



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa

Teemu Syrjälä

Opinnäytetyö
Toukokuu 2017
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

SYRJÄLÄ, TEEMU:

Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 8 sivua

Toukokuu 2017

Veriryhmävasta-aineiden tunnistus voi olla hankalaa tai jopa mahdotonta tilanteissa, joissa potilaalla esiintyy useita veriryhmävasta-aineita, autovasta-aineita tai vasta-aineita yleisesti esiintyviä punasoluantigeeneja vastaan. Kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet voivat myös tällöin jäädä kliinisesti merkityksettömien vasta-aineiden aiheuttamien reaktioiden alle ja häiritsevät siten vasta-aineiden tunnistusta. Potilaan plasmaa voidaan inkuboida rekombinanttien veriryhmäantigeenien kanssa, jolloin antigeenit toimivat vasta-aineita inhiboivina molekyyleinä. Tällä tavoin tiettyjen vasta-aineiden suhteen neutraloidulla plasmalla voidaan ongelmitta suorittaa vasta-aineiden tunnistusta epäsuoralla antiglobuliinitestillä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä tietämystä rekombinanteista veriryhmäantigeeneista ja selvittää niiden käytön ominaisuuksia, erityispiirteitä ja virhelähteitä veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa. Rekombinanttien veriryhmäantigeenien avulla suoritettavaa inhibointimenetelmää ja sen suoritusta arvioitiin kirjallisten lähteiden lisäksi käytännön työskentelyn avulla. Menetelmän käyttöön laadittiin Fimlab laboratoriot Oy:lle työohje. Opinnäytetyön ja laadittavan työohjeen tarkoitus oli erityisesti auttaa laboratoriohenkilöstöä ymmärtämään paremmin menetelmään liittyviä perusteita ja sitä kautta edesauttaa sen oikeellista, tehokasta ja luotettavaa käytännön suoritusta. Kirjallisia lähteitä käyttämällä tarkasteltiin Imusyn rBGA –reagenssien hyötyjä ja integraatiota verensiirtoserologiaan. Opinnäytetyön teoreettisessa viitekehyksessä käsiteltiin myös joidenkin harvinaisten veriryhmien ja veriryhmävasta-aineiden ominaisuuksia verensiirtoserologiassa sekä niiden yleisyyttä populaatiossa.

Tulosten mukaan Imusyn rBGA –reagenssien käyttö ja inhiboinnin suoritus sekä käsitellyllä näytteellä työskentely on yksinkertaista. Menetelmän käytön suurimmat ongelmakohdat liittyvät työskentelyn suunnitteluun sekä huolelliseen pipetointitekniikkaan. Itse inhiboinnin onnistuminen ei näytä olevan virhealtista, eikä liian lyhyt inkubointi tai puutteellinen reaktioseoksen sekoitus näyttänyt vaikuttavan tuloksiin. Menetelmän käyttö onnistuu luotettavasti huolellisesti laadittua työohjetta noudattamalla myös menetelmän käytössä kokemattomalta henkilöltä. Jatkotutkimuksena olisi hyvä selvittää Imusyn rBGA –reagenssien käytön taloudellisia vaikutuksia verrattuna alihankintana tehtävään vasta-aineiden tunnistukseen. Myös laadittua työohjetta olisi hyvä arvioida sen jälkeen kun se on otettu käyttöön Fimlab Laboratoriot Oy:ssä. Hyvä jatkotutkimuksen aihe voisi myös olla menetelmän erilaiset käyttötavat, esimerkiksi monesta eri rBGA-reagenssista valmistetun yhdistelmäliuoksen valmistaminen ja sen integroiminen veriryhmävasta-aineiden tunnistusprosessiin.

Asiasanat: rekombinantit veriryhmäantigeenit, rekombinanttiproteiinit, rBGA, veriryhmävasta-aineet, verensiirtoserologia

ABSTRACT

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

SYRJÄLÄ, TEEMU:

Use of Recombinant Blood Group Antigens in Anti-Erythrocytic Antibody Identification

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 8 pages

May 2017

The aim of this study was to introduce and augment knowledge about recombinant blood group antigens (rBGA) as well as assess the usability, characteristics and sources of error of integrating them into the antibody identification procedure in a clinical immunohaematology laboratory. In addition, a procedure manual was written to guide the laboratory staff of Fimlab Laboratories Ltd. in working with Imusyn rBGA reagents. The study relies on theoretical sources and literature as well as real-life observations made during premeditated practical work. Some uncommon blood groups and their corresponding anti-erythrocytic antibodies as well as their prevalence in populations were also addressed.

It was observed that implementing recombinant blood group antigens in the antibody identification procedure is straightforward. The rBGA-inhibition can easily be performed by following a precisely compiled procedure manual. The major stumbling blocks relate to the accuracy of pipetting and thorough enough planning of the subsequent identification process that need to be carried out after the initial assays with Imusyn rBGA. The inhibition effect itself seems to be easily achievable and infallible even with defective mixing and skipping the incubation of the sample completely.

Further studies could evaluate the financial aspects of using Imusyn rBGA instead of analysing the sample via subcontracting. The procedure manual compiled in the process of writing this bachelor's thesis should also be properly evaluated after it has been introduced and actually used in the laboratory. It would also be interesting to find different and new ways to implement rBGA reagents in the antibody identification process.

Key words: recombinant blood group antigens, rBGA, recombinant proteins, anti-erythrocyte antibodies, blood group serology

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	VERENSIIRTOSEROLOGIA	7
	2.1 Veriryhmäantigeenit	7
	2.2 Veriryhmävasta-aineet	8
	2.3 Vasta-aineiden seulonta ja tunnistus	9
3	VERIRYHMÄT	11
	3.1 Chido/Rogers	11
	3.2 Knops	12
	3.3 JMH.....	13
	3.4 Landsteiner-Wiener.....	13
	3.5 Duffy-veriryhmä	14
4	REKOMBINANTIT VERIRYHMÄANTIGEENIT.....	16
	4.1 Veriryhmäantigeenien heterologinen ekspressio	17
	4.2 Rekombinanttien veriryhmäantigeenien integraatio verensiirtoserologiaan	18
	4.3 Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käytön edut	19
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT	22
6	OPINNÄYTETYÖPROSESSI.....	23
7	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT JA TUTKIMUSASETELMA.....	25
8	TULOKSET	29
	8.1 Menetelmän käytettävyys ja erityispiirteet	29
	8.2 Virhelähteet.....	31
	8.3 Imusyn rBGA –inhiboinnin työ- ja suoritusohje	33
	8.4 Johtopäätökset.....	34
9	POHDINTA.....	36
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET	43
	Liite 1. Koestusraportti (Toivari 2015)	43
	Liite 2. rBGA-inhiboidun näytteen N17 antigeenikartta merkintöineen.....	47
	Liite 3. Työohje.....	48

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena on rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa. Tällä hetkellä jotkin verensiirtoserologisissa tutkimuksissa reaktioita aiheuttavat näytteen vasta-aineet saattavat häiritä ja hidastaa vasta-aineiden tunnistusta tai tehdä sen kokonaan mahdottomaksi muualla kuin referenssilaboratoriossa. Rekombinantteja veriryhmäantigeeneja käyttämällä voidaan inhiboida tällaisia vasta-aineista aiheutuneita reaktioita. Tällä tavalla voidaan helpottaa veriryhmävasta-aineiden tunnistamista ja pienentää sopimattoman punasoluvalmisteen valinnan riskiä (Imusyn 2015, 1; Toivari 2015, 1). Opinnäytetyön tavoitteena on lisätä tietämystä rekombinanteista veriryhmäantigeeneista ja selvittää niiden käytön ominaisuuksia, erityispiirteitä ja virhelähteitä veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa. Menetelmän käyttöön laaditaan Fimlab laboratoriot Oy:lle työohje. Opinnäytetyön ja siinä koostettavan työohjeen tarkoitus on kokonaisuutena auttaa laboratoriohenkilöstöä ymmärtämään paremmin menetelmään liittyviä perusteita sekä mahdollistaa sen oikeellisen, tehokkaan ja luotettavan käytännön suorituksen.

Aihe on saatu Fimlab laboratoriot Oy:n Verikeskukselta. Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa on menetelmänä uusi ja siitä halutaan lisätietoa. Kirjallisten lähteiden avulla tarkastellaan rekombinanttien veriryhmäantigeenien integraatiota verensiirtoserologiaan. Teoreettisessa viitekehyksessä käsitellään myös joidenkin harvinaisten veriryhmien ja veriryhmävasta-aineiden ominaisuuksia verensiirtoserologiassa sekä niiden yleisyyttä populaatiossa. Opinnäytetyössä keskitytään niihin vasta-aineisiin, joiden vastaavaa rekombinanttia antigeeniä on käytettävissä Fimlab laboratoriot Oy:n Verikeskuksessa. Kaikki kyseessä olevat vasta-aineet kuuluvat IgG-luokan vasta-aineisiin.

Vasta-aineita seulotaan ja tunnistetaan epäsuoran antiglobuliinitestin (IAT) avulla testaamalla potilaan plasman reaktiivisuutta antigeenien suhteen tunnettujen reagenssipunasolujen kanssa (Armstrong, Wilkinson & Smart 2008, 201). Reagenssipunasolut koostetaan paneeleiksi siten, että niiden antigeeniprofiileilla voi mahdollisimman monipuolisesti poissulkea näytteessä mahdollisesti olevia vasta-aineita. Tietyn näytteessä olevan vasta-aineen mahdollisuus voidaan yleensä poissulkea silloin, kun näyteplasma ei reagoi vähintään kahden vastaavaa antigeeniä kantavan reagenssipunasolun kanssa

(Milkins ym. 2014, 21). Joidenkin potilaiden plasma voi reagoida kaikkien tai lähes kaikkien reagenssipunasolujen kanssa vasta-aineseulonnessa, sopivuuskokeessa tai tunnistamisessa tehtävässä useamman solun paneelissa. Tällöin näytteen vasta-aineita ei siis voida poissulkea eikä tunnistaa. (Murphy ym. 2013, 338). Jotta epäsuorassa antiglobuliinitestissä saataisiin riittävästi negatiivisia reaktioita, voidaan nykyään käyttää esimerkiksi fenotyypiltään harvinaisia seulontasoluja joita on varattu lähinnä referenssilaboratorioille (Seltsam & Blasczyk 2016, 244).

Nykyisellään perusteellinen vasta-aineiden tunnistus saattaa siis olla aikaa vievä ja työläs prosessi, ja joitakin näytteitä joudutaan lähettämään muualle tutkittavaksi. Pahimmillaan potilaalle sopivan verivalmisteen löytyminen ja siirtäminen saattaa viivästyä hitaan vasta-ainetutkimusprosessin takia. Imusynin käyttöohjeen (2015a) mukaan rekombinantit veriryhmäantigeenit on kuitenkin suunniteltu selektiivisesti inhiboimaan jokin mahdollisesti tavanomaisia verensiirtoserologisia tutkimuksia häiritsevä vasta-aine, jolloin käsitellystä näytteestä voidaan sekä tunnistaa inhiboitu vasta-aine että jatkaa tutkimuksia mahdollisten muiden vasta-aineiden löytämiseksi (Imusyn 2015a, 1). Uuden menetelmän ottaminen laajaan käyttöön saattaisi nopeuttaa ja helpottaa kyseessä oleville potilaille sopivan verityypin löytymistä. Toivon myös että opinnäytetyö auttaa toimeksiantajaa ja laboratoriohenkilökuntaa menetelmän käyttämisessä.

2 VERENSIIRTOSEROLOGIA

Veriryhmä on punasolujen ominaisuus, joka määräytyy punasolun pinnalla olevien perittyjen tekijöiden, antigeenien perusteella. Jotta voidaan puhua veriryhmästä, näitä antigeenejä vastaan on oltava olemassa spesifinen allovasta-aine. Allovasta-aineeksi kutsutaan vasta-ainetta, joka muodostuu elimistössä sellaista antigeeniä kohtaan, jota ei ole yksilön omien solujen pinnalla. Tämän määrittelyn johdosta yksilöltä voidaan sanoa myös puuttuvan jokin tietty veriryhmä. (Daniels & Bromilow 2014, 1, 65.)

2.1 Veriryhmäantigeenit

Antigeeni on immuunireaktion aikaansaava rakenne tai molekyyli (Hedman 2011). Veriryhmäantigeeneina voivat toimia erilaiset makromolekyylit: proteiinit, glykoproteiinit, glykolipidit tai niiden osat. Veriryhmän määräytyminen voi lopulta tapahtua esimerkiksi yhden makromolekyylin monosakkaridin tai yhden aminohapon muutoksen perusteella. Makromolekyyli voi myös puuttua kokonaan. Nämä veriryhmäantigeeneja sisältävät molekyylit ovat integroituneina punasolujen kalvorakenteeseen. Veriryhmäantigeenejä kantavia molekyyliä on erilaisia ja niitä luokitellaan sen perusteella, miten ne ovat kiinnittyneet punasolun solukalvoon. Tyypin 1 antigeenit läpäisevät solukalvon kerran, ja niiden C-domeeni on punasolun sytoplasman puolella ja vastaavasti N-domeeni solukalvon ulkopuolella. Tyypin 2 antigeenit läpäisevät solukalvon myös vain kerran, mutta niiden C-domeeni on solukalvon ulkopuolella ja N-domeeni punasolun sytoplasman puolella. Tyypin 3 antigeenit läpäisevät solukalvon monta kertaa, ja yleensä sekä N- että C-domeeni ovat sytoplasman puolella. Tähän on poikkeuksena Duffy-glykoproteiini, jonka N-domeeni jää solukalvon ulkopuolelle. (Daniels & Bromilow 2014, 1-2.) Tyypin 5 antigeenit eivät läpäise solukalvoa, vaan ovat ankkuroituneena punasolun kalvorakenteeseen lipidihännän eli GPI-ankkurin avulla (Daniels & Bromilow 2014, 2; Reid ym. 2012, 17). Tyypin 5 antigeenien N-domeeni on solukalvon ulkopuolella (Daniels & Bromilow 2014, 2). Chido/Rogers –veriryhmän antigeenit ovat tyypin 4 antigeenejä, jotka eivät ole kiinni punasolun kalvorakenteissa, vaan ne sijaitsevat komplementin C4d-osassa jota adsorboidaan punasolun pintarakenteisiin plasmasta (Reid ym. 2013, 6).

Monet näistä proteiineista ovat polymorfisia eli ne kantavat useampaa kuin yhtä veriryhmäantigeeniä (ISBT n.d.). Varsinaisina veriryhmäantigeeneinä toimivat proteiinien osat sekä niihin tai lipideihin kiinnittyneet hiilihydraattiosat. Sekvensointitekniikoiden avulla veriryhmiä määrittäviä geenejä on voitu sekvensoida ja punasolujen pinnalla olevien proteiinien aminohapposekvenssi on voitu selvittää. Näin on saatu yksityiskohtaisempaa tietoa veriryhmäantigeenien molekyyliarakenteesta ja niiden sisältämien antigeenienä toimivien osien sijainnista ja rakenteesta. (Yazdanbakhsh 2007, 85S.)

2.2 Veriryhmävasta-aineet

Veriryhmävasta-aineet voidaan jaotella luonnollisesti esiintyviin ja immuunivälitteisiin vasta-aineisiin. Ne voidaan jakaa myös autovasta-aineisiin ja allovasta-aineisiin. Autovasta-aineet ovat vasta-aineita, joilla on spesifiteetti elimistön omien punasolujen pinnalla esiintyviä antigeeneja kohtaan. Allovasta-aineita muodostuu elimistössä sellaisia antigeenejä kohtaan, joita ei ilmennetä omien punasolujen pinnalla. Siksi jonkin yleisesti esiintyvän veriryhmän puuttuminen potilaalta saa kyseessä olevan potilaan elimistön tuottamaan harvinaisia vasta-aineita näitä veriryhmäantigeeneja kohtaan. (Daniels & Bromilow 2014, 65.) Veriryhmävasta-aineen ja sille komplementaarisen antigeenin reagoimisen seurauksena elimistössä voi muodostua immuunivälitteisiä verensiirtoreaktioita. Verensiirtoreaktiot ovat verivalmisteiden siirtoon liittyviä haittavaikutuksia, jotka voidaan jakaa akuutteihin ja viivästyneisiin reaktioihin. (Harmening 2012, 368.) Immuunivälitteiset verensiirtoreaktiot johtuvat yleensä siitä, että potilaan plasmassa olevat veriryhmävasta-aineet reagoivat luovutettujen punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin. Tästä seuraa joko komplementtivälitteinen intravaskulaarinen hemolyysi tai makrofagivälitteinen ekstravaskulaarinen hemolyysi. (Johns 2015, 221.)

Vasta-aineet ovat neljästä polypeptidiketjusta koostuvia molekyylijä, jotka jaotellaan IgA-, IgD-, IgE-, IgG- ja IgM-luokan vasta-aineisiin. Näitä kutsutaan vasta-aineiden isotyypeiksi. Jaottelu perustuu isotyyppien molekyyliarakenteen raskasketjujen variaatioon. Tärkeimpiä vasta-aineiden isotyypejä immunohematologiassa ovat IgG- ja IgM-luokkien vasta-aineet. (Blaney & Howard 2008, 13–14.) Toisin kuin IgM-luokan vasta-aineet, IgG-luokan vasta-aineet eivät yleensä aktivoi komplementtia voimakkaasti tai aktivoivat sitä vain C3-tasolle, joka voi johtaa ekstravaskulaariseen hemolyysiin (Johns 2015, 15; Daniels & Bromilow 2014, 65). IgG-luokan vasta-aineet ovat lisäksi kooltaan

vain n. 150 kilodaltonia, joten ne ovat myös riittävän pieniä kulkeutumaan istukan läpi äidin verenkierrosta sikiön verenkiertoon (Johns 2015, 6–7). Siksi IgG-luokan vasta-aineet voivat joskus aiheuttaa vastasyntyneen hemolyyttisen taudin (Daniels & Bromilow 2014, 65, 73). Vasta-aineet eivät kuitenkaan aina ole kliinisesti merkityksellisiä. Danielsin ja Bromilowin (2014) mukaan IgG-luokan vasta-aine on kliinisesti merkittävä, jos sillä on mahdollisuus stimuloida nopeutunutta punasolujen tuhoutumista. Kliinistä merkitsevyyttä arvioidessa tärkein tekijä on vasta-aineiden spesifiteetti: vasta-aineet, joita ei tunnisteta 37 asteessa eivät yleensä ole kliinisesti merkityksellisiä. (Daniels & Bromilow 2014, 69–70.)

2.3 Vasta-aineiden seulonta ja tunnistus

Vasta-aineiden seulonta- ja tunnistusmenetelmät perustuvat antigeeni-vasta-aine-kompleksien detektioon. Epäsuorassa antiglobuliinitestissä (indirect antiglobulin test, IAT) voidaan havaita potilaan veressä mahdollisesti olevat non-agglutinoivat vasta-aineet kun niitä testataan luovuttajan punasoluja vastaan sekä vasta-aineseulonnan ja vasta-ainetunnistuksen reagenssisoluja vastaan (Harmening 2013, 47,109). Verensiirtoserologisissa tutkimuksissa potilaan plasmaa inkuboidaan tunnettujen, verenluovuttajilta saatujen O-veriryhmän punasolujen kanssa (Blaney & Howard 2009, 157). Suomessa käytäntönä on tehdä tavallisten ABO- ja RhD-veriryhmätutkimusten lisäksi kaikille potilaille vasta-aineiden seulonta kolmella eri reagenssipunasoluilla sekä vielä suomalaiset veriryhmäharvinaisuudet kattavilla SF-seulontasoluilla. Jos vasta-aineita ei seulonnan perusteella ole, voidaan yleensä suoraan valita potilaalle veriryhmän mukainen punasoluvalmiste ilman sopivuuskoetta. (Punainen Risti Veripalvelu 2016, 11.) Mikäli vasta-aineseulonnasta saadaan positiivinen tulos, tutkimuksia on jatkettava jotta tuloksen syy saadaan selville ja potilaalle voidaan valita sopiva verivalmiste. Jatkotutkimuksena positiiviselle vasta-aineseulonnalle tehdään automaattisesti veriryhmävasta-aineiden tunnistus. (Fimlab Laboratoriot Oy 2015a.)

Vasta-ainetunnistuksessa käytettävät reagenssipunasolut koostetaan laajoiksi paneeleiksi siten, että niiden avulla voidaan mahdollisimman monipuolisesti poissulkea eri vasta-aineiden esiintyminen näytteessä. Tietyn näytteessä olevan vasta-aineen mahdollisuus voidaan yleensä poissulkea silloin, kun näyteplasma ei reagoi vähintään kahden vastavaa antigeenia kantavan reagenssipunasolun kanssa. (Milkins ym. 2014, 21.) Joidenkin

potilaiden plasma voi reagoida kaikkien tai lähes kaikkien reagenssipunasolujen kanssa vasta-aineseulonnessa, sopivuuskokeessa tai tunnistamisessa tehtävässä useamman solun paneelissa. Tällöin näytteen vasta-aineita ei siis voida poissulkea eikä tunnistaa. Poissulkemiseen tarvitaan seulontasoluja, joiden pinnalta puuttuu reaktion aiheuttava antigeeni. Aina tällaisia seulontasoluja ei ole käytettävissä ja poissulkemiseen voidaan tarvita esimerkiksi useista eri menetelmistä saatuja yhdisteltyjä tuloksia. (Murphy ym. 2013, 338, 341.) Jos näyteellä tehdyistä testeistä ei saada riittävästi negatiivisia reaktioita vasta-aineiden mahdollisuuden poissulkemiseen ja tiedetään että potilaalla ei ole vasta-aineita tämän omia punasoluja vastaan eli autokontrolli on negatiivinen, on syytä epäillä vasta-ainetta jotakin yleistä antigeenia vastaan (Milkins ym. 2014, 23).

3 VERIRYHMÄT

Nykytiedon mukaan erilaisia veriryhmäjärjestelmiä tunnetaan yhteensä 35 (Table of blood group antigens n.d.). Veriryhmäjärjestelmiin kuuluu yhteensä yli 300 eri anti-geeniä (Knight 2013, 21). Kun veriryhmän esiintyvyys populaatiossa on alle 1:1000, se luokitellaan harvinaiseksi. Kun esiintyvyys on alle 1:5000, veriryhmä luokitellaan erittäin harvinaiseksi. (Punainen Risti Veripalvelu 2016, 16.) Kaikilla veriryhmillä ei kuitenkaan välttämättä ole lainkaan kliinistä merkitysevyyttä tai siitä ei ole tarkkaa tietoa (Daniels 2015, 23–29). Ne saattavat silti aiheuttaa verensiirtoserologisten tutkimusten tulkintaa vaikeuttavia reaktioita. Tällaisia verensiirtoserologiaa haittaavia veriryhmävasta-aineita varten on kehitetty rekombinantteja antigeeneja. Tällä hetkellä saatavilla on muun muassa rekombinantteja antigeeneja Chido/Rogers-, Knops-, JMH-, Landsteiner-Wiener- ja Duffy-veriryhmien vasta-aineille (Imusyn 2015a). Veriryhmävasta-aineet voidaan jakaa kliinisesti merkityksellisiin ja merkityksettömiin sen mukaan, voivatko ne aiheuttaa punasolujen hemolysoitumisen kohdatessaan antigeeninsä siirrettyjen punasolujen pinnalla. Tähän ominaisuuteen vaikuttaa hyvin monta eri tekijää, esimerkiksi niiden reagoitilämpötila ja immunoglobuliiniluokka. (Daniels & Bromilow 2013, 69.)

3.1 Chido/Rogers

Chido/Rogers –veriryhmään ei kuulu varsinaisia veriryhmäantigeenejä, koska niitä ei ekspressoida punasolujen pinnalla. Chido/Rogers –antigeenit sijaitsevat komplementin C4 neljännessä komponentissa. Antigeenit adsorboidaan plasmasta punasolujen pinnalle. (Daniels & Bromilow 2014, 62; Harmening 2012, 205.) Chido/Rogers –veriryhmään kuuluu yhdeksän antigeeniä: Ch 1-6, Rg1 ja Rg2. Chido-antigeenejä koodaa CH(C4B)-geeni, jonka tuotteena on C4B-komplementtikomponentti. Rogers-antigeeneja koodaa RG(C4A)-geeni, jonka tuotteena on C4A-komplementtikomponentti. Molemmat tuotteista ovat glykoproteiineja. C4A sitoutuu punasolun pinnalla ensisijaisesti proteiiniin, kun taas C4B sitoutuu ensisijaisesti punasolun pinnalla olevan proteiinin hiilihydraattiosaan. Komponentit ovat aminohapposekvenssiltään 99% identtisiä. C4B sitoutuu tehokkaammin punasolun pinnalle ja on siten herkempi aiheuttamaan hemolyysiä. (Reid ym. 2013, 474–481.) Imusyn rBGA –reagenssien Chido- ja Rogers –antigeeneinä ovat rekombinantit C4B*3 ja C4A*3 (Imusyn 2015a, 1). Chido/Rogers –vasta-aineet ovat

yleensä IgG-luokan vasta-aineita ja ne reagoivat heikosti. Vasta-aineet ovat kliinisesti merkityksettömiä. (Harmening 2012, 205.) Nämä vasta-aineet eivät myöskään aiheuta vastasyntyneen hemolyyttistä tautia (Reid ym. 2013, 483).

Allotyyppi C4B*3 vastaa fenotyyppiä Ch/Rg:1,2,3,4,5,6,-11,-12 eli veriryhmää Ch+Rg-. Allotyyppi C4A*3 vastaa fenotyyppiä Ch/Rg:-1,-2,-3,-4,-5,-6,11,12 eli veriryhmää Ch-Rg+. (Reid ym. 2013, 480.) Veriryhmien yleisyydet on esitetty taulukossa (taulukko 1).

TAULUKKO 1. Chido/Rogers –veriryhmän yleisyys väestöryhmissä (Reid ym. 2013, 481, muokattu).

Useimmat populaatiot					
Ch:1,2,3	88,2%		Ch:4,5,6	>99%	
					Rg:11,12 95,0%
Ch:1,-2,3	4,9%				Rg:11,-12 3,0%
Ch:1,2,-3	3,1%				Rg:-11,-12 2,0%
Ch:-1,-2,3	3,8%				

3.2 Knops

Knops-veriryhmän antigeenit sijaitsevat komplementtia säätelevässä glykoproteiineissa, komplementtireseptori 1:ssä (CR1) (Daniels & Bromilow 2014, 63). Knops-veriryhmässä on yhdeksän antigeeniä, joista kaukaasialaisissa paljon esiintyviä ovat Kn^a, McC^a, Yk^a, SI^a ja KCAM. Kantajamolekyylit CR1:ssä on seitsemästä komplementtia säätelevästä proteiinista muodostuvia ketjuja: LHR A, LHR B, LHR C ja LHR D. Antigeenit ovat sitoutuneena LRH D -ketjussa, joka sijaitsee lähimpänä punasolun pintaa. (Reid ym. 2013, 549–552.) Veriryhmän yleisyys kaukaasialaisilla on esitetty taulukossa (taulukko 2). Reidin (2013) mukaan anti-Kn^a, anti-McC^a, anti-Yk^a ja anti-SI^a eivät aiheuta verensiirtoreaktioita eivätkä vastasyntyneen hemolyyttistä tautia ja ne ovat siten kliinisesti merkityksettömiä vasta-aineita. Anti-KCAM on myös hyvin todennäköisesti kliinisesti merkityksetön. (Reid ym. 2013, 555, 557–558, 358–359, 560, 565.) Anti-Kn^a-vasta-aineiden reaktiivisuus kasvaa inkuboitessa pitkään ja näitä vasta-aineita löydetään usein monia verensiirtoja saaneiden henkilöiden plasmasta (Harmening 2012, 206). Imusyn rBGA -reagenssien Knops-antigeeneinä ovat rekombinantit Kn(a), McC(a), SI(a) sekä SI3+ -antigeenit (Imusyn 2015a, 1).

TAULUKKO 2. Knops-veriryhmän yleisyys kaukaasialaispopulaatiossa (Reid ym. 2013, 553, muokattu).

Kaukaasialaiset			
Kn(a+b-)	94,5%	McC(a+)	98,0%
Kn(a-b+)	>1%	SI(a+)	98,0%
Kn(a+b+)	3,5%	KCAM+	98,0%

3.3 JMH

JMH-veriryhmään kuuluu kuusi eri antigeenia, ja niiden kantajaproteiininä on GPI-ankkurin avulla punasolun pintaan kiinnittynyt glykoproteiini. JMH-antigenejä koodaa JMH-geeni, josta on olemassa variantteja muotoja jotka altistavat etenkin ikääntyvillä ihmisillä heikentyneeseen JMH-antigeenien ekspressioon. JMH-antigeenien esiintyvyys kaikilla populaatioilla on kuitenkin 100%. JMH-vasta-aineet ovat IgG-luokan vasta-aineita, jotka eivät aiheuta verensiirtoreaktioita eivätkä vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. Ne ovat siis kliinisesti merkityksettömiä. Autoanti-JMH -vasta-aineita löydetään hankittuna ominaisuutena useimmiten vanhuksilta, joilla on JMG-antigeenien ekspressioon vaikuttava JMH-geenin variantti. (Reid ym. 2013, 591–601.) Imusyn rBGA -reagenssien JMH-antigeeninä on rekombinantti JMH-antigeeni (Imusyn 2015a, 1).

3.4 Landsteiner-Wiener

Landsteiner-Wiener – eli LW-veriryhmään kuuluu kaksi antigeeniä: LW^a ja LW^b. Antigenejä koodaa saman geenin eri alleelit. LW-antigeenit ovat solunsisäisiä adheesioglykoproteiineja, joita kutsutaan nimellä ICAM-4. (Daniels & Bromilow 2014, 62.) LW-antigeenien ekspressio on matalampi RhD-negatiivisilla kuin RhD-positiivisilla henkilöillä (Harmening 2012, 204). LW-glykoproteiinit ilmeisesti tarvitsevat ekspressoituaan vuorovaikutuksen Rh-proteiinien kanssa (Miola ym. 2013, 198). LW-antigeenien ekspressio vaatii myös divalentteja kationeita, erityisesti Mg²⁺-ioneita. Koska antikoagulanttina käytetty etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) kelatoi metalli-ioneja, LW-antigeenit saattavat ekspressoitua huonosti tai eivät ollenkaan EDTA-

säilöntäaineellisen näytteen punasoluissa. (Reid ym. 2013, 471–473.) Alloanti-LW reagoi voimakkaasti RhD-positiivisten punasolujen kanssa ja heikosti RhD-negatiivisten punasolujen kanssa (Harmening 2013, 201). LW-vasta-aineet eivät reagoi lainkaan Rh_{null}- ja LW-null -fenotyyppin punasolujen kanssa (Daniels & Bromilow 2014, 62). LW-vasta-aineiden ja RhD-positiivisten punasolujen välinen suhde taas on niin voimakas, että anti-LW -vasta-aine voidaan joskus virheellisesti tunnistaa anti-D:ksi (Knight 2012, 35). Autoanti-LW:n ekspressio on yleistä WAIHA-potilailla. Alloanti-LW^a -vasta-aineen aiheuttama viivästynyt verensiirtoreaktio tai vastasyntyneen hemolyttinen tauti on viivästyneenä ja lievänä mahdollinen mutta harvinainen. (Reid ym. 2013, 473.) Danielsin ja Bromilowin (2014) mukaan näitä vasta-aineita pidetään yleensä kliinisesti merkityksettömänä (Daniels & Bromilow 2014, 62). Reid ym. (2013) puolestaan määrittelevät LW-vasta-aineet kliinisesti joskus merkittäviksi (Reid ym. 2013, 704). Danielsin (2015) mukaan yhtäkään anti-LW -vasta-aineen aiheuttamaa verensiirtoreaktioita tai vastasyntyneen hemolyyttistä tautia ei ole raportoitu. Kuitenkin anti-LW -positiiviselle henkilölle tulisi valita RhD-negatiivinen verivalmiste. (Daniels 2015, 10, 17, 27.) Punaisen Ristin Veripalvelun mukaan LW^b-vasta-aine on kliinisesti merkityksellinen (Punainen Risti Veripalvelu 2016, 17). Imusyn rBGA -reagenssien LW-antigeeninä on rekombinantti LW(a) (Imusyn 2015a, 1). Suomalaisessa populaatiossa on poikkeuksellisesti henkilöitä, jotka ovat kummankin antigeenin suhteen LW-negatiivisia (taulukko 3).

TAULUKKO 3. LW-veriryhmän yleisyys eurooppalaisilla ja suomalaisilla (Reid ym. 2013, 471, muokattu)

	Eurooppalaiset	Suomalaiset
LW(a+b-)	97,0%	93,9%
LW(a+b+)	3,0%	6,0%
LW(a-b-)	0,0%	0,1%

3.5 Duffy-veriryhmä

Duffy-veriryhmään kuuluu kaksi antigeeniä: Fy^a ja Fy^b. Antigeneja koodaa saman geenin eri alleelit. (Daniels & Bromilow 2014, 52.) Antigeenien kantajamolekyylillä on tyyppin 3 glykoproteiini, joka läpäisee punasolun solukalvon useasti mutta jonka N-domeeni jää poikkeuksellisesti solukalvon ulkopuolelle (Reid ym. 2013, 364). Käytännössä jo-

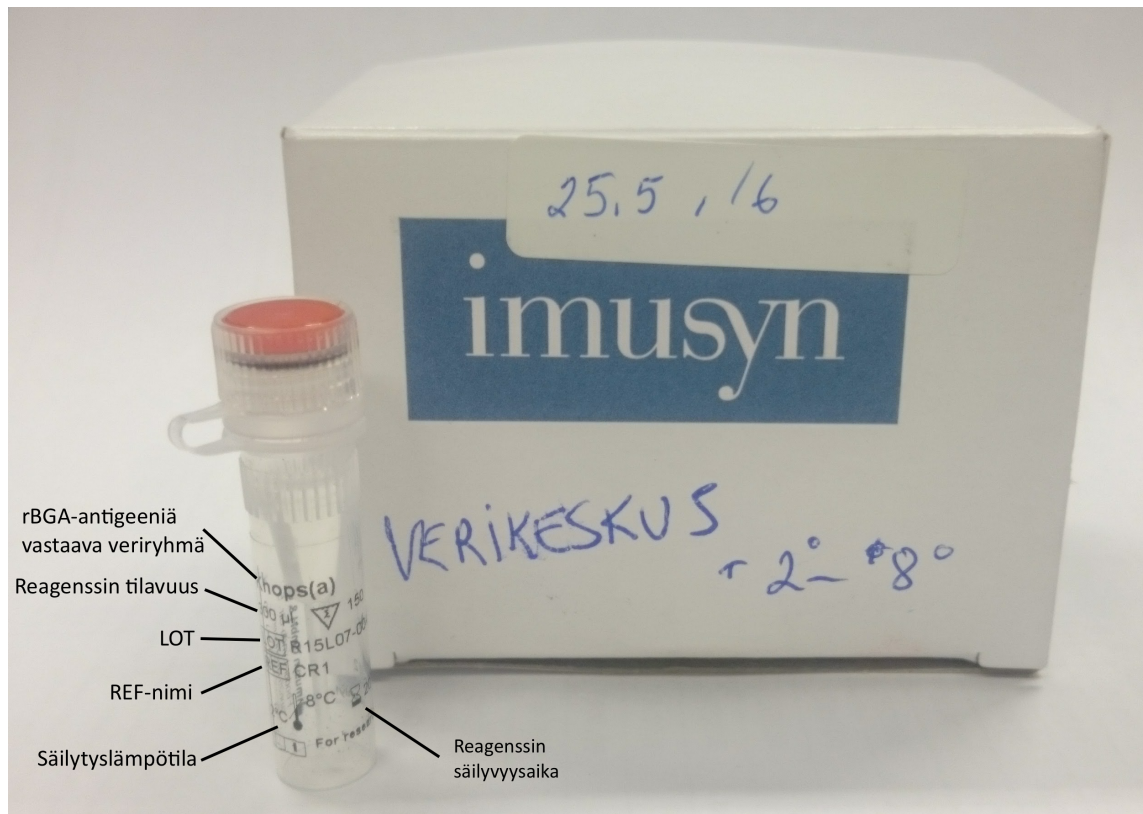
kainen kaukaasialainen on Duffy-veriryhmäpositiivinen vähintään toisen antigeenin suhteen, mutta etenkin Fy^a-veriryhmä puuttuu noin kolmasosalta kaukaasialaisista (taulukko 4). Alloanti-Fy^a ja alloanti-Fy^b ovat molemmat IgG-luokan vasta-aineita (Reid ym. 2013, 366, 368). Danielsin ja Bromilowin (2014) sekä ja Reidin ym. (2013) mukaan sekä Fy^a että Fy^b voivat aiheuttaa viivästyneitä verensiirtoreaktioita (Daniels & Bromilow 2014, 71; Reid ym. 2013, 367–368). Duffy-vasta-aineita voidaan siis pitää kliinisesti merkittävänä. Myös Harmening (2013) sekä Milkins ym. (2014) luokittelevat nämä vasta-aineet kliinisesti merkittäviksi (Harmening 2013, 49, 64; Milkins ym. 2014, 51). Anti-Fy^a on huomattavasti yleisempi löydös kuin anti-Fy^b (Harmening 2013, 49, 64). Imusyn rBGA –reagenssien Duffy-antigeeneinä ovat erillisinä reagensseinaan olevat rekombinantit Fy(a) ja Fy(b) (Imusyn 2015a, 1).

TAULUKKO 4. Duffy-veriryhmän yleisyys eurooppalaisilla ja kaukaasialaisilla (Daniels & Bromilow 2014, 53; Knight 2012, 40; Reid ym. 2013, 365, muokattu)

	Eurooppalaiset	Kaukaasialaiset
Fy(a+b-)	20,0%	17,0%
Fy(a+b+)	48,0%	49,0%
Fy(a-b+)	32,0%	34,0%
Fy(a-b-)	0,0%	0,0%

4 REKOMBINANTIT VERIRYHMÄANTIGEENIT

Rekombinantit veriryhmäantigeenit ovat laboratorio-olosuhteissa rekombinantti-DNA-tekniikoilla valmistettuja liukoisia proteiinikomplekseja, jotka toimivat antigeeneinä yhdelle tai useammalle veriryhmävasta-aineelle. Kun potilaan näytettä inkuboidaan valmisteeseen (kuva 1) kanssa, valmisteeseen antigeenit voivat reagoida näyteplasman vastaavien veriryhmävasta-aineiden kanssa ja siten estävät niitä aiheuttamasta positiivista reaktiota hemagglutinaatioon perustuvassa verensiirtoserologiassa. Näin käsitellyt näytteet voidaan testata uudelleen punasolupaneelilla ja tulosten avulla voidaan havaita aiemmin häiritsevien vasta-aineiden alle jääneet kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet. (Seltsam ym. 2014, 1823–1825.)



KUVA 1. Imusyn rBGA -reagenssin pakkaus ja reagenssiputkessa olevat tiedot (Kuva: Teemu Syrjälä 2016)

4.1 Veriryhmäantigeenien heterologinen ekspressio

Laboratorio-olosuhteissa on jo ainakin 90-luvulta alkaen onnistuttu heterologisesti ekspressoimaan solukalvolle kiinnittyneitä kokonaisia glykoproteiineja, jotka sisältävät aktiivisia veriryhmäantigeneja. Esimerkiksi Kell-, Duffy- ja Lutheran-glykoproteiineja on ekspressoitu tällä tavoin jo vuonna 1994 (Russo, Lee, Reid & Redman 1994). Heterologisessa hyönteissolulinjassa on saatu tuotettua vuonna 1999 myös rekombinanttia Kell-glykoproteiinia solukalvolta irrallaan liukoisessa muodossa, mutta sillä ei ollut aktiivisuutta ihmisen vasta-aineita kohtaan (Lee ym. 1999). Liukoisessa muodossa olevien ja ihmisen vasta-aineiden kanssa aktiivisten proteiinien tuottaminen on edistynyt viime vuosina muun muassa sekvensointitekniikoiden ansiosta (Reid ym. 2012, 12; Seltsam 2014, 1824; Seltsam & Blasczyk 2016, 244). Edistystä on tapahtunut myös transienteissa nisäkässolutransfektio tekniikoissa ja fuusiopartnereiden käytössä nisäkässoluista muodostuvissa ekspresiosysteemeissä (Carter ym. 2010, 357–358; Zhu 2011).

Yleensä rekombinantteja proteiineja ekspresoidaan hiiva- ja bakteerisoluisissa. Jotta ihmisen vasta-aineet pystyisivät tehokkaasti ja spesifisesti sitoutumaan rekombinantteihin antigeenipareihinsa, antigeenien konformaation ja rakenteen tulee olla samanlainen kuin ihmisen punasolujen pinnalla luonnollisesti esiintyvien antigeenien. Hiiva- ja bakteerisolot eivät kykene muokkaamaan proteiineja post-translacionaalisesti. Tällainen proteiinien muokkaus tapahtuu glykosylaation avulla. (Yazdanbakhsh 2007, 86S.) Glykosylaatio on hiilihydraattiosien liittämistä proteiiniin ja sitä tarvitaan etenkin solukalvon ulkopinnoille ulottuvissa proteiineissa (Frilander & Heino 2015). Glykosylaatio on vain eukaryoottisolulla oleva ominaisuus, minkä takia sopivia veriryhmäantigeenin sisältäviä ja toimivia rekombinantteja proteiineja voidaan ekspresoida ja tuottaa vain nisäkässolulinjoissa (Yazdanbakhsh 2007, 86S). Toisaalta on tehty myös tutkimuksia, joissa juuri glykosylaation puute ei ole vaikuttanut rekombinantin veriryhmäantigeenin aktiivisuuteen ihmisen vasta-ainetta kohtaan (Waśniowska, Czerwiński, Jachymek & Lisowska 2000). Tähän vaikuttavat kuitenkin oleellisesti proteiinin rakenteelliset ominaisuudet ja yksinkertaisuus: Esimerkiksi rekombinantisti tuotettu Lutheran-veriryhmäantigeeni on tutkimuksissa ollut yhtä aktiivinen sekä prokaryootissa että eukaryootissa tuotettuna. (Seltsam, Grüger & Blasczyk 2007.)

Rekombinanttien veriryhmäantigeenien tuotanto laajaan käyttöön on kuitenkin haastavaa. Carterin ym. (2010) mukaan liukoisten fuusioproteiinien tuotannossa tarvittavia

fuusiopartnereita on jo pitkään käytetty voimistamaan proteiinien ekspressiota *E. Colis*-sa, mutta edistys ei ole ollut yhtä nopeaa ja laajaa nisäkässolujen käytössä. Nisäkässoluissa tuotettujen liukoisten proteiinien ekspressio on lähtökohtaisesti hyvin heikkoa, mikä onkin ollut yksi menetelmän suurimpia ongelmia. (Carter ym. 2010.) Yazdanbakhsh (2007) korostaa, että on oltava tarkasti selvillä siitä millaisia ulkoisia tekijöitä solulinjat tarvitsevat tuottaakseen antigeeneja tarpeeksi suurina määrinä. Lisäksi transfektoitujen solulinjojen spesifisen antigeenin ekspressoiminen heikkenee tai loppuu kokonaan soluja pakastettaessa ja sulattaessa, jolloin toimivien solulinjojen ylläpitäminen on vaikeaa. (Yazdanbakhsh 2007, 88S). Kaikesta huolimatta proteiinien ekspressoiminen nisäkässoluissa on kehittynyt paljon 2000-luvulla. Zhun (2011) mukaan erityisesti nisäkässolulinjojen muokkaaminen, glykosylaation parempi ymmärtäminen ja geenien ekspressoimista parantavat menetelmät ovat selkeästi parantaneet ja laajentaneet nisäkässolujen käyttöä biolääketieteen eri aloilla ja erilaisten proteiinien tuotannossa (Zhu 2011).

Vaikka punasolun pinnalla olevat proteiinit tunnetaan rakenteeltaan hyvin, on vaikeaa saada selville niiden sisältämät epitoopit ja muut rakenteet, jotka mahdollistavat vasta-aineiden kiinnittymisen eli niiden varsinaisen toimimisen antigeeneina (Yazdanbakhsh 2007, 85S). Koko ajan lisääntyvä tietämys veriryhmäproteiinien ja niiden sisältämien antigeenien geneettisestä perustasta ja molekyyli-rakenteesta on myös osaltaan mahdollistanut näiden antigeenien rekombinantin ekspressoimisen ja eristämisen eukaryoottisessa systeemissä (Seltsam 2014, 1824, Seltsam & Blasczyk 2016, 244).

4.2 Rekombinanttien veriryhmäantigeenien integraatio verensiirtoserologiaan

Rekombinantteja veriryhmäantigeeneja voidaan suoraan yhdistää tavallisiin veriryhmäserologiassa käytettäviin hemagglutinaatioon perustuviin menetelmiin, mukaan lukien LISS/Coombs –geelikorttimenetelmään (Seltsam ym. 2008, 1154). Siksi rekombinanttien veriryhmäantigeenien tuominen osaksi verensiirtoserologiaa on vaivatonta.

Rekombinantteja veriryhmäantigeeneja voidaan käyttää apuna epäsuorassa antiglobuliinikokeessa. Imusynin käyttöohjeen (2015a) mukaan veriryhmävasta-aineen tunnistus voi olla hankalaa tai jopa mahdotonta tilanteissa, joissa potilaalla esiintyy useita veriryhmävasta-aineita, autovasta-aineita tai vasta-aineita yleisesti esiintyviä punasoluant-

geeneja vastaan. Kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet voivat jäädä kliinisesti merkityksettömien vasta-aineiden aiheuttamien reaktioiden alle ja haittaavat siten vasta-aineiden tunnistusta. Potilaan plasmaa voidaan inkuboida rekombinanttien veriryhmäantigeenien kanssa, jolloin antigeenit toimivat vasta-aineita inhiboivina molekyyleinä. Tällä tavoin tiettyjen vasta-aineiden suhteen neutraloitua plasmaa voidaan käyttää epäsuorassa antiglobuliinitestissä ilman mitään muuta jatkokäsittelyä. (Imusyn 2015a, 1–2.) Imusyn-reagenssien rekombinantin antigeenin konsentraatio on korkea. Esimerkiksi LW(a)-antigeenia on Imusynin teknisten tietojen (2015b) mukaan rBGA-reagenssissa 0,45 mg/ml (Imusyn 2015b). Vaikka tarvittavat konsentraatiot vasta-aineiden inhiboimiseen ovat yleisesti laskettavissa vain mikrogrammoissa millilitraa kohden, Imusyn rBGA-tuotetta voidaan myös lisätä asteittain inhibitioreaktioon jos inhibitio on ollut epätäydellistä. (Ridgwell, Dixey & Scott 2007; Imusyn 2015a.) Imusyn rBGA-reagenssien herkkyys ja tarkkuus on valmistajan mukaan kaikilla valmisteilla 100% poislukien Knops-veriryhmän CR1-reagenssi, jonka herkkyys on 74% (n=62). CR1-reagenssin rekombinanteista antigeeneistä Kn(a), McC(a), SI(a) ja SI3+ vain Kn(a) on ollut mukana serologisessa testauksessa (Imusyn 2015a, 1–2.)

4.3 Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käytön edut

Kliinisesti merkityksettömiä ja vasta-aineen tunnistusta haittaavia vasta-aineita voidaan joissain tapauksissa eliminoida näytteestä myös muilla menetelmillä, esimerkiksi adsorptio-, inhibitio-, eluutio- tai entsyymimenetelmillä (Yazdanbakhsh 2007, 87S). Adsorptiomenetelmässä tiettyä vasta-ainetta poistetaan näytteestä lisäämällä näytteeseen potilaan omia pestyjä ja vasta-ainevapaiksi käsiteltyjä punasoluja. Myös ulkopuolisen luovuttajan fenotyypitettyjä punasoluja voidaan käyttää. Adsorptiossa muodostuneet kiinteät kompleksit poistetaan näytteestä sentrifugoimalla ja tutkimuksia voidaan jatkaa. (Harmening 2013, 229–230.) Muissa inhibitiomenetelmissä käytetään nesteitä, joissa on läsnä tiettyjä veriryhmäantigeenejä. Inhibitiota käytettäessä näyte kuitenkin väistämättä laimenee. Tarpeeksi laimentuessaan näytteen joitakin vasta-aineita ei voida enää detektoida. (Yazdanbakhsh 2007, 87S.) Inhibointia varten tulee olla valmistettuna antigeenireagenssi, jossa antigeenien konsentraatio liuoksessa on suuri. Käytettäessä rekombinantteja antigeenejä näyte voidaan käsitellä reagenssilla siten, ettei näyte juurikaan laimene (Yazdanbakhsh 2007, 87S).

Vasta-aineiden tunnistaminen punasolupaneelien avulla vaatii sekä positiivisia että negatiivisia agglutinaatioreaktioita solupaneelien punasolujen kanssa. Jos näytteessä on useita vasta-aineita, autovasta-aineita tai vasta-aineita sellaisille antigeeneille joita esiintyy populaatiossa suurissa määrin, vasta-aineita ei voida suoraan tunnistaa. (Seltsam & Blasczyk 2016, 244.) Tällaisissa tapauksissa punasolupaneelissa ei ole riittävästi reagoimattomia seulontasoluja tulkinnan tekemiseen. Jotta epäsuorassa antiglobuliinitestissä saataisiin riittävästi negatiivisia reaktioita, voidaan käyttää fenotyypiltään harvinaisia seulontasoluja joita on varattu lähinnä referenssilaboratorioille (Seltsam & Blasczyk 2016, 244). SPR:n Veripalvelulla onkin käytössään punasolupaneeleita, jotka sisältävät suomalaisen väestön tyypillisimpiä harvinaisia antigeenityyppejä. Näitä paneeleita ei ole kaupallisesti saatavilla. SPR:n Veripalvelu myös säilyttää nestetyypessä pakastettuna kansainvälisestä vaihto-ohjelmasta hankittuja harvinaisia reagensseja, jotka soveltuvat vaativimpiin vasta-ainetunnistuksiin ja joita sulatetaan tarpeen mukaan. (Punainen Risti Veripalvelu n.d.). rBGA-antigeenit tarjoavatkin kliinisille rutiinilaboratoriolle menetelmän, jolla vasta-aineprofiililtaan harvinaisia tai muuten vaikeasti tutkittavia näytteitä voidaan analysoida (Seltsam & Blasczyk 2016, 245).

Kun rekombinantteja antigeenejä käytetään inhiboimaan näytteessä mahdollisesti olevat kliinisesti merkityksettömät vasta aineet, on mahdollista yhdessä punasolupaneelien kanssa epäsuorassa antiglobuliinitestissä saada selville vain yhden näytteenkäsittelyvaiheen lisäyksellä potilaan näytteessä mahdollisesti olevat kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet. Rekombinanttien antigeenien avulla rutiinilaboratoriot voisivat laajemmin tunnistaa myös hankalampien näytteiden vasta-aineita, mikä vähentää tarvetta turvautua referenssilaboratorioihin ja nopeuttaa myös tulosten vastaamista (Seltsam & Blasczyk 2016, 245). Rekombinantit proteiinit säilyvät jopa kuukausia, mikä lisää edelleen niiden käytettävyyttä erityisesti pienemmissä rutiinilaboratorioissa. Seltsamin ym. (2016) mukaan kaikki rBGA-proteiinit säilyvät tällä hetkellä +4°C lämpötilassa säilytettynä vähintään kuusi kuukautta (Seltsam ym. 2016, 247). Rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö todennäköisesti myös lisää epäsuoran antiglobuliinitestin herkkyyttä jopa käytettäessä säilytettyjä vasta-aineaktiivisuudeltaan heikentyneitä seeruminäytteitä (Seltsam ym. 2008, 1153–1154).

Imusyn rBGA –tuotteiden käyttäminen vasta-aineen tunnistuksessa saattaa nopeuttaa vastauksen saamista sekä toimittamista pyytävälle yksikölle ja mahdollisesti tarvittavan harvinaisen veren tarpeeseen voidaan varautua aikaisemmin. Tunnistuksen suoritus re-

konbinantteja veriryhmäantigeeneja apuna käyttäen saattaa lisäksi olla rutiinilaboratoriolle edullisempaa kuin näytteen lähettäminen referenssilaboratorioon. Lähetettäessä tunnistamaton näyte referenssilaboratorion tutkittavaksi lähettävälle yksikölle koituu kustannuksia näytteen lisääntyneestä käsittelystä materiaaalipalvelussa, kuljetuksesta sekä itse laboratoriolta tilatuista tutkimuksista ja mahdollisesti erikseen laskutettavista lisätutkimuksista. Yhden punasoluvasta-aineiden tunnistuksen veroton hinta on SPR:n Veripalvelussa noin 150 euroa, jonka lisäksi saatetaan periä noin 80 euron suuruinen kiireellisyyslisä. Fimlab Laboratoriot Oy:n ostolaskujen (2015b) mukaan yrityksen on mahdollisuus ostaa Imusyn rBGA-reagensseja 300 µl pakkauksissa, jotka ilman veroja maksavat 179 euroa kappaleelta. Yhteen tilaukseen sisältyy ilman veroja noin 170 euron edestä pakkaus- ja logistiikkakuluja (Fimlab Laboratoriot Oy 2015b). Laskennallisesti 300 µl reagenssia riittää kuitenkin jopa 150:een reagenssipunasoluilla suoritettavaan rBGA-inhiboituun reaktioon.

5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyön aiheena on rekombinanttien veriryhmäantigeenien käyttö veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa. Opinnäytetyön tavoitteena on lisätä tietämystä rekombinanteista veriryhmäantigeneista. Tavoitteena on myös selvittää Imusyn rBGA – rekombinanttiveriryhmä-antigeenien käytön ominaisuuksia, erityispiirteitä ja virhelähteitä veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa ja käytännön työskentelyssä. Kirjallisten lähteiden avulla tarkastellaan rekombinanttien veriryhmäantigeenien integraatiota verensiirtoserologiaan. Menetelmän käyttöön laaditaan myös Fimlab laboratoriot Oy:lle työohje. Opinnäytetyön ja laadittavan työohjeen tarkoituksena on erityisesti auttaa laboratoriohenkilöstöä ymmärtämään paremmin menetelmään liittyviä perusteita ja siten edesauttaa sen oikeellista, tehokasta ja luotettavaa käytännön suoritusta.

Opinnäytetyön tutkimustehtävinä ovat:

- Miten rekombinantteja antigeeneja voidaan käyttää veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa?
- Millaisia asioita inhiboitavan näytteen tutkimusprosessissa tulee ottaa huomioon ennen Imusyn rBGA -inhibointia, sen aikana ja sen jälkeen?

6 OPINNÄYTETYÖPROSESSI

Opinnäytetyöprosessi alkoi huhtikuussa 2016, jolloin valitsin Imusyn rBGA-veriryhmäantigeeneihin liittyvän aiheen. Aihe tuntui alusta alkaen mielenkiintoiselta, sillä kyseessä on kansainvälisestikin uusi menetelmä josta ei ollut paljon lähdemateriaalia saatavilla. Olin myös kiinnostunut verensiirtoserologiasta ja verikeskustyöskentelystä, joten näin aiheen myös tältä osin mielekkäänä. Aihe saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:ltä Tampereen Verikeskukselta.

Tapasimme työelämän yhteyshenkilöiden kanssa toukokuussa 2016, jolloin keskustelimme opinnäytetyön teoreettisesta sekä kokeellisesta sisällöstä tarkemmin. Keskustelusta saatujen täsmennysten ja lisätietojen pohjalta laadin toukokuussa opinnäytetyösuunnitelman sekä allekirjoitimme opinnäytetyösopimukset. Tästä lähtien aloin myös kirjoittaa opinnäytetyön teoriapohjaa. Kokeellisen osuuden ajankohdaksi sovittiin joulukuu 2016. Näytteiden harvinaislaatuudesta johtuen niiden keräys päätettiin aloittaa hyvissä ajoin. Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen Verikeskus ohjeisti henkilökuntaansa näytteiden keräyksestä 24.5.2016. Kerättävissä näytteissä tuli olla ainakin yksi sellainen vasta-aine, jota vastaan Verikeskuksella oli Imusyn-reagenssia. Näytteiden plasma eroteltiin viiden vuorokauden jääkaappisäilytyksen jälkeen ja pakastettiin.

Marraskuussa 2016 tapasin uudestaan opinnäytetyötä ohjaavan kemistin sekä ohjaavan opettajan kanssa. Päätimme muuttaa kokeellisen osan toteutusta nykyiseen muotoonsa vastaamaan paremmin toimeksiantajan tarpeita. Opinnäytetyön teoriapohja säilyi kuitenkin samanlaisena.

Suoritin 16.12.2016 sekä 19.–22.12.2016 opinnäytetyön kokeellisen osuuden Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen Verikeskuksen tiloissa. Kerättyjä näytteitä oli tässä vaiheessa 16 kappaletta. Näytteet sisälsivät joko anti-Fy(a) -vasta-ainetta tai anti-Ch -vasta-ainetta ja osassa näytteistä oli lisäksi joko tunnistamaton vasta-aine, anti-E tai anti-D -suojauksesta johtuva anti-D. Näytteet sulatettiin kemisti Eeva Toivarin ohjeistuksen (Toivari 2016) mukaisesti, jonka jälkeen sulatetut näytteet tarkastettiin silmämääräisesti. Osassa näytteissä näkyi sulatuksen jälkeen vaihtelevia määriä proteiinisaostumaa. Silmännähtävää saostumaa sisältävät näytteet päätettiin sentrifugoida, jonka jälkeen voitiin erotella näytemateriaaliksi kirkas plasma uuteen putkeen. Kokeellisen osan loppu-

puolella Verikeskukseen saapui tuore potilasnäyte, jossa tiedettiin olevan kliinisesti merkityksellinen anti-LW(a) sekä anti-D ja päätimme sisällyttää myös tämän näytteen opinnäytetyöhön. Kokeellisen työskentelyn pohjalta kirjoitettiin työohjeluonnos sekä opinnäytetyön kokeelliseen osuuteen liittyvät osiot. Työohjeluonnoksesta muokattiin Fimlab laboratoriot Oy:n Verikeskuksen vastuuhoitajan antaman palautteen perusteella lopullinen versio, joka hyväksyttiin Fimlab laboratoriot Oy:n hematologian erikoisalan analytiikkatuotannosta vastaavalla ylilääkärillä Tomi Koskella.

7 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT JA TUTKIMUSASETELMA

Opinnäytetyön tutkimusstrategia yhdistelee kokeellista tutkimusta ja tapaustutkimusta, joiden perusteella voidaan muodostaa menetelmän rutiiniin käyttöön soveltuva työohje. Tutkimuksen tarkoitus on kartoittava. Hirsijärven, Remeksen ja Sajavaaran (2009) mukaan tapaustutkimuksessa aineistoa kerätään muun muassa havainnoin, haastatteluin ja dokumentteja tutkien. Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttajaan. Kartoittavan tutkimuksen ominaispiirteisiin kuuluu osaltaan vähän tunnettujen ilmiöiden selvittäminen sekä uusien näkökulmien löytäminen. (Hirsijärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134–135, 138.)

Rekombinantit veriryhmäantigeenit on todettu käyttökelpoisiksi verensiirtoserologisissa tutkimuksissa (Seltsam 2011; Seltsam ym. 2014; Seltsam & Blasczyk 2016). Myös Toivari (2016) on koestusraportissaan todennut, että Imusyn rBGA –antigeneja voi käyttää hyväksi vasta-ainetunnistuksissa (Toivari 2015, liite 1).

Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:n Verikeskusta tiedotettiin opinnäytetyöhön sopivien näytteiden tarpeesta hyvissä ajoin, jotta näytteitä ehtisi kertyä riittävästi ennen kokeellisen osan alkua. Fimlab laboratoriot Oy:n (2015a) ohjeistuksen mukaan näyte vasta-aineseulontaa varten säilyy jääkaappilämpötilassa viisi vuorokautta (Fimlab laboratoriot Oy 2015a, 1). Joulukuuhun 2016 mennessä näytteitä oli kerätty 16 kappaletta, joista osa oli eri ajankohtana otettu näyte jo aikaisemmin näytemateriaalissa edustettuna olevasta potilaasta. Opinnäytetyötä varten kerätyt näytteet säilytettiin pakastimessa jonka lämpötila oli -20°C. Kokeellisen jakson aikana saapunut opinnäytetyöhön sisällytetty näyte (N17) oli alle viisi vuorokautta vanha ja sitä säilytettiin normaalin protokollan mukaan primaariputkessaan huoneenlämmössä ja myöhemmin jääkaappilämpötilassa.

Pakastetut näytteet sulatettiin Toivarin (2016) ohjeistuksen mukaan huoneenlämmössä ja putkia silloin tällöin kääntelemällä. Sulatuksen jälkeen näytteet sekoitettiin vielä hyvin putkia kääntelemällä. Koska geelikortilla tehtävä antiglobuliinitesti perustuu agglutinoituneiden punasolujen muodostamiin aggregaatteihin, epäspesifien reaktioiden välttämiseksi työskentelyssä käytettiin vain näytteitä, joissa ei ollut partikkeleita tai aggregaatteja. Jos näytteessä havaittiin saostumia, ne pyrittiin poistamaan sentrifugoinnin avulla. Opinnäytetyössä sulatetut näytteet arvioitiin silmämääräisesti ja vain sulatuksen

ja mahdollisen sentrifugoinnin jälkeen kirkkaita näytteitä käytettiin rBGA-inhiboinnin avulla suoritettavaan vasta-aineiden tunnistukseen. Opinnäytetyötä varten kerättyjen näytteiden tietoja sekä havainnot vasta-aineiden aktiivisuudesta ja huomiot käyttöasteesta on esitetty taulukossa 5. Opinnäytetyön kokeellista osaa varten kerättyjen näytteiden vasta-aineiden aktiivisuus tarkastettiin ennen käyttöä epäsuoralla antiglobuliinitestillä käyttäen natiivinäytettä että Imusyn rBGA-käsiteltyä näytettä. Useiden näytteiden tulokset eivät olleet yhdenmukaisia tuoreella näytteellä suoritettuihin tutkimuksiin verrattuna. Joidenkin näytteiden vasta-aineiden reaktiot olivat joko ristiriitaisia, puutteellisia, heikentyneitä tai ne olivat kokonaan reagoimattomia. Vain varmasti alkuperäisen vasta-aineaktiivisuutensa säilyttäneitä näytteitä käytettiin opinnäytetyössä.

TAULUKKO 5. Opinnäytetyötä varten kerättyjen näytteiden tiedot

Näyte	Näytteenottopvm	Aikaisemmin tunnistetut vasta-aineet	Vasta-aineaktiivisuus sulatuksen jälkeen	Huomio
N1	8.9.2016	anti-D -suojaus, anti-Fy(a)	epäselvä	ei käytetty
N2	20.9.2016	anti-Fy(a)	aktiivinen	
N3	4.10.2016	anti-Ch	ei aktiivinen	ei käytetty
N4	11.10.2016	anti-E, anti-Fy(a)	anti-E heikentynyt	ei käytetty
N5	12.10.2016	tunnistamaton vasta-aine, anti-Fy(a)	tunnistamaton vasta-aine ei aktiivinen	ei käytetty
N6	22.10.2016	anti-E, anti-Fy(a)	anti-Fy(a) heikentynyt	ei käytetty
N7	18.10.2016	anti-Fy(a)	aktiivinen	
N8	25.10.2016	anti-Fy(a)	–	ei käytetty
N9	23.10.2016	anti-E, anti-Fy(a)	anti-E heikentynyt	
N10	25.10.2016	tunnistamaton vasta-aine, anti-Fy(a)	–	ei käytetty
N11	3.11.2016	anti-Ch	–	ei käytetty
N12	15.11.2016	anti-Ch	aktiivinen	
N13	10.11.2016	anti-Ch	aktiivinen	
N14	21.11.2016	panagglutiniini, anti-E, anti-Fy(a)	–	panaggl., ei käytetty
N15	18.11.2016	anti-Ch	–	ei käytetty
N16	10.12.2016	anti-Fy(a)	aktiivinen	
N17	21.12.2016	anti-D, anti-LW(a)	aktiivinen	

Opinnäytetyön kokeellisessa osassa tehtiin vasta-aineseulontaa ja vasta-aineiden tunnistusta käyttäen Imusyn rBGA-tuotteita ja epäsuoraa antiglobuliinitestä (IAT). Menetelmän käytössä seurattiin Toivarin (2015) koestusraportissa (liite 1) esitettyä suoritusohjetta. Suoritusohjeen soveltuvuutta rutiiniin työskentelyyn arvioitiin ja muokattiin ilmenneiden tarpeiden mukaan siten, että prosessi on helposti ymmärrettävä ja ohje pysyy minimoimaan työskentelyssä tapahtuvien virheiden mahdollisuuden. Menetelmän suoritusohje kaikkine työvaiheineen oli tärkein osa laadittavan työohjeen kokonaisuutta. Kokeellisen osan aikana pyrittiin lisäksi tietoisesti koestamaan virhelähteitä rBGA-menetelmän käytössä, jotta niiden vaikutusta käytännön työskentelyssä voitiin arvioida. Koestettaviksi virhelähteiksi valittiin reaktioseoksen puutteellinen sekoitus sekä liian lyhyt inkubointiaika.

Vasta-aineiden tunnistus tehtiin käyttämällä EDTA-säilöntäaineelliseen putkeen otetusta kokoverestä sentrifugoimalla erotettua plasmaa. Plasma oli erotettu näytteestä sentrifugoimalla Stat spin Express 3 -sentrifuugilla kolmen minuutin ajan 7200rpm kierrosnopeudella, joka vastaa pyörimisvoimaa 4400 x g. RBGA-inhiboitua plasmaa sekä negatiivista kontrollia varten yksilöitiin kaksi 1,5ml eppendorf-putkea. Eppendorf-putkiin pipetoitiin näyteplasmaa 25µl suunniteltua seulontasolua kohden. Toiseen eppendorf-putkeen lisättiin valikoitua spesifiä Imusyn rBGA -reagenssia 2µl suunniteltua seulontasolua kohden. Jokaisesta näytteestä tehtiin rBGA-inhiboinnin rinnalla valmistajan ohjeiden mukainen negatiivinen kontrolli.

Imusynin (2015) mukaan näyte on positiivinen inhiboitavan vasta-aineen suhteen jos inhiboidun näytteen reaktiot ovat negatiiviset negatiiviseen kontrolliin nähden. Näyte tulkitaan negatiiviseksi inhiboitavan vasta-aineen suhteen, jos inhiboidun näytteen reaktiot eivät ole vaimentuneet negatiiviseen kontrolliin nähden. Jos vaimentumista nähdään edes jonkin verran negatiiviseen kontrolliin verrattuna, voidaan näytteessä ajatella olevan inhiboinnin kohteena oleva vasta-aine, jolla on joko korkea titteri tai aviditeetti. Tällaisissa tapauksissa Imusyn ohjeistaa joko lisäämään rBGA-antigeenin määrää tai laimentamaan näytettä. Jos negatiivinen kontrolli ei agglutinoidu lainkaan, inhiboidun plasman tulosta ei tule käyttää. Negatiivinen kontrolli tehdään lisäämällä näytteeseen Imusyn rBGA -reagenssin sijaan yhtäläinen tilavuus 0,9% NaCl-liuosta. (Imusyn 2015a.)

Negatiivista kontrollia varten toiseen putkeen lisättiin Imusyn-reagenssin sijaan sama tilavuus 0,9% NaCl-liuosta eli 2 μ l suunniteltua seulontasolua kohden. Tarvittaessa käytettiin toisen työpisteen manuaalista pipettiä verikeskustyoäskentelylle epätyypillisten tilavuuksien pipetointiin. Imusyn (2015a) korostaa käyttöohjeissaan sekoituksen tärkeyttä, sillä huonon sekoituksen seurauksena voidaan saada vääriä negatiivisia tuloksia (Imusyn 2015a, 2). Eppendorf-putkia vorteksoidtiin noin viiden sekunnin ajan Verikeskuksen solupaneelityöpisteessä. Pipetoidut ja vorteksoidut näytteet sentrifugoidaan nopeasti, jotta kaikki neste saataisiin putken reunoilta putken alaosaan (Imusyn 2015a, 1). Putkia sentrifugoitiin nopeasti laboratorion kaasukromatografiatyöpisteessä Eppendorf Centrifuge 5418 –laitteella noin viisi sekuntia pyörimisvoiman saavutettua 8000 x g / 8000 rcf, joka vastaa tämän laitteen roottorin 7,7cm säteellä kierrosnopeutta 9640rpm. Tämän jälkeen putkia inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä (19–25°C).

Vasta-aineiden tunnistusta jatkettiin vasta-aineiden mukaan tekemällä näytteistä neljän solun rutiiniseulonta (ID-DiaCell I-II-III-SF) sekä tarvittaessa lisäksi joko yhdentoista solun paneeli (ID-DiaPanel) tai Prophylax-paneeli (ID-DiaScreen Prophylax). Reaktiot saatiin normaalin seulonta- ja tunnistusprotokollan mukaan ID-Card LISS/Coombs-geelipartikkelimatriksikorttien avulla käyttäen ID-Pipetor EP-5 –pipettiä, ID-Incubator 37 S I –inkubaattoria (15min inkubointi, 37°C \pm 2°C) sekä ID-Centrifuge 12 S II –sentrifuugia (10 min \pm 15s, 1000 \pm 15 kierrosta/min). Sekä Anti-LW(a):ta että anti-D:tä sisältävästä näytteestä tehtiin neljän solun seulonnan ja yhdentoista solun paneelin lisäksi vastaavat paneelit entsyymikäsitellyillä soluilla (ID-DiaCell IP-IIP-IIIP ja ID-DiaPanel-P) sekä ID-Card Nacl, Enzyme Test and Cold Agglutinins –korteilla edellä mainittuja työskentelytapoja ja laitteita käyttäen.

Kokeellisen osan jälkeen laadittiin teorian tiedon sekä kokeellisen työskentelyn pohjalta työohje, johon sisällytettiin oleellimmat seikat rekombinanteista veriryhmäantigeenista, Imusyn rBGA -menetelmästä ja sen käytöstä. Työohjeen sisällön rakenne ja sen ulkoasu oli ennalta määrätty, sillä sen tuli olla johdonmukainen Fimlab laboratoriot Oy:n muiden työohjeiden kanssa. Työohjetta varten kirjoitettu teksti ladottiin valmiiseen työohjepohjaan. Ensimmäinen versio työohjeesta annettiin Fimlab laboratoriot Oy:n Verikeskuksen henkilökunnan arvioitavaksi ja kommentoitavaksi, jonka jälkeen palaute käytiin läpi ja arvioitiin mahdollisten muutosten tarve sekä laadittiin ja hyväksyttiin lopullinen työohje.

8 TULOKSET

Rekombinantteja veriryhmäantigeeneja käyttäessä täytyy ottaa huomioon monia asioita kaikissa prosessin vaiheissa. Imusyn rBGA -reagenssien käyttäminen alkaa kuitenkin aina tarpeen arvioinnista. Jos vasta-aineen tunnistus ei ole seulonnan, lisäpaneelien, lisäsolujen sekä mahdollisten käsittelyjen jälkeen yksiselitteinen, voidaan harkita kohdennettua yhden vasta-aineen hiljentämistä Imusyn rBGA -antigeeneillä. Käyttötarve voidaan huomata myös suoraan esimerkiksi referenssilaboratoriossa aikaisemmin tunnistetuista vasta-aineista, jolloin tiedetään näytteessä suurella todennäköisyydellä oleva tutkimuksia häiritsevä vasta-aine.

8.1 Menetelmän käytettävyys ja erityispiirteet

Ennen inhiboinnin suoritusta on hyvä miettiä näytteen todennäköisiä vasta-aineita, mikä ohjaa käyttämään tunnistuksessa sopivia solupaneeleja tai niiden yhdistelmiä ja auttaa ennalta suunnittelemaan inhiboitavan plasman määrää. On esimerkiksi hyvä huomata, että jos potilaan näytteessä on aikaisemmin todettu pelkästään anti-Ch -vasta-aine eikä ole syytä olettaa että näytteestä löytyy sen lisäksi jokin muu vasta-aine, vasta-aineen tunnistukseen todennäköisesti riittää neljän solun seulontapaneeli. Jos anti-Ch on näytteen ainoa vasta-aine, Imusyn Ch(a) -reagenssilla käsiteltynä neljän solun seulonta on negatiivinen eikä lisäpaneeleita tarvita.

Varsinainen inhibointiprosessi aloitetaan yksilöimällä 1,5ml eppendorf-putket tunnistettavalla tavalla. Putkien pienen koon vuoksi yksilöinti tulee tehdä käyttämällä näytteen tai potilaan tiedoista johdettua lyhennettä tai muuta luotettavaa merkintätapaa. Putkelle voisi halutessaan tulostaa myös potilastarran. Putket tulee joka tapauksessa yksilöidä virheiden välttämiseksi niin, että näyte on varmasti yhdistettävissä oikeaan potilaaseen tai näytteeseen. Nykyisessä suoritushjeessa ei käyttöohjeen vastaisesti ohjeisteta tekemään rBGA-inhiboidulle näytteelle negatiivista kontrollia, joka kuitenkin laimennusvaikutuksen mahdollisuuden vuoksi suositellaan tehtäväksi uudessa työohjeessa. Negatiiviselle kontrollille tarvitaan toinen yksilöity 1,5ml eppendorf-putki. Näyteplasma laimentuu inhibointiprosessin seurauksena suhteessa 1:12,5. Laimeneminen ei vaikuttanut tämän opinnäytetyön aikana tehtyjen tutkimusten tuloksiin.

Työskentelyn aikana ilmeni tarve sisällyttää tehtävään näyteseokseen pipetointivara. Pipetointivaran puuttuessa näyte loppuu herkästi kesken esimerkiksi työn suorittajan pipetointitavasta johtuen. Pipettien pipetoima pieni näyteylimäärä saattaa myös aiheuttaa ongelmia näytteen riittävydessä jokaiseen suunniteltuun soluun. Ongelma voidaan ratkaista kirjaamalla työohjeeseen pipetointivaran huomioonottaminen. Työskentelyn aikana riittäväksi pipetointivaraksi todettiin yhtä reagenssipaneelisolua vastaava määrä plasmaa sekä Imusyn rBGA -reagenssia eli 25 μ l näyteplasmaa ja 2 μ l käytettävää Imusyn rBGA:ta. Tällainen pipetointivara myös mahdollistaa tarkasti pipetoituna yhden lisäsolun tekemisen, jos se on jostakin syystä jäänyt liuosta valmistettaessa huomioimatta tai pipetointi jostain syystä epäonnistuu. Pipetointivaran huomioiminen on myös yksinkertainen ja helppo toteuttaa käytännössä, koska tilavuutena käytetään samoja liuoksen ”yksikköjä” kuin muutenkin.

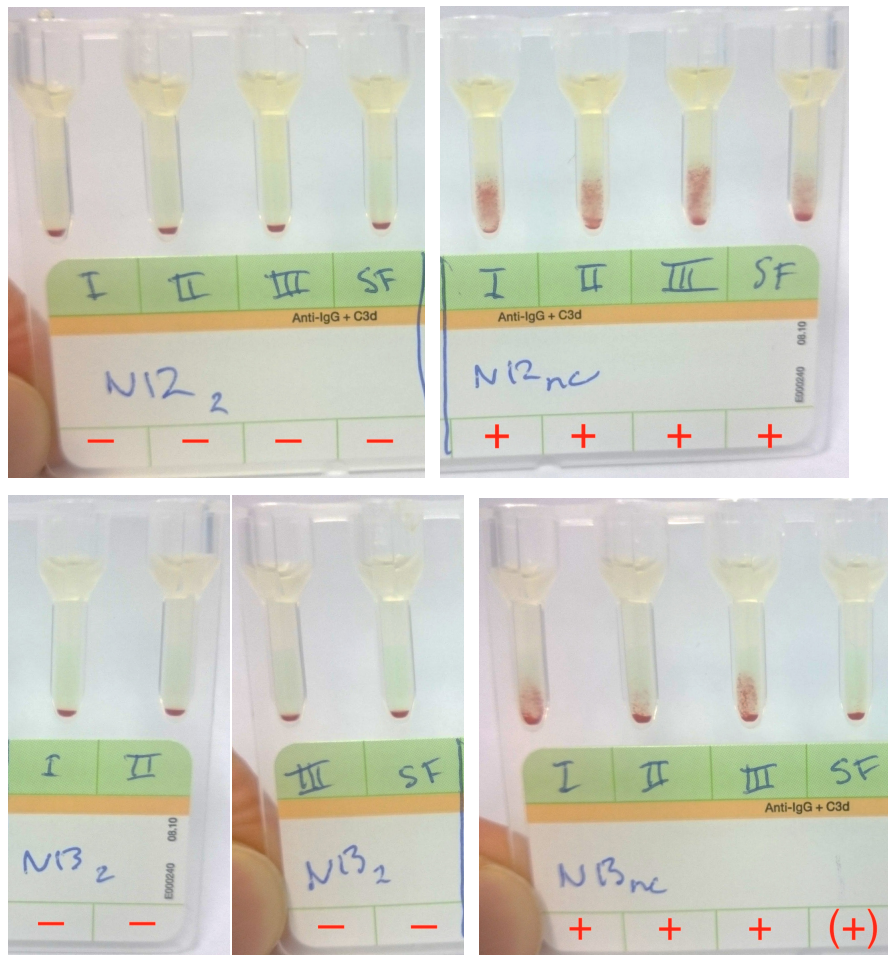
Pipetoitujen näytteiden ja rBGA-antigeenin tai NaCl-liuoksen sekoittuminen varmistetaan vorteksoimalla putkia viiden sekunnin ajan. Sekoituksen jälkeen putkia sentrifugoidaan viisi sekuntia pyörimisvoiman saavutettua 8000 x g. Koska käytettävä sentrifuugi (kaasukromatografiatyöpisteessä) on pöytämallinen, välikannellinen ja ajastettava, lyhyen sentrifugoinnin suorittaminen saattaa aiheuttaa epäselvyyksiä. Työohjeesta olisi hyvä käydä selvästi ilmi sentrifugointivaiheen tarkoitus, jotta sentrifuugin käytön voisi työskentelyssä suhteuttaa tavoiteltavaan vaikutukseen. Työohjeessa voitaisiin myös esittää sentrifuugin käyttöön liittyviä lisäohjeita liittyen esimerkiksi sentrifuugin ajastimen käytön tarpeettomuuteen ja siihen, että sentrifuugi tulee pysäyttää manuaalisesti viiden sekunnin sentrifugoinnin jälkeen. Käytännöllisintä olisi käyttää Verkikeskukseen sijoitettavaa pienempää ja yksinkertaisempaa pöytäseentrifugia, joka olisi tarkoitettu pienten eppendorf-putkien erittäin lyhyttä sentrifugointia varten ja jossa olisi Imusynin ohjeistama 8000 x g pyörimisvoima.

Punasolupaneeleja käytettäessä hyödynnetään paneelisolujen mukana tulevia antigeenikarttoja. Kartat ovat lisätutkimuksia tehdessä jokseenkin epäkäytännöllisiä, sillä täysin luontevaa tilaa Imusyn rBGA -antigeenien avulla tehdyistä reaktioista ei ole. Testauksen aikana parhaaksi käytettävissä olevaksi tilaksi merkitä reaktiot on antigeenikartan leveä ”Remarks”-sarake paperin oikeassa reunassa (liite 2). Tehdyistä merkinnöistä käy ilmi, että näytteenä on käytetty Imusyn-reagenssilla inhiboitua plasmaa. Käytetty rBGA-antigeeni yksilöidään antigeenin REF-nimeä käyttäen. Esimerkiksi rBGA-inhiboidun N17-näytteen antigeenikarttaan merkittiin ”Remarks”-sarakeeseen ”Imusyn

LW(a)”. Tämän alla on eriteltynä reaktiot normaalista LISS/Coombs-korteilla tehdystä paneelista, entsyymikäsitellyillä soluilla tehdystä paneelista sekä negatiivisella kontrollilla tehdystä paneelista liitteen 2 mukaisesti.

8.2 Virhelähteet

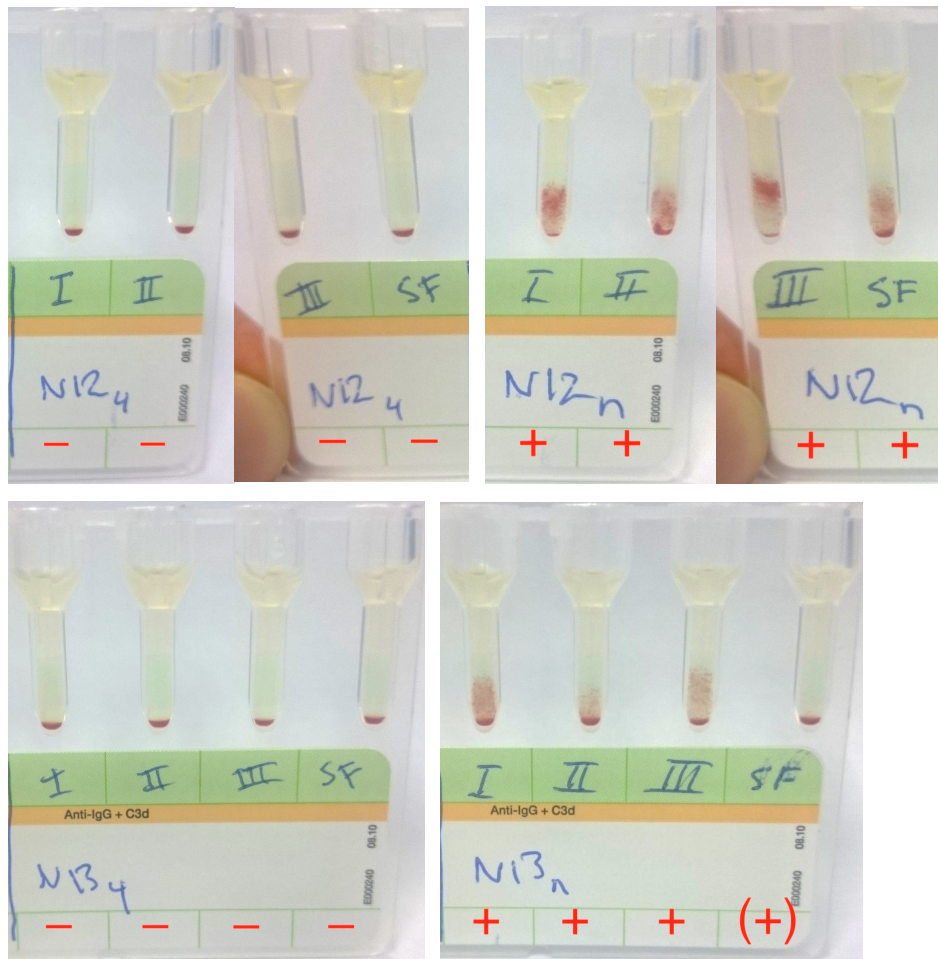
Viiden sekunnin pituinen vorteksointi on valmistajan ohjeiden mukainen ja se toteutettiin tässä opinnäytetyössä ilman apuvälineitä päässä laskien. Tämä todettiin riittäväksi. Virhelähteenä puutteellisen sekoituksen arviointi toteutettiin näytteillä N12 ja N13. Näytteiden vasta-aineet tunnistettiin jättämällä inhibointiprosessista vorteksointi tai muunlainen näyteputken sekoitus kokonaan pois. Imusyn rBGA Ch(a) –reagenssi pipetoitiin eppendorf-putken reunaan siten, että se ei sekoittunut näyteplasmaan. Tämän jälkeen edettiin suoraan suoritusohjeen viidenteen vaiheeseen eli putken spinnaukseen, jossa reagenssi tulee sentrifugoinnin johdosta kontaktiin näyteplasman kanssa. Tämän jälkeen näytettä käsiteltiin normaaliin tapaan. Molemmissa näytteissä oleva anti-Ch hiljeni täydellisesti (I-solu neg, II-solu neg, III-solu neg, SF-solu neg) verrattuna negatiivisiin kontrolleihin. Reaktiot on esitetty kuvassa 2. Vorteksoinnin poisjättämisellä ei täten ollut vaikutusta inhiboinnin onnistumiseen.



KUVA 2. Imusyn Ch(a) –reagenssilla käsitellyt, vorteksoimattomat anti-Ch –vasta-ainetta sisältävät N12 (N12₂) ja N13 (N13₂) sekä negatiiviset kontrollit (N12_{nc} ja N13_{nc}). Neljän solun seulonta. (Kuva: Teemu Syrjälä 2016)

Inkuboinnilla varmistetaan vasta-aineen täydellinen hiljentäminen. 30 minuutin inkuboinnin aikana Imusyn rBGA -antigeenien annetaan sitoutua spesifisesti hiljennyksen kohteena oleviin vasta-aineisiin muodostaen antigeeni-vasta-aine -komplekseja. Inkubointivaihe on yksinkertainen, sillä se voidaan tehdä normaalissa huoneenlämmössä (19–25°C) ajastimen tai sekuntikellon avulla. Vaillinaisen inkuboinnin vaikutusta tutkittaessa näytteitä N12 ja N13 ei inkuboitu ohjeiden vastaisesti lainkaan. Näytteet käsiteltiin Imusyn-reagenssilla ja niistä tehtiin negatiivinen kontrolli. Inhibointiprosessi suoritettiin ennen inkubointivaihetta normaalisti. Näytteiden nopean sentrifugoinnin jälkeen näytteet seisoivat huoneenlämmössä ainoastaan neljän solun seulonnan ID-DiaCell I-, II-, III- ja SF-solujen geelikortteihin pipetoinnin ajan. Tämän jälkeen reagenssilla käsitelty näyte ja negatiivinen kontrolli pipetoitiin geelikortteihin. Seulonta suoritettiin normaalin protokollan mukaan inkuboiden reaktioseoksia kortteissa ensin +37°C lämpö-

tilassa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin ID-Centrifuge 12 S II -sentrifuugilla 10 minuutin ajan (1000 kierrosta/min). 30 minuutin inkubaatioajan huomiotta jättäminen ei johtanut näillä näytteillä puutteelliseen vasta-aineiden hiljentymiseen. Vasta-aineen suhteen positiivisen tuloksen mukaisesti edes heikkoa reaktiota ei syntynyt minkään seulontasolun kanssa (I-solu neg, II-solu neg, III-solu neg, SF-solu neg), toisin kuin negatiivisissa kontrolleissa odotetusti. Reaktiot on esitetty kuvassa 3.



KUVA 3. Imusyn Ch(a) –reagenssilla käsitellyt, inkuboimattomat anti-Ch –vasta-ainetta sisältävät N12 (N12₄) ja N13 (N13₄) sekä negatiiviset kontrollit (N12_n ja N13_n). Neljän solun seulonta. (Kuva: Teemu Syrjälä 2016)

8.3 Imusyn rBGA –inhiboinnin työ- ja suoritusohje

Opinnäytetyössä tehtyjen havaintojen ja saatavilla olevan kirjallisuuden pohjalta laadittu työohje (liite 3) sisältää menetelmästä ja sen käytöstä oleelliset tiedot. Työohjeeseen kirjoitettiin tietoa menetelmästä, periaatteesta ja lääketieteellisestä taustasta, käy-

tettävissä olevista Imusyn-reagensseista, kontroleista, inhiboinnin suorituksesta, tulosten tulkinnasta sekä tulosten vastaamisesta.

Kokeellisen työskentelyn ja teoretiedon pohjalta laadittiin Imusyn rBGA -inhibointiin suoritusohje vaiheineen, joka sisällytettiin työohjeeseen (liite 3). Suoritusohjeen pohjana oli Toivarin (2015) koestusraportissa (liite 1) esitetty suoritusohje. Uudessa suoritusohjeessa on otettu huomioon työskentelyn aikana esiin nousseet kehittämistarpeet sekä laboratoriohenkilökunnan antama arviointi ja palaute työohjeesta. Työohjeen tärkeimpänä osana suoritusohje ja sen vaiheet päätettiin kuvata seuraavasti:

1. Yksilöi kaksi 1,5 ml eppendorf-putkea rBGA-inhibitiota ja rBGA-negatiivista kontrollia (NC) varten.
2. Pipetoi molempiin putkiin näyteplasmaa 25 μ l/suunniteltu seulontasolu.
3. Lisää inhibitioputkeen spesifiä Imusyn rBGA -antigeenireagenssia 2 μ l/suunniteltu seulontasolu.
4. Lisää rBGA-negatiiviseen kontrolliin 0,9% NaCl-liuosta 2 μ l/suunniteltu seulontasolu.
5. Vorteksoi suljettuja putkia 5 sekunnin ajan.
6. Spinnaa neste putkien pohjalle sentrifugoimalla putkia 8000 x g (8000 rcf) 5 sekunnin ajan (esim. kaasukromatografia-työpisteessä). Pysäytä sentrifuugi manuaalisesti 5 sekunnin jälkeen pyörimisvoiman saavutettua 8000 rcf.
7. Inkuboi putkia huoneenlämmössä (19-25°C) 30 minuuttia.
8. Jatka vasta-aineen tunnistusta suunnitellusti epäsuoralla antiglobuliinitestillä.

8.4 Johtopäätökset

Imusyn rBGA –näytteellä käsitelty plasma ei eroa fyysisiltä ominaisuuksiltaan normaalista plasmasta. Näytteen määrä on kuitenkin huomattavasti pienempi verrattuna näytteen pipetoimiseen suoraan primaariputkesta. Inhiboidun näytteen määrä on myös tarkkaan mitoitettu ennalta suunniteltuun työskentelyyn. Tämän vuoksi pipetoinnin tarkkuuteen ja inhiboidun näytteen hävikkiin on kiinnitettävä erityistä huomiota. Uutta näyteplasmaa voi tietenkin tarvittaessa käsitellä Imusyn rBGA -reagenssilla myöhemminkin, mikä ei kuitenkaan reagenssin kulutuksen eikä vasta-aineiden tunnistamisprosessiin kuluvan ajan ja käytetyn työajan kannalta ole optimaalista.

Näytteen käsittely Imusyn rBGA -reagenssilla on kokonaisuudessaan yksinkertaista ja riittävän informatiivisen työohjeen avulla myös menetelmän käytössä kokematon työntekijä pystyy suorittamaan rBGA-inhiboinnin oikeaoppisesti ja luotettavasti. Inhibointia on teknisesti vaikea saada epäonnistumaan. Työohjeen vastainen ja puutteellinen reaktioseoksen sekoitus tai liian lyhyt inkubointiaika ei näiden tulosten perusteella vaikuttanut inhiboinnin onnistumiseen. Näitä virheitä tulee kaikesta huolimatta luonnollisesti välttää. Huomiota on kiinnitettävä erityisesti työskentelyn suunnitteluun sekä pipetointiin ja siihen, että näytteeseen lisätään varmasti oikea ja tarkoituksenmukainen Imusyn rBGA -reagenssi. Myös selkeä ja jäljitettävä työskentelyn dokumentointi on olennainen osa tulosten luotettavuutta sekä myös potilasturvallisuutta.

9 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää rekombinanttien Imusyn rBGA -veriryhmäantigeenien käytön ominaisuuksia ja erityispiirteitä veriryhmävasta-aineiden tunnistamisessa sekä arvioida niiden avulla suoritettavaa inhibointimenetelmää ja sen suoritusta saatavilla olevien kirjallisten lähteiden ja käytännön työskentelyn avulla. Tavoitteena oli myös lisätä tietämystä rekombinanteista veriryhmäantigeneista. Opinnäytetyöllä oli ennalta määritellyt tutkimustehtävät, joihin saatiin vastaus.

Positiivisen geelikortilla tehtävän epäsuoran antiglobuliinitestin perustana on agglutinoituneiden punasolujen muodostamat aggregaatit, jotka ovat kooltaan liian suuria läpäisemään dekstraaniakryyliamidigeelipartikkelimatriksin sentrifugoinnin aikana. Vastaavasti negatiivinen tulos saadaan, kun agglutinoitumattomat punasolut mahtuvat painumaan geelikolumnin pohjaan partikkeleiden väleistä. (Harmening 2013, 220.) Imusyn rBGA –inhiboinnissa tulee käyttää vain näytteitä, joissa ei ole aggregaatteja tai muita partikkeleita (Imusyn 2015a, 2). Epäspesifien reaktioiden välttämiseksi työskentelyssä käytettiin vain näytteitä, joissa ei ollut partikkeleita tai aggregaatteja tai josta ne poistettiin sentrifugoimalla. Aggregaattien poistamisen merkitystä näytteen sisältämiin veriryhmävasta-aineisiin ei voitu ennustaa. Näytteiden kelpoisuutta voitiin kuitenkin arvioida vertaamalla sulatetulla näytteellä tehtyä vasta-ainetunnistusta tuoreilla näytteillä tehtyihin tutkimuksiin.

Vasta-aineiden pakastaminen ja sulattaminen saattaa aiheuttaa niiden inaktivoitumista. Vasta-aineiden kemiallisten ominaisuuksien muutokseen vaikuttaa sekä itse vasta-aineen rakenne sekä liuos, jossa vasta-aine on pakastettaessa. Vasta-aineiden mahdollinen epävakaumus ja inaktivoituminen voi näyttäytyä joko aggregoitumisena tai denaturoimisena. Muun muassa lämpötilanvaihtelut voivat aggregoida proteiineja. Jos vasta-aineet esimerkiksi fraktioituvat, ne denaturoituvat ja menettävät aktiivisuutensa. Vasta-aineiden aggregoituminen taas vähentää niiden aktiivisuutta. Vasta-aineet sietävät kuitenkin paremmin lämpötilanvaihteluita kuin muut proteiinit. (Wang ym. 2006, 8–20.) Oikeaoppisella sulatuksella pyritään välttämään herkkien analyyttien, kuten immunoassay-menetelmissä käytettävien antigeenien ja vasta-aineiden tuhoutumista (Hawker 2007, 2209).

Opinnäytetyössä käytettiin enintään kolmen kuukauden ajan pakastettuja EDTA-plasmanäytteitä. Joidenkin näytteiden vasta-aineiden aktiivisuus oli sulatuksen jälkeen joko merkittävästi vähentynyt tai kokonaan hävinnyt riippumatta siitä, oliko näyte sulatuksen jälkeen kirkas vai oliko siitä poistettu saostumia. Vasta-aineaktiivisuuden poikkeamat voitiin havaita odottamattomista ja ristiriitaisista negatiivisista reaktioista epäsuorassa antiglobuliinitestissä. Heikentymistä ilmeni niin anti-E:n, anti-D:n sekä anti-Fy(a):n kohdalla, mutta anti-Ch oli säilyttänyt jokaisessa tapauksessa aktiivisuutensa. Vasta-aineiden aktiivisuuden jokseenkin epäloogisen heikentymisen vuoksi heikentyneillä tai vasta-aineaktiivisuuden menettäneillä näytteillä tehtyjen tutkimusten tuloksia ei voitu sisällyttää opinnäytetyöhön eikä käyttää työskentelyn laadulliseen arviointiin, sillä rBGA-inhiboinnin käytännön suorituksen onnistumista ei voida luotettavasti varmistaa. Näytteet mahdollistivat kuitenkin rBGA-antigeeneilla suoritettavan inhiboinnin suorituksen ja tutkimusprosessin arvioimista kokonaisvaltaisesti.

Näytteiden määritettyä vasta-aineprofiilia sekä muita aikaisempia tutkimuksia voitiin tarkastella pakastettuihin primaarinäytteisiin liitettyjen henkilötietojen perusteella. Opinnäytetyötä varten näytteiden profiloinnin ja ominaisuuksien selvittämisen jälkeen näytteet numeroitiin juoksevilla näytenumeroilla (N1–N17) eikä henkilötietoja käsitelty opinnäytetyössä millään tavalla. Opinnäytetyötä varten potilaista ei otettu ylimääräisiä näytteitä, vaan näytemateriaali oli veriryhmäserologisista tutkimuksista yli jäänyttä eroteltua plasmaa.

Fimlab laboratoriot Oy:n Tampereen Verikeskuksen käytännön työskentelyssä vasta-aineet tunnistetaan poikkeuksetta tuoreesta tai jääkaapissa säilytetystä näytteestä ja siksi pakastuksen ja sulatuksen vaikutusta näytteen vasta-aineisiin ei arvioitu lainkaan. Virhelähteiden arvioinnissa vasta-aineiden odotetunlainen aktiivisuus oli olennaista, joten näihin määrittäisiin valittiin näytteet joiden vasta-aineaktiivisuus oli natiivinäytteen kaltainen (taulukko 5). Rekombinanttien veriryhmäantigeenien avulla on aikaisemmin tehty tutkimusta myös pitkään säilytetyillä vasta-aineaktiivisuudeltaan mahdollisesti heikentyneillä näytteillä ja testien herkkyys on tästä huolimatta pysynyt hyvin korkeana (Seltsam ym. 2008, 1153–1154).

Vasta-aineiden suhteen pakastamattoman näytteen kaltaisia sulatettuja näytteitä käytettiin erilaisten rBGA-inhiboinnin prosessin virhelähteiden arviointiin. Erilaisten virhelähteiden testausta suoritettiin ainoastaan anti-Ch -vasta-ainetta sisältävillä näytteillä

Imusyn rBGA Fy(a) –reagenssin loppumisen vuoksi. Tuoreen anti-D - ja anti-LW(a) - vasta-ainetta sisältävän näytteen myöhäinen saapuminen opinnäytetyön materiaaliksi esti sen laajemman käytön virhelähteiden testaamisessa. Hyvänä jatkotutkimusten aiheena voisikin olla virhelähteiden laajempi tutkiminen. Tutkimuksia voisi tehdä useammalla näytteellä, jotta saataisiin enemmän toistettavuutta sekä tutkimuksia myös vasta-aineominaisuuksiltaan erilaisilla näytteillä.

Valmistajan ohjeiden mukaan Imusyn rBGA -antigeenejä käytettäessä tulisi aina tehdä inhiboidun plasman rinnalla negatiivinen kontrolli (Imusyn 2015a, 1–2). Negatiivisen kontrollin avulla voitiin myös opinnäytetyössä todeta että näytteen vasta-aineet ovat säilyttäneet aktiivisuutensa pakastus-sulatus -syklin jälkeen. Samalla voitiin poissulkea menetelmässä tapahtuvan näytteen laimentumiseffektin seurauksena saatu heikentynyt reaktio. Käytännön työssä saattaa myös esimerkiksi työvuoronvaihdoksen johdosta ilmetä tilanteita, joissa plasman inhibointi ja inhiboidun plasman käyttö suoritetaan eri henkilön toimesta ja inhiboitu näyte odottaa analysointia pidempään kuin tavallisesti. Negatiivinen kontrolli osoittaisi myös tällaisissa tapauksissa inhiboidun plasman käytettävyyden säilymisen laimentumiseffektin poissulkemisen lisäksi. Inhiboitu plasma laimentuu melko vähän, suhteessa 1:12,5, jolloin yksinomaan näytteen laimenemisesta johtuva vasta-aineen hiljentyminen on epätodennäköistä, mutta vähintään teoreettisesti mahdollista. Koska laimennuseffekti on pieni ja sen vaikutus todennäköisesti olematon, negatiivisen kontrollin voisi helposti ajatella olevan tarpeeton. Jos inhiboinnin yhtenä tavoitteena on kuitenkin tunnistaa ja myös vastata inhiboinnin kohteena oleva vasta-aine, on erityisen tärkeää että tunnistus on tehty mahdollisimman luotettavasti valmistajan ohjeiden mukaan ottaen huomioon myös laimennusvaikutuksesta johtuvan hiljenty-misen poissulkeminen.

Opinnäytetyön osana käytettiin henkilökohtaisen työskentelyn lisäksi aidon käytännön rBGA-inhibition suorituksen prosessista tehtyjä havaintoja. Imusyn rBGA – reagensseilla toteutetun inhibointiprosessin arvioimisen luotettavuutta nostaa selvästi kokeellisen jakson lopussa saatu potilasnäyte N17, jossa potilastietojen perusteella tiedettiin todennäköisimmin olevan vasta-aineet anti-LW(a) sekä anti-D. Näytteen saapumisen aikaan työpisteellä oleva laboratoriohoitaja ei ollut vielä henkilökohtaisesti käyttänyt Imusyn-reagensseja vasta-aineiden tunnistamiseen. Tilanne antoi mahdollisuuden saada ensikäden tietoa käytettävästä Imusyn rBGA:n käyttöohjeesta, sen selkeydestä ja prosessin aikana ilmenneistä ongelmakohtista. Aktiivisen opastamisen sijaan päätettiin

antaa laboratoriohoitajan tehdä näytteen rBGA-inhibointi sekä sitä seuraava vasta-aineiden tunnistus täysin itsenäisesti. Laboratoriohoitajaa kehoitettiin tuomaan esiin työskentelyn aikana herääviä kysymyksiä ja epäselvyyksiä ja käymään vuoropuhelua kaikissa prosessin vaiheissa. Samalla esitettiin kysymyksiä ja mielipiteitä jo olemassa olevasta suoritusohjeesta. Saatua tietoa voitiin suoraan käyttää hyväksi työohjeen ja siihen sisältyvän suoritusohjeen laatimisessa.

Opinnäytetyöprosessi sujui pääosin suunnitellusti. Yksin opinnäytetyötä tehdessä työnjakoa ei tarvinnut miettiä ja opinnäytetyön aikataulutus oli täysin oman harkinnan ja päätöksenteon varassa, minkä koin hyväksi asiaksi. Aiheeseen ja teoreettiseen viitekehukseen tutustuminen oli erittäin mielenkiintoista. Työskentely Imusyn rBGA – reagenssien ja vasta-aineiden tunnistamisen parissa oli todella opettavaista ja koin sen tärkeäksi erityisesti ammatillisen kehittymisen kannalta. Erityisen palkitsevalta tuntui laatia Fimlab laboratoriot Oy:lle työohje, joka on koko opinnäyteprosessia hyödyntäen luotu selkeä ja konkreettinen tulos.

LÄHTEET

Armstrong, B., Wilkinson, R. & Smart, E. 2008. Combatibility testing. ISBT Science Series 3, 197–215. Blackwell Publishing Ltd.

Bio-Rad Laboratories, Inc. nda. LISS/Coombs. v.02.13 B004014. [pakkausseloste]. DiaMed GmbH. Tulostettu 4.10.2016.
<http://www.bio-rad.com/en-fi/product/lisscoombs>

Bio-Rad Laboratories, Inc. ndb. Test Cell Reagents for the ID-System. v.02.15 B004350. [pakkausseloste]. DiaMed GmbH. Tulostettu 4.10.2016.
<http://www.bio-rad.com/en-fi/product/id-diapanel>

Blaney, K. D. & Howard, P. R. 2008. Basic & applied concepts of immunohematology. 2. painos. St. Louis, MO: Mosby Elsevier.

Carter, J., Zhang, J., Dang, T-L., Hasegawa, H., Cheng, J. D., Gianan, I., O'Neill, J. W., Wolfson, M., Siu, S., Qu, S., Meininger, D., Kim, H., Delaney, J. & Mehlin, C. 2010. Fusion partners can increase the expression of recombinant interleukins via transient transfection in 2936E cells. *Protein Science* 19(2), 357–362.

Daniels, G. & Bromilow, I. 2014. Essential guide to blood groups. 3. painos. Chichester, West Sussex, U.K.: John Wiley & Sons Inc.

Daniels, G. 2015. Specification SPN214/3: The Clinical Significance of Blood Group Alloantibodies and the Supply of Blood for Transfusion. [määräys]. Tulostettu 18.10.2016.
<http://hospital.blood.co.uk/media/27446/spn2143-the-clinical-significance-of-blood-group-alloantibodies-and-the-supply-of-blood-for-transfusion.pdf>

Fimlab Laboratoriot Oy. 2015a. Veriryhmävasta-aineet, seulonta. v.1.5. [tutkimusohje]. Tulostettu 19.10.2016.
http://fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6218;id=13951

Fimlab Laboratoriot Oy. 2015b. Invoice. Imusyn GmbH & Co.KG.

Frilander, M. & Heino, T. (toim.) 2015. Proteiinisynteesin jälkeiset tapahtumat. Kehitysbiologia. Helsinki: Duodecim.

Harmening, D. M. 2012. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 6. painos. Philadelphia, PA: F. A. Davis Co.

Hawker, C.D. 2007. Development and Validation of an Automated Thawing and Mixing Workcell. *Clinical Chemistry* 53(12), 2209-2211.

Hedman, K. 2011. Immunologia: Kirja 2. Helsinki: Duodecim.

Hirsijärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. (15. uud. p.). Helsinki: Tammi.

Imusyn. 2015a. User manual rBGA. Hannover, Saksa: Imusyn GmbH & Co.KG

Imusyn. 2015b. Specification Sheet – LW(a). Hannover, Saksa: Imusyn GmbH & Co.KG

ISBT. International Society of Blood Transfusion. No date. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. [www-sivu]. Luettu 24.08.2016.
<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>

Johns, G. S. 2015. Clinical Laboratory Blood Banking and Transfusion Medicine: Principles and Practice. Boston: Pearson Education.

Knight, R. 2012. Transfusion and Transplantation Science. Oxford University Press.

Lee, S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D. & Redman, C. 1999. Proteolytic Processing of Big Endothelin-3 by the Kell Blood Group Protein. *Blood* 94(4), 1440–1540.

Milkins, C., Berryman, J., Cantwell, C., Elliott, C., Haggas, R., Jones, J., Rowley, M., Williams, M., Win, N. 2014. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Lontoo: British Committee for Standards in Haematology.

Miola, M. P., Cervo, S. V. B., Fachini, R. M. & Júnior, O. R. 2013. Do not confuse anti-LW autoantibodies with anti-D. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia* 35(3), 198.

Punainen Risti Veripalvelu. 2016. Verivalmisteiden käytön opas 2016. Helsinki: Libris Oy

Punainen Risti Veripalvelu. nd. Veriryhmätutkimukset. [www-sivu]. Luettu 17.12.2016.
<https://www.veripalvelu.fi/terveydenhuollon-ammattilaiset/laboratoriopalvelut/veriryhma>

Reid, M. E., Olsson, M. L. & Lomas-Francis, C. 2012. The blood group antigen facts-book. 3.painos. Lontoo: Elsevier/Academic Press.

Ridgwell, K., Dixey, J. & Scott, M. L. 2007. Production of soluble recombinant proteins with Kell, Duffy and Lutheran blood group antigen activity, and their use in screening human sera for Kell, Duffy and Lutheran antibodies. *Transfusion Medicine* 17, 384–394.

Russo, D.C., Lee, S., Reid, M. & Redman, C.M. 1994. Topology of Kell blood group protein and the expression of multiple antigens by transfected cells. *Blood* 84, 3518–3523.

Seltsam, A., Grüger, D. & Blasczyk, R. 2007. Prokaryotic versus eukaryotic recombinant Lutheran blood group protein for antibody identification. *Transfusion* 47, 1630–1636.

Seltsam, A., Agaylan, A., Grueger, D., Meyer, O., Blasczyk, R., Salama, A. 2008. Rapid detection of JMH antibodies with recombinant Sema7A (CD108) protein and the particle gel immunoassay. *Transfusion* 48, 1151–1155.

- Seltsam, A. 2011. Application of recombinant antigens to blood group diagnostics. An affiliated publication to *Vox Sanguinis*. ISBT Science Series 6 (S), 13–16.
- Seltsam, A., Wagner, F., Lambert, M., Bullock, T., Thornton, N., Scharberg, E. A., Grueger, D., Schneeweiss, C. & Blasczyk, R. 2014. Recombinant blood group proteins facilitate the detection of alloantibodies to high-prevalence antigens and reveal underlying antibodies: results of an international study. *Transfusion* 54, 1823–1830.
- Seltsam, A. & Blasczyk, R. 2016. Recombinant blood group proteins in clinical practice – from puzzling to binary antibody testing. An affiliated publication to *Vox Sanguinis*. ISBT Science Series 11 (S1), 243-249.
- Table of blood group antigens. v4.0 141124. n.d. [Taulukko]. Tulostettu 17.4.2016. http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20antigens%20within%20systems%20v4.0%20141124.pdf
- Toivari, E. 2015. Koestusraportti. Fimlab Laboratoriot Oy Hematologia/Verikeskus.
- Toivari, E. 2016. Henkilökohtainen tiedonanto. 16.12.2016.
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., Nema, S. 2007. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 1–26.
- Waśniowska, K., Czerwiński, M., Jachymek, W. & Lisowska, E. 2000. Expression and Binding Properties of a Soluble Chimeric Protein Containing the N-Terminal Domain of the Duffy Antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273, 705–711.
- Yazdanbakhsh, K. 2007. Applications of blood group antigen expression systems for antibody detection and identification. *Transfusion* 47 (S), 85–88.
- Zhu, Jianwei. 2011. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances* 30, 1158–1170.

LIITTEET

Liite 1. Koestusraportti (Toivari 2015)

1(4)

Fimlab Laboratoriot Oy
Hematologia/Verikeskus

4.12.2015

E. Toivari

1(4)

KOESTUSRAPORTTI:

Imusyn rekombinantiveriryhmäantigeenejä (*rBGA - recombinant blood group antigens*) käytetään inhiboimaan vasta-aineneista aiheutuneita reaktioita. Tällä tavalla voidaan helpottaa veriryhmävasta-aineen tunnistamista ja pienentää sopimattoman verituotteen valinnan riskiä.

Veriryhmävasta-aineen tunnistus on joskus hankalaa, jopa mahdotonta. Tällaisia tilanteita ilmenee:

- potilailla, joilla esiintyy useita veriryhmävasta-aineita,
- potilailla, joilla esiintyy autovasta-aineita,
- potilailla, joilla esiintyy vasta-aineita yleisimpiä punasoluantigeeneja (*high frequency erythrocytic antigens*) vastaan.

Toimintaperiaate

Potilaan plasmaa, jonka veriryhmävasta-aine(et) ovat hankalasti tunnistettavissa, inkuboidaan *Imusyn* rBGA kanssa ennen veriryhmävasta-aineiden tunnistuksen jatkamista. Inkuboinnin jälkeen tunnistusproseduuri toistetaan tarvittaessa kokonaisuudessaan.

Säilytys – säilyvyys

Imusyn rBGA säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2...+8°C). Kunkin antigeenipullon kyljessä on määriteltyä tuotteen säilyvyys. Tampereelle tulleiden antigeenipullojen säilyvyys vaihtelee 2 kk...6 kk.

Tampereelle tilatut antigeenit

Ch(a)	C4B*3 Chido
CR1	Kn(a) Knops
Fy(a)	Fy(a) Duffy
Fy(b)	Fy(b) Duffy
JMH	JMH JMH
Rg(a)	C4A*3 Rogers
LW(a)	LW(a) Landsteiner-Wiener(a)

Käyttö

Mikäli vasta-aineen tunnistus ei ole seulonnan (4 solua) ja lisäpaneelin (11 solua) sekä mahdollisen entsyymikäsittelyn ja lisäsolujen jälkeen yksiselitteinen, voidaan harkita kohdennetusti yksittäisen vasta-aineen hiljentämistä *Imusyn* rBGA antigeenillä. Kutakin seulontasolua varten tarvitaan 25 µl näyteplasmaa, joka on inkuboitu *Imusyn* rBGA kanssa.

1. Yksilöi 1,5 ml eppendorf-putki.
2. Pipetoi eppendorf-putkeen näyteplasmaa 25 µl / suunniteltu seulontasolu.
3. Lisää putkeen spesifiä *Imusyn* rBGA –antigeeniä 2 µl / suunniteltu seulontasolu.
4. Vorteksioi putkea 5 sekunnin ajan (esim. kaasukromatografia-työpisteessä).
5. Fuugaa putkea 8000 x g (eli 8000 rcf), 5 sekuntia (esim. kaasukromatografia-työpisteessä).
6. Inkuboi putkea 30 minuuttia huoneenlämmössä (+19...25°C).
7. Jatka vasta-aineen tunnistusta käyttämällä potilaan plasmaa, josta on spesifi vasta-aine hiljennetty.

Fimlab Laboratoriot Oy
Hematologia/Verikeskus

4.12.2015

E. Toivari

2(4)

Koestus 3.12.2015

Koestajat: Maarit Lehtonen, Tiina Ceder ja Eeva Toivari

Koestukseen valittiin näytteiksi

- Diamed Basic QC 2 (Group B Rhd positive, CcEe, K negative, containing anti-A and anti-Fya)
- Potilasnäyte (-668086), jossa 30.11.2015 tunnistettu anti-Fya ja anti-E

Rh-yr	Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	Rh-yr														Special specific type	Result / Resulto / Resultado			Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observaciones													
		D	C	E	c	e	C	k	K	ky	Ky	Js	Js	By	Fy		Jk	Jk	Le		Le	M	N	S	s	Lur	Lur	Xg	Lab / Labs	Enzyme	RT		
1	CCC ^W D.ee R ₁ ^W R ₂ 445391	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	1	#	-	
2	CCD.ee R ₁ R ₂ 190930	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-	
3	ccD.EE R ₂ R ₂ 494364	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	3	#	##		
4	Ccdee r ₁ r ₂ 083608	0	+	0	0	+	+	0	0	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	4	-	-			
5	ccdeEe r ₁ r ₂ 003717	0	0	+	0	0	+	+	0	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	5	#	##			
6	ccdee rr 298488	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	6	#	-				
7	ccdee rr 402954	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	7	-	-				
8	ccD.ee R ₁ r ₂ 078044	+	+	0	0	+	+	0	0	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	Mt+*	8	-	-			
9	ccdee rr 563610	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	Bg(a+)	9	#	-				
10	ccdee rr 152352	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	10	-	-				
11	ccdee rr 501517	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	11	#	-				
	CCC ^W D.ee R ₁ ^W R ₂ 052055	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	12	-	-			
	ccD.EE R ₂ R ₂ 894932	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	13	#	##			
	ccdee rr 900978	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	14	#	-				
	CCC ^W D.ee R ₁ ^W R ₂ 645188	+	+	0	0	+	+	0	+	+	nt	nt	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	C+ / LW(b+)	15	#	-			
	ccdee rr 567829	0	0	0	+	0	0	+	+	nt	nt	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	U(b+)	SF		(+)	-		

Koestuksen eteneminen 3.12.2015

1. Yksilöitiin kaksi 1,5 ml eppendorf-putkea.
2. Pipetoitiin kumpaankin eppendorf-putkeen plasmaa 125 µl.
3. Lisättiin kumpaankin putkeen Imusyn rBGA –antigeeniä Fy(a) 10 µl.
4. Vorteksoitiin putkia noin 5 sekunnin ajan kaasukromatografia-työpisteessä.
5. Fuugattiin putkia 8000 x g (eli 8000 rcf), noin 5 sekuntia pyörimisvoiman saavutettua 8000 x g kaasukromatografia-työpisteessä.
6. Inkuboitiin putkea 30 minuuttia huoneenlämmössä (+19...25°C).
7. Seulottiin vasta-aineet BioRadin ID Cards LISS/Coombs -kortilla neljän solun paneelilla (I, II, III ja SF).

Koestuksen tulokset 3.12.2015

- Diamed Basic QC 2 (Sample 2) inkuboituna Fy(a):n kanssa tuotti odotetusti negatiivisen vasta-aineseulonnan (seulontasolut I, II, III ja SF).



- Potilasnäyte inkuboituna Fy(a):n kanssa tuotti odotetusti edelleen positiivisen vasta-aineseulonnan. Ennen anti-Fya:n hiljentämistä seulontasolut II ja III tuottivat positiivisen reaktion (2+). Kun näytettä inkuboitiin Fy(a):n kanssa, seulontasolu II tuotti odotetusti positiivisen reaktion, johtuen anti-E:stä. Seulontasolu III reaktio oli vaimeni, ollen heikko sulkuplus (+).

Koestuksen perusteella *Imusyn rBGA* –antigeneja voi käyttää hyväksi vasta-ainetunnistuksissa.

Koestus 7.1.2016 (Maarit Lehtonen) ja tulokset

1. Potilasnäytteellä vasta-ainetunnistuksessa epäily Chido (a), lähetetty SPR Veripalveluun
2. Pipetoitiin plasmaa 125 µl eppendorf-putkeen.
3. Pipetoitiin Imusyn rBGA-antigeenia Chido(a) 10 µl.
4. Vorteksoitiin putkea noin 5 sekuntia kaasukromatografia-työpisteessä.
5. Fuugattiin putkia 8000 x g (eli 8000 rcf), noin 5 sekuntia pyörimisvoiman saavutettua 8000 x g kaasukromatografia-työpisteessä.

Fimlab Laboratoriot Oy
Hematologia/Verikeskus

4.12.2015

E. Toivari

4(4)

6. Inkuboitiin putkea 30 minuuttia huoneenlämmössä (+19...25°C).
7. Seulottiin vasta-aineet BioRadin ID Cards LISS/Coombs -kortilla neljän solun paneelilla (I, II, III ja SF).
8. Ennen antigeenin lisäystä potilaspasman neljän solun seulonnan tulokset olivat:
 - I solu +
 - II solu +
 - III solu ++
 - SF solu (+)
9. Imusyn rBGA-antigeenin Chido(a) lisäyksen jälkeen seulontatulokset olivat:
 - I solu neg
 - II solu neg
 - III solu neg
 - SF solu neg

Koestuksen perusteella *Imusyn rBGA* –antigeeneja voi käyttää hyväksi vasta-ainetunnistuksissa.

Liite 2. rBGA-inhibidun näytteen N17 antigeenikartta merkintöineen.

BIO-RAD

Set ID-DiaPanel: 45161.98.x (Japan: 4516.98.x.x)
 Set ID-DiaPanel P: 45171.98.x (Japan: 4517.98.x.x)

Antigen-Table / Tableau d'antigènes / Tabla de antígenos / Tabla de antígenos / Anticorpo-identifizierung / Antibody identification / Identificación de anticorpos / Identificação do anticorpo

2017.01.30 (Japan: 30.01.17)
 V.I.P. Software: P86

ID-DiaPanel
ID-DiaPanel-P

06174.98.x - 06274.98.x (Japan: 0617.98.x.x - 0627.98.x.x)
 05361.98.x - 05461.98.x (Japan: 0536.98.x.x - 0546.98.x.x)

LOT: 2017.01.30

Spender / Donor / Donneur / Donante / Dador	Rh-ir		Kell		Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS	Luth.	Xg	Spec. Antigene / Special types / Antígenos path. / Antígenos patológicos / Outros Antígenos / Tipos especiais	RT	Bemerkungen / Remarques / Note	
	D	C	E	C ^w	K ^a	K ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Ph				
1 CCCWD.ee R ₁ WR ₁ 132646	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
2 CCD.ee R ₁ R ₁ 117001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
3 ccD.EE R ₂ R ₂ 313085	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
4 Ccddee r'r 453488	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
5 ccdEee r'r 568595	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
6 ccddee rr 507852	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
7 ccddee rr 492575	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
8 ccD.ee R ₀ r 928390	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
9 ccddee rr 199252	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
10 ccddee rr 697309	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
11 ccddee rr 335745	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
I CCCWD.ee R ₁ WR ₁ 468769	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
II ccD.EE R ₂ R ₂ 455716	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
III ccddee rr 194971	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
SF CcCxD.ee R ₁ xr 449881	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
ccddee rr 567829	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Patient / Patient / Paciente / Paciente / Paciente															

Ammerkungen siehe rückseitig / Remarques see overleaf / Voir les remarques au verso / Per la nota consultare il retro / Ver observações no verso

RT = huoneenlämpö

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome

Liimaa lomakkeelle aina sekä yleistarra että potilastarra!

Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigen / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo sanguíneo + antígenos

A RhD neg

Interpretation / Interpretation / Interpretation / Interpretation / Interpretation

ant-D, ant-LW(a)

Sinertävä D-neg, LW(a)-neg, C-neg, E-neg verä

Date / Date / Fecha / Data

21.12.2016 / B98

22.12.2016 / B98



LABORATORIOT OY

VERIRYHMÄVASTA-AINEET, TUNNISTUS, IMUSYN
 Versio: 1.0, Luonnos
 Käyttöönottopäivä: 06.03.2017

1/(3)

VERIRYHMÄVASTA-AINEET, TUNNISTUS, IMUSYN

Luokitus:	Verikeskus: Vasta-aineiden tunnistus
Versio:	1.0
Tila:	Luonnos
Laatija:	Teemu Syrjälä, Eeva Toivari
Laatimispvm:	06.03.2017
Hyväksyjä:	-
Hyväksymispvm:	-
Ohje käytössä:	Pirkanmaa: Tampereen keskuslaboratorio
Käyttöönottopvm:	06.03.2017

Atk-numero	Lyhenne	Tekopaikka	Kommentti
2955	P -VRAbTu1	Suomen Punainen Risti Veripalvelu	

Menetelmä

rBGA-inhibitio Imusyn rBGA-veriryhmäantigeeneilla.

Periaate/Lääketieteellinen tausta

Veriryhmävasta-aineiden tunnistus voi olla hankalaa tai mahdotonta tilanteissa, joissa

- näyte sisältää useita veriryhmävasta-aineita,
- näyte sisältää autovasta-aineita tai
- näyte sisältää vasta-aineita yleisiä punasoluantigeeneja vastaan.

Vasta-ainespesifejä Imusyn rBGA -reagensseja voidaan käyttää inhiboimaan näytteessä tutkimuksia häiritsevä vasta-aine. Rekombinantit veriryhmäantigeenit (rBGA) sitoutuvat nonkompetitiivisesti ja spesifisti niitä vastaaviin vasta-aineisiin hiljentäen ne. Kyseisen vasta-aineen suhteen neutraloitua plasmaa voidaan käyttää epäsuorassa antiglobuliinitestissä ilman mitään muuta jatkokäsittelyä. Tällä tavoin sekä tutkimuksia häiritsevä vasta-aine että mahdolliset sen alle jääneet vasta-aineet voidaan tunnistaa.

Reagenssit

REF-nimi	Antigeeni	Veriryhmä
Ch(a)	C4B*3	Chido
CR1	Kn(a)	Knops
Fy(a)	Fy(a)	Duffy
Fy(b)	Fy(b)	Duffy
JMH	JMH	JMH
LW(a)	LW(a)	Landsteiner-Wiener, LW
Rg(a)	C4A*3	Rogers

- Imusyn rBGA, täydet reagenssipullot sisältävät 300 µl 0,5mg/ml rBGA-reagenssia
- 0,9% NaCl

Kontrollit

Imusyn-reagenssin suhteen negatiivinen rBGA-kontrolli (NC) tehdään poissulkemaan laimennosvaikutuksen aiheuttama reaktioiden vaimeneminen. Plasmaan lisätään Imusyn-reagenssin sijasta yhtäläinen tilavuus 0,9% NaCl-liuosta. Jos näyte on niukka, inhibointi voidaan tehdä ilman rBGA-negatiivista kontrollia.

Suoritus

Suunnittele ja laske ensin tarvittavien seulontasolujen määrä. Laske pipetointivaraa varten yksi ylimääräinen solu. Plasmaa tarvitaan 25µl ja Imusyn rBGA -reagenssia 2µl yhtä seulontasolua kohden.

Yleisimpiä pipetointitulavuuksia:

Suunnitellut solut	Näyte (µl)	Imusyn rBGA (µl)
4 solun seulonta + pipetointivara	125	10
4 solun seulonta + 11 solun paneeli + pipetointivara	400	32
4 solun seulonta + Prophylax-paneeli (6 solua) + pipetointivara	275	22

1. Yksilöi kaksi 1,5 ml eppendorf-putkea rBGA-inhibitiota ja rBGA-negatiivista kontrollia (NC) varten.
2. Pipetoi molempiin putkiin näyteplasmaa 25µl/suunniteltu seulontasolu.
3. Lisää inhibitioputkeen spesifiä Imusyn rBGA -antigeenireagenssia 2µl/suunniteltu seulontasolu.
4. Lisää rBGA-negatiiviseen kontrolliin 0,9% NaCl-liuosta 2µl/suunniteltu seulontasolu.
5. Vorteksoi suljettuja putkia 5 sekunnin ajan.
6. Spinnaa neste putkien pohjalle sentrifugoimalla putkia 8000 x g (8000 rcf) 5 sekunnin ajan (esim. kaasukromatografia-työpisteessä). Pysäytä sentrifuugi manuaalisesti 5 sekunnin jälkeen pyörimisvoiman saavutettua 8000 rcf.
7. Inkuboi putkia huoneenlämmössä (19-25°C) 30 minuuttia.
8. Jatka vasta-aineen tunnistusta suunnitellusti epäsuoralla antiglobuliinitestillä.

Tulkinta

Näyte on positiivinen neutraloitavan vasta-aineen suhteen, jos reaktiot ovat heikentyneet rBGA-negatiiviseen kontrolliin nähden.

Näyte on negatiivinen neutraloitavan vasta-aineen suhteen, jos reaktiot ovat samanhavuisia kuin rBGA-negatiivisessa kontrollissa.

Jos rBGA-negatiivinen kontrolli ei reagoi, tulosta ei voida käyttää vasta-aineiden tunnistamiseen tai poissulkemiseen.

Vastaaminen

Neutraloitu vasta-aine voidaan vastata rBGA-negatiiviseen kontrolliin nähden heikentyneiden reaktioiden perusteella.

Mahdolliset muut vasta-aineet vastataan normaaliin tapaan hyödyntäen Imusyn rBGA -reagenssilla käsitellyillä näytteillä tehtyjä tutkimuksia ja muita tutkimuksia.

Kuvassa näyte on käsitelty Imusyn LW(a) -reagenssilla ja siten tunnistettu anti-D sekä anti-LW(a) tekemällä neljän solun paneeli ja 11 solun paneeli sekä normaaleilla soluilla (LISS) että entsyymikäsitellyillä soluilla (Enz). Viimeisenä on rBGA-negatiivisella kontrollilla saadut reaktiot neljän

