cO_2HbF avulla. Koska fetaalioksihemoglobiinilla ja aikuisen oksihemoglobiinilla on erilaiset spektrit, fetaalioksihemoglobiinin konsentraatio voidaan mitata spektrien erilaisten kokojen ansiosta. (Radiometer 2006.)

Analysaattorissa oksimetrin parametriarvo fetaalihemoglobiinille lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$FHbF = \frac{cHbF}{ctHb}$$

FHbF = fetaalihemoglobiinifraktio

cHbF = fetaalihemoglobiinin konsentraatio näytteessä

ctHb = kokonaishemoglobiinin konsentraatio

Verikaasuanalysointori vertaa fetaali-oksi-Hb:n ja -aikuks-oksiHb:n spektrejä ja määrittää sen jälkeen fetaali-oksi-Hb:n pitoisuuden, josta se edelleen laskee fetaali-Hb:n konsentraation. Tulos fetaalihemoglobiinille ilmoitetaan prosentteina totaali-Hb:sta. (Radiometer 2006.)

6.7 Fetaalihemoglobiinivärijäys ja näytteiden mikroskopiointi

Fetaalihemoglobiinivärijäys suoritettiin Islabin hematologian laboratoriossa hemoglobiinin fetaalivärijäys (B- Hb- F- vr) -työohjeen mukaisesti. Fetaalihemoglobiinivärijäys aloitettiin tekemällä sivelyvalmisteet positiivisesta ja negatiivisesta kontrollista sekä tutkimusnäytteistä. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit haimme hematologian laboriopisteestä, jossa näytteistä oli aiemmin analysoitu muun muassa perusverenkuva. Hepariniiruisussa olevat tutkimusnäytteet haettiin vastasyntyneiden teho-osaston laboratoriohuoneesta.

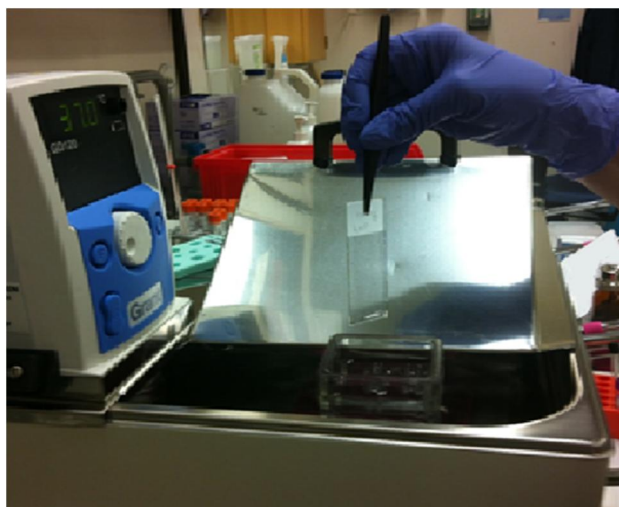
Positiivisena kontrollina käytetään enintään viikon ikäisen vastasyntyneen EDTA-verta, koska fetaalihemoglobiini muodostaa pääosan hemoglobiinista syntymähetkellä. Negatiivisena kontrollina on aina aikuisen miehen EDTA-veri, koska fetaalihemoglobiinin määrä on aikuisella noin 1-2 %. (Rajamäki & Salmi 2007, 224.) Fetaalihemoglobiiniarvo voi nousta raskauden aikana, joten tästä syystä negatiivisena kontrollina käytetään miehen verinäytettä (Stephens ym. 2012).

Fetaalihemoglobiinivärijäystä varten sivelyvalmisteet tehtiin sivelyvalmisteen teko- ohjeen mukaisesti. Teimme jokaisesta näytteestä kaksi sivelyä. Fetaali-Hb- tutkimuksessa on erityisen tärkeää, että sively on mahdollisimmat ohut ja tasainen, jotta punasolujen tunnistaminen on luotettavaa. Sively-

valmisteet ilmakeivattiin 10 minuuttia. Jos sivelyvalmistetta ei kuivata riittävän nopeasti solut saattavat kutistua, tumarakenne muuttua ja sytoplasma vakuolisoitua (Mellanoura 2008, 13).

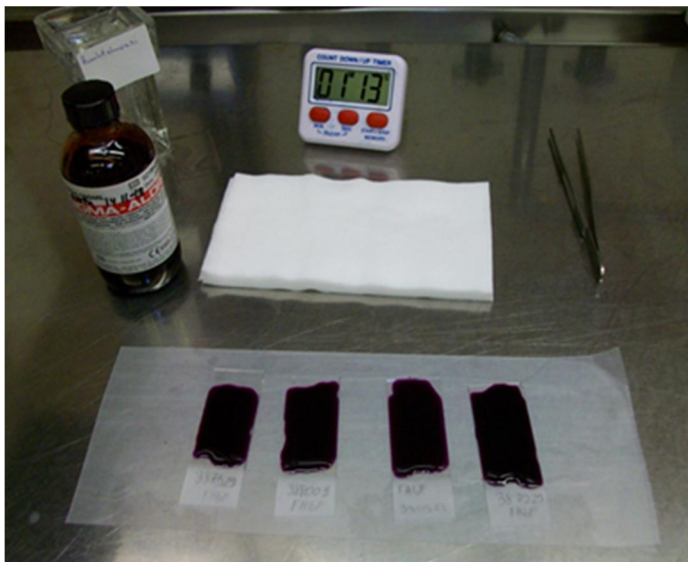
Seuraavaksi sivelet kiinnitettiin 5 minuutin ajan 80 % etanolilla. Etanolin tehtävänä on kiinnittää solut objektilasille. Fiksaation on oltava täydellistä, koska epäpuhtaus tekee valmisteeseen värjäysartefakteja. (Bain 2002, 11.) Kiinnitetyt sivelyvalmisteet huuhdeltiin puhdistetulla vedellä värjäysmaljassa. Huuhtelun aikana solut voivat helposti irrota sivelyvalmisteesta huuhteluliokseen, joten sivelyvalmisteet on huuhdeltava varovaisesti, mutta riittävästi. Sivelyvalmisteet ilmakeivattiin heti joko välitöntä tai seuraavana päivänä tehtävää värjäystä varten.

Upotimme sivelyvalmisteet 5 minuutiksi laimennettuun 37 °C:seen sitraattifosfaattipuskuriliuokseen, jonka pH on 3.3. Eluointiaika ja puskurin pH on oltava tarkasti kontrolloituja (Stephens ym. 2012). Sitraattifosfaattipuskurikäsittelyn aikana aikuisen hemoglobiini liukenee pois punasoluista, ja haponkestävä fetaalihemoglobiini jää soluihin (Kim & Makar 2012; Mehta & Keohane 2012, 403). Laseja tuli nostella varovasti joka minuutin jälkeen (kuva 8). Tämän jälkeen lasit huuhdeltiin huolellisesti ja varovaisesti puhdistetulla vedellä, minkä jälkeen lasit ilmakeivattiin huolellisesti. Lasit tuli kuivata huolellisesti, jotta ei tulisi värjäysartefakteja (Airaksinen 2012, 2).



KUVA 8. Sitraattifosfaattipuskurikäsittely © Rissanen & Räsänen 2013

Kuivauksen jälkeen sivelyvalmisteet siirrettiin värjäyspisteelle parafilmin päälle. Jokaisen lasin päälle pipetoitiin noin 500 µl hematoksyliiniliuosta kertakäyttöpipetillä (kuva 9). Väriliuos levitettiin lasille varovaisesti kertakäyttöpipetillä. Pipetti ei saanut osua lasin pintaan, koska muuten näyte naarmuttuisi. Hematoksyliiniväriin annettiin vaikuttaa 3 minuuttia, minkä aikana hematoksyliini värjää solun tuman sinimustaksi (Bancroft & Layton 2013, 173). Ylimääräinen väri lasilta kaadettiin lavuaariin, minkä jälkeen huuhoimme lasit puhdistetulla vedellä värjäyskipossa. Ylimääräinen vesi ravisteltiin varovasti lavuaariin.



KUVA 9. Näytelasien värjäys hematoksyliinillä © Rissanen & Räsänen 2013

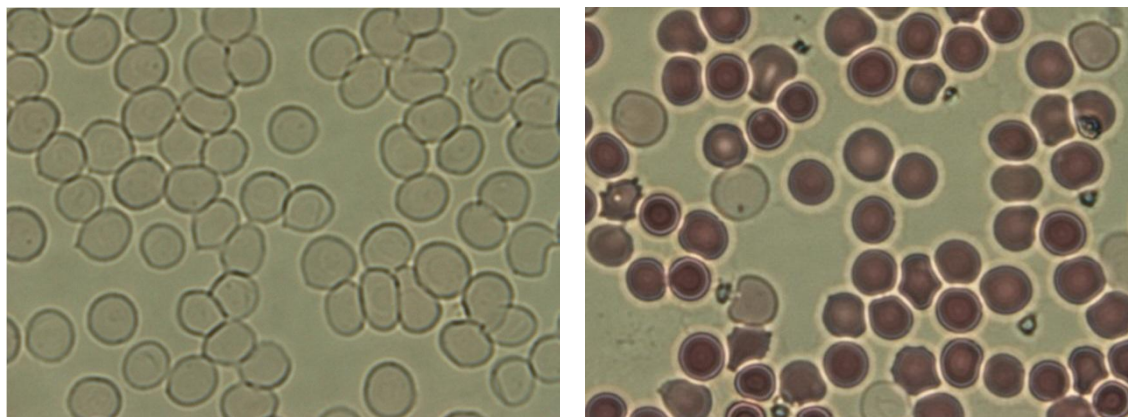
Seuraavaksi lasit laitettiin parafilmin päälle, ja jokaisen lasin päälle pipetoitiin noin 500 μ l eosini B-liuosta kertakäyttöpipetillä. Väriliuos levitettiin tasaisesti lasille, minkä jälkeen värin annettiin vaikuttaa 4 minuuttia (kuva 10). Lopuksi ylimääräinen väri kaadettiin lavuaariin, ja lasit huuhdottiin puhdistetulla vedellä, joka ravisteltiin lavuaariin. Värjätyt lasit ilmakeivattiin, jotta niitä voitiin mikroskoida.



KUVA 10. Näytelasien värjäys eosini B-liuoksella © Rissanen & Räsänen 2013

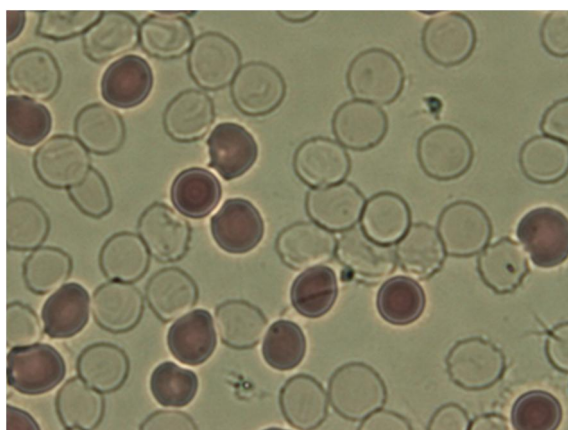
Sytokemiallisen värjäyksen jälkeen sivelyvalmisteen mikroskopointi aloitetaan makroskooppisella tarkastelulla. Siinä tarkastellaan värjäyksen ja sivelyn laatua, sivelyn pituutta, paksuutta ja muotoa, värin tasaisuutta sekä poikkeavien värikojen esiintymistä. Makroskopioidun jälkeen sivelyvalmistetta mikroskopoidaan tarkastelemalla veren soluja. (Hemminki & Peltari 2011, 32; Savolainen 2010, 73.) Fetaalihemoglobiinia mikroskopoidaessa objektin päälle laitetaan varovasti kuiva peitinlasi ilman monteerausainetta. HbF-solut mikroskopoidaan 100x-suurennuksella immersioöljyn avulla. On varoitettava, että öljyä ei pääse objektin päälle, koska tällöin solut muuttuvat epätarkoiksi ja negatiivisia soluja on lähes mahdotonta erottaa. (Airaksinen 2012, 3.)

Aloitimme mikroskopoinnin positiivisesta ja negatiivisesta kontrollista varmistaaksemme värjäyksen onnistumisen (kuva 11). Värjäyksen jälkeen happamuutta kestävät HbF-solut näkyvät lasilla tummaksi värjäytyneinä, kun taas aikuisen hemoglobiinisolut näkyvät taustaa vasten haaleiksi värjäytyneinä solubarjoina (Swirsky & Bain 2001, 275-276). Positiivisessa kontrollissa eli vastasyntyneen verinäytteessä tulisi näkyä paljon punaisiksi värjäytyneitä fetaalisoluja. Negatiivisessa kontrollissa eli aikuisen miehen verinäytteessä tulisi näkyä ainoastaan värjäytymättömiä solubarjoja.



KUVA 11. Negatiivinen ja positiivinen kontrolli EDTA-verestä © Rissanen & Räsänen 2013

Positiivisen ja negatiivisen kontrollien jälkeen mikroskoimme tutkittavia näytteitä (kuva 12). Tarkastelimme punasoluja sivelyn ohuesta päästä. Kumpikin opinnäytetyön tekijä mikroskoipoi jokaisen tutkimusnäytteen, joten jokaisen näytteen mikroskopointitulos oli rinnakkaisten mikroskopointitulosten keskiarvo. Ennen mikroskopointia emme tienneet verikaasuanalysointia antamaa tulosta näytteelle.



KUVA 12. Tutkimusnäyte, johon on tehty fetaalihemoglobiinivärjäys © Rissanen & Räsänen 2013

Fetaalivärjättyjä punasoluja mikroskoipoitiin 1000 kappaletta. Laskimme solulaskijalla värjäytyneiden fetaalisolujen ja värjäytymättömien punasolujen määrä 1000 punasoluun saakka. Laskimme HbF-tuloksen 1000 punasolulle seuraavan esimerkin mukaisesti:

HbF-soluja on laskettu 790 ja värjäytymättömiä punasoluja on laskettu 210, jolloin

$$HbF = \frac{790}{1000} \%$$

$$HbF = 79 \%$$

7 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimusaineisto koostuu 18 näytteestä (n=18), jotka on analysoitu rinnakkain kahdella eri menetelmällä. Fetaalivärjäyksestä saatujen mikroskopointitulosten ja verikaasuanalysointista saadut tutkimustulokset on esitetty tulostaulukkoina sekä tilastollisessa muodossa pylväsdiagrammeina ja pistediagrammeina. Tutkimustulokset käsiteltiin tilastollisesti regressioanalyysin, keskiarvon, keskihajonnan ja variaatiokertoimen avulla. Tuloksia esitettäessä on käytetty menetelmien välistä eroyksikköä ja ero prosenttia.

TAULUKKO 4. Rinnakkaiset mikroskopointitulokset ja niiden välinen eroyksikkö ja ero prosentti

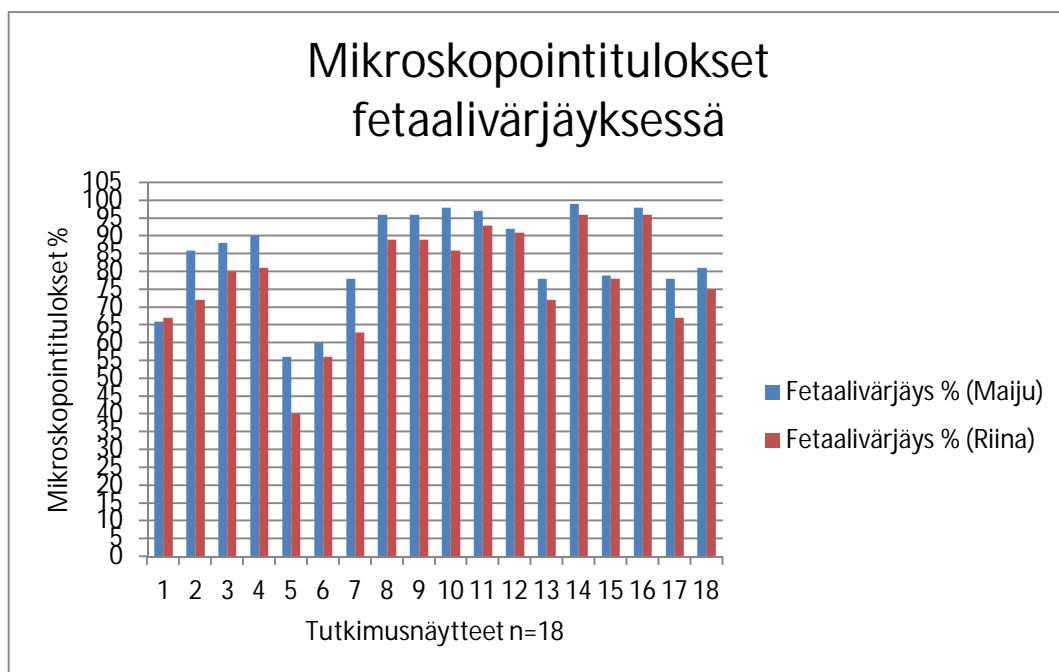
Näyte	Fetaalivärjäys % (Maiju)	Fetaalivärjäys % (Riina)	Ero	Ero %
1	66	67	-1	-1,49
2	86	72	14	19,44
3	88	80	8	10,00
4	90	81	9	11,11
5	56	40	16	40,00
6	60	56	4	7,14
7	78	63	15	23,81
8	96	89	7	7,87
9	96	89	7	7,87
10	98	86	12	13,95
11	97	93	4	4,30
12	92	91	1	1,10
13	78	72	6	8,33
14	99	96	3	3,13
15	79	78	1	1,28
16	98	96	2	2,08
17	78	67	11	16,42
18	81	75	6	8,00
Keskiarvo	84,22	77,28	6,94	10,24

Taulukossa 4 on esitetty fetaalivärjäyksen rinnakkaiset mikroskopointitulokset sekä niiden välinen eroyksikkö ja ero prosentti. Taulukkoon 4 on laskettu mikroskopointitulosten eroyksikön ja ero prosentin keskiarvot. Rinnakkaisia mikroskopointituloksia tarkasteltaessa (taulukko 4) nähdään, että rinnakkaisissa mikroskopointituloksissa ei ole suurta eroa näytettä 5 lukuunottamatta. Näytteessä 5 rinnakkaisten mikroskopointitulosten ero prosentti on 40 %.

TAULUKKO 5. Fetaalivärjäyksen rinnakkaiset mikroskopointitulokset ja niiden keskiarvo (n=18)

Näyte	Fetaalivärjäys % (Maiju)	Fetaalivärjäys % (Riina)	Fetaalivärjäys % (keskiarvo)
1	66	67	66,5
2	86	72	79
3	88	80	84
4	90	81	85,5
5	56	40	48
6	60	56	58
7	78	63	70,5
8	96	89	92,5
9	96	89	92,5
10	98	86	92
11	97	93	95
12	92	91	91,5
13	78	72	75
14	99	96	97,5
15	79	78	78,5
16	98	96	97
17	78	67	72,5
18	81	75	78

Fetaalivärjäyksen rinnakkaiset mikroskopointitulokset on esitetty taulukossa 5, johon on myös laskettu rinnakkaisten mikroskopointitulosten keskiarvo. Fetaalivärjäyksestä saadut mikroskopointitulokset esitellään prosenttiyksikköinä.



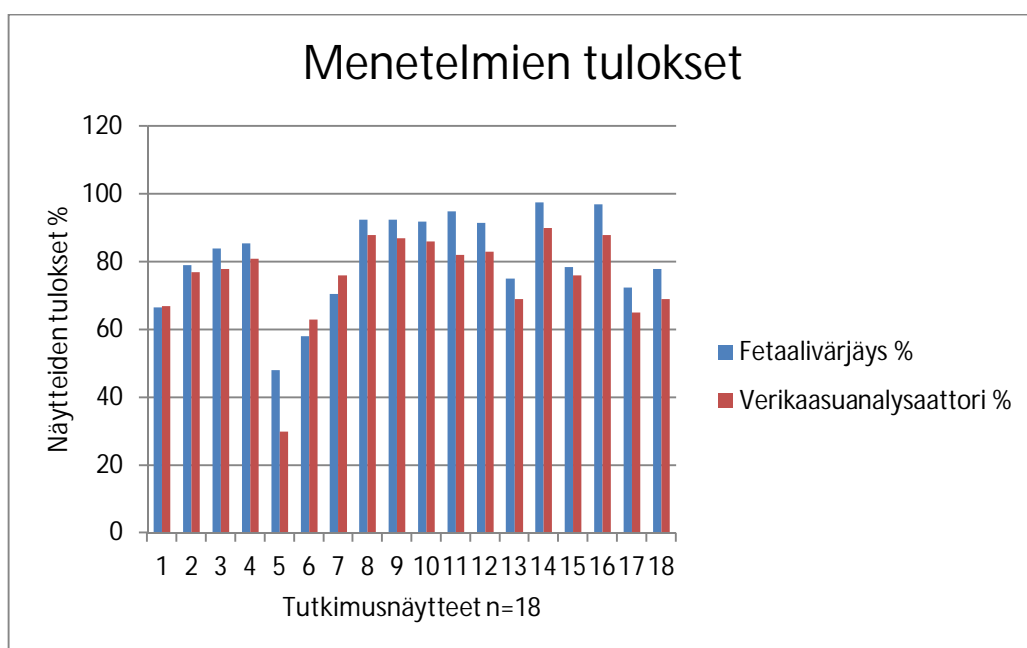
KUVIO 1. Rinnakkaiset mikroskopointitulokset fetaalivärjäyksessä (n=18)

Kuviossa 1 havainnollistetaan fetaalivärjäyksessä saatujen mikroskopointitulosten rinnakaistulokset, jotta voidaan nähdä Maijun ja Riinan mikroskopointitulosten välisten tulostasojen eroavaisuudet. Näytettä 1 lukuunottamatta Maijun mikroskopointitulosten tulostaso on korkeampi kuin Riinan mikroskopointitulosten tulostaso.

TAULUKKO 6. Menetelmien tulokset ja niiden välinen eroyksikkö ja eroprosentti

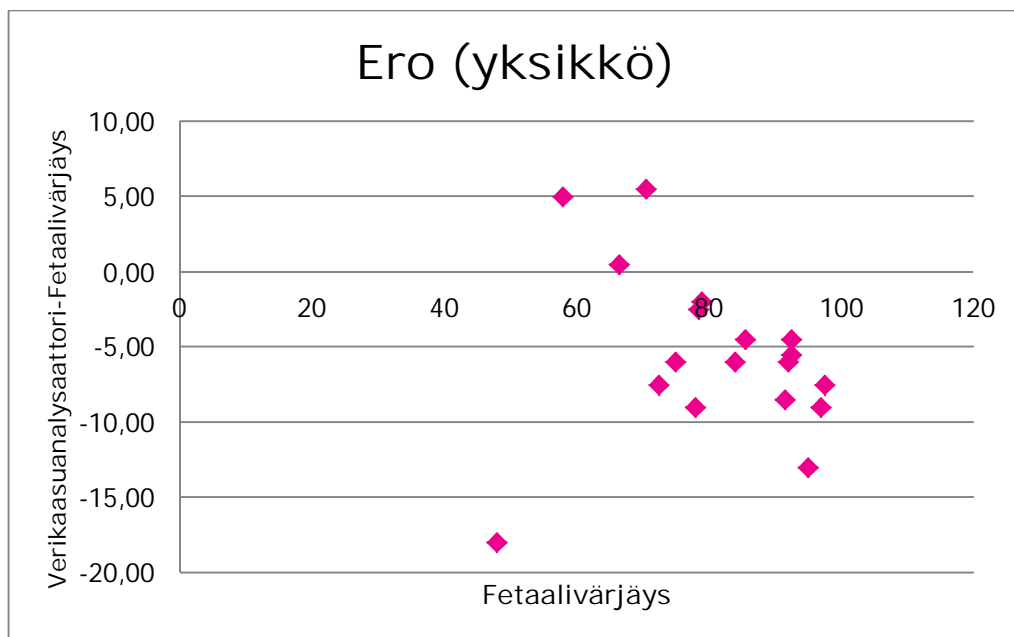
Näyte	Verikaasuanalysoija %	Fetaalivärjäys %	Ero	Ero %
1	67	66,5	0,50	0,75
2	77	79	-2,00	-2,53
3	78	84	-6,00	-7,14
4	81	85,5	-4,50	-5,26
5	30	48	-18,00	-37,50
6	63	58	5,00	8,62
7	76	70,5	5,50	7,80
8	88	92,5	-4,50	-4,86
9	87	92,5	-5,50	-5,95
10	86	92	-6,00	-6,52
11	82	95	-13,00	-13,68
12	83	91,5	-8,50	-9,29
13	69	75	-6,00	-8,00
14	90	97,5	-7,50	-7,69
15	76	78,5	-2,50	-3,18
16	88	97	-9,00	-9,28
17	65	72,5	-7,50	-10,34
18	69	78	-9,00	-11,54

Taulukossa 6 on esitetty verikaasuanalyysaattorin ja fetaalivärjäyksen tulokset jokaiselle tutkimusnäytteelle. Fetaalivärjäyksen tulokset ovat fetaalivärjäyksestä saatujen rinnakkaistulosten keskiarvoja. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa havaitaan, että verikaasuanalyysaattorin määrittämä pienin HbF-arvo on 30 % (näyte 5) ja suurin HbF-arvo on 90 % (näyte 14). Fetaalivärjäyksestä mikroskoipoitu pienin HbF-arvo on 48 % (näyte 5) ja suurin HbF-arvo on 97,5 % (näyte 14). Verikaasuanalyysaattorin määrittämät tulokset ovat välillä 30-90 % ja fetaalivärjäyksestä saadut tulokset ovat välillä 48–97,5 %, joten fetaalivärjäyksestä on saatu korkeampia tuloksia kuin verikaasuanalyysaattorista. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa (taulukko 6) havaitaan, että menetelmien väliset eroyksiköt ja eroprosentit vaihtelevat tutkimusnäytteiden välillä. Suurin eroyksikkö menetelmien välillä on -18,00 (näyte 5). Pienin eroyksikkö menetelmien välillä on 0,50 (näyte 1). Suurin eroprosentti menetelmien välillä on -37,50 % (näyte 5). Pienin eroprosentti menetelmien välillä on 0,75 % (näyte 1).



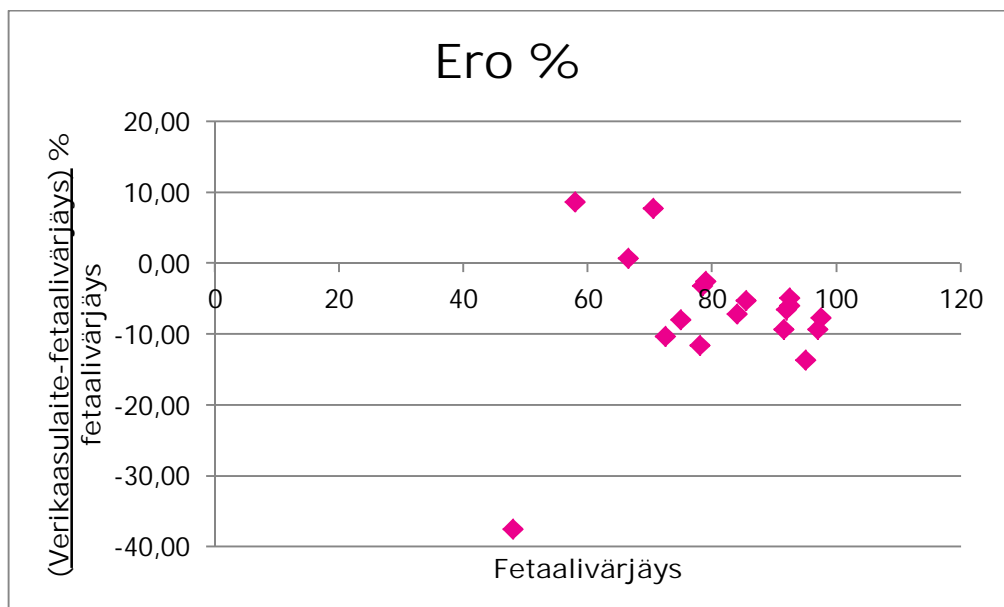
KUVIO 2. Menetelmien tulokset (n=18)

Kuvioon 2 on havainnollistettu fetaalivärjäyksestä ja verikaasuanalyysaattorista saatujen tulosten eroja. Pylväsdiagrammissa on esitetty jokaisen tutkimusnäytteen rinnakkaistulokset. Näytekohtaisesti tarkasteltuna suurimmassa osassa näytteistä fetaalivärjäyksen antama tulostaso on korkeampi kuin verikaasuanalyysaattorin antama tulostaso (kuviio 2). Ainoastaan näytteissä 6 ja 7 fetaalivärjäystulosten tulostaso on matalampi kuin verikaasuanalyysaattorin antama tulostaso.



KUVIO 3. Menetelmien välinen eroyksikkö (n=18)

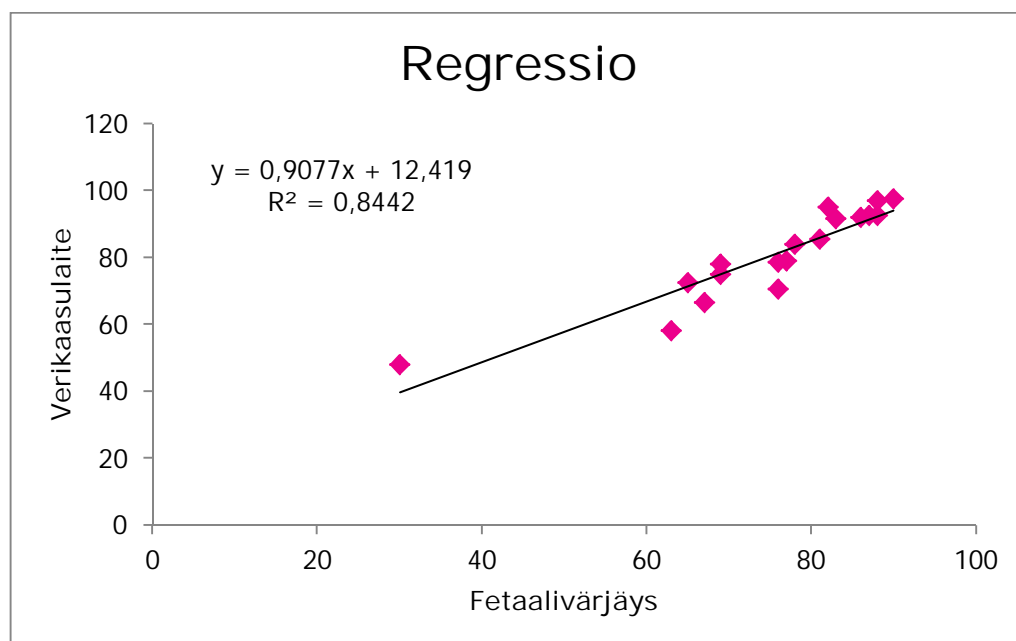
Kuviossa 3 on havainnollistettu menetelmien välisiä eroja eroyksikön avulla, missä suurin osa havaintopisteistä on lähellä toisiaan. Pistediagrammissa olevat pisteet kuvaavat menetelmien eroyksikköä verikaasuanalysointorin ja fetaalivärjäyksen välillä. Pistediagrammissa oleva keskijana kuvaa tutkimusnäytteiden prosentuaalista arvoa fetaalihemoglobiinivärjäyksessä. Kuviossa 3 havaitaan, että suurin osa havaintopisteistä on eroyksikön välillä +10 ja -15. Näytteen 5 eroyksikköä kuvaava havaintopiste sijaitsee kaukana muista havaintopisteistä, ja sen HbF-arvo oli 48 %.



KUVIO 4. Menetelmien välinen eroprosentti (n=18)

Kuviossa 4 on havainnollistettu menetelmien välisiä eroja eroprosentin avulla. Pistediagrammissa olevat pisteet kuvaavat menetelmien eroprosenttia verikaasuanalysointorin ja fetaalivärjäyksen välillä. Diagrammissa oleva keskijana kuvaa tutkimusnäytteiden prosentuaalista HbF-arvoa fetaalihemoglobiinivärjäyksessä. Kuviossa 4 suurin osa havaintopisteistä sijaitsee eroprosentin +10 ja -20 välis-

sä. Näissä tutkimusnäytteissä HbF-arvo oli yli 50 %. Näytteen 5 eroprosentin arvoa kuvaava havaintopiste sijaitsee kaukana muista pisteistä.



KUVIO 5. Regressioanalyysi

Kuviossa 5 regressiosuoran yhtälöksi saadaan $y = 0,9077x + 12,419$. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,9077 ja suoran ja y-akselin leikkauspiste on 12,419. Menetelmien korrelaatioksi saadaan 0,8442. Tutkimustuloksia tarkastellaan regressioanalyysin ja korrelaation avulla (kuvio 5), jotta voidaan arvioida menetelmien välistä lineaarista riippuvutta. Kuviossa 5 nähdään, että havaintopisteet sijoittuvat koordinaatistoon tasaisesti molemmiin puolin regressiosuoraa.

TAULUKKO 7. Menetelmien keskiarvo, keskihajonta ja CV % (n=18)

	keskiarvo	n	keskihajonta	CV %
Fetaalivärjäys	80,75	18	13,96	17,29
Verikaasuanalysointori	75,28	18	14,13	18,77
Ero (yksikkö)	-5,47	18	5,66	
Ero (%)	-7,00 %	18	9,66	

Taulukkoon 7 on esitetty menetelmien keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokerroimet (CV %). Fetaalivärjäystulosten keskiarvo on 80,75 ja verikaasuanalysointorista saatujen tulosten keskiarvo on 75,28. Menetelmien välisen eroyksikön keskiarvo on -5,47 ja eroprosentin keskiarvo on -7,00 %. Fetaalivärjäystulosten keskihajonta on 13,96 ja verikaasuanalysointorin keskihajonta on 14,13. Menetelmien välisen eroyksikön keskihajonta on 5,66 ja eroprosentin keskihajonta on 9,66. Fetaalivärjäystulosten variaatiokerroin on 17,29 % ja verikaasuanalysointorista saatujen tulosten variaatiokerroin on 18,77.

8 POHDINTA

8.1 Tutkimustulosten tarkastelu

Tutkimusnäytteet (n=18) analysoitiin rinnakkain, jotta tutkimustuloksia voidaan verrata fetaalivärjäyksestä ja verikaasuanalyssaattorista saatujen tulosten välillä. Taulukossa 4 on esitetty fetaalivärjäyksen rinnakkaiset mikroskopointitulokset sekä niiden välinen eroyksikkö ja eroprosentti. Taulukkoon 4 on laskettu mikroskopointitulosten eroyksikön ja eroprosentin keskiarvot. Rinnakkaisia mikroskopointituloksia tarkasteltaessa (taulukko 4) nähdään, että rinnakkaisten mikroskopointitulosten eroprosentti 10,24 %. Esimerkiksi retikulosyyttien laskennassa sallittu kokonaisvirhe on 16,8 % (Westgard 2009). Rinnakkaisissa mikroskopointituloksissa ei ole suurta eroa. Kuviossa 1 havainnollistetaan fetaalivärjäyksessä saatujen mikroskopointitulosten rinnakkaistulokset, jotta voidaan nähdä Maijun ja Riinan mikroskopointitulosten välisten tulostasojen eroavaisuudet. Näytettä 1 lukuunottamatta Maijun mikroskopointitulosten tulostaso on korkeampi kuin Riinan mikroskopointitulosten tulostaso. Kuvioista 2 voidaan havaita, että Maijun ja Riinan mikroskopoinnin tulokset olivat molemmilla tasalatauisia koko tutkimuksen ajan.

Kahden eri menetelmän tutkimustulokset ja niiden väliset eroyksiköt ja eroprosentit on esitetty taulukossa 6. Verikaasuanalyssaattorin määrittämät tulokset ovat välillä 30-90 % ja fetaalivärjäyksestä saadut tulokset ovat välillä 48-97,5 %, joten fetaalivärjäyksestä on saatu korkeampia tuloksia kuin verikaasuanalyssaattorista. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa (taulukko 6) havaitaan, että menetelmien väliset eroyksiköt ja eroprosentit vaihtelevat tutkimusnäytteiden välillä. Suurin eroyksikkö menetelmien välillä on -18,00 (näyte 5) ja pienin eroyksikkö on 0,50 (näyte 1). Suurin eroprosentti menetelmien välillä on -37,50 % (näyte 5). Pienin eroprosentti menetelmien välillä on 0,75 % (näyte 1). Taulukon 6 perusteella voidaan havaita, että menetelmien välillä on näytekohtaisesti tarkasteltuna vaihtelua.

Kuviossa 2 nähdään fetaalivärjäyksestä ja verikaasuanalyssaattorista saatujen tutkimusnäytteiden tulostasot. Näytekohtaisesti tarkasteltuna suurimmassa osassa näytteistä fetaalivärjäyksen antama tulostaso on korkeampi kuin verikaasuanalyssaattorin antama tulostaso (kuvio 2). Ainoastaan näytteissä 6 ja 7 fetaalivärjäystulosten tulostaso on matalampi kuin verikaasuanalyssaattorin antama tulostaso. Menetelmien välistä eroyksikköä on havainnollistettu kuviossa 3, jossa suurin osa havaintopisteistä on lähellä toisiaan, koska tutkimusnäytteiden HbF-arvot olivat samaa suuruusluokkaa fetaalihemoglobiinivärjäyksen mikroskopointituloksissa. Näytteen 5 eroyksikköä kuvaava havaintopiste sijaitsee kaukana muista havaintopisteistä, ja sen HbF-arvo fetaalivärjäyksessä oli 48 %. Verikaasuanalyssaattori antoi näytteelle 5 HbF-arvon 30 %, joten tässä näytteessä menetelmien välinen ero on suuri. Tutkimukseen ei tullut muita näytteitä, joissa olisi ollut matalia HbF-arvoja. Yhden matalan HbF-arvon perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä siitä, voiko verikaasuanalyssaattorilla mitata matalia HbF-arvoja. Menetelmien välistä eroprosenttia havainnollistetaan kuviossa 4. Siinä suurin osa havaintopisteistä sijaitsee eroprosentin +10 ja -20 välissä. Näissä tutkimusnäytteissä HbF-arvo oli yli 50 %. Näytteen 5 eroprosentin arvoa kuvaava havaintopiste sijaitsee kaukana muista pisteistä, mikä selittyy sillä, että näytteessä 5 oli matala HbF-arvo.

Tutkimustuloksia tarkastellaan regressioanalyysin ja korrelaation avulla (kuvio 5), jotta voidaan arvioida menetelmien välistä lineaarista riippuvuutta. Kuviosta 5 nähdään, että havaintopisteet sijoittuvat koordinaatistoon tasaisesti molemmin puolin regressiosuoraa. Menetelmien regressiosuoran kulma-kerroin on 0,9077 ja suoran ja y-akselin leikkauspiste on 12,419. Kahden muuttujan välillä oleva tilastollisen riippuvuus on voimakasta, kun korrelaatiokerroin on suurempi tai yhtä suuri kuin 0,7. Korrelaatiokertoimen arvo +1 kuvaa täydellistä positiivista korrelaatiota. (Tähtinen ym. 2011, 140-141.) Koska menetelmien korrelaatioksi saatiin 0,8442, korrelaatio on positiivista ja vahvaa. Korrelaation avulla voidaan todeta, että menetelmien välillä on voimakasta lineaarista riippuvuutta. Korrelaation avulla voidaan todeta, että menetelmien väliset tulokset ovat vertailukelpoisia.

Mittaustulosten välisiä eroja tarkastellaan menetelmien (taulukko 7) keskiarvon, keskihajonnan ja variaatiokertoimen perusteella. Keskiarvo on jakauman sijaintia kuvaava keskiluku (Heikkilä 2008, 83). Verikaasuanalysaattorin tulosten keskiarvo on 75,28 ja fetaalivärjäystulosten keskiarvo on 80,75. Menetelmien keskiarvojen perusteella voidaan havaita, että verikaasuanalysaattorin tulostaso on matalampi kuin fetaalivärjäyksen tulostaso. Menetelmien välisen eroprosentin keskiarvo on -7,00 %, joten menetelmien tulosten välinen ero on 7 %. Kun tulosten välinen ero on alle 10 %, se on oikein hyvä tulos. Esimerkiksi kokoveren hemoglobiinissa 4 % tulosten välistä eroa pidetään sallittuna kokonaiserona sisältäen kokonaisvirheanalyysin sekä biologisen variaation yksilö- ja populaatiotasolla (Westgard 2009).

Keskihajonta ja variaatiokerroin ovat hajontalukuja, joiden avulla voidaan ilmaista sitä, kuinka paljon mittaustulokset vaihtelevat. Keskihajonnan avulla voidaan kuvata sitä, kuinka hajallaan muuttujien arvot ovat keskiarvon ympärillä (Heikkilä 2008, 85-86.) Fetiaalivärjäystulosten keskihajonta on 13,96 ja verikaasuanalysaattorin tulosten keskihajonta on 14,13. Näiden menetelmien keskihajonnat ovat lähellä toisiaan eli muuttujien arvot ovat hajautuneet yhtä paljon menetelmien keskiarvojen ympärille. CV % eli variaatiokertoimen avulla voidaan verrata eri suuruusluokkaa olevien muuttujien arvojen hajontaa (Heikkilä 2008, 87). Variaatiokertoimen avulla voidaan siis arvioida toistuvuutta ja menetelmän toimivuutta. Fetiaalivärjäystulosten variaatiokerroin on 17,29 % ja verikaasuanalysaattorista saatujen tulosten variaatiokerroin on 18,77 %. Menetelmien väliset variaatiokertoimet ovat hyvin lähellä toisiaan, joten toistuvuus on samaa luokkaa molemmissa menetelmissä.

8.2 Menetelmävertailu

Vertaillaessa verikaasuanalysaattorista ja mikroskopoinnista saatuja tuloksia havaittiin, että ne korreloivat hyvin toisiaan. Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että verikaasuanalysaattorin tulostaso on matalampi kuin fetaalivärjäyksestä saatu tulostaso. Näytteessä 5 HbF-arvo oli matalampi kuin muiden näytteiden, ja siinä myös menetelmien välinen ero oli suurempi. Näytteessä 5 menetelmien välinen eroprosentti ja eroyksikkö olivat korkeampia kuin muissa näytteissä. Yhden matalan arvon perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä siitä, voiko verikaasuanalysaattorilla mitata matalia HbF-arvoja. Korkeissa HbF-arvoissa menetelmien välinen ero oli varsin pieni. Keskihajonnan ja variaatiokertoimen perusteella voidaan todeta, että mittaustulokset eivät vaihdelleet merkittävästi me-

netelmien välillä. Koska menetelmien välillä ei ollut suurta eroa, tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että manuaalisen ja automaattisen menetelmän tulokset ovat keskenään vertailukelpoisia. Verikaasuanalysaattori antaa vertailukelpoisia tuloksia korkeissa HbF-arvoissa sytokemialliseen verrattuna. Automaattinen menetelmä on luotettava fetalihemoglobiinin määrittämiseen korkeissa HbF-pitoisuuksissa. On tehtävä lisätutkimuksia siitä, mitaako verikaasuanalysaattori tarpeeksi luotettavasti fetalihemoglobiiniarvoja matalissa pitoisuuksissa.

Sytokemiallisen menetelmä on Islabissa käytössä äidin fetomaternaalivuodon osoittamiseen. Sytokemiallisen menetelmän etuna on, että äidin verinäytteestä voidaan mikroskopoida myös yksittäisiä HbF-soluja, vaikka niitä olisi läsnä vain muutamia. Verinäytteenotto ei vaadi paastoa tai muita erityisvalmisteluja. Sytokemiallisella menetelmällä voidaan määrittää myös sellaisia näytteitä, jotka saapuvat muista maakunnista. Sytokemiallisen menetelmän haittapuolena on, että tutkimus vie aikaa ja on työläs, ja siinä käsitellään haitallisia kemikaaleja. Mikroskooppisen laskennan ongelmana pidetään sen työläyttä ja tulosten huonoa toistettavuutta (Savolainen 2007, 92). Yhden näytteen hinta B-Hb-F-Vr- tutkimukselle eli fetalihemoglobiinivärijäykselle on 45 euroa, joten sytokemiallinen menetelmä on myös suhteellisen kallis tutkimus.

Verikaasuanalysaattorin käyttö on nopeaa ja yksinkertaista, eikä se vaadi haitallisten kemikaalien käyttöä analysoinnin aikana. Spektrofotometrisessä menetelmässä fetali-Hb-tutkimus suoritetaan verikaasulaitteella, joten näytemuotona on oltava heparinisoitu kokoveri. Koska näyte otetaan hepariiniiruiškuun, näytteenotto on haastavampaa kuin sytokemiallisessa menetelmässä. Mikroskopoinnin aikana totesimme, että heparinisoitu kokoveri ei vaikuttanut fetalihemoglobiinivärijäytyvyyteen. Spektrofotometrinen menetelmä ei sovellu maakuntanäytteisiin, koska hepariiniiruišunäytteet eivät säily kauan tutkimuskelpoisina. Spektrofotometrinen menetelmä on edullisempi kuin sytokemiallinen menetelmä, sillä yhden näytteen hinta aB/vB- VerikaasL- tutkimukselle eli verikaasuanalysaattorin käytölle on 9,20 euroa.

8.3 Tulosten luotettavuus

Reliabiliteetti tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta. Tutkimustulokset voidaan todeta reliabeleiksi esimerkiksi silloin, kun kaksi arvioijaa päätyy samaan tulokseen. (Hirsjärvi ym. 2007, 226.) Opinnäytetyön reliabiliteettia kuvaa se, että kaksi mikroskopioijaa tutki saman tutkimusnäytteen, jolloin samasta näytteestä saatiin rinnakkaistulokset. Tämän parinäytetoistettavuuden avulla voidaan arvioida manuaalisen menetelmän sisäistä toistettavuutta. Rinnakkaisissa mikroskopointituloksissa ei ole suurta eroa, mikä lisää tutkimuksen luotettavuutta. Mikroskooppitutkimuksissa luotettavuutta voidaan lisätä käyttämällä kahta arvioivaa henkilöä (Matikainen ym. 2010, 45). Luotettavuuden parantamiseksi menetelmävertailuun valittiin tutkimusnäytteen rinnakkaisten mikroskopointitulosten keskiarvo. Tutkimuksen luotettavuutta lisää se, että rinnakkaistulokset erosivat toisistaan vain vähän. Tutkimuksen aikana muutamia näytteitä mikroskoipoitiin kahteen kertaan, joista saatiin kuitenkin sama tulos kuin aikaisemmin. Mikroskopoinnin tulokset olivat molemmilla tasalaatuisia koko tutkimuksen ajan. Tutkimuksen luotettavuutta parantaa myös se, että mikroskopoinnin aikana ei tiedetty verikaasuanalysaattorin antamaa tulosta näytteelle. Tutkimus on toistettavissa myöhemmin, kos-

ka tutkimuksen vaiheet on kuvattu yksityiskohtaisesti opinnäytetyössä. Tutkimusasetelma on mahdollista toistaa silloin, kun tutkimusnäytteiksi valitaan vastasyntyneiden verinäytteitä. Tutkimushenkilön vaihtuminen ei heikennä toistettavuutta, koska kaikissa tutkimusnäytteissä oli senhetkinen vastasyntyneen elimistön senhetkistä tilaa vastaava fetaalihemoglobiinipitoisuus.

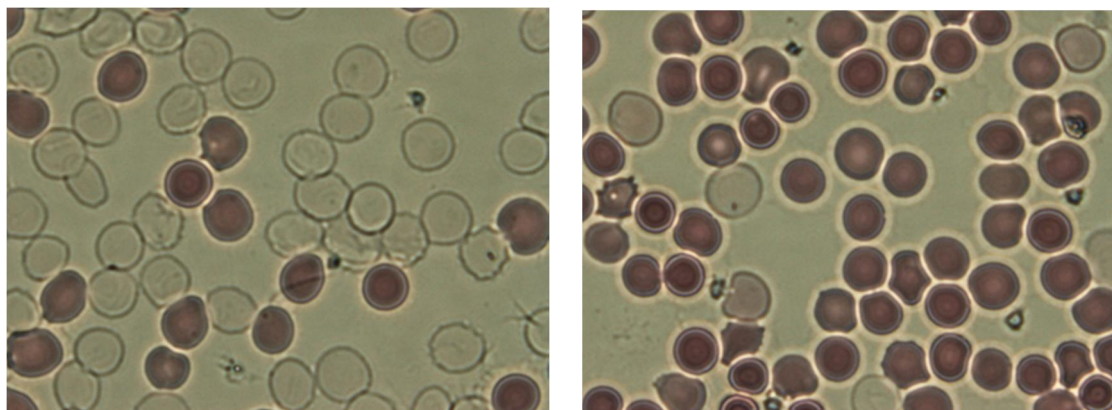
Tietojen tallennuksesta johtuvat mittausvirheet vaikuttavat tutkimustulosten luotettavuuteen (Vilka 2007, 149). Tutkimusaineiston keräämisen aikana tarkistimme tutkimustulokset ja tiedot moneen kertaan, jotta tulokset oli syötetty oikein. Tulosten luotettavuutta lisää se, että sairaalakemisti Mikko Mättö tarkasti tutkimustulokset Excel-taulukosta.

Validiteetti eli pätevyys tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä mitata juuri sitä, mitä sen on myös tarkoitus mitata (Hirsjärvi ym. 2007, 227). Valitsimme tutkimusnäytteiksi vastasyntyneiden verinäytteitä, jotta tutkimusnäytteistä on mahdollista mitata fetaalihemoglobiinia. Tutkimuksen validiteettia kuvaa se, että sytokemiallisessa menetelmässä positiivisen ja negatiivisen kontrollin avulla varmistuttiin fetaalivärjäyksen onnistumisesta. Tutkimuksen validiteetti tulee varmistaa etukäteen huolellisesti tarkoin harkitulla tiedonkeruulla ja suunnittelulla (Heikkilä 2008, 3). Ennen tutkimuksen toteuttamista tutustuimme fetaalihemoglobiinia käsitteleviin lähdemateriaaleihin hyvin. Tutkimuksen kulku suunniteltiin perusteellisesti sairaalakemistin Mikko Mätön kanssa. Suunnittelun aikana varmistuttiin siitä, että verikaasulaitteessa oli tutkittavana parametrina HbF.

Harjoittelimme Islabin hematologian laboratoriossa sivelyvalmisteiden tekoa, johon saimme apua muilta laboratoriohoitajilta. Tutkimuksen luotettavuuteen vaikuttaa se, että toinen meistä teki aina kaksi sivelyvalmistetta samasta näytteestä. Pipetoinnissa käytimme aina samaa pipettiä. Teimme jokaiseen sarjaan mukaan positiivisen ja negatiivisen kontrollin, jotta voitiin varmistaa, että värjäys oli onnistunut. Tulosten luotettavuutta arvioidaan muun muassa kontrollinäytteiden avulla. Kontrollinäytteet on käsitelty samalla tavalla kuin tutkittavat näytteet sekä niiden tulokset tunnetaan. Tutkittavat näytteet analysoidaan yhdessä kontrollinäytteen kanssa. Jos kontrollinäytteen tulos on annettujen rajojen sisällä, voidaan tutkittavia näytteitä pitää luotettavana. Laboratoriotutkimusten luotettavuutta lisätään myös tekemällä näytteestä useampi rinnakkaismääritys, ja näiden tulosten tulee olla samanlaisia. Tutkimusten luotettavuutta lisää myös eri työvaiheiden automatisointi, koska automatisointi vähentää inhimillisiä virheitä. (Matikainen ym. 2010, 45.)

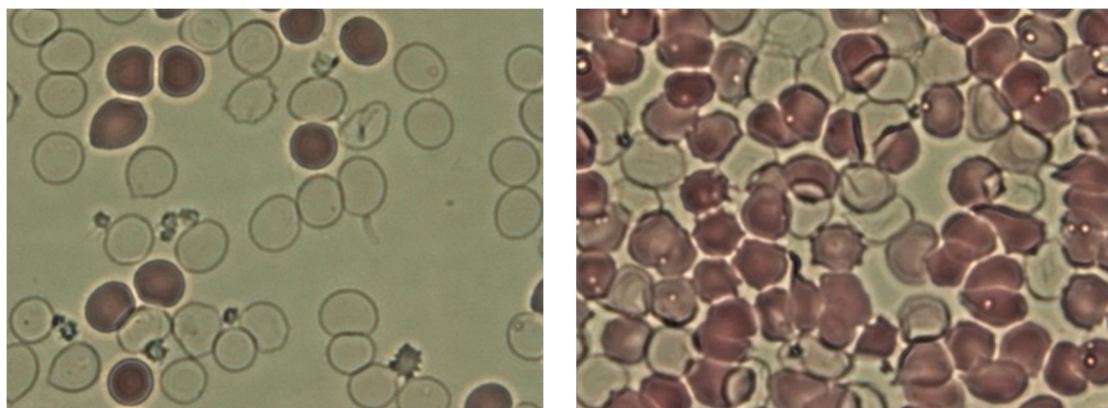
Opinnäytetyön reliabiliteettia heikensi se, että tutkimuksen otoskoko oli pieni ($n=18$). Mikäli tutkimuksen otoskoko on kovin pieni, tulokset ovat sattumanvaraisia (Heikkilä 2008, 30). Toisaalta tutkimuksen tarkoituksena oli alustavasti selvittää, oliko mahdollista saada samankaltaisia tuloksia sekä verikaasuanalysaattorilla että mikroskopoimalla. Tähän tarkoitukseen otoskoko oli riittävä. Pienet näytemäärät toivat myös haastetta tutkimuksen tekemiseen. Verikaasunäytteiden saatavuusongelman vuoksi emme voineet testata esimerkiksi parinäytetoistettavuutta, jolla olisi voitu arvioida automaattisen menetelmän sisäistä toistuvuutta. Tutkimuksen luotettavuutta laskee pieni näytemäärä, koska yhdestä tutkimusnäytteestä voitiin tehdä rajallinen määrä sivelyvalmisteita. Tutkimuksen luotettavuutta laskee, että osa sivelyvalmisteista oli naarmuisia, huonosti värjäytyneitä ja liian paksuja, jolloin solut ovat päällekkäin tai jakautuneet epätasaisesti lasille. Kuvassa 13 nähdään hepariiniruis-

kusta ja EDTA-verestä tehtyjen värjäystulosten eroavaisuudet. Mikroskopoinnin aikana totesimme, että heparinisoitu kokoveri ei vaikuttanut fetaalihemoglobiinivärjäytyvyyteen.



KUVA 13. Hepariiniruiskun ja EDTA-veren värjäytyvytydet © Rissanen & Räsänen 2013

Fetaalihemoglobiinivärjäyksessä tulee sivelyvalmisteen olla mahdollisimman ohut ja tasainen, jotta solut eivät jää päällekkäin. Kuvassa 14 nähdään, kuinka hepariiniruiskusta tehdystä tutkimusnäytteessä solut ovat jakautuneet epätasaisesti näkökenttään. Kuvassa 14 nähdään EDTA-verestä tehdystä tutkimusnäytteessä, kuinka solut ovat päällekkäin näkökentässä. Sivelyvalmisteen laatuun ja mikroskopointituloksiin vaikuttaa se, meillä oli vähän kokemusta sivelyn tekemisestä sekä mikroskopoinnista. Mikroskooppisen laskennan ongelmana pidetään sen työläyttä ja tulosten huonoa toistettavuutta. Vakioinnin vaikeus ja pieni laskettu solumäärä johtuvat siitä, että tulokset ovat huonosti toistettavia. (Savolainen 2007, 92.)



KUVA 14. Tutkimusnäyte hepariiniruiskusta ja EDTA-verestä: solut epätasaisesti näkökentässä © Rissanen & Räsänen 2013

Sivelyvalmisteen tulosten luotettavuuteen vaikutti myös näytteenotto sekä näytteen säilytys ja käsittely. Koska emme ottaneet itse näytteitä, emme voineet vaikuttaa näytteen preanalyttisiin tekijöihin. Näytteenoton jälkeen on tärkeää, että ruisku sekoitetaan välittömästi, koska se sisältää hyytymisenestoainetta eli hepariinia (Väisänen, Metsävainio & Romppanen 2006, 122). Meillä ei ole tietoa, oliko hepariiniruiskunäytettä sekoitettu hyvin näytteenoton aikana ja ennen näytteen analysoimista. Opinnäytetyössä tutkimme jo valmiiksi analysoituja näytteitä, joten emme aina tienneet sitä, kuinka kauan näyte oli seisonut vastasyntyneiden teho-osastolla olevassa näytelaatikossa. Sively tulee val-

mistaa tuoreesta näytteestä, koska solujen morfologia kärsii eniten säilytyksestä. Kävimme kerran päivässä hakemassa tutkimusta varten jätetyt näytteet vastasyntyneiden teho-osastolta, joista teimme heti sivelyvalmisteet ja kiinnitimme ne 80 % etanolilla.

8.4 Tutkimuksen eettiset vaatimukset

Käytimme pelkästään jo aiemmin analysoituja näytteitä, jotka olivat menossa hävitettäväksi. Opinnäytetyömme on Islabin menetelmäkehitystyö, ja tutkimuksen tekeminen ei edellyttänyt erillistä näytteenottoa potilaasta, jolloin tutkimukseen ei tarvittu tutkimuseettisen toimikunnan lausuntoa. Kliinisen laboratoriotyön eettisiin periaatteisiin kuuluu, että bioanalytikko noudattaa salassapitovelvollisuutta ja kunnioittaa näytteen luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia, kun hän käsittelee biolologista näytemateriaalia. Laboratoriotutkimusten suorittamista varten bioanalytikko hankkii vain niiden suorittamisen kannalta välttämättömän tiedon. (Suomen bioanalytikkoliitto 2006.) Tutkimuksemme sisälsi luottamuksellista sisältöä potilaiden henkilötiedoista, joten näytteiden keräämisen yhteydessä poistimme nimitarrat tietosuojajätteeseen ja nimesimme putket näyttenumeroilla.

8.5 Opinnäytetyöprosessin tarkastelu

Opinnäytetyön tarkoituksena oli toteuttaa menetelmävertailu spektrofotometrisen ja sytokemiallisen menetelmän välillä. Tarkoituksenamme oli selvittää, voitaisiinko fetaalihemoglobiinia mitata verikaasuanalyysaattorilla fetaalihemoglobiinivärjäyksen sijasta. Fetaalihemoglobiininäytteitä mitattiin ABL835 FLEX-verikaasuanalyysaattorilla, ja niitä verrattiin fetaalihemoglobiinivärjäyksestä saatuihin mikroskopointituloksiin. Fetaalihemoglobiinia mitataan äidin verestä, kun epäillään fetomaternaali- vuotoa. Opinnäytetyössä käytimme vastasyntyneiden näytteitä, koska vastasyntyneillä pääasiainen hemoglobiini on fetaalihemoglobiini. Opinnäytetyötä suunniteltaessa tarkoituksenamme oli mitata itse fetaalihemoglobiinia verikaasuanalyysaattorilla, jolloin samasta näytteestä tehdään fetaalihemoglobiinivärjäys sekä värjäytyn näytteen mikroskopointi. Alkuperäisestä suunnitelmasta poiketen emme käyttäneet verikaasuanalyysaattoria, koska vastasyntyneistä otettujen näytteiden näytemäärä osoittautui liian pieneksi kahdella eri menetelmällä tutkimiseen. Vastasyntyneiden teho-osaston sairaanhoitajat olivat analysoineet näytteet verikaasuanalyysaattorilla, jolloin haimme tutkimusnäytteet ja otimme niiden valmiit tulokset verikaasuanalyysaattorin muistista. Käytännössä emme päässeet käyttämään verikaasuanalyysaattoria lainkaan. Tutkimusnäytteestä tehtiin ainoastaan fetaalihemoglobiinivärjäys ja mikroskopointi.

Opinnäytetyön toiminnallinen osuus eteni suunnitellusti, vaikka ensimmäisten päivien aikana näyte- laatikkoon ei kertynyt yhtään näytettä. Tällöin meillä oli aikaa harjoitella fetaalivärjäyksen suorittamista ja sivelyvalmisteiden tekoa. Muutaman päivän kuluttua tutkimusnäytteitä kertyi päivittäin 1-4 näytettä. Teoriaosuuden kirjoittaminen oli välillä aika haastavaa, koska fetaalihemoglobiinin liittyvää teoretietoa oli vähän saatavilla. Myös verikaasuanalyysaattorin toiminnasta oli vähän lähdemateriaalia ja käytimmekin suurimmaksi osaksi verikaasuanalyysaattorin manuaalia. Fetaalihemoglobiinivärjäyksestä on todella niukasti lähteitä, joten jouduimme etsimään tietoa muiden sytokemiallisten värjäysten avulla. Tämän opinnäytetyön tavoitteet toteutuivat hyvin, mutta suunnitelmasta poiketen ar-

vioimme automaattisen menetelmän luotettavuutta korkeissa HbF-arvoissa. Toteutimme menetelmävertailun laboratorioprosessin laatuvaatimusten mukaisesti, koska työskentelimme huolellisesti ja laboratorion toimintaohjeiden mukaisesti. Tulosten tarkastelussa käy ilmi, että verikaasuanalyysaattorilla saadaan samansuuntaisia tuloksia kuin fetaalihemoglobiinivärjäyksen mikroskopointituloksista. Tämän opinnäytetyön tulokset ovat hyödynnettävissä työelämässä, koska opinnäytetyön tuloksista on hyötyä Islabin kliinisen kemian ja hematologian laboratoriolle.

8.6 Ammatillinen kasvu

Tämän opinnäytetyön avulla oma ammatillinen kasvumme kehittyi huomattavasti. Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman vuoden 2011 opetussuunnitelmassa esitellään bioanalytiikan osaamisen osa-alueet ja ammattispesifiset kompetenssit. Bioanalytiikan ammattiin liittyvät ydinsaamistavoitteet ovat laboratoriotutkimusprosessin preanalyttinen, analyttinen ja postanalyttinen osaaminen, opetus- ja ohjausosaaminen, laatuosaaminen sekä kehittämistoiminnan ja johtamisen osaaminen. Bioanalytiikan osaamisalueeseen kuuluu kriittinen arviointi lähdeaineiston suhteen. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2011.) Opinnäytetyöhön valitsimme sellaisia lähteitä, jotka arvioimme näytön lähteiden, asteiden ja luokkien suhteen luotettavaksi tiedoksi. Käytimme suomen- ja englanninkielisiä kirjallisia lähteitä sekä kliinisen laboratoriotyön ammattilehtiä. Käytimme lehtiartikkeleita, joista suurin osa oli kansainvälisiä julkaisuja, joten englanninkielentaitomme kehittyi huomattavasti. Tämän opinnäytetyöprosessin avulla lähdeaineiston kriittinen arviointi kehittyi.

Bioanalytiikko toimii kliinisen laboratoriotyön asiantuntijana terveydenhuollon moniammatillisissa ryhmissä, kehittää ja edistää näyttöön perustuvaa kliinistä laboratoriotyötä sekä osallistuu yhteiskunnalliseen päätöksentekoon kestävä kehityksen mukaisesti. Bioanalytiikko tuottaa luotettavia laboratoriotutkimustuloksia, joita käytetään asiakkaan terveydentilan arviointiin ja terveyden edistämiseen. Bioanalytiikko osallistuu asiantuntijaisuutensa puitteissa uusien menetelmien kehittämiseen ja laitehankintoihin. Valmistuvan bioanalytiikan on hallittava laboratoriotutkimusprosessi ja sen kehittäminen. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2011.) Opinnäytetyössä fetaalihemoglobiinin laboratoriotutkimusprosessi sekä siihen liittyvät laadunvarmistukset tulivat meille hyvin tutuiksi. Koska emme ottaneet itse näytteitä tutkimusta varten, vaikutimme preanalytiikkaan ainoastaan näytteiden käsittelyn ja säilytyksen osalta. Vastasyntyneiden teho-osastolla työskentelevät sairaanhoitajat olivat ottaneet näytteet hepariiniruiskuun, joten perehdyimme opinnäytetyössä hepariiniruiskunäytteiden säilyvyyteen.

Opinnäytetyömme avulla syvennyimme laboratorioprosessin analyttiseen vaiheeseen, joka kuuluu tärkeänä osana bioanalytiikan ammatilliseen kasvuun. Perehdyimme hematologian laboratoriossa sytokemialliseen menetelmään eli fetaalihemoglobiinivärjäykseen, joka on hematologian erikoisvärjäys. Opinnäytetyön aikana harjaannuimme sivelyllymisen tekoon ja sytokemialliseen värjäykseen. Sytokemiallisia menetelmiä käytetään myös monessa muussakin laboratorion tutkimuksissa, joten voimme hyödyntää sitä jatkossa omassa ammatissamme. Saimme myös paljon itsevarmuutta laboratoriotyöskentelyyn ja opimme oma-aloitteisuutta ja vastuunottokykyä opinnäytetyöprosessin aikana.

8.7 Jatkotutkimusehdotukset

Talassemioiden yleistymisen myötä fetaalihemoglobiinin määrittäminen voi yleistyä myös muiden kuin fetomaternaalivuodon määrittämisessä. Verikaasuanalysointilaitteen käyttö fetaalihemoglobiinitutkimuksessa on nopeampaa ja kustannustehokkaampaa. Verikaasuanalysointilaitteen vaatima näytemuoto on kuitenkin haasteellisempi, sillä menetelmä ei sovellu maakunnista saapuviin näytteisiin. Islab aikoo tehdä jatkotutkimuksia spektrofotometrisen menetelmän soveltuvuudesta fetaalihemoglobiinin määrittämisessä. Jatkotutkimusaiheena fetaalihemoglobiinia voisi tutkia suuremmalla otoskoolla sytokemiallisen ja spektrofotometrisen menetelmien välillä. Spektrofotometrisen menetelmän soveltuvuutta fetaalihemoglobiinin määrittämiseen voisi tutkia suuremmalla otoskoolla, jotta tutkimustulokset olisivat luotettavampia. Tutkimuksessa pitäisi olla näytteitä, joissa on sekä korkeita että matalia HbF-pitoisuuksia. Erityisen tärkeää olisi selvittää, kuinka verikaasulaite mittaa matalia HbF-arvoja. Tässä tutkimuksessa ainoa matala pitoisuus oli yhdessä tutkimusnäytteessä, jonka perusteella ei voida arvioida spektrofotometrisen menetelmän soveltuvuutta fetaalihemoglobiinin määrittämisessä. Koska vastasyntyneillä HbF-arvo on normaalisti 50-90 %, matalia HbF-pitoisuuksia ei ole mahdollista määrittää vastasyntyneiden näytteillä. Alle 2-vuotiailla lapsilla HbF-arvo on 0-4 %, joten jatkotutkimuksissa fetaalihemoglobiinia voisi määrittää alle 2-vuotiaiden lasten verinäytteistä. (Sigma-aldrich 2005.)

LÄHTEET

Airaksinen, R. 2012. *Hemoglobiinin fetaalivärjäys (B-Hb-F-vr) -työohje*. Islab. Kuopion aluelaboratorio, Puijo, solumorfologia.

Anttila, P. 2005. *Ilmaisu, teos ja tekeminen ja tutkiva toiminta*. Tallinna: AS Pakett.

Bain, B.J. 2002. *Blood Cells: A Practical Guide*. 3. painos. Oxford: Blackwell Science.

Bancroft, J.D. & Layton, C. 2013. The hematoxylin and eosin. Teoksessa Suvama, S. K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (toim.) 2013. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7. painos. Oxford: Churchill Livingstone, 173-174.

Duodecim. 2012. *Sirppisoluanemia* [verkkosivu]. Duodecim [viitattu 9.2.2013]. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt01806&p_haku=sirppisoluanemia.

Halonen, T. 2004. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 56, 66-67.

Hedberg, P., Koivula, M-K., Hallikainen, R., Kaila, K., Kuopus, S., Natri, P. & Huotari, V. 2013. *Näytteenotto verikaasuanalyysia varten* [verkkodokumentti]. Nordlab [viitattu 24.2.2014]. Saatavissa: http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjeet/Naytteenotto_verikaasuanalyysia_varten.pdf.

Heikkilä, T. 2008. *Tilastollinen tutkimus*. 7. uudistettu painos. Helsinki: Edita.

Hemminki, M. & Pelttari, T. 2011. Manuaalisesti ja automaattisesti tehtyjen perifeerisen veren siveilyvalmisteiden vertailu [verkkodokumentti]. Opinnäytetyö [viitattu 10.1.2014]. Saatavissa: http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/35188/Hemminki_Maria_Pelttari_Tiina.pdf?sequence=1.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. *Tutki ja kirjoita*. 13. Osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Hänninen, A. & Mahlamäki 2004. Kliinisen hematologian tutkimukset. Penttilä, I. (toim.) Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 265-266.

ISLAB. 2014a. aB-Verikaasuanalyysi, laaja [verkkosivu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen web-ohjekirja. Itä-Suomen laboratorikeskuksen liikelaitoskuntayhtymä [viitattu 10.2.2014]. Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=3534>.

ISLAB. 2014b. B –Hemoglobiini [verkkosivu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen web-ohjekirja. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä [viitattu 10.2.2014]. Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=600>.

ISLAB. 2014c. B -Hemoglobiini, fetaali, värjäys [verkkosivu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen web-ohjekirja. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä [viitattu 13.12.2012]. Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=1098>.

ISLAB. 2014d. vB-Verikaasuanalyysi, laaja [verkkosivu]. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen web-ohjekirja. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä [viitattu 10.2.2014]. Saatavissa: <https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp?indeksi=3535>.

ISLAB. 2014e. Esittely [verkkosivu]. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä [viitattu 10.2.2014]. Saatavissa: <http://www.islab.fi/showattachment.asp?ID=10453&DocID=8881>.

Juvonen, E. & Savolainen, E-R. 2013. Hemolyyttinen anemia [verkkodokumentti]. Duodecim [viitattu 9.2.2014]. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt00378&p_haku=sirppisoluanemia.

Kairisto, V. 2010. Laboratoriotulosten tulkinta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: kandidaattikustannus, 41-44.

Kim, Y.A. & Makar, R.S. 2012. Detection of fetomaternal hemorrhage. *American Journal of Hematology* [verkkójulkaisu] 87 (4) 417-418 [viitattu 16.1.2013]. Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.22255/pdf>.

Laitinen, M. 2004. pH ja verikaasuanalyysit. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 65-66.

Lehtinen, L. 1996. Talassemiat ja hemoglobinopatit. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., & Krusius, T. (toim.) *Veritaudit*. 1. Painos. Helsinki: Duodecim, 146-148.

Matikainen, A-M., Miettinen, M. & Wasström, K. 2010. *Näytteenottajan käsikirja*. Helsinki: Edita Prima Oy.

Mehta, R.P. & Keohane, E.M. 2012. Talassemias. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Keohane, E.M. (toim.) *Hematology: Clinical Principles and Applications*. 4. painos. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 403.

Mellanoura, J. 2008. Laadukas perifeerisen veren sivelyvalmiste. *Suomen Bioanalyttikoliitto ry* (2), 12-14.

Mosca, A., Paleari, R., Leone, D. & Ivaldi, G. 2009. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clinical Biochemistry* [verkkojulkaisu] 42 (18) 1797-1801 [viitattu 17.8.2013]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/science/article/pii/S0009912009002732?np=y>.

Naukkarinen, A. 2008. *Histologiset menetelmät- kurssi: luentomoniste*. 9. uudistettu painos. Kuopion yliopistollinen sairaala.

Nayak, R., Rai, S. & Gupta, A. 2012. *Essentials in hematology and clinical pathology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.

Penttilä, I. 2004. Tutkimustulosten laatu ja laadunvarmistus. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 35-38.

Punnonen, K., Remes, K. & Siimes, M.A. 2007. Rauta-aineenvaihdunta ja raudanpuuteanemia. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) *Veritaudit*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 160.

Radiometer. 2006. *Optical measuring principles*. Radiometer ABL835: Reference manual 989-963. Käyttöohje.

Rajamäki, A. & Salmi, T.T. 2007. Periytyvät hemolyytiset anemiat ja muut punasolupoiikkeavuudet. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) *Veritaudit*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 224, 226-229, 231, 235.

Rajantie, J. 2010. Mitä suomalaisen lääkärin tulee tietää talassemioista. *Duodecim* [verkkojulkaisu] 126 (10) 1137-1144 [viitattu 23.3.2014]. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=duo98807&p_haku=beetatalassemiat.

Rajantie, J. 2013. *Talassemiat* [verkkosivu]. Duodecim [viitattu 19.3.2014]. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt01844&p_haku=talassemia.

Rodak, B.F. 2012. Cytochemistry. Teoksessa Rodak, B.F., Fritsma, G.A. & Keohane, E.M. (toim.) *Hematology: Clinical Principles and Applications*. 4. painos. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 436.

Salmi, T. 2010. Maahanmuuttajien hematologia tuo laboratorioille uusia haasteita [lehtiartikkeli]. *Moodi* (4), 210-214.

Sand, O., Sjaastad, O.V., Haug, E. & Bjälle, J.G. 2011. *Ihminen: Fysiologia ja anatomia*. 1. painos. Helsinki: WSOY.

Savolainen, E-R. 2007. Verinäytteet ja verenkuvatutkimukset. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) *Veritaudit*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 92.

Savolainen, E-R. 2010. Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: kandidaattikustannus, 73.

Savolainen, E-R., Haapajärvi, P. & Mikkonen, M. 2012. *Veren sivelyvalmisteen tekeminen* [verkkodokumentti]. Näytteenoton käsikirja. Oyslab. [viitattu 11.1.2014]. Saatavissa: <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/33702/stadia-1197563757-2.pdf?sequence=1>.

Savonia-ammattikorkeakoulu. 2011. Bioanalytiikan koulutusohjelma. [verkkosivu]. Opetussuunnitelma [viitattu: 9.2.2014]. Saatavissa: <http://portal.savonia.fi/amk/fi/opiskelijalle/opetussuunnitelmat?yks=KS&konr=2478&tab=1>.

Schumacher, S. & Randolph, T. 2012. A method of HbF determination for potential use in underdeveloped countries. *Clinical Laboratory Science* [verkkojulkaisu] 25 (4) 212-218 [viitattu 18.8.2013]. Saatavissa: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=0ef3f7d7-0be4-4ff4-abfe-3b386d26a081%40sessionmgr198&hid=118>.

Siemens. *Rapidlab 1200-verikaasuanalysointilaitteen käyttöopas*.

Sigma Aldrich. 2005. *Prodecure fetal hemoglobin intended use* [verkkodokumentti]. Sigma Aldrich [viitattu 16.1.2014]. Saatavissa: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/1/285.pdf.

Siitonen, S. 2010. Hemolyyttinen anemia. Teoksessa Vilpo, J. (toim.) *Ilmari Palvan veritaudit*. 3. Uudistettu painos. Helsinki: Medivil, 86.

Stephens, A.D., Angastiniotis, M., Baysal, E., Chan, V., Davis, B., Fucharoen, S., Giordano, P.C., Hoyer, J.D., Mosca, A. & Wild, B. 2012. ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin F. *International Journal of Laboratory Hematology* [verkkojulkaisu] 34 (1) 15-19 [viitattu 18.8.2013]. Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-553X.2011.01367.x/pdf>.

Suomen bioanalytikkoliitto. 2006 [verkkodokumentti]. Bioanalytiikan, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. *Suomen bioanalytikkoliitto ry* [viitattu 9.2.2014]. Saatavissa: <http://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/220004/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011+%281%29.pdf>.

Swirsky, D. & Bain, B.J. 2001. Erythrocyte and leucocyte cytochemistry-leukaemia classification. Teoksessa Lewis, S.M., Bain, B.J. & Bates, I. (toim.) *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 9. Painos. Lontoo: Churchill Livingstone, 275-276.

Tarvonen, M., Ulander, V-M., Süvari, L. & Teramo, K. 2011. Vuoto sikiöstä äitiin - joskus lievänkin tapaturman vakava komplikaatio. *Duodecim* [verkkojulkaisu] 127 (16) 1727-1731 [viitattu

19.3.2014]. Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi:2048/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=duo99727&p_haku=hbf.

Tähtinen, J., Laakkonen, E. & Broberg, M. 2011. *Tilastollisen aineiston käsittelyn ja tulkinnan perusteita*. Turku: Turun yliopiston kasvatustieteiden tiedekunnan julkaisuja C:20.

Ulander, V., Ämmälä, P., Sjöberg, J. & Lehtovirta, P. 2002. Massiivinen fetomaternaalivuoto– salakavalaa ja vakava raskauskomplikaatio. *Duodecim* [verkkójulkaisu] 118 (6) 621-624 [viitattu 18.9.2013]. Saatavissa: <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo92850.pdf>.

Uotila, L. & Itkonen, O. 2012. *Hemoglobiini, fetaali, verestä* [verkkosivu]. Huslab [viitattu 13.12.2012]. Saatavissa: <http://huslab.fi/ohjekirja/1562.html>.

Vilka, H. 2007. *Tutki ja mittaa: määrällisen tutkimuksen perusteet*. Helsinki: Tammi.

Väisänen, S., Metsävainio, K. & Romppanen, J. 2006. *Preanalyttisistä virhetekijöistä verikäsittelysuoritusprosessilla tehtävissä analyyseissä* [verkkodokumentti]. Finnanest [viitattu 24.2.2014]. Saatavissa: http://www.finnanest.fi/files/a_vaisanen.pdf.

Westgard, J. 2009. *Rilibak German guidelines for quality* [verkkosivu]. Westgard QC [viitattu: 8.4.2014]. Saatavissa: <http://www.westgard.com/rilibak.htm>.

Åkerman, K. & Jokela, H. 2010. Mittaaminen ja mittalaitteet. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: kandi-taattikustannus, 49.

Åkerman, K. & Jokela, H. 2010. Reagenssit. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) *Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uudistettu painos. Helsinki: kandi-taattikustannus, 52-53.

LIITE 1: TUTKIMUSLUPA



ITÄ-SUOMEN LABORATORIOKESKUKSEN
LIIKELAITOSKUNTAYHTYMÄ

TUTKIMUS JA OPINNÄYTETYÖLUPA HAKEMUS 1(3)

Nro / 20

Lupahakemukseen liitetään tutkimussuunnitelma, aineiston keruulomakkeet saatokirjeineen ja rahoitussuunnitelma. Jos tutkimus- tai opinnäytetyössä käsitellään ISLABin yhteistyö-/asiakasorganisaatioiden toimintaa haetaan lupa myös heiltä.

HAKIJA

Vastuullinen tutkija
Riina Paulina Räsänen

Nimi

Muut tutkijat
Maija Paulina Räsänen

Työpaikka _____

Virkatoimi (ei koske opiskelijoita) _____

Opiskelupaikka AMK mikä Savonia yliopisto mikä _____ muu mikä _____

Suoritettava tutkinto Bioanalytiikan ke

TUTKIMUS / OPINNÄYTETYÖ

Tutkimuksen/ opinnäytetyön nimi Kehden eri menetelmän vertailu fetali-hemoglobiinimittauksessa

Tutkimuksen/ opinnäytetyön lyhyt kuvaus (mm. tutkimuksen tarkoitus, kohderyhmä ja tutkimusmenetelmät) sekä julkaisu- tai opinnäytetyösuunnitelma (maksimissaan 300 sanaa)

Opinnäytetyön tarkoituksena on saada tutkimustuloksia fetali-hemoglobiinimittauksen kahdesta eri menetelmästä. Tutkimusmenetelminä ovat automaattinen eli verikaasuanalysointi ja manuaalinen eli fetali-hemoglobiinivärgäys. Tarkoituksena selvittää ovatko manuaalisen ja automaattisen menetelmän tulokset keskenään vertailukelpoisia. Kirjallinen osuus valmistun keuhalla 2014, julkistamuse valmiin opinnäytetyön Savonia-ankin opinnäytetyöseminaarissa ja Thesauksessa

Tutkimus on Opinnäytetyö
 (arkki / ylempi arkki) pro gradu lisensiaattityö väitöskirja
 muu, mikä _____

Monikeskustutkimus ei kyllä kansallinen kansainvälinen

Tutkimuksen kokonaisrahoitus _____ Aikataulu ISLABissa/ Yhteistyöorganisaatiossa _____

Kustannukset Arvio ISLABille / yhteistyöorganisaatiolle kuluvista kustannuksista € _____ Tarkempi kustannuserittely esitettävä erillisellä liitteellä
 Ei aiheuta kustannuksia ISLABille / yhteistyöorganisaatiolle

ISLAB 210-3





Tutkimuseettisen toimikunnan lausunto			
<input type="checkbox"/> annettu	<input type="checkbox"/> käsitellyssä	<input type="checkbox"/> ei ole haettu	
Toimikunta	Mikko Mäntö keskusteli asiasta Susanna Luukkosen kanssa. Koska opinnäytetutkimuksen tekeminen ei edellytä erillistä näytteentönnöä potilaasta, vaan työssä käytetään ylijäämää näytteitä, ei tarvita tutkimuseettisen toimikunnan lausuntoa. Lisäksi tehtävä opinnäytetyö on ISLABin menetelmä kehitystyötä.	Lausunto nro	pvm
Toimitusjohtajan lupa rekisteritutkimuksia varten			pvm _____
<input type="checkbox"/> annettu	<input type="checkbox"/> käsitellyssä	<input type="checkbox"/> ei ole haettu	
STM:n lupa rekisteritutkimuksia varten			pvm _____
<input type="checkbox"/> annettu	<input type="checkbox"/> käsitellyssä	<input type="checkbox"/> ei ole haettu	
Aluelaboratorion johtajan lupa laboratorion toimintaa ja henkilökuntaa koskevia tutkimuksia varten			pvm _____
<input type="checkbox"/> annettu	<input type="checkbox"/> käsitellyssä	<input type="checkbox"/> ei ole haettu	
Muu lupa (mikä/ mistä)			pvm _____
<input type="checkbox"/> annettu	<input type="checkbox"/> käsitellyssä		
ALLEKIRJOITUS JA SITOUMUS			
Allekirjoittaneet tutkijat sitoutuvat noudattamaan ISLABin ohjeita, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä salassapito- ja välttövelvollisuutta ja lähettämään tutkimusraportin yksikköön, jossa tutkimus on tehty sekä luvan myöntäjälle.			
12.9 2013			
Tutkijan allekirjoitus		Tutkijan allekirjoitus	
Riina Rissanen			
Nimen selvitys		Nimen selvitys	
Mari Rissanen			
Tutkijan allekirjoitus		Tutkijan allekirjoitus	
Haiju Räsänen			
Nimen selvitys		Nimen selvitys	
TUTKIMUKSEN / OPINNÄYTETYÖN OHJAAJAT			
Ohjaajan allekirjoitus		Ohjaajan allekirjoitus	
JAANA HEFFREN			
Nimen selvitys		Nimen selvitys	
p. 044-7856334			
Osoite, puhelin, s-posti		Osoite, puhelin, s-posti	
SAIRAALAKATU 6-8			
70111 KROPIO jaana.heffren@savonia.fi			


PÄÄTÖS

- Myönnän tutkimusluvan
 Myönnän tutkimusluvan, mutta ennen tutkimuksen aloittamista tutkimukselle tulee hakea tutkimuseettisen toimikunnan lausunto / toimitusjohtajan lupa rekisteritutkimuksia varten / STM:n lupa rekisteritutkimuksia varten / muu lupa, mikä

Aluelaboratorion johtajan lupa; päätös nro

Toimitusjohtajan lupa; päätös nro

6/2013

16,9 20 13

Allekirjoitus

Karl Punnonen

Nimen selvennys

Toimitusjohtaja
 Itä-Suomen laboratoriokeskuksen
 liikelaitoskuntayhtymä

Yhteys henkilö ISLAB:ssa/ Yhteistyöorganisaatiossa (luvan myöntäjä nimeää)

Mikko Mättö, sairaalakemisti

ISLAB/Kuopion aluelaboratorio/Puijo

Nimi

Työyksikkö

mikko.matto@islab.fi

044-7178981

S-posti

Puhelin

LIITTEET

- Tutkimussuunnitelma 19 sivua
 Rahoitussuunnitelma _____ sivua
 Muita liitteitä _____ sivua

LIITE 2: KÄYTTÖTURVALLISUUSTIEDOTE TUTKIMUKSESSA KÄYTETYISTÄ KEMIKAALEISTA

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

KÄYTTÖTURVALLISUUSTIEDOTE

Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 mukaisesti

Versio 5.0 Muutettu viimeksi 30.10.2012

Päiväys 25.02.2014

1. AINEEN TAI SEOKSEN JA YHTIÖN TAI YRITYKSEN TUNNISTETIEDOT**1.1 Tuotetunnisteet**

Kauppanimi : Fetal Hemoglobiin Kit

Tuotenumero : 285D

Tuotemerkki : Sigma

1.2 Aineen tai seoksen merkitykselliset tunnistetut käytöt ja käytöt, joita ei suositella

Tunnistetut käyttötavat : Laboratorikemikaaleja, Aineiden valmistus

1.3 Käyttöturvallisuustiedotteen toimittajan tiedotYritys : Sigma-Aldrich Finland Oy
Bulevardi 7
FI-00120 HELSINKI

Puhelin : +358 9 350 9250

Telefax : +358 9 350 92555

Sähköpostiosoite : eurtechserv@sial.com

1.4 Häät puhelinnumero

Häät numero : Myrkytystietokeskus 358 9 4711

(Tämä on yhteenveto KT-tiedote kille, erilliset KT-tiedotteet kkin komponenteille, jotka on luettu kohdassa 16, löytyvät kotisivuiltamme.)

2. VAARAN YKSILÖINTI**2.1 Aineen tai seoksen luokitus**

Luokitus säädöksen (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP] mukaisesti.

Välitön myrkyllisyys, Suun kautta (Luokka 4)

Ihoärsytys (Luokka 2)

Vakava silmävaurio (Luokka 1)

Syöpää aiheuttavat vaikutukset (Luokka 2)

EU-direktiivien 67/548/ETY tai 1999/45/EY mukainen luokitus

Terveydelle haitallista niehtynä. Epäiltään aiheuttavan syöpäsairauden vaaraa.

2.2 Etiketin aliosat

Etiketöinti säädöksen (EC) No 1272/2008 [CLP] mukaisesti.

Varoitusmerkki



Huomiosana Vaara

Vaaraohje (et)

H302

H315

H318

H351

Haitallista niehtynä.

Ärsyttää ihoa.

Vaurioittaa vakavasti silmiä.

Epäiltään aiheuttavan syöpää.

Ennaltaehkäiseväohje (et)

P280

P305 + P351 + P338

Käytä suojakäsineitä/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta.

JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean

minuutin ajan. Poista piikönsä, jos sen voi tehdä helposti. Jatka

Täydentävät vaaralausekkeet	huuhtomista. ei yhtään
Direktiivin 67/548/ETY ja siihen tehtyjen korjausten mukaan.	
Vaaramerkintä	X
R-lausekkeet	
R22	Terveydelle haitallista niehtynä.
R40	Epäiltään aiheuttavan syöpäsairauden vaaraa.
S-lausekkeet	
S36/37	Käytettävä sopivaa suojavaatetusta ja suojakäsineitä.

2.3 Muut vaaratekijät - ei yhtään

3. KOOSTUMUS JA TIEDOT AINEOSISTA

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

4. ENSIAPUTOIMENPITEET

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

5. PALONTORJUNTATOIMENPITEET

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

6. TOIMENPITEET ONNETTOMUUSPÄÄSTÖISSÄ

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

7. KÄSITTELY JA VARASTOINTI

7.1 Turvallisen käsittelyn edellyttämät toimenpiteet

tietoja ei ole käytettävissä

7.2 Turvallisen varastoinnin edellyttämät olosuhteet, mukaan luettuina yhteensopimattomuudet

Säiliöt pidettävä tiivisti suljettuina kuivassa, viileässä ja hyvin ilmastoidussa paikassa. Säilytettävä kuivassa, viileässä paikassa.

Suosittelava säilytyslämpötila: 2 - 8 °C

7.3 Erityinen loppukäyttö

tietoja ei ole käytettävissä

8. ALTISTUMISEN EHKÄISEMINEN JA HENKILÖNSUOJAIMET

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

9. FYSIKAALISET JA KEMIALLISET OMINAISUUDET

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

10. STABIILISUUS JA REAKTIIVISUUS

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

11. MYRKYLLISYYTEEN LIITTYVÄT TIEDOT

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

12. TIEDOT VAARALLISUUDESTA YMPÄRISTÖLLE

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

13. JÄTTEIDEN KÄSITTELYYN LIITTYVÄT NÄKÖKOHDAT

Viittaa komponenttien KT-tiedotteeseen

14. KULJETUSTIEDOT**14.1 YK-numero**

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.2 Kuljetuksessa käytettävä virallinen nimi

ADR/RID: Ei vaarallisia aineita
IMDG: Not dangerous goods
IATA: Not dangerous goods

14.3 Kuljetuksen vaaraluokka

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.4 Pakkausryhmä

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.5 Ympäristövaarat

ADR/RID: ei IMDG Marine pollutant: no IATA: no

14.6 Erityiset varotoimet käyttäjälle

tietoja ei ole käytettävissä

15. LAINSÄÄDÄNTÖÄ KOSKEVAT TIEDOT

Tämä käyttöturvallisuustiedote täyttää Asetuksen (EY) N:o 1907/2006 vaatimukset.

15.1 Nimenomaisesti ainetta tai seosta koskevat turvallisuus-, terveys- ja ympäristösäännökset tai -lainsäädäntö

tietoja ei ole käytettävissä

15.2 Kemikaaliturvallisuusarviointi

tietoja ei ole käytettävissä

16. MUUT TIEDOT**Kitin osat:**

Acid hematoxylin solution	SIGMA	2852	Acute Tox. 4; Skin Irrit. 2; Eye Irrit. 2; H302, H315, H319 Xn, Xn, R22
Citrate Phosphate Buffer Concentrate	SIGMA	2851	Skin Irrit. 2; Eye Dam. 1; Carc. 2; H315, H318, H351 Xn, Carc. Cat. 3, R40
Eosin B solution			-

Lisätietoja

Ylläolevat tiedot ovat tämänhetkisen tietämyksen mukaan oikeita, mutta niitä voidaan käyttää vain ohjeellisesti. Tämän dokumentin sisältö perustuu tämänhetkiseen tietämykseen ja se soveltuu tuotteeseen huomioiden asianmukaiset turvatoimenpiteet. Se ei takaa tuotteen ominaisuuksia. Sigma ei vastaa minkäänlaisista tuotteen käsittelystä aiheutuneista vahingoista. Lisätiedot ja myyntiehdot löytyvät laskun tai lähetyslistan takapuolelta tai osoitteesta www.sigma-aldrich.com.
Copyright 2012 Sigma-Aldrich Co. LLC. Licenssi myöntää rajoittamattoman kopiointiin vain sisäiseen käyttöön.

