

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Hematologia
Kevät 2011

Jaana Eskola

LIKVORIN LEUKOSYTYTTIEN MIKROSKOOPPISEN ERITTE- LYLASKENNAN TULOSTEN VERTAILU TYKSLABISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jaana Eskola

LIKVORIN LEUKOSYYTTIEN MIKROSKOOPPISEN ERITTELYLASKENNAN TULOSTEN VERTAILU TYKSLABISSA

Likvoria eli aivo-selkäydinnestettä tutkitaan selvittäessä keskushermostoon liittyviä häiriötä tai sairauksia, kuten meningiittiä, tulehduksellisia tiloja, kasvaimia tai vuotoepäilyjä. Meningiiteissä todetaan syystä riippuen joko granulositytti- (bakteerimeningiitti) tai lymfosityttivaltainen (virusperäinen meningiitti) solumäärän lisääntyminen. MGG-värjätyistä sytosentrifuugivalmisteista solumorfologia on hyvin nähtävissä. Gram-värjäystä pisaravalmisteesta sen sijaan nähdään mahdolliset bakteerit, mutta solumorfologia ei ole yhtä hyvin tunnistettavissa kuin MGG-värjätyissä sytosentrifuugivalmisteissa.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kolmella eri menetelmällä saatuja likvorin leukosyyttien mikroskooppisten erittelylaskentojen tuloksia ja niiden eroja. Tutkimuksessa vertailtiin MGG- ja gram-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita keskenään sekä MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita. Tavoitteena oli yhtenäistää hematologian ja päivystyslaboratorion menetelmät likvorin leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa.

Likvorinäytteiden leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta suoritetaan eri menetelmin päiväaikana ja päivystysaikana. Päiväaikana näytteet valmistetaan käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää ja MGG-värjäystä kun taas päivystysaikana näytteet valmistetaan käyttäen pisaramenetelmää ja gram-värjäystä. Päivystysaikana vastataan leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta granulositytit ja mononukleaariset solut, jolloin vastaus leukosyyttien suhteellisista prosenttiosuuksista on aina 100 %. Päiväaikana tehdystä leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta lasketaan kaikki solut erikseen, jolloin myös monosyyttien suhteellinen prosenttiosuus lasketaan, mutta sitä ei kuitenkaan vastata. Tästä syystä leukosyyttien suhteelliset prosenttiosuudet eivät aina ole päiväaikana vastatuissa näytteissä yhteensä 100 %. Tähän pyritään saamaan muutosta, jotta vastaukset olisivat yhteneväisempiä.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää molemmissa värjäyksissä, saadaan yhteneväisempiä tuloksia, sillä solumorfologia on helposti erotettavissa sytosentrifuugivalmisteesta. Todettiin myös, että nykyisiä menetelmiä käyttämällä saadaan jonkin verran yhteneväisempiä tuloksia, jos gram-värjätyistä pisaravalmisteista laskettaisiin granulosityttien ja lymfosityttien lisäksi muut solut (monosyytit) erikseen.

ASIASANAT:

Likvor, aivo-selkäydinneste, sytosentrifuugi, MGG-värjäys, May-Grünwald-Giemsa-värjäys, gram-värjäys, leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Hematology

May 2011 | 63+4

Instructor: Senior Lecturer, MSc Soile Kemi

Jaana Eskola

THE COMPARISON OF MICROSCOPIC LEUCOCYTE CELL COUNTS FOR CEREBROSPINAL FLUID IN TYKSLAB

Cerebrospinal fluid is analysed to investigate disorders or diseases linked to the central nervous system such as meningitis, inflammatory conditions, tumours and haemorrhages. Depending on what causes the meningitis, multiplication of either granulocytes (bacterial meningitis) or lymphocytes (viral meningitis) is discovered. Cell morphology is easily spotted in MGG stained, cytocentrifuged preparations. In gram stained drop preparations, however, possible bacteria can be seen but the cell morphology is not as easily specified as in MGG stained cytocentrifuged preparations.

The purpose of the research was to compare the results and differences of microscopic cell counts for leukocytes obtained by three different cell count techniques from cerebrospinal fluid. MGG and gram stained cytocentrifuged preparations were compared to one another as well as MGG stained cytocentrifuged preparations and gram stained drop preparations. The aim was to uniform the techniques used in hematology and on-call laboratory for counting leukocytes in cerebrospinal fluid samples.

The leukocyte count for cerebrospinal fluid samples is carried out in different techniques during the day and on-call. During the day samples are prepared using the cytocentrifuge and MGG staining whereas during on-call the samples are prepared using the drop technique and gram staining. Whilst on-call the cell count result includes granulocytes and mononuclear cells, thus the proportion of leukocytes is always 100 %. During the day all the cells from the leukocyte count are specified and the proportion of monocytes is counted yet not mentioned in the results. This is why the proportion of leukocytes is not always 100 % in the results given during the day. Changes in the procedure are pursued in order to make the results more uniform.

The research shows that more uniform results can be achieved by using the cytocentrifuge technique in both stainings as cell morphology is as easily spotted in a cytocentrifuge preparation. It also showed that using current techniques will result in somewhat more uniform results if other cells (monocytes) alongside granulocytes and lymphocytes were to be counted from the gram stained drop preparations as well.

KEYWORDS:

Cerebrospinal fluid, liquor, cytocentrifuge, cytospin, May-Grünwald-Giemsa-staining, gram-staining, differential white blood cell count

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 LIKVORIN LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENTA	7
2.1 Likvori	7
2.1.1 Likvorin muodostuminen	7
2.1.2 Likvorin kierto	8
2.1.3 Likvorin organismit	9
2.1.4 Likvorin diagnostiikka	10
2.2 Sytosentrifuugivalmiste	13
2.2.1 Sytosentrifuugipreparaatin valmistus	13
2.3 MGG-värjäys	14
2.3.1 MGG-värin koostumus	15
2.3.2 Värjäysprosessi	16
2.3.3 Solujen värjäytyminen	17
2.4 Gram-värjäys	18
2.4.1 Gram-värjäys infektiodiagnostiikassa	20
2.4.2 Näytepreparaatin valmistus gram-värjäystä varten	21
2.4.3 Bakteerien värjäytyminen gram-värillä	22
2.4.4 Gram-värjäyksen tarkastelu	23
2.5 Leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta likvorista	23
2.5.1 Likvorin tarkastelu ennen erittelylaskentaa	26
2.5.2 Leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan suoritus	27
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	28
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	29
4.1 Tutkimuksen toteutus	29
4.2 Metodologiset lähtökohdat	31
4.3 Eettiset näkökohdat	33
4.4 Aineiston analysointi	35
4.4.1 Tilastolliset tunnusluvut	37
4.4.2 Korrelaatio	37
4.4.3 Parierojen t-testi	39
4.4.4 Normaalijakauman testaus	40
5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	41
6 POHDINNAT	54

LIITTEET

- Liite 1. Tutkimuslupa
- Liite 2. Bakteeri värjäys (Gram-värjäys)
- Liite 3. May-Grünwald-Giemsä-värjäys (MGG-värjäys)
- Liite 4. Tulokset

KUVIOT

- Kuvio 1. Preparaattien valmistus
- Kuvio 2. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (granulosyytti)
- Kuvio 3. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti)
- Kuvio 4. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (monosyytti)
- Kuvio 5. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (granulosyytti)
- Kuvio 6. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti)
- Kuvio 7. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti) (tutkimus)

TAULUKOT

- Taulukko 1. Tunnusluvut
- Taulukko 2. Tunnusluvut (tutkimus)
- Taulukko 3. Korrelaatiokertoimet (granulosyytit)
- Taulukko 4. Korrelaatiokertoimet (lymfosyytit)
- Taulukko 5. Korrelaatiokertoimet (lymfosyytit) (tutkimus)
- Taulukko 6. Korrelaatiokertoimet (monosyytit)
- Taulukko 7. Normaalijakaumatesti
- Taulukko 8. Normaalijakaumatesti (tutkimus)
- Taulukko 9. Parierojen t-testi
- Taulukko 10. Parierojen t-testi (tutkimus)

1 JOHDANTO

Likvoria eli aivo-selkäydinnestettä on tutkittu eri kokein jo yli sadan vuoden ajan. Likvoria tutkitaan selvittäessä keskushermostoon liittyvää häiriötä. (Ramström & Bergquist 2007; 269.) Likvorissa ei normaalisti esiinny soluja eikä bakteereita ja se on ulkonäöltään kirkasta ja väritöntä. Likvorin koostumuksessa tapahtuu muutoksia mm. aivoverenvuotojen, kasvaimien, tulehduksien ja muiden keskushermostosairauksien yhteydessä. (TYKSLAB 2010.)

Tutkimus käsittelee likvorinäytteiden leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan tulosten vertailua eri menetelmin. Tutkimus suoritettiin Turun yliopistollisen keskussairaalan hematologian laboratoriossa sekä päivystyslaboratoriossa, joissa tutkija vertaili kyseisten laboratorioiden käytössä olevia likvoripreparaattien valmistusmenetelmiä (pisara ja sytosentrifuugi) sekä niistä saatuja tuloksia keskenään. Vertailu tehtiin lisäksi gram- ja MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden välillä. Tutkimus on jatkoa aikaisempaan opinnäytetyöhön, joka tehtiin vuosi sitten keväällä 2010 (ks. Sahla 2010).

Ongelmana on ollut likvorinäytteen erittelylaskennassa saatujen tulosten eroavuus, joihin vaikuttavat laboratorioiden eri menetelmät. Aiemman tutkimuksen tulosten tulkinnassa tuli ongelmia, sillä solumorfologiaa oli joidenkin paksu-pisaranäytteiden kohdalla hankala tarkastella näytteen paksuuden vuoksi. TYKSin hematologian laboratoriosta tuli pyyntö, että tutkimusta jatkettaisiin siten, että kummassakin laboratoriossa likvorinäytteet valmistettaisiin sytosentrifuugin avulla. Tällöin solumorfologia olisi paremmin eroteltavissa kummankin laboratorion osalta. Lisäksi tehdään pisaravalmisteet vertailun vuoksi.

Tutkimuksen tarkoituksena on vertailla kolmella eri menetelmällä saatuja likvorin leukosyyttien mikroskooppisten erittelylaskentojen tuloksia ja niiden eroja. Tavoitteena on yhtenäistää laboratorioiden käytäntö likvorin leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa. Tutkimuksen avulla hematologian- ja päivystyslaboratorion menetelmätavat likvorinäytteiden erittelylaskennassa mahdollisesti yhtenäistyvät.

2 LIKVORIN LEUKOSYYTTIEN ERITTELYLASKENTA

2.1 Likvori

Ensimmäinen lumbaalipunktio suoritettiin potilaalle jo yli sata vuotta sitten. Viime vuosisadan alussa kyettiin osoittamaan, että veren ja aivojen välillä on tietynlainen este eri organismien vapaalle kulkeutumiselle. Kyseessä on veri-aivoeste, jonka toiminta vaihtelee erilaisissa patologisissa tiloissa. Tästä alkaen kiinnostus likvorin fysiologiaan ja sen merkitykseen eri tautitiloissa alkoi lisääntyä. Nykypäivänä likvorin analysointi on olennainen osa keskushermoston alueen tautien diagnostiikassa. (Weber & Ojala 1986.)

Normaalisti likvori on lähes solutonta eikä siinä esiinny bakteereita (TYKSLAB 2010). Likvorin päätehtävänä on toimia mekaanisena suojana aivoille. Lisäksi se kuljettaa aineenvaihdunnallisesti aktiivisia organismeja sekä poistaa kuona-aineita. (Jerrard ym. 2001, Ramström & Bergquist 2007; 269.) Infektion yhteydessä likvorissa todetaan riippuen syystä joko granulositytti- tai lymfosyyttivaltainen solumäärän lisääntyminen. Toisaalta solumäärä voi olla myös vähäinen mm. enkefaliiteissa ja lievissä virusmeningiiteissä. (Pirttilä 2006, 62.)

2.1.1 Likvorin muodostuminen

Likvori eli aivo-selkäydinneste syntyy suodoksena plasmasta. Kaksi kolmasosaa likvorista syntyy veren suodoksena aivokammioiden seinämässä olevien suonipunosten kautta. Muut veressä normaalisti kiertävät organismit eivät kuitenkaan pääse suoraan hermoston alueelle, sillä aivokammioiden suonipunosten endyymisolujen muodostama veriselkäydinneste-este ja endoteelin muodostama veriaivo- tai verihermoeste sekä aivoston ja selkäytimen alueen tiiviit liitokset rajoittavat niiden suodattumista. Osa veren organismeista kuitenkin pääsee aivostoon ja selkäydinnesteeseen diffundoitumalla tiiviiden liitosten läpi. Monille veren organismeille on olemassa lisäksi erilaisia aktiivisia ja kyllästyviä kuljetusjärjestelmiä, joiden avulla ne pääsevät aivostoon ja likvoriin. (Pirttilä & Oksi 2001, Pirttilä 2006; 58–59.) Noin 20 % likvorista muodostuu aivoston soluvälinesteestä ja kulkeutuu aivokudoksesta aivokammioihin. Tällä tavoin aivoissa

tuotetut tekijät pääsevät likvoriin, mikä mahdollistaa aivoston toiminnan muutosten selvittämisen likvorista. Aivokalvot eivät osallistu likvorin tuottamiseen, mutta tulehduksen yhteydessä niiden läpäisevyys soluille ja veren proteiineille lisääntyy kuitenkin huomattavasti. (Pirttilä & Oksi 2001.)

2.1.2 Likvorin kierto

Seerumin suodattuessa plexus chorioideusten suonten seinämän ja endyymin läpi aivokammioihin, syntyy likvori (Palo ym. 1996; 56, Mesko & Pullmann 2002; 393, Koss & Melamed 2006; 1023, Soinila 2007; 42). Tähän prosessiin osallistuvat suonten seinämän aktiiviset solut, differentiaalinen imeytyminen, aktiivinen erityis sekä tiivis aineenvaihdunnallinen kulku aivokammioihin (Mesko & Pullmann 2002; 393). Kyseessä on aktiivinen prosessi, joka muuttaa seerumin koostumusta merkittävästi. Likvori kulkeutuu lateraalikammioista kolmannen aivokammion ja aivonesteviemärin kautta neljänteen kammioon ja sieltä aivokammiossa olevien aukkojen kautta subaraknoidaaliseen tilaan, josta se virtaa selkäyttimeen. Selkäytimestä likvori lopulta imeytyy araknoidean granulaatiomuodostumien kautta laskimotilaan. (Palo ym. 1996; 56, Jerrard ym. 2001, Soinila 2007; 42.) Subaraknoidaalinen tila on tavallisesti suljettu systeemi, jonka bakteerimeningiitin riskiä kasvattaa päähän kohdistunut vaurio (Welch & Hasbun 2010; 32). Laskimotilasta likvori kulkee kaulan suurten laskimoiden kautta verenkiertoon, jonka mahdollistaa kallonsisäisen paineen muodostama gradientti, joka edistää likvorin imeytymistä laskimosinuksiin. Pumppuvoimana likvorikerrossa toimii aivoverenkierron pulssi. (Pirttilä & Oksi 2001, Soinila 2007; 42.)

Aikuisen likvorin kokonaismäärä on noin 150 ml, josta noin puolet on aivokammioissa ja puolet subaraknoidaalitilassa (Pirttilä & Oksi 2001, Koss & Melamed 2006; 1023, Pirttilä 2006; 58, Ramström & Bergquist 2007; 269, Soinila 2007; 42). Vastasyntyneellä likvorin määrä on 10–60 ml (Mesko & Pullmann 2002; 393, Koss & Melamed 2006; 1023, Collins 2007; 207). Likvorin määrä saattaa kuitenkin vaihdella $\pm 50\%$ (Jerrard ym. 2001, Pirttilä & Oksi 2001, Mesko &

Pullmann 2002; 393, Pirttilä 2006; 58, Soinila 2007; 42, Welch & Hasbun 2010; 31).

Likvorin kierto on vilkasta, jonka ansiosta sitä syntyy noin 500 ml vuorokaudessa (Jerrard ym. 2001, Pirttilä & Oksi 2001, Mesko & Pullmann 2002; 393, Pirttilä 2006; 58, Soinila 2007; 42, Welch & Hasbun 2010; 31). Näin ollen likvori uusiutuu 4-6 tunnin välein eli neljä viisi kertaa vuorokaudessa pääosin aivojen plexus chorioideuksista (Pirttilä & Oksi 2001, Ramström & Bergquist 2007; 269, Welch & Hasbun 2010; 32). Likvoria erittyy tietty määrä tietyssä aikana, jolloin taataan, että sen tilavuus pysyy suhteellisen muuttumattomana (Koss & Melamed 2006; 1023). Samalla tapahtuu jatkuvaa kemiallisten ainesosien vaihtoa likvorin ja veren välillä endependymissa, verisuonitilassa sekä lukinkalvolla (Mesko & Pullmann 2002; 393). Likvoritilavuuden vaihtelu toimii puskurina silloin, kun muiden kallonsisäisten rakenteiden tilavuus muuttuu. Likvorin muodostama nestevaippa aivojen ja selkäytimen ympärille toimii tehokkaana iskunvaimentajana. (Jerrard ym. 2001, Mesko & Pullmann 2002; 393, Pirttilä 2006; 58, Collins 2007; 207, Soinila 2007; 42.) Likvorinäytteiden tuloksiin vaikuttaa näytteenoton ajankohta suhteessa aivoston alueen tapahtumiin (Pirttilä & Oksi 2001).

2.1.3 Likvorin organismit

Joidenkin likvorin organismien pitoisuuksien muodostumista on säädelty tiettyyn määrään. On myös organismeja, kuten glukoosi, urea ja kreatiniini, jotka pääsevät sitä vastoin kulkemaan vapaasti likvoriin edellyttäen kuitenkin usean tunnin tasapainoista tilaa likvorissa. Analysoitaessa likvorin eri pitoisuuksia tulisi tuloksia verrata plasman pitoisuuksiin, vaikka likvorin aineenvaihdunta olisikin normaali, sillä plasman muutokset heijastuvat likvoriin. (Mesko & Pullmann 2002; 393.)

Likvori takaa ympäristön, joka parantaa aivojen ravinnon saantia, poistaa aineenvaihdunnalliset sivutuotteet aivoista sekä turvaa aivoja mekaanisilta vaurioilta. Suurin osa likvorin ainesosista esiintyy likvorissa samansuuruisina tai suurempina pitoisuuksina kuin plasmassa. (Mesko & Pullmann 2002; 393.) Tavallisesti plexus chorioideusten ns. veriaivoesteet rajoittavat eri ainesosien pää-

syä likvoriin. Näin likvorissa säilyy muuttumaton ja tasainen pitoisuus eri organismien välillä, jotka ovat riippumattomia seerumin muutoksista. Samalla tataan aivoille toimivat olosuhteet. Plexus chorioideusten ns. veriaivoesteet sisältävät tiettyjä geenejä, jotka estävät myrkyllisten aineiden kulun likvoriin. (Mesko & Pullmann 2002; 393, Koss & Melamed 2006; 1023.) Kuitenkin patologisissa tiloissa veriaivoesteen toiminta saattaa häiriintyä, jolloin ainesosat pääsevät kulkeutumaan likvoriin ja samalla niiden pitoisuudet kohoavat (Mesko & Pullmann 2002; 393).

Proteiinipitoisuus likvorissa on huomattavasti pienempi kuin seerumissa (Palo ym. 1996; 57). Suurin osa (noin 80 %) likvorin proteiineista on suodattunut verestä ja loput proteiineista on peräisin aivoston alueelta (Pirttilä 2006; 59). Proteiinipitoisuus kuitenkin kasvaa mm. likvorin kierron häiriöiden ja kasvainten yhteydessä. Likvori sisältää lisäksi glukoosia, jota on noin 2/3 veren glukoosista. Eräät aivokalvontulehdukset kuitenkin saattavat vähentää likvorin glukoosipitoisuutta. Punasoluja ei esiinny normaalisti terveen henkilön likvorissa, ja leukosyyttejäkin esiintyy vain muutamia. Punasolujen esiintyminen likvorissa viittaa kallonsisäiseen vuotoon ja valkosolujen lisääntyminen viittaa mm. tulehdukseen. (Palo ym. 1996; 57.)

2.1.4 Likvorin diagnostiikka

Likvori on tavallisesti steriiliä ja sisältää vain muutamia leukosyyttejä, lähinnä lymfosyyttejä (Koss & Melamed 2006; 1023, Baird 2005, 124). Lisäksi likvori sisältää samankaltaisia elektrolyyttejä, kuin veressä esiintyy sekä pieniä määriä proteiinia (Mesko & Pullmann 2002; 393). Ulkonäöltään likvori on normaalisti viskoositon, kirkas ja väritön (Palo ym. 1996; 137, Mesko & Pullmann 2002; 393, Koss & Melamed 2006; 1023, Collins 2007; 207, Saastamoinen 2009). Samea näyte saattaa viitata siihen, että se sisältää runsaasti leukosyyttejä ($>200/\text{mm}^3$), punasoluja ($>400/\text{mm}^3$) tai muita mikro-organismeja (Collins 2007; 207). Likvorin sameus ja maitomaisuus viittaa mahdolliseen bakteerimeningiittiin. Näyte, joka on tasaisen veristä ja juoksevaa, sentrifugoinnin jälkeen punertava tai punertavan keltainen, viittaa vuotoon. Merkinä vanhasta vuodosta lik-

vori saattaa olla keltaista, jolloin näytteen proteiinipitoisuus on hyvin korkea. Näytteessä saattaa olla myös ns. artefaktiverta, joka hyytyy tai on verinen, mutta kirkastuu jatkossa. Sentrifugoinnin jälkeen näyte on kuitenkin väritöntä. (Palo ym. 1996; 137, Saastamoinen 2009.) Verisen näytteen saattaa aiheuttaa myös punktiosta aiheutuva verenvuoto tai patologinen verenvuoto hermostossa (Collins 2007; 207).

Useamman näyteputken tullessa laboratorioon, havainnoidaan jokaisesta putkesta näytteiden ulkonäkö. Jos ensimmäisessä putkessa näyte on verinen, mutta loppuisissa putkissa näyte on kirkasta tai kirkkaampaa, on veri todennäköisesti peräisin punktiosta. Kaikkien putkien näytteiden ollessa tasaisen verisiä, on kyseessä todennäköisesti vuoto. (Collins 2007; 207.) Tuoreessa vuodossa supernatantti on kirkasta ja väritöntä. Tämä johtuu siitä, että punasolut eivät ole ehtineet vielä hajota. (Palo ym. 1996; 137.) Solujen lisääntyminen tai glukoosi- ja proteiinipitoisuuksien nousu likvorissa on merkki patologisesta tilasta (Koss & Melamed 2006; 1023). Likvorin koostumuksessa tapahtuu muutoksia aivoverenvuotojen, kasvaimien, meningiittien, tulehduksien ja muiden keskushermostosairauksien yhteydessä (TYKSLAB 2010).

Likvorinäyte otetaan tavallisimmin lumbaalipunktion eli lannepiston avulla (Palo ym. 1996; 134, Mesko & Pullmann 2002; 393, Ramström & Bergquist 2007; 271). Näyte voidaan ottaa kuitenkin myös suoraan aivokammioista neurokirurgisen operaation yhteydessä tai niskapunktiolla cisterna magnasta (Palo ym. 1996; 134, Koss & Melamed 2006; 1024). Likvorinäyte otetaan tavallisesti neljään näyteputkeen, joihin jokaiseen olisi hyvä saada 1,5 ml näytettä. Näyteputket lähetetään laboratorioon tarpeen mukaan leukosyyttien mikroskooppiseen erittelylaskentaan, glukoosi- ja proteiinitutkimuksiin sekä gram-värjäykseen ja viljelyyn. Lisäksi tarvittaessa näytettä lähetetään sieni- ja mykobakteeriviljelyä varten laboratorioon. (Jerrard ym. 2001.)

Nopea ja tarkka diagnosointi on välttämätöntä sairauksissa, jotka liittyvät keskushermostoon (Jerrard ym. 2001). Likvori antaa mahdollisuuden keskushermoston toiminnan muutosten selvittämiseen (Jerrard ym. 2001, Pirttilä 2006; 58, Welch & Hasbun 2010; 31). Analysoinnin avulla selvitetään tulehduksellista ti-

laa, useaa infektiota sekä infektiotonta tautia koskien aivoja sekä selkäydintä. Lisäksi sitä käytetään meningiittien havaitsemiseen, subaraknoidaalitilan vuodon selvittämiseen ja leptomeningiittisten metastaasien havainnointiin. (Deisenhammer ym. 2006.)

Analysointi tapahtuu laboratorion rutiinitesteillä, kuten mm. mikroskooppisella solulaskennalla ja proteiinipitoisuuksia mittaamalla tai edistyneellä molekyyli-diagnostiikalla sekä sytokiinien tarkastelulla (Welch & Hasbun 2010; 31). Likvorista tutkitaan tiettyjä ominaisuuksia. Näitä ovat likvorin väri, ulkonäkö, koostumus, hyytymät, paine, solut, biokemialliset tutkimukset, bakteerit ja virukset sekä niiden viljely, sytologiset ja serologiset analyysit, mikroskooppinen analysointi, antigeenien havainnointi, nukleinihappotutkimus PCR:n avulla, spesifinen serologinen testaus sekä eosinofiilien värjäys. Likvorin tutkimisen tarkoituksena on mitata likvorin painetta, jotta voidaan havaita mahdollinen este likvorin kierrossa. Tutkimuksista on apua diagnosoitaessa virus- tai bakteerimeningiittiä, subaraknoidaalitilan tai kallonsisäistä verenvuotoa, kasvaimia sekä aivojen märkäpaiseita. Lisäksi likvorin tutkimusta hyödynnetään diagnosoitaessa keskushermoston infektioita. (Mesko & Pullmann 2002; 393.)

Likvorin tutkiminen on tärkeää erityisesti meningiitissä, sillä leukosyyttien määrästä ja erittelylaskennasta saadaan yleensä nopeimmin viite taudin aiheuttajasta (Pirttilä & Oksi 2001). Tällöin likvorissa todetaan joko granulosityttivaltainen tai lymfosityttivaltainen solumäärän lisääntyminen. Enkefaliiteissa ja lievissä virusperäisissä meningiiteissä leukosyyttien määrä on suhteellisen pieni ja lymfosityttivoittainen. (Pirttilä & Oksi 2001, Pirttilä 2006; 62.) Useimmissa bakteerimeningiiteissä leukosyyttien määrä on suuri. Tämä tekee näytteestä sameanharmaata ja erittelylaskennassa granulosityttien osuus on merkittävä. (Pirttilä & Oksi 2001.) Viljelemällä, osoittamalla antigeeni tai vasta-ainemäärityksin pyritään tunnistamaan taudin aiheuttaja (Pirttilä 2006; 62). Tutkittaessa likvorin eri organismien pitoisuuksia eri menetelmin ja vertailemalla niitä lopuksi keskenään, lisätään diagnoosin herkkyyttä ja spesifisyyttä (Deisenhammer ym. 2006).

2.2 Sytosentrifuugivalmiste

Sytosentrifuugin käyttö parantaa solujen tunnistusta nesteissä, jolloin solujen morfologia on paremmin nähtävissä (Chapin-Robertson ym. 1992, Warfield 1998; 109, Collins 2007; 206). Sytosentrifuugitekniikkaa käyttämällä solut saadaan konsentroitua maksimaalisesti suoraan ns. solunapiksi objektilasille mikroskooppista tarkastelua varten (Warfield 1998; 109, Collins 2007; 206, Iivonen & Routa 2007; 8-10). Näytteissä, joissa on vähän solumateriaalia, preparaatin valmistus on hyvä suorittaa sytosentrifuugin avulla (Warfield 1998; 109). Sytosentrifuugi pyörii matalalla nopeudella, joka minimoi solun rakenteiden vääristymää (Collins 2007; 206).

2.2.1 Sytosentrifuugipreparaatin valmistus

Sytosentrifuugivalmisteen tekoon tarvitaan näytekammio, ns. pidike, imupaperi, johon liika neste imeytyy sekä objektilasi. Nämä kolme osaa kiinnitetään yhteen tietynlaisella pidikkeellä. (Collins 2007; 206.) Preparaatin valmistus aloitetaan kirjaamalla lasin hiospään potilaan tunnistetiedot. Näytekammioon pipetoidaan tarvittava määrä näytettä. Pidikkeen tehtävänä on pitää lasi paikoillaan sentrifugoinnin ajan. Imupaperin tehtävänä on saada rajattua solukerros tietylle kohtaa lasia siinä olevan rajaajan avulla ja samalla solukerros saadaan yksikerroksiseksi. Objektilasi sijoitetaan pidikkeeseen siten, että hiospään himmeä puoli on ylöspäin. Tämän jälkeen lasin päälle asetetaan imupaperi. Näytekammio asetetaan pidikkeeseen lasin ja imupaperin päälle. Ennen näytteen laittamista näytekammioon tulee tarkastaa, että imupaperin ja kammion aukot ovat kohdallaan. (Iivonen & Routa 2007; 8-10.)

Näytteen laatua ja ulkonäköä arvioidaan silmämääräisesti. Näyte pipetoidaan kammioon siten, että mitä paksumpaa näyte on, sitä vähemmän laitetaan näytettä ja toisinpäin (Iivonen & Routa 2007; 8-10.) Näytekammioon lisätään muutama tippa hyvin sekoitettua näytettä, jonka jälkeen se sentrifugoidaan hitaalla vauhdilla (Collins 2007; 206). TYKSin päivystyslaboratoriossa (os.930) ja hematologian laboratoriossa (os.933) solususpensio näytekammioon valmistetaan laittamalla kammioon 500 µl näytettä ja yksi tippa 22 % albumiinia (TYKSLAB

1998). Näytteet voidaan sentrifugoida eri nopeuksilla riippuen näytemateriaalin ominaisuuksista sekä objektilaseista (Iivonen & Routa 2007; 8-10). Sentrifugoidessa solususpensiosta siirtyy solukerros objektilasille rajaajan läpi sentrifuugin voiman pakottamana ja ylimääräinen näyte imeytyy imupaperiin (Warfield 1998; 111, Collins 2007; 206). Vaikka osa soluista imeytyy imupaperiin, antaa menetelmä oikean edustuksen solujen esiintyvyydestä näytteessä (Collins 2007; 206).

Sentrifugointiprosessi tai suuri solumäärä saattavat kuitenkin aiheuttaa vääristymiä näytteen solujen esiintyvyydessä. Suuresta solumäärästä johtuva vääristymä voidaan pyrkiä minimoimaan käyttämällä sopivaa laimenninta, jota lisätään näytteeseen ennen sentrifugointia. Laimentimena voidaan käyttää tavallisesti fysiologista keittosuolaliuosta. Tavallisesti laimenninta lisätään näytteeseen näytteen leukosyyttien määrän perusteella. Jos näytteessä on tumallisia soluja $200/\text{mm}^3$ tai vähemmän, saadaan hyvä valmiste solujen erittelylaskentaa varten. Näyte, jossa on erittäin paljon punasoluja, tulee laimentaa suuremmalla laimennoksella. (Collins 2007; 207.)

Käytettäessä aina samaa näytemäärää sytosentrifuugivalmistetta tehtäessä, voidaan olettaa, että saadaan tasainen solukerros objektilasille. Tämä voidaan varmistaa leukosyyttien solulaskennan avulla. Esimerkiksi, jos laimentamatonta tai laimennettua näytettä laitetaan aina viisi pisaraa tehtäessä sytosentrifuugivalmistetta, tulisi leukosyyttejä pystyä mikroskooppisesti erottelemaan 100:an, mikäli leukosyyttien solulaskennassa on saatu leukosyyttien määräksi $3/\text{mm}^3$ tai enemmän. Jokainen preparaatti tulisi käydä kokonaan läpi ennen mikroskooppista leukosyyttien erittelylaskentaa, jotta voidaan varmistua, etteivät solut ole kasaantuneet huomattaviin rykelmiin. (Collins 2007; 207.)

2.3 MGG-värjäys

MGG-värjäys eli May-Grünwald-Giemsa-värjäys on yksi muunnos Romanowskyn menetelmistä, joka mahdollistaa kaikkien kypsien solujen ja valtaosan ytimen hematopoeesin esiasteiden tunnistuksen värjäämällä leukosyyttien granulat. Tämä mahdollistaa solujen morfologisen tarkastelun. (Vilpo 1998; 94, Aho

2000, Perkins 2009; 8-9.) MGG:ssa tarvittavat reagenssit voidaan hankkia kaupallisina tai ne voidaan valmistaa itse laboratorioissa (Perkins 2009; 8).

Romanowskyn menetelmän kehitti 1900-luvun puolella venäläinen alkueläimiä tutkiva tutkija. Värjätessään malariaparasiittia, Romanowsky käytti vanhaa metyleenisineä ja eosiinin sekoitusta. Tämän väriseoksen ansiosta malariaparasitiin nukleolit värjäytyivät liilaksi ja sytoplasma siniseksi. Giemsa muutti värjäystä myöhemmin yhdistämällä metyleenisinen, atsuurin ja eosiinin keskenään. Niinpä kyseinen värjäys nimettiin May-Grünwald-Giemsa-väriksi. Giemsan ja May-Grünwald-värin yhdistelmä on yleisin käytetty värjäys Iso-Britanniassa. (Bain 2006; 12.)

MGG-värjäystä käytetään perifeerisen veren sivelyissä sekä luuydindiagnostiikassa. Värjäystä käytetään lisäksi diagnostisessa sytologiassa tehtyihin ilma-kuivattuihin sivelyvalmisteisiin sekä sytosentrifuugin avulla tehtyihin näytteisiin, mm. likvorivalmisteisiin. Värjäyksen avulla leukosyyttien eri tyypit saadaan hyvin esille. Menetelmä soveltuu sekä tulehdusten aktiivisuuden määrittämiseen että imusolmukkeista tehtävään lymfoomadiagnostiikkaan. (Aho 2000.)

2.3.1 MGG-värin koostumus

Romanowsky-tyyppisessä värjäysmenetelmässä oleellisena aineosana on perusväri, kuten atsuuri B, joka värjää nukleiinihapot ja nukleiinien proteiinit, basofiilien granulat ja heikosti neutrofiilien granulat sini-violeteiksi tai sinisiksi. Lisäksi se sisältää happaman värin, kuten eosiinin, joka värjää hemoglobiinin ja eosinofiilien granulat punaisiksi tai oranssiksi. Tyydyttävän Romanowskyn värjäyksen takaa väri, joka sisältää atsuuri B:tä ja eosiinia, sekä väri, joka sisältää sekoituksen atsuuri B:tä, metyleenisineä ja eosiinia. (Bain 2006; 13.)

MGG-värjäyksessä käytetään kahta polykromaattista liuosta; metyleenisineä ja eosiinia (Aho 2000, Bain & Lewis 2006; 61, Siitonen & Jansson 2007; 109, Perkins 2009; 8). May-Grünwaldin reagenssiluos koostuu eosiini Y:stä, joka värjää punasolut punertaviksi ja metyleenisinestä, joka värjää leukosyyttien tumat sinisiksi. Giemsa-reagenssi koostuu eosiini Y:stä, metyleenisinestä ja atsuuri B:stä.

Atsuuri B ja eosiini värjäävät yhdessä leukosyyttien eri granulat. Atsuuri B värjää metyleenisinen ja eosiinin kanssa tumat punasinisiksi. (Aho 2000, Siitonen & Jansson 2007; 109.) Kaikki Romanowskyn värjäysmenetelmät ovat veteen liukenemattomia, mutta liukenevat metanoliin. Värit eivät saa sisältää vettä, sillä vesi saattaa aiheuttaa artefaktiöydyksiä soluissa. Vedestä johtuvien artefaktien välttämiseksi objektilasi tulisi fiksoida metanolilla ennen värjäystä. (Perkins 2009; 8.)

2.3.2 Värjäysprosessi

Optimaaliset värjäysolosuhteet tulee vakiinnuttaa aina otettaessa uusi värierä käyttöön (Perkins 2009; 8). Objektilasi tulee ilmakeivata hyvin ennen värjäyksen aloittamista, jonka jälkeen se tulee kiinnittää mahdollisimman pian valmistuksen jälkeen (Vilpo 1998; 94, Aho 2000, Bain & Lewis 2006; 63–64). Lasin tulee olla kuivunut kunnolla ennen värjäystä, sillä solut eivät värjäydy kunnolla objektilasin ollessa vielä märkä (Vilpo 1998; 94, Aho 2000). Objektilasin seisotus usean päivän ajan huoneenlämmössä saattaa vaikuttaa värjäykseen siten, että kuivuneen plasman tausta värjäytyy haalean siniseksi, jota on mahdotonta poistaa pilaamatta punasolujen värjäytymistä (Bain & Lewis 2006; 63–64).

Värjäys aloitetaan kiinnittämällä kuiva objektilasi metanolissa 5-10 minuutin ajan (Aho 2000, Bain & Lewis 2006; 63). Kiinnityksen aikana on tärkeää välttää, ettei objektilasi pääse veden kanssa kosketuksiin, sillä pienikin vesimäärä saattaa aiheuttaa muutoksia objektilasilla (Bain & Lewis 2006; 64). Kiinnityksen jälkeen objektilasi siirretään muutamaksi minuutiksi May-Grünwald-liuokseen (Aho 2000, Bain & Lewis 2006; 63–64). Liuoksen eosiini reagoi solun osiin värjäten sytoplasman komponentit ja hemoglobiinin punertavan sävyisiksi. Metyleenisinen värjää solun happamat osat, jotka ovat negatiivisesti varautuneet, kuten tuman kromatiinin ja proteiinit sinertävän violetiksi. (Aho 2000, Perkins 2009; 8.) Seuraavaksi objektilasi käsitellään Giemsa-liuoksella noin 10 minuutin ajan (Aho 2000, Bain & Lewis 2006; 64). Liuoksessa liottimena toimii metanoli ja stabiloijana glyseroli (Aho 2000). Väriliuosten jälkeen suoritetaan vesihuuhtelut puskuroidulla aqualla, jonka pH on 6,8 (Bain & Lewis 2006; 64). Värjäyksen lo-

puksi objektilasi ilmakeivataan ja päällystetään (Aho 2000). Tyydyttävä ja tarkoituksenmukainen värjäystulos saadaan käyttämällä laadukkaita kaupallisia värejä sekä käyttämällä värjäysautomaattia (Bain 2006; 13). Laimennettujen värien värjäytymisvoimakkuus säilyy riittävän hyvin, vaikka samoilla väreillä värjätään useita objektilaseja. Värit tulee valmistaa päivittäin, jotta ne pysyvät tuoreina. (Bain & Lewis 2006; 64.)

Värjäys tulee suorittaa oikealla pH-pitoisuudella, sillä pH:n ollessa liian matala eivät basofiiliset osat värjäydy kunnolla. Leukosyytit ovat tavallisesti haaleita kirkkaanpunaisine eosinofiilien granuloineen. pH:n ollessa liian korkea, perusväriä voi olla liikaa, jolloin yleensä tapahtuu ylivärjäytymistä. Tällöin normaalien ja polykromaattisten punasolujen morfologian tarkkailu hankaloituu. Lisäksi eosinofiilien granulat ovat syvän sinisiä tai tummanharmaita ja normaalien neutrofiilien granulat ovat värjäytyneet voimakkaasti tekeytyen toksiseksi granulaatioksi. (Bain 2006; 13.)

2.3.3 Solujen värjäytyminen

Tavallisesti siniseksi värjäytyvää sytoplasmaa ja sinipunaisiksi värjäytyviä granuloita kutsutaan basofiiliseksi ja violetiksi tai punertavan violetiksi värjäytyneitä granuloita kutsutaan eosinofiiliseksi (Bain 2006; 13). Erytrosyyttien värjäytyvyys vaihtelee vaaleanpunaisesta haalean sinipunaiseen. Tumat värjäytyvät siniseksi tai punertaviksi ja granulat siniseksi. Sytoplasma värjäytyy vaalean harmaaksi tai sinipunaiseksi. (Aho 2000, Technical data sheet 813 2010.) Neutrofiilin tuman värjäytyvyys vaihtelee sinisestä tummansiniseen ja sinipunaiseen (Aho 2000, Perkins 2009; 9, Technical data sheet 813 2010). Neutrofiilin granulat ovat hie-man emäksisiä ja värjäytyvät siksi heikosti (Perkins 2009; 9). Näin ollen ne värjäytyvät punertavan liiloiksi ja sytoplasma värjäytyy haalean vaaleanpunaiseksi (Aho 2000, Technical data sheet 813 2010). Eosinofiilit sisältävät hyvin paljon emäksisiä osia, jotka eosiini värjää voimakkaasti (Perkins 2009; 9). Eosinofiilin tuman värjäytyvyys vaihtelee sinisestä tummansiniseen ja sinipunaiseen. Eosinofiilin granulat värjäytyvät punaisiksi tai oranssinpunaisiksi ja sytoplasma värjäytyy siniseksi. (Aho 2000, Technical data sheet 813 2010.) Basofiilien granulat

sisältävät lähinnä happamia proteiineja (Perkins 2009; 9). Tästä syystä basofiilin tumman värjäytyvyys vaihtelee liilasta tummansiniseen ja mustaan, granulat värjäytyvät liiloiksi. Basofiilin sytoplasma värjäytyy voimakkaan siniseksi. (Aho 2000, Perkins 2009; 9, Technical data sheet 813 2010.) Lymfosyytin ja monosyytin tumat värjäytyvät tumman sinipunaisiksi ja sytoplasma värjäytyy haaleansiniseksi tai harmaaksi. Trombosyytit värjäytyvät liilasta sinipunaiseen. (Aho 2000, Technical data sheet 813 2010.)

Toisinaan solut saattavat värjäytyä liikaa sinisellä värillä. Tämä saattaa johtua liian pitkästä värjäysajasta, virheellisestä värin valmistuksesta tai vanhentuneesta puskurista, joka on liian emäksistä, vanhasta näytteestä tai liian paksusta näytteestä. Värjäyksen laatua voidaan parantaa huuhtelemalla huolellisesti värjätty objektilasi tislattulla vedellä. Huolimaton huuhtelu näkyy mm. siinä, että väriä on jäänyt myös solujen väliseen tilaan. Värjäyksen tullessa esille liian vaaleanpunaisena tai punaisena, löytyy ongelma yleensä puskurista, joka on liian hapan. Lisäksi liiallista punaisuutta näytteessä saattaa aiheuttaa puutteellinen värjäysaika sekä liiallinen huuhtelu. Värjäyksessä aiheutuvat ongelmat ovat useimmiten kuitenkin peräisin liuosten pH- pitoisuudesta. Tämä ongelma saadaan useimmiten ratkaistua vaihtamalla puskuri uuteen. Artefaktien ilmeneminen näytteessä saattaa aiheutua likaisista objektilaseista tai pölystä. Väriliuokset tulee suodattaa tai vaihtaa viikoittain, jos ne ovat jatkuvassa käytössä. (Perkins 2009; 9.) Värjäysautomaatin käyttö on parempi vaihtoehto verrattuna manuaaliseen värjäämiseen, sillä automaatti kastaa lasit kokonaisuudessaan väriin. Sen sijaan manuaalimenetelmää käytettäessä väri tiputetaan vaakatasossa olevan lasin päälle, jolloin jokin kohta lasilta saattaa jäädä ilman väriä. (Bain 2006; 13–14.)

2.4 Gram-värjäys

Gram-värjäys on ollut jo yli sadan vuoden ajan tärkein menetelmä, jota käytetään bakteerien alustavaan tunnistukseen muodon, koon ja gram-värjäytyvyyden perusteella (Meurman 2010). Gram-värjätty likvorinäyte takaa välittömän tiedon tautia aiheuttavasta mikro-organismista tarkasteltaessa näy-

tettä mikroskoopilla (Dunbar ym. 1998). Se on yleisesti hyväksytty luotettavimmaksi keinoksi havaita bakteerit, joita on $\geq 10^5$ /ml elimistön nesteissä (Gray & Fedorko 1992). Gramilla värjätyt näytteet mikroskoopilla tarkasteltaessa antavat tietoa mahdollisesta infektiosta sekä organismien tyypeistä ja esiintyvyydestä näytteessä (Jerrard ym. 2001). Gram-värjäystä sekä mikroskooppista tutkimusta likvorista suositellaan kaikille potilaille, joilla epäillään meningiittiä. Tutkimus on suotuisa, sillä se on helppo, nopea, halpa ja luotettava selvittäessä mahdollisia bakteereita ja tulehduksellisia soluja likvorissa. (Gray & Fedorko 1992, Welch & Hasbun 2010; 39.)

Menetelmän periaatteen keksi tanskalainen Hans Christian Joachim Gram vuonna 1884 työskennellessään eräässä laboratoriossa. Gram käsitteli kristallivioletilla värjäämiään bakteereita jodiliuoksella. Samalla hän havaitsi, että käsittelyn jälkeen osalla bakteereista väri ei ollut pestävissä pois alkoholilla ja osalla taas oli. Myöhemmin saksalainen patologi Carl Weigert täydensi menetelmän lisäämällä siihen vastavärjäyksen safraniinilla. Tällöin värinsä pesussa menetäneet bakteerit värjäytyivät punaisiksi ja olivat helpommin havaittavissa. (Meurman 2010.) Alkuperäisestä gram-menetelmästä muokattiin parannettu versio (v.1921), joka sai lisänimen ”Huckerin modifikaatio” (Liimatainen 2000).

Gram-värjäyksellä on ratkaiseva merkitys etenkin henkeäuhkaavissa infektioidissa, kun tarvitaan nopeaa selvitystä haitallisesta organismista, joka aiheuttaa mm. bakteerimeningiittiä (Chapin-Robertson ym. 1992, Greenlee & Carroll 2004; 16). Sen avulla saadaan myös tärkeää tietoa antibiootihoidon tehokkuudesta (Greenlee & Carroll 2004; 16). Niinpä värjäys toimii pikadiagnostisena menetelmänä, joka ohjaa potilaan hoitoa vakavissa infektioidissa (Chapin-Robertson ym. 1992, Liimatainen 2000). Pikadiagnostisessa menetelmässä gram-värjäys tehdään suoraan potilasnäytteestä ns. primäärivärjäyksenä (Liimatainen 2000). Tämän perusteella voidaan alustavasti päätellä infektion aiheuttaja ja aloittaa potilaalle antimikrobilääkitys (Chapin-Robertson ym. 1992, Liimatainen 2000). Primäärivärjäyksen avulla pystytään lisäksi arvioimaan näytteen laatua. Gram-värjäys voidaan tehdä myös bakteeripesäkkeestä. Tätä menetelmää kutsutaan bakteerin tunnistustestiksi, joka toimii muiden tunnistustes-

tien apuna bakteerin nimeämisessä. (Liimatainen 2000.) Gram-värjättyä näytettä tulee tutkia huolella, ututterasti ja kärsivällisesti, sillä koko lasilla saattaa esiintyä vain muutama heikosti värjäytynyt bakteeri. Infektoituneet solut, erytrosyytit, värjäytynyt proteiini ja hätiköity värjäys saattavat hankaloittaa bakteerien havaitsemista. Bakteerien, tulehduksellisten solujen ja erytrosyyttien esiintyvyys, määrä ja morfologia tulee raportoida välittömästi. (Gray & Fedorko 1992.)

2.4.1 Gram-värjäys infektiodiagnostiikassa

Gram-värjäysmenetelmä on tärkein menetelmä tutkittaessa bakteereita laboratoriossa, sillä sitä käyttäen bakteerit saadaan jaettua kahteen pääryhmään; gram-positiivisiin, jotka säilyttävät violetin värinsä ja gram-negatiivisiin, jotka värjäytyvät safraniinin vaikutuksesta punertaviksi (Archunan 2004; 160, Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008; 192). Gram-värjäyksessä tapahtuvan reaktion ymmärtäminen on hyvin tärkeää bakteeria nimettäessä (Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008; 192).

80 % bakteerimeningiittitapauksista saadaan selville gram-värjäysmenetelmän avulla (Jerrard ym. 2001). Useat gram-värjäyksen tulokset viittaavat siihen, että menetelmän herkkyys vaihtelee 50–90 % välillä (Welch & Hasbun 2010; 39). Haitallisten organismien määrä vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Organismit havaitaan gram-värjäysmenetelmää käyttäen melkein 90 % tapauksista, jolloin kyseessä on pneumokokin tai stafylokokin aiheuttama meningiitti, 86 % tapauksista, kun kyse on Haemophilus influenzaesta sekä 75 % Neisseria meningitidis meningiitti tapauksista. Sen sijaan organismit havaitaan vain 50 % tapauksissa, jolloin kyseessä on gram-negatiivinen meningiitti ja alle 50 % tapauksissa, jolloin kyseessä on meningiitti, jonka aiheuttaja on anaerobinen organismi. (Gray & Fedorko 1992, Greenlee & Carroll 2004; 16, Welch & Hasbun 2010; 39.) Gram-värjäysmenetelmän spesifisyys lähentelee kuitenkin 100 % (Dunbar ym. 1998, Jerrard ym. 2001, Welch & Hasbun 2010; 39).

2.4.2 Näytepreparaatin valmistus gram-värjäystä varten

Tutkimuksen mukaan sytosentrifuugin käyttö preparaatin valmistuksessa parantaa laboratorion henkilökunnan kykyä erottaa bakteerit gram-värjätystä näytteestä. Kyseinen tekniikka rikastaa bakteerin näytteestä tehokkaammin kuin tavallinen sentrifuugi. (Gray & Fedorko 1992, Jerrard ym. 2001.) On myös tutkittu, että käytettäessä sytosentrifuugia sentrifugoitaessa likvoria (500 µl), kyky eri organismien havainnointiin gram-värjätystä näytteestä lisääntyy 100-kertaisesti verrattuna tavallisella sentrifuugilla valmistettuun näytteeseen (Gray & Fedorko 1992, Greenlee & Carroll 2004; 16). Lisäksi leukosyyttien morfologia säilyy huomattavasti paremmin käytettäessä sytosentrifuugitekniikkaa. Sytosentrifuugin käytön haittana on, että se edellyttää 400–500 µl näytettä, jonka jälkeen se ei ole enää käytettävissä muita tutkimuksia varten. (Greenlee & Carroll 2004; 16.)

Näyte tulee levittää värjäyslasille mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen, jos gram-värjäys tehdään suoraan näytteestä. Värjäyslasin tulee olla puhdas ja kuiva ennen näytteen siirtämistä lasille. Näyte tulisi levittää lasille mahdollisimman ohuena kerroksena, sillä se helpottaa näytteen värjäämistä ja katsomista. Sytosentrifuugin avulla märkänäytteet saadaan lasille tasaisena solukerroksena. Kun näyte on saatu lasille, tulee sen antaa kuivua huoneenlämmössä. (Liimatainen 2000.)

Päivystyslaboratoriossa gram-värjäys tehdään sentrifugoidulle näytteen sakalle. Pisara näytettä tiputetaan puhtaalle objektilasille steriilin pipetin avulla. Näytepisara levitetään tarvittaessa lasille, jotta saadaan sopivan paksuinen valmisteaikaiseksi. Pisanan annetaan kuivua objektilasille. Tarvittaessa voidaan käyttää lämpöalustaa kuivumisen nopeuttamiseksi. Kuivunut näyte kiinnitetään metanolissa minuutin ajan, jonka jälkeen objektilasi ilmakuivataan. Tämän jälkeen näyte peitetään kristallivioletilla ja annetaan värin vaikuttaa minuutin ajan, jonka jälkeen väri huuhdellaan vesijohtovedellä. Seuraavaksi näyte peitetään Gramin jodiliuoksella, jonka annetaan vaikuttaa minuutin ajan ja huuhdellaan vesijohtovedellä. Värjätty objektilasi huuhdellaan etanoli-asetoniliuoksella noin 30 sekunnin ajan, kunnes väriä ei enää irtoa, jonka jälkeen se huuhdellaan pikaisesti

vesijohtovedellä. Lopuksi näyte peitetään vielä safraniiniliuoksella ja annetaan vaikuttaa minuutin ajan, jonka jälkeen objektilasi vielä huuhdellaan vesijohtovedellä. Näytteen annetaan kuivua ennen mikroskooppista tarkastelua. (TYKSLAB 2009.)

2.4.3 Bakteerien värjäytyminen gram-värillä

Bakteerin värjäytyminen gram-menetelmää käyttäen riippuu bakteerin soluseinämien kemiallisesta koostumuksesta (Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008; 192). Kaikki bakteerit värjäytyvät sinisiksi kristallivioletin ansiosta, jotka jodikäsitteilyn aikana kiinnittyvät pysyvästi gram-positiivisiin organismeihin. Kristallivioletti poistuu gram-negatiivisista bakteereista alkoholi-asetoni-huuhtelun avulla. Kyseiset gram-negatiiviset bakteerit värjäytyvät safraniinilla punaisiksi. (TYKSLAB 2009.)

Aluksi kaikki bakteerit värjätään kristallivioletilla ja jodiliuoksella, joka muodostaa liukenemattoman kompleksin bakteerin kanssa. Gram-värjäyksen periaate on, että ensin kaikki bakteerit värjäytyvät kristallivioletin ansiosta sinivioleteiksi. Huuhdeltaessa lasia alkoholilla gram-negatiivisista bakteereista huuhtoutuu kristallivioletti pois. Tämä johtuu siitä, että gram-negatiivisilla bakteereilla on ohut peptidoglykaanikerros ulkoseinässä, jota alkoholi vaurioittaa. Vaurio aiheuttaa sen, että värikompleksit pääsevät solusta ulos. Gram-positiiviset bakteerit säilyttävät sinivioletin värin, sillä niiden paksu peptidoglykaanikerros ulkoseinässä suojaa seinän rikkoutumiselta alkoholin käsittelyn aikana. Tämä johtaa siihen, ettei väri pääse vapautumaan solusta. Tämänkaltaisen bakteeri ilmenee gram-värjäyksessä sinipunaisena. Tässä vaiheessa värjäystä gram-negatiiviset bakteerit ovat vielä värittömiä. Ne saadaan näkyviin tekemällä toinen värjäys safraniinilla, joka toimii gram-värjäyksessä vastavärinä. Safraniini värjää gram-negatiiviset bakteerit punaisiksi. (Baird 1998; 133–134, Kiernan 1999; 122–124, Liimatainen 2000, Meurman 2010.)

Monet tekijät vaikuttavat bakteerien värjäytyvyyteen ja morfologiaan. Näitä ovat esimerkiksi potilaan saama antimikrobilääkitys ennen näytteenottoa, joka saattaa muuttaa hyvin paljon bakteerien värjäytyvyyttä ja morfologiaa. Lopputulok-

seen vaikuttavat myös preparaatin valmistustapa, kiinnitysmenetelmä, käytetyt reagenssit ja värjäysmenetelmä. Liian paksuista näytteistä kristallivioletti ei huuhtoudu kunnolla normaalissa ajassa, jolloin preparaatti jää siniseksi. (Liimatainen 2000.) Vääriä negatiivisia tuloksia saattaa ilmetä tapauksissa, joissa meningiitti on osittain hoidettu tai potilailla, jotka ovat saaneet antibiootteja. Lisäksi vääriä negatiivisia tuloksia saadaan mm. syfiliksestä, bakteeriverisyydestä, Lymen borreliosisista sekä mykobakteerin aiheuttamasta tuberkuloosista. (Jerrard ym. 2001.)

2.4.4 Gram-värjäyksen tarkastelu

Värjäyksen täydellinen tulkinta voi olla hyvin vaativaa. Kuitenkin sen avulla saadaan arvokasta tietoa yksinkertaisistakin tulkinnoista. Värjätystä näytteestä tulkitaan näytteen edustavuus ja kelvollisuus, mikrobien esiintyminen ja gram-värjäytyvyys sekä bakteerien morfologia. (TYKSLAB 2009.) Mikroskooppinen värjäyksen tarkastelu aloitetaan 10-kertaisella objektiivilla, jolla etsitään näytteestä edustavia kohtia ja saadaan samalla yleissilmäys näytteestä (Liimatainen 2000, TYKSLAB 2009). 100-kertaisella öljymimmersio-objektiivilla tarkastellaan näytettä tarkemmin (Liimatainen 2000). Potilasnäytteestä tehdystä gram-värjäyksestä voidaan bakteerien etsimisen lisäksi suorittaa leukosyyttien erittely granulositytteihin ja lymfosyytteihin. On kuitenkin muistettava, että gram-värjäys ei vastaa MGG-värjäystä. (TYKSLAB 2009, Meurman 2010.)

2.5 Leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta likvorista

Leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta on herkkä ja tärkein analyysi selvitettäessä likvorin avulla keskushermoston akuuttia tulehduksellista tilaa. Sen avulla voidaan havaita lisäksi meningiitin esiintyminen likvorissa. (Jerrard ym. 2001, Reiber & Peter 2001.) Hyödyllisin ja yleisin tapa erottaa bakteerimeningiitti virusmeningiitistä on selvittää leukosyyttien eri muotojen esiintyvyys likvorissa (Welch & Hasbun 2010; 37). Hematologinen värjäys ja tekniikka solu-preparaatin valmistukseen auttavat solujen tunnistuksessa näytteessä, jossa on runsaasti mononukleaarisia soluja (Koss & Melamed 2006; 1024). Leukosyyt-

tien mikroskooppisten tutkimusten avulla voidaan tunnistaa solujen morfologia sekä laskea solut (Vilpo 1998, 88).

Punasolut likvorinäytteessä ovat peräisin punktioartefaktista tai subaraknoidaalitilaan vuotaneesta verestä. Keltainen likvorin väri kertoo useita päiviä tai viikkoja aikaisemmin tapahtuneesta subaraknoidaalivuodosta. (Soinila & Launes 2007; 82.) Punasoluja ei likvorissa normaalisti ole. Jos punasolujen määrä on satoja tuhansia, on kyseessä hyvin todennäköisesti oikea vuoto. Muutama kymmenen, sata tai tuhat punasolua saattavat olla merkki artefaktista. Kuitenkin kyseisissä tapauksissa on tulos aina suhteutettava muuhun neurologiseen taudinkuvaan. (Palo ym. 1996; 137–138.)

Tavallisesti likvorissa on leukosyyttejä alle 4×10^6 solua/l. Lisääntynyttä leukosyyttien määrää likvorissa sanotaan pleosytoosiksi, mikä erottaa sen veren leukosytoosista. (Soinila & Launes 2007; 82, Welch & Hasbun 2010; 37.) Pleosytoosi viittaa meningiittiin. Vastasyntyneillä leukosyyttien määrä likvorissa on korkeampi kuin tavallisesti. Kuukauden iässä likvorin leukosyyttien määrä kuitenkin laskee lähelle normaaliarvoa. (Jerrard ym. 2001, Welch & Hasbun 2010; 37.) Jotkin lääkkeet saattavat kohottaa lymfosyyttien määrää likvorissa, mikä normaalisti viittaisi meningiittiin (Jerrard ym. 2001). Valtaosa likvorin leukosyyteistä on tavallisesti mononukleaarisia lymfosyyttejä ja loput monosyyttejä (Jerrard ym. 2001, Pirttilä 2006; 59, Collins 2007; 208, Soinila & Launes 2007; 82).

Aikuisilla valtaosa likvorin leukosyyteistä on lymfosyyttejä, kun taas vastasyntyneillä vallitsevina leukosyyteinä ovat monosyytit (Collins 2007; 208). Neutrofiilejä ei normaalisti likvorissa esiinny kuin satunnaisesti pieninä määrinä. Neutrofiilien määrän kohotessa likvorissa tulee näytteestä tutkia huolellisesti mahdolliset bakteerilöydökset, sillä bakteerit likvorissa saattavat esiintyä hyvin pieninä määrinä bakteerimeningiitin alkuvaiheessa. (Collins 2007; 208, Welch & Hasbun 2010; 37.)

Mononukleaaristen solujen lisääntyminen viittaa useimmiten viruksen aiheuttamaan ns. seroosiin meningiittiin tai enkefaliittiin (Palo ym. 1996; 138, Jerrard ym. 2001). Liuskatumaiset granulositytit voivat olla vallitsevana leukosyyttityyp-

pinä bakteeri-infektioissa ja virustulehdusten alkuvaiheessa (Soinila & Launes 2007; 82). Virusinfektioon tai muuhun tulehdukselliseen tautiin viittaa yleensä pleosytoosin ollessa alle 1000×10^6 solua/l. Bakteeri-infektion merkinä on yleensä pleosytoosi yli 1000×10^6 solua/l. (Collins 2007; 208, Soinila & Launes 2007; 82, Welch & Hasbun 2010; 37.) Bakteerimeningiittiin viittaa, kun leukosyyttejä löydetään $1000-5000 \times 10^6$ solua/l (Welch & Hasbun 2010; 37). Tuomallisten punasolujen esiintyessä likvorissa, voidaan epäillä punktiosta aiheutuvaa kontaminaatiota luuytimeistä. Kontaminaatiosta johtuen voidaan likvorissa nähdä myös epäkypsiä neutrofiilejä ja megakaryosyyttejä. Likvorin kontaminaatio on ilmeinen, jos mikroskooppisessa tarkastelussa näyte on luuydinnäytteen kanssa vastaavan näköinen. (Collins 2007; 208.) Laboratorion havaitessa pleosytoosin, tehdään erittelylaskenta automaattisesti (Soinila & Launes 2007; 82).

Bakteeri- ja virusmeningiitin solulinjoissa on paljon päällekkäisyyksiä (Jerrard ym. 2001). 10 % akuutin bakteerimeningiitin tapauksista likvorissa saattaa esiintyä vallitsevana solutyypinä lymfosyytti. Kyseisiä tapauksia nähdään tavallisesti *Listeria monocytogenes*-meningiitin yhteydessä sekä vastasyntyneillä, joilla on gram-negatiivinen basillimeningiitti. (Jerrard ym. 2001, Welch & Hasbun 2010; 37.) Virusmeningiitissä vallitsevana solutyypinä nähdään erilaisia lymfosyyttejä mm. reaktiivisia lymfosyyttejä sekä plasmajoukkoja (Collins 2007; 208, Welch & Hasbun 2010; 37). 10–60 % potilaista, joilla todetaan viruksen aiheuttama meningiitti, esiintyy likvorissa kuitenkin vallitsevana solutyypinä neutrofiili. Kyseinen ilmiö esiintyy varsinkin analyyseissä, jotka on tehty taudin alkuvaiheessa. Noin 90 % viruksen aiheuttamista meningiiteistä valtaosa soluista vaihtuvat lymfosyyteiksi 12 tunnin kuluessa, vaikka tunteja sitten tehty solulaskenta osoittikin vallitsevan solutyypin olevan neutrofiilejä. Tästä syystä leukosyyttien erittelylaskennan uusimista saatetaan suositella 12 tunnin kuluttua siitä, kun soluja on havaittu likvorissa. Uusinta tutkimus suoritetaan potilaille, joilla ei esiinny myrkytystä, ja joiden glukoosi- ja proteiinitasot ovat vain hieman koholla. (Jerrard ym. 2001.) Kahdessa kolmesta tapauksesta aikaisessa enterovirusmeningiitissä likvorin vallitsevana solutyypinä esiintyy neutrofiili. 12–24 tunnin kuluessa enteroviruksen aiheuttama meningiitin vallitseva solutyypin kuitenkin tavallisesti vaihtuu neutrofiilistä lymfosyyttiin. (Welch & Hasbun 2010; 37.)

Eosinofiilejä ei normaalisti esiinny likvorissa (Deisenhammer ym. 2006). Eosinofiilejä ja basofiilejä saatetaan kuitenkin nähdä elinsiirrosta johtuvan reaktion johdosta tai allergisessa reaktiossa (Collins 2007; 208). Kyseessä on eosinofiilinen meningiitti, kun saadaan eosinofiilien määräksi yli 10×10^6 eosinofiilia/l tai, kun täydellisessä likvorin solulaskennassa saadaan eosinofiilien määräksi yli 10 % (Deisenhammer ym. 2006, Welch & Hasbun 2010; 37).

2.5.1 Likvorin tarkastelu ennen erittelylaskentaa

Kun likvorinäyte on otettu, tulee se lähettää heti laboratorioon tutkittavaksi, sillä leukosyyttien määrä näytteessä saattaa vähentyä jopa 50 % kahdessa tunnissa (Welch & Hasbun 2010; 37). Likvorinäytteen saapuessa laboratorioon tehdään sentrifugoimattomasta hyvin sekoitetusta näytteestä kammiolaskenta puolen tunnin kuluessa Bürkerin laskukammiota käyttäen (TYKSLAB 2008). Kammiolaskentaa käytetään punktionesteiden, mm. selkäydin-, pleura-, peritoneumontelo- ja synovianesteiden sisältämien solujen laskentaan (Savolainen 2010; 71). Sen avulla nähdään solujen määrä sekä tyyppi näytteessä (Baird 2005; 124, TYKSLAB 2008). Likvorin sisältäessä suuria määriä leukosyyttejä tai sen ollessa hyvin verinen tulee näyte laimentaa ennen kammiolaskentaa (Baird 2005; 124). Jos näytettä joudutaan laimentamaan, huomioidaan laimennuskerroin tulosta laskettaessa. Laimentimena käytetään yleensä fysiologista keittosuolaliuosta. (TYKSLAB 2008.)

Kammio sisältää pohjan, jossa on yhdeksän suurempaa neliötä ruudukkona. Jokainen kyseisistä ruudukoista on jaettu kuuteentoista pienempään neliöön. Kammion päälle asetetaan peitinlasi painamalla varovasti lasin reunoista kunnes sateenkaaren värit näkyvät peitinlasilta. (Baird 2005; 124.) Likvorinäyte laitetaan solukammioon pasteuripipetin avulla niin, että kammio täyttyy kokoaan ilman ilmakuplia. Tämän jälkeen odotetaan muutama minuutti, jotta näyte tasaantuu. Laskukammiossa on neliöitä, joiden mukaan solujen lasku tapahtuu. (Vilpo 1998; 93, Baird 2005; 124.) Laskettavat neliöt määräytyvät näytteessä esiintyvien solujen määrän mukaan. Laskukammiolta lasketaan mikroskoopin avulla erytrosyyttien ja leukosyyttien lukumäärät tietyltä pinta-alalta, joka vastaa

tiettyä tilavuutta käyttäen 10x20- tai 10x40 objektiivia. (Vilpo 1998; 93, Baird 2005; 124, TYKSLAB 2008.) Näin voidaan laskea suoraan värjäämättömän näytteen solupitoisuus. Jos likvorinäytteessä esiintyy mm. hyvin suuri määrä leukosyyttejä, tai näyte on verinen, tehdään näytteestä leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta. (Vilpo 1998; 93, Baird, 2005; 124.)

2.5.2 Leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan suoritus

Veren tai punktionesteen soluja voidaan tarkastella ja laskea objektilasilta mikroskoopin avulla sytokemiallisen värjäyksen jälkeen (Savolainen 2010; 73). Ennen kuin aloittaa mikroskooppisen leukosyyttien erittelylaskennan, tulee lasi esitarkastaa pienellä objektiivilla (10–25-kertaisesti suurentamalla). Esitarkastuksen avulla poissuljetaan artefaktien mahdollisuus sekä etsitään valmisteesta hyvät alueet. Samalla luodaan yleissilmäys leukosyyttien määrään ja jakautumaan. Varsinainen leukosyyttien erittelylaskenta tehdään 50-kertaisesti suurentamalla öljyimmersio-objektiivilla. (Siitonen & Johansson 2007; 101.)

Leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta tapahtuu siten, että lasi käydään järjestelmällisesti läpi laskien ja tunnistuen erilaisten leukosyyttien morfologia. Lasia tutkiskellaan koko pituudelta välttämättä lasin reuna-alueita. Lasi tarkastetaan alusta loppuun. Lasia tarkastellaan järjestelmällisesti kunnes 100 solua on laskettu ja tunnistettu. (Bain ym. 2006; 34–35.) Leukosyyttien erittelylaskennassa määritellään eri granulosyyttien (neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit), lymfosyyttien ja monosyyttien prosenttiset tai absoluuttiset osuudet (Noussainen 1998, Reider & Peter 2001).

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tutkimuksen tarkoituksena on vertailla kolmella eri menetelmällä saatuja likvorin leukosyyttien mikroskooppisten erittelylaskentojen tuloksia ja niiden eroja. Tutkittavat preparaattit valmistetaan käyttämällä sytosentrifuugi- sekä pisaramenetelmää. Preparaattien värjäysmenetelminä käytetään MGG- ja gram-värjäystä. Tutkimuksessa vertaillaan MGG- ja gram-värjättyjä sytosentrifuugi-valmisteita keskenään. Lisäksi vertaillaan MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita. Tutkimuksen tavoitteena on yhtenäistää laboratorioden käytäntö likvorin leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa.

Tutkimuksen tehtävät:

- 1) Likvorinäytteiden valmistus pisara- sekä sytosentrifuugimenetelmällä sekä preparaattien värjäys MGG- ja gram- värjäysmenetelmillä.
- 2) Likvorivalmisteiden leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta.
- 3) Leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta saatujen suhteellisten prosentiosuuksien tarkastelu tunnuslukujen (minimi, maksimi, keskiarvo ja keskihajonta) avulla sekä analysointi tilastollisin menetelmin käyttäen korrelaatiota, normaalijakaumatestausta ja parierojen t-testiä.

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

4.1 Tutkimuksen toteutus

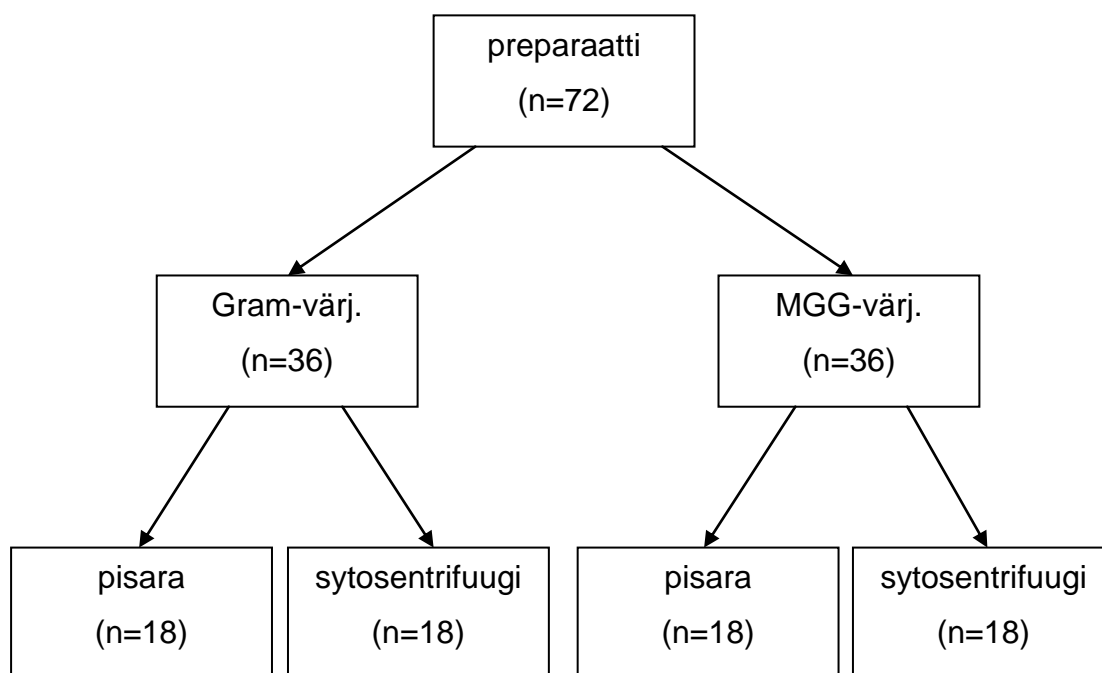
Tutkimus toteutettiin TYKSLABin hematologian laboratoriossa sekä päivystyslaboratoriossa joulutammikuussa 2010–2011. Tutkimukselle haettiin ja saatiin lupa (Liite 1.) Tutkimuksen käytännön ohjaajana toimi laboratoriohoitaja/osastonhoitaja Liisa Järvinen TYKSLABin hematologian laboratoriosta.

Tutkimuksen aineistoa kerättiin päivystyslaboratoriossa päiväaikana potilasnäytteistä, joiden likvorissa oli leukosyyttejä noin 20×10^6 solua/l tai enemmän leukosyyttien mikroskooppista erittelylaskentaa varten. Tutkimuksen aineistoa varten ei kerätty potilailta ylimääräistä näytettä, vaan käytettiin näytteitä, joista pyydettyjen analyysien jälkeen jäi vielä riittävä määrä näytettä (noin 600 μ l). Aineisto käsitti 18 potilaan likvorinäytteen, joista jokaisesta valmistettiin neljä kappaletta preparaatteja. Näin ollen leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa tarkasteltiin 72 preparaattia (n=72).

Tutkimuksen aineistoa kerättiin päivystyslaboratorion laboratoriohoitajien avulla, jotka laskivat likvorien solut Bürkerin laskukammiota käyttäen. Tästä eteenpäin tutkimuksen tekijä suoritti tutkimuksen eri vaiheet itsenäisesti. Näytteistä, joissa oli tarvittava määrä leukosyyttejä, valmistettiin preparaatit mikroskooppista erittelylaskentaa varten. Päivystyslaboratoriossa likvorin näyteputki sentrifugoitiin, jotta sakka saatiin putken pohjalle. Sentrifuugin asetuksina käytettiin 500 g/1700 rpm/10 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen näytteen supernatantti poistettiin steriilin pipetin avulla. Sakka sekoitettiin vielä varovasti mikserin avulla ennen näytopisarain pipetointia puhtaalle objektilasille. Objektilasille pipetoitiin yksi pisara näytettä käyttäen steriiliä pipettiä, jonka jälkeen näyte annettiin kuivua hyvin noin 37 °C lämpöalustan päällä. Yhden potilaan näytteestä valmistettiin kaksi pisaranäytettä. Näytteiden kuivuttua toinen lasista värjättiin gramvärjäysmenetelmää käyttäen päivystyslaboratorion työohjeen mukaisesti (Liite 2.). Gram-väreinä käytettiin Biomerieuxin valmistamaa colorgram2 Gram värjäyskittiä (4x240 ml). Toinen lasista värjättiin käyttäen MGG-

värjäysmenetelmää. Värjäysohjeena toimi hematologian laboratorion värjäysautomaatin MGG- värjäyksen työohje (Liite 3.).

Hematologian laboratoriossa preparaattit valmistettiin sytosentrifuugin avulla. Näytteenä käytettiin sentrifugoimatonta varovasti sekoitettua likvoria, jota pipetoitiin 300 µl sytosentrifuugin näytekammioon. Tämä poikkeaa normaalisti käytetystä 500 µl:sta. Poikkeamaan käytännöstä päädyttiin, jotta saatiin mahdollisimman moni näyte riittämään tutkimusta varten. Näytteen lisäksi näytekammioon pipetoitiin yksi pisara 22 % albumiinia. Tarvittaessa näyte laimennettiin ennen sytosentrifuugilla sentrifugointia fysiologisella keittosuolalla, mikäli näyte oli verinen tai samea. Sentrifugoinnin ajaksi asetettiin seitsemän minuuttia ja nopeudeksi 70 eli 700 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen näytteiden annettiin kuivua huoneen lämmössä, jonka jälkeen toinen värjättiin värjäysautomaatilla MGG-värjäysmenetelmää käyttäen ja toinen värjättiin gram-värjäysmenetelmää käyttäen. Sytosentrifuugivalmisteita tehtiin kaksi yhtä potilasta kohden. Seuraavasta kuvioista nähdään preparaattien valmistusvaiheet.



Kuvio 1. Preparaattien valmistus

Värjäysten jälkeen preparaatteja oli neljä kappaletta yhtä potilasnäytettä kohden, joista kaksi oli pisaravalmisteita ja kaksi sytosentrifuugimenetelmällä tehtyä valmistetta. Kummallakin menetelmällä valmistetuista preparaateista toinen värjättiin gram-menetelmää käyttäen ja toinen MGG-värjäysmenetelmällä. Objektiveihin kirjattiin potilaan sukunimi sekä päivämäärä, jolloin näyte oli otettu. Kun aineisto oli kerätty, kirjattiin lasit juoksevilla numerosarjalla, jolloin tuloksissa ei ilmene potilaiden henkilöllisyyttä.

Jokaisesta näytteestä tehtiin leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta, jossa eriteltiin lymfosyytit, granulositytit, monosyytit ja eosinofiilit. Erittelylaskennassa saadut tulokset kirjattiin ylös juoksevaa numerosarjaa käyttäen. Lopuksi saatuja tuloksia tarkasteltiin tunnuslukujen (minimi, maksimi, keskiarvo ja keskijajonta) avulla, jonka jälkeen ne analysoitiin tilastollisin menetelmin korrelaation, normaalijakaumatestauksen sekä parierojen t-testin avulla.

4.2 Metodologiset lähtökohdat

Tutkimus on määrällinen eli kvantitatiivinen. Kvantitatiivista tutkimusta käytetään selvittäessä kysymyksiä liittyen lukumääriin ja prosentiosuuksiin. (Heikkilä 2008a; 16.) Se antaa yleiskuvan muuttujien välisistä suhteista ja eroista ja vastaa kysymyksiin kuinka paljon tai miten usein. Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla voidaan kuvata numeerisia suureita sanallisesti samalla selittäen, millä tavalla eri asiat liittyvät toisiinsa tai eroavat toisistaan. (Vilkkä 2007a; 13–14.) Lisäksi saatuja tuloksia voidaan havainnollistaa erilaisin taulukoin ja kuvioin. Usein voidaan myös selvittää eri asioiden välisiä riippuvuuksia tai tutkittavassa ilmiössä tapahtuvia muutoksia. (Heikkilä 2008a; 16.) Analyysimenetelmäksi valitaan menetelmä, joka antaa tietoa asiasta, jota tutkitaan (Vilkkä 2007b; 119). Tilastollisen päättelyn avulla pyritään aineistosta saatuja tuloksia yleistämään tutkittuja havaintoyksiköitä suurempaan joukkoon. Kvantitatiivisella tutkimuksella voidaan kartoittaa olemassa olevaa tilannetta. (Heikkilä 2008a; 16.)

Tutkimuksessa on esitetty aiemmista tutkimuksista saatuja johtopäätöksiä ja teorioita. (Hirsjärvi ym. 2007b; 135–136, Vilkkä 2007b; 133). Tutkimukselle määritettiin tutkimuksessa käytetyt teoreettiset käsitteet. Lähteinä käytettiin mo-

nipuolisia, uusia, luotettavia, kotimaisia sekä ulkomaisia teoksia ja tieteellisiä artikkeleita, joiden pohjalta tutkimusta alettiin työstää. Myös joitakin vanhempia lähteitä käytettiin, mutta ne todettiin kuitenkin luotettaviksi vertaamalla niitä uudempiin teoksiin. Tekstiviitteiden perusteella on helppo löytää alkuperäinen lähde lähdeluettelosta. (Hirsjärvi ym. 2007b; 135–136.)

Tutkimuksessa esitettiin myös suunnitelma aineiston keruusta ja tutkittavista henkilöistä. Aineiston keruu- ja käsittelymenetelmät sekä tutkittavien näytteiden sopivuus suunniteltiin käytännön ohjaajan kanssa hyvin ennen varsinaista aineiston keruuta. Tulokset kerättiin taulukkomuotoon, josta ne muutettiin muotoon, jota voitiin tarkastella tunnuslukujen (minimi, maksimi, keskiarvo ja keskihajonta) avulla sekä käsitellä tilastollisin menetelmin käyttäen korrelaatiota, normaalijakaumatestausta sekä parierojen t-testiä. Päätelmien teko perustui tulosten tilastolliseen analysointiin. (Hirsjärvi ym. 2007b; 135–136.) Tarvittava aineisto tutkimusta varten kerättiin tutkijan toimesta. Aineisto voidaan hankkia myös erilaisista muiden keräämistä tiedoista, rekistereistä ja tietokannoista. Kerättäessä itse aineistoa tulee tutkimusongelman mukaan päättää, mikä on kohderyhmä ja mikä tiedonkeruumenetelmä sopii parhaiten kyseiseen tutkimukseen. (Heikkilä 2008a; 18–19.)

Vertailevan tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää paremmin tutkittavaa asiaa kahden tai useamman tutkimuskohteen avulla sekä tuoda asioiden väliset erot esille. Tutkimuksessa vertailtiin tilastollisien menetelmin kolmea eri menetelmää, joilla valmistettiin likvorin preparaatteja leukosyyttien mikroskooppista erittelylaskentaa varten. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta saatuja tuloksia vertailtiin keskenään. Lisäksi vertailtiin MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden prosenttiosuuksia keskenään käyttäen tämän hetkistä käytännönmenetelmää, jossa gram-värjättyjen pisaravalmisteiden mahdolliset monosyytit lasketaan lymfosyyttien prosenttiosuuteen (mononukleaariset solut). Lisäksi vertailtiin MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden prosenttiosuuksia keskenään laskemalla mahdolliset monosyytit erikseen. (Vilka 2007a; 18,21.)

4.3 Eettiset näkökohdat

Tutkimus auttaa hematologian- ja päivystyslaboratorion työskentelyä jatkossa mahdollisesti yhtenäistämällä laboratorioiden menettelytapaa likvorinäytteiden leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa ja siksi tutkimus on tärkeä.

Tutkimusta tehtäessä huomioitiin etiikan kysymykset ja noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä (Vilka 2005; 29). Tutkimuseettiset kysymykset koskevat tiedonhankintaa ja tutkittavien suojaa sekä tutkijan vastuuta tulosten soveltamisesta koskeviin säädöksiin (Vehviläinen-Julkunen 1997; 26). Tutkimusetiikka huomioitiin tutkimusprosessin ideointivaiheesta tutkimustulosten esittämiseen. Tutkimusetiikalla tarkoitetaan pelisääntöjä, jotka ovat yleisesti sovittuja. (Vilka 2005; 30,32.)

Hyvää tieteellistä käytäntöä noudattava tutkija osoittaa tutkimuksensa sekä tutkimusmenetelmiensä avulla kriteerien mukaisia ja eettisesti kestävien tiedonhankinnan ja tutkimustulosten johdonmukaista hallintaa. Tutkimuksessa noudatettiin tutkimustyön ja tutkimustulosten esittämisessä rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta sekä tarkkuutta. Lisäksi toimittiin vilpittömästi ja rehellisesti muita tutkijoita kohtaan. (Vilka 2005; 30, Mäkinen 2006b; 172–173.) Tämä toteutettiin siten, että tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmiin käytettiin yleisesti hyväksytyjä menetelmiä, jotka perustuivat mm. tieteelliseen alan kirjallisuuteen, ammattikirjallisuuteen, laboratoriotesteihin ja niistä saatujen tulosten havainnointiin sekä analysointiin tilastollisin menetelmin. Lähteet merkittiin oikein sekä tekstiviitteisiin että lähdeluetteloon, jonka ansiosta alkuperäinen lähde on helposti löydettävissä. Tutkimuksen suoritus sekä tulokset kerrottiin rehellisesti, mitään muuttamatta tai pois jättämättä. (Vilka 2005; 30.)

Tutkimuksessa noudatettiin tarkkuutta tulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tutkimuksen ja siitä saatujen tulosten arvioinnissa (Mäkinen 2006b; 172). Tutkimuksella ei loukattu hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti tutkimuksen kohderyhmää, tiedeyhteisöä eikä hyvää tieteellistä tapaa tutkimuksen kysymyk-

senasettelun ja tavoitteiden, aineiston keräämisen ja käsittelyn tai tulosten esittämisen ja aineiston säilyttämisen kautta (Vilkkä 2007a; 90).

Tutkimukselle haettiin ja saatiin tutkimuslupa (Liite 1.) tutkimuksen pyytäneeltä organisaatiolta heidän käytäntöjensä mukaisesti (Vehviläinen-Julkunen 1997; 28). Tutkimus suunniteltiin, toteutettiin ja raportoitiin laadukkaasti hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Lisäksi tutkimus noudattaa avoimuutta sekä kontrolloitavuutta. (Vilkkä 2005; 32–34.) Tutkimus lähti liikkeelle tutkimussuunnitelman laatimisesta, jonka jälkeen aineistoa lähdettiin keräämään ja havainnoimaan suunnitelman mukaisesti. Kun aineisto oli koossa, siirrettiin saadut tulokset taulukkoon, josta niitä analysoitiin tilastollisin menetelmin. Tulosten raportointi tapahtui luotettavasti sekä avoimesti säilyttäen kuitenkin tutkittavien anonymiteettiä.

Tutkimuksen aineistona käytettiin potilasnäytteitä, joista tutkittiin ensin kaikki pyydetty tutkimukset. Jos näytettä jäi tämän jälkeen riittävästi, se käytettiin tutkimusta varten. Näin ollen potilailta ei otettu ylimääräistä näytettä tutkimukseen, jolloin heille ei aiheutunut ylimääräistä haittaa eikä vaivaa. Aineiston keruuvaiheessa potilaan sukunimi ja näytteenottopäivämäärä kirjattiin objektilasin hiospäähän, jotta saman potilaan kaikki lasit pystyttiin myöhemmin yhdistämään toisiinsa. Kun leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta näytteistä oli suoritettu, kirjattiin tulokset juoksevaa numerosarjaa käyttäen. Tutkimuksessa aineiston tulokset kulkevat juoksevin numeroin, jolloin saatuja tuloksia ei voida yhdistää potilaaseen ja samalla potilaan anonymiteetti tulee taatuksi. Tutkimusta varten saadut tulokset eivät vaikuttaneet potilaiden saamaan hoitoon.

Yksi tärkeimmistä eettisistä periaatteista on tarkastaa tutkimustulosten paikkansa pitävyys ja niiden yleistettävyyden sekä julkistaminen. Tutkimustuloksiin mahdollisesti vaikuttaneita virheitä ei salattu raportoitaessa tuloksia vaan niistä kerrottiin rehellisesti ja avoimesti. (Mäkinen 2006a; 102.) Tutkimus suoritettiin hyödyntäen koko kerättyä aineistoa lukuun ottamatta MGG-värjättyjä pisaravalmisteita, sillä niiden solumorfologia oli kärsinyt liikaa, eikä soluja voitu tunnistaa luotettavasti. (Leino-Kilpi 2003; 292). Tulokset julkaistiin avoimesti ja rehellisesti

suojaten samalla tutkittavien anonymiteettiä (Vehviläinen-Julkunen 1997; 31). Tutkimusaineisto hävitettiin laboratorion riskijätteisiin (Vilkkä 2005; 32–34).

Tutkimuksen eri vaiheissa vältettiin epärehellisyyttä sekä noudatettiin salassapitovelvollisuutta. Toisten tekstiä ei plagioitu missään muodossa, tuloksia ei yleistetty kriittikittömästi, eikä niitä sepitetty tai kaunisteltu. Potilasnäytteitä käsiteltiin huolellisesti ja asianmukaisesti. Tutkimuksen eri vaiheiden menetelmät suoritettiin tarkasti laboratorioden työohjeiden mukaisesti. Raportointi tapahtui tarkasti ja luotettavasti, mitään tietoa pois jättämättä. (Hirsjärvi ym. 2007a; 25–26.)

4.4 Aineiston analysointi

Tutkimuksen aineisto koostui kolmella eri menetelmällä valmistetuista preparaateista, joissa näytteenä oli likvoria. Kaikista preparaateista tehtiin leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta, joiden tuloksia verrattiin tilastollisin menetelmin. Preparaatin valmistusmenetelminä käytettiin MGG- ja gram-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita. Aineisto koostui 72 preparaattista (n=72), joista 36 valmistettiin käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää ja toiset 36 preparaattia valmistettiin käyttämällä pisaramenetelmää. Sytosentrifuugivalmisteista 18 värjättiin käyttämällä MGG-väriä ja 18 gram-väriä. Pisaravalmisteista 18 värjättiin käyttäen MGG-värjäystä ja 18 gram-värjäystä. Jokaisesta preparaattista tehtiin leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta.

Preparaateista laskettiin leukosyyttejä 100–200 soluun asti. Saadut leukosyyttitulokset ilmaistiin suhteellisina prosenttiosuuksina. Pisaravalmisteiden osalta tuloksissa kerrotaan likvorin granulosityttien ja lymfosyyttien osuudet sekä mahdolliset muut havaitut solut, joita nähtiin, mutta joista ei pystytty tarkentamaan, mikä solu oli kyseessä. Sytosentrifuugivalmisteista eriteltiin likvorin granulosityttien, lymfosyyttien, monosyyttien sekä mahdollisten eosinofiilien ja basofiilien osuudet. Käytännössä pisaravalmisteesta vastataan ainoastaan granulositytit sekä mononukleaariset solut, jotka käsittävät lymfosyytit ja monosyytit. Sytosentrifuugivalmisteesta vastataan sen sijaan granulositytit ja lymfosyytit sekä lisäksi lasketaan muut solut, joihin sisältyvät mahdolliset monosyytit, eosinofiilit

ja basofiilit. Kyseisiä soluja ei kuitenkaan vastata. Jos näytteessä on huomattava määrä eosinofiilejä, vastataan ne sytosentrifuugivalmisteesta erikseen.

Liitteestä 4. nähdään kaikki 72 preparaattista saadut leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan tulokset. Vaakarivillä on yhden potilaan likvorinäyte ja pystyrivillä tilastollinen muuttuja eli saadut prosenttiosuudet likvorin leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta. Pisaravalmisteiden osalta tuloksissa on vain granulosyyttien, lymfosyyttien ja muiden prosenttiosuudet, kun taas sytosentrifuugivalmisteista on ilmoitettu granulosyyttien ja lymfosyyttien lisäksi monosyytit sekä eosinofiilit.

Tulosten vertailu tilastollisten menetelmien avulla suoritettiin siten, että gram-värjättyjen pisaravalmisteiden muiden solujen osuus lisättiin kyseisten näytteiden lymfosyyttien prosenttiosuuksiin (mononukleaariset solut). Näin toimitaan käytännössä, kun vastataan leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan tulokset gram-värjätystä pisaravalmisteista. Vertailun vuoksi gram-värjättyjen pisaravalmisteiden oikeat saadut suhteelliset prosenttiosuudet lymfosyyttien osalta analysoitiin tilastollisin menetelmin kuitenkin erikseen. Tällöin lymfosyytit ja monosyytit laskettiin erikseen. Vertailu suoritettiin, jotta voidaan todeta mahdollisten monosyyttiosuuksien vaikutus tuloksissa. Kyseisiin tuloksiin on merkitty teksti (tutkimus).

MGG-värjättyjä pisaravalmisteita ei analysoitu tilastollisin menetelmin, sillä näytteiden solumorfologia oli suurelta osin kärsinyt, jolloin solut olivat epäselviä, eikä niistä näin ollen saatu luotettavia tuloksia. Myöskään eosinofiilien osuutta ei analysoitu tilastollisin menetelmin, sillä eosinofiilejä oli havaittavissa ainoastaan MGG-värjättyissä sytosentrifuugivalmisteissa. Niiden osuudet gram-värjäysmenetelmissä löytyvät todennäköisesti granulosyyteistä.

Tuloksia tarkasteltiin tunnuslukujen (minimi, maksimi, keskiarvo ja keskihajonta) avulla ja analysoitiin tilastollisin menetelmin korrelaation, normaalijakaumatestauksen sekä parierojen t-testin avulla. Tilastollinen analysointi tapahtui käyttämällä PASW Statistics 18.0 ohjelmaa. Analyysien avulla vertailtiin MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden suhteellisiä prosenttiosuuksia gra-

nulosyyttien, lymfosyyttien sekä monosyyttien osalta. Lisäksi vertailtiin vielä MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita sekä gram-värjättyjä pisaravalmisteita granulosityttien ja lymfosyyttien suhteellisten prosentiosuuksien osalta.

Tulosten vertailussa gram-värjättyjen pisaravalmisteiden lyhenteinä käytetään GRAMgranP ja GRAMlymfP. Gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden lyhenteinä käytetään GRAMgranS, GRAMlymfS ja GRAMmonoS. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden lyhenteinä käytetään MGGgranS, MGGlymfS ja MGGmonoS.

4.4.1 Tilastolliset tunnusluvut

Tilastollisten tunnuslukujen avulla voidaan kuvata aineisto pääpiirteissään. Tunnuslukuja käyttäen voidaan tehdä erilaisia johtopäätöksiä jakauman sijainnista sekä havaintojen laajuuden jakaantuvuudesta. (Ernvall ym. 2002a; 19,32–33, Holopainen & Pulkkinen 2008; 78.) Erilaisia tunnuslukuja on runsaasti. Jokainen niistä kertoo muuttujan jakaumasta eri näkökulmista. Yhdistämällä selvitettyt tunnusluvut saadaan oleellista tietoa tutkittavasta jakaumasta. (Holopainen & Pulkkinen 2008a; 78.) Tarkoituksena on kuvata aineistoa tiiviisti muutamalla tunnusluvulla, kuten keskiarvolla, keskihajonnalla, minimillä ja maksimilla (Valli 2001; 51, 54, Heikkilä 2008c; 169). Tunnusluvut toimivat tilastollisen johtopäätöksen perustana (Heikkilä 2008c; 169). Luotettavia johtopäätöksiä jakaumasta voidaan tehdä tarkastelemalla yhtä aikaa useampaa tunnuslukua (Holopainen & Pulkkinen 2008a; 78).

4.4.2 Korrelaatio

Kahden tilastomuuttujan keskinäistä riippuvuutta voidaan tarkastella pareittain korrelaation avulla (Ernvall ym. 2002b; 69, Heikkilä 2008d; 203). Korrelaatiokerroin on tilastollinen tunnusluku, jota käytetään tilastanalyseissä (Holopainen & Pulkkinen 2008b; 233). Yleisin käytetty kahden muuttujan välisen riippuvuuden mitta ja sen kautta epäsuorasti teoreettisten käsitteiden yhteys saadaan selville ns. Pearsonin korrelaatiokerroimen avulla, joka osoittaa lineaarisen riippuvuuden voimakkuutta (Heikkilä 2008d; 203, Ketokivi 2009; 49,). Korrelaatiossa ker-

toimet vaihtelevat $-1 \leq r \leq +1$ välillä (Ernvall ym. 2002b; 77, Heikkilä 2008d; 203–204). Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on arvoa +1, sitä voimakkaampi on muuttujien välinen positiivinen lineaarinen yhteys, jolloin toisen muuttujan kasvaessa toinenkin kasvaa. Arvon ollessa -1, on muuttujien välillä voimakas negatiivinen lineaarinen korrelaatio, jolloin toisen muuttujan kasvaessa toisen arvo pienenee. Arvon ollessa lähellä 0, muuttujien välillä ei ilmene lineaarista riippuvuutta. (Heikkilä 2008b; 91, Ketokivi 2009; 49.) Korrelaatiokerroin on herkkä poikkeaville arvoille, jolloin varsinkin pienissä aineistoissa yksikin selvästi poikkeava arvo voi vaikuttaa huomattavasti korrelaatiokertoimen arvoon (Holopainen & Pulkkinen 2008b; 235).

On kuitenkin muistettava, että korrelaation vahvuus ei kerro yhteyden vahvuudesta teorian tai käytännön merkittävyyden näkökulmasta mitään. Vahva lineaarinen korrelaatio kahden muuttujan välillä kertoo yhteyden muodosta, ei sen merkittävyydestä. Kun tilastollinen yhteys kahden muuttujan välillä voidaan aineiston perusteella todeta poikkeavan nolasta, on se tilastollisesti merkitsevä, jolloin jonkinlainen yhteys muuttujien välillä on havaittu. Muita johtopäätöksiä kyseisellä testillä ei voida tehdä. (Ketokivi 2009; 50–51.)

Korrelaatiota voidaan ilmaista graafisen esityksen sekä korrelaatiokertoimen avulla. (Ernvall ym. 2002b; 69–71.) Korrelaation hahmottamiseksi on hyvä tehdä hajontakuvio, jossa havaintoyksiköt muodostavat pisteparven. Kuvioista on helppo havaita korrelaatio, mutta tuloksen päättelemineen saattaa olla vaikeaa pelkän hajontakuvion perusteella. (Vilka 2007b; 130.) Kuvion avulla nähdään tutkittavien mahdollisen yhteyden voimakkuus, muoto ja suunta (Holopainen & Pulkkinen 2008b; 229). Esimerkiksi sirontakuvion avulla voidaan havainnollistaa riippuvuutta sekä tehdä havaintoja tutkimusta mahdollisesti häiritsevistä poikkeamista (Heikkilä 2008d; 204).

Korrelaatiomatriisia käytetään usein esitettäessä samanaikaisesti useita korrelaatiokertoimia. Matriisiin on kerätty kaikkien tarkasteltavien muuttujien pareittain lasketut korrelaatiot. (Heikkilä 2008d; 204, Holopainen & Pulkkinen 2008b; 239.) Korrelaatiokertoimen testaamisella pyritään selvittämään sattuman suu-

ruuden osuutta asioissa (Ernvall ym. 2002c; 126). Muuttujien välillä voidaan sanoa olevan lineaarista riippuvuutta, kun korrelaatiokerroin poikkeaa selvästi nolasta. Pieni poikkeama nolasta saattaa olla sattuman aiheuttamaa. Testaamalla onko lineaarista riippuvuutta vai ei, voidaan selvittää korrelaatiokertoimen tilastollinen merkitsevyys. (Ketokivi 2009; 48). Korrelaatio on tilastollisesti merkittävä vain, jos korrelaatiota vastaava p :n arvo alittaa käytetyn merkitsevyystason. p :n ollessa valittua merkitsevyystasoa suurempi, ei riippuvuutta ole. Tällöin poikkeavuus korrelaatiokertoimen nolasta tulkitaan sattumaksi. (Heikkilä 2008d; 206.) Korrelaatiokertoimen lisäksi PASW- ohjelma ilmoittaa p -arvon sekä havaintoparien määrän (N). Ohjelman korrelaatiokertoimen testaus tapahtuu kaksisuuntaisena. (Heikkilä 2008d; 206.)

4.4.3 Parierojen t-testi

Tutkimuksen aineistoa testataan käyttämällä parierojen t-testiä, jota käytetään kun on kyseessä pieni otoskoko (Ernvall ym. 2002c; 120). T-testillä varmenneetaan saadun tutkimustuloksen oikeellisuus tarkistamalla, ettei saatu tulos ole satunnaisvaihtelua, vaan sitä voidaan olettaa esiintyvän myös perusjoukossa (Valli 2001b; 71). Testin avulla selvitetään ovatko kahden toisistaan riippumattoman ryhmän keskiarvot yhtä suuret. T-testi edellyttää normaalijakauman noudattamista, joten se tulee testata ennen t-testin tekemistä. (Valli 2001b; 71, Heikkilä 2008d; 230.) T-testin tuloste ilmoittaa lisäksi tulosten 95 % luottamuskäytävä. Se on tietty väli, jossa perusjoukon suure tietyllä todennäköisyydellä sijaitsee arvioitaessa sitä otoksesta laskettujen arvojen perusteella. (Heikkilä 2008b; 107.)

0,05 on riittävä raja, jota usein käytetään, jolloin testaus tapahtuu 5 %:n riskitasolla (Heikkilä 2008d; 194–195). p -arvon eron katsotaan olevan oireellinen, kun $0,05 \leq p < 0,10$, ero on jokseenkin merkittävä, kun $0,01 \leq p < 0,05$, ero on merkitsevä, kun $0,001 \leq p < 0,01$ ja erittäin merkitsevä, kun $p < 0,001$. (Ernvall ym. 2002c; 110–111, Heikkilä 2008d; 195.)

4.4.4 Normaalijakauman testaus

Useita tilastotieteen menetelmiä ei saa käyttää, elleivät tutkittavat muuttujat ole normaalisti jakautuneita perusjoukkoon nähden. Normaalijakauman käyttö perustuu siihen, että summa- ja keskiarvotyyppiset muuttujat jakautuvat normaalisti. (Heikkilä 2008b; 101–102.) Vertaamalla tutkimuksen keskiarvoja normaalijakaumaan, voidaan selvittää otoksen edustavuutta perusjoukossa (Vilkkä 2007b: 132). PASW Statistics 18.0 ohjelma tekee normaalijakaumatestauksen Kolmogorov-Smirnovin testillä, jossa nollahypoteesina on, että jakauma noudattaa normaalijakaumaa. p :n ollessa $> 0,05$, jakauma noudattaa normaalijakaumaa. (Ernvall ym. 2002c; 142.) p -arvon ollessa alle $0,05$, nollahypoteesi hylätään, jolloin jakauma poikkeaa normaalista (Heikkilä 2008d; 235).

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tilastollisten tunnuslukujen avulla voidaan kuvata aineisto pääpiirteissään (taulukko 1.). Tunnuslukuja käyttäen voidaan tehdä erilaisia johtopäätöksiä jakauman sijainnista sekä havaintojen laajuuden jakaantuvuudesta. (Ernvall ym. 2002a; 19,32–33, Holopainen & Pulkkinen 2008; 78.) Tunnuslukuina käytettiin minimiä, maksimia, keskiarvoa sekä keskihajontaa.

Keskiarvojen mukaan MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden tulokset granulosityttien (MGGgranS/48,06 ja GRAMgranS/48,06), lymfosyyttien (MGGlymfS/38,11 ja GRAMlymfS/40,94) eikä monosyyttien (MGGmonoS/12,44 ja GRAMmonoS/11,00) suhteellisten prosenttiosuuksien osalta juuri eroa toisistaan. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden granulosityttien (MGGgranS/48,06 ja GRAMgranP/46,33) ja lymfosyyttien suhteellisten prosenttiosuuksien (MGGlymfS/38,11 ja GRAMlymfP/53,67) välillä voidaan todeta jonkin verran vaihtelua, etenkin lymfosyyttien kohdalla.

Minimiarvot eli leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta saadut pienimmät suhteelliset prosenttiosuudet eivät eroa toisistaan granulosityttien (MGGgranS/0, GRAMgranS/0 ja GRAMgranP/0), lymfosyyttien (MGGlymfS/3, GRAMlymfS/2 ja GRAMlymfP/2) ja monosyyttien (MGGmonoS/0 ja GRAMmonoS/0) osalta MGG- ja gram-värjättyissä sytosentrifuugivalmisteissa. Ne eivät eroa myöskään verrattaessa MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita keskenään.

Maksimiarvot eli leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta saadut suurimmat suhteelliset prosenttiosuudet eivät eroa toisistaan granulosityttien (MGGgranS/97, GRAMgranS/97 ja GRAMgranP/98) osalta MGG- ja gram-värjättyissä sytosentrifuugivalmisteissa. Suurta vaihtelua ei nähdä myöskään MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden välillä. Pientä vaihtelua voidaan nähdä maksimiarvoissa lymfosyyttien (MGGlymfS/91, GRAMlymfS/95 ja GRAMlymfP/100) prosenttiosuuksissa MGG-

ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden välillä. Vaihtelua ilmenee vielä enemmän MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden välillä. Monosyyttien (MGGmonoS/58 ja GRAMmonoS/56) prosenttiosuuksien maksimiarvoissa on pientä eroa MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden välillä.

Taulukko 1. Tunnusluvut

Tunnusluvut					
	N	Minimi	Maksimi	Keskiarvo	Keskihajonta
GRAMgranP	18	0	98	46,33	31,531
GRAMlymfP	18	2	100	53,67	31,531
GRAMgranS	18	0	97	48,06	34,307
MGGgranS	18	0	97	48,06	34,735
GRAMlymfS	18	2	95	40,94	30,410
MGGlymfS	18	3	91	38,11	29,494
GRAMmonoS	18	0	56	11,00	13,797
MGGmonoS	18	0	58	12,44	14,143
Yhteensä	18				

Tunnuslukujen perusteella sytosentrifuugimenetelmällä valmistetuista MGG- tai gram-värjättyistä preparaateista saadaan yhteneväisempiä ja näin ollen luotettavampia tuloksia kuin käyttämällä gram-värjättyjä pisaravalmisteita ja MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita.

Tarkasteltaessa tutkimuksen tunnuslukuja (taulukko 2.) nähdään keskiarvon laskeneen gram-värjätyn pisaravalmisteen lymfosyyttien (44,67) suhteellisen prosenttiosuuden osalta jonkin verran, jolloin tulosten eroavuus MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden lymfosyyttituloksiin (MGGlymfS/38,11) verrattuna pienenee hieman. (taulukko 1.).

Gram-värjättyjen pisaravalmisteiden lymfosyyttien suhteellisten prosenttiosuuksien minimiarvo on 2 ja maksimiarvo on 98. Minimiarvo pysyy samana, mutta maksimiarvo laskee, jolloin ero MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden välillä pienenee jonkin verran. (taulukko 1.).

Taulukko 2. Tunnusluvut (tutkimus)

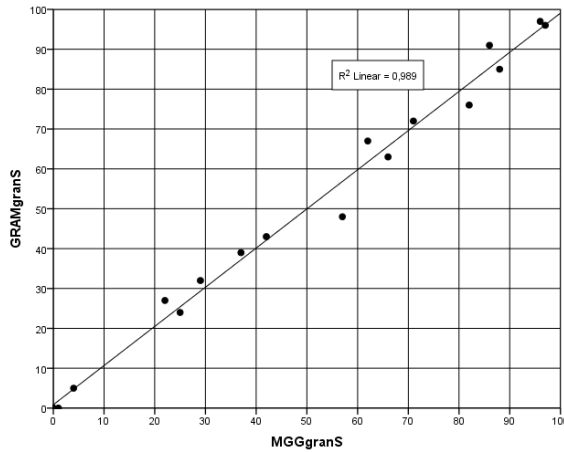
Tunnusluvut

	N	Minimi	Maksimi	Keskiarvo	Keskihajonta
GRAMlymfP	18	2	98	44,67	29,251
Yhteensä	18				

Tutkimuksen tunnusluvuista voidaan havaita, että laskemalla muut solut erikseen, saadaan jonkin verran yhteneväisempiä tuloksia MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden lymfosyytiosuuksista. Sytosentrifuugivalmisteiden käyttö kummassakin värjäysmenetelmässä antaa kuitenkin leukosyyttien prosenttiosuuksista yhteneväisempiä tuloksia.

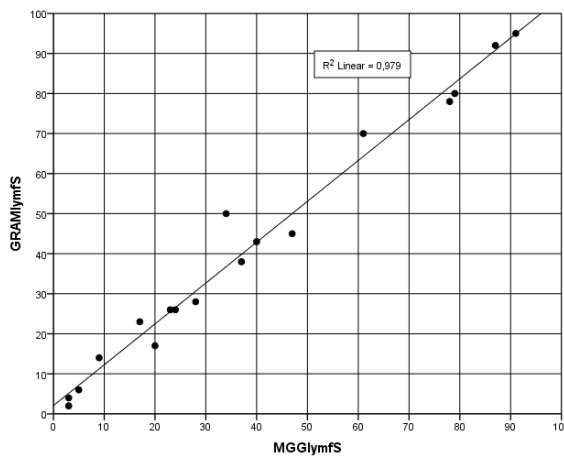
Kahden tilastomuuttujan keskinäistä riippuvuutta voidaan tarkastella pareittain korrelaation avulla (Ernvall ym. 2002b; 69, Heikkilä 2008d; 203). Korrelaation hahmottamiseksi on hyvä tehdä hajontakuviot, jossa havaintoyksiköt muodostavat pisteparven. Kuviosta on helppo havaita korrelaatio, mutta tuloksen päättelyminen saattaa olla vaikeaa pelkän hajontakuviot perusteella. (Vilkka 2007b; 130.) Kuvion avulla nähdään tutkittavien mahdollisen yhteyden voimakkuus, muoto ja suunta (Holopainen & Pulkkinen 2008b; 229). Seuraavissa kuvioissa esitetään korrelaation avulla tulosten riippuvuuksia eri menetelmien välillä likvorin leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa.

Kuviosta 2. voidaan nähdä, että granulosyyttitulosten välillä vallitsee voimakas positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,989$), jolloin toisen muuttujan kasvaessa myös toinen muuttuja kasvaa. Samalla nähdään, ettei suurta hajontaa esiinny.



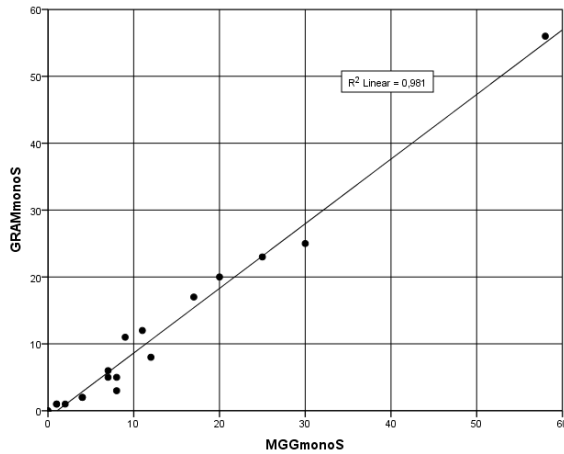
Kuvio 2. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (granulosyytti)

Kuviosta 3. nähdään, että lymfosyyttitulosten välillä vallitsee voimakas positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,979$). Samalla on nähtävissä, ettei hajontaa esiinny juuri lainkaan.



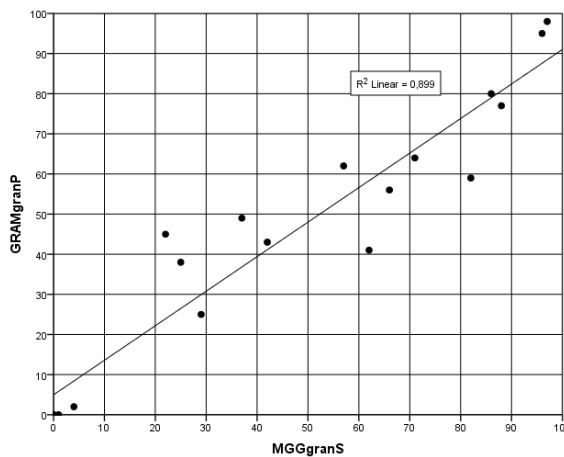
Kuvio 3. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti)

Kuviosta 4. voidaan havaita, että monosyyttitulosten välillä vallitsee voimakas positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,981$). Lisäksi voidaan nähdä, ettei suurta hajontaa esiinny.



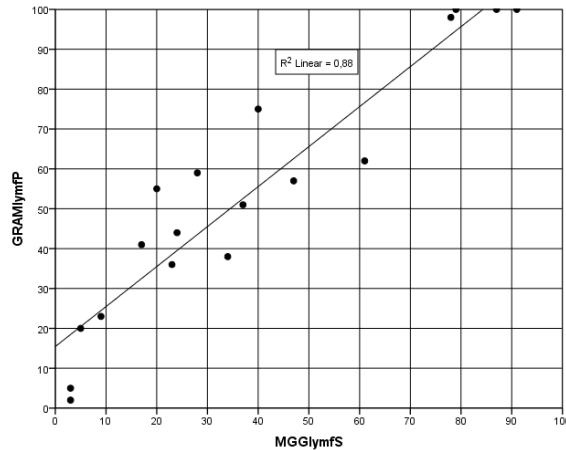
Kuvio 4. MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden korrelaatio (monosyytti)

Kuviosta 5. nähdään, että granulosyyttitulosten välillä vallitsee vahva positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,899$). Samalla on nähtävissä, että tuloksissa esiintyy hajontaa.



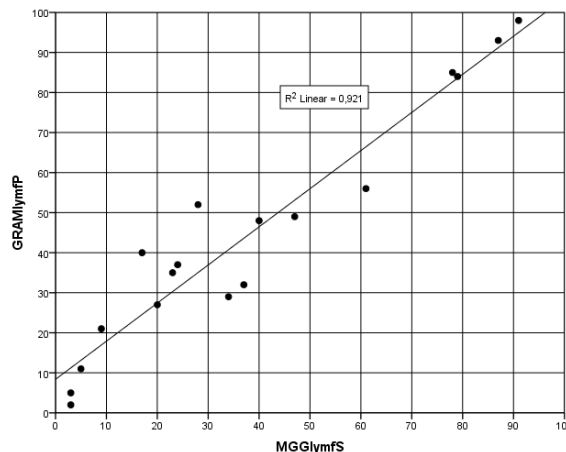
Kuvio 5. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (granulosyytti)

Kuviosta 6. voidaan havaita, että lymfosyyttitulosten välillä vallitsee vahva positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,880$). Kuviosta nähdään myös, että tuloksissa esiintyy hajontaa.



Kuvio 6. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti)

Kuviosta 7. nähdään, että lymfosyyttitulosten välillä vallitsee vahva positiivinen lineaarinen korrelaatio ($r=0,921$), joka on suurempi, kuin käytännön menetelmästä saatu korrelaatio ($r=0,880$) (kuvio 6.), jolloin tulosten yhtenevyys paranee laskettaessa muut solut erikseen. Kuviosta voidaan myös nähdä, että tulosten välillä on edelleen hajontaa jonkin verran, mutta hajonta on kuitenkin vähäisempää verrattuna käytännön menetelmään.



Kuvio 7. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatio (lymfosyytti) (tutkimus)

Korrelaatiokuvaajien perusteella MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden granulosityttien ja lymfosyyttien suhteellisten prosentiosuuksien tuloksissa ei esiinny suurta hajontaa, jolloin kyseisiä menetelmiä käyttämällä saa-

daan yhteneväisempiä ja näin ollen luotettavampia tuloksia, kuin mitä saadaan MGG-värjätystä sytosentrifuugivalmisteista ja gram-värjätystä pisaravalmisteista. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden tulosten eroavuus todennäköisesti vähenisi, jos gram-värjätystä pisaravalmisteista laskettaisiin muut solut erikseen, jolloin ne eivät sekoittaisi lymfosyyttien suhteellista prosentiosuutta näytteessä.

Yleisin käytetty kahden muuttujan välisen riippuvuuden mitta ja sen kautta epäsuorasti teoreettisten käsitteiden yhteys saadaan selville ns. Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla, joka osoittaa lineaarisen riippuvuuden voimakkuutta (Heikkilä 2008d; 203, Ketokivi 2009; 49,). Korrelaatiomatriisista (taulukko 3.) nähdään, että MGG- sekä gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden granulosityttien korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,994. Näin ollen tulosten välillä ilmenee voimakas positiivinen korrelaatio. p-arvoksi saatiin 0,000. Saadusta korrelaatiosta voidaan päätellä, että MGG-värjätystä sytosentrifuugivalmisteessä granulosityttien määrän ollessa korkea on se korkea myös gram-värjätystä sytosentrifuugivalmisteessä. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden granulosityttien korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,948 eli tulosten välillä vallitsee vahva positiivinen korrelaatio. p-arvoksi saatiin 0,000. Korrelaatiosta voidaan päätellä, että MGG-värjätystä sytosentrifuugivalmisteessä granulosityttien määrän ollessa korkea on se korkea myös gram-värjätystä pisaravalmisteessä.

Taulukko 3. Korrelaatiokertoimet (granulosyytit)

Korrelaatiot		GRAMgranP	GRAMgranS	MGGgranS
GRAMgranP	Pearsonin korrelaatiokerroin	1	,947**	,948**
	p- arvo (2-suuntainen)		,000	,000
	N	18	18	18
GRAMgranS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,947**	1	,994**
	p-arvo (2-suuntainen)	,000		,000
	N	18	18	18
MGGgranS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,948**	,994**	1
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	,000	
	N	18	18	18

** Korrelaatio on ilmoitettu 1 %:n merkitsevyydellä

Korrelaatiokertoimista voidaan päätellä, että riippumatta preparaatin valmistus- tai värjäysmenetelmästä, saadaan granulosyytituloksista lineaarisesti riittävän yhteneviä.

Korrelaatiomatriisista (taulukko 4.) nähdään, että MGG- sekä gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden lymfosyyttien korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,989, jolloin tulosten välillä ilmenee voimakas positiivinen korrelaatio. p-arvoksi saatiin 0,000. Saadusta korrelaatiosta voidaan päätellä, että MGG-värjättyssä sytosentrifuugivalmisteessä lymfosyyttien määrän ollessa korkea on se korkea myös gram-värjättyssä sytosentrifuugivalmisteessä. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden lymfosyyttien korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,938, mikä kertoo, että tulosten välillä vallitsee vahva positiivinen korrelaatio. p-arvoksi saatiin 0,000. Korrelaatiosta voidaan päätellä, että MGG-värjättyssä sytosentrifuugivalmisteessä lymfosyyttien määrän ollessa korkea on se korkea myös gram-värjättyssä pisaravalmisteessä.

Taulukko 4. Korrelaatiokertoimet (lymfosyytit)

Korrelaatiot		GRAMlymfP	GRAMlymfS	MGGlymfS
GRAMlymfP	Pearsonin korrelaatiokerroin	1	,910**	,938**
	p-arvo (2-suuntainen)		,000	,000
	N	18	18	18
GRAMlymfS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,910**	1	,989**
	p-arvo (2-suuntainen)	,000		,000
	N	18	18	18
MGGlymfS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,938**	,989**	1
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	,000	
	N	18	18	18

**Korrelaatio on ilmoitettu 1 %:n merkitsevyytasolla

Korrelaatiokertoimien perusteella voidaan todeta, että lymfosyyttituloksista saadaan lineaarisesti yhteneviä tuloksia preparaatin valmistus- tai värjäysmenetelmästä riippumatta.

Korrelaatiomatriisiin (taulukko 5.) tuloksista voidaan päätellä, että lymfosyyttien korrelaatiokerroin nousi jonkin verran gram-värjätyn pisaravalmisteen ja MGG-värjätyn sytosentrifuugivalmisteen välillä laskettaessa muut solut erikseen. GRAMlymfP-MGGlymfS korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,960, joka kasvoi 0,022 yksikön verran (0,960–0,938) käytännön menetelmästä (taulukko 4.).

Taulukko 5. Korrelaatiokertoimet (lymfosyytit) (tutkimus)

Korrelaatiot		GRAMlymfP	MGGlymfS
GRAMlymfP	Pearsonin korrelaatiokerroin	1	,960**
	p-arvo (2-suuntainen)		,000
	N	18	18
MGGlymfS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,960**	1
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	
	N	18	18

**Korrelaatio on ilmoitettu 1 %:n merkitsevyytasolla

Tutkimuksen korrelaatiokertoimen perusteella voidaan todeta, että laskemalla muut solut erikseen, saadaan yhteneväisempiä tuloksia lymfosyyttien suhteelli-

sista prosenttiosuuksista käytettäessä preparaattien valmistuksessa MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita.

Korrelaatiomatriisista (taulukko 6.) nähdään, että MGG- sekä gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden monosyyttitulosten korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,991, jolloin tulosten välillä ilmenee voimakas positiivinen korrelaatio. p-arvoksi saatiin 0,000 eli korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä eikä siis johdu sattumasta. Saadusta korrelaatiosta voidaan päätellä, että MGG-värjättyssä sytosentrifuugivalmisteessä monosyyttien määrän ollessa korkea on se korkea myös gram-värjättyssä sytosentrifuugivalmisteessä.

Taulukko 6. Korrelaatiokertoimet (monosyytit)

Korrelaatiot		GRAMmonoS	MGGmonoS
GRAMmonoS	Pearsonin korrelaatiokerroin	1	,991**
	p-arvo (2-suuntainen)		,000
	N	18	18
MGGmonoS	Pearsonin korrelaatiokerroin	,991**	1
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	
	N	18	18

** Korrelaatio on ilmoitettu 1 %:n merkitsevyystasolla

Korrelaatiokertoimen perusteella nähdään, että monosyyttituloksista saadaan lineaarisesti yhteneviä tuloksia preparaatin valmistus- tai värjäysmenetelmästä riippumatta.

Useita tilastotieteen menetelmiä ei saa käyttää, elleivät tutkittavat muuttujat ole normaalisti jakautuneita perusjoukkoon nähden (Heikkilä 2008b; 101–102). Normaalijakaumatestin (taulukko 7.) tuloksista nähdään eri menetelmien p-arvot; 0,859 (GRAMgranP), 0,859 (GRAMlymfP), 0,965 (GRAMgranS), 0,712 (GRAMlymfS), 0,390 (GRAMmonoS), 0,958 (MGGgramS), 0,866 (MGGlymfS) ja 0,274 (MGGmonoS). Tulosten p-arvojen perusteella voidaan todeta, että ne noudattavat normaalijakaumaa, sillä ne ovat yli 0,05. T-testi voidaan siis tehdä.

Taulukko 7. Normaalijakaumatesti

Kolmogorov-Smirnovin testi

	GRAM- granP	GRAM- lymfP	GRAM- granS	MGG- granS	GRAM- lymfS	MGG- lymfS	GRAM- monoS	MGG- monoS
N	18	18	18	18	18	18	18	18
p-arvo (2-suuntainen)	,859	,859	,965	,958	,712	,866	,390	,274

Normaalijakaumatestauksen (taulukko 8.) GRAMlymfP:n tuloksesta nähdään, että se noudattaa normaalijakaumaa p-arvon ollessa 0,908. Tästä voidaan tehdä myös t-testi.

Taulukko 8. Normaalijakaumatesti (tutkimus)

Kolmogorov-Smirnovin testi

	GRAMlymfP
N	18
p-arvo (2-suuntainen)	,908

T-testillä varmennetaan saadun tutkimustuloksen oikeellisuus tarkistamalla, ettei saatu tulos ole satunnaisvaihtelua, vaan sitä voidaan olettaa esiintyvän myös perusjoukossa (Valli 2001b; 71). Parierojen testauksessa (taulukko 9.) ilmeni, että MGG- ja gram-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet (MGGgranS-GRAMgranS) eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan p-arvon ollessa 1,000. 95 % luottamusvälin ala-arvo on -1,829 ja yläarvo 1,829. Näin ollen kyseiset menetelmät (MGGgranS-GRAMgranS) antavat granulositytien suhteellisten prosentiosuuksien tuloksista riittävän yhtenevät. (MGGlymfS-GRAMlymfS) eroavat toisistaan tilastollisesti jokseenkin merkitsevästi p-arvon ollessa 0,015. 95 % luottamusvälin ala-arvo on -5,039 ja yläarvo -0,627. Tässä tapauksessa eri värjäysmenetelmillä ei saada riittävän yhteneviä lymfosyyttituloksia. (MGGmonoS-GRAMmonoS) eroavat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi p-arvon ollessa 0,006. 95 % luottamusvälin ala-arvo on 0,476 ja yläarvo 2,413. Tässä tapauksessa eri värjäysmenetelmillä ei saada riittävän yhteneviä monosyyttituloksia.

Testauksessa selvisi, että MGG-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet ja gram-värjätyt pisaravalmisteet (MGGgranS-GRAMgranP) eivät eroa tilastollisesti

merkitsevästi toisistaan p-arvon ollessa 0,521. 95 % luottamusvälin ala-arvo on -3,823 ja yläarvo 7,267. Näin ollen kyseiset menetelmät (MGGgranS-GRAMgranP) antavat granulosityttien suhteellisista prosenttiosuuksista riittävän yhtenevät. (MGGlymfS-GRAMlymfP) eroavat toisistaan tilastollisesti erittäin merkitsevästi p-arvon ollessa 0,000. 95 % luottamusvälin ala-arvo on -20,990 ja yläarvo -10,121. Tässä tapauksessa eri värjäys- ja preparaatinvalmistusmenetelmillä ei saada riittävän yhteneviä lymfosyyttituloksia.

Taulukko 9. Parierojen t-testi

Parierojen t-testi

		Parierot				p-arvo (2-suuntainen)
		Keskiarvo	Keskihajonta	95 % Luottamusväli		
				Ala	Ylä	
Pari 1	MGGgranS - GRAMgranS	,000	3,678	-1,829	1,829	1,000
Pari 2	MGGlymfS - GRAMlymfS	-2,833	4,436	-5,039	-,627	,015
Pari 3	MGGmonoS - GRAMmonoS	1,444	1,947	,476	2,413	,006
Pari 4	MGGgranS - GRAMgranP	1,722	11,150	-3,823	7,267	,521
Pari 5	MGGlymfS - GRAMlymfP	-15,556	10,929	-20,990	-10,121	,000

Parierojen testauksessa saatiin selville, että MGG- ja gram-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden granulosityttien suhteellisen prosenttiosuudet eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi, jolloin kummastakin menetelmästä saadut granulosityttitulokset ovat keskenään verrannollisia. Lymfosyyttien suhteelliset prosenttiosuudet erosivat kyseisten menetelmien välillä tilastollisesti jokseenkin merkitsevästi. Näin ollen lymfosyyttituloksista ei saada riittävän yhteneviä. Monosyyttien suhteelliset prosenttiosuudet eroavat MGG- ja gram-värjättyissä sytosentrifuugivalmisteissa tilastollisesti merkitsevästi, joten menetelmillä ei saada riittävän yhteneviä monosyyttituloksia.

Testattaessa MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita granulosityttien suhteellisten prosenttiosuuksien osalta voidaan todeta, että tulokset eivät poikkea toisistaan tilastollisesti merkitsevästi, jolloin granulosityttitulokset kyseisiä menetelmiä käyttäen ovat keskenään verrannollisia. Lymfosyyttien suhteelliset prosenttiosuudet erosivat kyseisten menetelmien

välillä tilastollisesti erittäin merkitsevästi, jolloin MGG-värjätyillä sytosentrifuugivalmisteilla ja gram-värjätyillä pisaravalmisteilla ei saada yhteneviä tuloksia.

Testattaessa MGG- ja gram-värjätyjen sytosentrifuugivalmisteiden lymfosyyttien suhteellisia prosenttiosuuksia, todettiin tulosten eroavan tilastollisesti jokseenkin merkitsevästi toisistaan. MGG-värjätyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjätyjen pisaravalmisteiden välillä lymfosyyttitulosten ero on tilastollisesti erittäin merkitsevä. Näin ollen voidaan päätellä, että käytettäessä sytosentrifuugimenetelmää kummassakin värjäyksessä, saadaan yhteneväisempiä ja näin ollen luotettavimpia lymfosyyttituloksia.

Parierojen testauksessa tutkimuksen osalta (taulukko 10.) selvisi, että MGG-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet ja gram-värjätyt pisaravalmisteet (MGGlymfS-GRAMlymfP) eroavat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan p-arvon ollessa 0,004. 95 % luottamusvälin ala-arvo on -10,699 ja yläarvo -2,412. Tässä tapauksessa eri värjäys- ja preparaatin valmistusmenetelmillä ei saada riittävän yhtenäisiä lymfosyyttituloksia.

Taulukko 10. Parierojen t-testi (tutkimus)

Parierojen t-testi

		Parierot				p-arvo (2-suuntainen)
		Keskiarvo	Keskihajonta	95 % Luottamusväli		
				Ala	Ylä	
Pari 1	MGGlymfS - GRAMlymfP	-6,556	8,333	-10,699	-2,412	,004

Testattaessa MGG-värjätyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjätyjen pisaravalmisteiden lymfosyyttituloksia keskenään, voidaan todeta, että kyseiset menetelmät eroavat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan lymfosyyttitulosten osalta, eivätkä tulokset näin ollen ole riittävän yhteneviä keskenään. p-arvo kuitenkin nousi 0,000;sta 0,004:ään, jolloin voidaan päätellä, että laskettaessa gram-värjätyistä pisaravalmisteista muut solut erikseen, saadaan yhteneväisempiä tuloksia aikaan.

6 POHDINNAT

Likvorinäytteiden leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta suoritetaan eri menetelmin päiväaikana ja päivystysaikana. Päiväaikana näytteet valmistetaan käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää ja MGG-värjäystä kun taas päivystysaikana näytteet valmistetaan käyttäen pisaramenetelmää ja gram-värjäystä. Päivystysaikana vastataan leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta granulosityitit ja mononukleaariset (lymfosyytit ja monosyytit) solut, jolloin vastaus leukosyyttien suhteellisista prosenttiosuuksista on aina 100 %. Päiväaikana tehdystä leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta lasketaan kaikki solut erikseen, jolloin myös monosyyttien suhteellinen prosenttiosuus lasketaan, mutta sitä ei kuitenkaan vastata. Tästä syystä leukosyyttien suhteelliset prosenttiosuudet eivät aina ole päiväaikana vastatuissa näytteissä yhteensä 100 % vaan se voi olla esimerkiksi 85 %. Tähän pyritään saamaan muutosta, jotta vastaukset olisivat yhtenäisempiä.

Tutkimuksen tarkoituksena oli tarkastella kolmella eri menetelmällä valmistettujen likvorinäytteiden preparaattien eroja leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa. Vertailtavina kohteena oli MGG- ja gram-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet ja toisena vertailun kohteena olivat MGG-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet ja gram-värjätyt pisaravalmisteet. MGG- ja gram-värjätyjen sytosentrifuugivalmisteiden vertailulla pyrittiin selvittämään, saataisiinko kyseisillä menetelmillä yhteneväisempiä tuloksia kuin nykyisin käytössä olevista MGG-värjätyistä sytosentrifuugivalmisteista ja gram-värjätyistä pisaravalmisteista.

Aineiston mikroskopointivaiheessa tarkoituksena oli laskea kaikki nähdyt solut, jolloin jokaisesta preparaatista sen valmistuksesta riippumatta kirjattiin kaikki nähdyt granulosityitit, lymfosyytit, monosyytit, eosinofiilit ja basofiilit erikseen. Kyseiset tulokset ovat nähtävillä liitteestä 4. Tuloksia analysoitaessa tutkija päätyi analysoimaan tuloksia tilastollisin menetelmin siten, että hän yhdisti gram-värjätyjen pisaravalmisteiden muiden solujen osuudet kyseisten valmisteiden lymfosyyttiosuuksiin. Tähän hän päätyi, sillä käytännössä mahdollisesti nähtävät monosyytit gram-värjätyissä pisaravalmisteissa lasketaan lymfosyyttien suhteelliseen prosenttiosuuteen (mononukleaariset solut). Näin ollen nähdään tä-

mänhetkisten menetelmien erot käytännössä, kun käytössä on MGG-värjätyt sytosentrifuugivalmisteet ja gram-värjätyt pisaravalmisteet. Tutkija halusi tuoda lisäksi esille, miten tuloksiin vaikuttaa, jos gram-värjätyistä pisaravalmisteista laskettaisiin muut solut erikseen, kuten tehdään MGG-värjätyissä sytosentrifuugivalmisteissa.

Tutkimuksen tuloksista voidaan päätellä, että käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää likvorinäytteiden leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa, saadaan yhteneväisempiä tuloksia MGG- ja gram-värjätyistä valmisteista kuin mitä saadaan käyttämällä MGG-värjättyjä sytosentrifuugivalmisteita ja gram-värjättyjä pisaravalmisteita. MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden tulosten eroavuudet vähenivät jonkin verran, kun gram-värjätyistä pisaravalmisteista laskettiin myös muut solut erikseen. Kyseisellä menetelmällä saadut tulokset eivät olleet kuitenkaan yhtä yhteneviä kuin mitä oli MGG- ja gram-värjätyillä sytosentrifuugimenetelmillä.

Korrelaatiokuvioista voidaan nähdä, ettei sytosentrifuugivalmisteiden tuloksien välillä esiinny juuri vaihtelua. Tarkasteltaessa nykyisin käytössä olevien menetelmien eli MGG-värjättyjen sytosentrifuugivalmisteiden ja gram-värjättyjen pisaravalmisteiden korrelaatiokuvioita nähdään, että vaihtelua kyseisten näytteiden tulosten välillä esiintyy huomattavasti enemmän kuin sytosentrifuugivalmisteissa. Näin ollen voidaan korrelaatiokuvion avulla päätellä, että sytosentrifuugimenetelmällä saadaan yhteneväisempiä tuloksia riippumatta mitä värjäysmenetelmää käytetään.

Parierojen t-testauksen mukaan kaikkien verrattavien tulosten välillä esiintyy eroa lukuun ottamatta granulosityttituloksia, jotka eivät eronneet tilastollisesti toisistaan riippumatta menetelmästä, jota käytettiin. Erot johtuvat todennäköisesti aineiston pienestä koosta, jossa tehtiin leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta 18 preparaattista yhtä menetelmää kohden. Suuremman aineiston avulla saataisiin todennäköisesti vertailukelpoisempia tuloksia. Tulosten analyyseistä voidaan kuitenkin nähdä, että leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta saadaan yhteneväisempiä tuloksia käyttämällä sytosentrifuugivalmistetta kummassakin värjäysmenetelmässä kuin mitä MGG-värjättyillä sytosent-

rifuugivalmisteella ja gram-värjättyllä pisaravalmisteella saadaan. Myös MGG-värjätyistä sytosentrifuugivalmisteista ja gram-värjätyistä pisaravalmisteista saataisiin yhteneväisempiä tuloksia laskemalla gram-värjätyistä pisaravalmisteista muut solut erikseen.

Tutkimuksen tulosten ja tutkijan mikroskopointihavaintojen perusteella sytosentrifuugin käyttö likvorin preparaatin valmistuksessa olisi hyvä menetelmä leukosyyttien mikroskooppisessa erittelylaskennassa. Ainut huono puoli kyseisessä menetelmässä on näytemäärä, jota tarvitaan 500 µl yhtä preparaattia kohden. Yhtenäistämällä hematologian ja päivystyslaboratorion likvorin preparaattien valmistusmenetelmät siten, että molemmissa laboratorioissa käytettäisiin sytosentrifuugimenetelmää, saataisiin näytteiden solumorfologia paremmin esille ja näin tuloksista saataisiin luotettavampia sekä yhteneväisempiä laboratorioden välillä.

Tutkimuksen suoritus eteni suunnitellusti teoreettisen viitekehyksen laatimisesta tulosten analysointiin tilastollisin menetelmin. Tutkimuksen suorittaja perehtyi tutkimuksen teoreettisen viitekehyksen sekä tilastollisten menetelmien teoriaan. Hän perehtyi myös likvorin näytteenkäsittelyyn sekä preparaatin valmistusmenetelmiin. Valmistusmenetelminä käytettiin sytosentrifuugi- ja pisaratekniikkaa ja värjäysmenetelminä MGG- ja gram-värjäystä. Perehdytys tapahtui laboratoriohoitajien opastuksella sekä laboratorion työohjeiden avulla. Tutkija perehtyi lisäksi mikroskopointitekniikkaan sekä likvorin solumorfologiaan.

Tutkimuksessa käytetyt lähteet olivat luotettavia, eikä niitä käytetty väärin. Lähteet ja lähdeviitteet kirjattiin huolellisesti ja tarkasti oikein. Osa lähteistä oli melko vanhoja, mutta vertailtaessa niitä uudempiin teoksiin todettiin niiden sisältö samanveroiseksi. Näin ollen vanhempiakin lähteitä voitiin käyttää. Lähteitä käytettiin monipuolisesti käyttäen sekä kotimaisia että ulkomaisia lähteitä. Tutkija vertaili useaa eri lähdettä keskenään ja totesi lähteet luotettaviksi asiasisältöjen ollessa samoja.

Aineisto koostui 72 preparaatista (n=72), jotka käsittivät 18 potilaan näytteet. Näistä 36 valmistettiin käyttämällä sytosentrifuugimenetelmää ja toiset 36 pre-

paraattia valmistettiin käyttämällä pisaramenetelmää. Sytosentrifuugivalmisteista 18 värjättiin käyttämällä MGG-väriä ja 18 gram-väriä. Pisaravalmisteista 18 värjättiin käyttäen MGG-värjäystä ja 18 gram-värjäystä. Jokaisesta preparaattista suoritettiin leukosyyttien mikroskooppinen erittelylaskenta. Erittelylaskentaa hankaloitti usean näytteen verisyys, jolloin suuri punasolumäärä saattoi peittää leukosyyttejä alleen. Aineiston keruuvaiheessa tehtiin näytteistä myös MGG-värjätyt pisaravalmisteet. Niiden tuloksia ei kuitenkaan vertailtu tilastollisin menetelmin muiden tulosten kanssa, sillä MGG-värjättyjen pisaravalmisteiden solumorfologiaa ei ollut selkeästi nähtävissä.

Valmistettaessa sytosentrifuugivalmisteita käytettiin näytemääränä 300 µl, joka poikkeaa normaalista käytössä olevasta määrästä (500 µl). Tutkija päätyi tähän, jotta saatiin mahdollisimman moni näyte riittämään tutkimusta varten. Tämä on saattanut myös vaikuttaa jonkin verran saatuihin tuloksiin. Toisaalta kaikkiin tutkimuksissa tehtyihin sytosentrifuugivalmisteisiin käytettiin 300 µl näytettä, jolloin näytemäärä ei vaihdellut valmisteissa ja eri preparaattien tuloksista saatiin näin ollen yhtä luotettavia.

Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi se, että tutkija suoritti itse preparaattien valmistuksen, jolloin voidaan varmistua siitä, että kaikki preparaatit on valmistettu samalla tavalla ja ne ovat luotettavasti verrannollisia keskenään. Tutkija pyrki valmistamaan preparaatit mahdollisimman pian näytteen saavuttua laboratorioon. Aina se ei kuitenkaan ollut mahdollista ja jouduttiin käyttämään näytteitä, jotka olivat seisseet useamman tunnin ajan. Tutkija kuitenkin päätti kyseisten näytteiden soveltuvan tutkimukseen, sillä näytteen valmisteet tehtiin kuitenkin samaan aikaan, jolloin preparaattien välillä ei ollut eroa solumäärissä. Näytteiden seisotus kuitenkin hankaloitti pisaravalmisteiden leukosyyttien mikroskooppista erittelylaskentaa jonkin verran, sillä solumorfologia oli päässyt hieman kärkeen, kun osa soluista oli kuivuneita tai hajonneita, jolloin niiden tunnistus oli hankalaa.

Sytosentrifuugivalmisteissa molempia värjäysmenetelmiä käytettäessä (MGG ja gram) solumorfologia oli helposti havaittavissa, jolloin menetelmä soveltuu hyvin leukosyyttien mikroskooppiseen erittelylaskentaan. Ongelmana on, että likvorin

näytemäärä ei ole aina kovin suuri ja sytosentrifuugivalmisteeseen tarvitaan 500 µl näytettä, jolloin muut tarvittavat tutkimukset kärsivät. Gram-värjättyjen pisaravalmisteiden solumorfologia ei ole kovin selvästi erotettavissa, mutta sitä käytetäänkin ensisijaisesti bakteerien tunnistukseen. Päivystyslaboratoriossa on usein kiire, jolloin gram-värjäys sopii sen nopeuden vuoksi heidän käytäntönsä kun taas MGG-värjäys on enemmän aikaa vievää.

Tutkimuksen luotettavuutta tarkastellaan mm. mittaamisen ja aineistojen keruun suhteen sekä tulosten luotettavuutena. Tulosten luotettavuus riippuu siinä käytetyistä mittareista. Mittarin tulee rajata tutkittava käsite ja sen tulee olla herkkä, jotta voidaan erotella käsitteistä eri tasoja. Sen tulee kuvata tutkittavaa käsitettä oikein. (Vehviläinen-Julkunen & Paunonen 1997; 206.)

Tutkimuksissa tulee pyrkiä arvioimaan tehdyn tutkimuksen luotettavuutta erilaisin mittaus- ja tutkimustavoin. Tutkimuksen reliabiliteetilla tarkoitetaan mittaus-tulosten toistettavuutta ja tarkkuutta, jolloin tulosten ei tule olla sattumanvaraisia. (Hirsjärvi ym. 2007b; 226, Heikkilä 2007a; 30.) Tutkimuksen tuloksia käsiteltiin erilaisin tilastollisin menetelmin, joiden avulla voitiin arvioida mittareiden luotettavuutta. Tulosten tulkintaa varten tutkija perehtyi hyvin käytettyihin tilastollisten menetelmien analyyseihin. Virheiden välttämiseksi tutkija oli tarkka ja kriittinen jokaisessa tutkimusvaiheessa. Tulosten varmistamiseksi hän laski jokaisen preparaatin vähintään kahteen kertaan. Näin hän sai varmuuden saaduista suhteellisista leukosyyttien suhteellisista prosentiosuuksista. Tuloksia syötettäessä hän tarkisti niiden paikkansapitävyyden useampaan kertaan. Tutkimuksen suoritti tutkija yksin, jolloin leukosyyttien mikroskooppista erittelylaskentaa ei kukaan toinen suorittanut.

Tutkimuksen validiteetin avulla selvitetään mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä oli tarkoituskin mitata (Hirsjärvi ym. 2007b; 226, Heikkilä 2008a; 29). Karkeasti ottaen se tarkoittaa systemaattisen virheen puuttumista ja se varmistetaan etukäteen huolellisella suunnittelulla ja tarkoin harkitulla tiedonkeruulla (Heikkilä 2008a; 29–30). Tutkija valitsi näytteet, joiden kriteerit täyttyivät tutkimusta varten. Näin varmistettiin, ettei tutkimukseen otettu mm. liian vähäsoluisia näytteitä. Preparaattien valmistus tapahtui myös tutkijan toimesta,

jolloin niiden valmistuksessa ei tapahtunut poikkeamia, sillä ne tehtiin kaikki samalla tavalla. Samoin tutkija suoritti leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan jokaisesta preparaattista, jolloin solujen tunnistuksessa ei tapahtunut vaihtelua.

Jatkotutkimusaiheina voisi olla tämän saman tutkimuksen suorittaminen suuremmalla aineistolla, jolloin tuloksista saataisiin luotettavampia. Lisäksi voitaisiin verrata sytosentrifuugivalmisteiden tulosten eroavuuksia käytettäessä esimerkiksi 300 µl ja 500 µl näytettä preparaattien valmistuksessa. Tämän tutkimuksen avulla voitaisiin selvittää riittäisikö likvorin preparaattien valmistukseen mahdollisesti pienempi näytemäärä. Jatkotutkimuksena voisi myös selvittää miten eriävät vastaukset likvorin leukosyyttien mikroskooppisesta erittelylaskennasta tulkitaan osastoilla.

LÄHTEET

Aho 2000. Sytologiset värjäykset. Moodi 4-5/2000.

Archunan 2004. Classification of bacteria. Microbiology. First Edition 2004. Sarup & Sons, New Delhi: 158-182.

Bain 2006. Blood sampling and blood film preparation and examination. Blood cells: A Practical Guide. Fourth Edition 2006. Blackwell Publishing: 1-9.

Bain & Lewis 2006. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. Teoksessa Lewis, Bain & Bates 2006. Dacie and Lewis Practical haematology. 10th Edition Elsevier Ltd: 59-77.

Bain, Lewis & Bates 2006. Basic haematological techniques. Dacie and Lewis Practical haematology. 10th Edition Elsevier Ltd: 25-57.

Baird 2005. Microscopy in bacteriology: Application and sample preparation. Teoksessa Crocker & Burnett 2005. The science of laboratory diagnosis. Second Edition 2005. John Wiley & Sons, Ltd, England: 123-128.

Chapin-Robertson, Dahlberg & Edberg 1992. Clinical and Laboratory Analyses of Cytospin-Prepared Gram Stains for Recovery and Diagnosis of Bacteria from Sterile Body Fluids. Journal of Clinical Microbiology 1992, 30:377-380.

Collins 2007. Body Fluids in the Hematology Laboratory. Teoksessa Rodak, Fritsma & Doig 2007. Hematology: Clinical Principles and Applications. Saunders Elsevier: 205-218.

Deisenhammer, Bartos, Egg, Gilhus, Giovannoni, Rauer & Sellebjerg 2006. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. European Journal of Neurology 2006, 13: 913-922.

Dunbar, Eason, Musher & Clarridge 1998. Microscopic Examination and Broth Culture of Cerebrospinal Fluid in Diagnosis of Meningitis. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1617-1620.

Engelkirk & Duben-Engelkirk 2008. Bacterial Infections. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer 2008:183-443.

Ernvall, Ernvall & Kaukkila 2002a. Aineiston kuvailu. Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveysalalle. 1. painos. WS Bookwell Oy 2002, Juva: 19-68.

Ernvall, Ernvall & Kaukkila 2002b. Riippuvuuden tarkastelu. Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveysalalle. 1. painos. WS Bookwell Oy 2002, Juva: 69-96.

Ernvall, Ernvall & Kaukkila 2002c. Johtopäätösten tekeminen. Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveysalalle. 1. painos. WS Bookwell Oy 2002, Juva: 110-156.

Gray & Fedorko 1992. Laboratory Diagnosis of Bacterial Meningitis. Clinical Microbiology Reviews 1992 Apr.: 130-145.

Greenlee & Carroll 2004. Cerebrospinal fluid in central nervous system infections. Teoksessa Scheld, Whitley & Marra (toim.) Infections of the central nervous system. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins 2004:5-30.

Heikkilä 2008a. Tutkimusprosessi. Tilastollinen tutkimus. 7., uudistettu painos. Edita Prima Oy 2008, Helsinki: 13-32.

- Heikkilä 2008b. Tilastotieteen peruskäsitteitä. Tilastollinen tutkimus. 7., uudistettu painos. Edita Prima Oy 2008, Helsinki: 80-110.
- Heikkilä 2008c. Muuttujien esittäminen ja kuvaaminen. Tilastollinen tutkimus. 7., uudistettu painos. Edita Prima Oy 2008, Helsinki: 143-182.
- Heikkilä 2008d. Analysointimenetelmiä. Tilastollinen tutkimus. 7., uudistettu painos. Edita Prima Oy 2008, Helsinki: 183-242.
- Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007a. Tutkimus ja tutkimuksesta kirjoittaminen. Tutki ja kirjoita. 13., osin uudistettu painos. Kustannusosakeyhtiö Tammi. Helsinki: 63-228.
- Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007b. Tutkimusprosessi. Tutki ja kirjoita. 13., osin uudistettu painos. Kustannusosakeyhtiö Tammi. Helsinki: 13-59.
- Holopainen & Pulkkinen 2008a. Suoran jakauman tunnusluvut. Tilastolliset menetelmät. 5.-6. painos. WSOY Oppimateriaalit Oy 2008: 78-101.
- Holopainen & Pulkkinen 2008b. Tilastollinen riippuvuus. Tilastolliset menetelmät. 5.-6. painos. WSOY Oppimateriaalit Oy 2008: 228-258.
- Iivonen & Routa 2007. Sytosentrifugivalmisteiden Papanicolau-värijäyksen optimointi. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Bioanalyytikon koulutusohjelma 2007.
- Jerrard, Hanna & Schindelheim 2001. Cerebrospinal Fluid. The Journal of Emergency Medicine 2001, 21:171-178.
- Ketokivi 2009. Operationalisointi ja mittauksen luotettavuus. Gaudeamus Helsinki University Press Oy Yliopistokustannus, HYY Yhtymä 2009: 43-85.
- Kiernan 1999. Histological staining in one or two colours. Histological & histochemical methods: Theory & Practice. Third edition. Butterworth Heinemann: 103-131.
- Koss & Melamed 2006. Cerebrospinal and Miscellaneous Fluids. Koss' diagnostic cytology and it's histopathologic bases. Fifth Edition 2006. . Lippincott Williams & Wilkins 2006:1023-1055.
- Leino-Kilpi 2003. Yhteiskunnallinen näkökulma etiikkaan hoitotyössä. Teoksessa Leino-Kilpi & Välimäki. Etiikka hoitotyössä. 1.-2. painos. Werner Söderström Osakeyhtiö 2003: 251-302.
- Liimatainen 2000. Gramvärijäys. Moodi 4-5/2000.
- Lindsberg 2005. Riittääkö likvorin silmämääräinen tarkastus subaraknoidaalivuodon diagnostiikkaan? Duodecim 2005; 121:1489-92.
- Mesko & Pullmann 2002. Cerebrospinal Fluid. Teoksessa Marks, Cantor, Mesko & Nosalova 2002. Differential Diagnosis by Laboratory Medicine: A Quick Reference for Physicians. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002:393-414.
- Meurman 2010. Gramvärijäykset. Moodi 1/2010.
- Mäkinen 2006a. Tutkimusprosessi ja eettisyys. Tutkimusetiikan ABC. Kustannusosakeyhtiö Tammi, Helsinki 2006: 77-132.
- Mäkinen 2006b. Tutkimusetiikka ja ympäristö. Tutkimusetiikan ABC. Kustannusosakeyhtiö Tammi, Helsinki 2006: 141-174.
- Nousiainen 1998. Leukopenian selvittely. Duodecim 1998; 114: 1195-1201.
- Palo, Jokelainen, Kaste, Teräväinen & Waltimo 1996. Neurologia. 5. painos. WSOY:n graafiset laitokset, Porvoo 1996.

Perkins 2009. Laboratory Hematology. Teoksessa Greer, Foerster, Rodgers, Paraskevas, Glader, Arber & Means, Jr. Wintrobe's Clinical Hematology. 12th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer 2009:1-78.

Pirttilä 2006. Immuunivälitteisen hermostosairauden tutkimusmenetelmät. Teoksessa Elovaara, Pirttilä, Färkkilä & Hietaharju (toim.) Kliininen neuroimmunologia. Tekijät ja Yliopistopaino Kustannus, Helsinki 2006:58-97.

Pirttilä & Oksi 2001. Tarvitaanko selkäydinnestetutkimuksia 2000-luvulla? Suomen lääkärilehti 2001 vol. 56 no. 14, 1621-1627.

Ramström & Bergquist 2007. Proteomics of Human Cerebrospinal Fluid. Teoksessa Visith Thongboonkerd. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications. Humana Press inc.:269-284.

Reiber & Peter 2001. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. Journal of Neurological Sciences 2001, 184: 101-122.

Saastamoinen 2009. Lannepisto, likvorin tutkiminen ja löydökset. Lääkärin käsikirja. [Viitattu 18.09.2010] Saatavissa: [Terveysportti > http://www.terveysportti.fi/ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=likvor](http://www.terveysportti.fi/ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=likvor)

Sahla 2010. Likvorinäytteen gram- ja MGG-värijäysten vertailu. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma 2010.

Savolainen 2010. Laboratorion perusmenetelmät. Teoksessa Niemelä & Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia 3. painos. Kandidaattikustannus Oy:49-78.

Siitonen & Jansson 2007. Morfologiset tutkimukset. Teoksessa Ruutu, Rajamäki, Lassila & Porkka (toim.) Veritaudit. 3. Uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus kirjapaino Oy Jyväskylä 2007: 100–111.

Soinila 2007. Kliininen neuroanatomia. Teoksessa Soinila, Kaste & Somer (toim.) Neurologia. 2.-3. painos. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus kirjapaino Oy Jyväskylä 2007: 12–50.

Soinila & Launes 2007. Neurologinen tutkimus. Teoksessa Soinila, Kaste & Somer (toim.) Neurologia. 2.-3. painos. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus kirjapaino Oy Jyväskylä 2007: 66–84.

Technical data sheet 813 2010. (MGG) Stain Procedure. Polysciences Inc. Chemistry beyond the ordinary 2010. [Viitattu 18.9.2010] Saatavissa: <http://www.polysciences.com/SiteData/docs/813/236f73680926a4d97bafc97a75e87995/813.pdf>

TYKSLAB 2010. Tutkimusohjekirja. Likvorin tutkimukset. [Viitattu 18.9.2010] Saatavissa: <http://ohjekirja.tykslab.fi/liitteet/LikvorinTutkimukset.pdf>

Valli 2001a. Tilastoaineiston kuvaaminen. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. PS-kustannus. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 2001: 47-59.

Valli 2001b. Merkitsevyytestaus. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. PS-kustannus. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 2001: 71-86.

Vehviläinen-Julkunen 1997. Hoitotieteellisen tutkimuksen lähtökohdat. Teoksessa Paunonen & Vehviläinen-Julkunen. Hoitotieteen tutkimusmetodiikka. 1.-2. painos. Werner Söderström Osa-
keyhtiö 1997: 13-34.

Vehviläinen-Julkunen & Paunonen 1997. Tutkimuksen luotettavuus. Teoksessa Paunonen & Vehviläinen-Julkunen. Hoitotieteen tutkimusmetodiikka. 1.-2. painos. Werner Söderström Osa-
keyhtiö 1997: 205-231.

Vilka 2005. Tutkimukselle asetetut vaatimukset. Tutki ja kehittä. Kustannusosakeyhtiö Tammi Helsinki 2005: 20-41.

Vilka 2007a. Määrällisen tutkimuksen suunnittelu ja aineiston kerääminen. Tutki ja mittaa. Kustannusosakeyhtiö Tammi 2007:11-101.

Vilka 2007b. Määrällisen tutkimuksen analysointi, tulkinta ja arviointi. Tutki ja mittaa. Kustannusosakeyhtiö Tammi 2007:103-154.

Vilpo 1998. Hematologia. Teoksessa Rantala & Lounatmaa (toim.) Biologinen valomikroskopia. Yliopistopaino, Helsinki:88–104.

Warfield 1998. Cytopathology. Teoksessa Crocker & Burnett 1998. The science of laboratory diagnosis. First published 1998. Isis Medical Media: Oxford OX1 1ST, UK: 103-127.

Weber & Ojala 1986. Likvorin kliiniskemiällinen tutkiminen. Duodecim 1986 102: 562-570.

Welch & Hasbun 2010. Lumbar puncture and cerebrospinal fluid analysis. Teoksessa Roos & Tunkel (toim.) Handbook of Clinical Neurology. Vol 96 (third series) Bacterial Infections of the Central Nervous System. Elsevier B.V 2010: 31-50.

Julkaisemattomat lähteet

TYKSLAB 1998. Työohje; Peritolneaalinesteen leukosyytit, erittelylaskenta.,3

TYKSLAB 2008. Laatuksikirja; kliininen kemia, hematologia ja mikrobiologia.

TYKSLAB 2009. Työohje; Bakteeri värjäys (Gram-värjäys)

Tutkimuslupa

VARSINAIS-SUOMEN SAIRAANHOITOPIIRI Egentliga Finlands sjukvårdsdistrikt		HOITOTYÖN TUTKIMUS- JA OPINNÄYTETYÖ		Nro _____	
LUPAHAKEMUS (katso erilliset ohjeet: http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus) Hakemus lähetetään: VSSHP, TYKS, Hoitotyön toimisto, suunnittelija, PL 52, 20521 TURKU		<input type="checkbox"/> Uusi tutkimus		<input type="checkbox"/> Jatko/Muutos lupaan	
TUTKIMUSLUVAN HAKIJAT	Nimi/nimet: Jaana Eskola				
Opiskelu- tai työpaikka	Turun ammattikorkeakoulu				
Opinnäytetyö	<input type="checkbox"/> Väitöskirja <input type="checkbox"/> Pro gradu <input checked="" type="checkbox"/> Opinnäytetyö/AMK <input type="checkbox"/> muu, mikä? _____ <input type="checkbox"/> Licensiaattityö <input type="checkbox"/> Ylempi AMK				
TUTKIMUKSEN/OPINNÄYTETYÖN TIIVISTETTY KUVAUS (mm. tutkimuksen nimi, päätavoitteet, menetelmät, aineisto, tutkimuksen suorituspaikka, tutkimuksen merkitys)	Gram- ja MGG- värjättyjen liivornäytteiden mikroskooppisen erittelylaskennan tulosten vertailu. Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla hematologian- ja päivystyslaboratorion liivornäytteiden leukosyyttien mikroskooppisten erittelylaskentojen tuloksia ja tulosten eroavuuksia käyttäen näytteiden valmistuksessa sytosentrifugimenetelmää. Tällöin solumorfologia olisi paremmin eroteltavissa kummankin laboratorion osalta. Lisäksi tehdään paksupisaravalmisteet vertailun vuoksi. Värjäysmenetelmänä käytetään päivystyslaboratoriossa gramvärjäystä ja hematologian laboratoriossa MGG- värjäystä. Opinnäytetyö auttaa hematologian- ja päivystyslaboratorion työskentelyä jatkossa mahdollisesti yhtenäistämällä laboratoriodien menettelytapaa liivornäytteiden erittelylaskennassa. Opinnäytetyön aineistona tulee olemaan potilasnäytteitä, joista on jo tutkittu kaikki mitä on pyydetty. Aineiston koko tulee riippumaan päiväaikaan saatujen näytteiden määrästä.				
Tutkimussuunnitelma erillisenä liitteenä (max. 5 s.)					
TUTKIMUKSEN OHJAAJA(T)	23.11.2010	Sole Kere	23.11.2010	Lian Järvinen	allekirjoitus/nimen selvennys
YHTEYSTIEDOT	SOLE KEH, LIISA JÄRVINEN				
SITOMUS JA JULKAISULUPA	Sitoudun noudattamaan hyvää tutkimuskäytäntöä, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä vaihtolovelvollisuutta (http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/1071/ , www.turkucrc.fi).				
	23.11.2010	Jaana Eskola	JAAANA ESKOLA	1	hakijan allekirj./nimen selvennys
	1			1	hakijan allekirj./nimen selvennys
YLIHOITAJAN LAUSUNTO JA YHDYSHENKILÖN NIMEÄMINEN VSSHP:ssä	Klinikan/yksikön kehittämishanke, johon opinnäytetyö/tutkimus liittyy: _____ Yhdyshenkilö/virkan/toimen nimike: _____ (yh nimeää) Puollan <input type="checkbox"/> En puolla <input type="checkbox"/> Ylihoitaja(t) 1 _____ allekirjoitus/nimen selvennys 1 _____ allekirj./nimen selvennys				
HOITOTYÖN ASIAINTUNTIJARYHMÄN LAUSUNTO	<input type="checkbox"/> Lupaa puolletaan <input type="checkbox"/> Ei puolleta, Perustelu (tarv. liitteenä) <input type="checkbox"/> Pyydetään lähettämään eettiselle toimikunnalle 1 _____ allekirjoitus/nimen selvennös <input type="checkbox"/> Pyydetään lisäselvityksiä: _____				
EETTINEN TOIMIKUNTA	Eettisen toimikunnan lausunto saatu (liitteenä) 1 _____				
TUTKIMUSLUVAN MYÖNTÄMINEN	<input checked="" type="checkbox"/> Myönnetty <input type="checkbox"/> Ei myönnetty _____ 23.11.2010 <i>Senita Palonen</i> _____ allekirjoitus/nimen selvennys allekirjoitus/nimen selvennys VSSHP:n/sairaalan nimen saa julkaista tutkimusraportissa/opinnäytetyössä Kyllä <input type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Haluan nähdä tutkimusraportin/opinnäytetyön ennen julkaisuluvan antoa Kyllä <input type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/>				
	Päätös annettu tiedoksi hakijalle 1 _____ Päätöksen antoi _____				

Bakteerivärjäys (Gram-värjäys)

1. Valmiste kiinnitetään metanolissa 1 min. Metanoli tulee vaihtaa uuteen sen ollessa yli kolme tuntia vanhaa. Steriilejä näytteitä varten käytetään omaa allasta. Metanolikiinnityksen jälkeen lasit ilmakuivataan.
2. Valmiste peitetään kristalliviolettiliuoksella ja annetaan vaikuttaa 1 min, jonka jälkeen valmiste huuhdellaan vesijohtovedellä.
3. Valmiste peitetään Gramin jodiliuoksella ja annetaan vaikuttaa 1 min, jonka jälkeen valmiste huuhdellaan vesijohtovedellä.
4. Valmistetta huuhdellaan etanoli-asetoniliuoksella noin 30 sekuntia tai kunnes väriä ei enää lähde. Sen jälkeen se huuhdellaan lyhyesti vesijohtovedellä.
5. Valmiste peitetään safraniiniliuoksella ja annetaan vaikuttaa 1 min, jonka jälkeen valmiste huuhdellaan vesijohtovedellä.
6. Valmisteen annetaan kuivua.

May-Grünwald-Giemsä-värjäys (MGG-värjäys)

SAKURA VÄRJÄYSAUTOMAATTI

Ohjelma 1 / MGG-värjäys

1. Astia 1 / metanoli (kiinnitys) / 10 min
2. Astia 2 / May-Grünwald (2/3) + metanoli (1/3) / 5 min
3. Astia 3 / Giemsa (55 ml + 400 ml puskuroitua aquaa) / 15 min
4. Astia 4 / puskuroitu aqua / 1 min
5. Astia 5 / puskuroitu aqua / 1 min
6. kuivatus / 4 min

Tulokset

ID	GRAMgranP	MGGgranP	GRAMlymP	MGGlymP	GRAMmuutP	MGGmuutP	GRAMgranS	MGGgranS	GRAMlymS	MGGlymS	GRAMmonoS	MGGmonoS	GRAMecoS	MGGecoS
1	0	0	98	100	2	0	0	1	95	91	5	8	0	0
2	0	0	93	100	7	0	0	0	92	87	8	12	0	1
3	59	58	40	42	1	0	76	82	23	17	1	1	0	0
4	77	79	21	21	2	0	85	88	14	9	1	2	0	1
5	64	60	35	39	1	1	72	71	26	23	2	4	0	2
6	80	56	11	44	9	0	91	86	6	5	3	8	0	1
7	98	93	2	7	0	0	96	97	4	3	0	0	0	0
8	45	65	27	35	28	0	27	22	17	20	56	58	0	0
9	95	92	5	8	0	0	97	96	2	3	1	1	0	0
10	25	43	48	57	27	0	32	29	43	40	25	30	0	1
11	49	52	32	48	19	0	39	37	38	37	23	25	0	1
12	41	50	52	50	7	0	67	62	28	28	5	7	0	3
13	62	58	29	42	9	0	48	57	50	34	2	4	0	5
14	38	33	56	67	6	0	24	25	70	61	6	7	0	7
15	0	0	84	100	16	0	0	0	80	79	20	20	0	1
16	2	3	85	97	13	0	5	4	78	78	17	17	0	1
17	56	15	37	85	7	0	63	66	26	24	11	9	0	1
18	43	27	49	73	8	0	43	42	45	47	12	11	0	0