



Wilma Tenkanen

Vasta-ainetitterimenetelmän validointi geelikortille veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla

Menetelmän toistettavuus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

16.11.2023

Tekijä	Wilma Tenkanen
Otsikko	Vasta-ainetitterimenetelmän validointi geelikortille veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla
Sivumäärä	41 sivua
Aika	16.11.2023
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Merja Ojala Laboratorioasiantuntija Kati Sulin
<p>Suomessa kaikilta odottavilta äideiltä seulotaan alkuraskaudessa veriryhmävasta-aineet. Vasta-aineiden seulonnan tarkoituksena on löytää ne äidit, joilla on raskauden kannalta merkittäviä vasta-aineita ja joiden lapsella on vaara sairastua sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin. Riski sikiön sairastumiselle kasvaa, mitä suurempi vasta-aineen pitoisuus äidin veressä on. Vasta-aineen pitoisuus verestä määritetään titraamalla ja määrittäminen on suoritettu tähän mennessä manuaalisesti putkitekniikalla. Manuaalinen määrittäminen on hidasta ja työlästä ja se sitoo paljon työvoimaa. Menetelmän automatisointi sujuvoittaisi ja nopeuttaisi määrittämistä, minkä myötä tarvittava odottavan äidin seuranta päästään aloittamaan aikaisemmin.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia automatisoidun vasta-ainetitterimenetelmän toistettavuutta geelikortitekniikalla IH-500-analysaattorilla. Toistettavuus määritettiin analysoimalla kahta pitoisuuksiltaan erilaista kaupallista anti-D-vakiota sekä vasta-aineellisia plasmanäytteitä Bio-Radin veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla. Tavoitteena oli saada selville, oliko automatisoitu vasta-ainetitterimenetelmä toistettava, jotta vasta-ainetitterimääritys voitaisiin suorittaa jatkossa analysaattorilla rutiinikäytössä olleen manuaalisen analysoinnin sijaan.</p> <p>Tutkimuksen aineisto analysoitiin Suomen Punaisen Ristin, Veripalvelun laboratorioissa viitenä erillisenä päivänä. Käytännön toteutuksen lisäksi opinnäytetyön tietoperustaan etsittiin aiheeseen liittyvää aikaisempaa tutkimustietoa. Tutkimuksen tuloksina saatiin numeerisia titteriarvoja, mutta tuloksien tulkinnassa kiinnitettiin huomiota reaktivoimakkuustuloksien visuaaliseen arviointiin. Tutkimusaineiston näytteiden titteritulokset oli määritetty manuaalisilla tekniikoilla jo aiemmin ja analysaattorin antamia tuloksia verrattiin näihin tuloksiin.</p> <p>Tutkimuksessa selvisi, että automatisoitu geelikortitekniikka on manuaalista putkitekniikkaa huomattavasti herkempi menetelmä, sillä analysaattorilla saadut titteritulokset olivat selvästi korkeampia kuin manuaalisella putkitekniikalla saadut tulokset. Tutkimuksen tulokset kuitenkin osoittivat, että Bio-Radin IH-500-analysaattorin käyttämä geelikortitekniikka vasta-ainetitterimääritykseen on toistettava.</p> <p>Tämän opinnäytetyön avulla saatuja tuloksia hyödynnetään yhtenä osana Veripalvelussa tapahtuvaa laajempaa validointiprosessia. Validoinnin tarkoituksena on osoittaa vasta-ainetitterimenetelmän toimivuus sekä geelikortitekniikalla manuaalisesti että IH-500-laitteella. Näiden tulosten perusteella Veripalvelu määrittää uuden kliinisesti merkittävän titteritason, jota käytetään tutkittavien ohjaamisessa erikoissairaanhoidon. Tämän opinnäytetyön tuloksia hyödynnetään geelikortitekniikan toimivuuden osoittamisessa IH-500-analysaattorilla.</p>	
Avainsanat	Validointi, toistettavuus, veriryhmä, vasta-aine, titraus

Author	Wilma Tenkanen
Title	Validation of the Antibody Titration Method on a Gel Card with the Blood Group Serological IH-500 Analyzer
Number of Pages	41 pages
Date	16 November 2023
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Merja Ojala, Senior Lecturer Kati Sulin, Laboratory Specialist
<p>All expectant mothers in Finland are screened for blood group antibodies during early pregnancy. The purpose of the antibody screening is to identify those mothers who have clinically significant antibodies for the pregnancy and consequently, whose baby is at risk of developing a hemolytic disease of the fetus or newborn. The higher the concentration of antibodies in the mother's blood is, the risk of the hemolytic disease of the fetus or newborn increases. The concentration of the antibody in the blood is determined through titration, and so far, this determination has been done manually using a tube technique. The manual determination is slow, laborious, and in addition, requires a significant amount of workforce. Automating the method would streamline and speed up the determination process, allowing earlier monitoring of expectant mothers.</p> <p>The purpose of the thesis was to study the repeatability of an automated antibody titration method using the gel card technique on the IH-500 analyzer. Repeatability was defined by analyzing two different concentrations of commercial anti-D controls and antibody-containing plasma samples with the Bio-Rad blood group serology IH-500 analyzer. The aim of this study was to determine whether the automated antibody titration method was repeatable, allowing for the future execution of antibody titration on the analyzer instead of the manual analysis that had been used in routine practice.</p> <p>The research data were analyzed at the laboratory of Finnish Red Cross, Blood Service over five separate days. In addition to the practical implementation, previous research data related to the topic was searched to support this study. The results of the study produced numerical titration values, but the interpretation of the reaction intensity results also considered their visual assessment. The analyzer's results were compared to previous titer results that were determined using manual techniques.</p> <p>The study revealed that the automated gel card method is significantly more sensitive than the manual tube technique, as the titration results determined using the analyzer were notably higher than the results determined using the manual tube method. However, the study found that the gel card technology used by the Bio-Rad IH-500 analyzer for antibody titration is repeatable. The results of this thesis will be utilized as part of a wider validation process in the Blood Service. The aim of the validation is to demonstrate the functionality of the antibody titration method, both with the gel card technique manually and with the IH-500 analyzer. Based on these results, the Blood Service will determine a new clinically meaningful titer level to be used for referral of subjects to specialist care. The results of this thesis will be used to determine the effectiveness of the gel card technique with the IH-500 analyzer.</p>	
Keywords	Validation, repeatability, blood group, antibody, titration

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Immunisaatiota aiheuttavien punasoluvasta-aineiden määrittäminen	2
2.1	Veriryhmäjärjestelmä	2
2.1.1	Punasoluantigeenit	3
2.1.2	Punasoluvasta-aineet	3
2.2	Raskausimmunisaatio	5
2.2.1	Immunisaation kannalta tärkeimmät antigeenit ja vasta-aineet	5
2.2.2	Sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttinen tauti	7
2.2.3	Raskaudenaikaiset veriryhmä- ja vasta-ainetutkimukset	9
2.3	Punasoluvasta-ainetason eli titterin määrittäminen	10
2.3.1	Putkitekniikka	12
2.3.2	Geelikortitekniikka	13
3	Validointi	16
3.1	Validoinnin parametrit	16
3.2	Toistettavuus	17
3.2.1	Sarjojen sisäinen toistettavuus	17
3.2.2	Sarjojen välinen toistettavuus	18
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	18
5	Opinnäytetyön menetelmät ja opinnäytetyön toteutus	19
5.1	Menetelmälliset lähtökohdat	19
5.2	Aineiston keruu ja analysointi	20
5.3	Opinnäytetyön toteutus	22
6	Tulokset	24
6.1	Anti-D-vakioiden toistettavuus	24
6.2	Vasta-aineellisten plasmanäytteiden toistettavuus	26
7	Pohdinta	28
7.1	Tulosten tarkastelu	28
7.2	Johtopäätökset ja kehittämissuhteet	32
7.3	Luotettavuus	33
7.4	Eettisyys	35
7.5	Ammatillinen kasvu	36
	Lähteet	38

1 Johdanto

Raskaana olevien veriryhmä- ja vasta-ainetutkimuksia on tehty jo 1950-luvulta lähtien. Useimmissa maissa kaikilta odottavilta äideiltä tutkitaan alkuraskaudessa ABO- ja RhD-veriryhmät sekä seulotaan veriryhmävasta-aineet. Vasta-aineiden seulonnan tarkoituksena on löytää ne äidit, joilla on raskauden kannalta merkittäviä vasta-aineita ja joiden lapsella on vaara sairastua sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin. (Sainio & Kuosmanen 2017.) Riski sikiön sairastumiselle kasvaa, mitä suurempi vasta-aineen pitoisuus äidin veressä on (Jernman & Aitokallio-Tallberg & Kauppinen & Stefanovic & Sainio 2020). Suomessa raskaudenaikaiset veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimukset on keskitetty Veripalveluun vuodesta 1990 lähtien (Sainio & Kuosmanen 2017). Veripalvelussa tutkitaan vuosittain noin 60 000 odottavan äidin näytteet ja lähes prosentilla odottavista äideistä todetaan raskauden kannalta merkityksellinen vasta-aine. Näiden vasta-aineellisten odottavien äitien raskautta seurataan tarkkaan koko raskauden ajan, jotta mahdollinen sikiön sairastuminen voidaan hoitaa ajoissa. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa 2023.)

Vasta-aineen pitoisuuden määrittäminen eli titraus on suoritettu tähän asti manuaalisesti putkitekniikalla, joka on hidas ja työläs tekniikka. Lisäksi se sitoo paljon työvoimaa. Uusien veriryhmäanalyysointilaitteiden myötä titrauksen automatisointi on tullut mahdolliseksi. (Sulin 2023.) Menetelmän automatisointi sujuvoittaisi ja nopeuttaisi tutkimuksen määrittämistä, jolloin tulokset saataisiin nopeammin ja tämän myötä tarvittava odottavan äidin seuranta päästäisiin aloittamaan aikaisemmin. Lisäksi automatisoidussa menetelmässä tulokset eivät olisi niin riippuvaisia työntekijästä, jolloin mahdollisten inhimillisten virheiden määrä vähenisi. Viimeaikaisten tutkimusten myötä on kuitenkin todettu, että analyysointilaitteiden käyttämä geelikortitekniikka on putkitekniikkaa huomattavasti herkempi menetelmä, jolloin odotettavissa olisi todennäköisesti huomattavaa tulostason nousua. Koska näytteiden ja eri vasta-aineiden välinen vaihtelu on suurta, ei uutta menetelmää voida ottaa käyttöön selvittämättä sen vaikutusta hoitoketjuun. (Lieberman & Andrews & Evans & Cohn 2021.)

Tämä opinnäytetyö toteutettiin yhdessä Suomen Punaisen Ristin (SPR) Veripalvelun kanssa. SPR Veripalvelu on voittoa tavoittelematon organisaatio, joka huolehtii koko

Suomen verivalmistehuollosta sekä kaikista raskaudenaikaisista veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimuksista. Opinnäytetyö koostuu käytännön toteutuksesta ja kirjallisesta raportista.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia automatisoidun vasta-ainetitterimenetelmän toistettavuutta geelikorttitekniikalla Bio-Radin veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla. Toistettavuuden tutkimiseksi analysoitiin kahta pitoisuuksiltaan erilaista kaupallista anti-D-vakiota ja lisäksi myös plasmanäytteitä, joissa oli erilaisia kliinisesti merkittäviä vasta-aineita. Toistettavuuden tuloksia hyödynnetään yhtenä osana Veripalvelun laajempaa vasta-ainetitterimenetelmän validointia.

2 Immunisaatiota aiheuttavien punasoluvasta-aineiden määrittäminen

2.1 Veriryhmäjärjestelmä

Veriryhmä on punasolujen ominaisuus, jonka määrittää punasolun pinnalla esiintyvät monimuotoiset antigeenirakenteet, jotka ovat periytyviä veren punasolujen pintarakenteita. Henkilön perimä määrittää siis mitä antigeenejä punasolun pinnalla on, ja siten myös henkilön veriryhmän. Veriryhmät on järjestetty veriryhmäjärjestelmiksi ja nämä järjestelmät voivat sisältää yhden tai useamman punasoluantigeenin. Jokainen veriryhmäjärjestelmä eroaa geneettisesti kaikista muista veriryhmäjärjestelmistä. (Daniels 2013: 1–4.) Kansainvälinen verensiirtoyhdistys (The International Society of Blood Transfusion) ylläpitää virallista rekisteriä kaikista tällä hetkellä tunnustetuista veriryhmäjärjestelmistä. Heinäkuuhun 2023 mennessä veriryhmäjärjestelmiä tunnetaan 45 erilaista ja nämä järjestelmät sisältävät 360 eri punasoluantigeeniä.

ABO-veriryhmäjärjestelmässä on neljä erilaista veriryhmää: A, B, AB ja O. Veriryhmä määräytyy sen mukaan, onko punasolujen solukalvossa joko A- tai B-antigeeniä, molempia tai ei kumpaakaan antigeeniä. (Haug & Sand & Sjaastad & Toverud 1995: 322.) ABO-järjestelmä on tärkein ja samalla myös tunnetuin tapa määrittellä henkilön veriryhmä, sillä jokaisen veri kuuluu yhteen neljästä ABO-veriryhmästä eli ryhmään A, B, O tai AB. (Tietoa veriryhmistä 2023.) Rh-veriryhmäjärjestelmä on veriryhmäjärjestelmistä monimuotoisin. Rh-veriryhmäjärjestelmään kuuluu lukuisia antigeenejä, mutta tärkeimmät niistä ovat antigeenit D, C, c, E ja e. (Dean 2005: 39–40.) Rh-järjestelmän mukaan henkilön veriryhmä jaetaan joko RhD-positiiviseen tai RhD-negatiiviseen, sen mukaan

onko henkilön punasolun pinnalla D-antigeeniä vai ei. Perusveriryhmiä on siis siten yhteensä kahdeksan erilaista: A RhD pos, A RhD neg, B RhD pos, B RhD neg, O RhD pos, O RhD neg, AB RhD pos ja AB RhD neg. (Tietoa veriryhmistä 2023.)

ABO- ja Rh-veriryhmäjärjestelmien jälkeen kolmanneksi tärkein veriryhmäjärjestelmä on Kell-veriryhmäjärjestelmä. Kell-veriryhmäjärjestelmään kuuluu useita immunogeenisiä antigeenejä, mutta tärkein niistä on K-antigeeni. (Dean 2005: 57.) Muita yleisiä ja tärkeitä veriryhmäjärjestelmiä ovat Kidd- ja Duffy-veriryhmäjärjestelmät (Ekblom-Kullberg ym. 2023).

2.1.1 Punasoluantigeenit

Antigeeni on mikä tahansa molekyyli, joka saa aikaan immuunireaktion eli jota kohtaan elimistö tuottaa vasta-aineita (Meri 2011). Punasoluantigeenit ovat punasolun pinnan solukalvoon kiinnittyneitä proteiineja, glykoproteiineja tai glykolipidejä, jotka toimivat punasolujen pintamarkkereina. (Daniels & Bromilow 2013: 2.)

Perimä määrittää mitä antigeenejä henkilön punasolun pinnalla on (Daniels & Bromilow 2013: 1). Esimerkiksi Rh-tekijä, eli D-antigeeni, määräytyy RhD-geenin mukaan. Jos henkilöllä on kyseinen geeni, on hän silloin RhD-positiivinen ja jos henkilöllä ei ole kyseistä geeniä, on hän silloin RhD-negatiivinen. (Daniels 2013: 182.) D-antigeeniä vastaan ei ole luonnollisia vasta-aineita, mutta jos RhD-negatiivinen henkilö altistuu RhD-positiiviselle verelle raskauden tai verensiirron seurauksena, vasta-aineita voi muodostua (Haug ym. 1995: 323). Punasoluantigeenit eroavat toisistaan immunogeenisyydeltään eli kyvyllään aiheuttaa immuunireaktio. Jotkin järjestelmät ovat immunogeenisempia kuin toiset. Esimerkiksi Rh- ja Kell-järjestelmän antigeenit ovat hyvin immunogeenisiä, minkä vuoksi ne ovat yleisimpiä sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin aiheuttajia. (Murphy & Roberts & Yazer 2017: Luku 3.) Punasoluantigeenit pystytään määrittämään spesifisten vasta-aineiden avulla (Daniels & Bromilow 2013: 1).

2.1.2 Punasoluvasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat osa ihmisen immuunijärjestelmää ja vasta-aineita tuottavat B-lymfosyytit. Vasta-aineiden tavoitteena on auttaa poistamaan elimistöstä vieraita rakenteita. Kun elimistöön pääsee vieras rakenne, immuunijärjestelmä

aktivoituu ja elimistö alkaa tuottaa vasta-ainetta antigeeniä kohtaan ja tämän myötä kehittyy immunologinen muisti. Immunologinen muisti tarkoittaa sitä, että elimistön kohdassa antigeenin toisen kerran reaktio on erilainen kuin ensimmäisellä kerralla. Toisella kerralla vasta-aineita syntyy nopeammin ja enemmän, ja ne ovat affiniteetiltaan eli sitosvoimakkuudeltaan vahvempia. Vasta-aineita eli immunoglobuliineja on useita luokkia: IgM, IgG, IgE, IgA, IgD. (Jokiranta & Seppälä 2011.) Veren vasta-aineet ovat yleensä IgM- ja IgG-luokan vasta-aineita (Daniels & Bromilow 2013: 3). IgM-luokan vasta-aine on poikkeuksellinen muihin vasta-aineisiin verrattuna, sillä se on pentameeri ja pystyy kiinnittymään useaan antigeenimolekyylin osaan. Se on kooltaan myös suurempi kuin muut immunoglobuliinit (Jokiranta & Seppälä 2011), eikä pysty läpäisemään istukkaa. IgG-luokan vasta-aineet pystyvät läpäisemään istukan (Sainio & Kuosmanen 2012).

Punasoluvasta-aineet ovat punasoluantigenejä kohtaan muodostuvia vasta-aineita. Nämä vasta-aineet voivat olla joko allo- tai autovasta-aineita. Allo-vasta-aineet muodostuvat yleensä immunisoitumisen kautta, eli ne kehittyvät immuunijärjestelmän kohdatessa vieraan punasoluantigeenin, esimerkiksi raskauden tai verensiirron myötä. Immunisaation kautta muodostuneet punasoluvasta-aineet ovat useimmiten IgG-luokan vasta-aineita. Allovasta-aineet voivat olla myös luonnollisia vasta-aineita, jotka kehittyvät ilman kontaktia vieraaseen rakenteeseen, kuten ABO-isoagglutiniinit. Ihmisen elimistö alkaa kuuden kuukauden ikäisenä tuottamaan vasta-aineita niitä ABO-veriryhmätekijöitä kohtaan, jotka henkilöltä itseltään puuttuvat. Nämä luonnolliset vasta-aineet esiintyvät plasmassa ilman aikaisempaa altistusta antigeeneille. (Haug ym. 1995: 322.) Autovasta-aineet ovat henkilön omien punasolujen pinnalla olevia veriryhmäantigenejä kohtaan kehittyneitä punasoluvasta-aineita. (Ilmakunnas 2019: 48.)

Vasta-aineet jaetaan kliinisesti merkittäviin ja merkityksettömiin. Kliinisesti merkittävät vasta-aineet ovat yleensä immunisoitumisen kautta muodostuneita IgG-luokan vasta-aineita, jotka voivat aiheuttaa hemolyyttisiä verensiirtoreaktioita sekä sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. (Ilmakunnas 2019: 48.) Raskauden kannalta kliinisesti merkittäviä vasta-aineita ovat muun muassa anti-D, anti-c, anti-E ja anti-K (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa). Raskauden kannalta merkittäviä vasta-aineita tutkitaan ja seurataan tarkkaan jokaisen raskauden kohdalla (Sainio & Aho-Asunmaa 2020).

2.2 Raskausimmunisaatio

Raskausimmunisaatiossa äidin ja sikiön veriryhmät poikkeavat toisistaan, jolloin äidin puolustusjärjestelmä alkaa tuottaa vasta-aineita niitä sikiön punasoluantigeenejä kohtaan, jotka äidiltä itseltään puuttuvat. Nämä äidille vieraat sikiön punasoluantigeenit ovat isältä perittyjä. (Jernman ym. 2020.) Tavallisin immunisaatiolle altistava tilanne on synnytys, jonka aikana sikiön verta pääsee vuotamaan äitiin. Jo raskauden aikana istukan kautta voi myös kulkeutua pieniä määriä sikiön punasoluja äidin verenkiertoon. (Sainio & Aho-Asunmaa 2020.) Äidille immunisaation myötä muodostuneet IgG-luokan vasta-aineet läpäisevät istukan, jolloin ne pääsevät sikiöön ja alkavat hajottaa sikiön punasoluja. Punasolujen hajoamisen myötä sikiölle voi aiheutua vakava anemia ja hoitamattomana siitä voi seurata sikiön tai vastasyntyneen kuolema tai vammautuminen. (Laitinen & Jouppila & Mäkäraäinen 1997.) Koska äidin immunisaatoriski on suurin loppuraskauden tai synnytyksen aikana, taudin vakavia muotoja ei tavata vielä ensimmäisessä raskaudessa, vaan immunisoitumisen jälkeen seuraavassa raskaudessa, kun immunologinen muisti aktivoituu (Jernman ym. 2020).

2.2.1 Immunisaation kannalta tärkeimmät antigeenit ja vasta-aineet

Raskauden kannalta merkittävin ja sikiölle vaarallisin veriryhmä on Rh-veriryhmäjärjestelmä, etenkin Rh-järjestelmään kuuluvat antigeenit D ja c sekä lisäksi Kell-veriryhmäjärjestelmä ja sen antigeeni K. (Sainio & Aho-Asunmaa 2020.) Raskauden kannalta merkittäviä veriryhmiä ovat lisäksi Duffy- ja Kidd-veriryhmäjärjestelmät. Kaikki edellä mainitut veriryhmäjärjestelmät ovat raskauden kannalta merkittäviä, sillä näiden ryhmien antigeenejä kohtaan muodostuvat vasta-aineet ovat yleensä IgG-luokan vasta-aineita, jotka pystyvät läpäisemään istukan vahingoittaen sikiötä. (Daniels & Bromilow 2013: 39–51).

ABO-ryhmän vasta-aineet voivat olla IgG- tai IgM-luokan vasta-aineita. Yksilölle, joka on veriryhmää O, muodostuu vasta-aineet anti-A ja anti-B, jotka ovat yleensä IgG-tyypisiä. Veriryhmän A ja B yksilöiden elimistössä esiintyvät anti-A ja anti-B voivat olla IgG- tai IgM-tyypin vasta-aineita. Eli yksilölle, joka on veriryhmää A, muodostuu anti-B-vasta-aineita ja yksilölle, joka on veriryhmää B, muodostuu anti-A-vasta-aineita. Yksilöllä, jonka veriryhmä on AB, ei ole ABO-ryhmän vasta-aineita lainkaan. ABO-järjestelmän vasta-aineet voivat aiheuttaa vastasyntyneen hemolyyttisen taudin, mutta eivät

yleensä aiheuta hoitoa vaativia ongelmia raskauden aikana. ABO-ryhmän vasta-aineiden aiheuttama vastasyntyneen hemolyyttinen tauti on yleensä luonteeltaan lievä, sillä sikiön punasolut eivät vielä ilmennä aikuisten A- ja B-antigeenien tasoja. Sikiön ABO-veriryhmäantigeenien vahvuus voi kuitenkin vaihdella, ja siksi hemolyysin aste ja siten taudin vakavuus voivat olla arvaamattomia. (Dean 2005: 25, 29–30.)

Rh-veriryhmäjärjestelmä on monimutkaisin veriryhmäjärjestelmä ja RhD-veriryhmätekiä useimmiten vakavan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin aiheuttaja. Rh-veriryhmän merkitys perustuu Rh-antigeenien immuogeenisyyteen, sillä Rh-antigeenit ovat erittäin immunogeenisiä eli laukaisevat helposti immuunivastereaktion. Immunogeenisyyden taustalla on Rh-veriryhmäjärjestelmän antigeenien eroavaisuus. Rh-veriryhmäjärjestelmä sisältää D-antigeenin, joka eroaa saman järjestelmän C-, c-, E- ja e-antigeeneistä 35 aminohapon verran, kun useimmat veriryhmät määräytyvät punasolujen antigeeneillä, jotka eroavat yhden tai kahden aminohapon verran. On siis lähes varmaa, että jos RhD-negatiivinen yksilö kohtaa D-antigeenia elimistössään, tämä alkaa muodostamaan vasta-aineita D-antigeenia kohtaan. Eli jos odottava äiti on RhD-negatiivinen ja sikiö RhD-positiivinen ja äidin elimistöön pääsee raskauden tai synnytyksen aikana D-antigeenia, äidin elimistö muodostaa vasta-aineita D-antigeenia kohtaan. RhD-antigeenia kohtaan muodostuneet vasta-aineet ovat lähes aina IgG-luokan vasta-aineita ja pystyvät läpäisemään istukan, mikä on vaaraksi sikiölle. (Dean 2005: 39, 42.)

Kell-veriryhmäjärjestelmä on Rh- ja ABO-järjestelmien jälkeen merkittävin raskauden kannalta. Anti-K-vasta-aineita esiintyy yleensä äideillä, joille on tehty aiemmin useita verensiirtoja tai äideillä, jotka ovat herkistyneet antigeeni K:lle aikaisemmassa raskaudessa. Vaikka äidin ja sikiön Rh- tai ABO-veriryhmien yhteensopimattomuus on yleisempiä syitä vastasyntyneen hemolyyttiselle taudille, K-ryhmän yhteensopimattomuus voi olla kohtalokkaampi, sillä ABO-ryhmän aiheuttama tauti on yleensä lievä ja äidin anti-D:n aiheuttama sairaus voidaan suurelta osin estää anti-D-immunoglobuliinisuojauksen avulla. Lisäksi Kell-immunisaation aiheuttamassa sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttisessä taudissa on taipumus johtaa vakavaan sikiön anemiaan. Tämä johtuu siitä, että anti-K-vasta-aineet tuhoavat myös punasolujen epäkypsiä muotoja, jolloin sikiön punasolujen tuotanto häiriintyy jo punasolujen tuotannon alkuvaiheessa. Kell-veriryhmäjärjestelmä on monimutkainen ja sisältää monia antigeenejä, jotka ovat erittäin immunogeenisiä. (Dean 2005: 45, 47.) Duffy- ja Kidd-veriryhmäjärjestelmien yhteensopimattomuudesta johtuva sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti on harvinainen ja taudin muodot ovat yleensä lieviä (Dean 2005: 53, 59).

2.2.2 Sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttinen tauti

Äidin raskaudenaikainen immunisoituminen voi aiheuttaa sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttisen taudin. Immunisaation myötä äidille muodostuneet IgG-luokan punasoluvasta-aineet läpäisevät istukan ja päätyvät sikiöön. Koska sikiön punasolujen pinnalla on äidille muodostunutta vasta-ainetta vastaava antigeeni, vasta-aineet tarttuvat näihin sikiön punasolujen antigeeneihin ja sikiön punasolut alkavat hajota. Tämä voi aiheuttaa sikiölle anemian tai johtaa hyperbilirubinemiaan eli vastasyntyneen kellastumiseen. (Sainio & Kuosmanen 2012.) Hyperbilirubinemiassa vastasyntyneen veren bilirubiinipitoisuus on koholla ja suurina pitoisuuksina bilirubiini voi kertyä aivoihin aiheuttaen pysyviä aivovaurioita (Kumpula & Perälä 2019). Hemolyyttisen taudin vaikeimmat muodot voivat aiheuttaa hoitamattomina sikiön tai vastasyntyneen kuoleman tai neurologisen vammautumisen. Vaikeaa sikiön anemiaa hoidetaan kohdunsisäisellä eli intrauteriinillä punasolusiirrolla, jossa punasolut siirretään sikiöön napalaskimon kautta. (Jernman ym. 2020.)

Vielä 1900-luvun puolivälissä sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen sairaus oli maailmanlaajuisesti merkittävin sikiön ja vastasyntyneen sairastuvuuden ja kuolleisuuden syy. Tautiin löydettiin kuitenkin ennaltaehkäisevä keino injektiona annettavan anti-D-immunoglobuliinisuojausten avulla (Pegoraro ym. 2020). Suomessa kyseinen suojausohjelma otettiin käyttöön vuonna 1969 ja pian RhD-negatiivisten äitien suojaus anti-D-immunoglobuliinilla synnytyksen jälkeen osoittautui tärkeimmäksi äidin immunisoinnista ehkäiseväksi ja vastasyntyneen vaikean hemolyyttisen taudin riskiä vähentäväksi toimenpiteeksi (Sainio & Kuosmanen 2012: 152).

Synnytyksen jälkeisestä anti-D-suojauksesta huolimatta osalla RhD-negatiivisista äideistä todettiin edelleen seuraavassa raskaudessa anti-D-vasta-aine ja näistä valtaosan arvioitiin johtuvan raskaudenaikaisesta fetomaternaalivuodosta ensimmäisen raskauden aikana. Arvioitiin, että tapaukset olisivat estettävissä RhD-negatiivisille äideille jo raskauden aikana annettavalla rutiinimaisella anti-D-suojauksella (McBain & Crowther & Middleton 2015; Chilcott 2003.) Immunisaatioiden ehkäisemiseksi RhD-negatiivisten äitien rutiiniluonteinen raskaudenaikainen suojaus otettiin käyttöön Kanadassa jo 1970-luvun lopussa ja Yhdysvalloissa sekä monissa Euroopan maissa 1990-luvun puolivälissä (Sainio & Kuosmanen 2012: 152). Suomessa raskaudenaikainen rutiinisuojaus saatiin mukaan Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen äitiysneuvolatoiminnan suosituksiin vasta vuonna 2013 (Sainio & Kuosmanen 2020: 2321).

Vaikka yli 50 vuotta sitten keksittiin tehokas toimenpide ennaltaehkäisemään sairautta, tauti ei ole hävinnyt minnekään. Yhdysvalloissa julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin maailmanlaajuisesti eroa sen välillä, kuinka paljon anti-D-suojauksia vuosittain pitäisi antaa RhD-herkistymisriskin minimoimiseksi ja kuinka paljon todellisuudessa anti-D-immunoglobuliini suojauksia annetaan. Tutkimuksen tulokset osoittivat, että maailmanlaajuiset pyrkimykset RhD-negatiivisten äitien herkistymisen estämiseksi ovat kaukana optimaalisesta tavoitteesta. Anti-D-suojauksen tarjonnan ja kysynnän välinen kuilu on suuri. Toinen tutkimuksen tärkeä havainto on, että raskaudenaikainen suojaus anti-D-immunoglobuliinilla ei ole niin yleistä kuin suositellaan. (Pegoraro ym. 2020.)

Puutteellinen tieto anti-D-suojauksen annosta tai puutokset suojauksen saatavuudessa lisäävät satojen tuhansien RhD-negatiivisten naisten riskiä herkistyä RhD-antigeenille. Näin ollen voisi todeta, että sairaus on edelleen maailmanlaajuinen haaste. (Pegoraro ym. 2020.) Uudistetusta suojaushjelmasta huolimatta myös Suomessa noin viidessä raskaudessa vuosittain tarvitaan kohdunsisäisiä verensiirtoja äidin anti-D-immunisoitumisen vuoksi. Vaikka suurin osa hoidetuista lapsista jää eloon, neurologinen sairastavuus on lisääntynyt tässä ryhmässä. Valtaosa uusista anti-D-immunisaatioista näyttäisi Suomessa liittyvän tilanteisiin, joissa riskiperusteinen suojaus on jäänyt antamatta esimerkiksi alkuraskauden verenvuotojen yhteydessä inhimillisen erehdyksen vuoksi. (Sainio & Kuosmanen 2020: 2322.)

RhD-negatiivisten äitien suojaus anti-D-immunoglobuliinilla raskauden aikana ja synnytyksen jälkeen, vastasyntyneen verenvaihdot sekä kohdunsisäiset punasolusiirrot ovat vaikuttaneet siihen, että tautiin liittyvä kuolleisuus on harvinaista, vaikkakin sitä edelleen esiintyy. Tämän vuoksi sekä immunisaatoraskauksien ehkäisy että hoidon edellytys on hyvin toimiva ja keskitetty seulonta. Keskitetyn seulonnan etuna on reaaliaikainen tiedonkulku immunisoituneita äitejä hoitaviin yksiköihin sekä konsultaatioapu synnytysairaaloille yhä harvinaisemmaksi käyvästä taudista. Olennaisinta sairauden ehkäisyssä on seulonnan herkkyys todeta tauti toimenpiteitä vaativan sikiön kohdalla sekä löytää erikoissairaanhoidon ohjattavat immunisoituneet äidit. (Sainio & Kuosmanen 2020: 2323.)

2.2.3 Raskaudenaikaiset veriryhmä- ja vasta-ainetutkimukset

Kaikki raskaudenaikaiset veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimukset on keskitetty Veripalveluun. Kaikista Suomen neuvoloissa asioivista odottavista äideistä otetaan verinäyte 8.–12. raskausviikolla ja näytteet toimitetaan Veripalvelun laboratorioon tutkittavaksi. Näytteistä määritetään ABO- ja RhD-veriryhmät sekä seulotaan veriryhmävastaaineet. Mikäli odottava äiti todetaan veriryhmämäärityksen perusteella RhD-negatiiviseksi, otetaan lisänäytteinä uudelleen vasta-aineseulonta raskausviikoilla 24–26 ja 36. Raskausviikoilla 24–26 otetaan vasta-aineseulontanäytteen lisäksi myös näyte sikiön RhD-veriryhmätekijän tutkimista varten. (Pouta ym. 2013: 116–117.) Sikiön RhD-tekijä tutkitaan äidin plasmasta PCR-menetelmällä (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa). Mikäli sikiö on RhD-positiivinen, raskautta seurataan tarkemmin (Westhoff 2019: 1817). Sikiön RhD-veriryhmätekijän määrityksen avulla voidaan myös kohdentaa raskaudenaikainen rutiinimainen anti-D-suojaus sekä riskiperusteinen ja synnytyksen jälkeinen suojaus ainoastaan niille RhD-negatiivisille äideille, joiden sikiö on RhD-positiivinen (Sainio & Kuosmanen 2020: 2322). Sikiön veriryhmä määritetään myös vaikeissa immunisaatioissa, joissa äidin vasta-ainepitoisuus on korkea. Sikiön Rh-veriryhmäjärjestelmän veriryhmätekijät c, C, E ja e sekä Kell-veriryhmäjärjestelmän K-veriryhmätekijä voidaan osoittaa 16. raskausviikon jälkeen otetusta lapsivesinäytteestä ja RhD-veriryhmätekijä raskausviikolta 12 lähtien äidin plasmanäytteestä. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa.)

Mikäli veriryhmävasta-aineseulonnan tulos on positiivinen, tehdään jatkotutkimuksina vasta-aineiden tunnistus. Mikäli tunnistettu vasta-aine on raskauden kannalta merkittävä, vasta-aineen pitoisuus mitataan verestä titraamalla. Noin yhdellä prosentilla äideistä todetaan vasta-aine, joka voi aiheuttaa sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttisen taudin. Veriryhmävasta-aineet tutkitaan jokaisen raskauden yhteydessä, koska vasta-aineita muodostuu sitä todennäköisemmin, mitä useammin äiti on ollut raskaana. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa.)

Todetun kliinisesti merkittävän vasta-aineen pitoisuuden seuranta tapahtuu Veripalvelun ohjeiden mukaan joko neuvolassa tai yliopistosairaalassa. Jos immunisaatio on lievä, seuranta toteutetaan neuvolassa. Vakavissa immunisaatioissa äiti lähetetään jatkotutkimuksiin oman synnytysairaalan tai yliopistosairaalan äitiyspoliklinikalle. Veripal-

velun antaman titterituloksen perusteella yliopistosairaalat arvioivat, tarvitaanko raskauden seurannassa muita tutkimuksia ja tämän avulla suunnitellaan raskauden hoito. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa.)

Raskauden kannalta tärkein vasta-aine on Rh-veriryhmäjärjestelmän vasta-aine anti-D, minkä vuoksi äidin RhD-määritys on raskauden kannalta merkittävää. Suomalaisista äideistä noin 13 prosenttia on RhD-negatiivisia. Näille äideille voi kehittyä veriryhmäimmunisaatio, mikäli sikiö perii isältään RhD-positiivisen veriryhmän. (Sainio & Aho-Asunmaa 2020.) Anti-D-vasta-aine todetaan Suomessa noin 40 äidillä vuosittain ja näistä noin puolella vasta-ainepitoisuus on korkea. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa). Jos todetun anti-D-vasta-aineen titteritulos on vähintään 16, anti-D:n pitoisuus määritetään tällöin myös kvantitatiivisesti. Kvantitoimalla saadaan tarkka vasta-aineen pitoisuus IU/ml (International Units Per Milliliter). (Huslab 2023.)

Myös isän näyte voidaan pyytää tarvittaessa. Kun äidillä todetaan lapselle mahdollisesti vaarallinen vasta-aine, Veripalvelu pyytää neuvolaa lähettämään lapsen isän verinäytteen. Isän näytteestä tutkitaan ABO- ja Rh-veriryhmät ja se veriryhmätekijä, jota vastaan äidin vasta-aine on muodostunut. Jos isällä ei ole kyseistä veriryhmätekijää, sitä ei ole lapsellakaan, ja silloin ei ole vaaraa, että sikiö tai vastasyntynyt sairastuisi hemolyyttiseen tautiin. Tällöin äidin vasta-ainetutkimusten määrää voidaan vähentää raskauden aikana ja tarkistaa vain, ettei uusia vasta-aineita ole muodostunut. Mikäli isällä todetaan kyseinen veriryhmätekijä, isä voi olla heterotsygootti tai homotsygootti veriryhmäominaisuuden suhteen. Jos isä on veriryhmäominaisuuden suhteen heterotsygootti, puolet hänen lapsistaan perii kyseisen veriryhmätekijän. Jos isä taas on homotsygootti, kaikki hänen lapsensa perivät kyseisen veriryhmäominaisuuden. Molemissa tapauksissa sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin vaara on olemassa, jolloin äidin veren vasta-ainepitoisuutta seurataan säännöllisesti koko raskauden ajan. (Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa.)

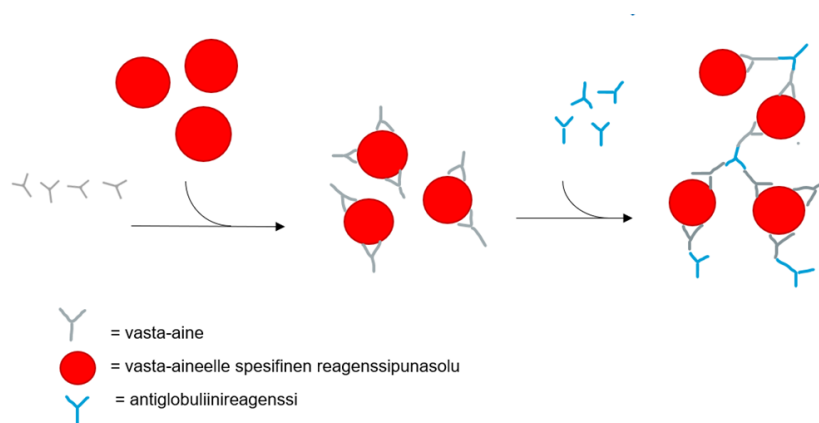
2.3 Punasoluvasta-ainetason eli titterin määrittäminen

Raskaudenaikaiset veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimukset perustuvat vasta-aineen ja punasoluantigeenien välisiin reaktioihin. Punasoluantigeenit ovat tutkittavan henkilön punasolujen tai reagenssipunasolujen pinnalla, ja vasta-aineet ovat peräisin tutkittavan henkilön plasmasta tai käytettävästä reagenssista. Määritykset tapahtuvat

putki- tai geelikorttitekniikalla. Kortti- ja putkitekniikassa voidaan käyttää suoraa agglutinaatiota sekä suoraa ja epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää. (Ekblom-Kullberg ym. 2018.)

Suorassa agglutinaatiomenetelmässä hyödynnetään IgM-luokkaan kuuluvien suurien punasoluvasta-ainemolekyylien kykyä tarttua samanaikaisesti moneen punasoluun ilman antiglobuliinireagenssin apua. Antiglobuliinireagenssi (AHG) on antihumaani IgG-vasta-aine, joka kohdistuu ihmisen anti-IgG-vasta-ainetta vastaan. Koska IgM-luokan vasta-aine pystyy rakenteensa vuoksi sitomaan yhtäaikaaisesti useita punasoluja, se muodostaa näkyvän agglutinaation ilman antiglobuliinireagenssia. Tätä menetelmää käytetään muun muassa ABO- ja RhD-veriryhmämäärityksessä sekä vasta-aineiden tunnistuksessa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018.)

Suorassa antiglobuliinimenetelmässä punasolujen annetaan reagoida suoraan antiglobuliinireagenssin kanssa, jolloin osoitetaan, onko punasolun pintaan tarttunut vasta-aineita. Esimerkiksi vastasyntyneeltä otetun näytteen suora antiglobuliinikoe voi olla positiivinen, jos äidillä on anti-D-vasta-aineita, jotka ovat tarttuneet sikiön RhD-positiivisten punasolujen pintaan. Epäsuorassa antiglobuliinikokeessa tarvitaan toista vasta-ainetta osoittamaan IgG-luokan vasta-aineen sitoutuminen punasoluun. Koska IgG-luokan vasta-aine pystyy sitoutumaan vain yhteen punasoluun, se ei pysty yksinään muodostamaan agglutinaatiota. Sen vuoksi tarvitaan toinen vasta-aine, yleensä antiglobuliinireagenssi. AHG-reagenssi sitoutuu IgG-molekyyliin, jolloin muodostuu näkyvä agglutinaatio. Kuvassa 1 on kuvattu, miten antiglobuliinireagenssi sitoutuu punasoluihin kiinnittyneisiin vasta-aineisiin, jolloin punasolut saadaan kiinnittymään toisiinsa muodostaen agglutinaation. Tätä menetelmää käytetään esimerkiksi vasta-aineiden seulonnassa. (Ekblom-Kullberg ym. 2023.)

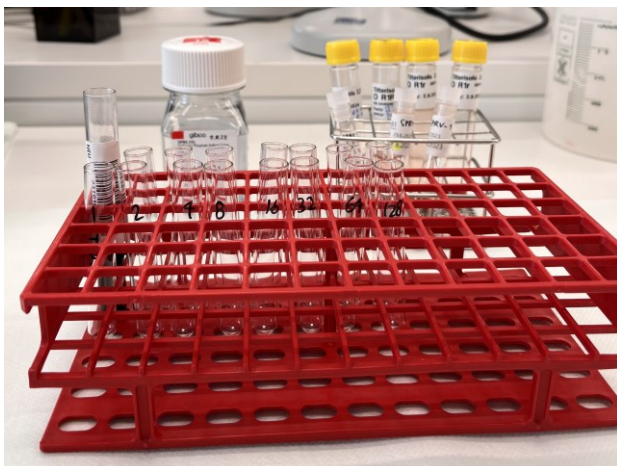


Kuva 1. Epäsuora antiglobuliinikoe.

Vasta-ainetitraus tarkoittaa vasta-aineen pitoisuuden määrittämistä plasmasta tai seerumista. Punasoluvasta-aineiden titraus on semi-kvantitatiivinen menetelmä, joka perustuu vasta-aineen sitoutumiseen antigeeniin. IgM-luokan vasta-aineiden määrittämiseen käytetään suoraa agglutinaatiomenetelmää ja IgG-luokan vasta-aineiden määrittämiseen epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää. Tutkittavasta näytteestä tehdään laimennossarja, jossa laimennoksen annetaan reagoida testipunasolujen kanssa. Testisoluissa on vasta-aineelle spesifinen punasoluantigeeni. Titterin avulla pystytään siis havaitsemaan vasta-ainepitoisuuden taso ja seuraamaan mahdollisesti pitoisuuden muuttumista. (Vasta-ainetitteri ja plasman DTT-käsittely 2022.) Raskauden kannalta merkittävien punasoluvasta-aineiden pitoisuuden määrittäminen on tärkeää, sillä mitä suurempi vasta-aineen pitoisuus äidin veressä on, sitä suurempi riski sikiöllä on sairastua vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin (Jernman ym. 2020).

2.3.1 Putkitekniikka

Vuoteen 2023 asti vasta-ainetason määrittäminen Veripalvelussa on tapahtunut manuaalisesti putkitekniikalla. Putkitekniikassa käytetään epäsuoraa agglutinaatiomenetelmää. Seerumin tai plasman sisältämien vasta-aineiden annetaan ensin kiinnittyä reagenssipunasolujen antigeeneihin. Tämän jälkeen vasta-aineet, jotka eivät ole kiinnittyneet punasoluantigeeneihin, pestään pois, jotta ne eivät häiritse reaktiota, kun antihumaniglobuliini (AHG) lisätään reaktioon. (Sulin 2023.) Tutkittavan plasman IgG-luokan vasta-aineet sitoutuvat reagenssipunasolujen pinnan antigeeneihin, mutta eivät saa aikaan näkyvää agglutinaatiota ilman antiglobuliinireagenssia eli AHG:tä. (Ekblom-Kullberg ym. 2023.)



Kuva 2. Vasta-ainetitterimääritys putkitekniikalla.

Kuvassa 2 on nähtävillä titterimääritykseen putkitekniikalla tarvittavat reagenssit ja tarvikkeet putkitekniikalla. Kuvassa näkyy primäärinäyte sekä lasiputket laimennossarjaa ja titterimääritystä varten. Takana olevat lasiputket on tarkoitettu laimennossarjalle eli näihin putkiin pipetoidaan näytettä ja laimenninta. Edessä oleviin lasiputkiin pipetoidaan laimennettu näyte sekä testipunasolut ja näistä putkista luetaan muodostuneet reaktiot.

Putkitekniikka on hidas ja työläs tekniikka ja se sitoo paljon työvoimaa. Putkitekniikassa on aina myös suurempi riski inhimillisille virheille sekä tulostason vaihtelulle. Putkitekniikassa suorittamiseen vaaditaan vankkaa kokemusta ja ammattitaitoa sekä kattavaa perehdytystä, jotta tuloksia voidaan pitää luotettavina. (Sulin 2023.)

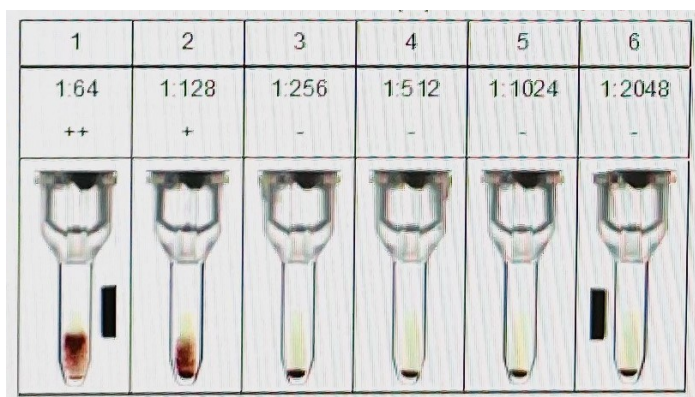
2.3.2 Geelikorttitekniikka

Geelikortti- eli pylväsagglutinaatiotekniikka perustuu punasolujen kulkeutumiseen geelikorteissa olevien mikropylväiden läpi. Mikropylväiden ylempää osaa, johon näytteet pipetoidaan, kutsutaan reaktiokammiksi, ja pylvään kapeassa ja pidemmässä osassa sijaitsee geeli, jonka läpi punasolut liikkuvat sentrifugoitaessa. (Green & Slayten & Rhees 2019: 269.) Sentrifugoinnin aikana punasolut kulkeutuvat väliainepatsaan eli geelin läpi pylvään pohjaa kohti. Agglutinaatio muodostuu, mikäli antigeenille spesifinen vasta-aine löytyy tutkittavasta näytteestä, jolloin punasoluagglutinaatio jää näkyviin pylvään geelin pinnalle. Muodostunut agglutinaatio voi olla selkeä kerros geelin pinnalla tai agglutinaatio saattaa hajota siten, että punasoluja on koko geelin matkalta. Jos

näytteestä ei löydy antigeenille spesifistä vasta-ainetta, punasolut eivät agglutinoidu ja laskeutuvat pylvään pohjaan asti. (Ekblom-Kullberg ym. 2023.)

Veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimuksien tuloksissa geelikortti- eli pylväsagglutinaatiomenetelmällä tulkitaan reaktivoimakkuuksia eli muodostuneita agglutinaatioita. Reaktivoimakkuus riippuu vasta-aineen pitoisuudesta ja sitoutumisvoimasta sekä punasoluantigeenin määrästä. Reaktivoimakkuuteen voi lisäksi vaikuttaa inkubaatio- ja sentrifugointiolosuhteet, minkä vuoksi pylväsagglutinaatiomenetelmissä valmistajan ennalta määrittelemät sentrifugointiaika ja -nopeus parantavat reaktiotulosten toistotarkkuutta. Tulokset luetaan yleensä paljain silmin vaaleaa taustaa vasten. Negatiivisessa reaktiossa (-) kaikki solut ovat selvänä nappina väliainepatsaan pohjalla. Sulkuihin merkitty plusmerkki ((+)) kuvaa reaktioita, jossa väliainepatsaan pohjalla oleva punasolunappi ei ole tasainen ja punasolunapin päälle voi nousta yksittäisiä agglutinaatteja. Yhden plusmerkin (+) vahvuisessa reaktiossa agglutinaatit nousevat väliainepatsaan pohjalta ylöspäin, eivätkä ole enää kokonaan väliainepatsaan pohjalla, mutta ovat kuitenkin väliainepatsaan puolivälin alapuolella. Kahden plusmerkin (++) vahvuisessa reaktiossa agglutinaatteja on koko väliainepatsaan alueella, mutta pylvään pohjalla voi olla pieni punasolunappi. Kolmen plusmerkin (+++) vahvuisessa reaktiossa agglutinaatit ovat väliainepatsaan puolivälin yläpuolella, eikä pylvään pohjalla ole vapaita soluja. Neljän plusmerkin (++++) vahvuisessa reaktiossa kaikki solut ovat selvästi väliainepatsaan päällä. (Ekblom-Kullberg ym. 2023.)

Kuvassa 3 on IH-500-automaatin ottama kuva geelikortin pylväistä, joissa titterimäärityksen reaktiot ovat tapahtuneet. Pylväissä 3–6 on nähtävillä pylvään pohjaan asti laskeutuneet punasolut eli näiden pylväiden kohdalla kyseessä on negatiivinen tulos. Pylväissä 1 ja 2 on nähtävillä positiiviset reaktiot, mutta reaktiot eroavat toisistaan. Pylväessä 1 on kahden plusmerkin vahvuinen reaktio eli vahvempi positiivinen reaktio kuin pylväessä 2. Pylväessä 2 on nähtävillä yhden plusmerkin vahvuinen reaktio.



Kuva 3. Bio-Radin IH-500-automaatin ottama kuva geelikortin pylväistä, joissa reaktiot ovat tapahtuneet.

Osassa geelikorteista väliainepatsas eli geeli sisältää valmiiksi jotakin reagenssia puskurin lisäksi, kun taas joissakin määryyksissä käytetään geelikorttia, johon ei ole lisättyä mitään reagenssia (Ekblom-Kullberg ym. 2023). Vasta-ainetitterimääritys geelikortteilla on epäsuora agglutinaatiomenetelmä, jota käytetään, kun halutaan selvittää näytteen IgG-luokan vasta-aineiden pitoisuus. Tällöin määryykseen käytetään LISS/Coombs-geelikorttia, sillä kortti sisältää tarvittavaa AHG-reagenssia sekä LISS-liuosta. (Vasta-ainetitteri ja plasman DTT-käsittely 2022.) LISS-liuosta (Low Ionic Strength Solution) käytetään vasta-aineiden ja punasolujen välisten reaktioiden voimistamiseen, koska liuos vähentää punasolujen pintavarausta ja vasta-aineet pääsevät tarttumaan tehokkaammin (Chaffin 2023). Geelikorttitekniikka LISS/Coombs-geelikortteilla eroaa siis putkitekniikasta siten, että näkyvän agglutinaation aikaansaama antiglobuliinireagenssi on LISS/Coombs-geelikorttien pylväissä valmiiksi, eikä sitä tarvitse erikseen lisätä. Lisäksi käytettävä titrauslaimennin on eri putkitekniikassa ja geelikorttitekniikassa. Geelikorttitekniikalla pystytään suorittamaan titterimääritys myös suoralla agglutinaatiomenetelmällä. Tällöin geelikorttina toimii NaCl/entzyme-geelikortti, jossa ei ole AHG-reagenssia lisättynä. Tällä menetelmällä saadaan selville näytteen IgM-luokan vasta-aineiden pitoisuus, sillä IgM-luokan vasta-aineet pystyvät kiinnittymään punasoluihin ja luomaan näkyvän agglutinaation ilman AHG-reagenssia. (Vasta-ainetitteri ja plasman DTT-käsittely 2022.)

Vasta-ainetitterimäärityksen suorittaminen geelikorttitekniikalla sujuvoittaisi määrytyksen tekoa, sillä geelikorttitekniikan voi automatisoida. Automatisoitu menetelmä olisi todennäköisesti myös tarkempi, eivätkä tulokset olisi riippuvaisia työn tekijästä. (Lieberman ym. 2021.) Vasta-ainetitterimenetelmän automatisoinnista geelikortille ei kuitenkaan ole vielä tehty kattavaa tutkimusta. Schneiderin ym. (2022) tekemän tutkimuksen

kohteena on ollut vasta-ainetitterimenetelmän automatisointi, mutta tässä tutkimuksessa ei tutkittu menetelmän automatisointia geelikortilla. Tutkimuksessa automatisoitu menetelmä perustui kiinteän faasin tekniikkaan, jossa hyödynnetään mikroliuskoja tai -levyjä, joissa on useita pieniä testikuoppia, ja nämä testikuopat sisältävät jo valmiiksi tarvittavat reagenssit tutkimusta varten.

3 Validointi

Validointi tarkoittaa menettelyä, jolla arvioidaan menetelmän tai laitteen soveltuvuutta tai suorituskykyä tiettyyn käyttötarkoitukseen (Labquality 2022). Validoinnille asetetaan tietyt vaatimukset menetelmän ja käyttötarkoituksen mukaan. Kun validoidaan menetelmää, tehdään ennalta suunniteltuja testejä, joiden avulla määritetään valittujen validointiparametrien arvot. Tilastollisten menetelmien avulla voidaan tunnistaa ne menetelmän kohdat, jotka ovat tuloksen luotettavuuden kannalta kriittisiä. Ennen menetelmän tai laitteen käyttöönottoa validoinnin tulee olla hyväksytty ja johtopäätökset validoinnista tulee olla tehty. Tarvittavan validoinnin laajuus voi vaihdella sen mukaan, onko käytöön otettava menetelmä aivan uusi vai onko kyseessä menetelmä, joka on jo käytössä kansallisesti tai kansainvälisesti. (Hägg 2016: 3.)

3.1 Validoinnin parametrit

Validoinnissa käytettäviä parametreja on useita. Validoinnissa voidaan mitata esimerkiksi herkkyyttä, erottelukykyä, täsmällisyyttä ja toistettavuutta. Herkkyys kuvaa menetelmän kykyä todeta vähäiset vaihtelut määritettävien analytyttien pitoisuuksissa ja erottelukyvyyssä selvitetään pienin mitattavan suureen muutos, joka aiheuttaa havaittavan muutoksen vastaavassa suuressa. Täsmällisyys eli tarkkuus kuvaa niiden mitattujen arvojen yhtäpitävyyttä, jotka on saatu toistomittauksilla tutkittaessa samaa tai samankaltaisia kohteita hyvin määritellyissä olosuhteissa. Toistettavuus on osa mittauksen täsmällisyyttä. (Hägg 2016: 20–21, 31–32.) Eli kun määritetään menetelmän tarkkuutta, ollaan kiinnostuneita menetelmän kyvystä tuottaa johdonmukaisia tuloksia. (Pursula 2022: 105.)

Edellä mainittujen parametrien lisäksi validoinnissa voidaan suorittaa myös vertailua. Vertailua käytetään yleensä testeissä, jotka antavat laadullisia eli kvalitatiivisia tuloksia. Kun vertaillaan mittausmenetelmiä, voidaan tehdä vertailuja esimerkiksi samaa testiä

suorittavien laitteiden tai eri menetelmän välillä. Kvalitatiivisten testien vertailulla yritetään selvittää vertailun kohteena olevien mittausmenetelmien välistä sopivuutta. Vertailussa voidaan pohtia, kuinka paljon tulosten odotetaan muuttuvan, kun vaihdetaan yhden menetelmän käytöstä toiseen menetelmään. (Pursula 2022: 84–85.)

3.2 Toistettavuus

Osa menetelmän validointia on varmistaa menetelmän käyttökelpoisuus eli tarkkuus ja täsmällisyys. Menetelmän toistettavuus tarkoittaa täsmällisyyttä eli menetelmän kykyä tuottaa samat tulokset, kun määrittäminen tehdään toistettavissa olosuhteissa tietyllä, yleensä lyhyellä, aikavälillä. (Hiltunen ym. 2011.) Toistettavuutta arvioitaessa on tarpeen arvioida kokonaistoistettavuuden lisäksi sarjojen sisäistä sekä sarjojen välistä toistettavuutta. (Chesher 2008). Toistettavuuden määrittämisessä näytteistä tehdään useita rinnakkaismäärittäyksiä ja määrittäyksen tuloksista lasketaan yleensä keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Saatujen tuloksien perusteella tehdään johtopäätöksiä menetelmän toistettavuudesta. Mikäli sarjojen välinen hajonta on suurta, syy vaihteluun täytyy selvittää. (Hiltunen ym. 2011.)

Toistettavuuden määrittämisessä voidaan hyödyntää varianssianalyysia (ANOVA). Varianssianalyysia käytetään, kun tutkitaan eroavatko kahden tai useamman ryhmän keskiarvot tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. (Tietoarkisto.) ANOVA-menetelmässä tarkastellaan toistettavuutta määrittäyksen sisällä, toistettavuutta eri määrittäyksen välillä ja toistettavuutta määrittäyksen välillä eri päivinä. Näiden kolmen komponentin avulla saadaan arvio laboratorion sisäisestä tarkkuudesta, joka kuvaa mittauksarkkuutta käytössä olevilla olosuhteilla. (Pursula 2022: 105–107.)

3.2.1 Sarjojen sisäinen toistettavuus

Sarjojen sisäisellä toistettavuudella tarkoitetaan saman mitattavan suureen peräkkäisten mittaus tulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset suoritetaan samoissa mittausolosuhteissa toistettavuusehtojen täytyessä (Chesher 2008). Sarjan sisäinen toistettavuus kertoo siis, kuinka hyvin menetelmä voidaan toistaa samanlaisissa olosuhteissa saman mittausarjan aikana (Hägg 2016: 44). Tämän avulla saadaan pienin epätarkkuus, jonka määrittäminen voi saavuttaa rutiinikäytännössä tietyllä pitoisuudella.

Mahdollinen tulosten vaihtelu johtuu yleensä instrumentin sisällä tapahtuvista satunnaisista asioista, kuten pipetoitujen näytteiden ja reagenssien tilavuuksien vaihtelusta. (Pursula 2022: 105.)

3.2.2 Sarjojen välinen toistettavuus

Sarjojen välinen toistettavuus kuvaa tulosten yhtäpitävyyttä, kun yksittäiset määriykset suoritetaan samassa laboratoriossa eri olosuhteissa. Sarjojen väliseen toistettavuuteen voivat vaikuttaa esimerkiksi eri tekijä tai erilainen ympäristö. Näytteitä tutkitaan menetelmän kannalta oleellisesti, esimerkiksi eri päivinä. (Chesher 2008.)

Tulosten vaihtelu eri sarjojen välillä voi johtua esimerkiksi käyttöolosuhteiden muutoksista. Laite voi esimerkiksi olla lämpimämpi iltapäivällä kuin aamulla. Tulokset voivat vaihdella myös eri päivien välillä, esimerkiksi kosteusmuutosten vuoksi. (Pursula 2022: 106.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää vasta-ainetitterimäärityksen toistettavuus geelikorttitekniikalla veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla. Validoinnin osa-alueita eli toistettavuutta analysoitiin käyttämällä kahta pitoisuudeltaan erilaista kaupallista anti-D-vakiota sekä vasta-aineellisia plasmanäytteitä.

Tavoitteena on, että opinnäytetyön avulla saatuja tuloksia hyödynnetään yhtenä osana Veripalvelun laajempaa validointiprosessia. Tuloksia tullaan hyödyntämään validoinnin arvioimisessa ja sen kehittämisessä. Veripalvelun suorittamalla validoinnilla osoitetaan neuvolanäytteiden vasta-ainetitterimenetelmän toimivuus sekä geelikorttitekniikalla manuaalisesti että IH-500-laitteella. Lisäksi määritetään uusi kliinisesti merkitsevä titteritaso, jota käytetään tutkittavien ohjaamiseen erikoissairaanhoidon. Vasta-ainetitterimenetelmän validoinnista geeliteknikalle on irrotettu omaksi osaksi vasta-ainetitterimenetelmän toistettavuuden osoittaminen, joka oli tämän opinnäytetyön aiheena.

Opinnäytetyö pyrki vastaamaan seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

1. Ovatko automatisoidulla geelikorttitekniikalla saadut vasta-ainepitoisuudet toistettavia?

2. Sopiiko veriryhmäserologinen IH-500-analysointilaitteisto rutiininomaiseen vasta-ainetitterimääritykseen?

5 Opinnäytetyön menetelmät ja opinnäytetyön toteutus

5.1 Menetelmälliset lähtökohdat

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin perehtymällä Bio-Radin veriryhmäserologiseen IH-500-laitteeseen ja käytössä oleviin menetelmiin SPR Veripalvelun laboratoriossa. Veriryhmäserologista IH-500-analysointilaitteistoa käytetään titterimäärityksien lisäksi muihinkin tutkimuksiin, kuten veriryhmämäärityksiin ja vasta-aineiden tunnistukseen. Laite on pääasiassa käytössä vain Veripalvelun potilaslaboratoriossa, jossa sitä käytetään sairaaloista saapuvien potilasnäytteiden määrityksissä. IH-500-analysointilaitteen menetelmäperiaatteena on pylväsagglutinaatio geelikorteilla ja laite suorittaa kaikki työvaiheet täysin automaattisesti. IH-500-analysointilaitteisto valmistaa tarvittavan solususpension, pipetoi tarvittavat materiaalit, inkuboi ja sentrifugoi geelikortit sekä lopuksi tulkitsee reaktiovoimakkuudet. Vasta-ainetitterimäärityksessä IH-500-analysointilaitteisto tekee tutkittavasta näytteestä laimennossarjan, jossa jokaisen laimennoksen annetaan reagoida spesifisten testipunasolujen kanssa. Lopuksi laite tulkitsee tulokset geelikorteilta. (Veriryhmäserologinen IH-500-analysointilaitteisto 2023.) Laitteen tekemä yksi titterimääritys kestää noin 40 minuuttia (Vasta-ainetitteri ja plasman DTT-käsittely 2022).

IH-500-laitteella titterimäärityksen reagensseina toimii Bio-Radin Titration Solution sekä Veripalvelun itse valmistamat reagenssipunasolut, joissa on vasta-aineille vastaavat punasoluantigeenit. (Veriryhmäserologinen IH-500-analysointilaitteisto 2023.) Reagenssipunasolut ovat Veripalvelun itse valmistamia ja ne valmistetaan vakioverenluovuttajien punasoluista, joiden fenotyyppi on tarkkaan tiedossa. Titterimäärityksen reagenssipunasolut on valittu vasta-ainekohtaisesti siten, että jokainen testisolu reagoi vain yhden vasta-aineen kanssa, esimerkiksi anti-D-vasta-aineelle reagenssipunasoluna toimii R1r-testisolu. Validoinnissa tätä reagenssipunasolua käytettiin anti-D-vakioiden sekä anti-D:tä sisältävän plasmanäytteen määrityksessä. Muille vasta-aineellisille plasma-näytteille oli omat spesifit reagenssipunasolut. Titterimääritykseen tarvittiin lisäksi Bio-Radin Titration Racks -telineitä. Yksi teline sisältää 60 tyhjää kaivoa, joihin laite pipetoi näytettä ja Titration Solution -liuosta näytteen laimentamista varten (Veriryhmäserologinen IH-500-analysointilaitteisto 2023). Tässä validoinnissa käytettiin ainoastaan epäsuoraa

antiglobuliinimenetelmää, joten määrittäisiin käytettiin Bio-Radin LISS/Coombs-geelikortteja.

Toistettavuuden osoittamisessa on suositeltavaa määrittää toistettavuus vähintään kahdella eri tasolla: matalalla ja korkealla. Toistettavuutta kuvaavat myös keskihajonta ja variaatiokerroin. Keskihajonta on matemaattinen vakio, joka saavuttaa arvonsa, kun kertoma on yli 25. Validoinnissa suosituksena on tehdä ainakin kaksi sarjaa päivittäin ja kaksi rinnakkaismäärittystä näytettä kohden. Tällöin tulosten laskennassa on mahdollista hyödyntää ANOVA-laskentaa. (Tutkimusmenetelmien verifiointi ja validointi 2023.) Koska anti-D-vakioiden määrittäminen tehtiin viitenä erillisenä päivänä ja viisi kertaa päivässä käyttäen kahta erillistä tasoa eli vahvaa ja heikkoa anti-D-vakiota, anti-D-vakioiden tulosten laskennassa hyödynnettiin ANOVA-laskentaa. ANOVA-laskennan avulla pystyttiin erittelemään aineistosta sarjan sisäinen, päivän sisäinen, päivien välinen ja laboratorion sisäinen toistettavuus.

Laitteelta saatujen hyväksytyjen tuloksien kirjaamisessa käytettiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaa, jossa laskettiin keskiarvo päivän tuloksista. Lisäksi tuloksista otettiin tulosteita, jotka muutettiin myös digitaaliseen muotoon. Excel-taulukkoon kerätyt tulokset siirrettiin Validation Manager -ohjelmistopalveluun (Finbiosoft, v2023.10.25), joka on käytössä SPR Veripalvelun laboratoriossa. Validation Manager -ohjelmaan on automatisoitu laboratoriomenetelmien ja -instrumenttien tarkastukset, validoinnit ja verifiointit. Ohjelma laskee annettujen arvojen perusteella validoinnin tilastollisia analyysiarvoja ja muodostaa lopuksi kirjallisen raportin validoinnin tuloksista. (Pursula 2022.) Validation Manager- ohjelman avulla laskettiin anti-D-vakioiden tilastolliset analyysiarvot ANOVA-menetelmällä. Kaikkia saatuja tuloksia analysoitiin myös visuaalisesti ja vertailtiin aikaisempia manuaalisesti saatuja tuloksia samoista näytteistä. Uusia tuloksia ja aikaisemmin saatuja tuloksia verrattiin keskenään.

5.2 Aineiston keruu ja analysointi

Kaikki tutkimukseen tarvittavat näytteet saatiin SPR Veripalvelulta. Näytteinä toimi kaksi pitoisuudeltaan erilaista kaupallista anti-D-vakiota: anti-D 0,05 IU/ml, AlbaCheck, Quotient ja anti-D 3,1 IU/ml, 3rd British Standard 2017 (Rho) Antibodies, NIBSC code 73/517. AlbaCheck-vakio on käyttövalmis liuos, mutta 3rd British Standard tuli laimentaa käyttöpitoisuuteen. Laimennettu käyttöpitoisuus oli 2,875 IU/ml. Veripalvelun koke-

neet laadunvalvontatutkimusten työntekijät olivat ennen opinnäytetyöhön liittyvän tutkimuksen aloitusta laimentaneet vakion valmiiksi ja pakastaneet sen $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen. Vakio oli jaettu viiden millilitran eriin ja viiteen erilliseen näyteputkeen. AlbaCheck, Quotient-vakio säilytettiin jääkaapissa valmistajan omassa näytepulloissa, josta otettiin suoraan tarvittava määrä validoinnin määrittämisä varten.

Tutkimuksessa analysoitiin myös vasta-aineellisia plasmanäytteitä. Nämä näytteet olivat peräisin verenluovuttajilta ja näytteet olivat useita kymmeniä vuosia vanhoja. Näytteet oli säilytystä varten jaettu useampiin erikokoisiin näyteputkiin ja niitä on säilytetty Veripalvelussa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Näytteiden kokonaismäärä vaihteli näytekohtaisesti, mutta validointia varten näytteistä sulatettiin vain pieni osa, esimerkiksi yksi 10 millilitran putki. Plasmanäytteitä oli viisi erilaista ja nämä kaikki sisälsivät eri vasta-ainetta. Jokainen plasmanäyte sisälsi vain yhtä vasta-ainetta ja jokaisen näytteen vasta-aine oli tiedossa. Plasmanäytteissä olevia vasta-aineita olivat Rh-veriryhmäjärjestelmään kuuluvat anti-D ja anti-E sekä lisäksi muiden veriryhmäjärjestelmien anti-Fya, anti-Jka ja anti-K. Kaikkia pakastettuja näytteitä sulatettiin lämpöhauteella $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa noin puoli tuntia. Sulatusaika ei ollut vakioitu.

Sekä anti-D-vakioista että vasta-aineellisista plasmanäytteistä oli määritetty aikaisemmin vasta-ainetitterit putki- ja korttitekniikalla manuaalisesti. Anti-D-vasta-aineellisesta plasmanäytteestä oli määritetty lisäksi myös kvantitatiivisesti vasta-aineen pitoisuus (IU/ml). Manuaalisen määrittämisen testitulokset ja tulokset oli tallennettu validoinnin taustatiedoksi sekä kirjallisena että sähköisenä versiona.

Geelikorttitekniikassa laimennossarja titterimäärittäystä varten tehdään kuten putkitekniikassa, mutta näytteen laimentamiseen käytetään Bio-Radin Titration Solution -liuosta. Geelikorttiin merkitään tunniste tutkittavasta näytteestä ja merkitään kaivot joko laimennuskertoimilla (1,2,4,8...) tai numeroilla 1–12. Pipetointi aloitetaan testisoluista, joita pipetoidaan jokaiseen kaivoon $50\text{ }\mu\text{l}$. Testisolujen päälle pipetoidaan $25\text{ }\mu\text{l}$ plasmaa niin, että ensimmäiseen kaivoon tulee laimentamatonta plasmaa ja loppuihin laimennussarjan mukaisesti laimennettua plasmaa. Kortteja inkuboidaan 15 minuuttia $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, minkä jälkeen niitä sentrifugoidaan 10 minuuttia. Veriryhmäserologinen IH-500-analysaattori suorittaa kaikki edellä mainitut vaiheet itsenäisesti. Kun tulokset eli reaktiivomakkuudet ovat valmiit, IH-500-analysaattori ottaa kuvat tuloksista. IH-500-analysaattori tulkitsee itse reaktiivomakkuudet ja antaa näille tulokset. Tulokset voivat olla epä-

selviä, negatiivisia tai jotakin yhden ja neljän plusmerkin väliltä. Kun IH-500-analysaattori on saanut tulokset tulkittua, se tuo tulokset nähtäville laitteen käyttäjälle. Laitteen käyttäjän on tarkistettava tuloksien todenmukaisuus ja tehdä tarvittaessa muutoksia. Tulokset täytyy lopuksi hyväksyä laitteen käyttäjän toimesta.

5.3 Opinnäytetyön toteutus

Toteutusvaiheeseen kuului viisi erillistä päivää, joiden aikana ajettiin anti-D-vakioita sekä vasta-aineellisia plasmanäytteitä. Anti-D-vakioiden kohdalla näytteitä ajettiin jokaisena viitenä päivänä viisi kertaa siten, että määritykset olivat erillisiä ja mahdollisuuksien mukaan päivän eri ajankohtina: aamulla, päivällä ja illalla. Plasmanäytteitä määritettiin neljän päivän aikana yhteensä kuusi kertaa ja analysointi suoritettiin aina anti-D-vakioiden määrityksien välissä. Taulukossa 1 on esitetty toteutusvaiheen päivät ja miten näytteiden määritys jakautui eri päiville. Kaikista näytteistä tehtiin pitkä titteri eli laimennokset 1:1–1:2000. Pitkässä titterissä on siis 12 laimennosta. Titterimäärityksen tuloksena saatiin reaktiivoimakkuuksia, joiden perusteella titteritaso todettiin. Nämä reaktiot olivat tutkittavan näytteen laimennoksien ja reagenssipunasolujen aiheuttamia agglutinaatioreaktiota.

Taulukko 1. Taulukko opinnäytetyön toteutuksen päivistä, joiden aikana näytteitä määritettiin.

Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4	Päivä 5
5 x vakiot	5 x vakiot 2 x plasmat	5 x vakiot 2 x plasmat	5 x vakiot 1 x plasmat	5 x vakiot 1x plasmat

Vasta-aineelliset plasmat sekä valmiiksi käyttöpitoisuuteen laimennettu 3rd British Standard anti-D-vakio olivat pakastettuja näytteitä, joten näytteet täytyi aluksi sulattaa lämpöhauteella +36–37 °C:ssa. Näytteiden sulatukselle ei ollut vakioitu sulatusaika, mutta kaikki sulatettavat näytteet olivat lämpöhauteella yhtä kauan. Näytteiden sulatuksen meni aikaa noin puoli tuntia. Sulatetut näytteet sentrifugoitiin vielä ennen analysointia. Sentrifugointiohjelma kesti viisi minuuttia ja nopeudeksi asetettiin 2100 g:tä. Tämän jälkeen jokaista määritettävää näytettä pipetoitiin omaan wasserman-lasiputkeen yhden päivän titterimääritykseen tarvittava määrä, sillä näytteiden määritykset tehtiin päiväkohtaisesti aina samasta näyteputkesta. Yhden päivän titterimääritykseen tarvittava määrä oli noin kolme millilitraa. Päivän vaihtuessa vaihdettiin myös näyteputket.

Jokaiseen näyteputkeen tehtiin tarkkaan omat tunnistetiedot. Tunnisteesta täytyi käydä ilmi määrittäminen, kuinka mones määrittäminen oli kyseessä ja onko kyseessä esimerkiksi vahva vai heikko anti-D tai jokin muu vasta-aine plasmanäytteessä. Esimerkiksi ensimmäisen määrittämissäytteen ensimmäisen määrittäksen tunniste vahvalla vakiolla oli 1anti-Dvahva_1.

Määrittästä varten laitteelle lisättiin titterimäärittästä varten tarvittavat reagenssit: Titration Solution -liuos, oikeat reagenssipunasolut, Titration Racks -telineet ja LISS/Coombs-geelikortteja. Näytteille tehtiin IH-500-laitteeseen liitetyn tietokoneaseeman kautta pyynnöt pitkään titterimäärittäykseen. Näytteet asetettiin IH-500-laitteen omiin näytetelineisiin ja syötettiin laitteelle. Laite luki syötetyn näytteen tunnisteen ja aloitti määrittäksen suorittamisen sille tehdyn pyynnön mukaan. Mikäli laitteelta puuttui jokin määrittäykseen tarvittava reagenssi, laite antoi siitä ilmoituksen, eikä aloittanut määrittäksen tekoa.

Kun määrittäminen oli valmis, laite otti kuvan geelikorttien kaivoista, joissa reaktiot olivat tapahtuneet ja tulkitse reaktioiden voimakkuudet asteikolla +, ++, +++, ++++ tai negatiivinen eli -. Epäselvissä tilanteissa laite ei välttämättä pysty tulkitsemaan tulosta luotettavasti, jolloin tulos jää epäselväksi ja laite antaa arvoksi "?". Titterimäärittäyksessä tulos luetaan aina suurimmasta laimennoksesta pienempään päin. Viimeinen laimennos, joka antaa yhden +-merkin vahvuisen reaktion, on määrittäksen tulos. Vasta-ainepitoisuudeksi ilmoitetaan tämän laimennossuhteen käänteisluku: esimerkiksi laimennussuhteen 1:16 käänteisluku on 16. Tulos ei saa kuitenkaan olla suurimman eli laimennosarjan viimeisen laimennoksen kohdalla, vaan yhden +-vahvuisen reaktion jälkeen tulee olla negatiivinen tulos luettavissa. Mikäli viimeisessä laimennoksessa on yhden +-vahvuinen reaktio, näytettä täytyy laimentaa lisää ja titterimäärittäminen suoritetaan uudelleen.

Vaikka IH-500-analysointilaitteet tulkitse määrittäksien reaktiivoimakkuudet itsenäisesti, ne hyväksytään lopullisesti vasta, kun ihminen on tarkastanut tulokset. Laitteen käyttäjä käy läpi laitteen tulkitsemat reaktiivoimakkuudet ja tekee tarvittaessa muutoksia oman tulkintansa mukaan. Verensiirto- ja veriryhmäserologien tutkimuksien reaktiivoimakkuuksia tulkittaessa täytyy aina huomioida, onko reaktion voimakkuudella väliä vai keskitytäänkö erottamaan positiiviset reaktiot negatiivisista. Titterimäärittäyksessä reaktion voimakkuudella on väliä, sillä tarkoituksena on erottaa viimeinen +-reaktio. Tämän validoinnin aikana laitteen tulkitsemia tuloksia täytyy muokata vain muutaman kerran. Laite ei osannut tulkitse heikompia reaktioita, jolloin tuloksia jäi epäselviksi ja ne täytyi korjata.

Saatujen anti-D-vakioiden titteritulokset kirjattiin päivittäin Excel-laskentataulukko-ohjelmaan. Ohjelmaan oli luotu valmiiksi taulukko anti-D-vakioiden tuloksille. Molemmille vakioille oli oma taulukko, jossa oli sarakkeet eri päiville sekä rivit päivän eri määrittämisille. Taulukon viimeiselle riville oli asetettu kaava laskemaan päiväkohtaisesti tuloksien keskiarvo. Lisäksi laitteen antamista tuloksista otettiin tulosteet, jotta laitteen tulkitsemia reaktiivoimakkuuksia päästiin tarkastelemaan myöhemmin. Plasmanäytteiden tuloksille ei ollut omaa Excel-tilukkoa, vaan laitteen antamat tulokset ainoastaan tulostettiin. Kaikki tulosteet tallennettiin myös digitaaliseen muotoon.

6 Tulokset

IH-500-analyssaattorilla saatuja tuloksia plasmanäytteistä sekä anti-D-vakioista verrattiin aiemmin manuaalisesti putkitekniikalla ja korttitekniikalla saatuihin tuloksiin. Manuaaliset määrittäykset on tehty validoinnin alkuvaiheessa vuoden 2022 puolella. Manuaalisesti tehtyjen määrittäyksien tulokset oli kirjattu Veripalvelun käyttämälle vasta-aineiden testauslomakkeelle. Lomakkeelle oli merkitty titterimäärittäykseen tarkoitettuun taulukkoon saadut reaktiivoimakkuudet jokaisen laimennoksen kohdalle. Testauslomake oli paperidokumentti, mutta se oli tallennettu myös sähköiseen muotoon.

6.1 Anti-D-vakioiden toistettavuus

Anti-D-vakioiden tuloksia käsiteltiin ANOVA-menetelmällä. Vakioiden kohdalla keskityttiin määrittäyssarjojen sisäiseen ja sarjojen väliseen toistettavuuteen, kun tarkasteltiin viittä erillistä määrittäystä viitenä erillisenä päivänä. Saman päivän aikana tehdyillä viidellä erillisellä määrittäyksellä tutkittiin sarjan sisäistä toistettavuutta. Viitenä erillisenä päivänä tutkittiin sarjojen välistä toistettavuutta. Koska vakioiden pitoisuudet olivat tiedossa, määrittäyksien avulla selvitettiin, kuinka toistettavasti ja täsmällisesti IH-500-analyssaattori suorittaa määrittäykset. Anti-D-vakioiden kohdalla täytyi myös tarkistaa validointisuunnitelmassa määrittettyjen hyväksymiskriteerien toteutuminen. IH-500-analyssaattorilla saadut tulokset anti-D-vakioista todettiin toistettaviksi jokaisella määrittäyskerralla. Anti-D-vakioiden määrittäyksissä tuloksissa ei ollut vaihtelua lainkaan, vaan jokaisella määrittäyskerralla saatiin täysin sama tulos molemmilla vakioilla.

Taulukko 2. IH-500-analysaattorilla saadut titteritulokset heikolla anti-D-vakiolla (AlbaCheck, Quotient 0,05 IU/ml).

Määrittyskerta	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4	Päivä 5
1	4	4	4	4	4
2	4	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4
5	4	4	4	4	4
keskiarvo	4	4	4	4	4

Taulukossa 2 on esitetty Bio-Radin veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla saadut tulokset heikosta anti-D-vakioista (0,05 IU/ml). Heikon anti-D-vakion tulokseksi IH-500-analysaattorilla saatiin 4. Niin kuin taulukosta on nähtävillä, tulos oli jokaisella määrittyskerralla sama, jolloin tuloksien keskiarvoksi saatiin 4. Manuaalisesti määritettynä heikon anti-D:n (0,05 IU/ml) tulos oli putkitekniikalla 1 ja korttitekniikalla 2.

Taulukko 3. IH-500-analysaattorilla saadut titteritulokset vahvalla anti-D-vakiolla (3,1 IU/ml, 3rd British Standard 2017, käyttöpitoisuus 2,875 IU/ml).

Määrittyskerta	Päivä 1	Päivä 2	Päivä 3	Päivä 4	Päivä 5
1	128	128	128	128	128
2	128	128	128	128	128
3	128	128	128	128	128
4	128	128	128	128	128
5	128	128	128	128	128
keskiarvo	128	128	128	128	128

Taulukossa 3 on nähtävillä vahvan anti-D-vakion (2,875 IU/ml) tulokset veriryhmäserologisella IH-500-analysaattorilla. Vahvan anti-D-vakion tulos oli IH-500-analysaattorilla määritettynä 128. Tulos toistui jokaisella määrittyskerralla ja tuloksien keskiarvoksi saatiin 128. Manuaalisesti määritettynä vahvan anti-D-vakion (2,875 IU/ml) tulos oli putkitekniikalla 16 ja korttitekniikalla 64.

Precision	Mean	Between-Run		Between-Day		Within-Laboratory	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Result	128	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)
Goals			10%		10%		10%

Precision	Mean	Between-Run		Between-Day		Within-Laboratory	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Result	4.00	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)	0 Qualitative result (0 – 0 Qualitative result)	0% (0% – 0%)
Goals			10%		10%		10%

Kuva 4. Kuva anti-D-vakioiden tilastollisista analyysiarvoista Validation Manager -ohjelmasta. Ylempänä vahvan anti-D-vakion (2,875 IU/ml) tulokset ja alapuolella heikon anti-D-vakion (0,05 IU/ml) tulokset. (Validation Manager 2023.)

ANOVA-menetelmällä saadut tulokset syötettiin Validation Manager -ohjelmaan, joka laski validoinnin tilastolliset analyysit annettujen arvojen perusteella. Kuvassa 4 on nähtävillä Validation Manager -ohjelmalla saadut tilastolliset analyysiarvot molemmilla anti-D-vakioilla. Koska tulokset anti-D-vakioilla olivat täysin toistettavia, keskihajonnan ja variaatiokertoimen tulokseksi saatiin nolla.

6.2 Vasta-aineellisten plasmanäytteiden toistettavuus

Vasta-aineellisten plasmanäytteiden tuloksissa oli jonkin verran vaihtelua joidenkin vasta-aineiden kohdalla. Taulukossa 4 on esitetty plasmanäytteiden tulokset vasta-ainekohtaisesti sekä manuaalisilla tekniikoilla että IH-500-analysaattorilla tehtynä. Vasta-aineellisia plasmanäytteitä määritettiin kuusi kertaa IH-500-analysaattorilla, mutta manuaalisilla tekniikoilla määritykset on tehty vain kerran kummallakin tekniikalla.

Taulukko 4. Vasta-aineellisten plasmanäytteiden titteritulokset manuaalisesti sekä IH-500-analysaattorilla.

Vasta-aineet	Manuaalinen tekniikka		IH-500-analysaattori
	Putkitekniikka	Kortitekniikka	
anti-D	64	1000	2048
anti-E	8	64	64 tai 128
anti-K	16	128	128 tai 256
anti-Fya	1	8	16
anti-Jka	titteritön	1	1

Anti-K:n tulos IH-500-analysointilaitteella vaihteli 128:n ja 256:n välillä. Kuudesta määrittyskerrasta kolmella saatiin tulokseksi 128 ja lopuilla määrittysillä 264. Manuaalisesti saadut tulokset olivat korttitekniikalla 128 ja putkissa tehtynä 16. Anti-E:n tulos IH-500-analysointilaitteella vaihteli 128:n ja 64:n välillä. Kuudesta määrittyskerrasta neljällä tulokseksi saatiin 128 ja kahdella määrittyskerralla 64. Manuaalisesti kortilla tehtynä tulokseksi anti-E:n kohdalla saatiin 64 ja putkissa tehtynä 8. Anti-Fya:n kohdalla IH-500-analysointilaitteella saatiin tulokseksi jokaisella määrittyskerralla 16 ja manuaalisesti tehtynä kortilla 8 ja putkissa 1. Anti-Jka:n tulos oli IH-500-analysointilaitteella sekä manuaalisesti kortilla 1. Manuaalisesti putkitekniikalla anti-Jka:n tulosta ei saatu lainkaan, vaan ensimmäisen laimennoksen jälkeen tulos oli erittäin heikko (+). Näin heikkoa reaktiota ei voida tulkita tulokseksi titterimäärittämisessä. Anti-D:n tulos IH-500-analysointilaitteella oli jokaisella määrittyskerralla 2048, joka on IH-500-analysointilaitteella tehdyssä määrittämisessä laimennossarjan viimeinen laimennos. Manuaalisesti kortilla anti-D:n tulokseksi saatiin 1000 ja putkissa tehtynä 64.

Taulukko 5. Vasta-aineellisten plasmanäytteiden tulokset IH-500-analysointilaitteella eriteltynä päiväkohtaisesti.

Vasta-aine	Päivä 2		Päivä 3		Päivä 4	Päivä 5
	Määrittys 1	Määrittys 2	Määrittys 3	Määrittys 4	Määrittys 5	Määrittys 6
anti-D	2048	2048	2048	2048	2048	2048
anti-E	128	128	128	128	64	64
anti-K	128	256	128	128	256	256
anti-Fya	16	16	16	16	16	16
anti-Jka	1	1	1	1	1	1

Taulukkoon 5 on eritelty plasmanäytteiden määrittäykset IH-500-analysointilaitteella päiväkohtaisesti. Taulukosta on nähtävillä, kuinka eriävät tulokset vasta-aineittain jakautuivat eri päiville. Anti-K-vasta-aineen kohdalla tulokset vaihtelivat satunnaisesti saman päivän aikana tai päivien vaihtuessa, mutta anti-E-vasta-aineen tulos muuttui vasta kahdena viimeisenä määrittäispäivänä. Vaikka anti-E- ja anti-K-vasta-aineilla saaduissa tuloksissa on vaihtelua, muutokset eivät kuitenkaan ylitä sallittua vaihteluväliä. Koska

vasta-aineellisten plasmanäytteiden analysointi aloitettiin vasta toteutuksen toisena päivänä, taulukkoon 5 on merkitty määritykset alkavaksi päivästä kaksi.

7 Pohdinta

7.1 Tulosten tarkastelu

Tulosten tarkastelu aloitettiin plasmanäytteistä vasta-ainekohtaisesti yksi kerrallaan. Plasmanäytteiden tuloksien tulokinnassa keskityttiin pääasiassa tuloksien vertailuun, mutta ensin tulkittiin laitteelta tulostettuja kuvia tuloksista, joissa näkyi näytteistä saadut reaktivoimakkuudet LISS/Coombs-geelikorteilla. Validointisuunnitelmassa tuloksien hyväksymiskriteereiksi oli määritetty, että tuloksissa on sallittu yhden laimennoksen vaihteluväli. Laitteen antamista tuloksista tarkistettiin, että edellä mainittu vaihteluväli ei ylity, jotta tuloksia voidaan pitää toistettavina. Lisäksi varmistettiin, että laitteen käyttäjän tekemät muutokset reaktivoimakkuuksien tulokinnassa vastaavat todellista reaktiota, sillä IH-500-analysaattori ei osannut tulkita kaikkia tuloksia itsenäisesti. Vaihteluväli ei ylittynyt minkään vasta-aineen kohdalla, joten laitteen antamat tulokset todettiin toistettaviksi jokaisella näytteellä. Reaktivoimakkuudet todettiin myös todenmukaisiksi. Näiden tuloksien perusteella tutkimukselle asetetun tavoitteen menetelmän toistettavuudesta voisi osittain jo todeta täytyneeksi.

Anti-D-vasta-aineellisen plasmanäytteen tuloksia ei kuitenkaan voitu huomioida tässä tutkimuksessa, sillä IH-500-analysaattorilla saadut tulokset kyseisen vasta-aineen kohdalla olivat liian korkeita. Anti-D-vasta-aineellinen plasmanäyte olisi pitänyt laimentaa ennen analysaattorille laittoa, jotta olisi saatu tulkittavia tuloksia. Koska tämä kävi ilmi vasta tuloksien tulkintavaiheessa, määrityksiä ei pystytty suorittamaan enää uudelleen tässä tutkimuksessa.

Plasmanäytteiden kohdalla vertailua tehtiin myös määrityksien välillä, koska plasmanäytteitä määritettiin yhteensä kuusi kertaa neljänä erillisenä päivänä. Tuloksia tarkastellessa vertailtiin, vaihtelivatko tulokset määrityksien välillä päivien vaihtuessa. Anti-K:n kohdalla tuloksissa oli vaihtelua jopa samana päivänä tehdyssä määrityksessä. Muutos ei kuitenkaan ollut merkittävä, vaan titterimäärityksessä sallittu yhden laimennosvoimakkuuden muutos. Myös anti-E-vasta-aineen kohdalla täytyy huomioida laitteella saadut eriävät tulokset, kun kuudesta määrityskerrasta neljällä saatiin 128 ja kahdella 64. Tutkimuksen toteutusvaiheessa plasmanäytteitä määritettäessä validointiin

sulatettu anti-E-vasta-aineellinen plasmanäyte loppui kesken määrytyksien, minkä vuoksi näytettä täytyi sulattaa lisää. Uusi sulatettu näyte oli peräisin samalta luovuttajalta kuin aiempikin, mutta näytettä oli pakastettuna useammassa näyteputkessa. Uudesta sulatetusta näytteestä IH-500-analysaattori antoi eriävän tuloksen kuin aiemmasta näytteestä. Validoinnin hyväksymiskriteeriksi luokiteltu tuloksien vaihteluväli ei kuitenkaan ylittynyt, joten tulosta voitiin pitää toistettavana.

Vertailua suoritettiin myös taustatiedoksi tehtyihin manuaalisiin määrytyksiin. Vasta-aineellisille plasmanäytteille tehtiin vertailua nykyisen ja uuden menetelmän välillä. Lisäksi tulosten analysoinnissa tarkasteltiin kahden menetelmän välistä eroa eri vasta-aineille. Tulosten välisen eron tuli olla saman suuntainen ja titteritason muutos menetelmien ja eri vasta-aineiden välillä tuli saada mahdollisimman luotettavasti selville. Tulosten vertailussa kiinnitettiin huomiota siihen, kuinka paljon IH-500-analysaattorin antamat tulokset erosivat manuaalisilla tekniikoilla saaduista tuloksista. Taulukossa 3 on nähtävillä vasta-aineellisten plasmanäytteiden tulokset sekä manuaalisilla tekniikoilla että IH-500-analysaattorilla tehtynä. Taulukosta on nähtävissä, että näissä tuloksissa oli merkittävä ero. IH-500-analysaattorilla automatisoidulla menetelmällä saadut tulokset olivat huomattavasti korkeampia varsinkin, kun vertailun kohteena olivat putkitekniikalla saadut tulokset. Manuaalisesti korttitekniikalla saadut tulokset sekä IH-500-analysaattorin tulokset olivat lähempänä toisiaan. Huomioitavaa on myös se, kuinka dramaattisia ja epäsäännöllisiä muutokset vasta-ainekohtaisesti ovat. Esimerkiksi anti-Jka:n kohdalla geelikorttitekniikoilla, manuaalisesti sekä IH-500-analysaattorilla saatiin sama tulos, kun taas anti-Fya-vasta-aineen tulokset geelikorttitekniikalla manuaalisesti ja IH-500-analysaattorilla erosivat toisistaan. Koska vasta-aineellisten plasmanäytteiden kohdalla suoritettiin vertailua, ei analysoinnissa hyödynnetty tilastollisia analyysijä.

Anti-D-vakioiden tuloksissa ei ollut vaihtelua lainkaan, vaan jokaisella määrytyksellä saatiin täysin sama tulos molemmilla vakioilla. Anti-D-vakioiden tulokset olivat täsmällisiä ja johdonmukaisia, eikä tulosten tulkinnessa ilmennyt epäselvyyksiä. Anti-D-vakioilla saatujen tuloksien sekä aiemmin mainittujen vasta-aineellisten plasmanäytteiden tuloksien avulla voidaan päätellä, että IH-500-analysaattorilla suoritettu vasta-ainetiterimenetelmä on toistettava.

Tässä tutkimuksessa todettu ero saaduissa tuloksissa putkitekniikan ja geelikorttitekniikan välillä tukee Liebermanin ym. (2021) aikaisempaa tutkimusta, jossa todettiin geelikorttitekniikan olevan putkitekniikkaa huomattavasti herkempi menetelmä. Lieberman

ym. (2021) totesivat tutkimuksessaan, että geelikorttitekniikalla suoritettavat titraukset olivat kaksi laimennosta korkeampia kuin putkitekniikalla tehtynä. Tämä sama tulos toistuu myös tässä tutkimuksessa ja syy eri menetelmien eroavaisuuteen olisi hyvä ymmärtää. Yksi suuri ero putkitekniikan ja geelikorttitekniikan menetelmissä on käytettävä laimennin titteritutkimuksessa: putkitekniikassa käytetään fosfaattipuskuroitua keittosuolaliuosta (PBS) ja korttitekniikassa Bio-Radin Titration Solution -liuosta. Bio-Radin titrausliuoksen sisältämät ainesosat eivät ole julkisesti tiedossa, joten ei voida olla varmoja, mitä kyseinen liuos sisältää. Vaikka eriävät laimennosliuokset voisivat mahdollisesti olla yksi syy tulostason vaihtelulle eri menetelmien välillä, siihen voi vaikuttaa myös LISS/Coombs-geelikorttien kyveteissä oleva LISS-liuos. Joka tapauksessa selvän tulostason nousun vuoksi täytyy vertailla vanhan ja uuden menetelmän tulostason eroa ja pohtia, mikä tulos uudella menetelmällä vastaa vanhalla menetelmällä saatua tulosta. Tärkeä kysymys on myös se, mikä on esimerkiksi uudessa menetelmässä erikoissairaanhoidon vaadittava tulostason raja tai anti-D-kvantitaatioon menevän näytteen raja. Tällä hetkellä määritetyt rajat vastaavat putkitekniikan tulostasoa ja putkitekniikassa esimerkiksi anti-D-kvantitaatioon vaadittava tulos on 16. Tämän tutkimuksen perusteella huomattavasti herkemällä geelikorttitekniikalla tämä tulos saavutettaisiin luultavasti jokaisen anti-D-vasta-aineellisen näytteen kohdalla.

Tuloksien tarkastelussa on otettava huomioon myös automatisoidun menetelmän vaikutus tuloksiin. Liebermanin ym. (2021) tutkimuksessa geelikorttitekniikkaa ei tutkittu automatisoidulla menetelmällä. Titterimäärityksen automatisoinnista on kuitenkin tehty tutkimusta, mutta tutkimuksessa on keskitytty ABO-vasta-aineiden titraukseen ja käytetyt menetelmät eivät ole olleet täysin vertailtavissa. Italiassa tehdyssä tutkimuksessa Schneider ym. (2022) käyttivät tutkimuksessaan täysin eri menetelmiä manuaalisesti ja automatisoidusti. Manuaalisesti titterimääritys tehtiin geelikorttitekniikalla Bio-Radin geelikorteilla ja automatisoidut määritykset suoritettiin Immucorin kiinteän faasin tekniikalla Galileo Neo -laitteella. Kyseinen tutkimus osoitti, että käytetyt menetelmät eivät olleet vastaavia. Tutkimuksen myötä todettiin kuitenkin, että automatisoitu menetelmä antaa toistettavampia tuloksia kuin geelikorttitekniikka manuaalisesti tehtynä. (Schneider ym. 2022.)

Tämän opinnäytetyön myötä on osoitettavissa, että automatisoitu menetelmä eroaa myös manuaalisesta menetelmästä, vaikka käytössä on sama geelikorttitekniikka. Tämän vuoksi on syytä pohtia laitteen ja menetelmän toimivuutta kyseiselle tutkimukselle.

Menetelmän toistettavuus, joka todettiin peräkkäisillä toistomittauksilla tunnetuilla vaki-oilla, tukee IH-500-analysaattorin toimivuutta kyseiselle menetelmälle. Lisäksi IH-500-analysaattorille saatavat reagenssit titterimäärityksille edesauttavat laitteen sopivuutta, sillä määrityksen suorittaminen on hyvin yksinkertaista laitteen käyttäjälle. Määrityksen suorittaminen laitteella vapauttaa myös huomattavasti aikaa muihin työtehtäviin laboratoriossa.

Toisaalta laitteella suoritettavaan määritykseen liittyy myös haasteita. IH-500-analysaattori on hyvin monipuolinen automaatti, jolla voidaan suorittaa monenlaisia veriryhmäserologisia tutkimuksia. SPR Veripalvelun laboratoriossa IH-500-analysaattoreita on kaksi ja näitä hyödynnetään kesään 2023 mennessä jo useamman eri tutkimuksen määrittämiseen. Koska erilaisia määritettäviä tutkimuksia on paljon, se vaatii paljon myös erilaisia reagensseja. Laitteella on kuitenkin reagensseja varten rajallinen määrä paikkoja, joten kaikkiin tutkimuksiin tarvittavat reagenssit eivät välttämättä mahdu laitteelle samanaikaisesti. Tämän vuoksi SPR Veripalvelussa määritettävät tutkimukset on jaettu kahdelle IH-500-analysaattorille siten, että osa tutkimuksista tehdään vain toisella laitteella ja osa tutkimuksista voidaan suorittaa molemmilla laitteilla.

Mikäli nykyisten potilasnäytteiden lisäksi myös Veripalvelussa tutkittavien neuvolanäytteiden vasta-ainetitterimääritykset lisättäisiin laitteiden rutiininomaiseen prosessiin, IH-500-analysaattorilla määritettävien näytteiden määrä kasvaisi huomattavasti. Koska IH-500-analysaattorilla määritettäviä tutkimuksia on valmiiksi jo useita ja potilaslaboratorion omien näytteiden määrä sekä kiireellisyysluokat vaihtelevat, neuvolanäytteiden lisäämistä IH-500-analysaattorin päivittäiseen rutiiniin tulisi pohtia huolellisesti. Uuden määrityksen käyttöönotto ei saisi vaikuttaa laboratoriossa määritettävien potilasnäytteiden tuloksien saatavuuteen. Yksi keskeinen asia on miettiä esimerkiksi sitä, keskittääkö neuvolanäytteiden titteritutkimuksen määrittäminen vain toiselle IH-500-analysaattorille, jolloin toinen laite pidettäisiin vapaana esimerkiksi potilaslaboratorion kiireenäytteitä varten. Tämän lisäksi tulisi arvioida neuvolanäytteiden titterimäärityksien määrää viikossa sekä sitä, kuinka nopeasti määrityksien tulokset vaaditaan. Tämän jälkeen voisi pohtia tehdäänkö titterimäärityksiä päivittäin vai jakautuvatko määritykset tietyille päiville viikon aikana.

7.2 Johtopäätökset ja kehittämisehdotukset

Tämän tutkimuksen myötä voidaan todeta, että Bio-Radin veriryhmäserologinen IH-500-analysaattori on käyttökelpoinen laite neuvolanäytteiden vasta-ainepitoisuuksien määrittämistä varten. IH-500-analysaattori suorittaa määrittäykset itsenäisesti ja luotettavasti ja laite on helppokäyttöinen. Koska laitteelle tarvittavat reagenssit ovat helposti saatavilla ja ne ovat osittain jo käytössä SPR Veripalvelun laboratoriossa, menetelmän käyttöönotto tämän osalta onnistuisi sujuvasti myös neuvolanäytteiden määrittämiseen. Anti-D-vakioiden toistomittauksilla saadut samat tulokset osoittavat myös sen, että IH-500-analysaattorin käyttämä mittaussuunnitelma titterimäärittämiseen on toistettava. Myös tämä tukee sekä menetelmän että laitteen soveltuvuutta haluttuun tutkimukseen.

Haasteeksi jää vasta-ainepitoisuudeltaan korkean näytteen käsittely ennen titterimäärittämisen aloitusta IH-500-analysaattorilla. Näyte, jossa on korkea vasta-ainepitoisuus, täytyy laimentaa jo ennen IH-500-analysaattorin määrittämistä, mutta pohdittavaksi jää, kuinka korkea vasta-ainepitoisuus selvitetään ennen laitteella tehtävää titterimäärittämistä. Lisäksi on päätettävä mikä olisi käsittelyvaiheen laimennoskerroin; olisiko se vakio vai riippuvainen näytteestä. Lisäksi käsittelyvaiheen laimennos tulisi muistaa huomioida lopullisessa tuloksessa laitteella tehdyn titterimäärittämisen jälkeen. Epäselväksi jää myös se, kuinka neuvolanäytteiden vasta-ainetitterimäärittäykset sovitetaan potilaslaboratorion päivittäiseen rutiiniin IH-500-analysaattoreilla. Tämän osalta on tehtävä vielä laajempi selvitys.

Anti-D-vasta-aineellisen plasmanäytteen korkea vasta-ainepitoisuus olisi pitänyt huomioida tässä tutkimuksessa tarkemmin, jotta kyseisellä näytteellä olisi saatu luotettavia tuloksia. Taustatiedoksi tehdyt manuaaliset määrittäykset olisi pitänyt käydä läpi ennen IH-500-analysaattorilla aloitettavia määrittäyksiä. Koska manuaalisesti geelikortilla oli saatu jo korkeita tuloksia anti-D-vasta-aineella, olisi mahdollisesti voitu ennustaa korkeiden tuloksien tapahtuvan myös laitteella. Koska Anti-D on yksi kriittisimmistä vasta-aineista neuvolanäytteiden titterimäärittäyksissä, olisi tärkeää saada luotettavia tuloksia juuri tämän vasta-aineen kohdalla.

Koska tämän ja aikaisempien tutkimuksien perusteella on todettu, että putkitekniikalla ja geelikortitekniikalla saaduissa titterimäärittäyksiä tuloksissa on selkeä ero, olisi mielenkiintoista selvittää tarkemmin, mistä tämä ero johtuu. Olisi aiheellista tunnistaa eron

syyt, jotta esimerkiksi määritettäessä uutta kliinisesti merkittävää titteritasoa ymmärretään, mihin uusi tulotaso perustuu. Lisäksi olisi hyödyllistä selvittää, miksi IH-500-analysaattorilla saavutetaan geelikortilla korkeampia tuloksia verrattuna manuaalisesti geelikortille määritettyihin tuloksiin; onko kyse laitteella olevista olosuhteista vai ihmiskäden epätarkkuudesta.

7.3 Luotettavuus

Tässä tutkimuksessa luotettavuutta tarkasteltiin kvalitatiivisen tutkimuksen näkökulmasta, vaikka titrausmenetelmien kohdalla puhutaan semi-kvantitatiivisesta menetelmästä. Vaikka titrausmenetelmä tuottaa numeerisia tuloksia, tässä tutkimuksessa tehdään reaktiivoimakkuuksien visuaalista arviointia. Anti-D-vasta-aineille on tehty kvantitatiivinen pitoisuuden määrittäminen materiaalin taustatiedoksi, mutta itse validoitavana oleva menetelmä ei ole kvantitatiivinen.

Kvalitatiivisessa eli laadullisessa tutkimuksessa tutkimuksen luotettavuuden kriteerejä ovat totuusarvo, sovellettavuus ja pysyvyys. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa luotettavuuden arvioiminen koskee myös aineiston keräämistä. Tutkimuksen luotettavuutta lisää se, että aineisto on kerätty sieltä, missä ilmiö esiintyy. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa tuloksia arvioidaan myös suhteessa aikaisempaan tutkimustietoon. Tällä osoitetaan, miten monipuolisesti ilmiötä on tarkasteltu. Vaikka käsitteet validiteetti ja reliabiliteetti ovat käytössä enemmän kvantitatiivisen tutkimuksen luotettavuuden arvioinnissa (Tuomi & Sarajärvi 2018), on ne syytä ottaa huomioon myös tässä tutkimuksessa, sillä tutkimuksen kohteena on ollut mittausmenetelmän toistettavuus. Validiteetissa on kyse siitä, onko tutkimus pätevä eli onko se perusteellisesti tehty ja ovatko saadut tulokset ja tehdyt johtopäätökset oikeita. Kun arvioidaan reliabiliteettia, arvioidaan missä olosuhteissa käytetty metodi on luotettava ja johdonmukainen ja tarkastellaan mittausten tai havaintojen pysyvyyttä eri aikoina sekä johdonmukaisuutta tuloksissa. (Kirk & Miller 1986.)

Luotettavuuden osoittamiseksi tässä tutkimuksessa tuodaan avoimesti esiin tutkimuksen luotettavuutta vahvistavat ja heikentävät asiat. Saadut tulokset on kuvattu selkeästi, jotta ymmärretään, miten analyysit on tehty ja mitkä ovat tutkimuksen vahvuudet ja rajoitukset. Tämän tutkimuksen tarvetta tuetaan kirjallisuuden ja aikaisempien tutkimusten avulla ja käytettyjä lähteitä arvioidaan kriittisesti. Tiedonlähteenä on käytetty yli kymmenen vuotta vanhoja lähteitä liittyen esimerkiksi veriryhmäjärjestelmiin. Käsitys

veriryhmäjärjestelmistä ja niiden alkuperästä ei ole kuitenkaan juuri muuttunut ajan saatossa (Hyland & Roulis & Schoeman 2019), joten tiedon hyödyntäminen on edelleen perusteltua tässäkin tutkimuksessa. Validointiin valittu menetelmä on FINAS-akreditoitu (The Finnish Accreditation Service) (Validointisuunnitelma 2022) ja menetelmä on käytössä jo Veripalvelun laboratoriossa potilasnäytteiden tutkimuksissa.

Opinnäytetyön tutkimuksellisessa osiossa tehdyt määrytykset on suorittanut koko tutkimuksen ajan sama henkilö, samanlaisessa toimintaympäristössä, samalla laitteella ja samoilla reagensseilla, mikä tukee valitun menetelmän tuloksien luotettavuutta ja uskottavuutta. Saadut tulokset on tulostettu tarkastelua varten siten, että niitä voidaan tulkita kriittisesti kaikki mahdolliset virheet huomioiden. Tulosteista käy selkeästi ilmi mitä näytettä, mitä reagenssia ja mitä laitetta määrytyksessä on käytetty, sekä ajankohta, jolloin määrytykset on tehty. Tämän avulla tuloksien tulkinnassa tuloksia pystyttiin arvioimaan kriittisesti, sillä oli nopeasti nähtävillä, mikäli määrytyksessä olisi tapahtunut virhe esimerkiksi reagenssin valinnassa.

Menetelmän reliabiliteettia eli mittauksen virheettömyyttä tukee toistuvat tulokset kaupallisilla anti-D-vakioilla. Toistomittauksilla määritetyt tulokset vakioille anti-D 0,05 IU/ml AlbaCheck, Quotient ja anti-D 3,1 IU/ml, 3rd British Standard 2017 olivat jokaisella määrytyksellä täysin samat, mikä ilmaisee sen, miten luotettavasti ja toistettavasti käytetty laite ja menetelmä mittaa haluttua analyyytiä. Validoinnin taustatiedoksi tehdyt manuaaliset titteritutkimukset auttavat tulkitsemaan IH-500-analysaattorilla tehtyjen tuloksien pätevyyttä. Vertailemalla aiemmin käytössä olevan putkitekniikan määrytyksien tuloksia ja IH-500-analysaattorilla tehtyjen määrytyksien tuloksia voidaan todeta tuloksien olevan todenmukaisia. Mikäli geelikortilla saadut tulokset, sekä manuaalisesti että IH-500-analysaattorilla, eroaisivat radikaalisti putkitekniikan tuloksista ja tulokset olisivat vaihtelevia, mittausmenetelmä ei välttämättä olisi pätevä. Tämän tutkimuksen tulokset kuitenkin ilmaisevat sen, miten hyvin tutkimuksessa käytetty mittausmenetelmä mittaa juuri sitä tutkittavan ilmiön ominaisuutta, mitä on tarkoituskin mitata.

Määrytyksessä käytetty näyttemateriaali oli validoinnille sopivan laaja, sillä materiaaliksi oli saatu näytteitä, joissa oli kaikista tärkeimmät vasta-aineet, joita validoinnin kohteena olevan menetelmän avulla haluttiin tutkia. Validoinnin aikana kuitenkin huomattiin, että anti-D-vasta-aineellisen plasmanäytteen korkea titteriarvoa ei ollut huomioitu tarpeeksi. IH-500-analysaattorilla määritettäessä kyseisen plasmanäytteen titteriarvoksi

saatiin laimennossarjan viimeinen laimennos, jota ei voitu hyväksyä tulokseksi, sillä titerimäärityksessä viimeisen positiivisen reaktion jälkeen täytyy olla negatiivinen reaktio luettavissa. Tämä olisi pitänyt huomioida jo ennen määrityksien aloitusta IH-500-analysaattorilla, sillä anti-D-vasta-aineellista plasmanäytettä olisi pitänyt laimentaa valmiiksi jo ennen titteriin tehtävää laimennossarjaa, jonka IH-500-analysaattori tekee. Tämän vuoksi anti-D-vasta-aineellisen plasmanäytteen tuloksia IH-500-analysaattorilla ei voida pitää luotettavina eikä näin ollen tuloksia voida huomioida tässä tutkimuksessa.

7.4 Eettisyys

Hyvä tieteellinen käytäntö edustaa luotettavaa, vastuullista ja avointa työskentelyä tutkimustyössä. Tutkimusetiikan lähtökohtia ovat muun muassa rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus tutkimustyössä. Lisäksi huolellisuutta vaaditaan myös sekä tulosten tallentamisessa ja esittämisessä että tutkimusten ja tulosten arvioinnissa. Lisäksi täytyy huomioida muiden tutkijoiden työn ja saavutuksien asianmukainen huomioon ottaminen käytämällä asianmukaista viittaustekniikkaa. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu myös tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten mukaan toteutettu tutkimuksen suunnittelu, toteutus ja raportointi sekä lisäksi asianmukainen tutkimuslupien hankkiminen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2021.)

Ennen tutkimuksen aloitusta tutustuttiin Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TENK) ohjeisiin hyvästä tieteellisestä käytännöstä ja sitouduttiin noudattamaan niitä. Työstä laadittiin sopimus Metropolia Ammattikorkeakoulun ja SPR Veripalvelun kanssa ja työlle haettiin SPR Veripalvelun opinnäytetyön tutkimuslupa. Kaikki opinnäytetyössä käytetty kuvamateriaali sekä taulukointi on opiskelijan itse tuottamaa, lukuun ottamatta kuvaa Validation Manager-ohjelman tuloksista. Tämän kuvan käyttöön on saatu lupa. Tämän opinnäytetyön jokaisessa vaiheessa on pyritty toimimaan mahdollisimman huolellisesti ja tarkasti, ja kaikki mahdolliset virhelähteet on pyritty tuomaan tulosten pohdinnassa rehellisesti esiin. Muita aiheeseen liittyviä tutkimustuloksia on käytetty tutkimusetiikkaa kunnioittaen. Tutkimuksen tulokset tuodaan avoimesti julki ja ne altistetaan kriittiselle arvioinnille. Opinnäytetyö on tarkistettu Turnitin plagioinnin tarkistusohjelmassa.

Tietosuojakysymykset otettiin huomioon jo tutkimuksen suunnitelmavaiheessa, jolloin todettiin, ettei tutkimuksen aikana tulla käsittelemään henkilötietoja. Osa näytteistä oli kaupallisia vakioita, joiden kohdalla henkilötietojen käsittelyä ei tarvinnut huomioida.

Osa käsitellyistä näytteistä oli peräisin verenluovuttajilta, mutta näytteet olivat useita kymmeniä vuosia vanhoja ja näytteistä oli poistettu henkilötiedot. Näytteet oli identifioitu numeroilla säilytystä varten, joten näytteitä ei pystynyt yhdistämään yksittäisiin henkilöihin. Verenluovuttajien henkilötiedot ovat kuitenkin tiedossa ja ne on arkistoitu Veripalvelun arkistoon, mikäli näihin tietoihin täytyisi palata. Pääsy arkistoihin henkilöihin on kuitenkin tarkkaan rajattu ja tässä tutkimuksessa henkilötietoihin ei tarvinnut palata. Verenluovuttajien näytteisiin on pyydetty lupa tutkimuskäyttöön, kun näytteet on kerätty useita vuosia sitten, joten uutta lupaa ei tarvinnut pyytää tätä tutkimusta varten, sillä validointi on Veripalvelun oma sisäinen tutkimus.

Tutkimuksen tulokset kirjattiin ylös niille tarkoitettuun dokumenttiin ja tulokset tulostettiin. Tulosteet arkistoi Veripalvelun asiantuntija, joka on vastuussa käynnissä olevasta validoinnista. Tuloksiin voidaan palata milloin tahansa.

7.5 Ammatillinen kasvu

Osallistuminen oikeaan työelämälähtöiseen tutkimukseen tuntui etuoikeutetulta ja oli erittäin mielenkiintoista olla osana merkityksellisen tutkimuksen toteutusta. Työn toteutus oli sekä erinomainen mahdollisuus soveltaa opintojen aikana kertynyttä osaamista että myös otollinen tilaisuus oppia paljon enemmän.

Validointiprosessin aikana omaa toimintaa tarkkaili aivan uudella tavalla. Vastuuntunto työn huolellisesta toteutuksesta ohjasi arvioimaan omaa tekemistään koko prosessin ajan. Tämän työn myötä oma ammatillinen kehittyminen erityisesti laadunvalvontaan liittyen oli huomattavaa. Tarkkaan määritellyt työohjeet ja työskentelytavat varmistivat tutkimuksen luotettavuuden ja tulosten oikeellisuuden. Bioanalyytikon ammatissa tutkimusten tulosten luotettavuuden varmistaminen on yksi tärkeimmistä asioista ja viimeistään tässä vaiheessa tämän ymmärtäminen on välttämätöntä.

Käytännön toteutus alkoi melko nopealla aikataululla, joten validointisuunnitelman tekemiselle jäi hyvin vähän aikaa. Vaikka aikataulu suunnitelman suhteen oli tiukka, alustava suunnitelma yhteistyötahon kanssa saatiin valmiiksi siten, että määritykset pystyttiin toteuttamaan sujuvasti. Suunnitelma toi itselle varmuutta siitä, mitä käytännössä tulen tekemään. Suunnitelmallisuuden tärkeys korostui siis jo heti työn alkuvaiheessa. Samalla kun tiukka aikataulu opetti suunnitelmallisuuden tärkeyttä, se opetti myös luot-

tamaan itseeni. Oli palkitsevaa huomata omat valmiudet ryhtyä työskentelemään nopealla aikataululla ja pienen paineen alla. Se, että opettelin täysin uuden laitteen käytön ja uuden tutkimusmenetelmän perusteet nopeasti, toi tietenkin itsevarmuutta myös ammatillisesti.

Työskentely kliinisen laboratorion tiloissa ammattitaitoisien työyhteisön kanssa opetti paljon. Koko työn toteutuksen ajan oli mahdollisuus kysyä neuvoa tai vinkkejä alan ammattilaisilta, mutta samalla täytyi ottaa oma tarvittava tila tutkimuksen toteuttamiseksi, vaikka ympärillä pyörii laboratorion päivittäinen toiminta. Kommunikointi muiden työntekijöiden kanssa oli siis välttämätöntä. Tämä vaati rohkeutta sekä hyviä yhteistyö- sekä ongelmanratkaisutaitoja ja nämä taidot kehittyivät tämän työn myötä. Työskentely kliinisen laboratorion tiloissa antoi myös valmiuksia siirtyä työelämään opintojen päätyttyä.

Yhteistyö SPR Veripalvelun asiantuntijan kanssa opetti tutkimuksen toteutuksesta paljon ja sain paljon uusia näkökulmia bioanalytiikan ammattiin liittyen. Kriittinen tulkinta ja pohdinta olivat avainasemassa tätä työtä tehdessä. Oma kriittinen tulkinta ja pohdinta lisääntyivät myös tiedonhaun myötä. Aikaisempia tutkimuksia etsiessä täytyi arvioida lähteitä kriittisesti, jotta ne olisivat relevantteja myös tässä tutkimuksessa. Useita erilaisia tutkimuksia lukiessa tutustui tieteelliseen kirjoittamiseen sekä tutkimukseen perustuvaan kirjallisuuteen. Tämä tuki samalla omaa kirjoittamista. Lisäksi tietoperustaan tutustuessa oppi paljon lisää tutkimuksen kohteena olevasta aiheesta. Mielenkiinto raskauteen liittyvistä vasta-ainetutkimuksista lisääntyi entisestään.

Vaikka tämän opinnäytetyön aiheena ollut toistettavuuden osoittaminen oli vain yksi osa isompaa validointiprosessia, sain arvokasta kokemusta laboratoriossa suoritettavasta validointiprosessista kokonaisuudessaan. Validointiin liittyen on paljon tietoa luettavissa, mutta pelkästään tämän perusteella on mahdoton ymmärtää, miten se käytännössä toteutetaan. Tässä validointiprosessissa mukana oleminen auttoi ymmärtämään, kuinka paljon uuden menetelmän validointi vaatii resursseja sekä aikaa.

Lähteet

Chaffin, Joe 2023. LISS. Blood Bank Guy. <<https://www.bbguy.org/education/glossary/gll05/>>. Viitattu 1.11.2023.

Chesher, Douglas 2008. Evaluating Assay Precision. *The Clinical biochemist Reviews* 29 (1). 23–26. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556577/>>. Viitattu 29.8.2023.

Chilcott, J & Lloyd Jones, M & Wight, J & Forman, K & Wray, J & Beverley, C & Tappenden, P 2003. A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus negative. *Health Technology Assessment* 7 (4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62211/pdf/Bookshelf_NBK62211.pdf>. Viitattu 20.2.2023.

Crowther, Caroline A & Middleton, Philippa & McBain, Rosemary D 2015. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *The Cochrane database of systematic reviews* 9. <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000020.pub3/epdf/full>>. Viitattu 20.4.2023.

Daniels, Geoff 2013. *Human Blood Groups*. E-kirja. USA: John Wiley & Sons, Wiley-Blackwell.

Daniels, Geoff & Bromilow, Imelda 2013. *Essential Guide to Blood Groups*. E-kirja. USA: John Wiley & Sons.

Dean, Laura 2005. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf_NBK2261.pdf>. Viitattu 19.4.2023.

Ekblom-Kullberg, Susanne & Korhonen, Anu & Koski, Toni & Mahlamäki, Eija & Sainio, Susanna & Salmela, Katja & Sareneva, Inna & Savolainen, Eeva-Riitta & Sivula, Mirka & Tienhaara, Anri 2023. *Verensiirto-opas*. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Green, Ralph E. B. & Slayten, Jayanna & Rhees, Justin 2019. *Blood Groups and Serologic Testing*. Teoksessa Harmening, Denise M. 2019. *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*. Seventh Edition. E-kirja. F.A. Davis.

Haug, Egil & Sand, Olav & Sjaastad, Øystein V. 1995. *Ihmisen fysiologia*. Porvoo; Helsinki; Juva: WSOY.

Hiltunen, Erkki & Linko, Linnea & Hemminki, Sari & Hägg, Margareta & Järvenpää, Eila & Saarinen, Pertti & Simonen, Seppo & Kärhä, Petri 2011. *Laadukkaan mittaamisen perusteet*. Espoo: Metrologian neuvottelukunta ja Mittatekniikan keskus, MIKES. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>>. Viitattu 27.9.2023.

Huslab 2023. Anti-D kvantitaatio, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 31.8.2023. <<https://huslab.fi/ohjekirja/6070.html>>. Viitattu 31.8.2023.

Hyland, Catherine A & Roulis, Eileen V & Schoeman, Elizna M 2019. Developments beyond blood group serology in the genomics era. *British journal of haematology* 184 (6). 897–911. <<https://doi.org/10.1111/bjh.15747>>. Viitattu 22.3.2023.

Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <<http://kemianseurat.fi/finntesting/wp-content/uploads/2019/10/Validoinnin-suunnittelun-opas-2016.pdf>>. Viitattu 27.9.2023.

Ilmakunnas, Minna 2019. Apua, potilaallani on veriryhmävasta-aine! *Finnanest* 52 (1). 48-55. <http://www.finnanest.fi/files/ilmakunnas_veriryhmavastaaaina.pdf>. Viitattu 8.2.2023.

Jernman, Riina & Aitokallio-Tallberg, Ansa & Stefanovic, Vedran & Kauppinen, Tuomas & Sainio, Susanna 2020. Kohdunsisäinen punasolusiirto. *Duodecim* 136. 21. 2393–2400. <<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/334748/duo15854.pdf?sequence=1>>. Viitattu 20.4.2023.

Kirk, Jerome & Marc L. Miller 1986. *Reliability and Validity in Qualitative Research*. Beverly Hills, California. London.

Kumpula, Laura & Perälä, Minna 2019. Vastasyntyneen sinivalohoito on mahdollista toteuttaa myös kotona. *ePooki*. Oulun ammattikorkeakoulun tutkimus- ja kehitystyön julkaisut 23. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/168003/ePooki%2023_2019.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Viitattu 20.4.2023.

Lieberman, Lani & Andrews, Jennifer & Evans, Michael D. & Cohn, Claudia S. 2021. Comparison of prenatal anti-D titration testing by gel and tube methods: A review of the literature. *Transfusion* 61. 1749–1756.

Murphy, Michael F. & Roberts, David J. & Yazer, Mark H. 2017. *Practical Transfusion Medicine*. 5th edition. E-kirja. USA: John Wiley & Sons, Wiley-Blackwell.

Pegoraro, Valeria & Urbinati, Ducciocompet & Visser, Gerard H. A. & Di Renzo, Gian Carlo & Zipursky, Alvin & Stotler & Brie A. & Spitalnik, Steven L. 2020. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: A preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. *PloS One* 15 (7). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7371205/>>. Viitattu 20.4.2023.

Pouta, Anneli & Hakulinen-Viitanen, Tuovi & Klemetti, Reija & Pelkonen, Marjaana & Vallimies-Patomäki, Marjukka & Ellilä, Merja & Häkkinen, Hannele & Jouhki, Maija-Riitta & Kampman-Nikulainen, Taru & Keravuo, Ritva & Lang, Leena & Lehtomäki, Leila & Liira, Helena & Paahtama, Soile & Rahkonen, Eeva & Raudaskoski, Tytti & Raussi-Lehto, Eija & Rätty, Heidi & Uotila, Jukka & Virtanen, Terhi & Ylä-Soininmäki, Taina 2013. Äitiysneuvolaopas. Suosituksia äitiysneuvolatoimintaan. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Tampere: Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy. <https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/110521/THL_OPA2013_029_verkko.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Viitattu 13.11.2023.

Pursula, Eeva 2022. Towards smarter verifications. Validation Manager. E-kirja. Finbio-soft.

Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa. Raskauteen liittyvät tutkimukset. Ammattilaiset. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. <<https://www.veripalvelu.fi/ammattilaiset/raskauteen-liittyvat-tutkimukset/seulontaohjelma-suomessa/>>. Viitattu 17.5.2023.

Raskaudenaikaiset veriryhmä- ja veriryhmävasta-ainetutkimukset. Laboratoriopalvelut. Ammattilaiset. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. <<https://www.veripalvelu.fi/ammattilaiset/laboratoriopalvelut/raskaudenaikaiset-veriryhma-ja-veriryhmavasta-ainetutkimukset/>>. Viitattu 20.5.2023.

Sainio, Susanna & Kuosmanen, Malla 2012. Vastasyntyneen hemolyyttinen tauti ei ole hävinnyt Suomesta. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 128. 151–157. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo10041.pdf>>. Viitattu 20.4.2023.

Sainio, Susanna & Kuosmanen, Malla 2020. Yli 50 vuotta raskausimmunisaatioiden ehkäisyä ja seulontaa Veripalvelussa. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 136. 2321–2323. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo15862.pdf>>. Viitattu 20.4.2023.

Sainio, Susanna & Aho-Asunmaan, Liisa 2020. Seulontatutkimukset äitiysneuvolassa. Teoksessa Sariola, Anna-Paula 2014. Odottavan äidin Käsikirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Schneider, Dana & Vicarioto, Mariangela & Coluzzi, Serelina & Matteocci, Antonella & Revelli, Nicoletta & Foglieni, Barbara & Artusi, Patrizia & Londero, Donatella & Quaglietta, Anna & Barrotta, Giancarla & Visceglie, Domenico & Portararo, Giuseppina & Gilsdorf, Jonella 2022. ABO antibody titres: a multisite comparative study of equivalency and reproducibility for automated solid-phase and haemagglutination titration, and manual dilution with gel column agglutination technology. Blood transfusion 20 (4). 329–337. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35175183/>>. Viitattu 25.8.2023.

Sulin, Kati 2023. Laboratorioasiantuntija. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. Vantaa. Suullinen tiedonanto 5.5.2023.

The International Society of Blood Transfusion 2023. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. Working Parties. <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>>. Viitattu 23.8.2023.

Tietoa veriryhmistä. Tietoa verestä. Verenluovutus. Suomen Punainen Risti, Veripalvelu. <<https://www.veripalvelu.fi/verenluovutus/tietoa-veresta/tietoa-veriryhmista/>>. Viitattu 20.5.2023.

Tietoarkisto. Varianssianalyysi. Palvelut. Tutkimusmenetelmien verkkokäsikirja. Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja. Monimuuttujamenetelmät. Tampere. <<https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/metelmaopetus/kvanti/variassi/anova/>>. Viitattu 26.10.2023.

Tuomi, Jouni & Sarajärvi, Anneli 2018. Laadullinen tutkimus ja sisällönanalyysi. Uudistettu laitos. E-kirja. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkauseräilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Helsinki. <https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Viitattu 17.8.2023.

Tutkimusmenetelmien verifiointi ja validointi 2023. Yleisohje. Vantaa: SPR Veripalvelu.

Validointisuunnitelma 2022. Vasta-ainetitterimenetelmän validointi geelitekniikalle. Vantaa: SPR Veripalvelu.

Vasta-ainetitteri ja plasman DTT-käsittely 2022. Tutkimusmenetelmäohje. Vantaa: SPR Veripalvelu.

Veriryhmäserologinen IH-500-analysaattori 2023. Laiteohje. Vantaa: SPR Veripalvelu.

Westhoff, Connie M. 2019. Blood group genotyping. Blood 133 (17). 1814–1820. <<https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-833954>>. Viitattu 21.4.2023.