



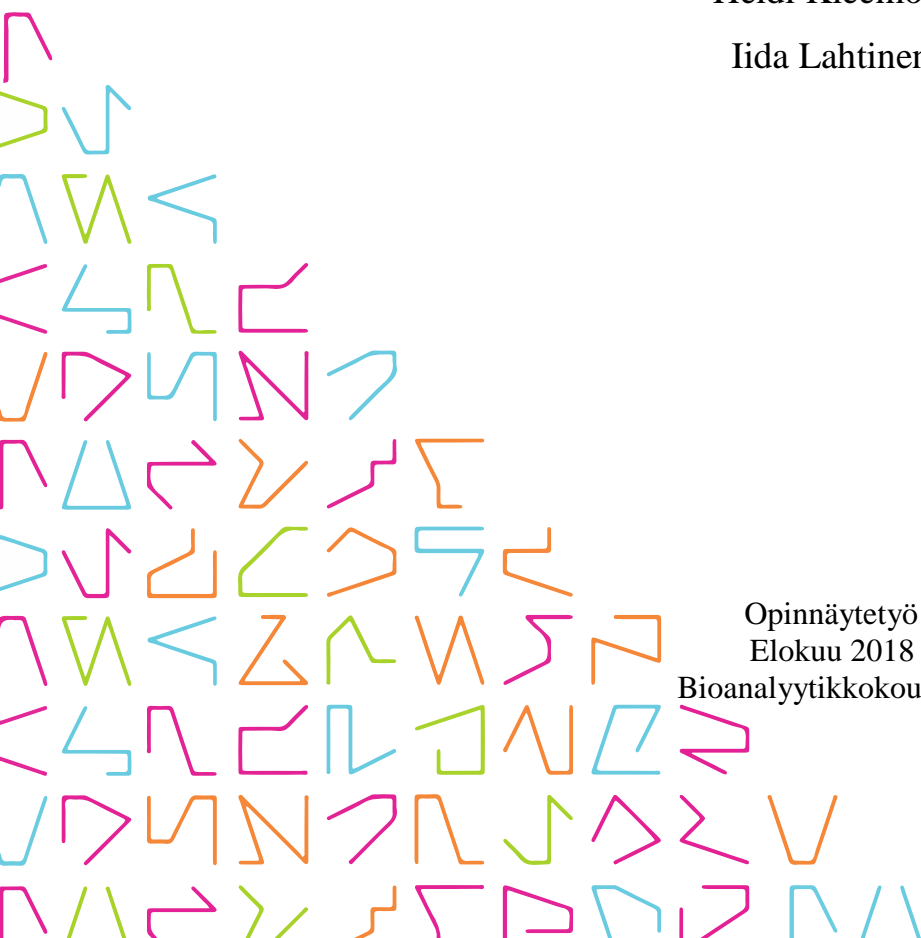
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KYLMÄVASTA-AINEIDEN TUTKIMUSMENETELMIEN VERTAILU VERIKESKUKSESSA

Heidi Kleemola

Iida Lahtinen

Opinnäytetyö
Elokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

KLEEMOLA HEIDI & LAHTINEN IIDA:

Kylmävasta-aineiden tutkimusmenetelmien vertailu verikeskuksessa

Opinnäytetyö 43 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Syyskuu 2018

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella eri geelikortteja, niiden käytettävyyttä ja eroavaisuuksia kylmävasta-aineita tutkittaessa. Kylmävasta-aineet ovat vasta-aineita, jotka reagoivat parhaiten ruumiinlämpöä viileämmissä lämpötiloissa. Ne ovat yleensä kliinisesti merkityksettömiä, mutta aiheuttavat hankaluuksia verensiirtoserologisissa tutkimuksissa. Ne voivat sekoittaa ABO-veriryhmämäärittystä, aiheuttaa positiivisia autokontrolleja ja peittää alleen toisia kliinisesti merkityksellisiä vasta-aineita. Vasta-aineiden seulontaan ja tunnistukseen käytetään Suomessa yleisimmin pylväsagglutinaatiomenetelmään perustuvia kaupallisia geelikortteja. Opinnäytetyön aiheena oli vertailla Bio-Rad:in LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- geelikorttien käytettävyyttä kylmävasta-aineiden tutkimisessa. Tarkoitus oli vertailla eroavatko näillä korteilla huoneenlämmössä saadut reaktiot ja reaktiovoimakkuudet toisistaan. Tarkoitus oli myös selvittää, eroavatko saadut reaktiot korttien välillä selvemmin antigeenin suhteen homo- tai heterosygoottisten testisolujen kanssa. Työn tavoitteena oli tarjota Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskukselle lisätietoa LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- geelikorttien käytettävyydestä kylmävasta-aineita tutkittaessa.

Teoreettisessa viitekehyksessä käsiteltiin veriryhmien ja vasta-aineiden taustaa, tarkemmin tarkasteltiin eri kylmävasta-aineet sekä vasta-aineiden tutkimiseen käytettävät menetelmät. Geelikorttien vertailu suoritettiin Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen verikeskuksen keräämästä materiaalista, joka sisälsi tunnistamiseen käytettyjä antigeenikarttoja, sekä automaattianalysaattorin tulosteita. Materiaalista poimittiin huoneenlämmössä LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korteilla saadut reaktiot ja koottiin rinnakkain taulukoihin. Korttien vertailu suoritettiin näiden taulukoiden avulla. Vertailussa LISS/Coombs-kortilla saatiin positiivisia reaktioita enemmän kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Korteilla saadut positiiviset reaktiot olivat myös voimakkuudeltaan vahvempia LISS/Coombs-kortilla. Systemaattisesti voimakkaampia reaktioita saatiin LISS/Coombs-kortilla erityisesti anti-M:n suhteen homotsygoottisilla testisoluilla.

Työstä saatujen tulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätös, että kylmävasta-aineet tulevat huoneenlämpötilassa herkemmin esiin LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tulosten perusteella erityisesti heikko anti-M tulee paremmin esiin LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan kylmävasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa suositella LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- kortteja käytettävän rinnakkain. Aihetta kannattaisi tulevaisuudessa tutkia laajemmalla aineistolla ja anti-M:n lisäksi muillakin kylmävasta-aineilla.

Asiasanat: kylmävasta-aineet, verikeskus, pylväsagglutinaatiomenetelmä, verensiirtoserologia

ABSTRACT

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

KLEEMOLA HEIDI & LAHTINEN IIDA:
Comparing Methods for Testing Cold-reactive Antibody in Hospital Blood Bank

Bachelor's thesis 43 pages, appendices 2 pages
September 2018

The aim of this study was to compare LISS/Coombs- and NaCl/Enzyme- gel cards when testing cold-reactive antibodies in room temperature. The most common method for testing antibodies is commercial gel cards that use column agglutination method. The purpose was to compare reactions of a test cell with two different gel cards and the strength of the reaction. The aim was also to examine whether the reactions differ when the test cell is homozygotic or heterozygotic towards anti-M. The purpose was to gather more information to Fimlab Laboratories Oy about testing cold-reactive antibodies in room temperature.

The data for this study were collected in the blood bank of Fimlab Laboratories Oy. The data included results of the tests conducted with two gel cards. The data consisted of the antigen profiles of the used test cells and prints from the results. Excel-tables were used to compare the results one test cell at a time. When comparing the two gel cards it was noticed that LISS/Coombs-cards had more positive reactions and stronger reactions than NaCl/Enzyme-cards. Especially test cells that were homozygotic towards anti-M gave stronger positive reactions with LISS/Coombs-gel card.

The findings of this study indicate that cold-reactive antibodies are more sensitively shown with LISS/Coombs- gel card than NaCl/Enzyme- gel card in room temperature. Especially weak anti-M can be better shown with LISS/Coombs- gel card. As a conclusion based on this study the recommendation is to use both gel cards side by side when testing cold-reactive antibodies. For future studies it would be beneficial to use larger material with more than one cold-reactive antibody.

Key words: cold-reactive antibodies, bloodbank, column agglutination method, blood group serology

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	VERIRYHMÄT JA VASTA-AINEET	8
	2.1 Veriryhmät ja punasoluantigeenit	8
	2.2 Vasta-aineet.....	11
	2.3 Kylmävasta-aineet.....	13
3	VERENSIIRTOSEROLOGISET TUTKIMUKSET	16
	3.1 Suora ja epäsuora antiglobuliinimenetelmä	17
	3.2 Vasta-aineiden seulonta ja tunnistus	18
	3.3 Automaatio verikeskuksessa	19
	3.4 Tutkimuksiin käytettävät geelikortit	20
4	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	25
5	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	26
6	OPINNÄYTETYÖPROSESSI JA TUTKIMUSNÄYTTEET.....	27
7	TUTKIMUKSEN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	31
	7.1 Seulontanäytteiden vertailu.....	31
	7.2 Tunnistuspaneelinäytteiden vertailu	33
	7.3 Tulokset.....	34
	7.4 Johtopäätökset.....	34
8	POHDINTA.....	36
	8.1 Tulosten arviointi	36
	8.2 Luotettavuus.....	37
	8.3 Eettisyys	38
	8.4 Jatkotutkimukset	38
	LÄHTEET	40
	LIITTEET	42
	Liite 1. Antigeenien tunnistukseen käytetty kartta esimerkki-merkintöineen.....	42
	Liite 2. Tutkimukseen käytettyjen vasta-ainetunnistuspaneelien tulokset.	43

LYHENTEET JA TERMIT

Agglutinaatio	Punasolujen yhteenliittyminen vasta-aineiden ja antigeenien välityksellä, sakkautuminen
AIHA	Autoimmuuni hemolyyttinen anemia
Allovasta-aine	Vasta-aine puuttuvaa antigeeniä kohtaan, muodostunut immunisaation tuloksena
Autovasta-aine	Yksilön muodostama vasta-aine omaa antigeeniä kohtaan
AHG	Antihumaaniglobuliini
DAT	Direct antiglobulin test, suora antiglobuliinikoe
HDN	Hemolytic disease of newborn, vastasyntyneen hemolyyttinen tauti
Hemolyysi	Punasolujen hajoaminen
Isoagglutiini	Punasoluvasta-aine eli anti-A ja anti-B, laajemmalla käsitykseltään kaikki allovasta-aineet
IAT	Indirect antiglobulin test, epäsuora antiglobuliinikoe
LISS	Low Ionic Strength Solution. Liuos, jossa on matala ioniväkevyys. Käytetään antiglobuliinimenetelmissä herkistämään menetelmää
Panagglutiini	Vasta-aine, joka ei ole spesifinen tietylle antigeenille vaan häiritsee tutkimuksia sakkauttamalla kaikki, jopa tutkittavan omat punasolut
RT	Room Temperature, huoneenlämpö

1 JOHDANTO

Verensiirtoihin luetaan punasolujen siirto sekä trombosyyttien ja jääplasmavalmisteiden siirto. Punasolusiirtoja tarvitaan erityisesti vaikean anemian hoidossa sekä akuutin vuodon korvaushoidossa. Suomessa punasoluvalmisteita siirretään vuosittain noin 200 000 valmistetta. Trombosyyttivalmisteita ja jääplasmavalmisteita käytetään kumpiakin noin 40 000 valmistetta. Verensiirtojen turvallisuus on Suomessa erinomaisella tasolla, mutta verivalmisteet ovat biologista materiaalia ja jokaiseen verensiirtoon liittyy aina pieni riski erilaisiin haittatapahtumiin. Verensiirtotoiminta on tarkoin säädeltyä, ja sitä ohjaavat useat lait ja asetukset, jotta haittatapahtumia ja vaaratilanteita olisi mahdollisimman vähän. Veriturvatoiminnalla tarkoitetaan kaikkia niitä toimenpiteitä, joilla seurataan verensiirtoketjun turvallisuutta verenluovutuksesta verensiirtoon ja sen jälkiseurantaan. (Verivalmisteiden käytön opas 2018, 6, 9, 53.) Laboratoriossa tehtävät verensiirtotutkimukset ovat olennainen osa verensiirtoketjua ja tutkimusten tavoitteena on löytää potilaalle sopiva verivalmiste ja näin osaltaan varmistaa turvallinen verensiirto. (Veripalvelu 2017a.)

Ennen verensiirtoa tehtäviä veren sopivuustutkimuksia ovat ABO- ja RhD- veriryhmän määritykset, punasoluvasta-aineiden seulonta ja tarvittaessa tunnistus, sekä sopivuuskoe. Näitä tutkimuksia kutsutaan verensiirtoserologisiksi tutkimuksiksi. (Veripalvelu 2017a.) Verensiirtoserologiset tutkimukset perustuvat veriryhmäantigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen yhteenliittymiseen. Punasoluantigeeneihin tarttuneet vasta-aineet osoitetaan yleisimmin agglutinaation avulla. Tutkimusten tekemiseen käytetään Suomessa pääosin pylväsagglutinaatiomenetelmää, joissa reaktiot tapahtuvat geelikorttien pylväissä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 49, 55.)

Ruumiinlämpöä alemmissa lämpötiloissa reagoivat vasta-aineet voivat häiritä useita verensiirtoserologisia tutkimuksia (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 70). Kyse on kylmävasta-aineista, jotka ovat usein itse kliinisesti merkityksettömiä, mutta voivat sekoittaa ABO-veriryhmämääritystä, aiheuttaa positiivisen autokontrollin ja peittää alleen toisia kliinisesti merkityksellisiä vasta-aineita. Kylmävasta-aineet ovat IgM- tai IgG- luokan vasta-aineita, jotka reagoivat parhaiten pääsääntöisesti 4–25 °C:n välillä. Kylmävasta-aineita voi esiintyä potilaalla luonnollisesti tai immunisaation seurauksena. Myös kylmäautovasta-aineita, eli henkilön omia antigeenejä kohtaan syntyneitä vasta-aineita

esiintyy joillakin ihmisillä. Kylmäautovasta-aineita esiintyy yleisimmin Epstein-Barr ja mycoplasma pneumoniae -infektioiden tai autoimmuunihemolyyttisen anemian (AIHA) yhteydessä. (Johns, Gockel-Blessing, Zundel, Denesiuk 2015, 143, 291.)

Opinnäytetyön aiheena on vertailla kylmävasta-aineiden seulontaan ja tunnistamiseen käytettäviä LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- kortteja, kun tutkimus tehdään huoneenlämmössä. Tarkoituksena on vertailla, eroavatko näillä korteilla saadut reaktiot ja niiden voimakkuudet toisistaan. Tarkoituksena on myös tutkia, eroavatko saadut reaktiot korttien välillä selvemmin antigeenin suhteen homo- tai heterotsygoottisten testisolujen kanssa. Työn tavoitteena on tarjota Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskukselle lisätietoa LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien käytettävyydestä kylmävasta-aineiden tutkimuksissa.

Opinnäytetyön aihe saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:n Verikeskuksesta. Fimlab Laboratoriot Oy on laboratorioalan yritys, joka tuottaa laboratoriopalveluita, sekä koulutusta ja tutkimusta Pirkanmaan, Keski-Suomen ja Kanta-Hämeen alueella. Fimlab Laboratoriot Oy:n alaisuudessa on lähes 100 toimipistettä. (Fimlab Laboratoriot Oy, a.) Laboratorio toiminta koostuu useista eri yksiköistä, joita ovat genetiikka, kliininen kemia, kliininen mikrobiologia, patologia, sekä hematologia. Verikeskus on hematologian laboratorioon kuuluva yksikkö, jonka tehtävänä on tehdä verensiirtoja edeltävät sopivuustutkimukset, sekä huolehtia verivalmisteiden varastoimisesta ja jakelusta hoitoyksiköille. (Fimlab Laboratoriot Oy, b.)

Opinnäytetyön alussa käsitellään veriryhmien ja vasta-aineiden teoriataustaa, sekä eri kylmävasta-aineiden teoriaa. Tämän jälkeen työssä käsitellään verensiirtoserologisia tutkimuksia yleisesti, sekä avataan kylmävasta-aineiden tutkimukseen käytettävät menetelmät, sekä esitellään vertailussa käytettävät Bio-Rad:n geelikortit. Tutkimusmenetelmän pääpiirteet ovat esitettyinä menetelmälliset lähtökohdat -kappaleessa, ja opinnäytetyöprosessia kuvataan kappaleessa 6. Tämän jälkeen työssä käsitellään vertailuun käytettävä aineisto, joka on koottuna havainnollistaviin taulukoihin ja aineistosta tehtävät johtopäätökset on esitelty tulokset-kappaleessa.

2 VERIRYHMÄT JA VASTA-AINEET

Veriryhmät ovat antigeenirakenteita, jotka ilmenevät punasolujen pinnalla. Ihmiseltä on löydetty 36 eri veriryhmäjärjestelmää. ABO- ja Rh-järjestelmät ovat tunnetuimmat, sekä verensiirron kannalta tärkeimmät veriryhmäjärjestelmät. Muita tärkeitä järjestelmiä ovat esimerkiksi Kell-, Duffy- ja Kidd- järjestelmät. Useimmat veriryhmät on löydetty vasta-aineiden muodostumisen myötä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 8.)

Veriryhmät ovat periytyviä ja niiden periytymismekanismit tunnetaan. Kun antigeenejä määrittävät geenit ovat alleelisia, kuuluvat antigeenit samaan veriryhmäjärjestelmään. Eri veriryhmäjärjestelmät eivät ole toisistaan geneettisesti riippuvaisia. Henkilö voi olla antigeeniä määräävän geenin suhteen homotsygoottinen tai heterotsygoottinen. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 12.) Homotsygootti on perinyt vanhemmiltaan tietyn veriryhmägeenin kaksi samanlaista kopiota (esimerkiksi Fya/Fya), heterotsygootilla geenin kopiot ovat erilaiset (esimerkiksi Fya/Fyb). Usein punasolun pinnalla ilmenevän antigeenin määrä eroaa homo- ja heterotsygoottien välillä. Homotsygootit punasolut voivat reagoida spesifisen vasta-aineen kanssa heterotsygootteja voimakkaammin. Serologista eroavaisuutta heterotsygoottisten ja homotsygoottisten punasolujen välillä kutsutaan nimellä annosvaikutus (dosage effect). (Johns ym. 2015, 29.) Veriryhmäantigeenirakenteiden määrä homotsygooteilla on heterotsygootteja suurempi erityisesti Rh-, Kidd-, Duffy- ja MNS- veriryhmien kohdalla. Laboratoriotutkimuksissa voidaan huomata, että joskus ainoastaan kyseisen geenin suhteen homotsygootit punasolut saavat aikaan positiivisen reaktion antigeenille spesifisen vasta-aineen kanssa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 12.)

2.1 Veriryhmät ja punasoluantigeenit

Veriryhmä muodostuu punasolun pinnalla sijaitsevien veriryhmäantigeenien rakenteen mukaan. Punasoluantigeenit ovat pääosin rakenteeltaan glykoproteiineja. Punasoluantigeeneja voidaan määrittää niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Nykyään tunnetaan noin 350 eri punasoluantigeeniä, joista noin 300 kuuluu veriryhmäjärjestelmiin. Punasolun pinnalta löytyvillä antigeeneillä on solun kannalta tärkeitä fysiologisia tehtäviä. Osa antigeeneistä on esimerkiksi solun ulkoisen ja sisäisen tilan välisiä kuljetusproteiineja,

osa punasolun pinnan entsyymejä ja osa sytokiinireseptoreita. Ne voivat toimia myös adheesiomolekyyleinä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 11.)

Veriryhmäjärjestelmät on nimetty usein veriryhmän löytäjän mukaan, kuitenkin niin, että ne eivät sekoitu keskenään. Ensimmäisenä löydetty ja tunnetuin veriryhmäjärjestelmä on ABO-järjestelmä. Ihmiselle muodostuu jo puolen vuoden ikäisenä vastaaineita muita kuin oman ABO-veriryhmän antigeenejä vastaan. Tämän veriryhmäjärjestelmän löytymistä voidaan pitää immunoematologian eli veren immunologisen tutkimusten syntyä ja tästä alkoivat verensiirtoserologiset laboratoriomääritykset. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 8–9.) ABO-järjestelmää pidetään myös merkityksellisimpänä veriryhmäjärjestelmänä verensiirtojen kannalta. Huomattiin, että ABO-veriryhmän vastaisen veriryhmän siirto potilaalle aiheuttaa vakavan verensiirtoreaktion. Punasolun pinnalla olevat antigeenit määrittelevät ihmisen veriryhmän A-, B-, AB- tai O-ryhmään. AB-ryhmään kuuluvilla punasolun pinnalta löytyy sekä A-antigeenejä että B-antigeenejä. O-ryhmään kuuluvilla punasolun pinnalta löytyy H-antigeeni. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 18–19, Mitra, Mishra & Rath, 2014.) ABO-veriryhmistä löytyy myös heikompia muotoja eli variantteja, jotka ovat muodostuneet mutaatioiden välityksellä. Näillä varianteilla veriryhmämuodoilla punasolun pinnalla on vähemmän ryhmän määrittelevää antigeeniä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 18–19.)

Toinen tunnetuimpiin veriryhmäjärjestelmiin kuuluva järjestelmä on Rh-veriryhmäjärjestelmä. (Mitra ym. 2014, Ekblom-Kullberg ym. 2018, 21.) Vaikka Rh-järjestelmästä tunnetaan nykyisin yli 60 eri antigeeniä, jaetaan ihmiset Rh-negatiivisiin ja Rh-positiivisiin ihmisiin. Tämä määräytyy ainoastaan D-antigeenin perusteella. D-antigeeni on erittäin immunogeeninen ja aiheuttaa helposti immunisaation, joten tämän vuoksi verensiirrosta otetaan aina huomioon RhD-veriryhmä. Suomalaisista noin 87 % on Rh-positiivisiä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 21–22.) Jos määritetään Rh-fenotyyppi, tarkoittaa tämä myös muiden tämän järjestelmän tunnetuimpien antigeenien tyypittämistä. Näihin kuuluvat C-, c-, E- ja e- antigeenit. Jos näitä antigeenejä kohtaan vastaaineita löydetään, siirretään aina Rh-fenotyypin mukaista verta immunisaation välttämiseksi. Myös tässä veriryhmässä on tavattu heikkoja muotoja, usein kuitenkin turvallisuuden vuoksi potilas luokitellaan mieluummin RhD-negatiiviseksi kuin RhD-positiiviseksi. Tällä varmistetaan, ettei potilas immunisoidu ja saa verensiirrosta verensiirtoreaktiota. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 21–22.)

Hieman tuntemattomampiin veriryhmäjärjestelmiin kuuluu MNS-veriryhmäjärjestelmä. Tämä on toiseksi monimuotoisin veriryhmäjärjestelmä Rh-järjestelmän jälkeen. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 32.) Järjestelmään kuuluu yli 40 antigeeniä, joista tärkeimmät ovat M, N, S ja s. Antigeenit ovat glykoforiineihin, eli glykoproteiineihin kiinnittyneinä. (Johns ym. 2015, 92.) Nämä antigeenit ovat kehittyneet jo vastasyntyneellä. Ne aiheuttavat punasolulle negatiivisen varauksen ja estävät punasoluja tarttumasta toisiinsa tai verisuonten seinämiin. Ne estävät myös bakteerien pääsyn solun sisälle. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 32.)

PIPK-veriryhmäjärjestelmään kuuluu tunnetuimpina P1- ja Pk- antigeenit. Näiden muodostamia yleisimpiä fenotyyppejä on P1 ja P2. Suomalaisista P1-fenotyyppiä on 70 % ja P2-fenotyyppiä on 30 %. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 35.) Kell-veriryhmäjärjestelmään kuuluu yli 30 antigeeniä. Kliinisesti merkityksellisin näistä on K-antigeeni ja muita tunnetuimpia on k-, Kpa- ja Ula- antigeenit. Kuten D-antigeeni, myös K-antigeeni on erittäin immunogeeninen. Vaikka verenluovuttajista Suomessa vain noin 4 % on K-antigeenin suhteen positiivisia, on Suomessa vuodesta 1996 alkaen määritetty verenluovuttajien K-antigeeni. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 28–29.) Tämä tehdään siksi, että anti-K on hyvin yleinen ja merkityksellinen vasta-aine ja se aiheuttaa verensiirtoreaktioita ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 28–29; Mitra ym. 2014.) K-negatiivista verta suositellaankin tästä syystä aina fertiili-ikäisille naisille ja silloin, jos potilaalta on löydetty joku kliinisesti merkityksellinen punasoluvasta-aine. Näin voidaan välttää lisäimmunisaatiota verensiirroissa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 28–29.)

Duffy-veriryhmäjärjestelmän tunnuksena käytetään Fy-merkintää ja sen antigeeneihin kuuluu Fya- ja Fyb- antigeenit. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 30; Mitra ym. 2014.) Sen yleisimpään fenotyyppiin Fy(a+b+) kuuluu noin 50 % suomalaisista. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 30.) Kidd-veriryhmäjärjestelmän merkintänä on Jk. Siihen kuuluvat antigeenit ovat Jka, Jkb ja Jk3. (Mitra ym. 2014; Ekblom-Kullberg ym. 2018, 31.) Suomalaisista noin 50 % on heterotsygoottista Jk(a+b+) -fenotyyppiä, noin 25 % on Jk(a+b-) -fenotyyppiä ja noin 25 % Jk(a-b+) -fenotyyppiä. Suomalaisilta löytyy myös oma mutaatio, joka ilmenee Jk(a-b-) -fenotyyppinä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 31.) Lewis-veriryhmäjärjestelmän symbolina on Le ja sen antigeeneinä ovat Lea- ja Leb-antigeenit. Nämä antigeenit ovat hiilihydraattirakenteita, jotka esiintyvät plasmassa ja syljessä. Plasmasta ne kiinnittyvät punasolun pinnalle. Tämän vuoksi Lewis-fenotyyppiä voidaan

laboratorio-olosuhteissa muuttua. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 40.) Muita veriryhmäjärjestelmiä ovat Landsteiner-Wiener-järjestelmä (LW), Vel- veriryhmäjärjestelmä (VEL), Colton- järjestelmä (CO), Cromer-järjestelmä (CROM), Gerbich-järjestelmä (GE), Lutheran-järjestelmä (LU), Chido/Rodgers-järjestelmä (CH/RG), Xg-järjestelmä (XG) ja Bg (HLA)-veriryhmät. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 33–42.)

2.2 Vasta-aineet

Vasta-aineet ovat olennainen osa elimistön immuunipuolustusta. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, joita löytyy veren plasmasta ja monista muista elimistön nesteistä. Ihmisistä löytyvät immunoglobuliinit voidaan jakaa viiteen kemiallisesti ja fysikaalisesti erilaiseen luokkaan: IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. Kaikki vasta-aineet rakentuvat samasta neljän polypeptidin ketjuyksiköstä, joka koostuu kahdesta kevyestä ketjusta ja kahdesta raskaasta ketjusta. Raskaan ketjun rakenne luokittelee vasta-aineet niiden viiteen eri luokkaan. Jokainen näistä luokista on kehittynyt kohtaamaan eri ominaisuuden omaavia antigeenejä (mikrobeja), jotka tulevat elimistöön eri reittejä. (Lydyard, Whelan & Fanger 2011, 69–73.)

IgM-luokan vasta-aineet muodostavat noin 10 % immunoglobuliineista (Turgeon 2014, 14.) ja esiintyvät suuren kokonsa vuoksi intravaskulaarisesti. IgM on aktiivinen alkuvaiheen immuunivasteessa, ja on ensimmäinen vasta-aine, jota tuotetaan ja joka ilmenee B-lymfosyytin pinnalla. Se toimii antigeenin reseptorina näille soluille ja on myös liukoisena molekyylinä veressä. (Lydyard ym. 2011, 75.) IgM aiheuttaa agglutinaatiota ja sytologisia reaktioita. IgM-luokan vasta-aineet ovat koholla esimerkiksi osassa tartuntataudeista, kollageenihäiriöissä ja hematologisissa taudeissa. (Turgeon 2014, 14.)

Veren seerumin immunoglobuliineista IgG-luokan vasta-aineet ovat yleisimpiä. Koko kehossa niitä voi olla jopa 75 % kaikista immunoglobuliineista. (Turgeon 2014, 14.) IgG-luokka voidaan jakaa vielä neljään alaluokkaan: IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4 (Lydyard ym. 2011, 74). Ne liikkuvat suonen sisältä myös helposti suonen ulkopuoliseen tilaan, jossa ne neutraloivat toksiineja ja sitoutuvat mikro-organismeihin (Turgeon 2014, 14). IgG-vasta-aineet voivat kulkeutua myös istukkaan ja antavat kasvavalle sikiölle myös suojan (Lydyard ym. 2011, 74). IgG-luokan vasta-aineiden suuret tasot voivat

johtua esimerkiksi tartuntataudista, kollageenihäiriöstä tai hematologisesta taudista (Turgeon 2014, 15).

IgA-luokan vasta-aineet muodostavat 15-20 % immunoglobuliineista (Turgeon 2014, 15) ja ovat pääasiainen vasta-aine kyynelissä, syljessä, äidinmaidossa ja suolistones-teissä. IgA:ta syntetisoidaan pääosin kudoksilla sijaitsevilla plasmasoluissa. Ne vastaavat ensi vaiheen puolustuksesta suolen pinnalla. (Turgeon 2014, 15; Lydyard ym. 2011, 75.) IgD-luokan vasta-aineita löytyy plasmasta vain noin 1 % kaikista immunoglobuliineista (Turgeon 2014, 15). Niitä on B-lymfosyyttien pinnalla IgM-vasta-aineiden lisäksi (Lydyard ym. 2011, 75). IgE-luokan vasta-aineita on hyvin vähän seerumissa, mutta ne ovat merkittävä tekijä akuutissa tulehduksessa ja allergisissa reaktioissa. (Turgeon 2014, 15–16; Lydyard ym. 2011, 75.)

Veriryhmäjärjestelmän antigeenejä vastaan voi muodostua vasta-aineita, jotka myös jaotellaan yllä mainittuihin immunoglobuliiniluokkiin. Veriryhmävasta-aineet ovat yleisimmin IgG- tai IgM-luokkaa, joskus harvoin myös IgA-luokkaa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 13.) Vasta-aineet voivat olla auto- tai allovasta-aineita. Autovasta-aineet ovat elimistön itse tuottamia vasta-aineita, jotka kohdistuvat omiin punasoluantigeeneihin. Allovasta-aineita taas syntyy immunisaation, eli vieraan punasolualtistuksen seurauksena esimerkiksi verensiirtojen tai raskauden yhteydessä. (Johns ym. 2015, 39.) Veriryhmävasta-aineet saavat etuliitteen anti, esimerkiksi anti-A on A-antigeenille spesifinen vasta-aine (Verensiirto-opas 2006). Punasoluvasta-aineita anti-A:ta ja anti-B:tä kutsutaan isoagglutiniineiksi. Nämä vasta-aineet ovat luonnollisia vasta-aineita ja kuuluvat IgM-luokan vasta-aineisiin. Kun taas D-antigeeniä vastaan muodostuva anti-D vasta-aine kuuluu IgG-luokkaan. Anti-D ei kuitenkaan ole luonnollinen vasta-aine vaan se muodostuu immunisaation seurauksena. Anti-D esiintyy usein yhdessä anti-C:n ja anti-E:n kanssa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 20, 24.)

Joillain antigeeni-vasta-ainekomplekseilla on kyky aktivoida komplementtia, erityisesti IgG1, IgG2 ja IgM-luokan vasta-aineilla (Johns ym. 2015, 15). Komplementtijärjestelmä on immuunipuolustuksen osa, joka aktivoituessaan voi aiheuttaa punasolujen hemolyysin. Reaktiosarja etenee vaiheittain tietynlaista reittiä pitkin, jossa komplementin komponentit aktivoituvat toinen toisensa jälkeen johtaen membraaneja tuhoavan kompleksin (MAC) syntymiseen. (Hall & Yates 2010, 70 – 89.) Vasta-aineen laukaisema komplementtikaskadi voi pysähtyä komponenttiin C3d, joka voidaan todeta punasolujen

pinnalta suorassa antiglobuliinikokeessa. Kuitenkin osa ABO- ja Kidd- veriryhmien vasta-aineista voi aiheuttaa vaarallisen intravaskulaarisen hemolyysin komplementin usein edetessä loppuun saakka. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 16.)

2.3 Kylmävasta-aineet

Suurin osa veriryhmävasta-aineista reagoi parhaiten joko kylmässä (4-25°C) tai lämpimässä lähellä ruumiinlämpöä (30-37°C). Yleisimmin lämpimässä reagoivat vasta-aineet kuuluvat IgG-luokkaan. Ne ovat usein myös kliinisesti merkityksellisiä. Kylmävasta-aineet ovat yleisimmin IgM-luokan punasoluvasta-aineita. Ne eivät useinkaan ole kliinisesti merkityksellisiä, mutta hankaloittavat ja viivästyttävät laboratoriotutkimuksia. Ne voivat peittää alleen muita kliinisesti merkityksellisiä vasta-aineita. Kylmävasta-aineet voivat olla auto- tai allovesta-aineita. Kylmäallovesta-aineita ovat esimerkiksi anti-M, anti-N, anti-Pl, anti-P, anti-Pk, anti-Lea, anti-Leb ja anti-Lua. Kylmäautovasta-aineita muodostuu yleensä hiilihydraattiantigeneja, kuten I, i, I^T ja IH antigeenejä kohtaan. Kylmävasta-aineita voi esiintyä myös luonnollisesti ilman altistusta. (Johns ym. 2015, 143–144.)

Anti-M ja anti-N ovat MNS-veriryhmän antigeeneille spesifisiä kylmässä reagoivia punasoluvasta-aineita. Yleisimmin ne ovat IgM-luokkaan kuuluvia luonnollisesti esiintyviä vasta-aineita. Erityisesti anti-M:ä tavataan myös osittain, tai kokonaan IgG-muodossa. (Verensiirto-opas 2006, 19–22.) Yleensä anti-M ei sido komplementtia, mutta jotkut IgG-komponentin omaavat muodot voivat aktivoida komplementtia (Tondon, Kataria, & Chaudhry 2008, 81–83). Myös anti-N:stä on löydetty IgG-komponentin omaava muoto (Kumawat, Jain, Marwah & Sharma 2015, 92–93).

Anti-M on yleisimmin laboratoriossa esiintyvä kylmävasta-aine. Anti-M ja anti-N tulevat esiin laboratoriotutkimuksissa erityisesti huoneenlämmössä tai kylmässä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 32.) MNS-veriryhmän antigeenit tuhoutuvat herkästi entsyymikäsitelyllä, esimerkiksi papaiinilla (Shah, Kalgutkar, Sawant & Deshpande 2016, 159–160; Ekblom-Kullberg ym. 2018, 33). MNS-veriryhmän vasta-aineille on myös tyypillistä, että ne reagoivat tutkimuksissa voimakkaammin vastaavan antigeeninsä suhteen homotsygoottisten punasolujen kanssa (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 33).

Anti-M ja anti-N mielletään yleensä kliinisesti merkityksettömiksi, mutta ne ovat harvoissa tapauksissa aiheuttaneet verensiirtoreaktioita tai vastasyntyneen hemolyyttistä tautia (hemolytic disease of newborn, HDN). Anti-M on suuremmalla todennäköisyydellä kliinisesti merkityksellinen, jos se sisältää IgG-komponentin, ja pystyy reagoimaan ruumiinlämmössä. Myös anti-N:stä on tavattu erittäin harvinainen ruumiinlämmössä reagoiva, hemolyyttisiä verensiirtoreaktioita aiheuttava muoto. (Makroo ym. 2014, 96–99.) Tapaukset ovat harvinaisia, ja pääsääntönä on, että M- ja N-fenotyypin vastaisia punasoluja voidaan siirtää, jos sopivuuskoe on negatiivinen. Kuitenkin jos anti-M näyttäytyy vahvana, ja reagoi heterotsygoottistenkin paneelisolujen kanssa, kannattaa siirtää M-negatiivisia punasoluja. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 32.)

Lewis veriryhmäjärjestelmään kuuluvien punasoluantigeenien vasta-aineet anti-Lea ja anti-Leb ovat luonnollisia kylmässä reagoivia vasta-aineita. Ne kuuluvat yleensä IgM-luokkaan, tosin myös IgG-komponentin omaavia muotoja on löydetty. (Makroo ym. 2014, 96–99.) Anti-Lea ja anti-Leb eivät yleensä tule +37 °C:ssa tehtävissä laboratoriokeissa esiin, vaan niitä tavataan vain, jos tutkimuksia tehdään huoneenlämmössä, tai kylmässä. Entsyymikäsittely voimistaa Lewis-järjestelmän punasoluvasta-aineiden reaktioita. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 40.) Joskus vasta-aineet sitovat komplementtia, mikä voi aiheuttaa hemolyysiä laboratoriokeissa. Lewis-ryhmän antigeenit kiinnittyvät punasoluihin vasta syntymän jälkeen, joten vastasyntyneiden hemolyyttistä tautia ei esiinny. Lewis-veriryhmät voidaan yleensä jättää huomiotta myös verensiirroissa. Anti-Lea:n on raportoitu harvoissa tapauksissa aiheuttaneen lieviä hemolyyttisiä verensiirto-reaktioita, mutta punasoluja voidaan siirtää, mikäli sopivuuskoe on negatiivinen. (Johns ym. 2015, 96.)

P1 ja Pk ovat P1PK veriryhmäjärjestelmään kuuluvia antigeeneja, ja P-antigeeni kuuluu Glob- veriryhmäjärjestelmään (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 35). Anti-P1, anti-P ja anti-PP1PK ovat yleisimmin IgM-luokkaan kuuluvia, luonnollisesti esiintyviä punasoluvasta-aineita (Johns ym. 2015, 94). Ne reagoivat kaikki parhaiten huoneenlämmössä, tai sitä viileämmässä. Anti-P1 on näistä huomattavasti yleisin. Se ei välttämättä ilmene vasta-aineseulonnoissa lainkaan, vaan havaitaan laboratoriossa yleensä ABO-määrityksen plasmapuolen reaktioissa. Anti-P1 ei ole kliinisesti merkityksellinen ja verta voi siirtää, jos sopivuuskoe on negatiivinen. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 35.)

Pk- ja p-veriryhmiin kuuluvilla henkilöillä esiintyy luonnollisena vasta-aineet anti-P ja anti-PP1Pk. Kummatkin ovat harvinaisia veriryhmiä, mutta vasta-aineet anti-P ja anti-PP1Pk ovat kliinisesti hyvin merkityksellisiä. Vasta-aineet omaaville henkilöille tulisi aina siirtää kyseisen antigeenin suhteen negatiivista verta ja sopivaa valmistetta on yleensä vaikea löytää. Anti-P ja anti-PP1Pk reagoivat laboratoriotutkimuksissa kaikkien testisolujen kanssa, myös veriryhmämäärityksessä A1- ja B-solujen kanssa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 35–36.)

Anti-I, anti-i sekä anti-IH ovat ruumiinlämpöä viileämmässä reagoivia vasta-aineita, ja esiintyvät useimmiten autovasta-aineina. Yleisin näistä on autoanti-I. (Johns ym. 2015, 143.) Yleensä näillä vasta-aineilla on kapea lämpöalue, jossa ne ovat aktiivisia, sekä alhainen titteri, mikä tekee niistä kliinisesti merkityksettömiä. Kliinisesti merkityksellisiä kylmäautovasta-aineet ovat lähinnä vain, jos titteri on suuri ja niillä on kyky reagoida lähellä ruumiinlämpöä. (Mohan, Henry, Rafi & Innah 2016, 152–154.) Kylmäautovasta-aineet kuitenkin voivat vaikeuttaa serologisia tutkimuksia, ja aiheuttaa positiivisen DAT:in (direct antiglobulin test), eli suoran antiglobuliinikokeen tai autokontrollin. Kylmässä reagoivia kliinisesti merkityksellisiä autovasta-aineita tavataan esimerkiksi mycoplasma-pneumoniae -infektiota sairastavilla, tai AIHA-potilailla. (Johns ym. 2015, 291.)

3 VERENSIIRTOSEROLOGISET TUTKIMUKSET

Ennen verensiirtoa tehtäviä serologisia tutkimuksia ovat veriryhmämääritys (E-ABORh), punasoluvasta-aineiden seulonta (P-VRAb-O) ja mahdollinen tunnistus (B-VRAbTu1), sekä sopivuuskoe (B-Xkoe) (Veripalvelu, 2017b). Tutkimuksiin suositellaan käytettäväksi EDTA-antikoagulanttiin otettua verinäytettä. Verinäytteet säilyvät analyysikelpoisena viisi vuorokautta, kun ne säilytetään jääkaappilämpötilassa. Verensiirtoserologiset tutkimukset perustuvat veriryhmäantigeenin, ja sille spesifisen vasta-aineen yhteenliittymiseen. Punasoluantigeneihin tarttuneet vasta-aineet osoitetaan yleisimmin agglutinaation avulla. Tutkimusten tekemiseen käytetään Suomessa pääosin geelikortteja, joissa reaktiot tapahtuvat. Geelikortit soveltuvat käsin pipetoitavaksi, sekä automaattilla tehtäviksi. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 49, 55–56.) Punasoluantigenejä tutkitaan usein vasta-aineiden tunnistuksen yhteydessä myös fenotyypityksellä. Tällä menetelmällä selvitetään punasolujen pinnalla olevat antigeenit vasta-aineiden avulla. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 11.) Jos serologisilla menetelmillä ei saada luotettavaa tulosta, voidaan tutkimuksissa hyödyntää myös genotyypitystä (Verivalmisteiden käytön opas 2018, 10). Genotyypityksessä DNA:sta voidaan määrittää veriryhmätekiäjien geneettinen koostumus, joka määrää punasolujen pinnalle muodostuvat veriryhmäantigeenit (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 11, 260).

Potilaan ABO- ja RhD- veriryhmät tutkitaan kertaalleen varsinaisesta veriryhmänäytteestä, sekä tarkistetaan aina ennen verensiirtoa sopivuuskoeinäytteestä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 57). Punasoluvasta-aineiden seulonta tehdään myös aina ennen punasoluvalmisteen siirtoa. Jos seulontatestissä ilmenee positiivinen reaktio, tulee tutkimuksia jatkaa vasta-aineen tunnistukseen. (Johns ym. 2015, 42.) Veriryhmämäärityksen ja vasta-aineiden seulonnan voi tehdä hyvissä ajoin ennen toimenpidettä, mutta sopivuuskoe on voimassa vain viisi vuorokautta, minkä ajan sisällä verensiirto on suoritettava. Veriryhmä- ja sopivuuskoeinäyte tulee ottaa eri kerroilla, eri näytteenottajan toimesta. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 49.)

Sopivuuskokeen tarkoituksena on varmistaa, ettei potilaalla ole vasta-aineita siirrettäväksi aiottuja punasoluja kohtaan. Verivalmisteiden sopivuus potilaalle voidaan sairaalan käytännöistä riippuen varmistaa noudattamalla perinteistä sopivuuskoeikäytäntöä tai veriryhmä ja seulonta -käytäntöä. Sopivuuskoeikäytännössä jokaiselle siirretyksi aiotulle

punasoluvalmisteelle tehdään serologinen sopivuuskoe. Serologisessa sopivuuskokeessa ”ristataan”, eli yhdistetään ja inkuboidaan potilaan plasmaa ja siirrettäväksi aiottuja punasoluja keskenään. Mikäli ristauksessa ilmenee agglutinaatio, on potilaalla mahdollisesti vasta-aineita siirrettäväksi aiottuja punasoluja kohtaan. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 62.)

Veriryhmä ja seulonta -käytännön, eli Type & Screen -käytännön ideana on, että sopiva verivalmiste voidaan valita tietojärjestelmän suorittamien tarkistusten perusteella ilman serologista sopivuuskoetta. Käytäntö edellyttää laboratoriolta sopivaa tietojärjestelmää, automatisoituja veriryhmämääryksiä, ja tiedonkulkua analysaattorin ja tietojärjestelmän välillä. Lisäksi vasta-aineseulonnan on oltava tarpeeksi laaja ja siinä tulee olla mukana SF-solut, jotka sisältävät suomalaiset veriryhmäharvinaisuudet. Type & Screen -käytäntö sopii noin 90 %:lle potilaista. Käytäntö ei sovi potilaille, joilla on joskus todettu punasoluvasta-aineita, tai potilaille, joille on tehty maksan tai allogeenisten kantasolujen siirto. Potilaille, jotka eivät ole sopivia Type & Screen -käytäntöön tehdään aina serologinen sopivuuskoe jokaisesta siirrettävästä valmisteesta. Type & Screen -käytäntö vähentää serologisista sopivuuskokeista aiheutuvaa työmäärää verikeskuksessa. Verivalmisteita ei varata potilaille valmiiksi, mikä helpottaa verivaraston ylläpitoa ja verivalmisteet voidaan käyttää tehokkaasti vanhenemisjärjestyksessä. Etukäteen tehdyt punasolutilaukset eivät ole määriltään sitovia, vaan lisävalmisteet ovat välittömästi käytettävissä, mikäli veren tarve onkin odotettua suurempi. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 117–120.)

3.1 Suora ja epäsuora antiglobuliinimenetelmä

Vasta-aineiden tutkimiseen käytetään antiglobuliinimenetelmiä, jotka perustuvat punasoluantigeenien ja niitä vastaavien vasta-aineiden väliseen sitoutumiseen. Antigeeni-vasta-ainekompleksi osoitetaan silminnähtävänä agglutinaationa tai hemolyysinä. Antiglobuliinimenetelmiä on kahdenlaisia: suora (DAT, direct antiglobulin test) ja epäsuora (IAT, indirect antiglobulin test) menetelmä. Suoralla menetelmällä voidaan osoittaa punasolujen pintaan jo elimistössä, in vivo, kiinnittyneet vasta-aineet. Suoraa menetelmää käytetään suorassa antiglobuliinikokeessa, eli Coombsin kokeessa. Epäsuoraa menetelmää käytetään vasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa. Epäsuorassa antiglobuliinimenetelmässä tarvitaan inkubointivaihe, jonka aikana tunnettujen testisolujen

punasoluantigeenit reagoivat potilaan vasta-aineiden kanssa in vitro. Inkubointi tapahtuu usein 37 °C:ssa, mutta esimerkiksi kylmävasta-aineet tulevat paremmin esiin huoneenlämmössä tai 4 °C:ssa. Kummassakin menetelmässä käytetään yleensä reagenssina AHG:ta (antihuman globulin), joka muodostaa siltoja antigeeni-vasta-ainekompleksien välille, ja liittää yhteen punasolut, jolloin muodostuu silmännähtävä agglutinaatio. (Johns ym. 2015, 41–47; Blaney & Howard 2008, 25–28.)

3.2 Vasta-aineiden seulonta ja tunnistus

Vasta-aineiden seulontatesti on kehitetty havaitsemaan potilaan plasmasta mahdolliset, muut kuin ABO-ryhmän, kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet. Vasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa potilaan plasman kanssa inkuboidaan kaupallisia O-ryhmän seulontasoluja, joiden pinnalla ilmenevät antigeenit tunnetaan. O-ryhmän soluja käytetään siksi, etteivät ne sisällä A tai B antigeenejä. Seulontasoluissa tulee olla edustettuna antigeenejä yleisimmin tavattavia vasta-aineita kohtaan. (Johns ym. 2015, 42, 129.) Kansainvälisten vaatimusten lisäksi Suomessa käytetään myös muualla harvinaisia, mutta suomalaiselle väestölle tyypillisiä antigeenejä, joita ei välttämättä ole saatavilla kaupallisissa paneeleissa (Veripalvelu, 2017b). Seulontasolujen pitää sisältää vähintään antigeenit D, C, E, c, e, M, N, S, s, P₁, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka ja Jkb. Antigeenien D, C, E, c, e, S, s, Fya, Fyb, Jka ja Jkb tulee löytyä seulontasoluista homotsygooteina, jos käytössä on Type & Screen -menetelmä. Lisäksi Type & Screen -käytännössä seulontasoluissa tulisi olla edustettuna harvinaisille kliinisesti merkityksellisille vasta-aineille antigeenit Cw, Cx, Ula ja LWb. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 60.)

Normaalisti vasta-aineseulonnan tulos on negatiivinen. Jos kuitenkin saadaan positiivinen tulos tai ABO-määrityksen plasmapuolella tai sopivuuskokeessa ilmenee ristiriitaisia reaktioita, tulee kyseessä oleva vasta-aine tunnistaa. (Fimlab Laboratoriot Oy 2015). Tällöin Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksen työhohjeen mukaan ensimmäisenä tehdään kaksi kolmen solun lisäseulontaa: vasta-aineseulonta huoneenlämmössä ja vasta-aineseulonta entsyymikäsitellyillä soluilla, sekä 11-solun tunnistuspaneeli. Huoneenlämmössä tehtävä seulonta vahvistaa kylmävasta-aineiden reaktioita ja se voidaan suorittaa LISS/Coombs-kortilla tai NaCl/Enzyme-kortilla. Entsyymikäsitely voimistaa tiettyjen vasta-aineiden reaktioita, mutta yleisimmät kylmävasta-aineet reagoivat siinä huonosti. Jos vasta-aine reagoi huoneenlämmössä voimakkaasti, mutta entsyymikäsitel-

lyillä soluilla vasta-aine ei ole reagoinut, viittaa se vahvasti kylmävasta-aineen läsnäoloon. Jos huoneenlämpöseulonnassa saadaan positiivisia reaktioita, voidaan tunnistuspaneeleita tehdä +37 °C:n lisäksi huoneenlämmössä tai +4 °C. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016.)

Vasta-aineen tunnistamisessa käytetään apuna paneelille ominaista antigeenikarttaa (Liite 1.), jonka avulla voidaan vasta-aine tunnistaa poissulkumenetelmällä. Antigeenikartasta näkyy kunkin paneelisolun ilmentämät antigeenit ja antigeenikarttaa verrataan paneelista saatuihin reaktioihin. Poissulkua lähdetään tekemään tarkastelemalla paneelin negatiivisia reaktioita. Negatiivisen reaktion kohdalla voidaan vasta-aine sulkea pois, jos antigeenikartan mukaan kyseinen testisolun antigeenin suhteen positiivinen (+). Eli jos reaktio on negatiivinen (-), potilaan plasmassa ei ole vasta-ainetta tätä antigeeniä kohtaan. (Johns ym. 2015, 129.) Poissulkuun tulee käyttää homotsygootteja soluja. Poikkeuksena on anti-K, joka voidaan poissulkea myös heterotsygootilla solulla. Kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet pitäisi saada poissuljettua useammalla kuin yhdellä solulla. Jollei vasta-ainetta saada tunnistettua peruspaneelilla, voidaan poissulkuun käyttää lisäksi muita seulonta- ja paneelisoluja. Jos vasta-ainetta ei lisäsolujen tai -menetelmienkään avulla saada tunnistettua, kyseessä on tunnistamaton tai epäspesifinen vasta-aine. Jos epäillään, että kyseessä on harvinainen vasta-aine, voidaan näyte lähettää vielä Helsingin veripalveluun tutkittavaksi. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016.)

3.3 Automaatio verikeskuksessa

Uudet verensiirtoserologian tekniikat ovat mahdollistaneet automaation kehittymisen immunoematologian laboratorioissa. Suurin osa immunoematologian automaatiolaitteista perustuu pylväsagglutinaatiomenetelmiin. Automaatio korostaa tutkimusten toistettavuutta ja tasapuolisuutta. Se myös vähentää käsityön määrää ja virhemahdollisuutta tulosten kirjaamisessa ja vastaamisessa. Valmistajat ovat tuoneet markkinoille suoritus- teholtaan erilaisia puoli- ja täysiautomaattisia laitteita, jotka soveltuvat erikokoisiin verikeskuksiin käytettäväksi suurimmalle osalle verensiirtoserologisia tutkimuksia. Täysautomaatit tekevät kaikki tutkimuksen työvaiheet solususpension tekemisestä tulosten lukemiseen. (Bajpai, Kaur & Gupta 2012, 140–144.) Täysautomaatit ovat yleisiä suurissa verikeskuksissa, mutta pieniin laboratorioihin hyödyllisempää on hankkia esimerkiksi laite, joka lukee reaktioita (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 56).

Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksessa Tampereella on käytössä kaksi Bio-Rad:n IH-1000 täysiautomaattia. IH-1000 perustuu pylväsagglutinaatiomenetelmään ja se soveltuu veriryhmämäärytyksiin, vasta-aineiden seulontaan ja tunnistukseen, suoraan anti-globuliinikokeeseen, sopivuuskokeisiin, ja fenotyypittämiseen. Laite käyttää käsimenetelmäänkin soveltuvia Bio-Rad:n geelikortteja. Laite pipetoi, inkuboi, sentrifugoi, sekä lukee ja kuvaa näytteet itsenäisesti. Laitteessa on jatkuva näytteiden ja reagenssien syöttömahdollisuus, näytepaikkoja on yhteensä 180 ja reagenssipainoja 28. Automaatti käyttää IH-Com -nimistä validointi- ja dokumentointiohjelmaa, jonka avulla reaktioita ja tuloksia tarkastellaan. (IH 1000, 2010.) Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksessa Tampereella IH-1000 automaattia tulee työohjeen mukaan käyttää aina, kun se on mahdollista. Laitteessa on valittavina erilaisia ohjelmia erilaisille seulonnoille ja paneeleille. (Fimlab Laboratoriot Oy 2016.)

3.4 Tutkimuksiin käytettävät geelikortit

Perinteisesti vasta-aineiden seulontaa ja tunnistusta on tehty agglutinaatiomenetelmällä koeputkissa, mutta nykyisin käytetään yleisimmin pylväsagglutinaatiomenetelmiä, joissa reaktiot tapahtuvat kaupallisten korttien mikroputkissa. Kortit vaativat vain vähäisen näytemäärän ja ovat herkkiä ja spesifisiä. Nämä menetelmät ovat automatisoitavissa tai voidaan suorittaa puoliautomaattisena systeeminä. Reaktiokortti sisältää usein kuusi mikroputkea, joiden yläosassa on reaktioalue ja alaosassa väliaine eli geeli tai lasihelmet. Tutkimuksesta riippuen väliaine voi olla neutraalia tai sisältää valmiita reagensseja. Esimerkiksi veriryhmämäärytyksessä anti-A, -B ja -D reagenssit ovat valmiina väliaineissa. (Delafor-Weiss & Chizhevsky, 2005). Mikroputkien yläosaan pipetoidaan näytemateriaali sekä mahdollisesti tarvittavat reagenssit. Epäsuorassa menetelmässä näyttettä inkuboidaan. Kortit sentrifugoidaan, jolloin geeli pysäyttää agglutinoituneet anti-geeni-vasta-ainekompleksit. Vapaat punasolut pääsevät kulkeutumaan väliaineen läpi muodostaen punasolunapin pylvään pohjalle. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 55.) Reaktivoimakkuuksiin voidaan vaikuttaa esimerkiksi entsyymikäsittelyillä, inkubaatiolämpötilan ja -ajan tai pH:n muuttamisella. (Johns ym. 2015, 45.)

Bio-Radin LISS/Coombs ID-card (kuva 1) on tarkoitettu käytettäväksi suorissa ja epäsuorissa antiglobuliinimenetelmissä. Se soveltuu vasta-aineiden seulomiseen ja tun-

nistukseen, sopivuuskokeisiin, sekä Coombsin kokeeseen. Valmistaja suosittelee, että LISS/Coombs korttia käytettäessä käytetään sille tarkoitettuja ID-DiaCell ja ID-DiaPanel testisoluja. Kortissa on kuusi mikrokyvettä, joiden sisältämässä geelissä on valmiina polyspesifistä AHG:ta (anti-human globulin), jossa on kanin anti-IgG:tä ja monoklonaalista anti-C3d:tä. AHG tunnistaa punasolun pintaan kiinnittyneen vasta-aineen tai C3d:n, ja liittää yhteen punasolut. Näytteeksi käy sitraatti-, EDTA-, tai CPD-A- putkiin tai lisääaineettomaan putkeen otettu näyte. Jos näytteeksi käytetään seerumia plasman sijasta, on näyte sentrifugoitava 10 minuutin ajan 1500 G:ssä. Seerumin pitää olla kirkasta ja siihen ei saa jäädä fibriinijäämiä, jotka häiritsevät reaktioita. (Bio-Rad, a.)

Vasta-aineseulontaa ja tunnistusta tehtäessä kortin kaivoihin pipetoidaan ensin testisolu-reagensseja ja sen jälkeen potilaan tai luovuttajan plasmaa tai seerumia. Kortin yhteen mikrokaivoon tehdään myös autokontrolli, johon käytetään potilaan omaa punasolususpensiota sekä potilaan omaa seerumia tai plasmaa. Korttia inkuboidaan 37 °C:ssa 15 minuuttia ja sentrifugoidaan 10 minuuttia sen jälkeen. Tämän jälkeen kaivot luetaan ja kirjataan tulokset. (Bio-Rad, a.)

Bio-Rad:in NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins –korttia (kuva 2) hyödynnetään kylmävasta-aineiden tutkimisessa. Tässä työssä käytetään kortista nimeä NaCl/Enzyme-geelikortti. Suolaliuostekniikalla voidaan seuloa ja identifioida vasta-aineita, jotka reagoivat +4 °C:ssa tai 18 - 25 °C:ssa eli huoneen lämpötilassa. Tällaisia vasta-aineita ovat esimerkiksi anti-M, -N, P1, -Lea, -Leb ja -I. Entsyymitekniikka voidaan käyttää hyödyksi vasta-aineseulonnassa, kun tarvitaan lisäherkkyttä. Entsyymitekniikka ei kuitenkaan sovellu kylmävasta-aineiden tutkimiseen. (Bio-Rad, b.)

NaCl/Enzyme-kortin kuusi mikrokyvettä sisältää neutraalia geelisuspensiota. Näytteeksi korttiin käy EDTA-, sitraatti- tai CPD-A- putkiin otetut näytteet. Kuitenkin myös lisääaineettomaan putkeen otettu näyte kelpaa. Korttiin voidaan käyttää plasmaa tai seerumia potilaan näytteestä. (Bio-Rad, b.)

Vasta-aineseulonnan ja -tunnistuksen suorittaminen tapahtuu samalla tavalla kuin edellä kerrotussa LISS/Coombs-kortissa. Kortin inkubointi voidaan haluttaessa tehdä joko huoneenlämmössä tai +4 °C:ssa. (Bio-Rad, b.)



KUVA 1. BioRad:in LISS/Coombs-kortti. Kortissa on kolme tyhjää mikrokyvettä (vas.), yksi negatiivinen reaktio ja kaksi ++-reaktiota. (Lahtinen 2018.)



KUVA 2. BioRad:in NaCl/Enzyme-kortti. Kortilla on saatu kolme negatiivista reaktiota (vas.), yksi ++++ -reaktio ja kaksi +++-reaktiota. (Lahtinen 2018.)

Geelikortissa esiintyvät reaktiot on esitetty taulukossa 1. Tulos on positiivinen silloin, jos agglutinoituneet punasolut muodostavat yhtenäisen punaisen tason geelin pinnalle tai punasoluja on levittäytyneenä geeliin. Positiivisia reaktioita on eri vahvuisia: +, ++, +++, ++++. Tulos on negatiivinen, kun mikrokyvetin pohjalla on yhtenäinen punainen solunappi. Merkintä +/- tarkoittaa epäselvää mahdollisesti positiivista reaktiota. (BioRad a,b.)

TAULUKKO 1. Geelikortin reaktioiden lukeminen

-	negatiivinen	yhtenäinen punasolunappi kaivon pohjalla
+/-	negatiivinen/ positiivinen	näytekaivon pohjalla olevan punasolunapin pinta ei ole yhtenäinen tai tasainen
+	positiivinen	punasoluja mikrokyvetin pohjalla ja ripottautuneena pylvään alapuolikkaaseen
++	positiivinen	punasoluja ripottautuneena geelin sekaan koko pylvään alueella
+++	positiivinen	punasoluja geelin pinnalla ja ripottautuneena pylvään yläpuolikkaaseen
++++	positiivinen	punasolut yhtenäisenä levynä geelin pinnalla
kaksois- populaatio	negatiivinen / positiivinen	punasolut reagoivat kahdella eri tavalla: osa punasoluista on selkeänä nappina pohjalla ja osa geelin pinnalla.

Vasta-aineseulonnessa negatiivinen tulos tarkoittaa, ettei potilaan plasmassa ole vasta-aineita seulontasolussa ilmeneviä antigeenejä kohtaan. Positiivinen tulos tarkoittaa vasta-aineiden löytymistä. Tulosta verrataan tunnettujen solupaneelien mukana tulleeseen antigeenikarttaan ja tarkistetaan, että kartan eränumero on sama kuin käytettävillä testisoluiilla. Tutkimusta voidaan jatkaa vasta-aineen tunnistukseen, jos yksi tai useampi testisolukaivo tulee positiiviseksi autokontrollin jäädessä kuitenkin negatiiviseksi. Tällöin kyseessä on luultavimmin spesifinen vasta-aine. Jos testisolukaivoista tulee positiivisia ja myös autokontrolli on positiivinen, kyseessä voi olla epäspesifinen vasta-aine. (Bio-Rad, a,b.)

Vasta-ainetunnistuksessa positiivinen tulos tarkoittaa vasta-aineen löytymistä potilaan tai luovuttajan plasmasta tai seerumista. Tulosta pitää verrata käytettyjen solujen mukana tulleeseen antigeenikarttaan. Esimerkki kartasta on liitteessä 1. Testisolujen eränumeron pitää olla sama kuin kartan eränumeron. Kun verrataan antigeenikarttaa ja saatuja positiivisia ja negatiivisia tuloksia, yleensä saadaan tunnistettua näytteestä löytyvä vasta-aine. Autokontrollin pitää olla negatiivinen, jotta voidaan tehdä tunnistusta. Jos autokontrolli on negatiivinen, mutta kaikki testisolut antavat positiivisen tuloksen, on kyseessä luultavimmin epäspesifinen vasta-aine tai vasta-aine jotain hyvin yleistä antigeeniä kohtaan. Myös autokontrollin ollessa positiivinen muiden testisolujen lisäksi, voi kyseessä olla epäspesifinen vasta-aine. (Bio-Rad, a,b.)

Rajoituksia ja virhelähteitä korttia käytettäessä on monenlaisia. Kortti, jossa on ilmakuplia tai geeliä mikrokyvetin yläosassa tai korttia suojaavassa foliossa, täytyy sentrifugoida ennen käyttöä. Jotkut lääkkeet ja patologiset tilat voivat aiheuttaa positiivisen reaktion antihumaaniglobuliinikokeessa. Kontaminaatio bakteerin tai muun materiaalin kanssa voi aiheuttaa väärää negatiivisia tai positiivisia tuloksia. Jos seerumia ei ole sentrifugoitu hyvin, siihen jääneet fibriinijäänteet voivat sitoa ei-agglutinoituneita punasoluja. Tämä näkyy ohuena punaisena viivana geelin päällä, vaikka muut solut ovat valuneet sentrifugoinnissa geelin pohjalle. Liian vahva tai laimea punasolususpensio voi myös vaikuttaa tuloksiin aiheuttaen poikkeavia tuloksia. (Bio-Rad, a,b.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyön aiheena on vertailla LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korteilla tehtyjä kylmävasta-ainetutkimuksia huoneenlämmössä. Tarkoituksena on vertailla, eroavatko näillä korteilla saadut reaktiot ja niiden voimakkuudet toisistaan. Tarkoituksena on myös vertailla, eroavatko saadut reaktiot korttien välillä selvemmin homo- tai heterotsygoottisten testisolujen kanssa. Työn tavoitteena on tarjota Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskukselle lisätietoa LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien käytettävyydestä kylmävasta-aineiden tutkimuksissa.

Tehtävänä on opinnäytetyön pohjalta selvittää:

1. Eroavatko ja kuinka paljon LISS/Coombs-kortilla sekä NaCl/Enzyme-kortilla analysoitujen näytteiden reaktiovoimakkuudet eroavat toisistaan?
2. Eroavatko saadut reaktiot LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien välillä selvemmin homo- tai heterotsygoottisten testisolujen kanssa?

5 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Kokeelliset tutkimusmenetelmät perustuvat koemuuttujien ja olosuhteiden hallintaan (Anttila 2006, 269). Tarkoituksena on mitata tietyn muuttujan vaikutusta toiseen tarkastelun kohteena olevaan muuttujaan. Tällöin tutkimuksen kohteena olevaa näytettä analysoidaan tarkoin kontrolloiduissa olosuhteissa. Olosuhteita muutellaan harkitusti ja systemaattisesti, tarkoituksena saada aikaan muutos yhdessä tai useammassa muuttujassa. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134.) Tulosten analysointi perustuu seurausten tarkasteluun. Tarkastellaan eroavatko tulokset toisistaan, kun tiettyjä tekijöitä on muutettu, mutta muuten olosuhteet ovat samat (Ronkainen ym. 2013, 63-64). Kaikki koetilanteeseen vaikuttavat taustamuuttujat pyritään pitämään vakioina, paitsi itse koemuuttuja. Vertailukohteena voidaan käyttää kontrolliryhmää. Kokeellisen tutkimusmenetelmän tavoitteina pidetään sisäisen ja ulkoisen validiteetin toteutumista. Kvasikokeelliset tutkimusmenetelmät eivät täytä kaikkia kokeellisen tutkimuksen piirteitä. Yleensä tarkastelun kohteena on tekijöitä, joiden kaikkia muuttujia ei pystytä kontrolloimaan. Kvasikokeellisen tutkimuksen tarkoituksena on kuitenkin pyrkiä mahdollisimman lähelle kokeellista tarkkuutta. (Anttila 2006, 269-274.)

Koeasetelmissa voidaan käyttää myös erilaisia vertailuasetelmia. Vertailuasetelmaa kannattaa tutkimuksessa käyttää, mikäli tutkimusongelma ja aineiston hankinta on suunniteltu vertailun näkökulmasta. Vertailuasemassa voivat olla esimerkiksi kahtena ajanjaksona kerätty aineisto tai erilaisten tilanteiden, ryhmien, toimintatapojen tai ratkaisujen välinen vertailu. Oleellista on vertailtavien kohteiden samankaltaisuus suhteessa ilmiöön, jotta vertailu on mielekästä ja tulokset tulkittavissa. Tutkimuksessa tulee pyrkiä mahdollisimman lähelle kontrolloitua koeasetelmaa. (Ronkainen ym. 2013, 64-66.)

6 OPINNÄYTETYÖPROSESSI JA TUTKIMUSNÄYTTEET

Aihe opinnäytetyölle saatiin alkuvuodesta 2017 Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksesta. Opinnäytetyöprosessi alkoi opinnäytetyösuunnitelman tekemisellä ja tutustumalla aiheeseen. Teoriassa perehdyttiin kylmävasta-aineisiin ja niiden taustaan laajemmin. Tutustuttiin myös verensiirtoserologisiin tutkimuksiin, sekä niissä käytettäviin korttimenetelmiin ja käytössä olevien eri korttien ominaisuuksiin. Työn sisällöstä keskusteltiin verikeskuksen vastuuhoitajan Ella Virolaisen kanssa. Opinnäytetyösuunnitelma valmistui toukokuussa 2017.

Syksyllä 2017 työstettiin varsinaisen opinnäytetyön teoriaosuutta. Tietoa haettiin kirjallisuudesta, tieteellisistä artikkeleista, sekä tutkimusohjekirjoista. Opinnäytetyön sisällöstä neuvoteltiin tarkemmin hematologi Hannele Kinnusen kanssa. Verikeskuksen työntekijät opastivat tulkitsemaan näytteiden tuloksia ja lukemaan vasta-aineiden tunnistukseen kuuluvaa antigeenikarttaa. Verikeskuksen vastuuhoitaja Ella Virolainen perehdytti opinnäytetyöntekijöitä yhden aamupäivän ajan vasta-aineiden tunnistukseen ja korttien käyttöön.

Sopivia näytteitä tuli harvakseltaan ja niiden pakastaminen ei onnistunut, koska se olisi voinut vaikuttaa tuloksiin. Tästä johtuen sovittiin verikeskuksen henkilökunnan kanssa, että he tekevät tutkimukset ja keräävät materiaalia. Koska opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- kortteja, verikeskuksen työntekijät ohjeistettiin tekemään opinnäytetyötä varten kaikki huoneenlämmössä tehtävät vasta-aine tutkimukset kummallakin kortilla, jos epäiltiin kylmävasta-ainetta. He dokumentoivat tekemänsä tutkimukset ja antigeenikartat sekä ottivat koneelta analysoitujen korttien kuvia liitteeksi. Työntekijät keräsivät tutkimusten tuloksia vuoden 2017 keväästä loppuvuoteen asti. Koska näytteitä tuli hyvin harvakseltaan, opinnäytetyöntekijöillä ei ollut mahdollisuutta osallistua tehtäviin tutkimuksiin. Opinnäytetyötä varten tekijät saivat kerätyn aineiston käyttöönsä syyskuussa 2017.

Näytteiden tulosten tutkimisessa hyödynnettiin paljon Microsoft Excel -ohjelmaa, kun tarvittavat tulokset poimittiin aineistosta ja taulukoitiin tarkasteltavaan muotoon. Jokainen näyte käytiin huolellisesti läpi yksitellen, koska aineisto ei ole opinnäytetyöntekijöiden itse keräämä. Syytä oli tarkastaa, että antigeenikartat ja siihen tehdyt merkinnät

täsmäsivät mukana tullessiin tulosteisiin korteista ja reaktioista. Jokaisesta näytteestä tehtiin omat Excel-taulukot, joihin kaikki tarvittavat tiedot siirrettiin. Lisäksi koottiin eri näytteiden reaktiot yhteiseen taulukkoon vertailun helpottamiseksi.

Kaikki kerätyt näytteet eivät kuitenkaan suoraan soveltuneet opinnäytetyöhön. Kaikista näytteistä ei ollut tehty samoja seulontoja ja tunnistuspaneeleja samoissa olosuhteissa, joten vain vertailukelpoiset näytteet valittiin. Alla on kerrottu kriteerit, joiden mukaan näytteet valittiin mukaan.

Kriteerit, joiden perusteella näytteet hyväksyttiin vertailuun sopiviksi:

1. Löydöksenä on kylmävasta-aine, joka on tunnistettu
2. Näytteestä on tehty vasta-aineseulonta huoneenlämmössä LISS/Coombs-kortilla, sekä NaCl/Enzyme-kortilla
TAI
Näytteestä on tehty tunnistuspaneeli huoneenlämmössä LISS/Coombs-kortilla, sekä NaCl/Enzyme-kortilla
3. Näytteessä ei ole vertailua häiritseviä tekijöitä (esim. kaksoispopulaatiota)

Opinnäytetyötä varten kerätyt näytteet ja niiden tiedot, sekä soveltuvuus vertailuun ovat koottuna taulukkoon 2. Tutkittuja näytteitä oli aineistossa yhteensä 15, joista 11:sta oli löydetty kylmävasta-aine, ja 4 oli tunnistamattomia panagglutiineja. Tunnistamattomat vasta-aineet jätettiin kuitenkin pois lopullisesta vertailuaineistosta, sillä ne eivät sovellu kylmävasta-aineiden käyttäytymisen arviointiin. Näytteistä oli tarkoituksena vertailla huoneenlämmössä tehtyjä seulontoja kahdella eri kortilla. Tutkimusaineistoon valittiin tästä syystä vain näytteet, joissa oli huoneenlämmössä tehty seulonta toteutettu kummallakin geelikortilla. Kuudesta näytteestä oli tehty vasta-aineiden seulontoja ja tunnistuspaneeleita LISS/Coombs-kortilla sekä NaCl/Enzyme-kortilla huoneenlämmössä. Neljästä näytteestä oli tehty seulonta huoneenlämmössä vain toisella kortilla. Vain toisella kortilla analysoidut näytteet jätettiin pois lopullisesta tutkimusaineistosta, koska vertailu oli mahdotonta suorittaa. Yhdestä näytteestä oli löytynyt kaksoispopulaatio, mikä viittaa yleensä lähiaikoina toteutettuun oman veriryhmän soluista poikkeavaan verensiirtoon. Kaksoispopulaatio tarkoittaa, että kaivoissa havaitaan selvästi kahdella eri tavalla reagoivia soluja, negatiivisesti ja positiivisesti reagoivia (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 68). Tästä syystä näytettä ei voitu käyttää tuloksien vertailussa. Tutkimusaineistoon soveltu-

via näytteitä kertyi kokonaisuudessaan vain kuusi kappaletta, joista voitiin suorittaa huoneenlämmössä tehtyjen seulontojen vertailu kahden eri kortin välillä.

TAULUKKO 2. Opinnäytetyötä varten kerätyt näytteet

Näyte- nume- ro	Seulonta kummalla- kin kortilla	Paneeli kummalla- kin kortilla	löydetty vasta-aine	muuta	soveltu- vuus ver- tailuun
1	kyllä	kyllä	anti-M		kyllä
2	kyllä	ei	anti-M		vain seulonta
3	ei	kyllä	anti-M		vain paneeli
4	kyllä	kyllä	(auto)anti-M	kaksoispopulaa- tio	ei sovellu
5	kyllä	kyllä	anti-M		kyllä
6	ei	kyllä	anti-M		vain paneeli
7	kyllä	kyllä	anti-M		kyllä
8	ei	kyllä	anti-M		vain paneeli
9	ei	kyllä	anti-M		vain paneeli
10	kyllä	kyllä	anti-M		kyllä
11	kyllä	ei	anti-M		vain seulonta
12	kyllä	kyllä	tunnistama- ton		ei sovellu
13	ei	kyllä	panagglutiini, tunnistama- ton v-a		ei sovellu
14	ei	kyllä	anti-E, anti- Jka, anti-S, tunnistama- ton panagglu- tiini		ei sovellu
15	ei	kyllä	tunnistama- ton v-a	anti-D-suojaus	ei sovellu

Seulontanäytteiden lisäksi työssä vertaillaan myös vasta-aineiden tunnistukseen käytettävien paneelien tuloksia. Tunnistuspaneelit on tehty LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme - korteilla huoneenlämmössä. Tunnistuspaneelien tekemiseen käytetään samoja geelikortteja ja samaa menetelmää kuin vasta-aineseulonnassa. Tunnistuspaneelien vertailussa keskityttiin vertailemaan vain reaktioita korttien välillä, välittämättä kuitenkaan tunnistuksen tuloksesta. Tutkituista näytteistä kahdeksasta oli tehty tunnistuspaneeli huoneen-

lämmössä kummallakin kortilla. Loput näytteet hylättiin tästä vertailusta, koska niissä oli käytetty vain toista korttia tunnistusmenetelmänä. Samasta näytteestä tehtyjä seulontoja ja paneeleita käsiteltiin vertailussa erillisinä.

7 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tulokset on koottu kahteen taulukkoon, jotta näytteiden vertailu eri korteil-la olisi helpompaa. Toiseen on kerätty seulontatutkimusnäytteiden tulokset ja toiseen tunnistuspaneelinäytteiden tulokset. Tunnistuspaneelien taulukko on kooltaan suuri, jonka vuoksi se sijoitettiin teknisistä syistä työn liitteisiin.

7.1 Seulontanäytteiden vertailu

Seulontatutkimusnäytteiden tulokset on koottu taulukkoon (taulukko 3). Seulontanäyt-teitä on vertailussa yhteensä 6. Näytteet on numeroituina vasemmanpuolimmaisessa sarakkeessa, ja oikealle puolelle on eroteltu LISS/Coombs-kortilla ja NaCl/Enzyme-kortilla huoneenlämmössä tehtyjen vasta-aineseulontojen tulokset. Kummallakin kortil-la on käytetty samoja seulontasoluja I, II, III, jotka ovat merkittyinä taulukkoon reakti-oiden yläpuolelle. Koska seulonta on suoritettu kolmella solulla, reaktioita on jokaisessa kohdassa kolme, eli näytteen reaktiot seulontasolujen I, II ja III kanssa. Koska näytteet on kerätty pitkän ajanjakson sisällä, soluerät seulontasoluissa ovat vaihtuneet eri näyt-teiden välillä. Testisolujen antigeeniprofiili eroaa soluerien välillä, minkä takia anti-M:n suhteen homo- ja heterotsygoottiset testisolut vaihtelevat näytteissä.

TAULUKKO 3. Tutkimusnäytteiden vasta-aineiden seulonta, huoneenlämmössä. (Reaktiot M-antigeenin suhteen homotsygoottisten testisolujen kanssa merkitty tähdellä (*))

Vasta-aineiden seulonta, huoneenlämmössä						
	LISS/Coombs-kortti			NaCl/Enzyme-kortti		
Testisolu	I	II	III	I	II	III
Näyte 1	++	++*	+/-	++	++*	-
Näyte 2	-	+ *	+*	-	+/- *	-*
Näyte 5	++	-	++++*	++	-	++++*
Näyte 7	++*	+++*	-	++*	++*	-
Näyte 10	-	-	++*	-	-	+*
Näyte 11	++*	++*	-	-*	-*	-

Taulukossa 3 viiva (-) kuvaa negatiivista reaktiota ja plus-merkit (+, ++, +++, +++) erivahvuisia positiivisia reaktioita. Merkinällä +/- tarkoitetaan epäselvää, mahdollisesti positiivista reaktiota. Taulukkoon on myös merkitty tähdellä (*) ne reaktiot, joissa M-antigeeni on esiintynyt homotsygoottina.

Seulonnan tuloksista (taulukko 3) voi nähdä, että reaktiot ovat täysin yhteneväisiä kummallakin kortilla vain näytteessä 5. Jos tarkastellaan ainoastaan positiivisia ja negatiivisia reaktioita, välittämättä positiivisen tuloksen voimakkuudesta, yhteneväiset tulokset on saatu myös näytteillä 7 ja 10. Näytteissä 1, 2 ja 11 on LISS/Coombs-kortilla saatu positiivisia reaktioita sellaisissa kohdissa, joissa tulos on ollut negatiivinen NaCl/Enzyme-kortilla. Yksikään anti-M-vasta-ainetta sisältävä näyte ei ole reagoinut seulonnassa voimakkaammin NaCl/Enzyme-kortilla kuin LISS/Coombs-kortilla. Jos tuloksia tarkastellaan reaktio kerrallaan, huomataan että seitsemässä kohdassa on LISS/Coombs-kortilla saatu joko NaCl/Enzyme-kortin negatiivinen reaktio positiiviseksi tai positiivinen tulos vahvemmin positiiviseksi. Neljässä reaktiossa on NaCl/Enzyme-kortin negatiivinen tulos saatu positiiviseksi LISS/Coombs-kortilla. Kolmessa reaktiossa on tulos muuttunut vahvemmin positiiviseksi LISS/Coombs-kortilla kuin se oli NaCl/Enzyme-kortilla.

7.2 Tunnistuspaneelinäytteiden vertailu

Tunnistuspaneeleja, jotka soveltuivat mukaan vertailuun, oli yhteensä 8. Taulukko näytteiden tunnistuspaneelien tuloksista löytyy liitteestä (Liite 2). Tunnistuspaneelien merkinnät ovat samanlaisia kuin seulontojen merkinnät, jotka on selitetty kappaleessa 8.1. Taulukossa (Liite 2) on esitetty kaikki tunnistuspaneelien tulokset niin, että näytteet ovat vasemmalla pystyakselilla numerojärjestyksessä. Vaaka-akselilla on paneelin jokainen solu eri sarakkeessa. Jokainen näyte on tehty LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme-kortilla ja näiden tulokset on eritelty jokaisen solun kohdalla rinnakkain merkeillä L ja N.

Näytteiden tulokset ovat monilta osin hyvin yhteneväisiä, riippumatta siitä kummalla kortilla testi suoritettiin. Näytteessä 1 anti-M:n suhteen homotsygootit testisolut reagoivat näytteen kanssa yhtä vahvasti kummallakin kortilla, mutta kaksi heterotsygoottista testisolua reagoi vahvemmin LISS/Coombs-kortilla. Näytteet 3, 9 ja 10 reagoivat heikosti ja vain M-antigeenin suhteen homotsygooteilla soluilla positiivisesti. Näistä 11 positiivisesta reaktiosta kuusi reaktiota oli vahvempia LISS/Coombs-kortilla. Muut positiiviset reaktiot olivat yhtä vahvoja kummallakin geelikortilla. Näytteet 6 ja 7 reagoivat pääasiassa vain homotsygooteilla soluilla. Kummallakin näytteellä on kuitenkin yksi reaktio heterotsygoottisilla soluilla. Tämä yksi reaktio molemmilla näytteillä on vahvempi LISS/Coombs-kortilla. Näytteiden homotsygoottisilla soluilla tapahtuneista kahdeksasta reaktiosta neljä reagoi vahvemmin LISS/Coombs-kortilla, muut neljä yhtä vahvasti kummallakin kortilla. Näyte 8 reagoi sekä M-antigeenin suhteen homotsygooteilla, että muilla soluilla positiivisesti. Kaikilla homotsygooteilla soluilla saatiin positiivinen reaktio ja se oli kaikilla myös vahvempi LISS/Coombs-kortilla. Heterotsygoottisilla soluilla saadut positiiviset reaktiot näytteellä 8 ovat yhtä vahvoja kummallakin geelikortilla. Koko muusta näyttemateriaalista poiketen näyte 5 reagoi vahvemmin NaCl/Enzyme-kortilla. Kaikki NaCl/Enzyme-kortilla saadut vahvemmat reaktiot olivat heterotsygoottisten testisolujen kanssa. Homotsygoottisten testisolujen kanssa näyte 5 antoi kummallakin kortilla yhtä vahvat reaktiot.

7.3 Tulokset

Vasta-aineiden seulonnoista saatiin kummallakin kortilla 18 reaktiota, eli 18 vertailukohtaa. Näistä seitsemässä kohdassa LISS/Coombs-kortin reaktivoimakkuus on suurempi verrattuna NaCl/Enzyme-kortin reaktioiden voimakkuuksiin. Tämä on 38,9 % tarkastelluista reaktioista. Yhdessäkään vertailukohteessa ei NaCl/Enzyme-kortilla saatu LISS/Coombs-korttia voimakkaampaa tulosta, ja 11 reaktiossa tulos oli sama kummallakin kortilla. Kun tarkastellaan tuloksia näyte kerrallaan, viisi kuudesta seulonnassa testatusta näytteestä sisälsi eroavia tuloksia reaktiossa korttien välillä. Vain yhden näytteen tulokset olivat täysin yhteneväiset kummallakin kortilla. Huomattavaa oli myös, että yksi näyte reagoi kaikilla testisolulla täysin negatiivisesti NaCl/Enzyme-kortilla, mutta LISS/Coombs-kortilla kahdella testisolulla näyte reagoi positiivisesti.

Tunnistuspaneeleita tehtiin kahdeksalle näytteelle ja käytössä oli 11 testisolua. Tällöin vertailuun saatiin 88 reaktioparia. Reaktiopareista 18 reaktiota on voimakkaampia LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tämä on 20,5 % tunnistuspaneelien reaktioista. Muusta aineistosta poiketen, yhdellä näytteellä neljä reaktiota reagoivat kuitenkin vahvemmin NaCl/Enzyme-kortilla.

Heterotsygoottisia positiivisia reaktioita on aineistossa yhteensä vain 14 reaktioparia, joista viisi reagoi kummallakin kortilla yhtä voimakkaasti, viisi LISS/Coombs-kortilla voimakkaammin ja neljä saman näytteen reaktiota koko aineistosta poiketen NaCl/Enzyme-kortilla voimakkaammin. Anti-M suhteen homotsygoottien testisolujen kanssa anti-M reagoi LISS/Coombs-kortilla systemaattisesti vähintäänkin yhtä hyvin tai voimakkaammin. Sen sijaan heterotsygoottisten testisolujen kanssa saadut reaktiot olivat vaihtelevia näytteiden välillä. Aineiston ainut poikkeuksellisesti reagoinut näyte (N5), reagoi NaCl/Enzyme-kortilla LISS/Coombs-korttia voimakkaammin juurikin heterotsygoottisten testisolujen kanssa.

7.4 Johtopäätökset

Tämän materiaalin perusteella anti-M reagoi LISS/Coombs-kortilla voimakkaammin ja positiivinen tulos saadaan herkemmin. Sekä seulonnoissa että tunnistuspaneeleissa, LISS/Coombs-kortin reaktiot olivat positiivisilla reaktioilla vahvempia kuin

NaCl/Enzyme-kortilla. Työstä saatujen tulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätös, että anti-M tulee huoneenlämpötilassa herkemmin esiin LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tämä pätee erityisesti M-antigeenin suhteen homotsygoottisilla testisolulla, sillä reaktiot olivat näyttemateriaalissa systemaattisesti yhtä voimakkaita tai voimakkaampia LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Koko aineistossa on 11 reaktioparia, jotka ovat antaneet NaCl/Enzyme-kortilla täysin negatiivisen reaktion, mutta LISS/Coombs-kortilla positiivisen reaktion. Saatujen reaktioiden perusteella erityisesti heikko anti-M tulee paremmin esiin LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan kylmävasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa suositella LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme kortteja käytettävän rinnakkain.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön aiheena oli vertailla huoneenlämmössä kahta kylmävasta-aineiden seulontaan ja tunnistukseen käytettävää geelikorttia: BioRadin LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- kortteja. Tarkoituksena oli vertailla geelikorttien reaktioiden ja reaktivoimakkuuksien eroavaisuuksia ja selvittää näyttäytyvätkö korttien eroavaisuudet eri tavalla käytettäessä antigeenin suhteen homo- tai heterotsygoottisia testisoluja. Työn tavoitteena oli tarjota Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskukselle hyödyllistä lisäinformaatiota LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien käytettävyydestä kylmävasta-aineita tutkittaessa.

8.1 Tulosten arviointi

Opinnäytetyön perusteella LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien reaktiot eroavat toisistaan jonkin verran. Tulosten perusteella näyttää, että LISS/Coombs-kortilla saadaan anti-M paremmin esille kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Tätä havaintoa tukee myös Koreassa tehty tutkimus, jossa tutkittiin NaCl/Enzyme-kortin hyödyllisyyttä vasta-aineiden tunnistuksessa. Tutkimuksessa ilmeni tapauksia, joissa anti-M pystyttiin identifioimaan ainoastaan LISS/Coombs-kortilla, mutta ei NaCl/Enzyme-kortilla. (Lee, Cho, Shin & Ryang 2006.)

Toisena tavoitteena oli selvittää saatujen reaktioiden perusteella ilmenevätkö eroavaisuudet LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme- korttien välillä selvemmin M-antigeenin suhteen homo- tai heterotsygoottisten testisolujen kanssa. Tulosten perusteella erityisesti homotsygoottisten testisolujen kanssa reaktiot olivat systemaattisesti yhtä voimakkaita, tai voimakkaampia LISS/Coombs-kortilla kuin NaCl/Enzyme-kortilla. Heterotsygoottisten testisolujen kanssa saadut reaktiot olivat vaihtelevia näytteiden välillä.

Korttien vertailu kylmävasta-aineiden tunnistamisessa toteutui vain osittain, sillä opinnäytetyössä käytetyssä aineistossa oli edustettuna kylmävasta-aineista vain anti-M, eikä näiden tulosten perusteella voida arvioida muiden kylmävasta-aineiden käyttäytymistä LISS/Coombs- ja NaCl/Enzyme-korteilla. Kuitenkin anti-M on kylmävasta-aineista laboratoriossa yleisin, ja näin ollen tärkein tämän tutkimuksen kannalta. Opinnäytetyö on kokonaisuudessaan verikeskuksen saatavilla, ja toivottavaa olisi, että tämä vertailu

tukisi verikeskuksen työntekijöiden käytännön kokemuksia kylmävasta-aineiden käyttäytymisestä.

Kylmävasta-aineiden olemassaolo ei välttämättä aiheuta verensiirron kannalta toimenpiteitä, eikä tunnistaminen ole välttämätöntä koska yleensä verta voidaan siirtää serologisen sopivuuskokeen perusteella. Tästä herää kysymys, onko vasta-aineen tunnistaminen aina tarpeellista. Tunnistaminen on tärkeää, jotta saadaan varmuus, ettei kyse ole jostain kliinisesti merkityksellisemmästä vasta-aineesta. Jos vasta-aine reagoi heikosti, sitä ei myöskään saada poissuljettua, jolloin tuloksena joudutaan vastaamaan tunnistamaton vasta-aine. Tunnistamaton vasta-aine hidastaa laboratoriosessia ja sopivan veren löytyminen voi hankaloitua. Verensiirtoserologiset tutkimukset nopeutuvat, jos vasta-aine saadaan nopeasti tunnistettua.

On myös hyvä miettiä mikä on käytettävälle kortille sopiva herkkyysaste. Herkin kortti ei välttämättä ole aina paras vaihtoehto. Seulonnassa liian herkällä kortilla saattaa tulla esiin myös kliinisesti täysin merkityksettömiä vasta-aineita, joiden löytyminen tutkimuksissa aiheuttaa ylimääräistä ja tarpeetonta lisätyötä. On kuitenkin tärkeää, että käytettävä menetelmä on tarpeeksi herkkä, jotta kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet tulevat varmasti esiin. Herkällä kortilla vasta-aineet saadaan yleensä myös nopeasti tunnistettua. Tulosten arvioinnissa pitää ottaa myös huomioon, että testisolut ovat humaanina materiaalia. Testisolujen sisältö vaihtelee erien välillä hieman. Tämä voi vaikuttaa reaktiivoimakkuuksiin. Siksi myös tuloksiin voi hieman vaikuttaa se, ettei kaikkia näytteitä tutkittu saman erän testisoluilla.

8.2 Luotettavuus

Työn luotettavuutta, eli reliabiliteettia heikentää merkittävästi näytteiden pieni määrä, minkä takia tuloksista ei voida tehdä täysin luotettavia johtopäätöksiä. Valitettavasti osa saaduista näytteistä jouduttiin hylkäämään vertailuun mukaan otettavasta materiaalista, sillä näytteistä suoritettavat vertailulle välttämättömät tutkimukset olivat puutteellisia. Kuitenkaan muutaman näytteen hylkäämisellä ei ollut merkittävää vaikutusta työn luotettavuuteen, sillä jotta voidaan tehdä päätöksiä korttien käytöstä ja niiden toiminnasta, olisi näytemäärän pitänyt olla huomattavasti suurempi. Opinnäytetyöhön varatun ajanjakson puitteissa merkittävästi suuremman otoskoon saaminen olisi ollut mahdotonta, sillä

kylmävasta-aineita tulee esiin laboratoriossa harvakseltaan. Koska näinkin pieneen aineistoon mahtui yksi täysin päinvastaisesti käyttäytyvä näyte (N5), ei voida ennustaa, paljonko erilaista variaatiota anti-M:n käyttäytymisessä voi esiintyä.

Työn luotettavuutta lisää kuitenkin se, että tutkimukset tehtiin oikeissa verikeskuslaboratorio-olosuhteissa ja näyttemateriaalia keränneet henkilöt ovat verikeskuksessa työskenteleviä ammattilaisia. Tutkimukset suoritettiin pääosin IH-1000 -automaatilla, jolloin olosuhteet tutkimuksissa pysyivät tasalaatuisena eri näytteiden välillä.

Opinnäytetyön teoriaosuuden tekemisessä on käytetty monipuolisesti erilaisia lähdeaineistoja, muun muassa kirjoja, tieteellisiä artikkeleita ja Fimlab Laboratoriot Oy:n työohjeita. Aiheesta on saatavilla vain vähän suomenkielistä materiaalia, minkä vuoksi työssä on käytetty suomenkielisten materiaalien lisäksi paljon ulkomaista lähdemateriaalia. Suomalaisten SPR Veripalveluiden asiantuntijoiden, yliopistosairaaloiden verikeskuslääkäreiden ja verensiirtoa toteuttavien lääkäreiden yhteistyönä laadittu Verensiirto-opas on ollut työssämme yksi päälähteistä, sillä työhön on ollut tärkeää saada ajankohtaista tietoa erityisesti Suomen verensiirtotoiminnan käytänteistä. Koska verensiirtoihin liittyvät tutkimukset kehittyvät koko ajan ja muun muassa veriryhmäjärjestelmistä on tullut paljon uutta tietoa viimevuosina, on lähdemateriaaliksi pyritty valitsemaan mahdollisimman tuoreita julkaisuja.

8.3 Eettisyys

Eettisyysasiat nousevat esille erityisesti, kun työssä käytettiin oikeiden potilaiden tuloksia ja identifiointitiedot ovat näkyvillä IH-1000 -automaatilta saaduissa tulosteissa sekä antigeenikartoissa. Työ on kuitenkin eettisesti huolellisesti suoritettu, sillä materiaalit olivat vain opinnäytetyöntekijöiden ja Fimlab Laboratoriot Oy:n työntekijöiden saatavilla ja työn valmistuttua ne palautettiin verikeskuksen haltuun. Opinnäytetyössä näytteitä ei missään vaiheessa käsitelty potilaiden nimillä vaan näytteet numeroitiin juoksevalla numerolla. Työn tuloksia ei pysty enää yhdistämään tutkittuihin henkilöihin.

8.4 Jatkotutkimukset

Jatkotutkimuksena kannattaisi tehdä samantapainen tutkimus laajemmalla aineistolla, jotta saataisiin laajemmin selvitettyä kylmävasta-aineiden käyttäytymistä eri geelikor-teilla. Toivottavaa olisi saada laajempaan aineistoon myös muita kylmävasta-aineita kuin anti-M, jotta tuloksia saataisiin myös harvinaisempien vasta-aineiden käyttäytymi-sestä näillä korteilla. Jos tulokset olisivat saman suuntaisia muillakin vasta-aineilla, voi-si tulevaisuudessa olla mahdollista vähentää tai jopa luopua NaCl/Enzyme-kortin käy-töstä kylmävasta-aineiden tunnistuksessa.

Tämän opinnäytetyön aineistossa oli 11 reaktioparia, jotka ovat antaneet NaCl/Enzyme-kortilla täysin negatiivisen reaktion, mutta LISS/Coombs-kortilla positiivisen reaktion. Aiheesta voisi tehdä myös tutkimuksen, jossa selvitetään, onko ero korttien välillä mer-kittävä vasta-aineen tunnistuksen kannalta. Eli ilmeneekö tapauksia, joissa vasta-aine saadaan tunnistettua LISS/Coombs- kortilla, mutta joudutaan vastaamaan tunnistamat-tomana, kun tunnistuspaneelit tehdään NaCl/Enzyme- kortilla.

8.5 Työn suoritus

Opinnäytetyön suoritus ei sujunut täysin alkuperäisen suunnitelman mukaan, mutta työ muokkautui matkan varrella sopivaksi kokonaisuudeksi. Aluksi teorian laajuuden hah-mottaminen oli vaikeaa. Teoriaosuuden kirjoittaminen aiheen rajaamisen jälkeen sujui kuitenkin hyvin. Valmis materiaali asetti haasteita meille tekijöille, koska antigeenikar-tat ja merkintätavat olivat vieraita. Paljon aikaa kuluikin tulosten tulkitsemiseen ja nii-den kirjoittamiseen auki taulukoihin. Taulukoiden rakentaminen oli myös yksi työn suu-rista haasteista. Tunnistuspaneelien tuloksien saaminen yhteen taulukkoon vaati paljon työtunteja ja silti jouduimme tekemään kompromissin ja esittämään taulukon liitteenä. Opinnäytetyön tekeminen oli antoisaa meille, koska aiheesta oppi paljon uutta. Aina ei ollut helppoa hahmottaa asioita, jolloin lopputulos tuntuikin palkitsevammalta. Toi-vommeikin, että työstä on hyötyä myös Fimlab Laboratoriot Oy:n työntekijöille.

LÄHTEET

Anttila, P. 2006. Tutkiva toiminta ja ilmaisu, teos, tekeminen. 2. p. Hamina: Akatiimi.

Bajpai, M., Kaur, R., & Gupta, E. 2012. Automation in Immunohematology. Asian Journal of Transfusion Science, 6(2), 140–144. Luettu 20.2.2018.

<http://doi.org/10.4103/0973-6247.98914>

Bio-Rad. a. LISS/Coombs. Pakkausohje. Luettu 13.11.2017. https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B004014_50531_02.13_FI.pdf

Bio-Rad. b. NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins. Pakkausohje. Luettu 13.11.2017.

https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B005014_50520_06.13_FI.pdf

Blaney, K. D. & Howard, P. R. 2008. Basic & applied concepts of immunohematology. 2nd ed. St. Louis (MO): Mosby Elsevier. s. 96, 170-173.

Delafor-Weiss, E. & Chizhevsky, V. 2005. Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience. Labmedicine. s. 489-492. Tulostettu 30.10.2017.

Eklblom-Kullberg, S., Savolainen, E., Koski, T., Mahlamäki, E. H., Sainio, S., Salmela, K. & Tienhaara, A. 2018. Verensiirto-opas. 1. painos. Helsinki: Duodecim.

Fimlab Laboratoriot Oy. a. Yritys. Luettu 1.12.2017.

https://www.fimlab.fi/sivu.tmpl?sivu_id=138

Fimlab Laboratoriot Oy. b. Laboratoriot toiminta. Luettu 1.12.2017

https://www.fimlab.fi/sivu.tmpl?sivu_id=190

Fimlab Laboratoriot Oy. 2016. Veriryhmävasta-aineet, tunnistus. [työohje]. Tulostettu 3.11.2017.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2015. Veriryhmävasta-aineet, seulonta. [työohje]. Luettu 1.12.2017.

https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6218;id=13951

Hall, A. & Yates, C. 2010. Immunology. Oxford: Oxford University Press.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uud. p. Helsinki: Tammi.

IH-1000, Fully automated system for ID-Cards. 2010. Bio-Rad Laboratories. Luettu 20.2.2018. <http://www.galenica.cl/wp-content/uploads/2015/01/Cat%C3%A1logo-IH1000.pdf>

Johns, G., Gockel-Blessing, E., Zundel, W., Denesiuk, L. 2015. Clinical laboratory blood banking and transfusion medicine: Principles and practices. Boston: Pearson Education. s.65-67, 143-144, 290-292.

- Kumawat, V., Jain, A., Marwaha, N., & Sharma, R. R. 2015. Anti-N antibody reacting at 37°C: An unusual occurrence interfering with routine testing: Two interesting cases. *Asian Journal of Transfusion Science*, 9(1), 92–93. Tulostettu 30.10.2017.
<http://doi.org/10.4103/0973-6247.150964>
- Lee, J. S., Cho, D., Shin, M. G. Ryang, D. W. 2006. Usefulness of NaCl/Enzyme Gel Test for the Identification of Unexpected Antibodies. *Korean J Lab Med*. 26(3): 204-209. Luettu 29.4.2018.
- Lydyard, P., Whelan, A. & Fanger, M. W. 2011. *Immunology*. 3rd ed. New York: Garland Science.
- Makroo, R. N., Arora, B., Bhatia, A., Chowdhry, M., & Luka, R. N. 2014. Clinical significance of antibody specificities to M, N and Lewis blood group system. *Asian Journal of Transfusion Science*, 8(2), 96–99. Tulostettu 30.10.2017.
<http://doi.org/10.4103/0973-6247.137442>
- Mitra, R., Mishra, N., & Rath, G. P. 2014. Blood groups systems. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), 524–528. <http://doi.org/10.4103/0019-5049.144645>
- Mohanani, N., Henry, N., Rafi, A. M., & Innah, S. J. 2016. Anti IH: An antibody worth mention. *Asian Journal of Transfusion Science*, 10(2), 152–154. Luettu 1.11.2017.
<http://doi.org/10.4103/0973-6247.187941>
- Ronkainen, S., Pehkonen, L., Lindblom-Ylänne, S. & Paavilainen, E. 2013. *Tutkimuksen voimasanat*. 1.-2. p. Helsinki: Sanoma Pro.
- Shah, S. P., Kalgutkar, S. M., Sawant, R. B., & Deshpande, A. S. 2016. Anti-M antibodies: Biphasic (reactive at room temperature and at 37°C): A case series. *Asian Journal of Transfusion Science*, 10(2), 159–160. Tulostettu 31.10.2017.
<http://doi.org/10.4103/0973-6247.172181>
- Tondon, R., Kataria, R., & Chaudhry, R. 2008. Anti-M: Report of two cases and review of literature. *Asian Journal of Transfusion Science*, 2(2), 81–83. Luettu 1.11.2017.
<http://doi.org/10.4103/0973-6247.42695>
- Turgeon, M. L. 2014. *Immunology & serology in laboratory medicine*. 5th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Mosby
- Verensiirto-opas. 2006. 3. uud. p. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.
- Veripalvelu. 2017a. Tutkimusohjekirja. Punasoluvasta-aineiden tunnistus. Päivitetty 4.1.2017. Luettu 17.10.2017. <https://www.veripalvelu.fi/terveydenhuollon-ammattilaiset/laboratoriopalvelut/tutkimusohjekirja>
- Veripalvelu. 2017b. Veriryhmätutkimukset. Suomen Punainen Risti. Päivitetty 18.1.2016, Luettu 14.10.2017 <https://www.veripalvelu.fi/terveydenhuollon-ammattilaiset/laboratoriopalvelut/veriryhma>
- Verivalmisteiden käytön opas 2016. 2018. Punainen risti, veripalvelu. 3.versio. Päivitetty 2018:1. Luettu 20.2.2018.
<http://view.24mags.com/mobilev/06245f57f379dc98aaf1f0ac499b932e#/page=2>

Liite 2. Tutkimukseen käytettyjen vasta-ainetunnistuspaneelien tulokset.

LISS/Coombs (L) +NaCl/Enzyme (N)												
Testisolu	Kortti	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Näyte 1		-	++	+/	++	++	+/	-	-	-	++	-
Näyte 3		-	+*	-	++	+*	-	-	-	-	+*	-
Näyte 5		++++*	++	-	++++*	++	++	-	++	++++*	+++*	-
Näyte 6		-	+++*	-	+++*	++	+	-	-	-	+++*	-
Näyte 7		+/	-	+++*	-	-	-	++	-	++	++	-
Näyte 8		+++*	++	++	-	-	-	+++*	++	-	+++*	++
Näyte 9		+*	-	-	-	-	-	+*	-	-	+*	+*
Näyte 10		-	-	-	+*	-	-	+++*	-	-	-	+*