

Nina Grasutis ja Milla Kulin

Muutokset anti-D ja anti-Fya-vasta-aineiden pitoisuuksissa sekä näytteiden laadussa erilaisten inkubaatio-olosuhteiden seurauksena

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Sosiaali- ja terveysalan
ammattikorkeakoulututkinto
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
19.4.2011

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Nina Grasutis ja Milla Kulin Muutokset anti-D ja anti-Fya-vasta-aineiden pitoisuuksissa sekä näytteiden laadussa erilaisten inkubaatio-olosuhteiden seurauksena 47 sivua + 6 liitettä 19.4.2011
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumismuutokset	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Opettaja Irma Niittymäki Asiantuntija Katri Haimila
<p>Immuunipuolustuksen tehtävä on tuottaa vasta-aineita elimistölle vieraita solun pintarakenteita eli antigeenejä kohtaan. Vasta-ainetuotannon aktivaatio on mahdollista myös raskauden aikana, jos sikiön punasolujen pinnalla on antigeenejä, joita äidillä ei ole. Äidin vasta-ainetuotannon alkamista sikiön punasolujen antigeenejä kohtaan kutsutaan raskauden aikaiseksi immunisaatioksi ja sen seurauksena sikiö tai vastasyntynyt voi sairastua hemolyyttiseen tautiin. Taudin aste voi vaihdella ja on riippuvainen kyseisen antigeenin immunogeenisyydestä sekä vasta-aineen molekyylikoon suuruudesta. Tautia voivat aiheuttaa ainoastaan IgG-luokan vasta-aineet, jotka pienen molekyylikokonsa vuoksi mahtuvat kulkeutumaan istukan kautta äidistä sikiöön.</p> <p>Kaikki Suomen raskaana olevien naisten vasta-aineseulonnat ja niihin liittyvät jatkotutkimukset on keskitetty Suomen Punaisen Ristin Veripalveluun. Näiden vasta-ainetutkimusten tavoitteena on löytää immunisoituneet äidit ja ehkäistä näin sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, muuttuvatko vasta-ainepitoisuudet ja kärsiikö näytteen laatu pitkittyneen kuljetusajan tai poikkeavien kuljetuslämpötilojen seurauksena. Tutkittaviksi vasta-aineiksi valikoituivat anti-D ja anti-Fy^a, joita tutkittiin 235 testinäytteestä. Testiolosuhteet, joissa näytteitä säilytettiin, olivat 6 ja 21 vuorokauden seisotusajat sekä +1 °C ja +35 °C asteen seisotuslämpötilat.</p> <p>Vasta-aineseulonnat sekä näytteen laadun testaaminen tehtiin koneellisesti ja vasta-ainepitoisuuksien tutkimukset vasta-ainetitterillä koeputkissa. Tulokset osoittivat, etteivät testiolosuhteet vaikuttaneet vasta-ainepitoisuuksiin kummankaan vasta-aineen kohdalla. Näytteen laatu sen sijaan kärsi huomattavasti etenkin 21 vuorokauden sekä kummankin lämpötila-altistuksen seurauksena. Tulosten perusteella voidaan pitkällä tähtäimellä kehittää neuvolanäytetutkimuksia entisestään ja mahdollisesti siten vaikuttaa sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin esiintyvyyteen.</p>	
Avainsanat	punasoluvasta-aineet, anti-D, anti-Fy ^a , sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti

Authors Title	Nina Grasutis and Milla Kulin Changes in the Concentrations of Antibodies Anti-D and Anti-Fy ^a and in the Quality of the Samples as a Result of Different Incubation Times and Temperatures
Number of Pages Date	47 pages + 6 appendices 19 April 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Irma Niittymäki, Senior Lecturer Katri Haimila, Laboratory Specialist
<p>The immune system produces antibodies against unfamiliar antigens. If the red cells of the fetus have antigens that red cells of the mother do not, mother's antibody production activates. The mother's immunisation can lead to a condition called the hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). The severity of this disease depends on the immunogenicity of the antigen and the antibody's molecular size. Only IgG-antibodies have a molecular size small enough to fit through the placenta and into the fetus' blood circulation, causing HDFN.</p> <p>The antibody-screenings and antibody-related assays of pregnant women in Finland are conducted by the Finnish Red Cross Blood Service. The goal is to prevent HDFN through detecting the immunised women.</p> <p>The objective of our study was to find out if the concentrations of antibodies and the quality of the samples change due to stretched transportation times and abnormal transportation temperatures. The antibodies that were selected to our study were anti-D and anti-Fy^a and the amount of studied samples was 235. The samples were stored in different test conditions; prolonged incubation periods of 6 and 21 days and incubation temperatures of +1 and +35 degrees Celsius.</p> <p>The quality of the samples was tested by analyzers and the antibody concentrations were tested by titration in test tubes. The results showed that the test conditions had no effect on the antibody concentrations. However, the quality was greatly affected by the 21 day and both the temperature conditions especially. Possible, this could be of help in developing pregnant women's antibody assays in Finnish Red Cross Blood Service and in preventing HDFN in the future.</p>	
Keywords	red cell antibodies, anti-D, anti-Fy ^a , HDFN

SISÄLLYS

1	Johdanto	2
2	Kliinisesti merkitykselliset punasoluvasta-aineet	3
2.1	Rh-veriryhmäjärjestelmän D-antigeeni ja anti-D-vasta-aine	6
2.2	Duffy-veriryhmäjärjestelmän Fy ^a -antigeeni ja anti-Fy ^a -vasta-aine	7
3	Raskausimmunisaatio ja sen seuraukset	8
3.1	Raskaudenaikainen immunisaatio	9
3.2	Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti	10
3.3	Hyperbilirubinemia	10
3.4	Anti-D-suojaus	12
4	Neuvolanäytteet ja niiden laatu	12
4.1	Näytteiden laatuun liittyviä ongelmia laboratorioprosessin aikana	13
4.2	Vasta-aineiden säilyvyyden tutkimukset	15
5	Neuvolanäytetutkimukset	15
5.1	ABO- ja Rh-veriryhmämääritykset	15
5.2	Vasta-aineiden seulonta geelikortilla	16
5.3	Vasta-ainetitteri koeputkessa	17
6	Työn tavoitteet ja tutkimuskysymykset	18
7	Työvaiheet ja niiden merkitys	20
7.1	Työssä tutkittavat näytteet	20
7.2	Testiolosuhteet	23
7.3	Titrauksessa käytetyt vasta-aineet ja testisolut	24
7.4	Näytteen analysaattorikelpoisuuden tutkiminen	25
7.5	Näytteiden titraus	26
8	Tutkimustulokset	26
8.1	Tutkimustulosten käsittely	26
8.2	Anti-D:n säilyvyys eri lämpötiloissa ja pidennetyissä seisotusajoissa	28
8.3	Anti-Fy ^a :n säilyvyys eri lämpötiloissa ja pidennetyissä seisotusajoissa	31
8.4	Muutokset näytteen pipetoitavuudessa	35

8.5	Yhteenveto tuloksista	37
9	Luotettavuuden pohdinta	38
10	Pohdinta	40
	Lähteet	44

Liitteet 1-6

1. Rekrytointi-ilmoitus
2. Titteri-taulukko
3. Aikataulu
4. Työssä käytettyjä laitteita, reagensseja ja tarvikkeita
5. Ohje raskaudenaikaisista veriryhmä- ja vasta-ainetutkimuksista
6. Raskaudenaikaisten veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimusnäytteiden pakkausohje

Työssä käytettäviä käsitteitä:

- ◆ alleeli = tietyssä lokuksessa oleva geenin eri vaihtoehto
- ◆ antigeeni = elimistölle vieras aine, joka aiheuttaa vasta-aineiden syntymisen
- ◆ bilirubiini = keltainen pigmentti, jota syntyy kun punasolut hajoavat
- ◆ fenotyyppi = veriryhmätekijöiden osalta fenotyypillä ilmaistaan mitä antigeenejä punasolujen pinnalta on todettavissa
- ◆ genotyyppi = veriryhmätekijöiden osalta genotyypillä ilmaistaan ihmisen perimässä olevia veriryhmägeenejä
- ◆ HDFN = the hemolytic disease of the fetus and newborn/ sikiön ja vastasyntyneen hemolyttinen tauti
- ◆ heterotsygootti = eriperintäinen
- ◆ homotsygootti = samanperintäinen
- ◆ HTR = Haemolytic transfusion reaction/ hemolyttinen verensiirto-reaktio
- ◆ immunisaatio = vasta-ainetuotannon aktivoituminen vieraan antigeenin ilmentymisen johdosta
- ◆ immunogeeninen = vastustuskykyä tuottava
- ◆ immuunivasta-aine = vasta-ainetuotannon aktivoituminen vieraan antigeenin ilmentymisen johdosta
- ◆ in vitro = tutkimustekniikka koeputkessa tai maljalla
- ◆ titteri = suurimman laimennoksen käänteisluku, jossa agglutinaatio vielä havaitaan
- ◆ vasta-aine = immunoglobuliini eli plasmasolun tuottama puolustusjärjestelmän proteiini
- ◆ verensiirto = veren tai sen komponenttien, esim. plasman tai trombosyyttien siirtäminen henkilöltä toiselle
- ◆ verenvaihto = henkilön verta siirretään pois ja korvataan luovuttajaverellä, kunnes suurin osa verestä on vaihtunut. Käytetään hemolyttisen taudin hoidossa

1 Johdanto

Anti-D on Rh-veriryhmäjärjestelmän ja anti-Fy^a Duffy-veriryhmäjärjestelmän immuunivasta-aine. Molemmat vasta-aineet ovat raskaudenaikaisissa tutkimuksissa kliinisesti merkityksellisiä ja altistavat sikiön tai vasta-syntyneen vaaralle sairastua hemolyyttiseen tautiin ja sen vakaviin jälkikomplikaatioihin. Vaikka punasoluvasta-aineet kuuluvat yleisimmin IgG- ja IgM-immunoglobuliiniluokkiin, ovat IgG-luokan vasta-aineet vaaran aiheuttajia raskaudenaikaisen immunisaation syntyessä. Tämä johtuu IgG-vasta-aineiden kyvystä tunkeutua istukan kautta sikiön verenkiertoon pienen molekyylikokonsa mahdollistamana. Anti-D aiheuttaa tavallisimmin hemolyyttistä tautia, mutta taudin vaikeus voi vaihdella lievästi hyvinkin vakavaan. Tästä seikasta johtuen raskaudenaikaisen vasta-ainepitoisuuden seuranta ja vasta-aineiden tunnistus on oleellista sikiön ja vastasyntyneen hyvinvoinnin kannalta. (Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.) 2007:638.)

Kaikista raskaana olevista naisista otetaan ensimmäisen neuvolakäynnin aikana verinäyte, joka lähetetään Suomen Punaisen Ristin Veripalveluun tutkittavaksi. Yksi näistä näytteistä tehtävä sikiön kannalta erittäin merkittävä tutkimus on punasoluvasta-aineiden seulonta. Seulonnan avulla havaitaan onko äidin elimistö alkanut tuottaa vasta-ainetta elimistölle vierasta ainetta, tässä tapauksessa sikiön punasoluja kohtaan eli onko äiti immunisoitunut. Immunisoitumiselle vaarassa ovat äidit, joiden punasolujen pinnalta puuttuu antigeeni, joka sikiöllä on. Yleensä immunisaatio on tapahtunut jo edellisten raskauksien aikana, kun sikiön punasoluja on päässyt äidin verenkiertoon esimerkiksi synnytyksen aikana. (Ruutu ym. 2007:638.)

Vasta-aineiden löytyminen ja pitoisuuksien seuranta on sikiön ja vasta-syntyneen kannalta hyvin tärkeää, sillä äidin immunisoitumisesta aiheutunut sikiön punasolujen tuhoutuminen voi johtaa vakaviin komplikaatioihin ja pahimmillaan sikiön tai vastasyntyneen kuolemaan. Raskaudenaikaisesta immunisaatiosta johtuvaa sikiön punasolujen tuhoutumista kutsutaan sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttiseksi taudiksi. (Ruutu ym. 2007:639.)

Suomen neuvoloissa asioivien raskaana olevien naisten vasta-aineseulonnat, sekä vasta-ainepitoisuuksien seurannat ovat olleet Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun vastuulla vuodesta 1990 lähtien. Koska näytteitä raskaana olevista naisista tulee Veripalve-

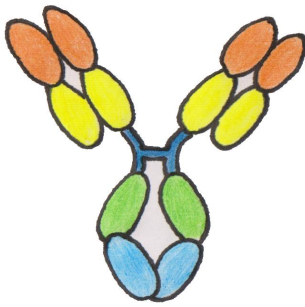
luun neuvoloista kautta maan, on keskustelun aiheena Veripalvelussa ollut pitkien väli-matkojen ja sääolosuhteiden vaikutus vasta-aineiden säilyvyyteen sekä näytteen laa-tuun näyteputkissa. Tähän opinnäytetyöhön valikoituivat tutkittaviksi vasta-aineiksi anti-D ja anti-Fy^a. Tarkoituksena oli selvittää vaikuttavatko erilaiset lämpötilat ja inku-baatioajat vasta-aineiden säilyvyyteen eli pitoisuuksiin. Lisäksi tutkimuksen kohteena oli näytteen laadun seuranta ja laadun vaikutus koneellisesti tehtävien tutkimusten onnis-tumiseen.

Tämän tutkimuksen teoriapohja ja tutkimusta inspiroivat tekijät liittyvätkin niin kutsut-tuihin neuvolanäytteisiin, mutta tulokset ovat sovellettavissa Veripalvelussa myös ve-renluovutukseen liittyvien tutkimusten ja kehittämisen tukena. Tutkimustuloksia hyö-dynnetään jatkossa näytteiden säilytystä ja kuljetusta koskevassa kehittämistoiminnas-sa. Uusien näytekuljetuspakkausten kehittämisprojekti, jossa muun muassa tämän työn tuloksia hyödynnetään, on jo käynnistymässä.

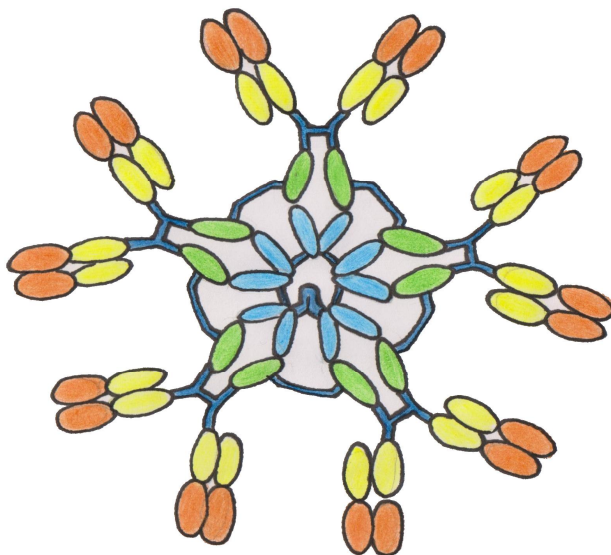
2 Kliinisesti merkitykselliset punasoluvasta-aineet

Punasolun pinnan rakenteita; glykolipidejä, glykoproteiineja ja proteiineja kutsutaan punasoluantigeeneiksi eli veriryhmäantigeeneiksi. Näitä punasoluantigeenejä pystytään tunnistamaan spesifien vasta-aineiden avulla (Daniels, G. – Bromilow, I. 2007:1.)

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat proteiineja, jotka tunnistavat antigeenin sitou-tuen siihen. Antigeenin sitä kohtaa, jonka vasta-aine tunnistaa, kutsutaan epitoopiksi. Punasoluvasta-aineet kuuluvat yleensä IgM- tai IgG-luokkaan ja jotkut myös IgA-luokkaan, mutta immuunivasta-aineet kuuluvat pääasiassa vain IgG-luokkaan. Kliinises-ti merkittävät vasta-aineet eli ne, jotka kykenevät aiheuttamaan sikiön hemolyyttistä tautia, ovat aina IgG-luokan vasta-aineita. Ne ovat IgM-luokan vasta-aineita huomatta-vasti pienempiä ja pystyvät näin ollen tunkeutumaan odottavan äidin istukasta suoraan sikiön verenkiertoon, ja tuhoamaan solut (Daniels, G. – Bromilow, I. 2007:3,39; Bla-ney, Kathy D. – Howard, Paula R. 2000:6-11.) Kuviossa 1 ja 2 on esitetty IgG- ja IgM-luokkien vasta-aineiden rakenne. Kuvista käy ilmi kyseisten immunoglobuliinien ko-koero.

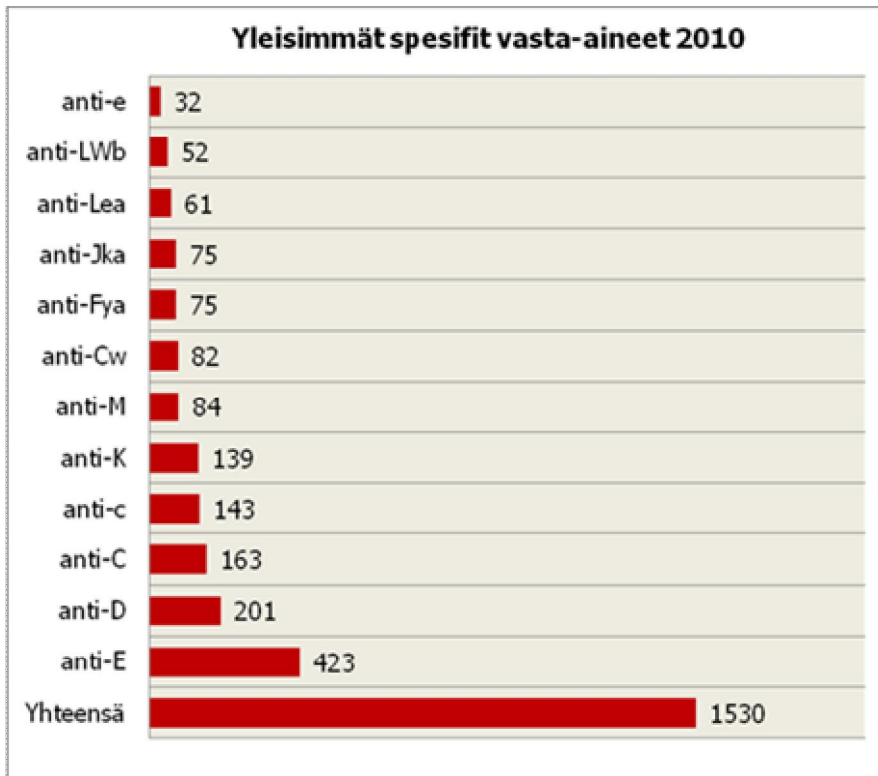


Kuvio 1. IgG-luokan vasta-aineen rakenne (Mukaiillen: Daniels, G. – Bromilow, I. 2007:63)



Kuvio 2. IgM-luokan vasta-aineen rakenne (Mukaiillen: Daniels, G. – Bromilow, I. 2007:63)

Veriryhmäjärjestelmiä on useita erilaisia ja näin ollen on myös useita erilaisia punasoluvasta-aineita. Tarkalleen erilaisia veriryhmäjärjestelmiä tiedetään olevan tällä hetkellä 30, joista viimeisimpänä on tunnistettu RHAG-järjestelmä (Daniels, G. – Castilho, L. – Flegel, W. A. et al. 2008). Kuviossa 3. on esitetty diagrammi vuonna 2010 uusina tapauksina löydettyistä vasta-aineista. Taulukko käsittää potilaat, äidit ja luovuttajat vuodelta 2010. Taulukosta ilmenee, että Rh-järjestelmän suhteen ilmenee eniten immunisatiotapauksia. Anti-D:tä oli vuonna 2010 201 tapausta ja anti-Fy^a 75 tapausta.

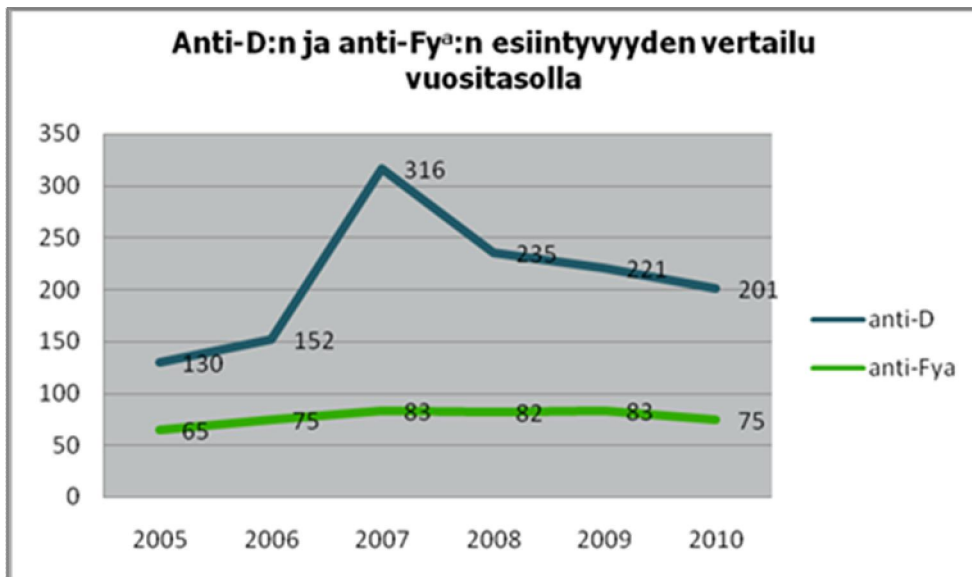


Kuvio 3. Yleisimmät spesifit vasta-aineet 2010. Löydetyt tapaukset uutena. Veripalvelun tilasto.

Kuvassa 4 on esitetty anti-D:n ja anti-Fy^a:n esiintyvyys vuodesta 2005 vuoteen 2010. Tilastoista huomaa, että anti-D:n ja anti-Fy^a:n löydösten määrä on samankaltainen vuodesta toiseen. Jos löydösten määrässä olisi huomattavaa vaihtelua vuodesta toiseen, tarkoittaisi se sitä, että käytettävissä määrittämissä olisi jotain vikaa, koska vasta-aineiden esiintyvyys on suoraan verrannollinen antigeenien frekvensseihin väestössä, sekä antigeenin immunogeenisyyteen.

Kuviosta ilmenee myös, että anti-D tapaukset ovat yleisempiä kuin anti-Fy^a-tapaukset, tämä johtuu siitä, että D-antigeeni on immunisoivampi kuin Fy^a-antigeeni.

Alkava piikki vuoden 2006 kohdalla johtuu siitä, että vuonna 2006 vasta-aineiden seulonta vaihdettiin ID-Gelstation-analysaattorille, joka on herkempi kuin edeltäjänsä. Äideiltä, jotka ovat seulottu ennen ID-Gelstationia, pieniä pitoisuuksia ei ole huomattu. ID-GelStationilla pienet pitoisuudet on huomattu samojen äitien ollessa raskaana toista kertaa.



Kuvio 4. Anti-D:n ja anti-Fy^a:n esiintyvyyden vertailu vuositasolla 2005-2010. Veripalvelun tilasto.

2.1 Rh-veriryhmäjärjestelmän D-antigeeni ja anti-D-vasta-aine

Rh-veriryhmäjärjestelmän viisi tärkeintä antigeeniä ovat D,C,E, c ja e. Näistä antigeeneista D-antigeeni on hyvin immunogeeninen ja tästä syystä RhD-veriryhmä otetaan aina huomioon verensiirroissa juuri immunisaation välttämiseksi. Valkoihoisella väestöllä yleisin fenotyyppi on D+C+c+E-e+. Fenotyyppi on sama kuin työssä käyttämällämme testisolulla (R1r). Valkoihoisesta väestöstä D-antigeenin suhteen yli 80 % on D-positiivisia (Daniels, G. – Bromilow, I. 2007.)

Rh-veriryhmän kliininen merkitys perustuu siihen, että D-antigeeni on hyvin immunogeeninen. Jos D-negatiiviselle henkilölle siirretään D-positiivista verta anti-D-vasta-ainetta alkaa muodostua 90 %:lla tapauksissa (Anstee, D – Klein, H. 2005:163.)

Anti-D on immuunivasta-aine ja useimmiten IgG-luokan vasta-aine (Savolainen, E-R ym. 2006:18) Anti-D on kaikkein vaarallisin Rh-järjestelmän vasta-aine ja se syntyy kun D-negatiivisen äidin elimistö alkaa tuottaa vasta-aineita D-positiivista sikiötä vastaan (Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset. 2008). Anti-D-vasta-aine voi syntyä myös verensiirron kautta, jos D-negatiivinen potilas saa siirrossa D-positiivista verta. Sikiön hemolyyttisen taudin mahdollisuus on olemassa, mikäli vasta-ainetitteri on 16 tai enemmän (Ulander, V-M – Halmesmäki, E – Ämmälä, P. 2004).

Anti-D-vasta-aine on toinen tutkimistamme vasta-aineista siitä syystä, että se on tällä hetkellä suurin immunisoija ja vaarallisin vasta-aine. Anti-D aiheuttaa suurimman osan

veriryhmäimmunisaatioista. Tässä työssä haluamme testata sekä vahvaa, että heikkoa vasta-ainetta, jotka ovat kliinisesti merkittäviä. Anti-D edustaa tässä työssä vahvaa kliinisesti merkittävää vasta-ainetta.

2.2 Duffy-veriryhmäjärjestelmän Fy^a-antigeeni ja anti-Fy^a-vasta-aine

Duffy-järjestelmän suhteen kaksi yleisintä antigeeniä ovat Fy^a ja Fy^b. Näiden antigeenien kesken ilmenee neljää erilaista fenotyyppiä: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) ja Fy(a-b-). Yleisimmät edellä mainituista fenotyypeistä on Fy(a-b+) ja Fy(a+b+). Valkoihoisesta väestöstä homotsygootteja Fy^a:n suhteen on 17 % ja Fy^b:n suhteen 34%. Harvinaisin taas on Fy(a-b-), joka kuitenkin afrikkalaisella väestöllä on yleisin. Kyseisen fenotyypin onkin todettu suojaavan väestöä malarian aiheuttaja *Plasmodium vivaxilta* sekä *Plasmodium knowlesilta* (Reid, M.E. – Lomas-Francis, C. 2008.) On todettu, että malaria parasiitti ei pysty tunkeutumaan punasoluun Fy^a- ja Fy^b-antigeenien puutteen johdosta. (McCullough, Jeffrey 1997:181).

Lapsi, joka perii kummaltakin vanhemmaltaan eri punasoluantigeenin, on saanut punasolujensa pinnalle niin kutsutun yksittäisen annoksen (single dose) kumpaakin antigeeniä. Toisaalta taas saman punasoluantigeenin periminen kummaltakin vanhemmalta aiheuttaa antigeenin ilmenemisen voimakkaampana, tupla-annoksen (double dose) vaikutuksesta. Lapsi, joka on perinyt vanhemmiltaan saman alleelin, eli on Fy^a:n suhteen homotsygootti, Fy^a-antigeeniä ilmenee voimakkaammin punasolun pinnalla kuin heterotsygootilla. Tätä variaatiota antigeenin ilmenemisessä alleelien määrän vuoksi kutsutaan annosvaikutukseksi. (Blaney, K. – Howard, P. 2000:61.)

Vasta-aineet, jotka kuuluvat Duffy-veriryhmäjärjestelmään, ovat myös poikkeuksetta immuunivasta-aineita. Immuunivasta-aineilla tarkoitetaan sellaisia punasoluvasta-aineita, joita syntyy elimistön altistuessa vieraille punasoluantigeenille tai itseltään puuttuvalle punasoluantigeenille (Savolainen, E-R ym. 2006:23,154) Tämänkään järjestelmän vasta-aineita ei synny ilman altistusta. Tällaisia immuunivasta-aineita syntyy raskauden tai verensiirron seurauksena. Anti-Fy^a löydetään yleensä verensiirron tai raskauden yhteydessä, mutta niitä esiintyy todella harvoin luonnollisena (Anstee, D – Klein, H. 2005:215).

Duffy-ryhmän vasta-aineet anti-Fy^a ja anti-Fy^b, voivat molemmat aiheuttaa sekä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin, että hemolyyttisen verensiirtoreaktion. Näistä kah-

desta anti-Fy^a:a tavataan melko usein, kun taas anti-Fy^b:tä huomattavasti harvemmin. Molemmat voivat aiheuttaa sekä lieviä, että vakavia oireita ja ilmetä sekä pieninä, että suurina pitoisuuksina. Myös Duffy-järjestelmän vasta-aineet ovat merkityksellisiä, vaikka niiden titteri on yleensä matala ja reaktiivoimakkuus huomattavasti heikompi, kuin esimerkiksi Rh-järjestelmän vasta-aineilla. (Savolainen, E-R ym. 2006:20,23; Combs, M.R. ym. 2005:343-345; Daniels G. – Bromilow, I. 2007:49).

Anti-Fy^a on myös rakenteeltaan IgG-luokan vasta-aine. Anti-Fy^a on toinen tutkimamme vasta-aine siitä syystä, että haluttiin tutkia kahta eri vasta-ainetta. Lisäksi haluttiin tutkia yhden vahvan vasta-aineen rinnalla myös yhtä heikkoa vasta-ainetta. Tarkoituksena oli tutkia kahta eri vasta-ainetta, jotka molemmat ovat kuitenkin kliinisesti merkittäviä, sillä kaikki kliinisesti merkittävät vasta-aineet voivat johtaa sikiön ja vasta-syntyneen hemolyyttiseen tautiin, joka taas on opinnäytetyömme perimmäinen lähtökohta.

3 Raskausimmunisaatio ja sen seuraukset

Kaikista raskaana olevista naisista otetaan verinäyte ensimmäisellä neuvolakäynnillä. Tämä näyte otetaan ensisijaisesti punasoluvasta-aineseulontaa varten, mutta siitä määritetään myös äidin ABO- ja Rh-veriryhmä. Jos naiselta puuttuu D-antigeeni, eli hän on RhD-veriryhmältään D-negatiivinen, otetaan näyte myös raskausviikoilla 24-26 ja 36. Jos vasta-aineseulonnan avulla löydetään äidistä raskauden kannalta kliinisesti merkityksellinen punasoluvasta-aine, otetaan vasta-ainepitoisuuden seurantanäytteitä kuukausittain. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 1999:22-23)

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen suosituksesta kaikki raskaudenaikaiset vasta-aineseulot ja pitoisuuksien seurannat Suomessa on keskitetty Suomen Punaisen Ristin Veripalveluun 1.1.1990 lähtien sovitun seurantaohjelman mukaisesti. Keskittäminen on laadun ja luotettavuuden kannalta merkityksellistä, sillä on oleellista verrata naisen eri raskauskertojen tutkimustuloksia luotettavasti toisiinsa. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 1999.) Veripalveluun tulee näytteitä kaikista Suomen neuvoloista. Vuonna 2009 Veripalvelussa määritettiin raskaana olevista naisista 84 298 näytettä, vuonna 2010 83 123 näytettä. (Punainen Risti, Veripalvelu 2011.)

Veripalvelun neuvolanäytetutkimusten perimmäisenä tavoitteena on havaita vasta-aineseulonnan avulla immunisoituneet äidit, tunnistaa vasta-ainepositiivisesta näytteestä-

tä vasta-aine ja määrittää, onko se merkityksellinen sikiön hyvinvoinnin kannalta. Positiiviset tulokset ilmoitetaan neuvolaan ja sovitulle äitiyspoliklinikalle (Aitokallio-Tallberg, Ansa 2011.) Vasta-aineseulassa positiivinen tai muissa rutiinimäärityksissä poikkeavan tuloksen saanut näyte lähetetään jatkotutkimuksiin, joiden avulla tuloksia tarkennetaan ja vahvistetaan. Näitä jatkotutkimuksia ovat vasta-aineiden tunnistus, punasoluantigeenien fenotyyppitys, vasta-aineiden titraus ja kvantitatiivinen anti-D määrittäminen virtaus-sytometrillä.

3.1 Raskaudenaikainen immunisaatio

Raskaudenaikaisella immunisaatiolla tarkoitetaan tilannetta, jossa äidin puolustusjärjestelmä aloittaa vasta-ainetuotannon sikiön äidille vieraita pinta-antigenejä vastaan. Raskaudenaikainen immunisaatio on mahdollista ainoastaan tilanteessa, jossa äidiltä puuttuu punasoluantigeeni, joka sikiöllä/vastasyntyneellä on; äiti on siis tietyn punasoluantigeenin suhteen negatiivinen ja lapsi positiivinen. Lapsi on tällöin perinyt antigenipositiivisuuden isältään. (Ruutu ym. 2007:638.)

Vasta-ainetuotanto alkaa, kun sikiön punasoluja kulkeutuu istukan kautta (Ulander, V-M. – Halmesmäki, E. – Ämmälä, P. 2004) äidin verenkiertoon ja äidin immuunipuolustus aktivoituu. On todettu, että noin 0,1 ml verta kulkeutuu sikiöstä äitiin koko raskauden ajan. Määrä on pieni ja immunisaation aste riippuukin useasta eri seikasta; veriryhmätekijän immunogeenisyydestä, sikiöstä äitiin siirtyvien punasolujen määrästä ja vasta-aineen ominaisuuksista, esimerkiksi koosta (Ruutu ym. 2007:639) On todettu, että äidin ja sikiön ABO-veriryhmien epäsopivuus saattaa myös vaikuttaa äidin vasta-ainetuotantoon. Vieraiden solujen tuhoutuminen on tehokasta autovasta-aineiden toimesta, eikä immuunivasta-ainetuotanto pääse näin kunnolla käyntiin. (Hillyer, Christopher D. – Shaz, Beth H. – Zimring, James C. – Abshire, Thomas C. 2009.)

Ensimmäisen raskauden aikana ei sikiöllä/vastasyntyneellä ole vielä suurta vaaraa sairastua hemolyyttiseen tautiin, sillä äidin vasta-ainetuotanto saa vasta alkunsa ensimmäisen raskauden aikana tapahtuneen immunisaation johdosta. Vaikka vasta-aineita voi alkaa muodostua jo pienenkin verikontaktin tapahtuessa, voidaan vasta-ainetitterin avulla määrittää, onko vasta-ainepitoisuus kliinisesti merkittävä sikiön hyvinvoinnin kannalta. Pitoisuutta tarkkaillaan koko raskauden ajan ja verrataan edeltäviin tuloksiin. (Combs, M.R. ym. 2005: 535-537.) Immunisaation aste riippuu siitä, mihin veriryhmäjärjestelmään vasta-aineet kuuluvat. Kaikkein immunisoivimpia antigenejä ovat Rh-

järjestelmän D, c ja E (Savolainen, E-R. ym. 2006: 75) sekä Kell-järjestelmän K (Ruutu ym. 2007: 642.) Anti-D on merkittävin hemolyyttistä tautia aiheuttavista punasoluvasta-aineista. Anti-Fy^a-immunisaatio voi edellyttää vastasyntyneen tutkimuksia ja hoitoa, vaikka raskauden aikana ilmenevän taudin hoitoa tarvitaan vain harvoin. Vaikkakin anti-D on merkittävin hemolyyttisen taudin aiheuttaja, $\leq 5\%$ hemolyyttistä tautia aiheuttavista vasta-aineista kuuluvat johonkin muuhun kuin Rh-veriryhmäjärjestelmään. Tähän 5 % lukeutuu esimerkiksi Kell- Kidd- ja Duffy-järjestelmien vasta-aineet. (Ruutu ym. 2007:638.)

3.2 Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti

HDFN (hemolytic disease of fetus and newborn) eli sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti saa alkunsa, kun äidin IgG-luokan vasta-aineet siirtyvät istukan kautta sikiön verenkiertoon ja kiinnittyvät sikiön punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin. Nämä vasta-aineet aiheuttavat sikiön punasolujen tuhoutumista ja estävät jopa niiden uudelleen muodostumista. Punasolujen tuhoutuminen voi aiheuttaa sikiölle eriasteista, vaikeakin anemiaa (Eder, A.F 2006), jonka seurauksena sikiöllä voi ilmetä muun muassa sydämen vajaatoimintaa, elinsuurentumia ja kasvun hidastumista. (Ruutu ym. 2007: 639.)

Hemolyyttisellä taudilla on eri asteita; lievää tilaa ei voida tunnistaa edes hemoglobiinitason muutoksilla, kun taas vaikea hemolyyttinen tauti aiheuttaa sikiölle niin vaikeaa anemiaa, että sikiön elimistö pyrkii kompensoimaan punasolujen tuhoa nestetilavuuden suurentamisella, josta on seurauksena hengenvaarallinen hydrops fetalis eli sikiöpöhö. Hemolyyysin aste on aina riippuvainen punasolutuotannosta, joka voi hyvässä tapauksessa lisääntyä kompensatorisesti ja pitää näin veren punasolutason vakaana. (Ruutu ym 2007: 639.) Hemolyyttisen taudin seurauksena vastasyntynyt voi sairastua myös hyperbilirubinemian aiheuttamaan kernikterukseen, jonka vaikutukset voivat olla pitkäkestoisia ja jopa elinikäisiä. Konjugoimaton bilirubiini vastasyntyneen veressä onkin suurina määrinä vakavampi kliininen uhka vastasyntyneelle kuin anemia (Combs, M.R. ym. 2005: 536.)

3.3 Hyperbilirubinemia

Bilirubiinia syntyy pääasiassa pernassa ja imukudoksessa hemi-molekyylistä, joka on osa tuhoutuneen punasolun hemoglobiinia. Bilirubiinia syntyy 35 mg yhdestä grammas-

ta hemoglobiinia (Ruutu ym. 2007:640.) Aikuisen ihmisen terveessä elimistössä mak-sasolut siirtävät vapaan bilirubiinin sapen mukana pois elimistöstä. Raskauden aikana äidin maksa käsittelee myös sikiön punasoluista vapautunutta bilirubiinia (Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008.) Synnytyksen jälkeen lapsi on kuitenkin vaarassa sairastua hyperbilirubinemiaan, sillä vastasyntyneen maksa ei omaa vielä mekanismeja vapaan bilirubiinin poistamiseksi elimistöstä (Combs, M.R. ym. 2005:536.)

Käsittelemätön eli konjugoimaton bilirubiini on elimistölle myrkyllistä. (Combs, M.R. ym. 2005:536.) Jos vapaan bilirubiinin määrä veressä on hyvin suuri, läpäisee se veri-aivoesteen ja kertyy keskushermostoon. Tästä voi aiheutua vastasyntyneelle pitkäaikainen seuraus, kernikterus eli keltatauti. Vastasyntynyt voi kärsiä kernikteruksen aiheuttamista aivoverenvuodoista ja hengitystoiminnan häiriintymisestä. Lapselle voi kehittyä myöhemmässä vaiheessa myös CP-oireita; henkistä jälkeenjääneisyyttä, atetoosia eli vaikeaa pakkoliikeistä CP-vammaa ja ataksiaa eli liikkeen koordinaation häiriötä. (Ruutu ym. 2007:639-640).

Raskausviikkojen on todettu vaikuttavan hyperbilirubinemian ja sen aiheuttamien aivo-vaurioiden syntyyn. Mitä varhaisemmassa vaiheessa raskautta sikiö sairastuu hemolyyt-tiseen tautiin, sitä suurempi todennäköisyys on myös vakaville myöhäisille haittavaiku-tuksille, kuten kernikterukselle. (Maisels, M. Jeffrey – Bhutani, Vinod K. – Bogen, Debra – Newman, Thomas B. – Stark, Ann R. – Watchko, Jon F 2009.) On kuitenkin huomioi-tava, että tehokkaan raskaudenaikaisen seurannan tuloksena, vakavat hemolyyttisen taudin komplikaatiot ja taudin esiintyvyys ovat vähentyneet tuntuvasti. Jos hyperbiliru-binemia havaitaan ja hoidetaan ajoissa, voidaan vakavilta taudinkuvilta välttyä koko-naan (Petrova, Anna – Mehta, Rajeev – Birchwood, Gillian – Ostfeld, Barbara – Hegyi, Thomas 2006.) Sikiön hoito perustuu anemian korjaamiseen, äärimmillään kohdun-säisen verensiirron avulla. Punasolujen siirto voi olla tarpeen useaan otteeseen ras-kauden aikana, ja hemolyysin astetta seurataan tarkasti esimerkiksi napasuonesta ote-tun napaverinäytteen avulla. (Ruutu ym. 2007: 641.) Sikiön hemolyysin aste voidaan myös selvittää epäsuorasti mittaamalla bilirubiinipitoisuus lapsivedestä. Tämä mene-telmä ei ole kuitenkaan täysin aukoton, sillä sen luotettavuutta ei ole voitu osoittaa ennen raskausviikkoa 28. Sikiön anemian vaikeusasteen arviointi on lisäksi hankalaa pelkän bilirubiinimittauksen avulla. (Ulander, V.M. ym. 2004.)

Vastasyntyneen hoito kohdistetaan hemolyysin korjaamiseen, anemian hoitoon ja hy-perbilirubinemian ehkäisyyn. Bilirubiinin liikaesiintyminen vastasyntyneen veressä ha-

vaitaan ihon keltaisuutena, jota hoidetaan ensisijaisesti valohoidolla (Eder, A.F. 2006.) Verenvaihto voi tulla kyseeseen vaikean anemian kohdalla, joka samalla alentaa myös veren bilirubiinipitoisuutta. Verenvaihdon tuloksena myös vasta-aineiden määrä vähenee ja punasolujen hemolysoituminen vähenee tai lakkaa kokonaan. (Ruutu ym. 2007: 641-642).

3.4 Anti-D-suojaus

Anti-D:stä aiheutuva immunisaatio voidaan useimmissa tapauksissa ehkäistä raskauden yhteydessä anti-D-suojauksen avulla. Vastaavaa menetelmää sikiön suojaamiseksi ei ole muiden veriryhmätekijöiden kuin RhD:n osalta (Ulander,V-M. ym. 2004.) Erään tutkimuksen mukaan anti-D:stä johtuvat immunisaatiot vähenevät suojauksen aloittamisesta 15 vuoden aikana 18,4:stä 1,3:een 100 000 raskautta kohti. Suojauksen mekanismi on, että kun Suomessa käytettävä vakioannos 250 µg:n anti-D-gammaglobuliinia tuodaan äidin verenkiertoon passiivisesti, peittää se sikiön D-positiiviset punasolut ja estää näin äidin immuunipuolustuksen aktivoitumisen. Suojaus annetaan D-positiivisen lapsen synnyttyä, jolloin tarkoituksena on ehkäistä hemolyyttisen taudin ilmeneminen D-positiivisella sikiöllä seuraavan odotuksen aikana. Anti-D-suojaus voidaan kuitenkin antaa jo raskauden aikana esimerkiksi istukan irtoamisen tai muun vuotoa aiheuttavan immunisaatiolle altistavan trauman tapahtuessa (Ruutu ym. 2007: 641.)

Anti-D-suojauksen teho ei kestä ikuisesti. Sen puoliintumisaika elimistössä on noin kolme viikkoa, joten Anti-D suojaus voidaan joutua uusimaan uuden altistuksen tapahduttua. Vuodon määrää sikiöstä äitiin voidaan tutkia osoittamalla sikiöperäistä hemoglobiinia äidin verestä. (Ulander V-M. ym. 2004.)

4 Neuvolanäytteet ja niiden laatu

Neuvolanäytteet ovat EDTA-antikoagulanttia sisältävään putkeen otettuja laskimoverinäytteitä, joista erotellaan plasma sentrifugoimalla. Tämänkaltainen näytematriisi on vaativa ja kaippaa niin ottajaltaan, kuljettajaltaan kuin säilyttäjältäänkin tietoisuutta käsittelyn vaikutuksesta näytteen laatuun.



Kuvio 5. Vacutainer®
EDTA-putki.
Lähde: Nina Grasutis

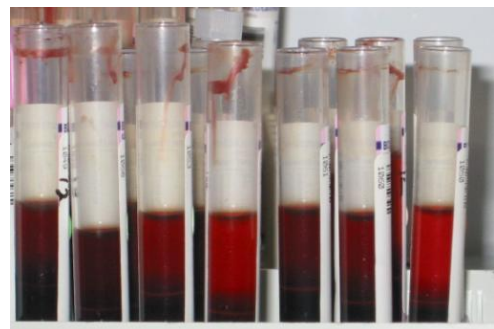
Neuvolanäytteet ovat kokoverinäytteitä, joiden hyytymisreaktiota estetään ottamalla laskimoverta antikoagulanttia, eli hyytymistä ehkäisevää ainetta (EDTA) sisältävään putkeen. Jotta antikoagulantti toimisi toivotulla tavalla, on putki sekoitettava välittömästi näytteenoton jälkeen. Tarkoitus on saada EDTA sekoittumaan näytteeseen tasaisesti. Optimaalisen lopputuloksen saavuttamiseksi ohjeistus on putken kääntely 7-10 kertaa heti näytteenoton jälkeen.

Näytteet ohjeistetaan lähettämään +2 °C– +25 °C kuljetuslämpötilassa, 3-5 päivän kuluessa näytteenottoajankohdasta Veripalveluun analysoitaviksi. Tätä vanhempia näytteitä ei analysoida lainkaan. Jäätynyttä näytettä ei voida tutkia. (SPR Veripalvelu 2008.)

Näytteenotto, kuljetuslämpötila ja -aika sekä ylimääräinen seisotus näytteenottoaikas- sa voivat vaikuttaa siihen, että neuvolanäytteiden laatu on suurelta osin koettu ongelmalliseksi ja ylityöllistäväksi. Näytteet sisältävät monesti hyytymiä, jolloin ne eivät ole analysaattorikelpoisia vaan siirtyvät käsityöksi, niin sanottuihin "neivolajatkoihin". Hyytymät voivat olla syntyisin perustavaa laatua olevasta ongelmasta; näytettä ei huomata sekoittaa EDTA-antikoagulanttiin välittömästi näytteenoton jälkeen tai sekoittaminen on riittämätöntä. Lämpötilojen sekä pitkien seisotusaikojen vaikutusta näytteen laatuun tutkittiin tämän opinnäytetyön puitteissa.

4.1 Näytteiden laatuun liittyviä ongelmia laboratoriosprosessin aikana

Veriryhmämääritykset ja vasta-aineisiin liittyvät määritykset perustuvat miltei kokonaan agglutinaatioiden eli antigeeni-vasta-aineekompleksien havaitsemiseen. Analysaattorin tulkitessa ja määrittäessä näytteitä, on kuitenkin olemassa tilanteita, jotka haastavat



agglutinaatioiden havaitsemisen ja lukemisen ja vaikeuttavat sekä hidastavat näin laboratoriosprosessia. Tällai-

Kuvio 6. Vahvasti hemolysoituneita näytteitä +35 °C testiolosuhteesta.

Lähde: Katri Haimila ja Nina Grasutis

nen laadullisesti huono ja laboratoriotutkimusten kannalta epäedullinen näyte on yleensä hemolyyttinen tai osittain hyytynyt verinäyte.

Hemolysoituneella näytteellä tarkoitetaan näytettä, jossa punasoluja on hajonnut esimerkiksi väärän kuljetuslämpötilan tai muiden olosuhteiden takia ennen laboratorioon saapumista. Vahvasti hemolysoituneesta (Kuvio 6.) näytteestä ei analysaattori pysty erottamaan plasman ja solujen välistä rajapintaa eikä siten tunnista pipetoitavaa syvyyttä. Jos näyte ei ole kunnolla sekoittunut putkessa olevaan antikoagulanttiin, on näyte osittain hyytynyt. Vain osittain hyytyneessä näytteessä voivat punasolut kiinnittyä pieniin fibriinihiyytymiin, jolloin muodostuu aggregaatteja, jotka analysaattori voi tulkita agglutinaatioksi. (Combs, M.R. ym. 2005:409). Analysaattorin aspiroiva neula voi tukkeutua verinäytteessä sijaitsevasta hyytymästä eikä siten saa näytettä riittävästi tai ollenkaan tutkimuksiaan varten. Tämänkaltaisen tilanteen ilmentyessä näyte määritetään aina uudelleen manuaalisesti. Tämä tuottaa kuitenkin ongelmia kyseessä ollessa kymmeniä tai jopa satoja näytteitä.

Rutiininomaisesti ei voida todeta näytteenottopäivän tai sääolosuhteiden vaikuttavan tietyllä tavalla näytteen laatuun ja analysointikelpoisuuteen. Kokemuksen perusteella voidaan silti olettaa joidenkin, varsinkin äärimmäisien lämpötilavaihteluiden ja pitkien seisotusaikojen, vaikuttavan näytteeseen. Näytteen analysointikelpoisuus voidaan siis todeta ainoastaan kirjattujen ohjeiden, kuten maksimiajan määrittämisen näytteenotosta analysointiin ja säilytyslämpötilojen perusteella.

Tuloksien käsittelyssä Veripalvelulla on käytössään toimiva ATK-järjestelmä, jonka avulla uusia tuloksia verrataan vanhoihin. Poikkeamien esiintyessä ristiriitaisuudet siirtyvät poikkeamalistalla, jonka jokaisen näytteen tilanne selvitetään yksityiskohtaisesti. ABO-veriryhmän määrittäminen toimii kontrollina tämänkaltaisessa tulosvertailussa, sillä toisin kuin vasta-aineet, ABO-antigeenit eivät muutu tai häviä elimistöstä koskaan. Tilanteessa, jossa esiintyy ABO-poikkeavuus ja voidaan varmuudella todeta näytteen olevan halutusta henkilöstä, voidaan epäillä muun muassa hemolyysin vaikutusta tuloksiin. Näyte voi olla alkujaankin, näytteenoton seurauksena vahvasti hemolysoitunut. Tämän takia on tärkeää, että näytteitä ottavat tahot, tässä tapauksessa neuvolat ovat tietoisia ja asiallisesti koulutettuja myös näytteenoton eri vaiheisiin ja vaiheiden vaikutuksiin lopputuloksessa.

4.2 Vasta-aineiden säilyvyyden tutkimukset

Laajan tiedonhaun tuloksena voidaan todeta, ettei tutkimuksia vasta-aineiden säilyvyydestä koe- tai näyteputkissa ole joko tehty tai ainakaan julkistettu kansainvälisesti. Raskaudenaikaisten immuunivasta-aineiden kliininen merkitys sekä eri veriryhmäjärjestelmien vasta-aineet on tunnettu jo vuosikymmeniä, siksi tämänkaltaisen tutkimuksen puuttuminen on kummallista. Voidaankin ehkäpä olettaa, että tutkimuksia on kuin onkin tehty, mutta tulokset ovat syystä tai toisesta ulottumattomissamme. Tämän opinäytetyön aihe kuitenkin korostuu ja saa merkityksensä juuri tästä tiedon vähyydestä, tarvetta vasta-aineiden säilyvyyden tutkimiselle on varmasti ja tulokset odotettuja.

5 Neuvolanäytetutkimukset

Neuvolanäytteiden laboratoriotutkimukset pitävät sisällään tutkimuksia äidin ja sikiön veriryhmiin sekä etenkin punasoluvasta-aineisiin liittyen. Näiden tutkimusten tarkoituksena on varmistaa turvallinen raskausaika sekä äidille että sikiölle. Tutkimusten avulla osataan lisäksi varmistaa oikea-aikainen hoito, esimerkiksi anti-D-suojaus ennaltaehkäisevästi tai valohoito vastasyntyneelle.

5.1 ABO- ja Rh-veriryhmämääritykset

PK 7300-analysointilaitteisto tutkii antigeenin solupuolelta että vastaavat vasta-aineet eli isoagglutiniinit plasmasta. Näytteen on siis oltava sentrifugoitu, jotta punasolumassa ja plasma erottuvat toisistaan. Laitteessa käytetyn Bromeliini-entsyymin avulla tehostetaan solujen ja vasta-aineiden keskinäisiä reaktioita. Entsyymikäsittelyn teho perustuu sialoglykoproteiinin pilkkomiseen punasolujen pinnalta, jonka seurauksena jopa pienikokoinen IgG-luokankin vasta-aine pystyy agglutinoimaan punasoluja (Savolainen, E.R. ym. 2006: 45.). Testisoluja A1 ja B käytetään laitteessa anti-A ja anti-B – vasta-aineiden löytymiseen plasmasta. Reagenssit A, B ja D ovat antiseerumeita, joiden sisältämien



Kuvio 7. Olympus PK7300-analysointilaitteisto.
Lähde: Nina Grastis

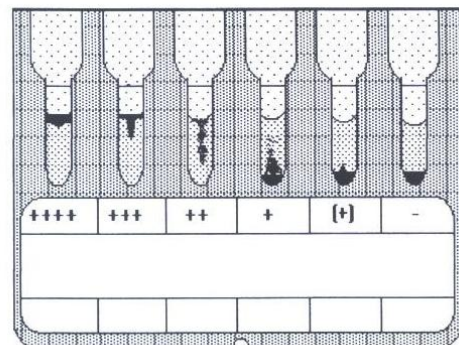
spesifisten vasta-aineiden avulla tunnistetaan punasolun pinnalta vastaavat antigeenit. ABORhD-veriryhmä määritetään aina sekä punasolun pinnan antigeenien että plasmas-
sa sijaitsevien vasta-aineiden perusteella Taulukossa 1. esitetyn niin kutsutun ABO-
logiikan mukaisesti. Kuoppalevyllä, johon laite aspiroi tarvittavat reagenssit sekä näyt-
teen, se lukee ja tulostaa tulokset sekä kvalitatiivisesti (negatiivinen tai positiivinen)
että kvantitatiivisesti (reaktion vahvuus yksikköinä).

Taulukko 1. ABO-veriryhmäjärjestelmän antigeenit ja vasta-aineet. Daniels, G.–Bromilow, I. 2007:21. Mukailleen taulukkoa 3.1.

ABO-ryhmä	Punasoluantigeenit	Isoagglutiniinit	Genotyyppi
O	ei ole	anti-A ja anti-B	O/O
A	A	anti-B	A/A tai A/O
B	B	anti-A	B/B tai B/O
AB	A ja B	ei ole	A/B

5.2 Vasta-aineiden seulonta geelikortilla

Geelikortissa on kuusi mikroputkea, jotka sisältävät dekstraani-akryyliamidigeeliä (Casi-
na, T.S. 2006), johon on sekoitettu antiglobuliinireagenssia (AHG). Reaktioalueelle pi-
petoidaan tunnettuja punasoluja ja tutkitta-
vasta näytteestä plasmaa. Geelikortteja
inkuboidaan lämpöhauhteessa 10-15 minuut-
tia ja sentrifugoidaan korttisentrifuugilla 10
minuuttia (Tutkimusmenetelmäohje VR
3461 2009: Punasoluvasta-aineiden seulon-
ta Diamed ID-geelimenetelmällä.) Jos näyt-
teen plasmassa on vasta-aineita, ne agglu-
tinoituvat tunnettujen punasolujen kanssa.
Geeli vangitsee agglutinaatit ja mahdollistaa
niiden gradeerauksen asteikolla +/- – 4+.



Kuvio 8. Agglutinaatioiden gra-
deeraus-asteikko.

Tämä menetelmä on luotettava ja käyttäjäystävällinen, sillä geelikortilla näkyvät reaktiot pysyvät vakaina ja helposti luettavina jopa 24 tuntia testin suorittamisen jälkeen. (Casina, T.S. 2006).

Tätä seulontamenetelmää käytettiin analysaattorin sijaan siksi, että kolmen viikon seisoituksen jälkeen näytteet eivät enää olleet analysaattorikelpoisia voimakkaan hemolyyysin ja paksujen hyytymien takia. Seulonnan kaikki vaiheet suoritettiin Veripalvelun tutkimusmenetelmäohjeen VR 3461 2009: Punasoluvasta-aineiden seulonta Diamed ID-geelimenetelmällä mukaisesti.

5.3 Vasta-ainetitteri koeputkessa

Vasta-aineiden titraus on semikvantitatiivinen menetelmä, jonka avulla määritetään vasta-aineiden pitoisuus. (Combs, M.R. ym. 2005:761). Samoin kuin edellisen kappaleen menetelmä, tämäkin perustuu näytteessä olevan vasta-aineen agglutinaatioon testipunasolujen antigeenien kanssa. Titteri tehtiin tutkimuksessamme epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä, käyttämällä 12 putken laimennossarjaa. Sen laimennoksen käänteisluku, jossa vasta-aineen ja antigeenin muodostama agglutinaatio on vielä silminnähtävää (ei mikroskooppisesti), on vasta-ainetitterin tulos.

Vasta-ainetitteri määritetään jatkotutkimuksena neuvolanäytteille, joiden vasta-aine on tunnistettu kliinisesti merkitykselliseksi (Tutkimusmenetelmäohje VR-3405 2008) ja jonka vahvuus on vasta-aineseulonnan tuloksena vähintään 1+.

Vasta-ainetitteri menetelmänä on altis virheille ja tulkinnanvaraisuudelle, sillä sen jokainen vaihe suoritetaan manuaalisesti. Seuraaviin asioihin tulee kiinnittää huomiota vasta-ainetitteriä määritettäessä (Combs, M.R. ym.2005: 763.)

- Tarkkuus pipetoimisessa on oleellista. Koska toistoja on paljon, saman tekniikan säilyttäminen läpi määrittäksen on tärkeää. Pipetoitavat määrät ovat pieniä, joten minimaalisellakin vaihtelulla tilavuuksissa voi olla vaikutusta lopputulokseen.
- Inkubointiajat ja lämpötilat tulee pitää ohjeiden mukaisina määrittäksen jokaisessa vaiheessa. Sama pätee myös sentrifugointiaikoihin ja – kierroksiin sekä pesuohjelmaan. Putkien ei tule missään vaiheessa antaa seistä turhaan pöydällä tai odottaa lukemista liian kauan.

- Erityisesti tämänkaltaisessa tutkimuksessa, jossa vasta-aineiden titteriä vertailaan toisiinsa eri ajankohtina, on hyvä käyttää samoja testipunasoluja tutkimuksen kaikissa vaiheissa, jotta tämänkaltaisista muuttujista aiheutuvat erot tittereissä voidaan pois sulkea.
- Mitä suurempi-volyymiset laimennokset, sitä tarkempi on titterin tulos. Tässä tutkimuksessa putken 12 laimennos oli 1:2048.

Kun määrittäminen on suoritettu, tulokset luetaan osin mikroskooppia apuna käyttäen. Varsinaisen vasta-ainetitterin on kuitenkin se laimennos, jossa agglutinaatio on silminnähtävää eli käytännössä 1+ reaktio. Kaikki reaktiot kirjataan silti ylös; mikroskoopissa näkyvä heikko positiivinen, positiiviselta vaikuttavat niin kutsutut karkeat punasolut ja +/- joka jo enteilee varsinaista positiivista tulosta, mutta ei ole silminnähtävä reaktio. Reaktiot kirjataan ylös ja muunnetaan käyttökelpoisiksi vasta-ainepitoisuuksiksi.

Määrittäminen suoritettiin tarkasti Veripalvelun tutkimusmenetelmäohjeen VR-3405 2008: Vasta-ainetitterin mukaisesti ja sitä edelsi muutaman päivän perehdytysjakso.

6 Työn tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Tavoitteena oli selvittää, onko Veripalvelussa analysoitavien näytteiden kuljetus- ja säilytysohjeistuksessa parantamisen varaa ja tukeeko ohjeistus näytteistä saatavien tulosten luotettavuutta. Veripalvelun huoli kyseistä asiaa koskien oli nimenomaan preanalyttisten seikkojen vaikutus vasta-ainepitoisuuksiin, ja koska vasta-aineet ovat keskeisessä osassa etenkin neuvolanäytteitä tutkittaessa, tuli niistä tutkimuksemme perimmäinen kohde. Lisäksi henkilökohtaisena tavoitteenamme oli kehittää omaa asiantuntijuuttamme, vuorovaikutustaitoja, sekä projektiosaamistamme.

Opinnäytetyön päällimmäisenä tavoitteena oli siis tutkia, miten punasoluvasta-aineiden pitoisuudet muuttuvat ja miten näytteen laatu kärsii eri lämpötilojen ja seisotusaikojen vaikutuksesta. Tavoitteena on siis selvittää, onko mahdollista, että näyte, joka alun perin on sisältänyt vasta-aineita, antaakin väärän negatiivisen tuloksen tai selvän vas-

ta-ainepitoisuuden alenemisen rutiinitutkimuksissa. Työn aihe, tutkittavat vasta-aineet sekä primäärit vasta-ainepitoisuudet päätettiin Veripalvelun asiantuntijoiden ja laboratoriohenkilökunnan toimesta.

Opinnäytetyömme tavoitteena on myös tuottaa Veripalvelulle mahdollisimman kattavaa ja luotettavaa tietoa, jota he pystyvät hyödyntämään niin, että punasoluvasta-ainetutkimuksista saataisiin entistä parempia ja luotettavampia tuloksia. Työmme tulokset auttavat parhaimmillaan ehkäisemään tulevaisuudessa entistä tehokkaammin sikiöiden ja vasta-syntyneiden hemolyyttistä tautia ja työn aihe onkin lähtenyt Veripalvelun omista tarpeista selvittää kyseistä asiaa.

Opinnäytetyötämme ohjasivat seuraavat tutkimuskysymykset:

1. Kuinka anti-D vasta-aine säilyy 6 vuorokaudessa (3vrk rt + 3 vrk 4 °C), 21 vuorokaudessa (3 vrk rt + 18 vrk 4°C), +1°C (3 vrk + 2vrk 4°C) ja +35 °C (3 vrk + 2vrk 4°C) in vitro?
2. Kuinka anti-Fy^a vasta-aine säilyy 6 vuorokaudessa (3vrk rt + 3 vrk 4 °C), 21 vuorokaudessa (3 vrk rt + 18 vrk 4°C), +1°C (3 vrk + 2vrk 4°C) ja +35 °C (3 vrk + 2vrk 4°C) in vitro?

Näytteitä säilytettiin neuvolanäytteiden pakkausohjeen mukaisesti 6 ja 21 vuorokauden olosuhteissa. Säilytimme putkia ensin kolme vuorokautta makuuasennossa huoneenlämmössä, joka simuloi kuljetustilannetta ja sen jälkeen pystyasennossa jääkaapissa, jonka avulla selvitettiin, onko näytteitä mahdollista luotettavasti tutkia vielä ohjeellisen säilytysajan jälkeenkin.

Asetimme näytteet jääkaappiin +1 asteeseen ja lämpökaappiin + 35 asteeseen, kumpaankin olosuhteeseen saman verran näytteitä. Kaappeihin laitoimme TempTale4-lämpötilanseurantamittarit, jotka rekisteröivät lämpötilan ja sen vaihtelut koko halutulta ajalta. Mittareiden avulla pystyimme varmistumaan lämpötiloista, joissa näytteitä on säilytetty. Näiden lämpötilojen tarkoitus oli simuloida kesän ja talven ajan kuljetuslämpötiloja. Näissä olosuhteissa oli siis pelkästään kysymys kuljetuksen aikaisesta lämpötilasta ja sen vaikutuksesta näytteisiin ja vasta-ainepitoisuuksiin. Veripalvelu ohjeistaa

sivuillaan näytteiden saapumisen analysoitaviksi viiden vuorokauden sisällä näytteenotosta. Säilytimme siten myös tutkittavia näytteitä maksimiajan, viisi vuorokautta.

3. Kuinka analysointikelpoisena näyte säilyi?

Neuvola- kuten luovuttajanäytteidenkin laadun ja määrän ehdoton edellytys on, että ne ovat käsiteltävissä ja analysoitavissa analysaattoreiden voimin. Tämä seikka on hyvin tärkeä, sillä suurten näytemäärien käsittely manuaalisesti on mahdotonta aika- ja henkilöstöressurssien puitteissa. Tähän tutkimusosioon käytimme näytteitä kaikista neljästä olosuhteesta (6 vrk ja 21 vrk seisotusajat, +1°C ja +35°C inkubaatiot 5 vrk ajan)

Neuvolanäytteiden lisäksi vasta-aineiden säilyvyys on oleellista myös luovuttaja- ja potilasnäytteiden kohdalla ja kaikki työssämme esitetyt tulokset ovat sovellettavissa myös näillä osa-alueilla.

7 Työvaiheet ja niiden merkitys

Työ suoritettiin kahdessa osassa, käytännön määrytykset yhtenä ja tulosten avaaminen, sekä teoriaosuuden liittäminen käytäntöön toisena. Kaikki käytännön laboratoriomäärytykset, sekä näytteenoton suoritimme Veripalvelun Kivihaan yksikön tiloissa. Tutkimuksemme selkärankana, kaiken määräävänä tekijänä olivat käytännön määrytykset, jotka suoritimme kuukauden kestäväenä suurena projektina. Tämä käytännön osuus suoritettiin työtä varten laaditun prosessikaavion mukaisesti (Kuvio 11.).

Prosessi alkoi kokonaisuudessaan palavereilla Veripalvelun ohjaajamme Katri Haimilan, Irja Haapasen ja ohjaavan opettajan Irma Niittymäen kanssa. Palavereiden aikana hahmottui tarve, potentiaali, kohderyhmä sekä suurpiirteinen aikataulus. Seuraava etappi oli näytteenantajien rekrytointi-ilmoituksen (LIITE 1) laatiminen sekä ilmoittautumisten vastaanottaminen ja organisointi.

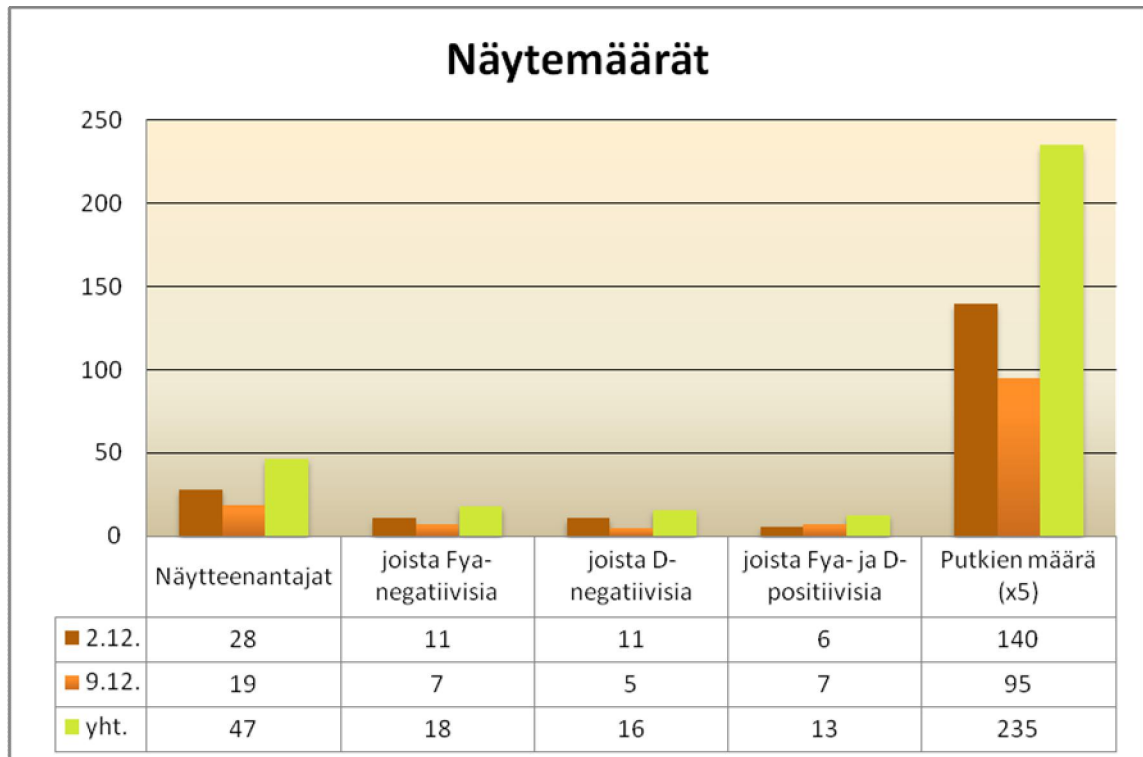
7.1 Työssä tutkittavat näytteet

Päädymme ottamaan ja käsittelemään kaikki näytteet itse alusta loppuun saakka. Näin työn toistettavuus, sekä eri työvaiheiden hallinta työn jokaisessa vaiheesta parani huomattavasti. Oikeita neuvolanäytteitä emme voineet työssämme käyttää, sillä emme olisi saaneet mistään varmuutta siitä, millaisissa olosuhteissa näytteet ovat Veripalve-

luun päätyneet. Tämä seikka oli merkittävä työmme kannalta, sillä jos olisimme ottaneet tutkimukseemme oikeita neuvolanäytteitä, ei tuloksia olisi voinut pitää luotettavana epävarmojen kuljetusolosuhteiden takia. Olosuhteiden vakiointi oli työssä oleellinen asia juuri epävarmojen kuljetusolosuhteiden takia.

Prosessin aloitimme rekrytoimalla Veripalvelusta vapaaehtoisia näytteenantajia rekrytointi-ilmoituksen avulla (LIITE 1). Vapaaehtoiset henkilöt ilmoittivat meille sähköpostitse sopivan päivän ja kellonajan ehdottamistamme ajankohdista. Tavoitteena oli saada mahdollisimman paljon sopivia näytteenantajia eli enimmäkseen Fy^a- ja D-negatiivisia henkilöitä, mutta myös molempien antigeenien suhteen positiivisia henkilöitä. Ohessa on taulukko saamistamme näytemääristä. Jokaiselta näytteenantajalta otimme viisi putkea verta 7ml:n EDTA-putkeen, joista neljä putkea jaettiin neljään eri olosuhteeseen ja yksi putki oli nk. ykköspotki, joka fuugattiin ja käytettiin laitteissa. Ykköspotken tarkoituksena oli myös toimia eräänlaisena kontrollina sekä tärkeänä näytteenä analysointikelpoisuuden eli pipetoitavuuden tutkimisessa.

Yhdestä henkilöstä otetusta viidestä putkesta, jokainen putki päätyi eri olosuhteeseen. Yhteensä näytteenantajia oli 47 ja putkia 235.



Kuvio 9. Näytemäärät

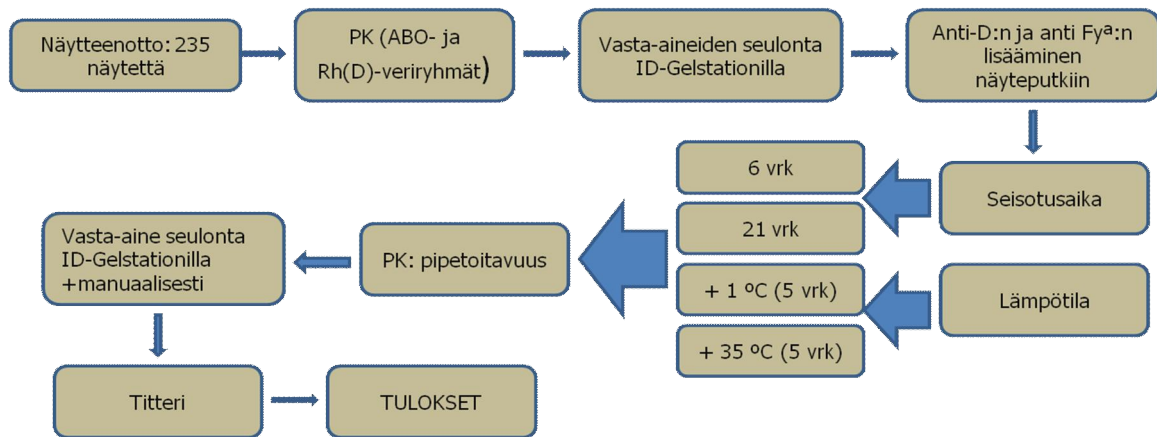
Koko määritysprosessin jaoinme kahteen osioon, suurien näytemäärien käsittelyn helpottamiseksi. Ensimmäinen näytteenottopäivä oli 2.12, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin tutkittavat vasta-aineet; anti-D 300 µl per putki RhD-negatiivisiin näytteisiin ja anti-Fy^a 700 µl per putki Fy^a-negatiivisiin näytteisiin. Näytteet määritettiin 5:n, 6:n ja 21 vuorokauden seisotuksen jälkeen. Viiden vuorokauden jälkeen määritettiin näytteet, jotka olivat olleet +1°:ssa ja +35° asteessa. Olosuhteiden valinnasta ja perusteluista tarkemmin kappaleessa 7.2 Testiolosuhteet.

Määritykset käsittivät ABO- ja RhD-typitykset PK 7300-analysointorilla, vasta-aineseulonnan ID-Gelstationilla, sekä vasta-ainepitoisuuksien selvittämisen vasta-ainetitterin avulla. Titteri tehtiin alusta loppuun asti käsin, Veripalvelun työohjeiden mukaisesti. Titterin tekoa kävimme myös harjoittelemassa kahdesti kokeneen laboratoriohoitajan ohjauksessa,



Kuvio 10. ID-Gelstation. Lähde: Nina Grastis

jolloin saimme varmuutta omaan osaamiseen ja tulosten tulkintaan. Seuraavan prosessikaavion tarkoitus on havainnollistaa työn tutkimusosiota kokonaisuutena kaikkein vaiheineen:



Kuvio 11. Työprosessin kulku

7.2 Testiolosuhteet

Tällä hetkellä Veripalvelussa on ohjeena, että näytteet tutkitaan viiden vuorokauden kuluessa näytteenotosta ja on huolehdittava, etteivät näytteet jäädy. (Raskaudenaikaiset veriryhmä- ja vasta-ainetutkimukset. 2007). Näytteiden nopea jäätyminen aiheuttaa punasolun tuhoutumisen, kun jäätä muodostuu sekä solun ympärille, että sisälle. Hidas jäätyminen puolestaan johtaa solun kuivumiseen ja kutistumiseen. (Lee, Richard G. - Bithell, Thomas C. – Foerster, John – Athens, John W. – Lukens, John N. Witrobbé's Clinical Hematology. 1993:655).

Tutkimusolosuhteissamme toinen pidennetty seisotusaika on 6 vrk, joka on yhden vuorokauden pidempi, kuin tämän hetken ohjeellinen viisi vuorokautta. Tällä hetkellä Veripalvelussa ei määritetä yli viiden vuorokauden vanhoja näytteitä, joten tällä olosuhteella haluttiin testata, vaikuttaako yksi vuorokausi lainkaan näytteen analysointikelpoisuuteen. Tämän olosuhteen tulokset vaikuttavat siihen, voidaanko ehdottaa, että tutkimusaikaa pidennettäisi yhdellä vuorokaudella nykyisestä viidestä kuuteen vuorokautteen. Näytteet olivat ensin kolme vuorokautta huoneenlämmössä vaaka-asennossa ja kolme vuorokautta jääkaapissa pystyasennossa. Ensimmäiset kolme vuorokautta vastasivat kuljetusta ja seuraavat kolme vuorokautta tilannetta Veripalvelun jääkaapissa.

Toinen pidennetty seisotusaika on 21 vrk. Tämän kolmen viikon seisotusajan tarkoituksena oli tutkia, voidaanko näytteelle tehdä jatkotutkimuksia vielä myöhemmässäkin vaiheessa tarpeen vaatiessa. Tämä konkretisoituisi Veripalvelussa siten, että neuvola-näytteiden säilytysaika voitaisiin pidentää nykyisestä kahdesta viikosta kolmeen, haluttiin siis testata pitkän seisotusajan vaikutusta analysointikelpoisuuteen. Näytteet olivat ensin 3 vuorokautta huoneenlämmössä vaakasennossa, jonka jälkeen ne siirrettiin jääkaappiin. Näytteet säilytettiin jääkaapissa pystyasennossa, mikä vastaa normaalia näytteiden säilytystapaa Veripalvelun jääkaapissa.

Lämpötilaolosuhteet on valittu sen mukaan, mitä sääolosuhteet Suomessa ovat. Jo tiedetään, että näytteet eivät kestä pakkasta, joten tutkimuksemme matala lämpötilaolosuhde on $+1\text{ °C}$ (5vrk) sisältäen tunnin pakastamisen. Pakastamisaika ei voinut olla tuntia pidempi, sillä muuten näytteet olisivat jäätyneet. Tämä asia oli testattu Veripalvelussa asiantuntevan laboratoriohoitajan toimesta. Pakastamisvaiheessa putket olivat vaakasennossa pakattuna kuljetuslaatikkoon ohjeiden mukaisesti. Tämän tarkoitus oli mukailla oikeata kuljetustilannetta mahdollisimman hyvin.

Korkea lämpötilaolosuhde on $+35\text{ °C}$ (5 vrk) vastaten Suomen kesää ja kuuminta mahdollista kuljetusolosuhdetta. Kyseisiin olosuhteisiin päädyimme yhdessä ohjaajamme ja asiantuntijaryhmän kanssa ja olosuhteiden valinta tehtiin asiantuntijoiden ehdotuksien perusteella.

Lämpökaapissa ja jääkaapissa pidimme koko ajan lämpötilaloggereita eli lämpötilanseurantamittareita, jotka rekisteröivät lämpötilat halutulta ajalta. Tulosteista näimme, että lämpötilat ovat pysyneet halutussa koko ajan. Tämä lisää tulosten luotettavuutta, sillä voimme olla varmoja näytteiden lämpötilaolosuhteista. Olosuhdemääritykset teimme Veripalvelun tiloissa pilottilaboratoriossa. Lämpökaapin keskimääräinen lämpötila oli $+34,3\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ ja jääkaapin $+1\text{ °C} \pm 0,3\text{ °C}$.

7.3 Titrauksessa käytetyt vasta-aineet ja testisolut

Työssä käyttämämme laitteet ja välineet olivat kaikki Veripalvelun rutiinikäytössä olevia, kuten myös tilat, joissa teimme käytännön työt. Lämpötilaolosuhteisiin sopivat kaapit olivat Veripalvelun laboratoriossa. Käyttämämme välineet ja laitteet on tarkemmin eritelty Liitteessä 5.

Putkiin lisäsimme näytteenoton jälkeen ja ennen olosuhteisiin asettamista tietyn määrän vasta-ainetta. Lisätyt vasta-ainemäärät perustuvat Veripalvelussa tehtyyn testiin, ja kyseisillä määrillä saatiin anti-D:n titteriksi 128 ja anti-Fya:n titteriksi 4. Anti-D Forte:a pipetoitiin (lot: 7.1.1991) 300 µl per putki RhD-negatiivisiin näytteisiin ja anti-Fy^a:a pipetoitiin (lot: VC 24.10.1996) 700 µl per putki Fy^a-negatiivisiin näytteisiin.

Testisoluina käytimme seuraavia soluja: R1r (0816664, exp 7.1.11) anti-D:n titrauksessa ja R1r' (Fya+b+) 4% anti-Fya:n titrauksessa. Anti-D määrityksissä käyttämämme testisolu R1r on D-antigeeni-fenotyypiltään heterotsygootti D^{Ce}/d^{ce}. Kyseinen fenotyyppi on yleisin valkoihoisella väestöllä.

Anti-Fya määrityksissä käyttämämme testisolu R1r' on Duffy-fenotyypiltään heterotsygootti eli Fya+b+. Jotkut vasta-aineet reagoivat heikommin sellaisten punasolujen kanssa, joiden antigeenit ovat luonteeltaan heterotsygootteja kuten Fy(a+b+). Kyseisen testisolun valintaa puoltaa sen heterotsygoottisuus, sillä se antaa heikommat reaktiot, kuin mitä homotsygootti testisolu olisi antanut.

Valitut testisolut ovat heterotsygootteja siitä syystä, että sikiö on aina heterotsygootti ja tämän vuoksi neuvonäytetutkimuksissa käytetään aina heterotsygoottisolua. Vasta-ainetta muodostanut äiti on negatiivinen ja sikiö on saanut isältään antigeenin. Silloin heterotsygoottisolulla saatu reaktiivoimakkuus vastaa sikiön tilannetta.

7.4 Näytteen analysaattorikelvoinisuuden tutkiminen

Näytteen analysaattorikelvoinisuutta tutkittiin kahdella eri analysaattorilla, Olympus PK 7300:lla ja ID-Gelstationilla. Kaikista testinäytteistä eroteltiin plasma sentrifugoimalla ennen analysaattorikelvoinisuuden tutkimista. Sentrifugoidut näytteet laitettiin analysaattoreihin kuten oikeat näytteet rutiinitutkimuksissa, samoilla reagensseilla ja ohjelmilla. Tämä vaihe suoritettiin prosessin alussa sekä välittömästi testiolosuhteiden jälkeen. Analysaattorikelvottomat näytteet laite jätti kokonaan tai osittain tulkitsematta. Laite jätti näytteen kokonaan pipetoimatta, jos huomasi sen olevan huomattavasti normaalista poikkeava, esimerkiksi voimakkaasti hemolyyttinen tai hyytymiä sisältävä näyte.

7.5 Näytteiden titraus

Sen jälkeen, kun näytteiden analysaattorikelpoisuus oli tutkittu, vasta-ainepitoisuudet määritettiin titraamalla. Titraus suoritettiin epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä. Tutkimus tehtiin 12 putken laimennossarjan avulla, jossa ensimmäinen putki oli väkevin eli itse näyte laimentamattomana. Näyte laimennettiin seuraavasti: 1:1 (näyte), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 ja 1:2048. Laimennosputkista reaktiot luettiin käsittelyn jälkeen mikroskopoimalla. Koko titraus suoritettiin Tutkimusmenetelmäohjeen VR 3405 2008: Vasta-ainetitteri mukaisesti. Titraustulokset ilmoitetaan laimennoksen käänteisluvulla, esimerkiksi, jos 1+ reaktio näkyy laimennoksessa 1:16, on titteri 16. Titrauksen tulokset kirjattiin tarkoitusta varten laaditulle lomakkeelle (LIITE 2), jonka jälkeen tulokset käsiteltiin tilasto-ohjelmalla.

8 Tutkimustulokset

Asettamamme olosuhteet eivät tilastollisesta näkökulmasta vaikuttaneet merkittävästi vasta-aineiden pitoisuuksiin, sen sijaan kliinisestä näkökulmasta tuloksia voidaan pitää tärkeinä ja hyödyllisinä jatkoa ajatellen. Päädyimme käyttämään omien tulostemme tulkinnassa Kruskal-Wallis testin, sillä vertailtavia ryhmiä oli enemmän kuin kaksi. Valitsimme käytettäväksi parametrittoman testin, sillä otoskoko tutkimuksessa oli suhteellisen pieni. Tilasto-ohjelman avulla halusimme selvittää, ovatko saamamme tulokset "todellisia" vai johtuvatko ne satunnaisesta vaihtelusta.

Näytteen laatuun eli pipetoitavuuteen inkubointi erilaisissa olosuhteissa sen sijaan vaikutti. Lisäksi tulokset herättävät kysymyksiä siitä, ovatko ne luotettavasti tulkittavissa ja millaisiin jatkotoimenpiteisiin tulisi varautua.

8.1 Tutkimustulosten käsittely

Tulokset syntyivät titrauksista, joka oli yksi työn käytetyimmistä menetelmistä. Titrausta tehdessä, kirjassimme kaikki tulokset niitä varten suunnitellulle titteritaulukolle (LIITE 2). Kun kaikkien olosuhteiden titraukset oli tehty ja kirjattu taulukkoon, alkoi tulosten käsittely PASW 18-tilasto-ohjelmalla. Tuloksia verrattiin titteriarvoihin, joihin näytteenseen pipetoidulla vasta-aineen määrällä on pyritty.

Aineisto syötettiin ensin ohjelmaan, jonka jälkeen pystyttiin tekemään valitut testit, joilla saatiin tietoa tulosten tilastollisesta merkitsevyydestä. Testin valinnassa on otettava huomioon ainakin neljä seuraavaa seikkaa; sopiiko analyysimenetelmä tutkimuskysymykseen, sopiiko testi otannan kokoon ja mittaustarkkuuteen ja lisäksi testin tehokkuus ja voimakkuus. (Metsämuuronen, Jari. 2004.)

Tämä opinnäytetyö on määrällinen eli kvantitatiivinen tutkimus. Kvantitatiivisella tutkimuksella tarkoitetaan tutkimusta, jossa tulee ilmi muuttujien väliset merkitykset ja erot. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tietoa käsitellään ja tulokset kuvataan numeerisesti (Vilkka, H. 2007:13–14). Opinnäytetyössä tutkimme kahden muuttujan välistä suhdetta veriryhmävasta-aineiden säilyvyyteen, kyseiset muuttujat ovat lämpötila ja seisotusaika.

Tilasto-ohjelmaa varten titterit oli muutettava muotoon, jota ohjelma pystyy käsittelemään. Annoimme jokaiselle titterille oman arvon, 1:1 on 1, 1:2 on 2, 1:4 on 3 jne. Väkevimmät laimennokset kirjattiin pienimmillä luvuilla ja laimein, jossa vasta-aine näkyy suurimmalla luvulla. Kuvassa 12 on kaavio, joka helpottaa tulosten tulkintaa. Tilasto-ohjelman taulukot, joihin tarvitaan kyseistä "tulkinta-avainta" on merkitty tähdellä *.

Arvo taulukossa	Laimennos	Titteri
1	1:1	1
2	1:2	2
3	1:4	4
4	1:8	8
5	1:16	16
6	1:32	32
7	1:64	64
8	1:128	128
9	1:256	256
10	1:512	512

Kuvio 12. Vastaava titterin lukema tähdellä *- merkityissä taulukoissa.

8.2 Anti-D:n säilyvyys eri lämpötiloissa ja pidennetyissä seisotusajoissa

Taulukosta 2. käy ilmi näytteiden määrät eri olosuhteissa anti-D:n suhteen. Kuudessa vuorokaudessa ja +1 asteessa näyteputkia oli 13 molemmissa ja 21 vuorokaudessa ja +35 asteessa näyteputkia oli 14 molemmissa. Kruskall-Wallis testin avulla vertailtiin miten eri olosuhteet vaikuttivat siihen, missä laimennoksessa vasta-aine ilmenee.

Testi vertaili eri olosuhteita järjestyslukujen keskiarvon avulla. Mitä pienempi järjestyslukujen keskiarvo on, sitä vahvempi liuos vaadittiin vasta-aineen ilmenemiseksi. +1 aste vaatii näkyäkseen väkevimmän laimennoksen ja 6 vrk toiseksi väkevimmän. 21 vrk ja + 35° keskenään melkein samanlaiset laimeammat liuokset. Tämä tulos kertoo, että äärimmäisilläkään olosuhteilla (21 vrk, + 35°) ei ole ollut vaikutusta vasta-aineen havaitsemiseen, vaan että vasta-aine on havaittu jopa hieman suuremmassa titterissä kuin 6 vuorokaudessa tai +1 asteessa.

*Taulukko 2. anti-D positiivisten näytteiden määrät eri tutkimusolosuhteissa

Kruskall-Wallis testin tulos

olosuhde	N	Järjestyslukujen keskiarvo
6 vrk	13	23,69
21 vrk	14	34,14
+ 1 aste	13	18,85
+ 35 astetta	14	32,43
Yhteensä	54	

Taulukosta 3. tulee ilmi titterin keskiarvo, moodi ja keskihajonta. Keskiarvo ja keskihajonta ovat tässä vain tukemassa tilastollista testiä ja niitä on käytetty vain tilastollisen merkitsevyyden laskentaan. Tämän työn kannalta niillä ei ole suurta merkitystä ja titterien suhteen niitä ei voida tulkita. Moodi sen sijaan on tärkeä luku ja se kuvaa tässä työssä useimmiten esiintynyttä titterin arvoa. Tässä tapauksessa moodi eli useimmiten esiintynyt titterin tulos on 6 vuorokauden ja +1 °C kohdalla 128 ja 21 vuorokauden ja +35 °C kohdalla 256. Titteri on vaihtunut siis vain yhden yksikön verran ja menetelmäohjeen mukaan tämä kuuluu normaaliin vaihteluun. Tavoitteena anti-D titrausten suhteen titteri oli juuri 128.

Pienemmässä taulukossa (Taulukko 4.) kuvataan havaintojen määrää kaikkien anti-D titrausten suhteen. Kaikkiaan tittereiden tuloksia on yhteensä 54. Tittereiden moodi on 128 ja pienin titrauksesta saatu tulos on 64 ja suurin 512. Myös kaikkien olosuhteiden vertailussa moodi on tavoitteiden mukainen eli 128. Tämä kuvastaa myös sitä, että olosuhteilla ei ole ollut vaikutusta vasta-aineen pitoisuuksiin.

*Taulukko 3. anti-D positiivisten näytteiden titterien keskiarvo, moodi ja keskihajonta

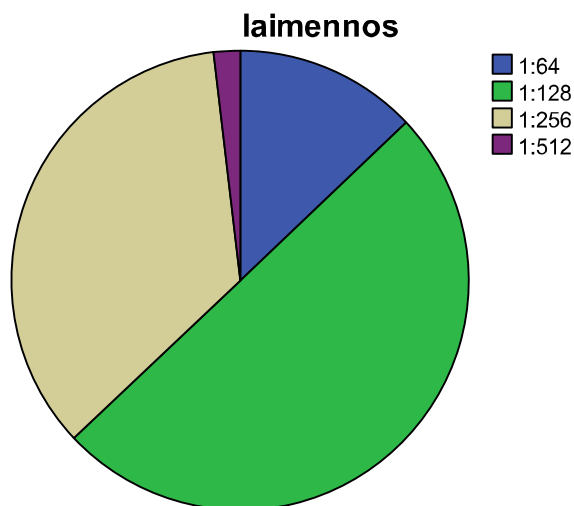
Titteri

6 vrk	N	Havainnot	13
		Puuttuu	1
		Keskiarvo	8,08
		Moodi	8
		Keskihajonta	,641
21 vrk	N	Havainnot	14
		Puuttuu	0
		Keskiarvo	8,57
		Moodi	9
		Keskihajonta	,514
+ 1 aste	N	Havainnot	13
		Puuttuu	1
		Keskiarvo	7,85
		Moodi	8
		Keskihajonta	,555
+ 35 astetta	N	Havainnot	14
		Puuttuu	0
		Keskiarvo	8,50
		Moodi	9
		Keskihajonta	,855

*Taulukko 4. Havaintojen määrä kaikista anti-D titrauksista

Titteri		
N	Havainnot	54
	Puuttuu	2
	Keskiarvo	8,26
	Moodi	8
	Keskihajonta	,705
	Minimi	7
	Maximi	10

Piirakkadiagrammin (Kuvio 13.) avulla voidaan helposti havaita, mikä on jakauma eri tittereiden (laimennosten) välillä. Titteriä 64 on esiintynyt seitsemän kertaa (13%), titteriä 128 27 kertaa (50%) eli puolet, titteriä 256 19 kertaa (35,2%) ja titteriä 512 yhden kerran (1,9%). Vain yksi näyte on poikennut tavoitteista enemmän kuin yhden yksikön verran. Tässä poikkeavassa näytteessä vasta-aine on kuitenkin havaittu titraamalla jo laimeammassa näytteessä kuin muut ja tämä kertoo sen, että vasta-aineen pitoisuus ei ainakaan ole vähentynyt.



Kuvio 13. Titteritulosten (laimennosten) jakauma.

Taulukosta 5. ilmenee, minkälaisia tittereitä on saatu eri olosuhteissa olevista näytteistä. Suurimmasta osasta (moodi) titterin tulokseksi on tullut 128 (eli 1:128), joka vastaa täysin tavoitetta. Taulukosta huomaa, että eri tittereiden arvoja on jakautunut vain vierekkäisille tittereille, lukuun ottamatta yhtä näytettä. Kyseinen vaihtelu on normaalia menetelmään liittyvää vaihtelua ja sitä ei katsota muutokseksi. Titterin tulkitaan olevan muuttunut, mikäli ero on kahden yksikön verran. Eli jos titteri on ollut 128, muutosta olisi tapahtunut, jos tulos olisi 32 tai 512. Ainoa muutos on olosuhteessa +35° yhden näytteen osalta ja sekin viittaa enemmän vasta-ainepitoisuuden nousuun. Trendi on siis enemmän vasta-ainepitoisuuden nousu kuin lasku. Tässä tapauksessa olosuhteilla ei ole ollut vaikutusta vasta-aineen titteriin merkitsevästi.

Taulukko 5. Titteritulosten lukumäärä eriteltynä eri olosuhteisiin.

			laimennos				Yhteensä
			1:64	1:128	1:256	1:512	
olosuhde	6 vrk	Määrä	2	8	3	0	13
		% olosuhteessa	15,4%	61,5%	23,1%	,0%	100,0%
	21 vrk	Määrä	0	6	8	0	14
		% olosuhteessa	,0%	42,9%	57,1%	,0%	100,0%
	+ 1 aste	Määrä	3	9	1	0	13
		% olosuhteessa	23,1%	69,2%	7,7%	,0%	100,0%
	+ 35 astetta	Määrä	2	4	7	1	14
		% olosuhteessa	14,3%	28,6%	50,0%	7,1%	100,0%
Yhteensä		Määrä	7	27	19	1	54
		% olosuhteessa	13,0%	50,0%	35,2%	1,9%	100,0%

8.3 Anti-Fya:n säilyvyys eri lämpötiloissa ja pidennetyissä seisotusajoissa

Seuraavassa taulukossa (Taulukko 6.) ilmenee näyteputkien määrät anti-Fy^a:n suhteen eri olosuhteissa. Kuudessa vuorokaudessa näyteputkia oli 17, 21 vuorokaudessa ja +1° asteessa 16 molemmissa ja +35° asteessa 14 putkea eli yhteensä 63 näyteputkea.

Tässä taulukossa on vertailtu eri olosuhteita järjestyslukujen keskiarvon avulla. Mitä pienempi järjestyslukujen keskiarvo on, sitä väkevämpi liuos vaadittiin vasta-aineen ilmenemiseksi. Järjestyslukujen keskiarvot kertovat anti-Fy^a:n suhteen sen, että 21

vuorokaudessa on vaadittu väkevin liuos (eli pienin titteri) vasta-aineen havaitsemiseksi ja seuraavaksi väkevin +35 asteessa. +1 asteessa ja 6 vuorokaudessa vasta-aine on havaittu melko samanlaisissa laimennoksissa. Tämä taulukko kertoo sen, että anti-Fy^a:n suhteen 21 vuorokauden olosuhteessa vasta-aine on havaittu jonkin verran muita väkevämmässä liuoksessa (pienemmässä titterissä), mikä voisi viitata vasta-ainepitoisuuden laskuun tai päinvastaisesti muissa olosuhteissa vasta-ainepitoisuuden nousuun.

Taulukko 6. Anti-Fy^a-positiivisten näytteiden määrä eri olosuhteissa.

Kruskal-Wallis testin tulokset

olosuhde		N	Järjestyslukujen keskiarvo
laimennos	6 vrk	17	37,24
	21 vrk	16	19,31
	+ 1 aste	16	38,47
	+ 35 astetta	14	32,75
	Yhteensä	63	

Seuraavasta taulukosta (Taulukko 7.) käy ilmi titterin keskiarvo, moodi ja keskihajonta. Keskiarvoa ja keskihajontaa ei voida tässä taulukossa tulkita, vaan ne ovat vain tilastollisen menetelmän tukena ja apuna laskettaessa tilastollista merkitsevyyttä. Moodi eli useimmiten esiintynyt titterin arvo on 6 vuorokauden ja +1° asteen olosuhteessa 8 ja 21 vuorokauden olosuhteessa 4. +35° asteen olosuhteessa useampi titterilukema on esiintynyt yhtä monta kertaa ja tilasto-ohjelma ilmoittaa moodiksi pienimmän mahdollisen, joka tässä tapauksessa on 4. Jälleen titterin arvot ovat vaihtuneet vain yhdellä yksiköllä, jota ei tulkita muutokseksi, vaan menetelmän normaaliksi vaihteluksi. Lisäksi titterin tavoitelukema oli 4.

Pienemmässä taulukossa (Taulukko 8.) on kuvattu havaintoja titterien kesken huomioiden kaikki olosuhteet. Yhteensä titterilukemia on 63. Havaintojen määrät olosuhteissa vaihtelevat, koska osalta näytteenantajista otettiin muu määrä kuin viisi putkea. Useimmiten esiintyvä titterin arvo eli moodi on 8 (1:8). Pienin titteri on 2 ja suurin 8. Tässäkin trendinä on enemmän vasta-ainepitoisuuden nousu kuin lasku. Olosuhteet eivät siis merkitsevästi ole vaikuttaneet vasta-aineiden pitoisuuksiin. Titterin tavoitearvo anti-Fy^a:n suhteen oli 4.

*Taulukko 7. Anti-Fy^a-positiivisten näytteiden titterien keskiarvo, moodi ja keskihajonta.

Tilastot

Titteri

6 vrk	N	Havainnot	17
		Puuttuu	1
		Keskiarvo	3,65
		Moodi	4
		Keskihajonta	,493
21 vrk	N	Havainnot	16
		Puuttuu	2
		Keskiarvo	3,00
		Moodi	3
		Keskihajonta	,516
+ 1 aste	N	Havainnot	16
		Puuttuu	2
		Keskiarvo	3,69
		Moodi	4
		Keskihajonta	,479
+ 35 astetta	N	Havainnot	14
		Puuttuu	4
		Keskiarvo	3,50
		Moodi	3 ^a
		Keskihajonta	,519

a. Useita moodeja esiintyy. Pienin arvo on näytetty.

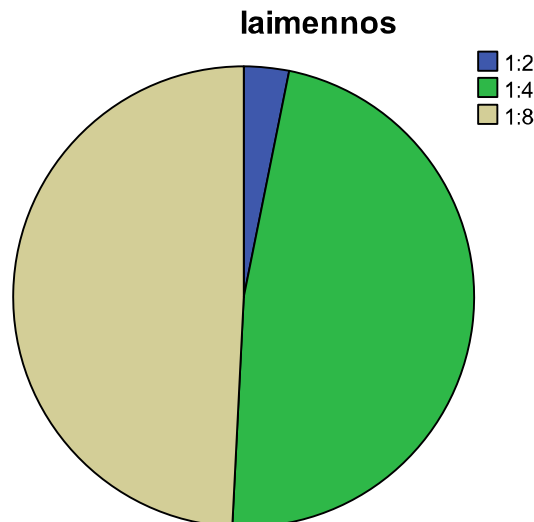
*Taulukko 8. Anti-Fy^a-positiivisten näytteiden titterit yhteensä jokaisesta olosuhteesta

Tilastot

Titteri

N	Havainnot	63
	Puuttuu	9
	Keskiarvo	3,46
	Moodi	4
	Keskihajonta	,563
	Minimi	2
	Maximi	4

Seuraavassa kuviossa (Kuvio 14.) havainnollistuu eri tittereiden (laimennosten) suhde ja esiintyvyys anti-Fy^a – positiivisten näytteiden kesken. Diagrammista käy selvästi ilmi, mikä on jakauma eri tittereiden välillä. Huomaa, että titterilukemat ovat jakautuneet melkein tasan lukeman 4 ja lukeman 8 välillä. Lisäksi kaksi näytettä on saanut titterikseen lukeman kaksi. Tavoitearvo oli 4, joten vaihtelua on tapahtunut vain yhden yksikön verran. Yhden yksikön vaihtelua ei menetelmäohjeen mukaan pidetä merkittävänä.



Kuvio 14. Tulosten jakauma eri tittereissä.

Seuraavasta taulukosta (Taulukko 9.) käy ilmi, että titterit anti-Fy^a:n suhteen on aivan erilaisia kuin edellä olevassa taulukossa esitetyt anti-D:n suhteen. Heikkous ilmenee seuraavassa taulukossa siten, että kaikki titterit ovat 8 tai alle. Mikäli olosuhde vaikuttaisi tittereihin merkityksellisesti, titterit olisivat tavoitelukemaa pienempiä. Taulukosta käy ilmi, että 21 vuorokauden olosuhteessa suurin osa on saanut titteriksi lukeman 4, kun taas samat näytteet, jotka ovat olleet 6 vuorokauden olosuhteessa, enimmäkseen saaneet titterilukemakseen 8. Tästä käy ilmi, että trendinä on jälleen enimmäkseen nouseva vasta-aine pitoisuus kuin laskeva, sillä tittereiden tavoitearvo oli juuri 4, mikä on 21 vuorokauden olosuhteen moodi. Tuloksista käy siis ilmi, että olosuhteilla ei ole ollut vaikutusta vasta-aineen pitoisuuteen laskevasti.

Taulukko 9. Titteritulosten lukumäärä eriteltyinä eri olosuhteisiin.

			laimennos			Yhteensä
			1:2	1:4	1:8	
olosuhde	6 vrk	Määrä	0	6	11	17
		% olosuhteessa	,0%	35,3%	64,7%	100,0%
	21 vrk	Määrä	2	12	2	16
		% olosuhteessa	12,5%	75,0%	12,5%	100,0%
	+ 1 aste	Määrä	0	5	11	16
		% olosuhteessa	,0%	31,3%	68,8%	100,0%
	+ 35 astetta	Määrä	0	7	7	14
		% olosuhteessa	,0%	50,0%	50,0%	100,0%
Yhteensä		Määrä	2	30	31	63
		% olosuhteessa	3,2%	47,6%	49,2%	100,0%

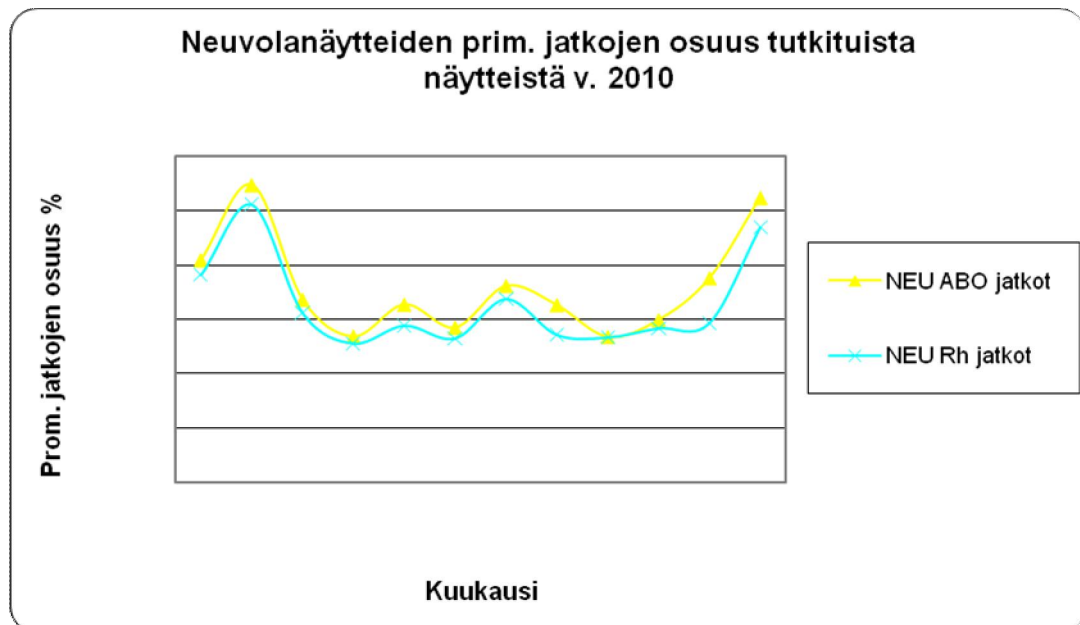
8.4 Muutokset näytteen pipetoitavuudessa

Poikkeuksetta kaikki anti-D-positiiviset näytteet antoivat vahvan (vähintään 1+) reaktion myös vasta-aineseulonnassa ID-Gelstationilla. Anti-Fy^a-positiiviset näytteet antoivat +/-–2+ reaktion toisella tai kummallakin solulla (O¹ tai O²-solut). Sen sijaan hemolyysistä johtuen osa näytteistä, joihin ei ollut syötetty mitään vasta-ainetta ja jotka oli primääriseulonnassa todettu negatiivisiksi, antoivat positiivisen tuloksen ID-Gelstationin vasta-aineseulonnassa. Tämä herättää kysymyksiä siitä, voidaanko vasta-aineseulonnan tuloksiin luottaa lainkaan, olivatko tulokset vain sattumia, positiivisia ainoastaan hemolyysistä johtuen. Merkittävää eroa tuloksilla ei ollut eri olosuhteiden välillä. Kuitenkin hemolyysin asteessa oli hienoisia nousuja +35°C ja 21 vrk seisotusajan suhteen kahteen muuhun (+1°C ja 6 vrk seisotus) olosuhteeseen nähden.

Edellä mainitut tulokset oikeita neuvolanäytteitä tutkittaessa johtaisivat mahdollisesti turhiin jatkotutkimuksiin tai vähintäänkin näytteiden uusintaseulontaan manuaalisesti geelikortilla. Kumpikin vaihtoehto hidastaa tulosten välittymistä Veripalvelulta potilasta hoitavalle yksikölle sekä on Veripalvelun näkökulmasta erittäin epäedullinen sekä henkilöstö- että materiaalikustannusten vuoksi.

Virheellinen positiivinen tulos ilmeni viimeistään jatkotutkimusvaiheessa, jolloin erilaiset pitoisuuksien mittaukset ja vasta-ainetunnistukset tehdään käsin. Todennäköisesti se huomattaisiin jo tulosten ensisijaisessa tarkistuksessa, joissa silmiinpistävä hemolyysi havaittaisiin varmasti. Tällainen tulosten epäjohdonmukaisuus ja silmin arviointi vaikuttaa silti pitkällä tähtäimellä tulosten luotettavuuteen ja kyseenalaistaa analysaattorin perimmäisen tarkoituksen; avustaa laboratorion henkilökuntaa suurten näytemäärien käsittelyssä.

Koska neuvolanäytteistä määritetään ABO- ja RhD-veriryhmä Olympus PK 7300-analysaattorilla, tutkimme näytteiden pipetoitavuutta myös tällä analysaattorilla. Tässä tapauksessa merkitykselliset löydökset olivat niitä tuloksia, joita analysaattori ei pystynyt lainkaan tulkitsemaan. Näytteiden pipetoitavuutta tutkiessa huomioitiin tuloksista siis ainoastaan ne, jotka analysaattori oli syystä tai toisesta jättänyt kysymysmerkeiksi. Arvioitaessa tuloksia apuna käytettiin Veripalvelun tilastoa jatkotutkimuksien määrästä neuvolanäytteiden kohdalla (Kuvio 15.)



Kuvio 15. Primäärijatkotutkimusten osuus neuvolanäytteistä

6vrk: 6 vuorokauden seisotusajan jälkeen 40 näytteestä seitsemän näytettä olisi joutunut jatkotutkimukseen epätäydellisistä tuloksista johtuen. 17,5 % näytteistä olisi reaalitilanteessa jouduttu määrittämään jatkotutkimusten avulla. Tämä määrä poikkeaa normaalitilanteesta, jatkotutkimusten määrä on suurempi. Sekä solupuolelta tehtävät

antigeenimääritykset, että plasmasta tehtävät punasoluvasta-ainetutkimukset olivat tasapuolisesti jääneet auki kysymysmerkeiksi.

21vrk: 21 vrk jälkeen näytteitä ei enää määritetty analysaattorein, sillä pitkän inkubaation seurauksena näytteet eivät enää olleet analysaattorikelpoisia (lue vahvasti hemolyyttisiä ja reilusti hyytymiä sisältäviä). Geelikortilla tehdyn vasta-aineseulonnan tulokset olivat selvästi positiivisia anti-D:tä ja anti:Fy^a:a sisältävien näytteiden kohdalla ja negatiivisia puhtaiden kontrollinäytteiden kohdalla. Pipetoitavuuden kohdalle voimme todeta, ettei kolmen viikon jälkeen näytteitä tule ottaa huomioon lainkaan vaan uuden näytteen pyytäminen potilaasta on ehdotonta. Hätätilanteessa, kolme viikkoa vanhasta näytteestä saadaan kuitenkin vasta-aineseulonnan tulos manuaalisesti, jos uuden näytteen saaminen on syystä tai toisesta mahdotonta.

+1°C: Viiden vuorokauden inkubaatiossa+ 1°C asteessa olevista 39 näytteestä 13 näytettä jäi jatkotutkimuksiin. Jatkotutkimuksiin joutui siis 33,3 % näytteistä eikä näin suuri prosentuaalinen osuus voi mennä satunnaisen poikkeaman piiriin. Analysaattori hälyytti taas sekä solupuolen että plasmapuolen tuloksista, joten näytteiden hemolyysi sekä olosuhteista aiheutunut hyytymien esiintyminen vaikuttivat kumpikin pipetoitavuuteen selvästi.

+35°C: Viiden vuorokauden inkubaatiossa+ 35°C asteessa olevista 39 näytteestä 26 näytettä jäi jatkotutkimuksiin. Jatkotutkimuksiin joutui siis 66.6 % näytteistä. Näytteet olivat silminnähtävien hemolyyttisiä, tulokset olivat jääneet analysaattorin poikkeamiin sekä solu- että plasmapuolen epäjohdonmukaisuuksista johtuen. Suuresta prosentuaalisesta osuudesta voidaan päätellä, että näytteiden laatu kärsii selvästi korkeasta lämpötilasta, joka voi olla hyvinkin realistinen kesällä tapahtuvan kuljetuksen aikana.

8.5 Yhteenveto tuloksista

Tulokset olivat toivottuja anti-D:n suhteen, sillä pipetoidulla määrällä anti-D:tä eli 300 µl oli tarkoitus saada titterin arvoksi 128. Titrausten moodi oli 128 eli voidaan todeta, että tilastollisesti merkitseviä tuloksia ei syntynyt. Sen sijaan kliinisesti merkityksellisiä tulokset ovat, sillä nyt voidaan todeta, että vasta-aineen pitoisuudet eivät juurikaan muutu, vaikka näytteet ovat kulkeneet erilaisissa olosuhteissa. Voidaan todeta, että mikään testatuista olosuhteista ei vaikuttanut merkittävästi vasta-aineen säilyvyyteen

vaan päinvastoin ilmenevä trendi oli enemmän vasta-ainepitoisuuden nousu kuin lasku.

Myös anti- Fy^a :n osalta tulokset olivat hyvät ja vasta-ainepitoisuuden laskua ei ilmennyt. Tavoitteena pipetoidulla määrällä anti- Fy^a :a eli 700 μ l oli tarkoitus saada titterin arvoksi 4. Anti- Fy^a :n suhteen tulokset osoittivat, että olosuhteilla ei ollut vaikutusta vasta-aineen pitoisuuteen laskevasti. 21 vuorokaudessa moodi oli 4, joka oli titterilukeman tavoite. Muissa olosuhteissa moodi oli 8, mikä tarkoittaa sitä, että vasta-aine on havaittu jo tavoitetta laimeammassa näytteessä (suuremmassa titterissä). Tässäkin trendinä on enemmän vasta-ainepitoisuuden nousu kuin lasku.

Tuloksista kävi myös ilmi, että anti-D:n ja anti- Fy^a :n titterit ovat aivan erilaisia keskenään. Tämä on täysin normaali ja odotettu reaktio ja se kuvastaa hyvin sitä, että anti- Fy^a on ns. heikko vasta-aine. Tämä tulos myös puoltaa työmme onnistuvuutta.

Kaikkiaan, vaikka tilastollista merkitsevyyttä titrauksen tuloksilla ei ollut, kliininen merkitys oli suuri. Tulokset osoittivat, että erilaisten kuljetusolosuhteiden suurikin vaihtelu, ei vaikuta anti-D-, eikä anti- Fy^a -vasta-aineiden pitoisuuksiin. Tämä on toivottu tulos odottavien äitien kannalta, sillä vasta-aine ei ole niin altis erilaisille lämpötiloille ja seisotusajoille kuin olisi voinut olettaa. Voidaan todeta, että näytteitä voidaan luotettavasti määrittää, vaikka ne kulkevat erilaisissa olosuhteissa.

Tulosten perusteella voidaan myös todeta, että näytteen laatu kärsi jokaiseen testiolosuhteen vaikutuksesta. Voimakasta hemolysoitumista oli havaittavissa etenkin +35 °C ja 21 vuorokauden olosuhteissa olleissa näytteissä. Pipetoitavuuden osalta, +35 °C inkubaation putkista reilusti yli puolet (66,6%) ei mennyt enää analysaattorista läpi, muissakin olosuhteissa muutos oli selkeästi huomattavissa. Pipetoitavuuden testaamisen osalta 21 vuorokauden olosuhde jäi kokonaan pois, sillä näytteiden tiedettiin jo etukäteen kärsivän pitkästä seisotusajasta niin, ettei niitä uskallettu laittaa analysaattoriin edes testimielessä.

9 Luotettavuuden pohdinta

Tutkimuksessa pyrimme hyvään reliabiliteettiin eli luotettavuuteen. Tällä tarkoitetaan sitä, että tutkimus on toistettavissa kenen tahansa tekemänä ja että suunnitelmamme

on niin tarkka, että kuka tahansa sen pystyy luotettavasti toistamaan. Luotettavuuteen olemme pyrkineet harjoittelemalla menetelmiä, ennen kuin toteutimme itse käytännön työn. Lisäksi saimme perehdytystä menetelmiin osaavalta henkilökunnalta ennen työmme varsinaista toteutusta.

Tutkimuksessa pyrimme myös hyvään validiteettiin. Validiteettia arvioidaan sen perusteella, miten on onnistuttu mittaamaan sitä, mitä tutkimuksessa on ollut tarkoitus mitata. Sellaista tutkimusta, jossa ei esiinny systemaattista virhettä, voidaan pitää validiteetiltaan hyvänä. (Vilka, H. 2007: 179.)

Tutkimustuloksia voidaan mielestämme pitää luotettavina, vaikka otoskoko jäikin suhteellisen pieneksi. Teimme koko käytännön työn täysin ohjeiden mukaisesti ja Veripalvelun rutiinikäytössä olevilla laitteilla ja välineillä. Myös tilat, jossa suoritimme käytännön laboratoriotyöt, olivat Veripalvelun jokapäiväisessä käytössä olevia tiloja. Olimme harjoitelleet titrausta etukäteen Veripalvelun ammattitaitoisen henkilökunnan avustuksella, joten käytännön työn alkaessa titrauksen suorittaminen ja lukeminen ei ollut vieras asia.

Yksi työn virhelähde olisi voinut olla huolimattomuus kirjattaessa tutkimustuloksia tilasto-ohjelmaan. Tämän otimme kuitenkin huomioon jo ennen kuin tuloksia alettiin kirjaamaan tilasto-ohjelmaan. Tarkistimme useita kertoja, että tulokset ovat oikein kirjatut ja näin välttyttiin mahdolliselta virhelähteeltä.

Luotettavuutta puoltaa myös se, että saimme odotettuja tuloksia. Tuloksista käy esimerkiksi ilmi se, että anti-Fy^a:n reaktiot olivat huomattavasti heikompia kuin anti-D:n reaktiot. Lisäksi eri olosuhteiden välillä ei ollut merkittävää eroa ja tavoitteena onkin, että tulokset eivät jakautuisi ollenkaan. Epäluotettavuutta olisi herättänyt se, että olisimme saaneet hyvin erilaisia tittereitä saman vasta-aineen sisältävistä näytteistä. Yhtäkään väärää negatiivista tulosta ei tullut. Lisäksi moodit olivat tavoitearvoissa.

Tutkimuksessa käyttämistämme näytteistä, tiesimme ennakkoon ovatko näytteet Fy^a-vai D-negatiivisia, vai molempien suhteen positiivisia. Otimme näytteet itse ja tiesimme koko tutkimuksen ajalta, millaisissa olosuhteissa näytteet ovat olleet.

Myös eettinen puoli tästä työstä onnistui hyvin ja näytteitä luovuttaneiden henkilöiden tulokset pysyivät tunnistamattomina työn loppuun asti. Tutkimuksessa käyttämämme

testinäytteet otimme itse Veripalvelun henkilökunnasta, jotka olimme itse laatimallamme ilmoituksella rekrytoineet sähköpostin avulla vapaaehtoisiksi näytteenantajiksi. Suurena apuna rekrytoinnissa toimi Katri Haimila, joka tiesi samansuuntaisten ilmoitusten toimineen myös edellisten tutkimusten kohdalla. Näytteet määritettiin tutkimuksemme jokaisessa vaiheessa pelkän numerotunnisteen avulla, eivätkä näytteet enää näytteenoton jälkeen olleet tunnistettavissa tietyn henkilön luovuttamiksi. Lisäksi tutkimamme asiat eli veriryhmä ovat ihmisen perusominaisuuksia, ne eivät paljasta sairauksia, eivätkä hyviä tai huonoja ominaisuuksia.

Näytteiden tekeminen anonymiksi selvitettiin myös rekrytointi-ilmoituksessa, eikä henkilökohtaisia tuloksia näin ollen olisi voinut saada meiltä edes pyydettyä. Eettisiä ongelmia ei esiintynyt missään vaiheessa tutkimusta ja eettisestä näkökulmasta onnistuimme työssämme hyvin.

Alun perin putkia olisi pitänyt olla jokaisessa olosuhteessa saman verran. Emme saaneet kuitenkaan D-negatiivisia henkilöitä yhtä paljon kuin Fy^a-negatiivisia henkilöitä. Tämän vuoksi näytemäärät vaihtelevat vasta-aineiden ja olosuhteiden kesken. Epätasaisen näyteputkimäärän vuoksi kaikkiin olosuhteisiin ei pystynyt laittamaan saman verran putkia. Putket jakaantuivat kuitenkin melko tasaisesti eri olosuhteisiin ja erot eivät olleet merkitseviä. Näin ollen voidaan tulkita, että pienet erot putkien määrissä eivät vaikuta tuloksiin. Näissä tilanteissa valitsimme satunnaisesti, mihin olosuhteisiin ”ylimääräiset” putket jaetaan.

Lisäksi olosuhteiden välisiin määriin vaikutti se, että muutama putki poksautui lämpökaapissa ollessaan +35 asteen olosuhteessa. Tämä kertoo, että näin kuumassa olosuhteessa putken ominaisuudet heikkenevät ja alkaa kertyä painetta. Kuitenkaan emme tätä voi pitää varsinaisena tutkimustuloksena, sillä olimme avanneet putkien korkit, jotta saimme vasta-aineet pipetoitua. Korkkien avaaminen ei välttämättä vastaa oikeanlaista tilannetta. Jos putket olisivat olleet kuumassa olosuhteessa pitempään, niin olisiko silloin useamman putken korkit avautuneet itsestään paineen vaikutuksesta?

10 Pohdinta

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, vaikuttavatko valitut testiolosuhteet anti-D ja anti-Fy^a -vasta-aineiden pitoisuuksiin näyteputkissa. Tutkimuksen kohteena olivat lisäk-

si näytteen laatu ja laadun muutosten vaikutukset analysointoreilla tehtäviin tutkimuksiin. Testiolosuhteiden määrittäminen perustui näytteiden oletettuihin kuljetuslämpötiloihin kesäisin ja talvisin (+1 °C ja +35 °C) sekä eripituisiin ajanjaksoihin näytteenoton ja määrittämisen välillä (6 ja 21 vuorokauden jaksot). Olosuhteiden määrittämisen perimmäisenä ajatuksena oli toistaa mahdollisimman tarkasti normaalitilanteita, joten jokaiseen testiolosuhteeseen sisältyi myös 2-3 vuorokauden aika Veripalvelun noin 5 asteisessa kylmiössä.

Tutkittavat näytteet otettiin Veripalvelun henkilökunnasta. Tämä seikka oli ratkaiseva tutkimuksemme kannalta, koska näin näytteet saatiin kontrolloitua täysin sekä laadun että näytteenkulun kannalta, jokainen vaihe oli tarkasti valvottu. Lisäksi aikaa säästy muutenkin pitkässä prosessissa, sillä Veripalvelun henkilökunta on pitkälti veriryhmien osalta jo tutkittu. Tämä mahdollisti myös tutkimuksen kulun suunnittelemisen alusta loppuun, sillä vasta-ainepitoisuuksien tutkimiselle erityisen merkitykselliset näytteet olivat joko D- tai Fy^a-antigeenin suhteen negatiivisia. Näytteen laadun eli pipetoitavuuden tutkimiseen käytettiin näytteitä, joiden veriryhmillä ei ollut sen suurempaa merkitystä, käytännössä ne olivat kuitenkin poikkeuksetta D- ja Fy^a-antigeenin suhteen positiivisia. Näiden taustatietojen perusteella tutkimuksessa käytetyt näytemäärät hahmotuivat ja tutkimus voitiin jakaa työmäärän suhteen realistisiin osioihin.

Tutkimustulokset olivat johdonmukaisia ja siten luotettavasti arvioitavissa. Ne osoittivat, että sekä anti-D että anti-Fy^a -vasta-aineet kestivät hyvin testiolosuhteissa eivätkä siis osoittaneet merkityksellistä vaihtelua vasta-ainetitteritutkimuksissa. Nämä tulokset ovat kliinisesti erittäin merkityksellisiä, sillä vasta-aineiden löytyminen äidin näytteestä on sikiön hyvinvoinnin kannalta tärkeää ja sen avulla voidaan ehkäistä sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia ja sen vakavia seurauksia. Tutkimuksen lähtökohdat ja teoriapohja ovat puhtaasti neuvolanäytteiden inspiroimia, mutta tulokset ovat ehdottomasti sovellettavissa myös verenluovuttajiin liittyviin tutkimuksiin.

Näytteen laadun tutkimukset osoittivat, että testiolosuhteet vaikuttivat näytteisiin ja saivat analysointoreilla tehtävistä tutkimuksista aikaan enenevän määrän jatkotutkimuksia. Osasta näytteistä voitiin silmämääräisesti arvioida, että kyseinen olosuhde oli aiheuttanut punasolujen hemolysoitumista siinä määrin, että analysointori ei enää tunnistanut plasmata punasolumassasta. Lisäksi näytteisiin oli ilmestynyt hyytymiä, jotka estivät näytteen pipetoitavuuden kokonaan. Koska analysointorin hylkäämien näytteiden prosenttiosuudet olivat 17,5-66,6%, voitiin tulkita tuloksien aiheutuvan testiolosuhteiden

teistamme eikä satunnaisista poikkeamista. Prosenttiosuudet pienimmilläänkin olivat siis normaalia suuremmat.

Virheellisiä positiivisia tuloksia ilmeni ID-Gelstationilla tehdyissä vasta-aineseulontatutkimuksissa, ilmeisesti voimakkaan hemolyysin seurauksena. Virheellinen positiivinen tulos ilmeni viimeistään jatkotutkimusvaiheessa, jolloin erilaiset pitoisuuksien mittaukset ja vasta-ainetunnistukset tehdään käsin. Todennäköisesti se huomattaisiin jo tulosten ensisijaisessa tarkistuksessa, joissa silmiinpistävä hemolyysi havaittaisiin varmasti. Tällainen tulosten epä johdonmukaisuus ja silmin arviointi vaikuttaa silti pitkällä tähtäimellä tulosten luotettavuuteen ja kyseenalaistaa analysaattorin perimmäisen tarkoituksen; avustaa laboratorion henkilökuntaa suurten näytemäärien käsittelyssä. Automaation merkitys, etenkin laboratoriossa, jossa tutkitaan päivittäin toista tuhatta näytettä, on huomattava, eikä sitä pystytä manuaalisesti tehtävin tutkimuksin korvaamaan. Lisäksi tulosten epäselvyys ja niiden varmistaminen manuaalisesti jatkotutkimuksin hidastaa tulosten välittymistä Veripalvelulta potilasta hoitavalle yksikölle sekä on Veripalvelun näkökulmasta erittäin epäedullinen sekä henkilöstö- että materiaalikus-tannusten vuoksi.

Vaikka tutkimustulokset indikoivat keskenään eri asioita, ovat ne kuitenkin rinnastettavissa toisiinsa laboratorioprosessin kannalta. Vaikka testiolosuhteet eivät vaikuttaneet vasta-ainepitoisuuksiin merkittävästi, näytteet olisivat silti työllistäneet laboratorion henkilökuntaa käsityönä tehtävien jatkotutkimusten muodossa aikaa säästävän automaation sijasta. Silminnähdyn huonolaatuinen neuvolanäyte olisi mahdollisesti jätetty varmuuden vuoksi huomiotta kokonaan ja pyydetty äidistä uusi näyte. Tämä aiheuttaa raskaana olevalle naiselle vaivaa ja ehkä huoltakin.

Tutkimustuloksiamme pohjalta suunnitellaan uutta näytteiden kuljetuspakkausta. Tämä on merkittävä asia, sillä tuloksia tutkaillessa voidaan todeta +35 °C testiolosuhteen vaikuttaneen näytteen laatuun huomattavasti, 66,6 % näytteistä ei ollut enää analysaattorikelpoisia. Lisäksi tätä tutkimusta varten tehdyissä esitutkimuksissa todettiin pakasasteiden (≤ 0 °C) pilaavan näytteen kokonaan. Sääolosuhteilla on siis suuri vaikutus näytteiden laatuun ja niiltä suojaaminen ehdotonta laadukkaan laboratorioprosessin kannalta. Lisäksi on edelleen huomioitava näytteen laadun merkitys nimenomaan raskaana olevien naisten, verenluovuttajien sekä potilasnäytteiden kannalta, jolloin asi-aankuuluvien kuljetuspakkauksien merkitys korostuu taas entisestään.

Kun sääolosuhteiden vaikutus näytteisiin pystytään täten tulevaisuudessa minimoimaan, voidaanko nykyohjeistusta, niin kutsuttua viiden vuorokauden sääntöä muokata? Ohjeistuksen mukaan yli viisi vuorokautta vanhoja näytteitä ei siis määritetä ollenkaan. Tätä seikkaa on syytä pohtia erityisesti sen tosiasian kannalta, että suurin osa liian vanhoina hylätyistä näytteistä on kuusi vuorokautta vanhoja, siis päivän sallittua vanhempia. Kuusi vuorokautta vanhat näytteet ja erityisesti niiden taustat herättävät ajatuksia lähettävien yksiköiden vaikeuksista saada näytteet ajallaan Veripalveluun. Ovatko näytteet mahdollisesti viikonloppua vasten otettuja eikä kuljetuksen ajoitusta ole osattu ennakoida? Kuinka merkittävä olisi määritettävien neuvolanäytteiden määrän kasvu päivittäisellä, viikoittaisella ja kuukausittaisella tasolla, jos kuusi vuorokautta vanhat näytteet hyväksyttäisiin määritettävien joukkoon? Tämänkaltainen selvitys ja muutokset ohjeistuksessa palvelisi Veripalvelun asiakasta neuvolaa ja erityisesti raskeana olevaa naista hyvinkin konkreettisella tavalla, kun käynnit neuvolassa lisänäytteiden vuoksi vähenisivät.

Tutkimustamme on mahdollista ja ehkäpä suotavaakin jatkaa ja kehittää vielä eteenpäin. Veripalvelu voi mahdollisuuksien mukaan tutkia vasta-aineiden säilyvyyttä isomalla otoksella ja muillakin, kun tutkimuksessamme edustetuilla vasta-aineilla. Jatko mahdollisuuksia seuraa myös siitä, että työmme puitteet eivät riittäneet tutkimaan esimerkiksi näytteen sekoituskertojen määrän vaikutusta näytteen laatuun. Tämän opin näytteen puitteissa tehtyjä tutkimuksia olisi silti syytä jalostaa vielä eteenpäin, sillä nyt tutkittavana oli vain kaksi vasta-ainetta ja rajallinen kahteen määrittäjään perustuva otos. Tutkittavia testiolosuhteita olisi ehkä syytä venyttää vielä hieman, ottaa tutkittavaksi ilmiöksi ennemminkin ne olosuhteet, joissa vasta-aineita ei enää esiinny lainkaan.

Tavoitteenamme oli tuottaa luotettava tutkimus, jonka tuloksista olisi konkreettista hyötyä Veripalvelussa. Opinnäytteemme pohjalta ja sitä apuna käyttäen on mahdollista jatkaa tutkimuksia Veripalvelussa edelleen, joka onkin toivottavaa laboratoriotutkimusten laadun kehittämisen kannalta. Työmme tulokset julkistamme ja esitämme Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa asiantuntijoista ja laboratorion henkilökunnasta koostuvalle yleisölle. Tämän lisäksi työmme prosessi ja tulokset esitetään Metropolia ammattikorkeakoulussa sekä Osllossa järjestettävillä Bio-Nord Symposium Biomedical science today – päivillä, jossa kuulijakunta koostuu pohjoismaiden yliopistojen ja ammattikorkeakoulujen opiskelijoista, henkilökunnasta ja tutkijoista.

Lähteet

- Aitokallio-Tallberg, Ansa 2011. Sikiön punasoluimmunisaation diagnostiikka ja hoito. Luentolyhennelmä. Labqualitypäivät 2011.
- Anstee, David - Klein, Harvey G. 2005. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.
- Bettelheim, D. – Panzer, S. – Reesink, H.W. – Csapo, B. – Pessoa, C. – Guerra, F. – Wendel, S. – Calda, P. – Sprogøe, U. – Dzielgel, M. – Aitokallio-Tallberg, A. – Koskinen, S. – Kuosmanen, M. – Legler, T.J. – Stein, W. – Villa, S. – Villa, M.A. 2010. Monitoring and treatment of anti-D in pregnancy. The International Journal of Transfusion Medicine. 99. 177-192.
- Blaney, Kathy D. – Howard, Paula R. 2000. Basic & Applied: Concepts of Immunohematology. St. Louis, Missouri: Mosby.
- Brinc, Davor – Lazarus, Alan H. 2009. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. Hematology 2009. American society of hematology.
- Casina, T.S. 2006. In search of the Holy Grail: comparison of antibody screening methods. Immunohematology. 22 (4).
- Combs, Martha Rae – Denomme, Gregory – Grossman, Brenda J. – Haley, N. Rebecca – Harris, Teresa – Jett, Betsy W. – Leger, Regina M. – Linden, Jeanne V. – McFarland, Janice G. – Perkins, James T. – Roseff, Susan D. – Sweeney, Joseph – Triulzi, Darrell J. 2005. Technical manual aabb. 15th edition. American Association of Blood Banks. Bethesda.
- Crowther CA – Middleton P. 2009. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation.
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1471-2369.tb02000.x>>. Luettu 15.2.2011.
- Daniels, G. – Castilho, L. – Flegel, W. A. – Fletcher, A. – Garratty, G. – Levene, C. – Lomas-Francis, C. – Moulds, J. M. – Moulds, J. J. – Olsson, M. L. – Overbeeke, M. – Poole, J. – Reid, M. E. – Rouger, P. – Van der Schoot, E. – Scott, M. – Sistonon, P. – Smart, E. – Storry, J. R. – Tani, Y. – Yu, L.-C. – Wendel, S. – Westhoff, C. – Yahalom, V. – Zelinski, T. 2009. International Society of Blood Transfusion Committee. Macao report. Vox Sanguinis.96. 153–156.
- Daniels, Geoff–Bromilow, Imelda 2007. Essential Guide to Blood Groups. Blackwell Publishing Ltd.
- Eder, A.F 2006. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. Immunohematology. 22 (4).

- Hillyer, Christopher D. – Shaz, Beth H. – Zimring, James C. – Abshire, Thomas C. 2009. Transfusion medicine and hemostasis. Clinical and laboratory aspects. First edition. Elsevier incorporation.
- Lee, Richard G. - Bithell, Thomas C. – Foerster, John – Athens, John W. – Lukens, John N. Witrobe's Clinical Hematology 1993. Vol.1. Ninth edition. Lea & Febiger. Philadelphia- London
- Maisels, M. Jeffrey – Bhutani, Vinod K. – Bogen, Debra – Newman, Thomas B. – Stark, Ann R. – Watchko, Jon F. 2009. Hyperbilirubinemia in the newborn infant ≥ 35 weeks' gestation: an update with clarifications. Pediatrics. 124(4).
- Male, David 1998. Immunology, an illustrated outline. Third edition. Mosby 1998.
- Martin, Sandra – Jerome, Rebecca N. – Epelbaum, Marcia I. – Williams, Annette M. – Walsh, William 2008. Addressing hemolysis in an infant due to mother-infant ABO blood incompatibility. J Med Libr Assoc. 96(3).
- McCullough, Jeffrey 1998. Transfusion medicine. The McGraw-Hill Companies, inc.
- Metsämuuronen, Jari 2004. Pienten aineistojen analyysi. Parametrittomien aineistojen analyysi. Metodologia-sarja 9. Jyväskylä:Gummerus Kirjapaino Oy.
- Murray, Neil. A – Roberts, Irene A.G. 2007. Haemolytic disease of the newborn. Verk-kodokumentti.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675453/>>. Luettu 9.2.2011.
- Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. Bilirubiini. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodo-kumentti.
<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03074>. Luettu 27.3.2011.
- Niemelä, Onni – Vilpo, Juhani (toim.) 2003. Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Kandidaattikustannus Oy. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens:
- Petrova, Anna – Mehta, Rajeev – Birchwood, Gillian – Ostfeld, Barbara – Hegyi, Thomas 2006. Management of neonatal hyperbilirubinemia: Pediatricians' practices and educational needs. BMC Pediatrics 6(6).
- Punainen Risti, Veripalvelu. Veripalvelun viestintä ja Mediafocus Oy/Tiia Soinen (toim.). Veripalvelun vuosi 2010. Vuosikertomus. Libris Oy.
- Raitakari, Maria – Lähdeniemi, Tarja – Pelliniemi, Terttu 2001. ID-Gelstation-automaatin koestus TYKS:n verikeskuksessa.
- Reid, Marion E. – Loman-Francis, Christine 2008. The Blood Group Antigen. Facts Book. Second edition. Elsevier Ltd.
- Rudmann, Sally V. 1995. Textbook of blood banking and transfusion medicine. W.B Saunders company.

- Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.) 2007. Veritaudit. 3. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim. Jyväskylä:Gummerus Kirjapaino Oy.
- Savolainen, Eeva-Riitta – Aroviita, Pekka – Dunkel, Paula – Koski, Tomi - Koskinen, Sinikka – Mahlamäki, Eija – Mäki, Tiina – Salmela, Katja - Sareneva, Hannele – Tienhaara, Anri. Hellsten, Soile (toim.) 2006. Verensiirto-opas 2006. Suomen kuntaliitto. 3. uudistettu painos. Kerava: Savion kirjapaino Oy
- Schenkel-Brunner, Helmut 2000. Human blood groups. Chemical and biochemical basis of antigen specificity. Second, completely revised edition. Springer-Verlag Wien.
- SPR Veripalvelu 2008. Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset. Verkkodokumentti. Päivitetty 09.03.2011. <<http://www.veripalvelu.fi/www/2294>>. Luettu 20.09.2010.
- SPR Veripalvelu 2008. Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset. Näytteenotto-ohje 2007. Verkkodokumentti. Päivitetty 09.03.2011. <<http://www.veripalvelu.fi/www/2294>>. Luettu 20.09.2010.
- Terveysten ja hyvinvoinnin laitos 1999. Seulontatutkimukset ja yhteistyö äitiyshuollossa. Suositukset 1999. Veriryhmäimmunisaatiotutkimukset. Verkkodokumentti. <http://www.stakes.fi/verkkojulkaisut/Muut/op34_1999.pdf>. Luettu 1.3.2011.
- Tutkimusmenetelmäohje VR 3461 2009. Punasoluvasta-aineiden seulonta Diamed ID-geelimenetelmällä. Veripalvelu. Helsinki.
- Tutkimusmenetelmäohje VR-3405 2008. Vasta-ainetitteri. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki.
- Tutkimusmenetelmäohje VR-5234 2010. Punasoluvasta-aineiden seulonta neuvolanäytteistä ID-Gelstation-laitteistolla. Veripalvelu. Helsinki.
- Tutkimusmenetelmäohje VR-5235 2010. Neuvolanäytteiden määrittäminen Olympus PK7300-laitteistolla. Veripalvelu. Helsinki.
- Ulander, Veli-Matti – Halmesmäki, Erja – Ämmälä, Pirkko 2004. Rh-immunisaation muuttuva hoito. Katsaus. Duodecim. 120(24).
- Veripalvelun tilasto. Julkaisematon materiaali. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. 2005-2010.
- Vilka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

HALUAISITKO OSALLISTUA VASTA-AINEIDEN SÄILYVYYSTUTKIMUKSEEN?

Teemme opinnäytteenämme tutkimusta punasoluvasta-aineiden (anti-Fya ja anti-D) säilyvyydestä eri olosuhteissa. Näytteinä käytämme ns. normaaleja, vasta-aineettomia näytteitä, joihin tutkimukseen liittyvät vasta-aineet lisätään ennen varsinaisia määrytyksiä. Lisäksi näytteitä tarvitaan tutkimuksiin, joiden avulla selvitetään HVB ja HVC antigeenien ja vasta-aineiden säilyvyyttä näytteissä. Myös näihin virustutkimusten näytteisiin lisätään tarvittavat antigeenit ja vasta-aineet jälkikäteen määrytyksiä varten. Osa näytteistä määritetään sellaisenaan normaalinäytteinä.

Tähän tarvitsimme Sinun apuasi, sillä tutkimuksemme vaatii yhteensä 200 näytettä Veripalvelun henkilökunnalta. Jokaiselta näytteenantajalta tarvitaan 5 putkellista verta. Näytteenottoon voit tulla joko toisena tai kumpanakin päivänä. Näytteitä tarvitsemme 20 henkilöltä/pv, joten ilmoittautuminen etukäteen on oleellista. Sinun ei tarvitse erikseen valmistautua näytteenottoon (raskaana olevien naisten näytteitä emme valitettavasti voi käyttää) ja näytteenottotilanne kestää n. 5-10 minuuttia per näytteenantaja. Näytteet otetaan Veripalvelun tiloissa, neuvotteluhuone Pikku a:ssa. Valitsethan itsellesi sopivimman ajankohdan joko yhtenä tai molempina päivinä:

2.12 (to) klo 13.00–15.30: 13.00–13.30, 13.30–14.00, 14.00–14.30, 14.30–15.00 ja 15.00–15.30

ja

9.12 (to) klo 8.30–11.00: 8.30–9.00, 9.00–9.30, 9.30–10.00, 10.00–10.30 ja 10.30–11.00

Näytteet käsitellään anonyymisti kumulatiivisen numerosarjan avulla ja niistä määritetään ainoastaan ABO, Rh(D) ja vasta-aineseulonta. Yksittäisiä tuloksia ei julkisteta erikseen. Tulokset käsitellään ja ovat opinnäytetyöstämme luettavissa tilastollisessa muodossa sekä suurempana kokonaisuutena.

KIITOS OSALLISTUMISESTANNE TÄRKEÄÄN PROJEKTIIMME!

ILMOITTAUTUMINEN NÄYTTEENOTTOON:

Nina Grasutis
bioanalytiikan opiskelija
Metropolia AMK
nina.grasutis@metropolia.fi

TAI

Milla Kulin
bioanalytiikan opiskelija
Metropolia AMK
milla.kulin@metropolia.fi

LISÄTIETOJA:

Katri Haimila
Lab. asiantuntija
SPR Veripalvelu
katri.haimila@veripalvelu.fi

Työssä käytettyjä laitteita, reagensseja ja tarvikkeita

- Sentrifuugit ja käytetyt ohjelmat:
Hettich Rotanta 46 → 2800 rpm, 5 minuuttia
DiaMed Diacent-12 → 500 rpm, 10 sekuntia

DiaMed DiaCent-CW → 4 x pesuohjelma

ID-Centrifuge 12 S II, Micro Typing System
- Vasta-aineet: Anti-D Forte, lot: 7.1.1991
Anti-Fya, lot: VC 24.10.1996
- Kontorolli: ORTHO[®] Coombs control, lot: K750, exp. 2011-01-04
- Anti-IgG: Alba Bioscience.
- Testisolut: R1r 0816664, exp 7.1.11
R1r' (Fya+b+) 4%
- Tarvikkeet: Wassermann-putkia ja putkitelineitä
Automaattipipettejä, Biohit, 50-200 µl ja 200-1000 µl ja pipetinkärkiä
- Mikroskooppi: Olympus Tokyo
- Vesihaude: Grant, Sub 28
- Inkubaattori: DiaMed-ID, ID-Incubator 37 S I
- Sekoittaja: Vortex Genie 2
- Lämpötila-Loggerit: TempTale4

Lisäksi näytteiden ABO- ja Rh-ryhmät sekä rutiini-vasta-aineseulonta tehtiin seuraavilla analysaattoreilla:

- Analysaattorit: Olympus PK 7300
Diamed ID-Gelstation

+ analysaattoreissa normaalisti käytettävät reagenssit, testisolut ja kontrollit

21.02.2007

RASKAUDENAIKAISET VERIRYHMÄ- JA VASTA-AINETUTKIMUKSET

Raskaudenaikaisten veriryhmä- ja vasta-ainetutkimusten tarkoituksena on löytää ne immunisoituneet äidit, joiden lapsilla on vaara sairastua vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin joko raskauden aikana tai syntymän jälkeen. Verinäytteestä tutkitaan punasoluvasta-aineet ja määritetään ABO- ja RhD-veriryhmä.

Näyte tutkitaan

- kaikista raskaana olevista äideistä ensimmäisen neuvolakäynnin yhteydessä, tavallisimmin raskausviikolla 8–12
- RhD negatiivisista äideistä lisäksi raskausviikolla 24–26 ja viikolla 36
- RhD positiivisista äideistä, joille on tehty verensiirtoja tai joilla on keltaisuuden vuoksi hoidettuja lapsia, raskausviikolla 36
- immunisoituneista äideistä eli äideistä, joilla on joko aikaisemman raskauden tai tämän raskauden aikana todettuja punasoluvasta-aineita, Veripalvelun vastauksessa annettujen ohjeiden mukaan.

Isän näyte tutkitaan Veripalvelun pyynnöstä, kun äidillä on punasoluvasta-aineita, jotka voivat aiheuttaa vastasyntyneen hemolyyttisen taudin.

Kirjallisuus: Seulontatutkimukset ja yhteistyö äitiyshuollossa. Suositukset 1999. STAKES opas 34, 1999.

Näyte

Verinäyte otetaan 6/7 mL:n EDTA-putkeen (ei geeliputkeen). Immunisoituneista äideistä otetaan 2 x 6/7 mL EDTA-putkeen. Näytteen mukana tulee olla aina 'Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-aineet' – lähete huolellisesti täytettynä. Putket ja pakkausmateriaalit kuuluvat tutkimushintaan, asiakas maksaa postimaksut.

- Kun verinäyte otetaan EDTA:ta sisältävään putkeen, on putki sekoitettava välittömästi näytteenoton jälkeen. EDTA-putkea käännetään ylösalaisin huolellisesti (ei saa ravistaa) 7–10 kertaa näytteen ja EDTA:n sekoittamiseksi.
- Putken tulee olla täysi. Jos putki jää vajaaksi, sekoittamiseen tulee kiinnittää erityistä huomiota. Liian pieni näyte voi aiheuttaa ongelmia analysointoreilla, eikä näyte riitä mahdollisiin jatkotutkimuksiin (esim. vasta-aineen tunnistus). Jos näyte on liian pieni, joudumme pyytämään uuden näytteen. Suositeltava näytteen tilavuus on vähintään 3 mL.

21.02.2007

- Näytettä ei sentrifugoida.
- Näyteputkeen merkitään selkeästi äidin nimi, henkilötunnus ja näytteenottopäivämäärä.
- Näytteen tulee olla tuore. Se tulisi lähettää mahdollisimman pian siten, että näyte on Veripalvelussa viimeistään 3–5 vuorokauden kuluessa näytteenottopäivästä.
- Suositeltavia näytteen lähetyspäiviä ovat ma, ti, ke ja to. Näytteitä ei suositella lähetettäväksi perjantaina, vaan perjantaisin otetut verinäytteet säilytetään jääkaappilämpötilassa pystyasennossa viikonlopun yli ja postitetaan heti maanantaina.
- Näyte voidaan lähettää huoneenlämpöisenä.
- Talviaikana tulee varmistaa, ettei näyte pääse jäätymään.

Laboratoriovastaus

Äidin vastaukseen merkitään

- ABO- ja RhD-veriryhmä sekä vasta-aineseulonnan tulos

Jos äidillä on vasta-aineita, merkitään lisäksi

- Vasta-aine ja sen pitoisuus (titteri, IU/mL)
- Vasta-aineen merkitys ja ohjeet seurantatiheydestä
- Äidin muu veriryhmä (fenotyyppi)

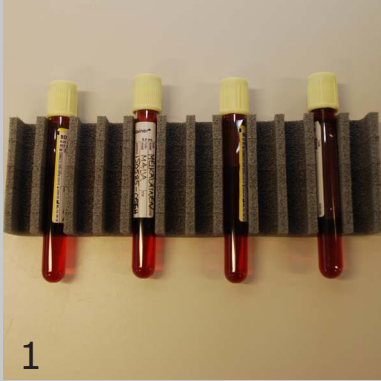
Isän vastaukseen merkitään ABO- ja RhD-veriryhmä ja muu veriryhmä (fenotyyppi).

Veripalvelu postittaa laboratoriovastaukset äidin neuvolaan. Jos äidillä on raskauden kannalta merkityksellinen punasoluvasta-aine, laboratoriovastaus postitetaan myös yliopistosairaalaan, jonka alueella äiti asuu. Vastaukset postitetaan kaksi kertaa viikossa, vasta-aineellisista äideistä vastaus postitetaan heti, kun tulos on valmiina.

Lisätietoja

Suomen Punainen Risti, Veripalvelu
Potilastutkimukset/neuvolanäytetutkimukset
Kivihaantie 7, 00310 Helsinki
p. (09) 5801 252, 5801 254, 5801 409, faksi (09) 5801 397

RASKAUDENAIKAISTEN VERIRYHMÄ- JA VERIRYHMÄVASTA-AINETUTKIMUSNÄYTTEIDEN PAKKAUSOHJE



- 1 Aseta näyteputket vaahtomuovialustalle niin, että alusta pysyy suorassa ja tuntuu tukevalta. Jos putkia on vähän, kannattaa niiden väliin jättää tyhjiä välejä. Laita yhteen lähetykseen enintään kahdeksan näytettä.
- 2 Laita vaahtomuovialusta muovipussiin ja aseta imeytysliina vaahtomuovialustan alle. Imeytysliina estää nesteen valumisen ulos pussista, jos näyteputki menee rikki. Älä kääri imeytysliinaa näyteputkien ympärille.
- 3 Sulje pussi huolellisesti ja taittele se vaahtomuovialustan ympärille.
- 4 Pakkaa muovipussi sisältöineen kelta-mustaraidalliseen laatikkoon. Laita laatikkoon mukaan myös *Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-aineet* -lähete. Älä pakkaa lähetettä muovipussin sisään.
- 5 Paina sisään laatikon pohjassa olevat kaksi läppää, jotta laatikosta tulee tukeva ja se kestää hyvin kuljetuksen. Sulje laatikko käyttäen laatikon omaa teippinauhaa.
- 6 Varmista, että pakkauksen vastaanottajaksi on merkitty *SPR Veripalvelu, Näytteiden esikäsitteily-yksikkö, Neuvolanäytetutkimukset*. Lähetä näytteet Veripalveluun mahdollisimman pian 1. luokan kirjeenä. Postimaksu veloitetaan painon mukaan. Säilytä perjantaisin otetut näytteet pystyasennossa jääkaapissa ja postita ne heti maanantaina.

Lisätietoja

Suomen Punainen Risti, Veripalvelu, Potilastutkimukset/neuvolanäytetutkimukset, Kivihaantie 7, 00310 Helsinki
p. 09 5801 252, 5801 254, 5801 409, faksi 09 5801 484

Itellan ohjeet näytteiden lähettämisestä: www.itella.fi/liitteet/palvelutjatuotteet/diagnostiset_naytteet_ohje.pdf