

Henrika Werling

# Suoran Coombs-määrityksen validointi Classic Plus-analysaattorilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

16.4.2013

Tekijä Otsikko	Henrika Werling Suoran Coombs-määrityksen validointi Classic Plus-analysaattorilla
Sivumäärä Aika	21 sivua + 1 liite 16.4.2013
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Bioanalyttikko Sisko Takala Sairaalakemisti Jari Leinonen Lehtori Terttu-Liisa Lindell
<p>Suora Coombsin koe on tärkeä osa hemolyttisestä tilasta kärsivän potilaan laboratoriodiagnostiikkaa. Sen avulla tutkitaan onko hemolyysin syynä potilaan punasolujen pinnalle kiinnitynyt vasta-aine tai koplementti. Tämä opinnäytetyö on tehty HUSLABin kliinisen kemian ja hematologian vastuu-alueen Meilahden sairaalan verikeskukselle, jossa suorat Coombs-määritykset on tähän saakka tehty manuaalisesti. Työn tarkoituksena oli validoida suora Coombs-määritys Classic Plus-analysaattorille, jolla verikeskuksessa tehdään muitakin immunohematologisia määrityksiä. Osa näistä määrityksistä tehdään automaattisella ja osa puoliautomaattisella menetelmällä. Puoliautomaattinen menetelmä eroaa automaattisesta siinä mielessä, että tulokset tarkistetaan visuaalisesti laitteen optisen tulosten lukemisen jälkeen. Näin menetellään näytteiden osalta, jotka laite luokittelee negatiivisiksi, koska laite ei aina havaitse heikkoa positiivisuutta.</p> <p>Työssä tutkittiin manuaalisella, automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saatujen tulosten yhtäpitävyyttä käyttäen manuaalista menetelmää referenssimenetelmänä. Lisäksi tutkittiin automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saatujen tulosten keskinäistä yhtäpitävyyttä käyttäen puoliautomaattista menetelmää referenssimenetelmänä. Koska suora Coombsin koe on osittain kvalitatiivinen ja osittain semikvantitatiivinen määrittäminen, eri menetelmillä saatujen tulosten yhtäpitävyyden tarkastelussa käytettiin tähän soveltuvaa kappa-statistiikkaa. Työn avulla pyrittiin saamaan vastaukset tutkimuskysymyksiin ”Vastaavatko automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saadut tulokset manuaalimenetelmällä saatuja tuloksia” ja ”Mikä osa analysaattorin ilmoittamista tuloksista tulee tarkistaa visuaalisesti”.</p> <p>Työn tulosten perusteella voidaan sanoa, että automaattisella ja manuaalisella menetelmällä saadut tulokset vastaavat toisiaan vain osittain, mutta puoliautomaattisella ja manuaalisella menetelmällä saadut tulokset vastaavat toisiaan erittäin hyvin. Lisäksi voidaan sanoa, että laitteen negatiivisiksi luokittelemat tulokset tulee ehdottomasti tarkistaa visuaalisesti ja että lisäksi näin suositellaan meneteltävän myös muiden tulosten osalta.</p>	
Avainsanat	Classic Plus, suora Coombs, validointi

Author Title Number of Pages Date	Henrika Werling Validation of the Direct Coombs Test on the Classic Plus Analyzer 21 pages + 1 appendix 16 April 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Sisko Takala, Biomedical Laboratory Scientist Jari Leinonen, Clinical Chemist Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer
<p>The direct Coombs test is an important part of the laboratory diagnostics of a patient suffering from a hemolytic condition. The test helps to find out whether there is immunoglobulin or complement attached to the patient's red cells causing the hemolysis. This final project was carried out for the Blood Center of Meilahti Hospital underlying the department of clinical chemistry and hematology in HUSLAB, Helsinki, Finland, where the direct Coombs test has been carried out manually so far. The purpose of the project was to validate the direct Coombs test on the Classic Plus analyzer, on which other immunohematological analyses are carried out. One part of these analyses is carried out automatically and the other part is carried out semiautomatically. The difference between the semiautomatic and automatic methods is that using the semiautomatic method the results are checked visually in addition to the optical result reading of the device. This procedure is used with samples the device defines as negative, because it does not always detect a weak positive reaction.</p> <p>The agreement of the results given by the manual, semiautomatic and automatic methods was studied using the manual method as a reference. In addition the agreement of the results given by the semiautomatic and automatic method was studied using the semiautomatic method as a reference. Since the direct Coombs test is a partially qualitative and partially semiquantitative test, kappa-statistics were used to study the agreement of the results between the different methods. The aim of the final project was to find out whether the results given by the automatic and semiautomatic methods correspond to the results given by the manual method and which part of the results given by the analyzer needs to be checked visually.</p> <p>Based on the results of the project it may be said that the results given by the automatic method corresponded only partially to those given by the manual method, but that the results given by the semiautomatic method corresponded very well to those given by the manual method. It also may be said that the results the analyzer classifies as negative must absolutely be checked visually and that this is also recommended as to the other results.</p>	
Keywords	Classic Plus, direct Coombs, validation

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Suora Coombsin koe	2
2.1	Indikaatiot ja tulkinta	2
2.2	Menetelmän periaate	4
3	Määrittymenetelmät	7
3.1	Manuaalinen menetelmä	7
3.2	Automaattinen ja puoliautomaattinen menetelmä	8
4	Validointi	10
4.1	Validointiparametrit	10
4.2	Kappastatistiikka	12
5	Tarkoitus, tavoitteet ja työtä ohjaavat kysymykset	13
6	Toteutus	13
7	Tulokset	14
7.1	Tulostaso ja uusittavuus	14
7.2	Yhteenveto	17
8	Pohdinta	18
	Lähteet	20
	Liitteet	
	Liite 1. Tulostaulukko	

## 1 Johdanto

Suoran Coombsin kokeen avulla pyritään selvittämään onko potilaan punasolujen pinnalla elimistössä kiinnittynyttä vasta-ainetta tai komplementtia. Tutkimusta käytetään hemolyyttisen tilan etiologian selvittelyssä. Kokeen menetelmä perustuu punasoluagglutinaatioon, joka saadaan aikaan antiseerumien avulla. Koe on kvalitatiivinen ja tulos vastataan negatiivinen/positiivinen. Positiivisille näytteille tehdään lisäksi suoran Coombsin kokeen jatkotutkimukset, joiden avulla määritetään onko positiivisuuden syy vasta-aine, komplementti vai molemmat. Nämä tutkimukset vastataan semikvantitatiivisella asteikolla. (Coombs, suora, punasoluista. 2011.)

Suoran Coombsin kokeen suorittamiseen on olemassa manuaalinen ja automaattinen menetelmä, joissa molemmissa määrittäminen tehdään geelikorteilla. Tämä opinnäyte on tehty HUSLABin kliinisen kemian ja hematologian vastuu-alueen Meilahden sairaalan verikeskukselle. Verikeskuksessa suora Coombsin koe on tähän saakka tehty manuaalisesti, mutta siellä on käytössä analysaattori, jolla tehdään muita immunoematologisia määrittämiä kuten veriryhmämäärittämiä ja sopivuuskokeita. Näitä määrittämiä ei kuitenkaan tehdä täysin automaattisesti, vaan negatiivisten näytteiden kohdalla käytetään puoliautomaattista menetelmää, jossa analysaattorin ilmoittamat tulokset tarkistetaan visuaalisesti. Tämä perustuu siihen, että analysaattori luokittelee osan heikoimmista positiivisista tuloksista negatiivisiksi, koska se ei havaitse näiden positiivisuutta. Suora Coombs-määrittämisen siirtäminen analysaattorille säästäisi henkilökunnan aikaa ja vähentäisi manuaalisen menetelmän aiheuttamaa kättä rasittavan pipetoinnin määrää. Nämä hyödyt ovat merkittäviä oli kyse sitten automaattisen tai puoliautomaattisen menetelmän käyttöönotosta.

Uutta menetelmää käyttöönotettaessa on osoitettava, että menetelmällä saadut tulokset ovat yhtäpitäviä referenssimenetelmällä saatujen tulosten kanssa. Tätä kutsutaan validoinniksi (Ehder 2005: 26). Validointi on laadunhallintaa ja sen tarkoituksena on osoittaa, että menetelmä soveltuu sen käyttötarkoitukseen ja täyttää sille laaditut vaatimukset (Saari 2010). Tämän työn tarkoitus on validoida suora Coombsin koe Classic Plus-analysaattorille ja selvittää mikä osa analysaattorin ilmoittamista tuloksista tulee tarkistaa visuaalisesti. Työssä tutkitaan manuaalisella, automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saatujen tulosten yhtäpitävyyttä käyttäen manuaalista menetelmää referenssimenetelmänä. Lisäksi tutkitaan

automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saatujen tulosten keskinäistä yhtäpitävyyttä käyttäen puoliautomaattista menetelmää referenssimenetelmänä. Tulosten yhtäpitävyyttä tutkitaan kappastatistiikalla ja niiden perusteella pyritään vastaamaan tutkimuskysymyksiin, jotka ovat ”Vastaavatko automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saadut tulokset manuaalimenetelmällä saatuja tuloksia” ja ”Mikä osa analysoitujen ilmoittamista tuloksista tulee tarkistaa visuaalisesti”.

## 2 Suora Coombsin koe

Suora Coombsin koe on yksi verikeskuksessa tehtävistä immunohepatologisista tutkimuksista. Sen avulla selvitetään potilaan hemolyyttisen tilan etiologiaa. Tutkimus perustuu punasoluagglutinaatioon ja siihen kuuluu osatutkimuksina suoran Coombsin jatkotutkimukset. Tässä luvussa kuvataan tutkimuksen indikaatiot ja tulkinta sekä menetelmän periaate tarkemmin.

### 2.1 Indikaatiot ja tulkinta

Normaalisti potilaan punasolujen pinnalle ei ole kiinnittynyt vasta-aineita tai komplementtia, mutta tiettyjen kliinisten tilojen seurauksena punasolujen pinnalle voi kiinnittyä immunoglobuliini G:tä tai komplementtitekijä C3d:tä tai näitä molempia, jolloin suorasta Coombsin kokeesta saadaan positiivinen tulos (Coombs, suora, punasoluista. 2011). Suora Coombsin koe on merkittävä tutkimus potilaan hemolyyttisen tilan etiologian selvittelyssä (Coombs, suora, punasoluista. 2011). Hemolyyttisellä tilalla tarkoitetaan punasolujen kiihtynyttä hajoamista. Tilassa hemolyysi johtaa hemoglobiiniarvon laskemiseen, koska luuytimen punasolutuotanto ei riitä korvaamaan tavallista nopeammin hajoavia punasoluja. Tällöin puhutaan hemolyyttisestä anemiasta. (Juvonen – Savolainen 2007: 198). Muualla maailmassa yleisimpiä syitä hemolyyttiseen anemiaan ovat synnynnäinen sirppisoluanemia, talassemia ja rakennepoikkeavuudet hemoglobiinissa, jotka kaikki kuuluvat synnynnäisiin ja perinnöllisiin hemolyyttisiin anemioihin. Suomessa esiintyvät hemolyyttiset anemiat ovat yleensä hankinnaisia immuunihemolyyttisiä anemioita. Näistä tavallisin on autoimmuunihemolyttinen anemia, joka kuitenkin on verrattain harvinainen ja jota todetaan alle sadalla henkilöllä vuodessa. (Salonen 2011; Juvonen – Savolainen 2007:

198-205.) Euroopassa sen esiintyvyys on arviolta 1:80 000-100 000. Tämän lisäksi esiintyy alloimmunihemolyyttisiä anemioita, joita ovat vastasyntyneen hemolyyttinen tauti ja verensiirtoreaktio. Lisäksi hemolyyttinen anemia voi johtua myös muun muassa infektioista tai lääkkeistä. (Juvonen – Savolainen 2007: 204-205.) Suoran Coombsin kokeen positiivinen tulos johtuu yleensä immunihemolyyttisestä anemiasta (Coombs, suora, punasoluista. 2011).

Autoimmunihemolyttisessä anemiassa potilaan punasolujen pinnalla esiintyy autovasta-aineita tai komplementtia. Autovasta-aineet ovat potilaan oman immuunipuolustuksen tuottamia. Näitä vasta-aineita on kahta eri tyyppiä; lämminvasta-aineet, jotka yleensä kuuluvat IgG-luokkaan ja kylmävasta-aineet, jotka yleensä kuuluvat IgM-luokkaan. Lämminvasta-aineet reagoivat vahvasti +37 °C, kun taas kylmävasta-aineet ovat tässä lämpötilassa yleensä inaktiivisia, mutta reagoivat alhaisemmissa lämpötiloissa. Noin kolmasosa autoimmunihemolyttisistä anemioista ovat kylmähemagglutiniinioireyhtymiä. Tässä tilassa komplementtia on kiinnittynyt punasolujen pintaan kylmävasta-aineen kiinnittymisen seurauksena. Tämä ei itsessään vielä aiheuta hemolyyttistä, mutta kun punasolut joutuvat verenkierron mukana lämpimimpiin olosuhteisiin, vasta-aine irtoaa niistä jättäen komplementin kuitenkin sitoutuneeksi. Näin ollen suorassa Coombsin kokeessa lämminvasta-aineiden aiheuttama autoimmunihemolyttinen anemia näkyy yleensä IgG-positiivisuutena ja kylmävasta-aineiden aiheuttama C3d-positiivisuutena. (Juvonen – Savolainen 2007: 201-208.)

Vastasyntyneen hemolyttisessä taudissa suoran Coombsin kokeen positiivisuus johtuu siitä, että äidin IgG-vasta-aineita on kiinnittynyt lapsen punasolujen pintaan (Coombs, suora, punasoluista. 2011.) Näissä tapauksissa sikiöllä on isältä saatu punasoluantigeeni, joka äidiltä puuttuu. Tämä aiheuttaa äidin immunisoitumisen ja käynnistää vasta-ainetuotannon vierasta antigeenia kohtaan. Näin ollen äidillä saattaa olla kyseistä vasta-ainetta jo aiempien raskausten tai myös verensiirtojen seurauksena. Vakava vastasyntyneen hemolyttinen tauti johtuu yleensä äidin Rh(D)-immunisaatiosta. Suurin osa taudeista on ABO-yhteensopimattomuuden aiheuttamia, mutta tällöin taudinkuva on yleensä hyvin lievä. Ainoastaan IgG-luokan vasta-aineet voivat aiheuttaa vastasyntyneen hemolyttisen anemian, koska ne ovat tarpeeksi pieniä päästäkseen istukan läpi lapsen verenkiertoon. (Juvonen – Savolainen 2007: 203-204).

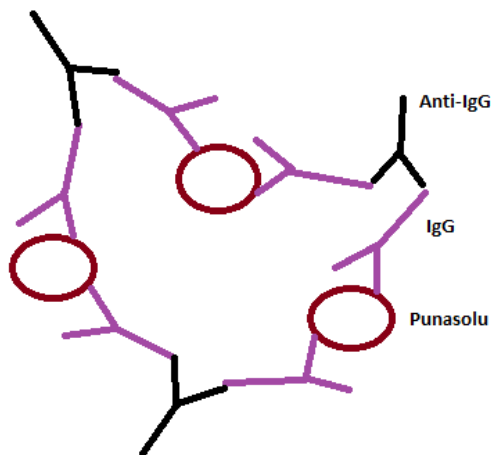
Hemolyttisessä verensiirtoreaktiossa suoran Coombsin kokeen positiivisuus johtuu siitä, että potilaan omia punasoluvasta-aineita on kiinnittyt siirrettyjen punasolujen pintaan. Kokeen negatiivisuus ei kuitenkaan poissulje hemolyttisen verensiirtoreaktion mahdollisuutta, sillä kyseessä saattaa olla välitön hemolyttinen reaktio, jolloin siirretyt punasolut hajoavat jo verenkierrrossa, jonka vuoksi kiinnittymistä ei ole havaittavissa (Coombs, suora, punasoluista. 2011; Krusius – Auvinen 2011: 366.)

Suoran Coombsin kokeen positiivinen tulos voi johtua myös siitä, että potilaalle annetussa plasmassa tai immunoglobuliinivalmisteessa on vasta-aineita, jotka tarttuvat potilaan punasolujen pinnalle. Lisäksi jotkut lääkkeet, esimerkiksi monet mikrobilääkkeet voivat aiheuttaa positiivisen tuloksen. (Verensirto-opas 2006: 54.) Kokeen tulos voi olla positiivinen myös terveillä henkilöillä, jolloin punasolujen pintaan on kiinnittynyt osoitettavia määriä vasta-aineita ja/tai komplementtia ilman että tästä on henkilölle haittaa (Coombs, suora, punasoluista. 2011). Verivalmisteesta tehtävän suoran Coombsin kokeen positiivinen tulos voi selittää samalle valmisteelle tehdyn sopivuuskokeen positiivisuuden (Verensirto-opas 2006: 54). Suoran Coombsin kokeen positiivisen tuloksen arvioinnissa tulee huomioida potilaan sairaushistoria ja kliininen tila (Blaney – Howard 2000: 25).

## 2.2 Menetelmän periaate

Suora Coombsin koe perustuu punasoluagglutinaatioon. Agglutinaatioksi kutsutaan tapahtumaa, jossa vasta-aineet kiinnittyvät partikkelien pinnoilla oleviin antigeeneihin ja saavat aikaan näkyvän sakan tuomalla partikkelit yhteen. Tässä tapauksessa partikkelit ovat punasoluja. Agglutinaatio syntyy kun punasolujen välille muodostuu siltoja vasta-ainemolekyylien avulla. Tätä hankaloittaa solujen pinnassa esiintyvä negatiivinen sähkövaraus, joka hylkii toisia soluja. Tämä tulee esille erityisesti pienten vasta-aineiden kuten IgG:n kohdalla. IgG muodostaa siltoja solujen välille vain, jos nämä on jo valmiiksi saatu lähelle toisiaan eliminoimalla sähkövaraus ja tästä johtuva hylkiminen. Tätä varten soluille tehdään entsyymikäsittelyjä tai luodaan erityiset ioniolosuhteet, jotta solun pinnan siaalihappoja saadaan vähennettyä. Suorassa Coombsin kokeessa käytetään anti-immunoglobuliinia ja antikomplementtia, jotka tarttuvat punasoluihin kiinnittyneeseen vasta-aineeseen tai komplementtiproteiiniin ja sitovat solut yhteen saaden aikaan agglutinaation (Kuvio 1). (Seppälä – Meri 2011: 91-92.)





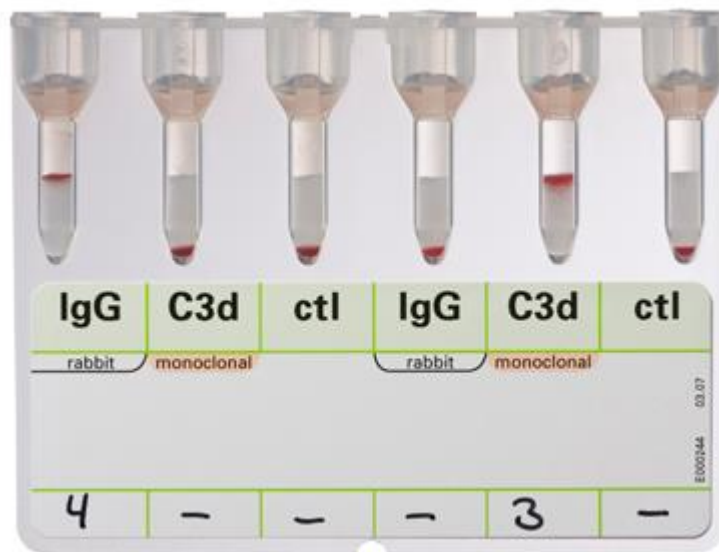
Kuvio 1. Punasolujen agglutinaatio.

Suorassa Coombsin kokeessa potilaan punasolut tutkitaan ensin polyspesifisellä antiseerumilla käyttäen LISS/Coombs-geelikortteja (ID-Card LISS/Coombs, DiaMed). LISS/Coombs-kortissa on kuusi kyvettä, jotka kaikki sisältävät polyspesifistä antihumaaniglobuliinia (Kuvio 2). Antihumaaniglobuliini sisältää anti-IgG:tä ja anti-C3d:tä ja sijaitsee geelissä kortin kyvettien pohjalla. Kyvettiin lisätään geelin päälle potilaan punasolususpensiota ja kortti sentrifugoidaan. Jos potilaan punasolujen pinnalla on in vivo kiinnittynyttä IgG:tä tai C3d:tä antiseerumi sitoutuu näihin ja sitoo punasolut yhteen, jolloin syntyy näkyvä agglutinaatio. Negatiivisissa tapauksissa antiseerumilla ei ole mitään mihin kiinnittyä eikä agglutinaatiota tapahdu. Yhdellä kortilla voidaan tehdä kuusi potilasnäytettä. (BIO-RAD LISS/Coombs-korttien pakkausseloste.)



Kuvio 2. LISS/Coombs-geelikortti (Bio-Rad).

LISS/Coombs-kortilla positiivisen tuloksen antaneet näytteet tutkitaan tämän jälkeen monospesifiseillä antiseerumeilla käyttäen DC-Screening II-geelikorttia (ID-Card DC-Screening II, DiaMed). Tässäkin kortissa on kuusi kyvetteä, joista kaksi sisältää anti-IgG:tä, kaksi anti-C3d:tä ja kaksi eivät kumpaakaan (Kuvio 3). Reagenssittomat kyvetit toimivat kontrolleina. Lisäämällä kyvetteihin potilaan punasolususpensiota saadaan selville kumpaa molekyyliä punasoluihin on kiinnittynyt. Jos agglutinaatio syntyy IgG-kyvetissä, on luonnollisesti kyse IgG:stä ja vastaavasti C3d-kyvetin kohdalla C3d:stä. Kontrollikyvetin (ctl) tulee aina antaa negatiivinen tulos ja muuten tulokset eivät ole luotettavia. Yhdellä kortilla voidaan tehdä kaksi potilasnäytettä. (BIO-RAD DC-Sreening II-korttien pakkausseloste.)



Kuvio 3. DC-Screening II-geelikortti (BioRad).

Agglutinaatio näkyy kyvetissä joko nousevana kyvetin pohjalta tai laskevana kyvetin yläosasta. Jos agglutinaatiota ei esiinny, kyvetin pohjalla näkyy tasainen punasolunappi (Kuviot ja ). Agglutinaatioiden voimakkuus arvioidaan silmämääräisesti ja luokitellaan asteikolla (+), +, ++, +++, +++++. (Työohje. 2007.)

HUSLABissa suoran Coombsin kokeen kohdalla käytetään tutkimusnimikettä E-Coomb-O ja sen tutkimusnumero on 3015. Se sisältää osatutkimukset E-CoomIgG ja E-CoomC3D, jotka ovat suoran Coombsin kokeen jatkotutkimuksia. Nämä tehdään ilman erillistä pyyntöä kaikista positiivisista näytteistä. Polyspesifisellä antiseerumilla tehtävä tutkimus vastataan kvalitatiivisesti negatiivisena tai positiivisena ja monospesifisillä antiseerumeilla tehtävät tutkimukset vastataan kunkin antiseerumin

kohdalla erikseen ja positiiviset tulokset vastataan semikvantitatiivisesti asteikolla (+), +, ++, +++, +++++. E-Coomb-O-tutkimus tehdään K2-EDTA-putkeen (5/4 ml) otetusta verinäytteen punasoluista. (Coombs, suora, punasoluista. 2011.) Antikoagulanttiin otettu näyte edistää tuloksen luotettavuutta, koska muuten komplementtia voi sitoutua punasoluihin epäspesifisti näytteen säilytyksen aikana. EDTA estää komplementin sitoutumisen in vitro-olosuhteissa ja näin ollen havaitaan ainoastaan in vivo-olosuhteissa tapahtunut sitoutuminen. (Blaney – Howard 2000: 25.) Tutkimuksen tekotiheys on päivittäin ja tulokset saadaan samana päivänä kuin tutkimus on pyydetty tai sitä seuraavana päivänä. Tutkimuksessa käytetty menetelmä on akkreditoitu. (Coombs, suora, punasoluista. 2011.)

### 3 Määritysmenetelmät

Suora Coombsin koe voidaan suorittaa joko manuaalisesti, automaattisesti tai puoliautomaattisesti. Kaikissa tapauksissa tutkimus tehdään geelikorteilla. Tässä luvussa kuvataan näiden koken menetelmän yhtäläisyyksiä ja eroja.

#### 3.1 Manuaalinen menetelmä

Tässä kappaleessa kuvataan, miten suora Coombsin koe tehdään manuaalisesti. Määrittystä varten tarvitaan pestyjä lasisia koeputkia, 5 ja 50 µl tarkkuuspipetit ja pipetinkärkiä, LISS-liuosta (DiaMed, ID-Diluent 2), geelikortteja (DiaMed, ID-Card LISS/Coombs ja DC-Screening II) ja ID-sentrifugi (DiaMed, ID-centrifuges 6 S, 12 S II, 24 S) (Työohje. 2012). Geelikorttien kohdalla tulee varmistaa ettei kyvettien yläosassa tai päällysfoliossa ole ilmakuplia tai geelipisaroita. Lisäksi tulee huomioida, että liian väkevä tai laimea punasolususpensio saattaa aiheuttaa korteilla virheellisen tuloksen. (BIO-RAD LISS/Coombs-korttien pakkausseloste.) Koeputket ja geelikortit merkitään näytetunnisteilla ja koeputkiin tehdään punasolususpensiot pipetoimalla 4 µl punasoluja näytteestä ja lisäämällä 0,5 ml LISS-liuosta ja sekoittamalla nämä hyvin. Korteista poistetaan folio tarvittavien kyvettien päältä (yksi LISS/Coombs-kortin kyvetti ja yhdet DC-Screening II-kortin IgG-, C3d- ja ctl-kyvetit / määrittäminen) pitämällä kortit pystysuorassa ja kyvetteihin pipetoidaan 50 µl punasolususpensiota. Korteja sentrifugoidaan ID-sentrifugilla (Kuvio 4) kymmenen minuuttia, jonka jälkeen tulokset luetaan silmämääräisesti. Reaktiivoimakkuudet tulkitaan asteikolla (+) - +++++ ja

tulokset vastataan LISS/Coombs-kortin kohdalla negatiivinen tai positiivinen ja DC-Screening II-kortin kohdalla negatiivinen, (+), +, ++, +++ tai ++++. (Työohje. 2012.)



Kuvio 4. ID-sentrifugi (DiaMed).

### 3.2 Automaattinen ja puoliautomaattinen menetelmä

Classic Plus ID-Gelstation (DiaMed) (Kuvio 5) on laite, joka suorittaa geelikorteilla tehtävät immunoematologiset määritykset automaattisesti tietokoneen ohjauksen avulla. Laite on suunniteltu immunoematologisia perusmäärityksiä tekeville laboratorioille ja sillä tehtäviä määrityksiä ovat esimerkiksi veriryhmämääritys, sopivuuskoe, vasta-aineseuonta ja –tunnistus ja suora Coombsin koe. Kaikki nämä määritykset perustuvat antigeeni-vasta-ainereaktioon punasolujen ja plasman tai seerumin välillä. Laitteella ei voi tehdä muita kuin immunoematologisia määrityksiä eikä sillä voi käyttää muiden valmistajien reagensseja tai geelikortteja. (Laitteohje. 2006.)

Laitteen automaattiset toiminnot on suunniteltu vastaamaan manuaalisia työvaiheita niin tarkasti kuin mahdollista. Nämä toiminnot ovat näytteen tunnistus, reagenssin tunnistus, kortin tunnistus, kortin siirtäminen, punasolususpension teko, punasolususpension annostelu, plasman annostelu, reagenssin annostelu, inkubointi, sentrifugointi, reaktion luku ja tuloksen tulkinta. Epävarmojen tulkintojen kohdalla laite pyytää käyttäjää tarkistamaan ne. Laitteen suorittamat tunnistukset perustuvat viivakoodin lukuun, joka tapahtuu aina ennen kuin kyseessä olevaa näytettä, reagenssia tai korttia käytetään. Reaktion luku tapahtuu optisesti CCD-kameran ja morfologisen analyysin avulla. Laitteen kamera ottaa reaktiosta kuvan, josta laite suorittaa morfologisen analyysin ja tämän perusteella tulkitsee tuloksen. (Laitteohje. 2006.)



Kuvio 5. Classic Plus-analysaattori (Bio-Rad).

Tässä kappaaleessa kuvataan miten suora Coombsin koe tehdään Classic Plus-analysaattorilla. Määrityksessä käytetään samoja reagensseja ja geelikortteja kuin manuaalimäärityksessä. Laitteen kansi avataan ja reagenssit ja näyteputket asetetaan korkittomina niille tarkoitetuille kiekolle. Korttipaikoille asetetaan tarvittava määrä tehtävien määritysten vaatimia geelikortteja. Kansi suljetaan ja laitteelle annetaan näytteentunnistuskomento. Laite lukee viivakoodit näyteputkien tarroista yksitellen ja näytetuunnisteet ilmestyvät näytölle. Tutkimusvalikosta valitaan kullekin näytteelle haluttu määräys (suora Coombsin koe tai suoran Coombsin kokeen jatkotutkimukset) ja ohjelma käynnistetään. Laite tekee näytteistä punasolususpensiot ja annostelee nämä geelikorttien kyvetteihin. Laite sentrifugoi kortteja kymmenen minuuttia, jonka jälkeen se ottaa niistä kuvan ja tämän perusteella tulkitsee tulokset. Laite ilmoittaa ohjelman loppumisesta ja laitteen ilmoittamat tulokset tarkistetaan visuaalisesti. Kansi avataan ja kortit tunnistetaan lukemalla yksittäisen kortin viivakoodi manuaalisesti, jolloin laitteen ottama kuva kortista ilmestyy näytölle. Kuvasta nähdään, miten laite on luokitellut kyveteissä näkyvät reaktiot. Laite ilmoittaa tulokset asteikolla -, 1+, 2+, 3+, 4+ ja epävarmat tulokset se merkitsee +/- Doubtful. Nämä tarkistetaan visuaalisesti lukemalla ne suoraan kortista. Laitteen ilmoittamia tuloksia muokataan visuaalisen tulkinnan perusteella ja hyväksytään ne. Muokattujen tulosten eteen laite merkitsee kirjaimen M (modified). (Laitteohje. 2006.)

Analysaattorilla tehdyn veriryhmämäärityksen validoinnin perusteella tiedetään, että laitteen kamera ei havaitse kaikkia heikkoja reaktioita. Nämä tulokset laite tulkitsee negatiivisiksi, vaikka ne todellisuudessa yleensä vastaavat (+)-asteen reaktioita. Reaktiot, jotka laite havaitsee, mutta jotka se tulkitsee olevan heikompia kuin 1+ se

ilmoittaa epävarmoina (+/- Doubtful). Nämäkin vastaavat todellisuudessa yleensä (+)-asteen reaktioita. (Validointisuunnitelma. 2012.)

Automaattisen ja puoliautomaattisen menetelmän ero on, että automaattisessa menetelmässä tulosten luku tapahtuu ainoastaan optisesti laitteen kameran toimesta kun se puoliautomaattisessa menetelmässä tapahtuu tämän lisäksi visuaalisesti laitteen käyttäjän toimesta. Tämän lisäksi automaattinen ja puoliautomaattinen menetelmä eroavat manuaalisesta menetelmästä punasolususpension teossa. Laite käyttää punasolususpensiossa 10 µl punasolutilavuutta 4 µl sijasta ja 1 ml LISS-liuostilavuutta 0,5 ml sijasta, eli noin kaksinkertaisia tilavuuksia manuaaliseen menetelmään verrattuna. Suspension vahvuus on näin ollen 0,2 prosenttiyksikköä suurempi kuin manuaalisessa menetelmässä ja solutilavuus 6 µl suurempi.

## 4 Validointi

Validoinnin pohjana on validointisuunnitelmassa määritetyt parametrit. Kun parametrit on mitattu, tulokset tulee analysoida tarkoituksenmukaisella menetelmällä. Tässä luvussa esitetään työssä käytetyt validointiparametrit ja kuvataan tulosten käsittelyssä käytettyä menetelmää.

### 4.1 Validointiparametrit

Validoinnissa käytettäviä parametrejä ovat muun muassa toistettavuus, uusittavuus, selektiivisyys ja spesifisyys. Toistettavuudella tarkoitetaan sarjan sisäistä toistuvuutta. Sillä mitataan peräkkäisillä määrittäyksillä saatujen tulosten oikeellisuutta ja sitä tutkitaan suorittamalla useita rinnakkaismäärittäyksiä samoissa mittausolosuhteissa. (Saari 2010.) Näiden olosuhteiden vaatimuksena on, että niissä saadaan samoista näytteistä toisistaan riippumattomia tuloksia lyhyellä aikavälillä, mittauksen suorittajan, menetelmän, laitteen ja laboratorion pysyessä samana. Toistettavuusmittauksessa käytetään useita eri tuloksen antavia näytteitä. (Ehder 2005: 37.) Uusittavuudella tarkoitetaan sarjojen välistä toistuvuutta. Se voi olla joko laboratorioden välistä tai laboratorion sisäistä. Laboratorioden välisellä uusittavuudella mitataan tulosten yhtenevyyttä eri mittausolosuhteissa ja laboratorion sisäisellä uusittavuudella mitataan tulosten yhtenevyyttä pitkällä aikavälillä. Uusittavuusmittaukset suoritetaan käyttämällä

samaa näytettä ja samaa menetelmää kaikissa mittauksissa. (Saari 2010.) Koska mittaukset tehdään pitkällä aikavälillä, niissä on kyse muuttuneista olosuhteista. Muuttuneet olosuhteet voidaan spesifioida ja esimerkkejä niistä ovat mittauksen suorittaja, mittausmenetelmä, mittauslaite, käyttöolosuhteet (esimerkiksi lämpötila) ja aika (esimerkiksi näytteen säilyvyys). Toistettavuus on yleensä suurempaa kuin uusittavuus ja pienen uusittavuuden syy tulee aina selvittää. Syy voi olla jokin niistä tekijöistä, jotka ovat muuttumattomia toistettavuusmittauksissa (esimerkiksi läm pötila ja säilyvyys), mutta mahdollisesti vaihtelevat uusittavuusmittauksissa. (Ehder 2005: 37.)

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita tutkittava analyytti muiden näytteessä esiintyvien komponenttien seasta niiden häiritsemättä. Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita ainoastaan tutkittava analyytti. Näin ollen menetelmän täydellinen selektiivisyys tarkoittaa myös spesifisyyttä. (Ehder 2005: 27.)

Seuraavissa kappaleissa kuvataan mitkä validointitavoitteet ovat tämän työn osalta. Validoinnissa tulostason mittaamiseen käytettävien näytteiden tavoitemäärä on 150 näytettä. Näistä negatiivisten, heikosti positiivisten ja vahvasti positiivisten näytteiden tavoitemäärät ovat kullekin ryhmälle 50 näytettä. Positiivisista näytteistä heikosti ja vahvasti IgG-positiivisten näytteiden tavoitemäärät ovat kumpikin 40 näytettä ja C3d-positiivisten näytteiden tavoitemäärä 20 näytettä. C3d-positiivisten näytteiden alhainen tavoitemäärä johtuu niiden suhteellisesta harvinaisuudesta. Polyspesifisellä antiseerumilla tehtävän tutkimuksen osalta automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saatujen tulosten ja manuaalisella menetelmällä saatujen tulosten tavoiteyhtäpitävyys on sekä positiivisten että negatiivisten näytteiden osalta 100 %. Monospesifisillä antiseerumeilla tehtyjen tutkimusten osalta tavoiteyhtäpitävyys on korkeintaan yhden positiivisuusluokan ero. (Validointisuunnitelma. 2012.)

Toistettavuuden mittaamisen osalta näyteaineiston koostumuksen tavoite on negatiivinen, heikosti IgG-positiivinen, vahvasti IgG-positiivinen, heikosti C3d-positiivinen ja vahvasti C3d-positiivinen näyte. Peräkkäisten analyysien tavoitemäärä on 20 analyysia kustakin näytteestä. Tavoiteyhtäpitävyys on positiivisuuden ja negatiivisuuden osalta 100 % ja eriasteisten positiivisuuksien osalta korkeintaan yhden positiivisuusluokan ero. Uusittavuuden mittaamisen osalta tavoite on kymmenen eri päivinä tehtyä analyysia samalla positiivisella näytteellä. Tavoiteyhtäpitävyys on korkeintaan yhden positiivisuusasteen ero. (Validointisuunnitelma. 2012.)

## 4.2 Kappastatistiikka

Kun halutaan tutkia kahden eri havaitsijan yhtäpitävyyttä tietyn asian suhteen (interobserver agreement), voidaan käyttää kappastatistiikkaa, joka on tähän tarkoitukseen yleisin käytetty menetelmä lääketieteessä. Menetelmällä saadaan havaitsijoiden välistä yhtäpitävyyttä kuvaava määrällinen arvo. Kappastatistiikalla lasketut tulokset ovat informatiivisempia kuin pelkällä prosenttiosuudella lasketut tulokset, koska kappayhtälö huomio myös sattuman osuuden yhtäpitävyydestä. Kun halutaan tutkia kahden eri havaitsijan yhtäpitävyyttä asian suhteen, jolla on eri luokkia, voidaan käyttää painotettua kappastatistiikka. Tällöin ollaan yleensä kiinnostuneita yhtäpitävyydestä niiden luokkien välillä, joilla on merkityksellinen ero. Painotettu kappayhtälö antaa vähemmän merkitystä kahden lähellä toisiaan olevien luokkien eroavuudelle kuin kahden kaukana toisistaan olevien luokkien eroavuudelle. Kappastatistiikan rajoittava tekijä on, että siihen vaikuttaa tarkasteltujen havaintojen yleisyys, mistä aiheutuu paradoksi. Ratkaisukeinoja tähän on kuvattu tieteellisissä julkaisuissa. (Viera – Garrett 2005: 360-363.)

Kappastatistiikassa käytetty yhtälö perustuu havaitun ja odotetun yhtäpitävyyksien eroon. Odotetulla yhtäpitävyydellä tarkoitetaan sen yhtäpitävyyden määrää, jonka odotetaan ilmenevän täysin sattumanvaraisesti. Havaitulla yhtäpitävyydellä tarkoitetaan kaiken kaikkiaan ilmenevää yhtäpitävyyden määrää. Yhtälöstä saatava kappa-arvo  $K$  kuvaa havaitun ja odotetun yhtäpitävyyksien eron suuruutta asteikolla  $-1-1$ , jolla 1 vastaa täydellistä yhtäpitävyyttä, 0 ainoastaan odotettua sattumanvaraista yhtäpitävyyttä ja negatiiviset arvot vähempää kuin sattumanvaraisesti odotettua yhtäpitävyyttä. Tällä asteikolla 0,01–0,20 vastaa vähäistä, 0,21–0,40 kelvollista, 0,41–0,60 kohtalaista, 0,61–0,80 huomattavaa ja 0,81–0,99 lähes täydellistä yhtäpitävyyttä. (Viera – Garrett 2005: 361-362.) Taulukossa 1 on esitetty esimerkki kappastatistiikan soveltamisesta.

Taulukko 1. Esimerkki kappastatistiikan soveltamisesta.

Kyvetissä agglutinaatiota?		Referenssimenetelmä		
		Ei	Kyllä	Yhteensä
Uusi menetelmä	Ei	a	b	$m^0 (a+b)$
	Kyllä	c	d	$m^1 (c+d)$
	Yhteensä	$n^0 (a+c)$	$n^1 (b+d)$	$(a+b+c+d)$



Taulukon 1 perusteella Kappa-arvon laskemisessa käytetään seuraavia yhtälöitä:

$$p_e = [(n^0/n) * (m^0/n)] + [(n^1/n) * (m^1/m)]$$

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e),$$

joissa  $p_e$  = odottetu sattumanvarainen yhtäpitävyys (expected agreement),  $p_o$  = havaittu yhtäpitävyys (observed agreement) ja  $K$  = kappa-arvo (kappa value). (Viera – Garrett 2005: 361.) Lisäksi taulukosta voidaan laskea prosenttiluvut uuden menetelmän selektiivisyydelle ja spesifisyydelle kuvaamaan uuden menetelmän diagnostista suorituskykyä referenssimenetelmään verrattuna, jolloin selektiivisyys =  $d/n^1$  ja spesifisyys =  $a/n^0$  (Ehder 2005: 27).

## 5 Tarkoitus, tavoitteet ja työtä ohjaavat kysymykset

Työn tarkoituksena on selvittää soveltuuko Classic Plus-analysaattori suora Coombs-määrityksen tekoon. Lisäksi tarkoituksena on selvittää millä ehdoin määritys voidaan siirtää analysaattorille. Tavoitteena on saada vastaukset seuraaviin kysymyksiin: ”Mikä on sarjan sisäinen toistuvuus?”, ”Mikä on sarjojen välinen toistuvuus?”, ”Mikä osa tuloksista tulee tarkistaa visuaalisesti?” ja ”Mikä on analysaattorin tulostaso?”.

## 6 Toteutus

Validoinnissa käytetty näyteaineisto koostui 138 potilasnäytteestä. Verikeskuksen henkilökunta keräsi työn aikana talteen kaikki tehdyt ja vastatut näytteet, joista oli pyydetty suora Coombsin koe. Näytteet säilytettiin +4 C° lämpötilassa kunnes ne analysoitiin validointia varten. Opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin loppusyksyn 2012 ja talven 2013 aikana niin, että kaikki yhden viikon aikana kertyneet näytteet analysoitiin samalla kerralla. Tähän menettelyyn päädyttiin siksi, että negatiivisia suora

Coombs-näytteitä tulee verikeskukseen yhden viikon aikana runsaasti, mutta positiivisia vain noin 15 kappaletta ja tämän huomattiin olevan sopiva määrä yhdelle analysointikerralle ajallisesti ja työmäärällisesti. Lisäksi näytteiden koostumus kärsii jos säilytysaika on yli viikon. Negatiivisten näytteiden tavoitemäärä täyttyi jo työn alkuvaiheessa, mutta vahvojen positiivisten näytteiden osalta tavoitemäärä jäi vajaaksi. Näytteet analysoitiin manuaalisella, automaattisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saman päivän aikana vertailukelpoisten tulosten saamiseksi. Tulokset kirjattiin taulukkoon, joka on esitetty Liitteessä 1. Analysointia varten näytteet numeroitiin 1-138 eikä työn dokumentoinnissa käytetty alkuperäisiä näytetunnisteita potilaan tietosuojan takaamiseksi. Numerointi myös helpotti työtä. Analyysit tehtiin lähdeluettelossa mainittujen ohjeiden mukaan (Työohje 2012, Työohje 2007 ja Laiteohje 2006). Sarjan sisäisen toistuvuuden mittaukseen ei työn aikataulun puitteissa jäänyt aikaa. Eettisestä näkökulmasta katsottuna työ ei tuottanut mitään uutta potilasta koskevaa tietoa, koska siinä käytettiin jo vastattuja näytteitä.

Ennen työni käytännön osan suoritusta sain bioanalytikko Sisko Takalalta perehdytyksen kaikkiin kolmeen menetelmään ja tulosten tulkitsemiseen ja kirjaamiseen. Käytännön osan suorittamisen aikana sain ohjausta verikeskuksen henkilökunnalta tarvittaessa. Tulokset analysoitiin kappastatistiikalla ja tätä varten sain sairaalakemisti Jari Leinoselta kappastatistiikkaan perustuvan laskentapohjan exceltaulukon muodossa.

## **7 Tulokset**

Tässä luvussa kuvataan validoinnin tuloksia sekä tekstin että taulukoiden avulla. Ensin esitetään tulostason ja uusittavuuden mittauksien tulokset ja tämän jälkeen yhteenveto tuloksista.

### **7.1 Tulostaso ja uusittavuus**

Näytteiden kokonaismäärä jäi vahvasti positiivisten näytteiden harvinaisuuden takia vajaaksi tavoitemäärästä. Näytteitä analysoitiin yhteensä 138 kappaletta, joista negatiivisia oli 50 kappaletta, heikosti positiivisia 56 kappaletta ja vahvasti positiivisia 32 kappaletta. Eri positiivisuusluokissa näytteiden määrät olivat 18 (+)-, 24 +-, 14 ++-,

29 +++- ja 3 ++++-näytettä. Taulukoissa 3, 4 ja 5 on esitetty eri määrittämenetelmillä saatujen tulosten yhtäpitävyydet kappa-arvoina. Taulukossa 2 on esitetty kappa-arvon tulkintaperiaate. Negatiivisuuden ja positiivisuuden osalta tuloksia vertailtiin sekä polyspesifisen antiseerumin että molempien monospesifisten antiseerumien kohdalla erikseen. Lisäksi monospesifisten antiseerumien kohdalla tuloksi vertailtiin heikon ja vahvan positiivisuuden osalta. Kun vertailtiin kaikkia negatiivisia ja eri positiivisuusluokkien tuloksia menetelmien kesken saatiin painotettu kappa-arvo (weighted kappa value). Lisäksi vertailtiin vielä kaikkia eri positiivisuusluokkia erikseen. Kaikkien vertailuparametrien (poislukien IgG ja C3d kaikki luokat) osalta on myös esitetty arvioitavan menetelmän (ei-referenssi) selektiivisyys ja spesifisyys.

Taulukko 2. Kappa-arvon tulkinta (Viera – Garrett 2005).

Kappa-arvo	0,01-0,20	0,21-0,40	0,41-0,60	0,61-0,80	0,81-0,99
Yhtäpitävyys	vähäinen	kelvollinen	kohtalainen	huomattava	lähes täydellinen

Taulukko 3. Automaattinen menetelmä verrattuna manuaaliseen (referenssi) menetelmään.

Vertailuparametri	Kappa-arvo	Selektiivisyys	Spesifisyys
Polyspesifinen antiseerumi, neg / pos (n=138)	0,80	90	92
IgG neg / pos (n=88)	0,32	84	71
C3d neg / pos (n=92)	0,88	91	97
IgG heikko pos / vahva pos (n=81)	0,59	100	73
C3d heikko pos / vahva pos (n=34)	0,82	100	86
IgG kaikki luokat (n=88)	0,91 (painotettu)		
C3d kaikki luokat (n=92)	0,97 (painotettu)		
IgG (+) (n=27) / muut pos	0,50	96	48
IgG + (n=20) / muut pos	0,56	77	90
IgG ++ n=12 / muut pos	0,52	78	100
IgG +++ (n= 18) / muut pos	0,59	76	100
IgG ++++ (n=4) / muut pos	0,29	81	100
C3d (+) (n=7) / muut pos	0,64	93	71
C3d + (n=11) / muut pos	0,80	91	91
C3d ++ (n=4) / muut pos	0,77	93	100
C3d +++ (n=12) / muut pos	0,88	91	100
C3d ++++ (n=0) / muut pos	0,00	94	-

Taulukko 4. Automaattinen menetelmä verrattuna puoliautomaattiseen (referenssi) menetelmään.

Vertailuparametri	Kappa-arvo	Selektiivisyys	Spesifisyys
Polyspesifinen antiseerumi, neg / pos (n=138)	0,80	86	100
IgG neg / pos (n=89)	0,56	88	100
C3d neg / pos (n=88)	0,95	94	100
IgG heikko pos / vahva pos (n=81)	0,75	74	100
C3d heikko pos / vahva pos (n=35)	0,88	100	91
IgG kaikki luokat (n=89)	0,97 (painotettu)		
C3d kaikki luokat (n=88)	0,98 (painotettu)		
IgG (+) (n=16) / muut pos	0,49	100	38
IgG + (n=22) / muut pos	0,73	83	100
IgG ++ (n=14) / muut pos	0,66	85	100
IgG +++ (n= 19) / muut pos	0,71	84	100
IgG ++++ (n=10) / muut pos	0,60	86	100
C3d (+) (n=7) / muut pos	0,82	96	86
C3d + / muut pos n=10	0,86	96	90
C3d ++ (n=5) / muut pos	0,80	93	100
C3d +++ (n=13) / muut pos	0,88	91	100
C3d ++++ (n=0) / muut pos	0,00	94	-

Taulukko 5. Puoliautomaattinen menetelmä verrattuna manuaaliseen (referenssi) menetelmään.

Vertailuparametri	Kappa-arvo	Selektiivisyys	Spesifisyys
Polyspesifinen antiseerumi neg / pos (n=138)	0,87	100	84
IgG neg / pos (n=88)	0,69	98	71
C3d neg / pos (n=92)	0,93	97	97
IgG heikko pos / vahva pos (n=81)	0,91	100	95
C3d heikko pos / vahva pos (n=34)	0,94	100	95
IgG kaikki luokat (n=88)	0,92 (painotettu)		
C3d kaikki luokat (n=92)	0,98 (painotettu)		
IgG (+) / muut pos n=16	0,88	98	89
IgG + / muut pos n=22	0,93	98	95
IgG ++ / muut pos n=14	0,90	97	100

IgG +++ / muut pos n= 19	0,93	97	100
IgG ++++ / muut pos n=10	0,79	97	100
C3d (+) / muut pos n=7	0,91	100	86
C3d + / muut pos n=10	0,93	96	100
C3d ++ / muut pos n=5	0,87	97	100
C3d +++ / muut pos n=13	0,94	95	100
C3d ++++ / muut pos n=0	0,00	97	-

Uusittavuuden tarkastelussa käytetyt analysointikerrat jäivät tavoitemäärää alhaisemmaksi. Tulokset olivat kaikilla analysointikerroilla samat ja uusittavuus on näin ollen sata prosenttia näiden analysointikertojen perusteella.

## 7.2 Yhteenveto

Manuaalisen ja automaattisen menetelmän kesken yli puolet vertailuparametreista antavat lähes täydellisen tai huomattavan tulosten yhtäpitävyyden. Yli neljäsosa parametreista edustaa kohtalaista tulosten yhtäpitävyyttä ja kahdeksasosa kelvollista yhtäpitävyyttä. Selektiivisyydet ja spesifisyydet ovat 71 ja 100 % välillä poikkeuksena IgG (+)/muut pos-parametri, jonka osalta spesifisyys on 48 %.

Puoliautomaattisen ja automaattisen menetelmän kesken suurin osa vertailuparametreista edustaa lähes täydellisestä tai huomattavaa yhtäpitävyyttä. IgG neg/pos-, IgG (+)/muut pos- ja IgG ++++/muut pos-parametrien osalta tulokset ovat kohtalaisen yhtäpitäviä. Selektiivisyydet ja spesifisyydet ovat 83 ja 100 % välillä poikkeuksina IgG heikko pos/vahva pos- ja IgG (+)/muut pos-parametrit, joista ensimmäisen osalta selektiivisyys on 74 % ja jälkimmäisen osalta spesifisyys 38 %.

Manuaalisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken tulokset ovat lähes kaikkien vertailuparametrien osalta lähes täydellisesti yhtäpitäviä ja loput huomattavan yhtäpitäviä. Selektiivisyydet ja spesifisyydet ovat 84 ja 100 % välillä poikkeuksena IgG neg/pos-parametri, jonka osalta spesifisyys on 71 %.

## 8 Pohdinta

Polyspesifisen antiseerumin osalta suurin kappa-arvo saadaan manuaalisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken, jolloin se edustaa lähes täydellistä yhtäpitävyyttä kun se muissa vertailuissa edustaa huomattavaa yhtäpitävyyttä. Spesifisyysluvun (84 %) perusteella voidaan sanoa, että puoliautomaattinen menetelmä on herkempi kuin manuaalinen menetelmä. Verrattaessa automaattista menetelmää manuaaliseen voidaan selektiivisyys(90 %)- ja spesifisyys(92 %)lukujen perusteella sanoa, että laitteen kamera ei havaitse kaikkia positiivisia reaktioita. Sama voidaan sanoa myös verrattaessa automaattisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken saatuja lukuja (86 ja 100 %). Erityisesti tarkasteltaessa IgG neg/pos-parametrin kappalukuja voidaan sanoa, että puoliautomaattinen menetelmä on herkin. Puoliautomaattisen menetelmän suurempi herkkyys manuaaliseen menetelmään verrattuna saattaa johtua siitä, että laitteen käyttämä punasolutilavuus punasolususpensiota tehtäessä on noin kaksinkertainen manuaaliseen menetelmään verrattuna. Se, että laitteen kamera ei havaitse kaikkia positiivisia reaktioita, vastaa odotettua.

Kaikilla menetelmillä painotetut kappa-arvot edustavat lähes täydellistä yhtäpitävyyttä. Tarkempi käsitys saadaan kuitenkin tarkastelemalla yksittäisiä positiivisuusluokkia erikseen. Manuaalisen ja automaattisen menetelmän välillä IgG-luokat ovat pääasiallisesti kohtalaisen yhtäpitäviä ja C3d-luokat huomattavan yhtäpitäviä. Puoliautomaattisen ja automaattisen menetelmän kesken IgG-luokat ovat enimmäkseen huomattavan yhtäpitäviä ja C3d-luokat lähes täydellisen yhtäpitäviä. Manuaalisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken sekä IgG- että C3d-luokat ovat lähes kokonaan lähes täydellisen yhtäpitäviä. C3d ++++/muut pos-parametrin poikkeavat tulokset johtuvat näytteiden olemattomuudesta. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että C3d-luokat edustavat suurempaa yhtäpitävyyttä kuin IgG-luokat ja että näiden molempien yhtäpitävyydet ovat suurimpia manuaalisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken. IgG ja C3d heikko/pos-parametrien osalta kappa-arvot ovat huomattavasti suurimmat manuaalisen ja puoliautomaattisen menetelmän kesken.

Manuaalisella ja puoliautomaattisella menetelmällä saadut tulokset vastaavat toisiaan erittäin hyvin ja manuaalisella ja automaattisella menetelmällä saadut tulokset vastaavat toisiaan vain osittain. Tulosten perusteella suora Coombs-määritys voidaan

siirtää Classic Plus-analysaattorille, mutta laitteen negatiivisiksi luokittelemat tulokset tulee ehdottomasti tarkistaa visuaalisesti ja lisäksi on suositeltavaa että näin menetellään myös muiden tulosten kohdalla. Tällöin olisi siis kyse puoliautomaattisen menetelmän käyttöönotosta, joka tämäkin toisi huomattavaa hyötyä verikeskuksen henkilökunnalle ja päivittäiselle toiminnalle kaikkien manuaalisten työvaiheiden (tulosten lukua lukuunottamatta) jäädessä pois.

Validoinnin tulosten luotettavuuden kannalta näytteiden pitkä säilytysaika on yksi mahdollinen virhelähde. Periaatteessa samasta näytteestä saadut tulokset ovat vertailukelpoisia keskenään, koska analysoinnit eri menetelmillä tehtiin samana päivänä. On kuitenkin huomioitava, että potilasnäytteitä analysoitaessa näytteet ovat aina tuoreita (säilyvyys noin vuorokauden +4 °C) ja validoinnissa käytettyjä näytteitä säilytettiin +4 °C yhdestä seitsemään vuorokautta. Analysointiolosuhteet validoinnissa eivät näin ollen olleet täysin identtisiä normaalitilanteen kanssa. Toinen mahdollinen virhelähde on kokemattomuuteni tulosten tulkinnan osalta. Kahden eri positiivisuusluokan rajalla olevat reaktiot olivat hankalia tulkita, mutta toisaalta näiden tulkinnassa saattaa esiintyä eroja myös kokeneempien tulkitsijoiden kesken.

Tehdessäni työtä koen saaneeni syventävän katsauksen tietynlaiseen laboratorion laadunhallintaan, erityisesti validointikäsitteeseen. Sain erityisesti kokea, kuinka tärkeää menetelmävalidointi on tulosten luotettavuuden ja tätä kautta myös potilaan turvallisuuden kannalta. Sain perehtyä yhteen immunohepatologiassa käytettävään menetelmään ja analysaattoriin ja näiden taustaan, jonka koin hyvin mielenkiintoiseksi ja opettavaksi. Lisäksi sain kappa-statistiikkaan perehtymisen kautta hyvän käsityksen tämän tyyppiseen validointiin parhaiten sopivasta tulosten käsittelytavasta, mitä pidän arvokkaana kokemuksena ja mitä uskon voivani hyödyntää tulevaisuudessa.

## Lähteet

BIO-RAD DC-Sreening II-korttien pakkausseloste.

BIO-RAD LISS/Coombs-korttien pakkausseloste.

Blaney, Kathy D. – Howard, Paula R. 2000. Concepts of Immunohematology. St. Louis: Mosby.

Coombs, suora (mono-/polyspesifinen antiseerumi)(kval), punasoluista. 2011. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=3015&terms=coomb](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=3015&terms=coomb)>. Luettu 2.10.2012.

Ehder, Tapio (toim.) 2005. Kemian metrologian opas. Verkkodokumentti. <[http://www.mikes.fi/documents/upload/j6\\_05\\_b5\\_nettiin.pdf](http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf)>. J6/2005. 26. Luettu 11.1.2013.

Juvonen – Eeva, Savolainen – Eeva-Riitta 2007. Hankinnaiset hemolyyttiset anemiat. Teoksessa Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit. Helsinki: Duodecim. 198-216.

Krusius, Tom – Auvinen, Marja-Kaisa 2011. Verensiirrot. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 2, Immunologia. Helsinki: Duodecim. 358-370.

Laiteohje. DiaMed-ID Micro Typing System. Suomenkielinen käyttöohje. Classic ID-Gelstation. 2006. DiaMed Fennica.

Saari, Leena 2010. Kemiallisten menetelmien validointi ja mittausepävarmuus: Kemian ja toksikologian yksikkö. Evira. Verkkodokumentti. <[http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely\\_toiminta\\_valvonta/laboratoriotoinnta/koulutus/leena\\_saari\\_13.10.10.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/esittely_toiminta_valvonta/laboratoriotoinnta/koulutus/leena_saari_13.10.10.pdf)>. Luettu 11.1.2013.

Salonen, Jonna 2011. Punasolujen kiihtynyt hajoaminen (hemolyyttinen anemia). Lääkärikirja Duodecim. Duodecim Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00923](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00923)>. Luettu 5.4.2013.

Seppälä, Ilkka J. T. – Meri, Seppo 2011. Immunologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim): Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 3, Infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 82-99.

Työohje. DiaMed-GEELIKORTTIEN AGGLUTINAATIOIDEN KIRJAAMINEN. 2007. HUSLAB.



Työohje. Suora Coombsin koe geelimenetelmällä. 2012. HUSLAB.

Validointisuunnitelma. Suora Coombs-määritys ClassicPlus-veriryhmäserologisella analysaattorilla. 2012. HUSLAB.

Verensiirto-opas 2006. Suomen kuntaliitto. Helsinki.

Viera, Anthony J. – Garrett, Joanne M. 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. Family Medicine 37 (5). 360-363.



31	-	-	-									
32	-	-	-									
33	-	-	-									
34	-	-	-									
35	-	-	-									
36	-	-	-									
37	-	-	-									
38	-	-	-									
39	-	-	-									
40	-	-	-									
41	-	-	-									
42	-	-	-									
43	-	(+)	+/-									
44	-	(+)	-									
45	-	(+)	-									
46	-	(+)	-									
47	-	(+)	-									
48	-	+	+									
49	-	+	+									
50	-	+	+									
51	(+)	+	+	-	-	-	(+)	-	-	+/-	-	-
52	(+)	(+)	+/-	(+)	-	-	(+)	-	-	+/-	-	-
53	(+)	+	+	(+)	-	-	(+)	-	-	+/-	-	-
54	(+)	(+)	+/-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
55	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
56	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
57	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
58	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
59	(+)	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-
60	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	+/-	-
61	(+)	(+)	-	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
62	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
63	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
64	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
65	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
66	(+)	+	+/-	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
67	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
68	(+)	(+)	-	+	-	-	(+)	-	-	+/-	-	-
69	+	+	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	+/-	-
70	+	++	++	-	+	-	-	+	-	-	+	-

71	+	++	++	-	+	-	(+)	+	-	+/-	-	-
72	+	+	+	(+)	+	-	(+)	+	-	-	+	-
73	+	+++	+++	(+)	+	-	+	+	-	+	+	-
74	+	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
75	+	++	++	(+)	+	-	-	+	-	-	+	-
76	+	+	+	(+)	-	-	+	-	-	+	-	-
77	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
78	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
79	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
80	+	+	+	+	(+)	-	+	(+)	-	+	-	-
81	+	+	+	+	(+)	-	+	-	-	+	-	-
82	+	++	++	+	-	-	+	-	-	+	-	-
83	+	+	+	+	-	-	+	(+)	-	+	+/-	-
84	+	+	+	+	-	-	++	-	-	++	-	-
85	+	++	++	+	-	-	++	-	-	++	-	-
86	+	++	++	+	-	-	++	-	-	++	-	-
87	+	+	+	+	(+)	-	++	(+)	-	++	+/-	-
88	+	++	++	+	-	-	++	-	-	+++	-	-
89	+	++	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-
90	+	++	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-
91	+	++	+++	++	+	-	+	+	-	+	+/-	-
92	+	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
93	++	++	++	-	++	-	-	+++	-	-	+++	-
94	++	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
95	++	++	++	+	+	-	+	+	-	+	+	-
96	++	+++	+++	+	++	-	+	++	-	+	++	-
97	++	++	++	+	-	-	++	-	-	++	-	-
98	++	++	++	+	-	-	++	-	-	++	-	-
99	++	+++	+++	+	-	-	+++	-	-	+++	-	-
100	++	++	++	++	-	-	++	-	-	++	-	-
101	++	++	++	++	-	-	++	-	-	+	-	-
102	++	++	++	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
103	++	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
104	++	+++	+++	++	(+)	-	+++	+	-	+++	+	-
105	++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
106	++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
107	+++	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-
108	+++	+++	+++	(+)	++	-	(+)	+++	-	-	+++	-
109	+++	+++	+++	(+)	+++	-	-	++	-	-	+++	-
110	+++	+++	+++	(+)	+++	-	(+)	+++	-	+	+++	+

111	+++	+++	+++	(+)	+++	-	(+)	+++	-	-	+++	-
112	+++	+++	+++	(+)	+++	+	-	+++	-	-	+++	-
113	+++	++++	++++	(+)	+++	-	+	+++	-	+	+++	-
114	+++	+++	+++	+	+++	-	++	+++	-	++	+++	-
115	+++	+++	+++	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-
116	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	-	++	+++	-
117	+++	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
118	+++	+++	+++	++	-	-	+++	(+)	-	+++	+/-	-
119	+++	++	+++	+++	+	+	+++	+	+	++++	+	+
120	+++	++++	++++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
121	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
122	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
123	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
124	+++	++++	++++	++++	++	-	++++	++	-	++++	++	-
125	+++	++++	++++	++++	+++	-	++++	+++	-	++++	+++	-
126	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
127	+++	+++	+++	+++	+	(+)	+++	++	++	+++	++	+
128	+++	+++	+++	++++	(+)	-	++++	(+)	-	++++	+/-	-
129	+++	++++	++++	+++	+	-	++++	++	-	++++	+	-
130	+++	+++	+++	+++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
131	+++	+++	+++	+++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
132	+++	++++	++++	+++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
134	+++	++++	++++	+++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
135	+++	++++	++++	+++	-	-	++++	-	-	++++	-	-
136	++++	++++	++++	(+)	+++	-	++	+++	(+)	++	+++	-
137	++++	++++	++++	+++	+++	(+)	+++	+++	-	+++	+++	-
138	++++	++++	++++	++++	-	-	++++	-	-	++++	-	-

