

**IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen
suhteen määrittäminen
immunisoituneiden äitien
raskaudenaikaisista plasmanäytteistä**

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyytikko
Opinnäytetyö
20.10.2009

Kirsi Jaatinen
Pauliina Virtanen

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Kirsi Jaatinen ja Pauliina Virtanen			
Työn nimi			
IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen määrittäminen immunisoituneiden äitien raskauden aikaisista plasmanäytteistä			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäyte	Syksy 2009	57	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Raskauden aikana sikiön punasoluja voi kulkeutua istukan kautta äidin verenkiertoon. Jos sikiön punasolujen pinnalla on veriryhmäantigeeneja, joita äidillä ei ole, äidin immuunijärjestelmä tunnistaa vieraat punasoluantigeenit ja käynnistää niitä kohtaan vasta-ainetuotannon. Seurauksena tästä voi olla sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttinen tauti, joka pahimmillaan johtaa lapsen kuolemaan. Istukan läpäisevät vain IgG-luokan vasta-aineet niiden pienen molekyylikoon vuoksi. Vastasyntyneen hemolyyttisen taudin syntymekanismissa tärkeimmät ovat IgG1- ja IgG3-alaluokat. IgG1-alaluokan on todettu aiheuttavan ongelmia lapselle jo ennen syntymää, kun taas IgG3-alaluokka voi aiheuttaa vastasyntyneelle viivästyneen hemolyyttisen taudin syntymän jälkeen. Näin ollen IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisellä suhteella äidin veressä voi olla merkitystä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin kannalta.</p> <p>Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa tehdään kaikkien raskaana olevien äitien veriryhmä- ja punasoluvasta-ainetutkimukset, joiden tarkoituksena on löytää sikiön terveyttä uhkaavat punasoluvasta-aineet ja ennakoida riskiraskaudet. Raskaana olevien immunisoituneiden naisten vasta-ainepitoisuutta seurataan määrittämällä vasta-ainetitteri sekä anti-D titterin ollessa 16 tai yli anti-D:n kvantitatiivinen pitoisuus. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin soveltuvuutta osaksi immunisoituneiden äitien seurantaprosessia. DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortilla saadaan selville IgG1- ja IgG3-alaluokkien välinen suhde sekä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riski. Geelikortin toimivuutta testattiin tunnetun anti-D vasta-aineen viidellä eri laimennoksella, joiden titterit vastasivat potilasnäytteitä. Testauksen jälkeen 101 plasmanäytettä 55 immunisoituneelta äidiltä tutkittiin DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortilla. Näytteet sisälsivät anti-D, anti-C, anti-E, anti-c tai anti-K vasta-ainetta. Tuloksia verrattiin tiedossa oleviin vasta-ainetittereihin ja lisäksi alaluokkien suhteiden välisiä eroja eri äitien sekä eri vasta-aineiden välillä tarkasteltiin.</p> <p>Tulokset osoittivat, että IgG1- ja IgG3-alaluokkien välinen suhde ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riski voivat vaihdella eri vasta-aineiden sekä eri äitien välillä. Tulosten perusteella vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riski voi olla korkea, vaikka vasta-ainetitteri on alle 16. Geelikortin tuloksen perusteella voitaisiin harkita anti-D kvantitaation tekemistä jo titterillä 8 anti-D immunisaatiossa. IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen perusteella voitaisiin myös arvioida, onko hemolyyttisen taudin riski suuri jo sikiöllä vai vasta viivästyneenä reaktiona syntymän jälkeen vastasyntyneellä.</p>			
Avainsanat			
vastasyntyneen hemolyyttinen tauti, IgG-alaluokat, IgG1, IgG3, DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Authors		
Kirsi Jaatinen and Pauliina Virtanen		
Title		
Determining the Relationship Between IgG1 and IgG3 Subclasses in Plasma Samples from Immunized Pregnant Women		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Autumn 2009	57
<p>ABSTRACT</p> <p>During pregnancy, the red cells of the fetus may drift to the mother's blood circulation through the placenta. If the blood group antigens on the fetus's and the mother's red cells differ from each other, the mother's immune system recognizes the unfamiliar red cell antigens and starts to produce antibodies against them. This can cause a haemolytic disease of the fetus and the newborn (HDN), which is fatal in the worst cases. Only the antibodies of IgG class pass the placenta because of their small molecule size. The IgG1 and IgG3 subclasses are the key factors when observing the development of a haemolytic disease of a newborn. The IgG1 subclass is known to have caused problems to the child already before delivery, when again the IgG3 subclass may lead to a delayed haemolytic disease after childbirth. Consequently, the relationship between the IgG1 and IgG3 subclasses in the maternal plasma can be crucial for the development of a haemolytic disease of the newborn.</p> <p>Finnish Red Cross Blood Service does the blood group testing and red cell antibody screening for all pregnant mothers. The objective is to find the red cell antibodies which may harm the fetus and predict the risk pregnancies. Antibody level of pregnant women who are immunized is being controlled by defining the antibody titre. When the antibody titre is 16 or above, also the quantitative content of anti-D will be specified. The objective of this study was to examine the applicability of the DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 gel card as a part of the follow-up process of the immunized mothers. The relationship between the concentrations of the IgG1 and IgG3 subclasses and the risk of a haemolytic disease of a newborn is detected with the gel card. As for study methods, the functionality of the gel card was tested with five different dilutions of a known anti-D antibody, whose titres corresponded the patient samples. After the testing 101 plasma samples from 55 immunized mothers were examined with the gel card. The samples included anti-D, anti-C, anti-E, anti-c or anti-K antibodies. The results were compared to the known titres. Also the differences in the relationships between the IgG1 and IgG3 subclasses between the mothers and the different antibodies were observed.</p> <p>The results demonstrated that the relation between the IgG1 and IgG3 subclasses and the risk of a haemolytic disease of the newborn can vary between the different antibodies and according to the mother. Based on the study results the risk of a haemolytic disease of the newborn can be high even though the antibody titre is below 16. In these cases, according to the results of the gel card, quantification of anti-D could be done although the titre is below 16. Based on the relationship between the IgG1 and IgG3 subclasses it can also be estimated if the risk for a haemolytic disease is high already for the fetus or only as a delayed reaction for a newborn after delivery.</p>		
Keywords		
haemolytic disease of the newborn, IgG subclasses, IgG1, IgG3, DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3		

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	RASKAUDENAIKAINEN VERIRYHMÄIMMUNISAATIO	2
2.1	RhD-immunisaatio ja sen ehkäisy	2
2.2	Muut veriryhmäimmunisaatiot	4
3	SIKIÖN JA VASTASYNTYNEEN HEMOLYYTTINEN TAUTI	4
3.1	Taudin syntymekanismi	5
3.2	Taudinkuva	6
3.3	Taudin vaikeusasteen arvioiminen	7
3.4	Taudin hoito	8
4	IMMUNOGLOBULIINIT JA IGG-ALALUOKAT	9
4.1	Vasta-aineiden tehtävät	10
4.2	Vasta-aineiden yleisrakenne ja vasta-aineluokat	10
4.3	IgG-alaluokat	12
4.3.1	Alaluokkien ominaisuudet	13
4.3.2	IgG1- ja IgG3 -alaluokkien merkitys sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttiselle taudille	14
5	RASKAUDENAIKAISET VERIRYHMÄ- JA VASTA-AINETUTKIMUKSET	16
6	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET	18
7	TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	20
7.1	Tutkimusaineisto	21
7.2	Tutkimuksessa käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit	22
7.3	Laboratoriotutkimusmenetelmät	23
7.3.1	Vasta-ainetitterin määrittäminen epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä	24
7.3.2	IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen määrittäminen DiaMed-ID geelikorttimenetelmällä	25
7.4	DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin testaaminen	28
7.4.1	Geelikortin testauksessa käytettyjen anti-D-laimennosten valinta	28
7.4.2	Geelikortin testauksen suorittaminen	29
7.4.3	Geelikortin testauksen tulokset	31
7.4.4	Näytteiden tutkimisessa käytettyjen reagenssi- ja näytemäärien testaaminen	35
7.5	Näytteiden tutkiminen	35
7.6	Tutkimustulosten käsittely	36

8	TUTKIMUSTULOKSET	37
8.1	Geelikortin toimivuuden testauksen tulokset	37
8.2	Koko aineiston tulokset	37
8.3	Näytteiden jakautuminen riskiluokkiin	41
8.3.1	Koko aineisto	42
8.3.2	Jokaiselta äidiltä vain yksi näyte	44
8.3.3	Anti-D-vasta-aineen sisältävät näytteet	46
8.4	Samanaikaisen raskauden näytteiden tulokset	48
9	TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	49
10	POHDINTA	50
	LÄHTEET	54

1 JOHDANTO

Äidin raskaudenaikainen immunisoituminen voi tapahtua, jos sikiöllä on punasolujen pinnalla sellaisia isältä perittyjä veriryhmäantigenejä, joita äidillä ei ole. Raskauden aikana on tavallista, että sikiön punasoluja siirtyy istukan kautta äidin verenkiertoon, yleensä synnytyksen yhteydessä. Äidin immuunijärjestelmä tunnistaa sikiön punasolujen vieraat veriryhmäantigenit ja käynnistää vasta-aineiden muodostumisen niitä kohtaan eli äiti immunisoituu. Vasta-aineet voivat kulkeutua istukan läpi sikiön verenkiertoon ja tarttua sikiön punasolujen antigeeneihin. (Eklund - Kuosmanen - Renlund - Teramo 1995: 265-266; Salmi - Pihkala - Siimes - Rajantie - Riikonen 2007: 638; Verensiirto-opas 2006: 74.) Fagosyytit tunnistavat vasta-aineella päällystetyt punasolut ja tuhoavat ne, mikä johtaa sikiön anemisoitumiseen ja vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin (Eklund ym. 1995: 265-266; Salmi ym. 2007: 638.)

Ainoastaan IgG-luokan vasta-aineet ovat molekyylikooltaan tarpeeksi pieniä läpäisemään istukan (Eklund ym. 1995: 265-266; Salmi ym. 2007: 638). Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin aiheuttavista IgG-luokan vasta-aineista merkittävimmät alaluokat ovat IgG1 ja IgG3 (Strohm 2005: 428). Kyseisten alaluokkien määrillä suhteessa toisiinsa on todettu olevan merkitystä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin kannalta. (Brossard - Debbia - Lambin - Puillandre 2002: 1544.) Tutkimuksissa on todettu, että IgG1-alaluokan ollessa vallitsevana alaluokkana äidin plasmassa aiheuttaa se ongelmia sikiölle jo raskauden aikana. IgG3-alaluokan on puolestaan kuvattu aiheuttavan viivästyneen hemolyysin riskin, jolloin ongelmat ilmenevät vasta syntymän jälkeen. (Strohm 2005: 428.)

Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa raskaana olevilta äideiltä seulotaan veriryhmävasta-aineet ja niiden pitoisuutta seurataan raskauden aikana, jotta voidaan ennakoita mahdollinen vastasyntyneen hemolyyttinen tauti. Vasta-ainepitoisuutta seurataan määrittämällä vasta-ainetitteri ja tarvittaessa anti-D-vasta-aineen kvantitatiivinen pitoisuus ELISA-menetelmällä.

Tässä opinnäytetyössä Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun potilastutkimusten veriryhmäserologiseen laboratorioon tutkitaan DiaMed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin soveltuvuutta osaksi immunisoituneiden äitien seurantaprosessia. Työssä määritetään IgG1- ja IgG3-alaluokkien suhde immunisoituneiden äitien raskaudenaikaisista

plasmanäytteistä käyttäen Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia. Geelikortilla saadaan selville IgG1- ja IgG3-alaluokkien välinen suhde äidin plasmassa sekä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riski. Kyseinen geelikortti ei ole tiettävästi käytössä tässä tarkoituksessa Suomessa. Työssä selvitetään kirjallisuuden avulla IgG1- ja IgG3-alaluokkien merkitystä vastasyntyneen hemolyyttisen taudin luonteeseen ja vaikeusasteeseen sekä pohditaan, miten käytetty geelikortti soveltuisi osaksi immunisointuneiden äitien seurantaprosessia. Teoriaosuudessa käsitellään lisäksi raskaudenaikaista immunisaatiota, vastasyntyneen hemolyyttistä tautia sekä yleisesti vasta-aineita.

2 RASKAUDENAIKAINEN VERIRYHMÄIMMUNISAATIO

Raskauden aikana on tavallista, että sikiön punasoluja siirtyy istukan läpi äidin verenkiertoon. Transplantaalisen vuodon määrää lisää merkittävästi synnytys sekä istukan irtoaminen. (Eklund ym. 1995: 265-266.) Raskausaikana sikiön punasolujen päästessä äidin verenkiertoon äidin immunologinen puolustusjärjestelmä tunnistaa sikiön punasolujen vieraat pinta-antigeenit ja saattaa käynnistää vasta-ainemuodostuksen vieraita veriryhmätekijöitä kohtaan. (Eklund ym. 1995: 265-266; Salmi ym. 2007: 638; Verensiirto-opas 2006: 74.) Vasta-aine voi kulkeutua istukan läpi sikiön verenkiertoon ja tarttua punasolujen pinnalle. Tämä aiheuttaa sikiön punasolujen tuhoutumisen ja johtaa sikiön anemiaan sekä vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin. (Verensiirto-opas 2006: 74.)

2.1 RhD-immunisaatio ja sen ehkäisy

Rh-järjestelmän D-antigeeni on hyvin immunogeeninen, minkä vuoksi se aiheuttaa suurimman osan raskaudenaikaisista immunisaatioista (Verensiirto-opas 2006: 75; Eklund ym. 1995: 268). Immunisaation riskiryhmänä ovat RhD-negatiiviset naiset, jotka synnyttävät RhD-positiivisen lapsen. Ensimmäisessä raskaudessa sikiön punasoluja siirtyy äidin verenkiertoon riittävästi aiheuttamaan immunogeenisen ärsykkeen useimmiten vasta synnytyksen yhteydessä, minkä takia ensimmäisessä raskaudessa ei tavallisesti ole vielä vaaraa immunisaatiosta. (Eklund ym. 1995: 268.) Seuraavassa raskaudessa, jossa sikiö on RhD-positiivinen, jopa yksittäiset sikiön

punasolut pystyvät aiheuttamaan sekundaarisen vasta-ainetuotannon äidissä (Strohm 2005: 424). Tämän vuoksi immunisaation riski kasvaa jokaisessa raskaudessa, jossa sikiö on RhD-positiivinen. RhD-antigeeni muodostuu sikiölle jo ensimmäisen raskauskolmanneksen aikana ja on heti muodostuttuaan yhtä immunogeeninen kuin loppuraskaudessa. Tämän vuoksi sekä keskenmeno että raskauden keskeytykset voivat myös aiheuttaa immunisaation. (Eklund ym. 1995: 268.) Immunisoitumisen riski on myös muissa tilanteissa, joissa äidin verenkiertoon on mahdollisuus päästä sikiön punasoluja. Näitä ovat esimerkiksi lapsivesi- ja napasuonipunktiot, istukkabiopsia, ulkokäännös, kohdunulkoinen raskaus, uhkaava keskenmenoon viittaava vuoto tai vatsanalueen trauma. (Verensiirto-opas 2006: 75.)

RhD-immunisaatiota voidaan ennaltaehkäistä anti-D-suojauksella. RhD-immunisaatio pystytään ehkäisemään antamalla anti-D-immunoglobuliinia viimeistään 72 tuntia RhD-positiivisen lapsen syntymän jälkeen sekä abortin tai keskenmenon yhteydessä. Anti-D-immunoglobuliinia suositellaan annettavaksi raskauden aikana RhD-negatiiviselle äidille silloin, kun verenvuodon riski sikiöstä äitiin on kasvanut. Näitä tilanteita ovat esimerkiksi lapsivesipunktio, ulkokäännös ja kohdunulkoinen raskaus. Suojaus uusitaan synnytyksen jälkeen. Suojauksesta ei ole hyötyä, jos äiti on jo immunisoitunut D-antigeeniä kohtaan. (Eklund ym. 1995: 274.)

Anti-D-immunoglobuliinin vaikutusmekanismia, jolla se estää immunisoitumisen RhD-positiivisille punasoluille, ei tunneta varmuudella (Greiss - Urbaniak 2000: 56). Eläinkokeiden perusteella on esitetty, että liukoiset IgG-vasta-aineet kilpailisivat primaarivasteen aikana lymfosyyttien pinnan reseptorivasta-aineiden kanssa. Tämä aiheuttaisi sen, että B-solut eivät lähtisikään kehittymään vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi. (Leikola 1987: 53.) Lapsen ja äidin ABO yhteensopimattomuuden on todettu suojaavan äitiä immunisoitumiselta. Tämä voi johtua siitä, että äidin verenkiertoon päässeet lapsen punasolut päällystetään nopeasti isoagglutiniineilla (IgM-luokan anti-A- ja/tai anti-B-vasta-aineilla) ja poistetaan verenkierrosta fagosytoosilla pääasiallisesti maksassa. Anti-D-vasta-aineen synteesi ei välttämättä käynnisty, koska maksalla ei ole niin hyvä immuunivaste kuin pernalla. Tällöin äidin anti-D-immunisaatiota ei ehdi tapahtua. (Greiss - Urbaniak 2000: 56.)

2.2 Muut veriryhmäimmunisaatiot

RhD-antigeenin lisäksi myös muut veriryhmäantigenit voivat aiheuttaa raskaudenaikaisen immunisaation. Yleisimpiä sikiön kannalta merkityksellisiä vasta-aineita ovat Rh-järjestelmän anti-c ja anti-E, Kell-järjestelmän anti-K sekä Duffy- ja Kidd-järjestelmien vasta-aineet. (Verensiirto-opas 2006: 75.) Tilanne, jossa äiti on negatiivinen jonkin muun Rh-järjestelmän antigeenin suhteen, kuten C-, c- ja E-antigeenit, ja lapsi puolestaan positiivinen, ei ole sen harvinaisempi kuin tilanne, jossa äiti on RhD-negatiivinen ja lapsi RhD-positiivinen. C-, c- ja E-antigeenien aiheuttama immunisaatio on kuitenkin harvinaisempi kuin D-antigeenin aiheuttama johtuen niiden huomattavasti heikommasta immunogeenisyydestä verrattuna D-antigeeniin. (Eklund ym. 1995: 269.)

Anti-c vasta-aineen aiheuttama vastasyntyneen tai sikiön hemolyyttinen tauti on melko harvinainen, koska usein lapsi on c-negatiivinen ja äiti on immunisoitunut verensiirrosta johtuen (Anstee - Klein 2005: 525-526). Anti-c on kuitenkin kliinisesti erittäin merkittävä, sillä se voi aiheuttaa vakavan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin (Bromilow - Daniels 2007: 41), vaikka sen titteri ei yleensä nouse kovin korkeaksi (Anstee - Klein 2005: 525). Anti-E on yksi yleisimmistä äideillä esiintyvistä Rh-vasta-aineista ja aiheuttaa harvoin yksinään vastasyntyneen hemolyyttisen taudin. (Anstee - Klein 2005: 525-526.) Anti-K on seuraavaksi yleisin vasta-aine ABO- ja Rh-vasta-aineiden jälkeen, joka aiheuttaa vastasyntyneen hemolyyttistä tautia (Ahaded - Brossard - Debbia - Lambin 2000: 1239). Anti-K vasta-aine voi aiheuttaa vakavan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin, vaikka titteri olisi matala (Bromilow - Daniels 2007: 68).

3 SIKIÖN JA VASTASYNTYNEEN HEMOLYYTTINEN TAUTI

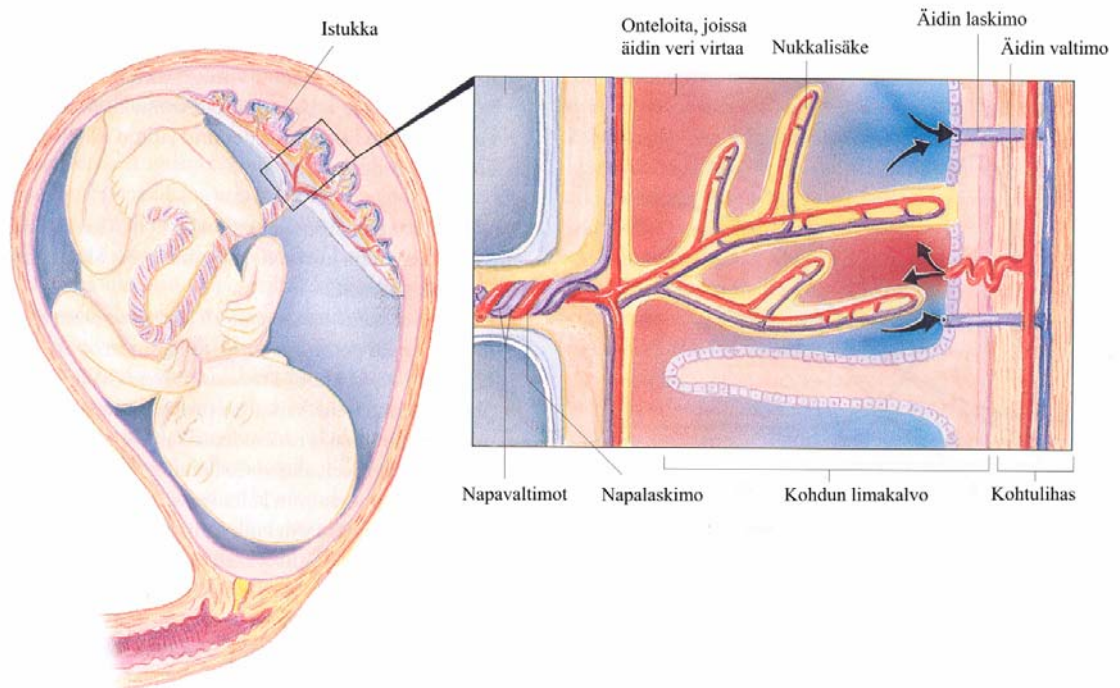
Hemolyyttisissä anemioissa hemolyysi eli punasolujen hajoaminen on lisääntynyt, jolloin punasolujen elinikä lyhenee. Hemolyyttiset tilat voidaan luokitella hemolyysiin johtaneiden syiden ja taudinkuvan perusteella synnynnäiseen, perinnölliseen tai hankinnaiseen sairauteen. Perinnöllisissä hemolyyttisissä tiloissa taustalla on punasoluissa itsessään oleva vika, kun taas hankinnaisissa tiloissa hemolyysi johtuu

yleensä punasolujen ympäristöstä kuten esimerkiksi punasoluvasta-aineista. (Juvonen – Savolainen 2007: 198.) Vastasyntyneen hemolyyttinen tauti (Haemolytic Disease of the Newborn, HDN) kuuluu hankinnaisiin alloimmuunihemolyyttisiin anemioihin. Taudin aiheuttavat allovasta-aineet, jotka ovat siirtyneet äidistä istukan kautta lapsen verenkiertoon. (Juvonen – Savolainen 2007: 202-203.)

3.1 Taudin syntymekanismi

Istukka on desidua-trofoblasti-kaksoiskalvo, joka toimii valikoivana kahdensuuntaisena suodattimena (Tiilikainen 1997: 132). Istukassa äidin ja sikiön veret kiertävät kahdessa erillisessä verenkiertojärjestelmässä eivätkä sekoitu toisiinsa. Äidin ja sikiön verien välinen kontaktipinta on noin 15-20 m² nukkalisäkkeiden ansiosta (kuvio 1). Nukkalisäkkeiden kautta tapahtuu äidin ja sikiön välinen aineiden vaihto diffundoitumalla hiussuonien ohuiden seinämien läpi. (Bjälle - Haug - Sand - Sjaastad - Toverud 1999: 423.) Monet pienet proteiinimolekyylit, joilla on tärkeä immunologinen säätelytehtävä kuten vastasyntyneen suojaaminen infektioilta, pääsevät läpäisemään tätä kautta istukan. (Tiilikainen 1997: 132-133.)

Äidin immunisaation seurauksena syntyneet vasta-aineet ovat useimmiten IgG-luokan vasta-aineita, jotka ovat tarpeeksi pieniä päästäkseen kulkeutumaan istukan läpi sikiön verenkiertoon. Vasta-aine sitoutuu istukan pinnassa oleviin Fc-reseptoreihin ja pääsee näin kulkeutumaan aktiivisesti sen läpi. Aktiivisuus lisääntyy sitä enemmän mitä pidemmällä raskaus on. (Eklund ym. 1995: 265-266; Salmi ym. 2007: 638.) Vasta-aineiden päästessä sikiön verenkiertoon ne sitoutuvat punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin. Pernassa ja maksassa retikuloendoteliaalijärjestelmän fagosyytit tunnistavat vasta-aineella päällystetyt punasolut ja tarttuvat niihin Fc-reseptoreillaan. (Eklund ym. 1995: 265-266; Strohm 2005: 423-424.) Tämän jälkeen fagosyytit poistavat punasolut verenkierrosta joko fagosytoosin tai sytotoksisen lyysin avulla, mikä aiheuttaa sikiön anemisoitumisen. (Bromilow - Daniels 2007: 65.)



KUVIO 1. Sikiön veri kiertää nukkalisäkkeissä, joita äidin veri ympäröi. (Mukaillen Bjälje - Haug ym. 1999: 423.)

3.2 Taudinkuva

Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin kliininen kuva vaihtelee sen mukaan, miten voimakasta hemolyysi on ja miten sikiön lisääntynyt punasolutuotanto pystyy tilannetta kompensoimaan. Sikiön kannalta suurin ongelma taudissa on hemolyysin aiheuttama anemia ja vastasyntyneellä tämän lisäksi veren korkeasta bilirubiinipitoisuudesta johtuva keltaisuus sekä bilirubiinin kertyminen aivoihin. (Salmi ym. 2007: 639.) Sikiön elimistö pyrkii kompensoimaan punasolujen normaalia nopeammasta hajoamisesta johtuvaa anemiaa lisäämällä punasolutuotantoa, joka tapahtuu osittain luuytimen ulkopuolella maksassa, pernassa ja keuhkoissa. Tämä saattaa aiheuttaa maksan ja pernan suurentumisen. Lisäksi verenkierron punasoluista jopa 80 % saattaa olla erytroblasteja. (Eklund ym. 1995: 265.) Lievissä taudinkuvissa punasolujen hajoaminen ja bilirubiinin syntyminen voi olla niin vähäistä, ettei hemoglobiinitaso muutu eikä ole vaaraa hyperbilirubinemiasta (Salmi ym. 2007: 639).

Vaikeimmissa tapauksissa anemia voi edetä niin pahaksi, että sikiö pyrkii korjaamaan tilannetta suurentamalla nestetilavuutta. Tämän hengenvaarallisen seurauksena on hydrops fetalis -tilanne. Oireina sikiöllä on tällöin muun muassa turvotukset,

hepatosplenomegalia eli maksan ja pernan suurentuminen sekä askites seurauksena sydämen vajaatoiminnasta. (Salmi ym. 2007: 639.) Hydrops saattaa johtua osaksi myös hypoalbuminemiasta ja plasman eri proteiineista johtuvasta onkoottisen paineen alenemisestä. Jos sikiön anemiaa hemoglobiinin ollessa alle 40 g/l ei hoideta, se johtaa sikiön menehtymiseen. Vaikeasta hemolyyttisestä taudista kärsivä vastasyntynyt on kalpea ja hydroptinen sekä muuttuu nopeasti keltaiseksi ensimmäisen vuorokauden aikana. Vastasyntyneellä voi olla pieni trombosyyttipitoisuus, hiussuonipurkautumia ja vuotohäiriöitä. Hemoglobiini on alhainen ja retikulosyyttitaso on suuri. (Eklund ym. 1995: 265.) Vaikeaan taudinkuvaan voi kuulua lisäksi haiman saarekesolujen hypertrofiasta aiheutuva hypoglykemia (Salmi ym. 2007: 640).

Sikiöllä hemoglobiinin hajoamisesta syntynyt bilirubiini poistuu istukan kautta, mutta vastasyntyneen maksa ei pysty muuttamaan bilirubiinia vesiliukoiseksi tarpeeksi nopeasti (Eklund ym. 1995: 265). Bilirubiinitaso nousee tällöin hyvinkin nopeasti syntymän jälkeen, jopa vuorokauden kuluessa. Bilirubiinitason noustessa liian korkeaksi veressä on vaarana, että bilirubiini läpäisee veri-aivoesteen ja kertyy keskushermostoon, erityisesti basaalganglioihin. Seurauksena on kernikteruksen eli vastasyntyneen keltataudin aiheuttama aivorungon vaurio, joka on vastasyntyneen hemolyyttisen taudin aiheuttamista seurauksista vakavin ja pitkäaikaisin. (Salmi ym. 2007: 639-640.)

3.3 Taudin vaikeusasteen arvioiminen

Arvioitaessa hemolyysin voimakkuutta voidaan lapsivedestä mitata bilirubiinitaso, joka suhteutetaan raskauden kestoon tarkoitukseen tehtyjen kuvaajien avulla. Luotettavamman kuvan hemolyysin asteesta edelliseen verrattuna antaa lapsiveden erytropoietiinin taso. Tarkimman tiedon sikiön anemiasta ja hemolyyttisen taudin vaikeusasteesta antaa edelleen napasuonesta otettu verinäyte. (Salmi ym. 2007: 641.)

Sikiön kaikututkimus ja sydämensykkeen rekisteröinti kardiotokografialla ovat tärkeitä menetelmiä arvioitaessa sikiön välitöntä vointia Rh-immunisaatiotapauksissa. Kaikututkimuksella seurataan nesteen kertymistä sikiöön, napalaskimon poikkimittaa, ns. sikiön bioprofiilia sekä istukan paksuutta. Napanuoran verivirtaus on kääntäen verrannollinen sikiön hemoglobiinin määrään. (Eklund ym. 1995: 270-271.)

Kaikututkimuksella voidaan mitata myös sikiön keskimmäisen aivovaltimon virtausnopeutta, mikä antaa lisätietoa sikiön anemian tilasta. Virtausnopeuksien on todettu kasvavan sikiön vaikeassa ja keskivaikeassa anemiassa. Anemiassa sikiön veren hapensitomiskyvyn heiketessä sikiön elimistö pyrkii korjaamaan tilannetta suurentamalla sydämen minuuttitilavuutta, mikä aiheuttaa virtausnopeuksien kasvua verisuonissa. Sikiö myös keskittää verenkiertoa elintärkeisiin elimiin kuten aivoihin, mikä myös osaltaan lisää aivovaltimon virtausnopeutta. (Ulander – Halmesmäki – Ämmälä 2004: 2900.)

3.4 Taudin hoito

Keskivaikeissa ja vaikeissa immunisaatiotapauksissa sikiön seuranta sekä mahdollinen kohdunsisäinen hoito on keskitetty yliopistosairaaloihin (Eklund ym. 1995: 270). Raskauden aikana hoito kohdistetaan sikiön anemian hoitamiseen. Anemiaa hoidetaan tarvittaessa kohdunsisäisellä verensiirrolla. Intrauteriinisessä verensiirrossa käytetään pääsääntöisesti O RhD- ja K-negatiivisia punasoluja, jotka siirretään yleensä napalaskimoon. Siirto on mahdollista antaa myös intrakardiaalisesti, intraperitoneaalisesti tai maksan porttilaskimoon. Sikiölle punasolusiirto ei ole täysin riskitön ja joudutaan joissain tilanteissa toistamaan useita kertoja. Tämän vuoksi hoitoa suunniteltaessa on suhteutettava riskit kuten keskenmeno tai enneaikainen synnytys immunisaation ja sen hoidon riskeihin. (Salmi ym. 2007: 641.) Kohdun sisäisiä verensiirtoja saa vuosittain noin kymmenen sikiötä (Koskinen – Kuosmanen 2005: 25-26.)

Vastasyntyneen lapsen hemolyyttisen taudin hoidossa tähdätään anemian hoitamiseen, hyperbilirubinemian ehkäisyyn sekä hemolyyysin vähentämiseen tai lopettamiseen. Vaikeimmissa tapauksissa vastasyntyneen ollessa hyvin aneeminen joudutaan tekemään välittömästi verenvaihto. (Salmi ym. 2007: 641-642.) Verenvaihdolla saadaan poistettua noin 90 %:a antigeeniposiitivisista soluista (Bromilow - Daniels 2007: 68). Verenvaihdossa käytetään koostevettä, joka koostuu pääsääntöisesti O RhD-negatiivisista valkosoluttomista punasoluista ja AB-veriryhmän Octaplas[®]-valmisteesta (Verivalmisteiden käytön opas 2009: 30). Määrällisesti lapsen verta vaihdetaan kaksi kertaa lapsen veritilavuuden verran, mikä on noin 160 ml painokiloa kohden. (Salmi ym. 2007: 641-642.) Verenvaihdon etuna on, että se poistaa lapsen verenkierrosta myös

yli 50 %:a vapaana olevaa bilirubiinia, jolloin bilirubiinipitoisuudet saadaan alenemaan (Bromilow - Daniels 2007: 68). Lisäksi samalla poistuu myös punasoluvasta-aineita, mikä vähentää hemolyysiä, anemisoitumista sekä bilirubiinin muodostumista. (Salmi ym. 2007: 641-642.) Koska bilirubiinia on myös kudosteissa, sen mahdollisimman täydelliseksi poistamiseksi joudutaan verenvaihtoon usein toistamaan (Leikola 1987: 52).

Lievimmissä tautitapauksissa hyberbilirubinemian hoitoon riittää sinivalohoito, jos hemolyysi ei ole kovin voimakasta (Salmi ym. 2007: 640). Bilirubiini absorboi valoa aallonpituudella 425 - 475 nm. Ihossa kiertävän veren bilirubiini muuttuu moneksi värittömäksi vähemmän myrkylliseksi aineeksi. Hemoglobiinia seurataan usean viikon ajan ja joskus joudutaan turvautumaan punasolusiirtoihin. (Eklund ym. 1995: 272.)

Yhtenä hoitona vastasyntyneen vasta-ainevälitteiseen hemolyysiin on immunoglobuliinien antaminen suonensisäisesti. Huonona puolena kyseisessä hoidossa voidaan pitää sitä, että usein vaaditaan useita annoksia immunoglobuliineja sekä sitä, että lopulta voidaan joutua kuitenkin verensiirtoihin anemian kehittyessä. (Salmi ym. 2007: 642.)

4 IMMUNOGLOBULIINIT JA IGG-ALALUOKAT

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat immuunijärjestelmään kuuluvia glykoproteiineja, joita esiintyy sekä plasmassa että muissa kudosteissa (Turgeon 2009: 10). Ne ovat plasmasoluiksi muuttuneiden lymfosyyttien erittämiä proteiineja. Vasta-aineita voidaan tutkia seerumista, mutta niitä esiintyy lisäksi limakalvoilla, syljessä sekä maidossa. Niiden toiminta liittyy elimistön antigeenin tunnistusvaiheeseen sekä soluvälitteiseen immuunisuuteen. (Leikola 1987: 2.) Vasta-aineet tarttuvat niille spesifisiin rakenteisiin eli antigeeneihin. Antigeenin kohtaa, johon vasta-aine sitoutuu, kutsutaan epitopiksi ja vasta-aineen vastaavaa rakenneosaa paratopiksi. Vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin voi olla tilapäinen tai pitkään pysyvä. Edellisessä vasta-aineen ja antigeenin välisen affiniteetin sanotaan olevan heikko, jolloin niiden irtautumistodennäköisyys toisistaan on suuri. Jälkimmäisessä tilanteessa affiniteetti puolestaan on vahva ja sidos on tällöin pidempiaikainen. (Seppälä 2005: 624.)

4.1 Vasta-aineiden tehtävät

Vasta-aineilla on osana ihmisen immuunijärjestelmää useita erilaisia tehtäviä. Tarttumalla virusten tai bakteerien pinnalla oleviin tarttumisproteiineihin ja peittämällä ne vasta-aineet pystyvät tehokkaasti neutraloimaan mikrobeja sekä myös toksineja, sillä tällöin mikrobien ja toksiinien soluun pääsy estyy. Lisäksi vasta-aineiden tarttuminen mikrobien pintaan edistää mikrobien fagosytointia. Fagosyytit eli syöjäsolut tunnistavat mikrobien pinnassa olevien vasta-aineiden Fc-osat ja tarttuvat niihin Fc-reseptoreillaan. Oponisaation seurauksena mikrobi ei pääse pakenemaan, jolloin mikrobin tuhoamismahdollisuudet kasvavat. (Seppälä 2005: 629.)

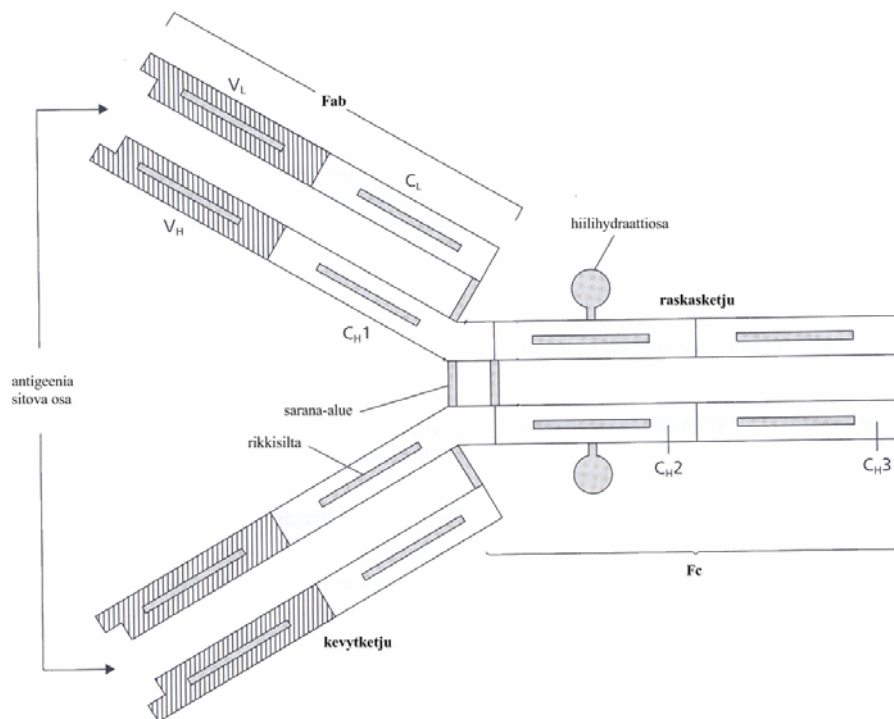
Vasta-aineiden tärkeitä tehtäviä on myös toimia komplementin aktivoijana sekä voimistaa tulehdusreaktioita. Komplementti aktivoituu vasta-aineen sitoutuessa antigeneihin. Tulehdusreaktioiden voimistaminen tapahtuu solunsisäisten signalointireittien välityksellä, kun solu sitoutuu vasta-aineen Fc-osaan ja saa reseptorinsa välityksellä tiedon vasta-aineen ja antigenin interaktiosta. (Seppälä 2005: 629 - 630.)

4.2 Vasta-aineiden yleisrakenne ja vasta-aineluokat

Vasta-aineiden perusrakenneyksikkö koostuu proteiiniirungosta sekä siihen liittyneestä pienestä hiilihydraattiosasta, mikä muodostaa Y-kirjaimen muotoisen rakenteen (kuvio 2). Perusrakenneyksikön runko koostuu kahdesta samanlaisesta heavy- eli raskasketjusta sekä kahdesta samanlaisesta light- eli kevytketjusta. Sidoksen raskasketjujen välille muodostavat kaksi tai useampi rikkisilta ja epäkovalenttiset sidokset. Kevytketjut liittyvät puolestaan raskasketjuun epäkovalenttisin sidoksin ja yleensä lisäksi yhdellä rikkisillalla. (Anstee - Klein 2005: 57-58; Seppälä 2005: 626.)

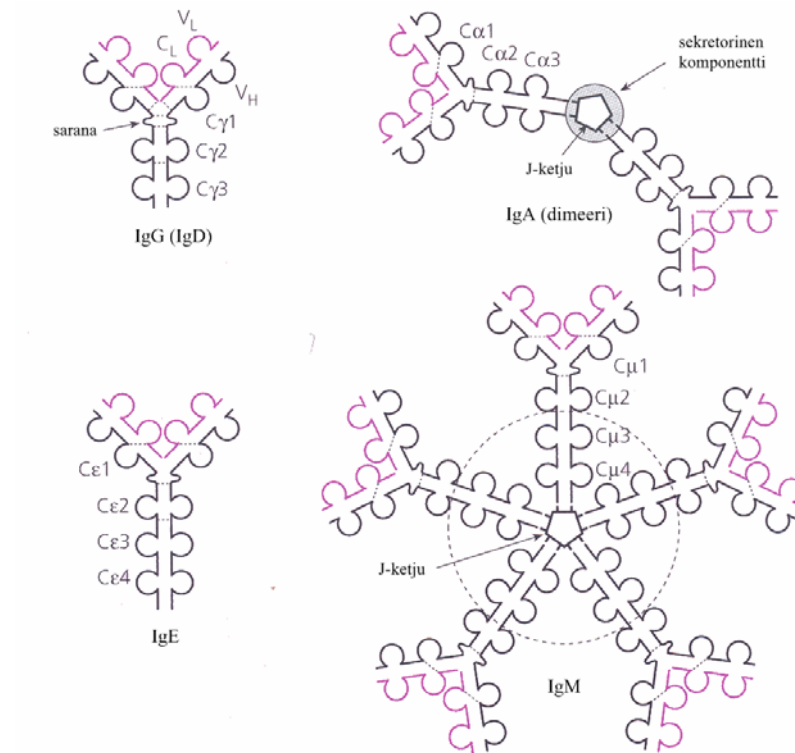
Yhdestä perusrakenneyksiköstä koostuvaa immunoglobuliinimolekyyliä kutsutaan monomeeriksi. Tällaista monomeerista immunoglobuliinimolekyyliä pidetään vasta-ainemolekyylien perusyksikkönä, jolla on kaksi paikkaa antigenin sitoutumiselle. Sitoutumispaikkoina toimivat raskas- ja kevytketjujen muodostamat parit Y-kirjaimen muotoisen molekyylin sakaroissa. (Seppälä 2005: 626.) Sakarat, joita kutsutaan Fab-osiksi (antigen-binding fragments), ovat liittyneenä joustavalla sarana-alueella

molekyylin varteen eli Fc-osaan (crystallizable fragments). Fc-osan välityksellä vasta-aine pystyy kiinnittymään muun muassa immuunijärjestelmän solujen pintaan sekä komplementin ensimmäiseen (C1q) komponenttiin saaden aikaan komplementin aktivoitumisen. (Turgeon 2009: 12-13.)



KUVIO 2. Immunoglobuliinin perusrakenneyksikkö (Mukaiillen Anstee - Klein 2005: 58).

Vasta-aineet voidaan jakaa rakenteidensa perusteella viiteen luokkaan, joita ovat IgG, IgM, IgA, IgE ja IgD (kuvio 3). Ne eroavat toisistaan raskaiden ketjujen rakenteiden perusteella. Raskaita ketjuja kutsutaan gamma- (γ), myy- (μ), alfa- (α), epsilon- (ϵ) ja deltaketjuiksi (δ). Kevyitä ketjuja on vain kahta lajia, kappa (κ) ja lambda (λ) ja niitä esiintyy kaikissa immunoglobuliiniluokissa. (Anstee - Klein 2005: 57; Seppälä 2005: 630-632). Immunoohematologian tärkeimmät vasta-aineluokat ovat IgG ja IgM. IgG:n ja IgM:n tärkein ero on molekyylikoko. (Leikola 1987: 3-4.) IgG muodostuu ainoastaan yhdestä immunoglobuliinin perusrakenneyksiköstä, eli kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta ketjusta, mutta IgM on viiden perusosan muodostama molekyyli (Anstee - Klein 2005: 57). IgA:n perusrakenne on samankaltainen kuin IgG:n. IgA:ta tuottavan solun tuottaessa myös J-ketjua syntyy dimeeristä IgA:ta ja lisäksi voi syntyä trimeerejä tai tetrameerejä. IgD ja IgE ovat monomeerejä. (Seppälä 2005: 633-634.)



KUVIO 3. Immunoglobuliiniluokkien rakenteet. Kevytketjut ovat kuvassa violetteja, raskasketjut mustia ja ketjujen väliset katkoviivat kuvaavat rikkisiltoja. (Mukaillen Seppälä 2005: 630.)

4.3 IgG-alaluokat

Suurin osa kaikesta veren ja kudosten immunoglobuliinista on IgG-luokan vasta-ainetta (Seppälä 2005: 632). IgG jakautuu neljään alaluokkaan: IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4. Alaluokat eroavat toisistaan rakenteeltaan ja biologisilta ominaisuuksiltaan (taulukko 1). (Anstee - Klein 2005: 60.) Eri IgG-luokan vasta-aineet voivat olla eri IgG-alaluokkaa ja myös samalla vasta-aineella IgG-alaluokkien osuudet voivat vaihdella. Rh-vasta-aineet ovat yleensä joko IgG1- tai IgG3-alaluokkaa tai molempia (Greiss - Urbaniak 2000: 49). Anti-K puolestaan on pääosin pelkästään IgG1-alaluokkaa (Ahaded ym. 2000: 1244; Bromilow - Daniels 2007: 47).

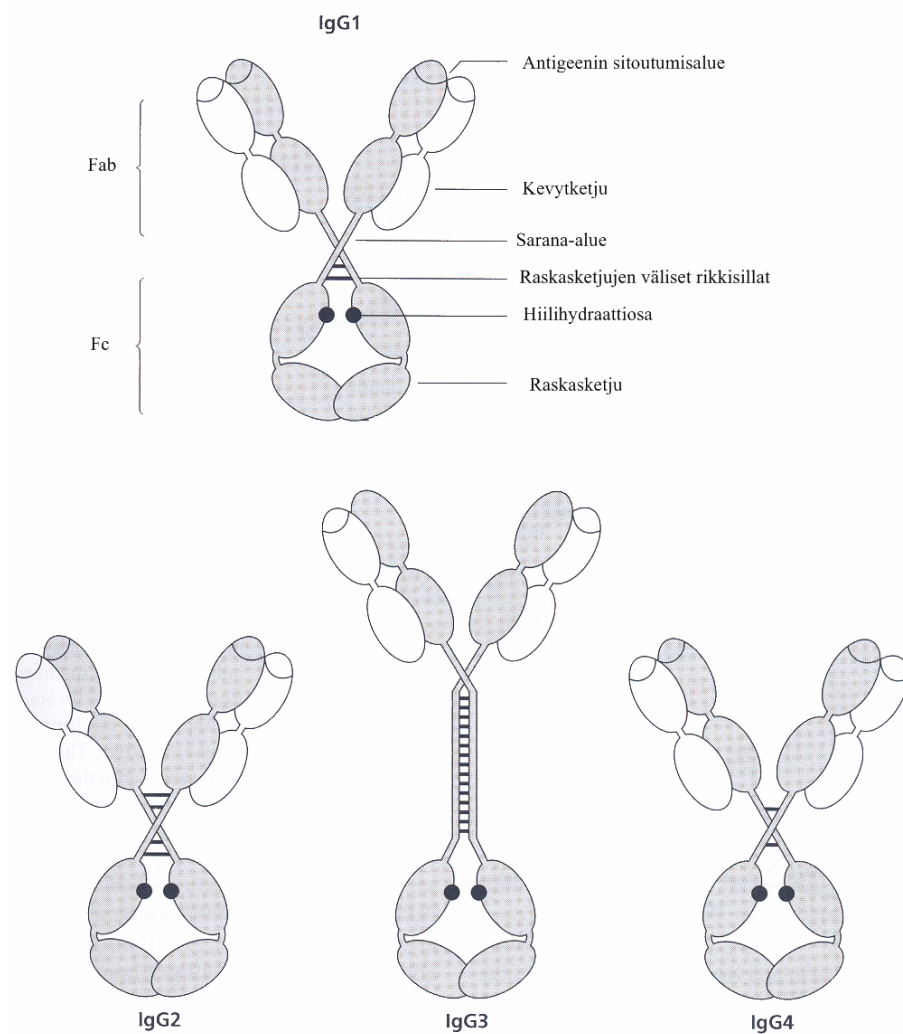
TAULUKKO 1. IgG-alaluokkien biologiset ominaisuudet (Mukaiillen Seppälä 2005: 631).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Konsentraatio (terveen aikuisen seerumissa)	7,0 g/l	3,0 g/l	0,6 g/l	0,5 g/l
Puoliintumisaika kehossa	23 vrk	21 vrk	7 vrk	21 vrk
Komplementin aktivoituminen	+++	+	+++	-
Opsonointikyky	+++	+	+++	-
Kulkeutuminen sikiöön	+++	++	++	++

4.3.1 Alaluokkien ominaisuudet

Veren IgG:stä noin 66 % on IgG1-alaluokkaa, 23 % IgG2-alaluokkaa, 7 % IgG3-alaluokkaa ja 4 % IgG4-alaluokkaa. Pääasialliset erot alaluokkien välillä ovat rikkisiltojen määrissä sekä sijainnissa raskasketjujen välillä saranakohdassa (kuvio 4). Sarana-alueiden erilaisuus aiheuttaa erot eri alaluokkien toimintaan, esimerkiksi kykyyn aktivoida komplementtia ja sitoutua antigeeniin. IgG3-alaluokalla on laajin sarana-alue ja eniten rikkisiltoja. (Stevens 2003: 63-64.) Pitkän sarana-alueen vuoksi IgG3-molekyylillä on myös hyvin joustava, minkä vuoksi näitä molekyylejä tarvitaan vähemmän solua kohti aikaansaamaan punasolun tuhoamisprosessin (Bromilow - Daniels 2007: 63). IgG-luokan vasta-aineella on pitkä biologinen puoliintumisaika verrattuna muihin vasta-aineluokkiin. Puoliintumisaika on noin kolme viikkoa muilla IgG-alaluokilla paitsi IgG3-alaluokalla noin viikko. (Seppälä 2005: 631-632.)

IgG-alaluokkien kyky aktivoida komplementtia vaihtelee. IgG1- ja IgG3-alaluokat aktivoivat komplementtia tehokkaasti, kun taas IgG2-alaluokka vain heikosti. IgG4-alaluokka ei aktivoi komplementtia ollenkaan. (Anstee - Klein 2005: 60.) IgG-vasta-aineet aktivoivat komplementtia sen aktivaatioreitin C3-vaiheeseen. Komplementin C3-komponenteilla ja IgG-vasta-aineilla yhdessä punasolun pinnalla on synergistinen vaikutus opsonisaatiolle, mikä indusoi tehokkaasti fagosytoosia. Tämä saa aikaan erittäin tehokkaan punasolujen tuhoamisen ja poistamisen verenkierrosta, mikä tapahtuu tällöin pääsääntöisesti maksassa. (Bromilow - Daniels 2007: 63). Jos punasolun pintaan on kiinnittyneenä IgG-vasta-aineita, jotka eivät aktivoi komplementtia, punasolut tuhoutuvat ekstravaskulaarisesti ensisijaisesti pernan makrofagien toimesta. Esimerkiksi Rh-vasta-aineet harvoin aktivoivat komplementtia, vaikka ne ovat IgG1- ja IgG3-alaluokkaa. (Greiss - Urbaniak 2000: 49-50.)



KUVIO 4. IgG-alaluokkien rakenteet (Mukaillen Anstee - Klein 2005: 59).

4.3.2 IgG1- ja IgG3 -alaluokkien merkitys sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttiselle taudille

IgG1 ja IgG3 ovat merkittävimmät IgG-alaluokat vastasyntyneen hemolyyttisen taudin syntymekanismeissa. Vaikka kaikki IgG-alaluokat läpäisevät istukan, vain IgG1 ja IgG3 kykenevät herkistämään punasolut makrofaagien fagocytoosille saaden aikaan mahdollisen punasolujen hemolysoitumisen. (Strohm 2005: 428.) Jotta vasta-aineet kykenisivät aiheuttamaan punasolun fagocytoitumisen, tulee punasolujen olla päällystetty joko 1000-4000 IgG1-molekyylillä tai 135-500 IgG3-molekyylillä. IgG3-vasta-ainetta tarvitsee olla suhteessa vähemmän kuin IgG1-vasta-ainetta, jotta se voi aiheuttaa punasolun fagocytoitumisen. (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste.)

IgG1 läpäisee istukan aikaisemmin kuin IgG3, mikä mahdollistaa suuremman IgG1-pitoisuuden ja suuremman punasolutuhon sikiön verenkierrassa kohdussa ja tällöin napasuonesta mitattu hemoglobiinitaso syntymähetkellä on matala. IgG3 läpäisee istukan paljon myöhemmässä vaiheessa raskautta kuin IgG1. IgG3-alaluokan määrä ei saavuta yhtä korkeaa tasoa kuin IgG1-alaluokka sikiön verenkierrassa, mistä johtuen se ei myöskään aiheuta yhtä suurta punasolutuhoa sikiölle. Tällöin syntymähetkellä mitattu napahemoglobiinitaso on korkeampi. IgG3-alaluokka aiheuttaa kuitenkin syntymän jälkeen suurempaa punasolutuhoa, mikä johtaa bilirubiinitason nousemiseen. Tämä kertoo IgG3-alaluokan suuremmasta potentiaalista aiheuttaa hemolyysiä syntymän jälkeen. (Strohm 2005: 428.) Brossard ym. (2002: 1543) ovat todenneet tutkimuksessaan, että ainoastaan 1/3 äidin seerumin anti-D:n IgG3-alaluokan osuudesta voidaan havaita vastasyntyneen punasolujen pinnalla. Tutkimuksessa todettiin myös, että vastasyntyneen hemolyyttinen tauti oli sitä vakavampi, mitä enemmän äidin seerumissa oli IgG1-vasta-ainetta, mutta puolestaan sitä lievempi, mitä enemmän vastasyntyneen punasolujen pinnalle oli sitoutunut IgG3-vasta-ainetta. Kuitenkin suureen IgG3-alaluokan osuuteen äidin seerumin anti-D-vasta-aineesta todettiin liittyvän viivästynyt riski sikiön anemiaan. (Brossard ym. 2002: 1543.)

Useat tutkijat ovat yrittäneet osoittaa merkityksen IgG1- ja IgG3-alaluokkien suhteen ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin vaikeusasteen välillä, mikä ei kuitenkaan ole ollut helppoa (Brown ym. 1995: 170). Ansteen ja Kleinin mukaan (2005: 511) yhdessä tutkimuksessa on todettu, että anti-D-immunisaatiossa esiintyessä ainoastaan IgG3 vasta-ainetta, taudin vakavuus on vähäisempi kuin tilanteissa, joissa esiintyy ainoastaan IgG1-vasta-ainetta tai sekä IgG1- että IgG3-vasta-aineita. Toisessa tutkimuksessa heidän mukaan on todettu, että sekä IgG1- että IgG3-vasta-aineen esiintyessä, oli IgG1 yleensä vallitsevampi ja vakavin tauti korreloi IgG1:n määrän kanssa. Toisten tutkimusten mukaan, kun ainoastaan IgG1 havaittiin, oli tauti vakavampi, vähemmän vakava tai ei eroa kuin tilanteessa, jossa sekä IgG1 että IgG3 havaittiin. Tällaisten eroavaisuuksien uskotaan johtuvan IgG1-alaluokan osuuden vaihtelusta tilanteissa, joissa esiintyy kumpaakin alaluokkaa. Todennäköisemmin IgG1-alaluokka korreloi kuitenkin paremmin taudin vaikeusasteeseen kuin IgG3-alaluokka. (Anstee - Klein 2005: 511.)

5 RASKAUDENAIKAISET VERIRYHMÄ- JA VASTA-AINETUTKIMUKSET

Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu on tehnyt jo vuodesta 1990 alkaen Suomessa kaikki raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset (Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset 2008). Kaikilta äitiysneuvolan asiakkaina olevilta naisilta tutkitaan raskausaikana ABO- ja RhD-veriryhmä sekä seulotaan punasoluvasta-aineet (Yleisohje VR-YO-073; Verensiirto-opas 2006: 74). Tutkimusten tarkoituksena on löytää sikiön terveyttä uhkaavat punasoluvasta-aineet ja ennakoida näin mahdolliset riskiraskaudet. Jos punasoluvasta-aineita löydetään, niiden pitoisuutta seurataan säännöllisesti. (Verensiirto-opas 2006: 74.) Vuosittain tutkitaan noin 65 000 odottavan äidin näytteet, joista noin 250 löydetään merkityksellinen vasta-aine. Taulukossa 2 on esitettynä yleisimmät äideillä esiintyvät vasta-aineet. Tutkimustulokset säilytetään kansallisessa rekisterissä ja niitä käytetään raskauden seurannassa. (Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset 2008.)

TAULUKKO 2. Veripalvelun tilasto: Yleisimmät äideillä esiintyvät vasta-aineet / vuosi (K. Sulin, henkilökohtainen tiedoksianto 8.9.2009)

Vasta-aine	Äidillä/vuosi
anti-D, Rh-suojaus	180 – 250
heikko tunnistamaton	150 - 200
anti-E	50 - 90
anti-c, -cE	50 - 80
anti-M	30 - 40
anti-D	40 - 60
anti-K	40 - 60
anti-Fy ^a	10 - 20
anti-Le ^a	10 - 20
anti-Jk ^a	5 - 10

Raskausviikoilla 8-12 jokaisen äidin näytteestä tutkitaan ABO- ja RhD-veriryhmä sekä tehdään vasta-aineseulonta. RhD-negatiivisille äideille tutkimus tehdään myös raskausviikoilla 24–26 sekä 36 suuremman immunisaatoriskin vuoksi. Lisäksi RhD-positiivisille äideille tehdään tutkimus toistamiseen noin kuukautta ennen laskettua aikaa, jos heille on tehty verensiirtoja tai heille on aiemmin syntynyt kellastunut lapsi. (Viisainen 1999: 22.)

Mikäli vasta-aineseulonta on positiivinen eli äidin näytteestä löydetään punasoluvasta-aineita, tehdään vasta-ainetunnistus sekä tarvittaessa pitoisuus määritetään titraamalla (Verensiirto-opas 2006: 74). Jos anti-D-titteri on 16 tai sen yli, määritetään anti-D pitoisuus kvantitatiivisesti entsyymi-immunologisella menetelmällä (Sulin 2008: 13).

Kvantitaation tulos antaa lisätietoa sikiön anemisoitumisen riskin arvioimiseen raskauden aikana. Vasta-ainetitterin selvä nousu (esimerkiksi titteristä 2 titteriin 8) ennustaa immunisaation vaikeutumista. Korkeita vasta-ainepitoisuuksia esiintyy eniten Rh-järjestelmän (D-, E- ja c-antigeenit) ja Kell-järjestelmän (K-antigeeni) antigeeneja kohtaan. (Koskinen – Kuosmanen 2005: 25) Äidiltä pyydetään seurantanäytteet noin kuukauden välein, jos hänellä todetaan sikiön terveyden kannalta merkityksellinen vasta-aine. Tällä tavoin seurataan vasta-ainepitoisuuden muutosta sekä tutkitaan onko äiti muodostanut mahdollisesti uusia vasta-aineita. (Verensiirto-opas 2006: 74.)

Jos äidiltä löydetään sikiön kannalta merkityksellinen vasta-aine, voidaan myös isän näyte tutkia. Isän näytteestä tutkitaan ABO- ja RhD-veriryhmä, tehdään vasta-aineseulonta ja määritetään Rh-antigeenit C, E, c ja e sekä K-antigeeni. Jos isä on K-positiivinen, tehdään myös k-antigeenimääritys. Näytteestä tutkitaan myös se antigeeni, jota vastaan äidin vasta-aine on muodostunut. (Yleisohje VR-YO-048.) Isän ollessa negatiivinen kyseisen antigeenin suhteen, myös sikiö on negatiivinen. Tällöin vauvalla ei ole vaaraa sairastua vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin ja äidin vasta-ainetutkimusten määrää voidaan vähentää. Jos isällä on kyseinen antigeeni, isä on joko heterotsygootti tai homotsygootti kyseisen antigeenin suhteen. Isän ollessa heterotsygootti hänen lapsillaan on 50 %:n mahdollisuus periä kyseinen antigeeni. Isän ollessa homotsygootti kaikki lapset perivät kyseisen antigeenin. Koska kummassakin tapauksessa vauvalla on vaara sairastua vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin, seurataan äidin veren vasta-ainepitoisuutta tiiviisti koko raskauden ajan. (Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset 2008.)

Sikiön punasolujen D-, E-, c- ja K-antigeenit voidaan määrittää lapsivesinäytteestä PCR-tekniikalla 16. raskausviikon jälkeen. Määrittämisestä on hyötyä silloin, kun äidillä on korkea vasta-ainetaso ja lapsella on 50 %:n todennäköisyys periä isältään tutkittava antigeeni. Jos sikiö todetaan negatiiviseksi kyseisen antigeenin suhteen, voidaan raskaus vapauttaa tiheästä seurannasta. (Koskinen – Kuosmanen 2005: 25)

6 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin soveltuvuutta osaksi immunisointuneiden äitien seurantaprosessia. Tulosten perusteella voidaan arvioida, onko kortti käyttökelpoinen ja saataisiinko kortin avulla lisää tietoa sikiön tilasta immunisaatioissa. Veripalvelu voisi tällöin selvittää tarkemmin asiakkaiden kiinnostusta kyseiselle tutkimukselle. Kyseinen geelikortti ei tiettävästi ole käytössä tässä tarkoituksessa missään muualla Suomessa.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää:

Soveltuuko Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortti osaksi immunisointuneiden äitien seurantaprosessia Veripalvelussa?

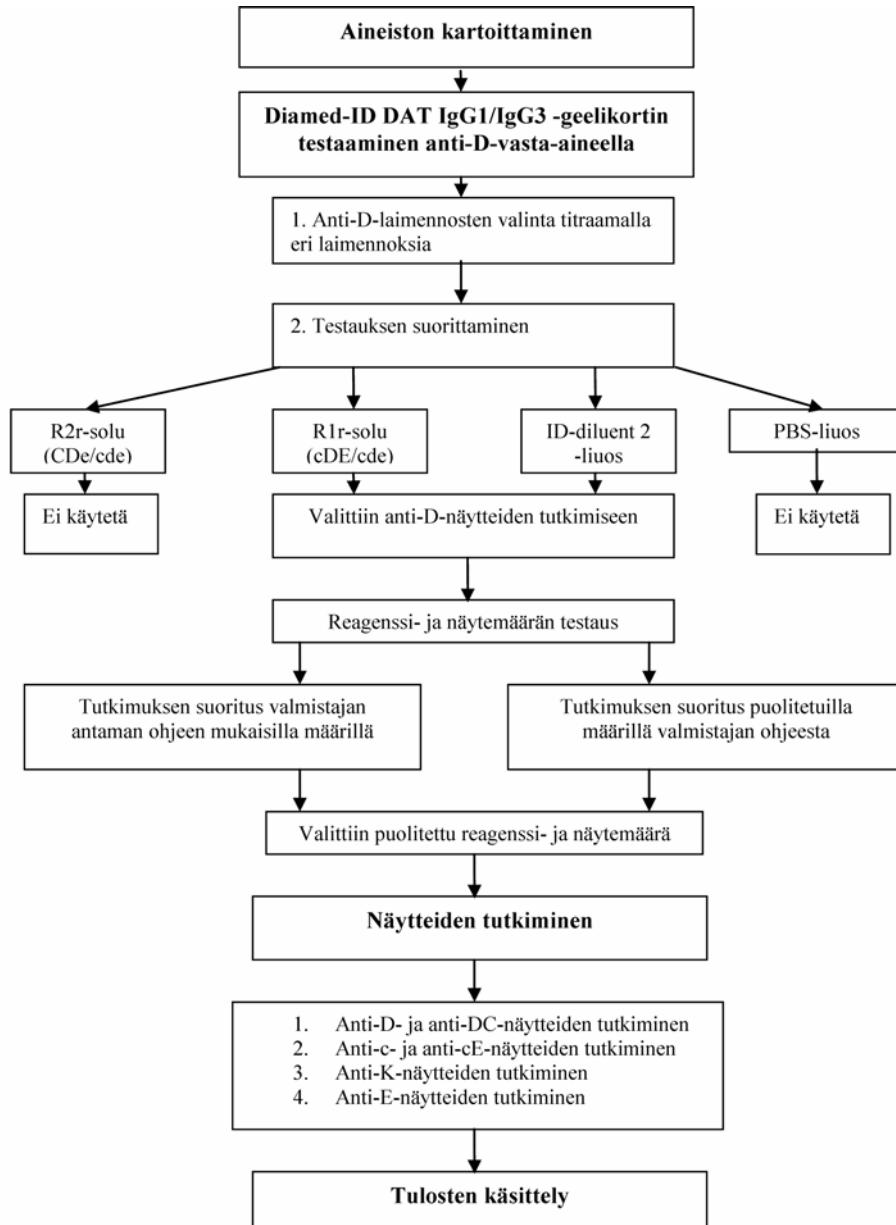
- 1 Kortin testaus ja toimivuuden osoitus: Minkälaisia eroja alaluokkien välillä saadaan kortilla näkyviin?
 - Kortin toimivuutta testataan tunnetulla anti-D-vasta-aineella, josta tehdään laimennoksia, jotka vastaavat tittereiltään potilasnäytteiden tittereitä.
 - Laimennokset tutkitaan potilasnäytteiden tapaan käyttäen Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia, jolloin voidaan nähdä kortin herkkyys eri tittereillä sekä erot alaluokkien välillä.

- 2 Millaisia tuloksia kortilla saadaan? Mikä alaluokkien suhde näytteissä on? Minkälaisia alaluokkien välisiä eroja samalla vasta-aineella eri potilaiden välillä saadaan? Entä millaisia alaluokkien välisiä eroja eri vasta-aineiden välillä saadaan?
 - Tutkimuksessa analysoidaan oikeita potilasnäytteitä, jotka sisältävät anti-D-, anti-c-, anti-E- tai anti-K-vasta-aineen, käyttäen Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia, jolloin voidaan havaita, onko alaluokkien välillä eroja ja minkälaisia ne ovat.

- Tutkimuksessa analysoidaan eri vasta-aineita sisältäviä näytteitä, jolloin voidaan havaita, esiintyykö eri vasta-aineiden välillä eroavaisuuksia.
- 3 Minkälainen yhteys näytteen titterillä on vastasyntyneen hemolyyttisen taudin korkeaan ja keskinkertaiseen riskiin geelikortin antaman tuloksen mukaisesti? Miten eri IgG-alaluokkia sisältävät näytteet jakautuvat kyseisiin riskeihin?
- Näytteiden titterit jaetaan matalaan (0-8/0-4) ja korkeaan (yli 16/yli 8) sekä geelikortin antamat tulokset valmistajan ohjeen mukaisesti vastasyntyneen hemolyyttisen taudin keskinkertaiseen ja korkeaan riskiin.
 - Näytteet jaetaan luokkiin myös sen mukaan, onko niissä ollut havaittavissa enemmän IgG1- vai IgG3-alaluokkaa.
 - Tällöin voidaan katsoa, kuinka eri titteri- ja IgG-luokat jakautuvat riskiluokkiin.
- 4 Minkälaisia eroja IgG1/IgG3-alaluokkien suhteessa on saman äidin raskauden eri vaiheissa otettujen näytteiden välillä?
- Tutkimuksessa analysoidaan saman äidin raskauden eri vaiheissa otettuja näytteitä geelikortilla, jolloin voidaan nähdä mahdollinen alaluokkien välisen suhteen muutos raskauden edetessä.

7 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Tutkimusosuus suoritettiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa potilastutkimusten veriryhmäserologisessa laboratoriossa. Tutkimus koostui eri vaiheista, jotka on esitetty kuviossa 5.

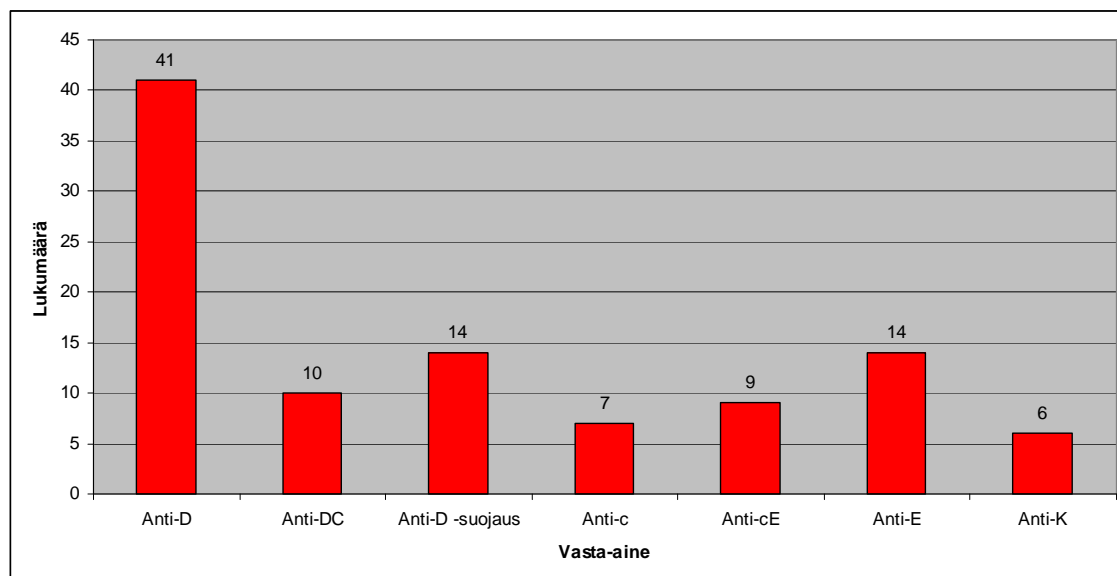


KUVIO 5. Tutkimuksen suorittamisen eri vaiheet.

7.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineisto koostui immunisoituneiden äitien plasmanäytteistä, joista oli tutkittu ABO- sekä RhD-veriryhmä, tehty vasta-aineseulonta sekä tarvittavat jatkotutkimukset. Kyseisistä näytteistä oli todettu ja tunnistettu jokin vasta-aine. Laboratorion henkilökunta oli pakastanut rutiinitutkimusten jälkeen näytteistä noin 0,5 – 2 ml plasmaa. Pakastetut näytteet sisälsivät eri vasta-aineita ja olivat titteriltään sekä anti-D kvantitaatioltaan erilaisia (hyvin heikkoja sekä vahvoja). IgG-alaluokat-projektia varten näytteitä oli kerätty marraskuusta 2008 toukokuuhun 2009. Lisäksi tutkittiin näytteitä vanhoista immunisaatiotapauksista, joista oli tietoa myös syntyneen lapsen tilasta. Näytteitä oli kerättyä eri raskauden vaiheista ja samalta potilaalta 1-6 näytettä. Projektia varten kerättyjä näytteitä oli yli sata, joista valittiin ensin vasta-aineet, joita haluttiin tutkia. Tutkittaviksi vasta-aineiksi valittiin anti-D, anti-E, anti-c sekä anti-K. Näytteet saattoivat sisältää tutkittavan vasta-aineen lisäksi myös muita vasta-aineita tai vasta-aineet saattoivat olla kahden vasta-aineen kombinaatioita kuten anti-cE tai anti-DC. Kyseiset vasta-aineet valittiin niiden suuren kliinisen merkittävyyden vuoksi sekä siksi, että näitä vasta-aineita sisältäviä näytteitä oli lukumäärällisesti eniten tai niistä löytyi hyvin erilaisia pitoisuuksia vasta-ainetta.

Tutkimusaineisto koostui 55 äidin näytteistä, joita oli yhteensä 101. Anti-D:n sisältäviä näytteitä tutkittiin yhteensä 65, joista 10 sisälsi anti-DC-vasta-ainekombinaation ja 14:ssä tiedettiin tai epäiltiin vasta-aineen johtuvan annetusta anti-D-suojauksesta. Tutkittavat näytteet olivat vasta-ainepitoisuuksiltaan vaihtelevasti hyvin matalasta korkeaan. Titterit vaihtelivat nollan ja 128:n välillä ja anti-D-vasta-aineen kvantitatiiviset määrät kolmen ja 121 IU/ml välillä. Anti-c:n sisältäviä näytteitä tutkittiin 16, joista yhdeksän oli anti-cE-vasta-ainekombinaatioita. Näiden näytteiden titterit vaihtelivat nollan ja 32:n välillä. Anti-E:n sisältäviä näytteitä tutkittiin 14 ja niiden titterit vaihtelivat yhdestä 16:een. Anti-K:n sisältäviä näytteitä tutkittiin kuusi ja niiden titterit vaihtelivat yhdestä 256:een. Kuviossa 6 on nähtävillä tutkitut näytemäärät vasta-aineittain.



KUVIO 6. Tutkitut näytemäärät vasta-aineittain. Yhteensä tutkittuja näytteitä oli 101 kappaletta.

Aluksi kaikkien potilaiden saman raskauden aiempiakin näytteitä koskevat paperit kopioitiin ja paperit järjestettiin potilaiden mukaan aakkostettuna kansioon. Sen jälkeen tehtiin Excel-taulukko näytteiden tiedoista, kuten potilaan henkilötiedot, näyttenumero ja näytteenottopäivämäärä, vasta-aine sekä mahdollinen titteri ja anti-D-kvantitaatio. Jäljitettävyyden vuoksi äidit numeroitiin yhdestä 55:een ja jokaisen äidin näytteet näytteenottojärjestyksen mukaan.

7.2 Tutkimuksessa käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit

Kaikki tutkimuksessa käytetyt laitteet ja välineet ovat Veripalvelun laboratoriossa päivittäisessä käytössä. Laitteet ovat numeroituja ja kirjattu laiteluetteloon sekä lisäksi niitä huolletaan ja niiden toimintaa seurataan säännöllisesti. Tarvitut reagenssit olivat joko Veripalvelun reagenssivalmistuksessa valmistettuja tai ulkopuoliselta valmistajalta Veripalvelun hankkimia. Käytetyt Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortit tilattiin tutkimusta varten Sveitsistä.

Käytettyjä laitteita olivat serologinen sentrifugi (DiaMed Diacent-12), vesihaude, automaattinen solupesusentrifugi (DiaMed DiaCent-CW), mikroskooppi (Olympus CK) sekä sekoittaja (Vortex Genie 2).

Käytettyjä välineitä olivat lasiset koeputket ja putkitelineet, manuaali- ja automaattipipetit tarvittavilla tilavuuksilla sekä niihin sopivat pipetinkärjet, telineet geelikorteille pipetointia varten ja valopöytä.

Käytettyjä reagensseja olivat Veripalvelun anti-D Forte -reagenssi, Biotestin AB-kontrolliseerumi (erä 1110606, LOT 1731101), fosfaattipuskuroitu suolaliuos eli PBS-liuos (valmistettu 25.5.09), DiaMedin ID-diluent 2 (LOT 05761.19.10), B. Braun Ecotainer® 0,9 % natriumkloridi (NaCl), Alba Biosciencen monoklonaalinen anti-IgG-reagenssi (LOT V068996) ja ORTHOn Coombs Control AHG-kontrollisolut (LOT K596). Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS-liuos) valmistettiin laimentamalla fosfaattipuskuri (67 mmol/l, pH 7,25-7,30) 1:10 natriumkloridilla (9 mg/ml).

Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin (LOT 50890.15.01) kaivot sisälsivät geelissä sekä monoklonaalista anti-IgG1- että monoklonaalista anti-IgG3-vasta-ainetta kahtena eri vahvuutena (1:1 ja 1:100) ja lisäksi anti-IgG-vasta-ainetta 1:10 laimennoksena.

Käytetyt testipunasolut olivat erikseen valituilta verenluovuttajilta peräisin ja Veripalvelussa rutiinikäytössä olevia punasoluja, jotka oli laimennettu noin 4 % DiaMedin Cellstab-säilöntäliuoksella. Rh-vasta-aineiden (anti-D, -E, -c) tutkimiseen käytetyt testipunasolut olivat Rh-fenotyypiltään R1r (CDe/cde), R2r (cDE/cde) ja R1R2 (CDe/cDE) ja anti-K-vasta-aineen tutkimiseen käytettiin Veripalvelun SPRV-punasolupaneelin 6. solua, mikä on fenotyypiltään heterotsygootti K-antigeenin suhteen (K/k).

7.3 Laboratoriotutkimusmenetelmät

Tutkimusosuudessa käytettiin kahta laboratoriotutkimusmenetelmää. Vasta-ainetitteri määritettiin epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä ja Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortti perustui geelipylväsagglutinaatiomenetelmään.

7.3.1 Vasta-ainetitterin määrittäminen epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä

Vasta-aineiden titraus on semikvantitatiivinen menetelmä, jossa punasoluvasta-ainepitoisuus määritetään plasmasta tai seerumista. IgG-luokan vasta-aineiden pitoisuuden määrittämiseen käytetään epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää. Tutkittavan näytteen plasmasta tehdään laimennossarja fosfaattipuskuroituun fysiologiseen 0,9 % suolaliuokseen (PBS-liuos). Jokaisen laimennoksen annetaan reagoida testisolujen kanssa 30 minuuttia +37 °C lämpöhauteessa. Näytteessä oleva vasta-aine sitoutuu testipunasolun pinnalla olevaan antigeeniin. (Tutkimusmenetelmäohje VR-3405.) Inkuboinnin jälkeen sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois 0,9 % natriumkloridilla ennen anti-humaaniglobuliinireagenssin (AHG-reagenssi) lisäystä, koska muuten ne neutraloisivat AHG-reagenssin tarttumalla reagenssin sisältämiin anti-IgG-molekyyleihin ja saattaisivat näin ollen aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia. Punasolujen pintaan tarttuneet vasta-aineet osoitetaan AHG-reagenssilla, mikä on yleisimmin anti-IgG:n ja anti-komplementin (anti-C3d) seos. Sentrifugoinnin aikana anti-humaaniglobuliini sitoutuu punasolujen pinnalle kiinnittyneisiin vasta-aineisiin ja anti-komplementti punasolujen pintaan kiinnittyneisiin komplementtimolekyyleihin. Tämä aiheuttaa siltojen muodostumisen punasolujen välille ja havaitaan punasolujen agglutinaationa koeputkessa. (Verensiirto-opas 2006: 45 - 47.)

Titrauksen tulos ilmoitetaan sen laimennoksen käänteislukuna, jossa agglutinaatio on vielä silminnähtävä (Tutkimusmenetelmäohje VR-3405). Määrityksen antiglobuliinivaiheessa saatu negatiivinen tulos varmistetaan käyttämällä AHG-kontrollisoluja, jotka ovat IgG:llä päällystettyjä punasoluja. AHG-kontrollisolut varmistavat AHG-reagenssin toimivuuden ja pesuvaiheen onnistumisen. AHG-kontrollisolut agglutinoituvat, jos AHG-reagenssi toimii. Negatiivinen tulos voidaan hyväksyä ainoastaan silloin, kun AHG-kontrollisoluilla saadaan silmin havaittava agglutinaatio. Määritys on uusittava, mikäli kontrollisolut antavat negatiivisen tuloksen. (Tutkimusmenetelmäohje VR-3405; Verensiirto-opas 2006: 47 - 48.) Reaktiivoimakkuudet tulkitaan putkimenetelmää käytettäessä ja silmin luettaessa taulukon 3 mukaisesti.

TAULUKKO 3. Reaktivoimakkuuksien tulkinta putkimenetelmää käytettäessä (Yleisohje VR-YO-043).

++++	Agglutinaatti ei juuri hajoa putkea ravisteltaessa ja tausta on kirkas.
+++	Agglutinaatti hajoo useaksi suureksi osaksi ja tausta on kirkas.
++	Agglutinaatio muodostuu useista pienistä agglutinaateista, eikä tausta ole aivan kirkas.
+	Agglutinaatio on heikko ja näkyy paljain silmin juuri ja juuri. Tausta on samea.
-	Ei havaittavissa agglutinaatiota, kaikki solut ovat vapaina.

7.3.2 IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen määrittäminen DiaMed-ID geelikorttimenetelmällä

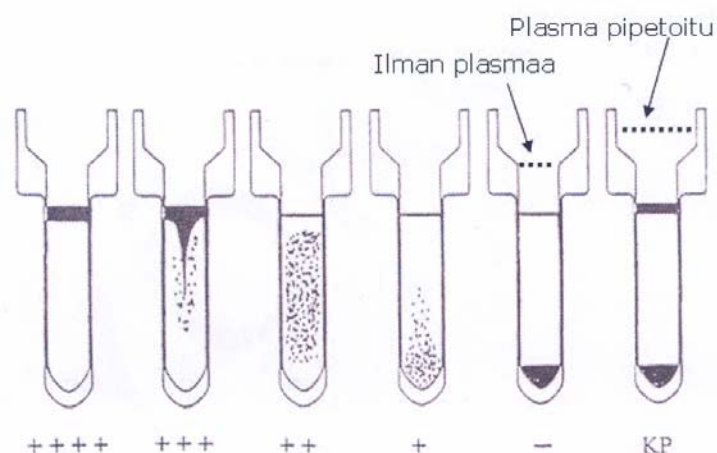
DiaMed-ID geelikorttimenetelmä on pylväsagglutinaatiomenetelmä. Menetelmässä käytetään korttia, jossa on kuusi mikroputkea. Kortin yläosassa olevalle reaktioalueelle pipetoidaan punasolut ja plasma. Punasolususpensio tehdään DiaMed ID-diluent 2-liuokseen. Korttia inkuboidaan tavallisesti 15 minuuttia, jona aikana punasolut ja plasma reagoivat keskenään. Tämän jälkeen kortti sentrifugoidaan ja sentrifugoinnin aikana agglutinoituneet punasolut jäävät geelin pinnalle tai geeliin ja vapaat punasolut kulkeutuvat pylvään pohjalle. (Verensiirto-opas 2006: 47.)

Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortti sisältää monoklonaalista anti-IgG1- ja anti-IgG3-vasta-ainetta kumpaakin kahtena eri laimennoksena, 1:1 ja 1:100. Lisäksi kortissa on yksi mikropylväs, joka sisältää anti-IgG-vasta-ainetta 1:10 laimennoksena sekä yksi pylväs, joka toimii negatiivisena kontrollina. (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste.)

Määritettäessä IgG1- ja IgG3-alaluokkien välistä suhdetta annetaan tutkittavan vasta-ainetta sisältävän plasman sekä vastaavan antigeenin sisältävien testipunasolujen reagoida keskenään 30 minuutin ajan 37 °C lämpöhauteessa (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste). Tänä aikana plasmassa oleva vasta-aine sitoutuu punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin. Inkuboinnin jälkeen solut pestään

0,9 % NaCl:lla, jolloin sitoutumattomat vasta-aineet peseytyvät pois. Mikäli vapaana olevia vasta-aineita ei poistettaisi, sitoutuisi geelikortin mikropylväiden sisältämät anti-IgG-molekyylit myös niihin aiheuttaen mahdollisesti virheellisesti heikomman agglutinaation tai negatiivisen tuloksen. (Verensiirto-opas 2006: 45 - 47.) Pestyt punasolut suspensoidaan ID-diluent 2-liuokseen, joka vahvistaa kortilla tapahtuvia reaktioita. Punasolususpensio pipetoidaan kortin kaivoihin ja kortti sentrifugoidaan (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste). Sentrifugoinnin aikana kortin kaivoissa oleva anti-IgG sitoutuu punasoluihin kiinnittyneisiin vasta-aineisiin ja agglutinoi ne (Verensiirto-opas 2006: 45 - 47).

Kortilla näkyvän reaktion voimakkuus riippuu muun muassa punasoluihin sitoutuneen vasta-aineen sekä kortilla olevan anti-IgG:n määrästä. Positiivinen reaktio kaivossa, jossa anti-IgG:tä on 1:1 tarkoittaa, että noin 1000 IgG1- tai 125 IgG3-molekyyliä on sitoutunut yhteen punasoluun. Tämä siis tarkoittaa, että veressä on vähintään se vähimmäismäärä vasta-ainemolekyyliä, mikä tarvitaan aiheuttamaan punasolujen fagosytoituminen. Negatiivinen reaktio kaivoissa, joissa anti-IgG:tä on 1:1, tarkoittaa, että alle 1000 IgG1- tai alle 125 IgG3-molekyyliä on sitoutunut yhteen punasoluun, mikä ei riitä aiheuttamaan punasolun fagosytoitumista. Positiivinen reaktio kaivossa, jossa anti-IgG:tä on 1:100, kertoo korkeasta IgG-pitoisuudesta tutkittavassa näytteessä. Negatiivinen reaktio ei kuitenkaan tarkoita, että näytteessä ei voisi olla vasta-ainetta ollenkaan. Tällöin vasta-ainetta ei vain ole tarpeeksi aiheuttamaan positiivista reaktiota. Myöskään voimakkaampi reaktio anti-IgG3- kuin anti-IgG1-kaivoissa ei tarkoita, että näytteessä olisi suurempi määrä IgG3-alaluokkaa, vaan sitä on vain enemmän suhteessa aiheuttamaan punasolujen fagosytoituminen. (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste.) Kortin reaktiovoimakkuudet (kuvio 7) tulkitaan taulukon 4 mukaisesti.



KUVIO 7. Reaktivoimakkuuksien tulkinta geelikortilta (Yleisohje VR-YO-043).

TAULUKKO 4. Reaktivoimakkuuksien tulkinta geelikorttimenetelmää käytettäessä (Yleisohje VR-YO-043).

++++	Solut ovat kerroksena geelin päällä.
+++	Suurin osa soluista on kerroksena geelin päällä, mutta osa on kulkeutunut alaspäin.
++	Solut ovat koko geelin alueella.
+	Osa soluista on geelin alueella, osa mikroputken pohjalla.
-	Kaikki solut ovat mikroputken pohjalla tasaisena kerroksena.
KP	Kaksoispopulaatio, jossa osa soluista antaa selvän agglutinaation, osa ei agglutinoidu.

Täysin negatiivisen tuloksen ja yhden plussan reaktion välissä käytetään seuraavia merkintöjä:

(+)	Heikosti positiivinen, soluja selvästi geelin alueella.
- ^r	Ei täysin negatiivinen, rajapinta ei ole selvärajainen, yksittäisiä soluja geelin alueella.

Geelikortilla saatuja tuloksia tulkitaan valmistajan antaman ohjeen mukaisesti. Kyseisen ohjeen mukaan hemolyysin riski luokitellaan keskinertaiseksi, jos ainoastaan 1:1 kaivo antaa positiivisen reaktion joko toisella tai molemmilla vasta-aineella. Hemolyysin riski luokitellaan korkeaksi, mikäli myös 1:100 kaivo antaa positiivisen reaktion joko toisella

tai molemmilla vasta-aineella. Valmistajan antama ohje ei anna selvitystä riskin tasosta tilanteessa, jossa ainoastaan anti-IgG 1:10 kaivo antaa positiivisen tuloksen.

7.4 Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin testaaminen

Ennen varsinaisen tutkimuksen suorittamista tehtiin geelikortin toimivuuden testaus. Korttitestauksen tarkoituksena oli varmistaa ja todentaa kortin toimivuus sekä määrittää kortin herkkyys eri vahvuisille vasta-ainetittereille.

7.4.1 Geelikortin testauksessa käytettyjen anti-D-laimennosten valinta

Korttitestauksen ensimmäisessä vaiheessa erilaisista anti-D laimennoksista määritettiin titterit, joiden tuli edustaa mahdollisimman hyvin potilasnäytteiden anti-D tittereitä. Titrauksessa käytettiin anti-D Fortea, joka laimennettiin Biotestin kontrolliseerumiin. Testisoluna oli 4 % Veripalvelun säilöntäliuoksessa (Cellstab) oleva R2r-testisolu, jota kortin valmistaja suosittelee käytettäväksi. Titraukset tehtiin laimennoksista 1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 sekä laimentamattomasta anti-D Fortesta. Kaikista laimennoksista määritettiin titteri molempien opinnäytetyön tekijöiden toimesta. Tarkoituksena oli testata myös ”titrauskäsialoja”, kuinka samanlaisia ne ovat keskenään sekä verrata tuloksia laboratorion henkilökunnan aiemmin saamiin tuloksiin Veripalvelun sisäiseltä laadunarviointikierrokselta, jolla he titrasivat samoja laimennoksia. Samalla nähtiin myös laimennosten tittereiden toistettavuus.

Titraukset suoritettiin Veripalvelun tutkimusmenetelmäohjeen VR-3405 mukaisesti. Aluksi tehtiin puolilaimennossarja PBS-liuokseen (1:2, 1:4, 1:8 ja niin edelleen) putkissa. Laimennossarjan tekemisen jälkeen tehtiin vasta-ainetitterisarja. Putkiin pipetoitiin kutakin laimennosta ja testisoluja 1:1. Putket sekoitettiin ja niitä inkuboitiin 30 minuuttia +37 °C:ssa vesihauteessa. Inkuboinnin jälkeen putket pestiin automaattisella solupesuseentrifugilla neljä kertaa ja putkiin lisättiin anti-IgG-reagenssia. Putkia sentrifugoitiin serologisella sentrifugilla. Tämän jälkeen tulokset luettiin Veripalvelun yleisohjeen VR-YO-043 mukaan (taulukko 3) aloittaen viimeisestä putkesta. Epäselvät ja heikot reaktiot varmistettiin mikroskoopissa. Lopuksi putkiin, joissa ei ollut silmin havaittavaa agglutinaatiota, lisättiin AHG-kontrollisoluja. Tämän

jälkeen putkia sentrifugoitiin serologisella sentrifugilla. Negatiivinen tulos oli hyväksyttävissä vain, jos kontrollisolu antoi silmin havaittavan (vähintään 1 +) reaktion.

Laimennosten tittereiden tulokset on esitetty taulukossa 5. Tittereiden tulokset olivat muuten yhteneväisiä keskenään, paitsi laimennoksen 1:200, josta toistettiin molemmat titraukset ja saatiin edelleen samat tulokset. Lisäksi titraukset uusittiin laimennoksella 1:100 saaden samat tulokset kuin aiemmin. Titrauksen tehtiin vielä laimennoksella 1:50 käyttäen solua R1r, jota yleensä käytetään anti-D tittereiden tekemiseen Veripalvelussa, jotta voitiin verrata tulosta R2r-solulla saatuun tulokseen. Tuloksiksi saatiin 16, mikä oli yhden korkeampi kuin R1r-solulla saatu tulos. Nämä tulokset kuitenkin käytännössä tulkitaan yhtä suuriksi menetelmässä sallitun vaihtelun vuoksi.

TAULUKKO 5. Anti-D Forte -laimennosten titraustulokset.

Anti-D Forte -laimennos	Titteri		Solu
	Kirsi	Pauliina	
1:1	256	256	R1r
1:5	64	64	R1r
1:25	16	16	R1r
1:50	8	8	R1r
1:50	16	16	R2r
1:100	4	4	R1r
1:200	2	8	R1r

Saatujen titteritulosten perusteella korttitestaukseen valittiin laimennokset 1:5, 1:25, 1:200 sekä laimentamaton anti-D Forte. Kyseiset laimennokset valittiin sen vuoksi, että niiden titteritulokset vastasivat oikeiden potilasnäytteiden tittereitä. Asiantuntijan kanssa sovittiin 1:200 laimennoksen valinnasta, vaikka siitä oli saatu eriävät tulokset, koska se kuitenkin edusti kaikkein laimeinta vasta-ainetasoa verrattuna tutkittaviin näytteisiin. Korttitestaus tehtiin molemmilla soluilla, R1r ja R2r.

7.4.2 Geelikortin testauksen suorittaminen

Korttitestaus suoritettiin määrittämällä IgG-alaluokkien suhde Anti-D Forte laimennoksista käyttäen Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia. Tutkimus tehtiin kortin valmistajan ohjeen mukaisesti. Testisoluina käytettiin sekä R1r- että R2r-testisoluja ja laimennosliuoksina sekä ID-diluent 2- että PBS-liuosta. Molempia soluja testattiin, koska ohje suosittelee käyttämään solua R2r, mutta anti-D vasta-ainetitterit

tehdään Veripalvelussa yleensä solulla R1r. Testauksella haluttiin nähdä, onko tuloksissa eroa solusta riippuen. Lisäksi testattiin molempia laimennosliuoksia, koska ohje suosittelee käyttämään ID-diluent 2 liuosta, mutta titterit tehdään PBS-liuokseen. Tarkoituksena oli saada selville, vahvistaako jompikumpi laimennosliuos reaktioita enemmän kortilla.

Ensimmäiseksi pipetoitiin 200 µl valmista n. 5 % R2r-solususpensiota kahdeksaan koeputkeen ja R1r-solususpensiota kahdeksaan putkeen. Kutakin anti-D Forte laimennosta lisättiin 400 µl kahteen R2r-solususpensiota sisältävään putkeen ja kahteen R1r-solususpensiota sisältävään putkeen. (Taulukko 6.) Tämän jälkeen putkia inkuboitiin 30 minuuttia +37 °C:ssa vesihauteessa ja putket pestiin NaCl:lla automaattisella solupesuentrifugilla kolme kertaa. Seuraavaksi lisättiin 1000 µl ID-diluent 2-liuosta kunkin laimennoksen sekä R1r- (4 kpl) että R2r- (4 kpl) solususpensiota sisältävään putkeen. Vastaavasti lisättiin 1000 µl PBS-liuosta kunkin laimennoksen sekä R1r- (4 kpl) että R2r- (4 kpl) solususpensiota sisältävään putkeen. (Taulukko 7.) Tämän jälkeen geelikortit tarkastettiin mahdollisten geelissä olevien ilmakuplien ja muiden kortissa mahdollisesti olevien visuaalisesti havaittavissa olevien vikojen varalta sekä merkittiin ne laimennoksella, laimennosliuoksella ja solulla (esimerkiksi ”1:1 ID2 R1r”). Tämän jälkeen pipetoitiin 50 µl jokaista suspensiota omalle merkitylle kortilleen, kortin jokaiseen kuuteen kaivoon (taulukko 8). Kortteja sentrifugoitiin ID-sentrifugilla 10 minuuttia, jonka jälkeen tulokset luettiin ja tulkittiin valopöydällä Veripalvelun yleisohjeen VR-YO-043 mukaan (taulukko 4).

TAULUKKO 6. Solujen ja laimennosten pipetointikaavio.

Solu:	Laimennos:				
	1:1	1:5	1:25	1:200	
R2r					R2r-solut (200 µl) ja laimennos (400 µl)
R2r					R2r-solut (200 µl) ja laimennos (400 µl)
R1r					R1r-solut (200 µl) ja laimennos (400 µl)
R1r					R1r-solut (200 µl) ja laimennos (400 µl)

TAULUKKO 7. Solujen suspensointikaavio.

Solu:	Laimennosliuos:	Laimennos:				
		1:1	1:5	1:25	1:200	
R2r	ID-2					Lisätään 1000 µl ID-2 liuosta R2r-putkeen (4kpl)
R2r	PBS					Lisätään 1000 µl PBS-liuosta R2r-putkeen (4kpl)
R1r	ID-2					Lisätään 1000 µl ID-2-liuosta R1r-putkeen (4kpl)
R1r	PBS					Lisätään 1000 µl PBS-liuosta R1r-putkeen (4kpl)

TAULUKKO 8. Suspensioiden pipetointi kortille.

Suspensio	Määrä
1:1 ID-2 R1r	6 x 50 µl
1:5 ID-2 R1r	6 x 50 µl
1:25 ID-2 R1r	6 x 50 µl
1:200 ID-2 R1r	6 x 50 µl
1:1 PBS R1r	6 x 50 µl
1:5 PBS R1r	6 x 50 µl
1:25 PBS R1r	6 x 50 µl
1:200 PBS R1r	6 x 50 µl
1:1 ID2 R2r	6 x 50 µl
1:5 ID2 R2r	6 x 50 µl
1:25 ID2 R2r	6 x 50 µl
1:200 ID2 R2r	6 x 50 µl
1:1 PBS R2r	6 x 50 µl
1:5 PBS R2r	6 x 50 µl
1:25 PBS R2r	6 x 50 µl
1:200 PBS R2r	6 x 50 µl

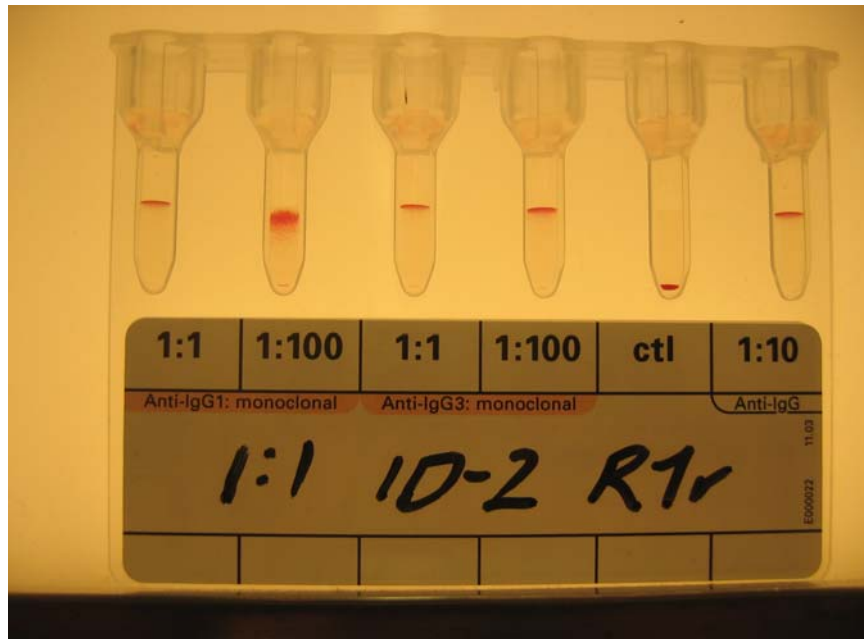
7.4.3 Geelikortin testauksen tulokset

Geelikortin testaus osoitti kortin toimivuuden, sillä IgG-kaivoihin saatiin näkyviin positiivisia reaktioita ja lisäksi kontrollikaivot olivat negatiivisia. Kaikki tulokset ovat nähtävissä taulukossa 9. Laimennoksissa 1:1, 1:5 ja 1:25 olivat IgG1- ja IgG3-alaluokkien pitoisuudet korkeat eli sekä 1:1 että 1:100 kaivot antoivat positiivisen reaktion. Reaktivoimakkuuksien perusteella anti-D Fortessa oli kuitenkin IgG3-alaluokkaa enemmän suhteessa kykyyn aiheuttaa punasolun fagosytoitumisen. Laimennoksessa 1:200 IgG3-alaluokan pitoisuus oli edelleen korkea, mutta IgG1-alaluokan pitoisuus oli matala eli 1:100 ei enää antanut positiivista reaktiota. Testaustulokset osoittivat, että geelikortilla on havaittavissa myös mahdollinen alaluokkien suhteiden välinen ero.

TAULUKKO 9. Geelikorttitestauksen tulokset.

Laimennos	Laimennosliuos ja solu	anti-IgG1 1:1	anti-IgG1 1:100	anti-IgG3 1:1	anti-IgG3 1:100	ctl	anti-IgG 1:10
1:1	ID2 R1r	4+	3+	4+	4+	-	4+
1:5	ID2 R1r	4+	3+	4+	4+	-	4+
1:25	ID2 R1r	4+	2+	4+	3+	-	4+
1:200	ID2 R1r	3+	- ^r	2+	1+	-	4+
1:1	PBS R1r	4+	3+	4+	3+	-	4+
1:5	PBS R1r	4+	3+	4+	3+	-	4+
1:25	PBS R1r	4+	2+	4+	2+	-	4+
1:200	PBS R1r	3+	- ^r	2+	1+	-	4+
1:1	ID2 R2r	4+	2+	4+	3+	-	4+
1:5	ID2 R2r	4+	2+	4+	3+	-	4+
1:25	ID2 R2r	4+	2+	4+	2+	-	4+
1:200	ID2 R2r	3+	- ^r	2+	1+	-	4+
1:1	PBS R2r	4+	2+	4+	3+	-	4+
1:5	PBS R2r	4+	2+	4+	2+	-	4+
1:25	PBS R2r	4+	2+	4+	2+	-	4+
1:200	PBS R2r	3+	- ^r	2+	1+	-	4+

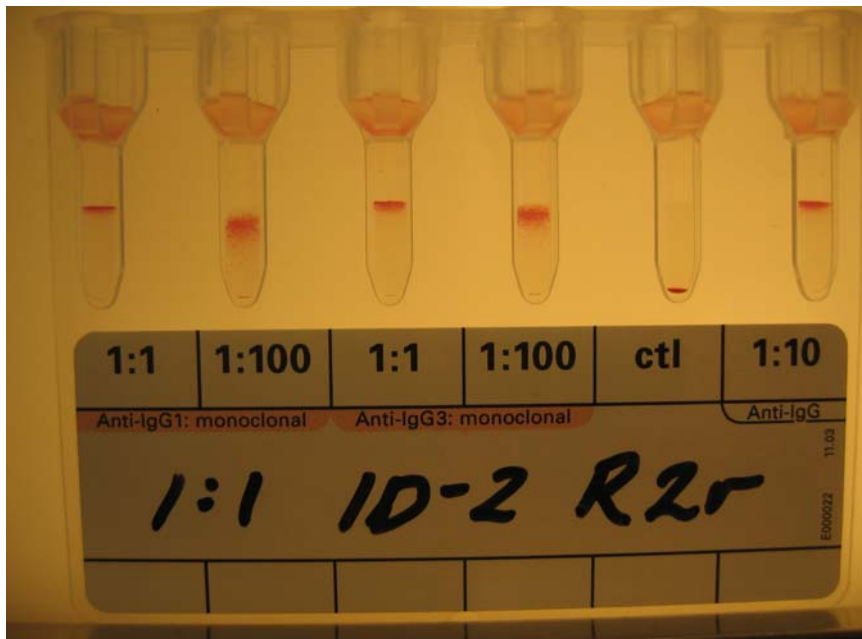
Tulosten perusteella solut, jotka oli laimennettu ID-diluent 2 -liuokseen, antoivat jonkin verran selkeämmät reaktiot, kuin PBS-liuokseen laimennetut solut (kuvio 8 ja 9). Ero näkyi varsinkin IgG3-kaivoissa. Soluista puolestaan R1r antoi vahvemmat reaktiot, mikä näkyi etenkin terävämpinä neljän plussan reaktioina, minkä voi havaita verratessa kuvioita 8 ja 10.



KUVIO 8. Laimentamaton (1:1) anti-D Forte ja ID-diluent 2 -liuokseen suspensoidut R1r (CDe/cde) -solut.



KUVIO 9. Laimentamaton (1:1) anti-D Forte ja PBS-liuokseen suspensoidut R1r (CDe/cde) -solut.

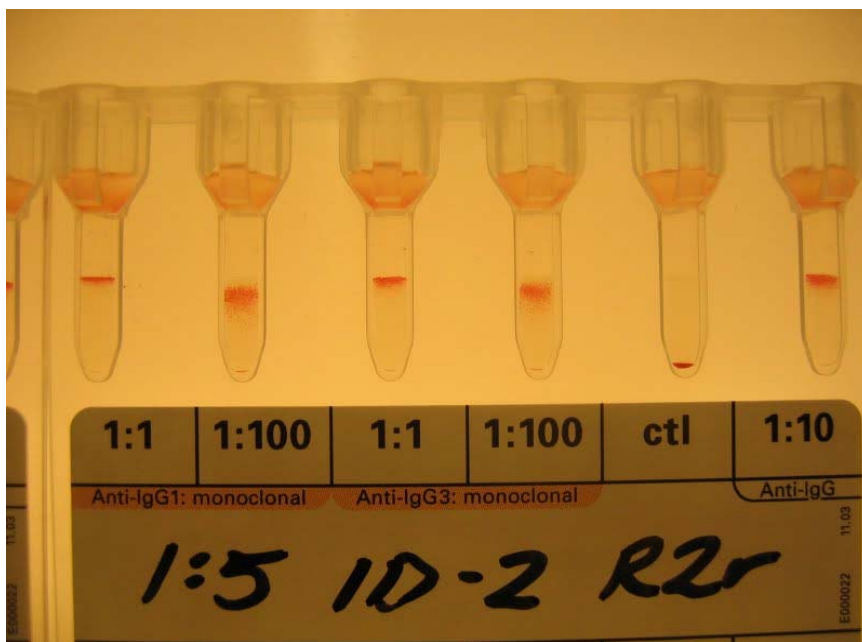


KUVIO 10. Laimentamaton (1:1) anti-D Forte ja ID-diluent 2 -liuokseen suspensoidut R2r (cDE/cde) -solut.

Alaluokkien suhteiden välinen ero saatiin toistuvasti näkymään selkeämmin R1r-solulla kuin R2r-solulla verrattaessa anti-IgG3 1:100 -kaivoja (kuvio 11 ja 12).



KUVIO 11. 1:5 laimennettu anti-D Forte ja ID-diluent 2 -liuokseen suspensoidut R1r (CDe/cde) -solut.



KUVIO 12. 1:5 laimennettu anti-D Forte ja ID-diluent 2 -liuokseen suspensoidut R2r (cDE/cde) -solut.

Laimennoksella 1:200 ei ollut enää eroja näkyvissä eri solujen ja laimennosliuosten välillä. Korttien testaus osoitti, että myös matalatitterillisissä näytteissä voi olla tarpeeksi IgG1- tai IgG3-alaluokkaa saamaan aikaan positiivinen reaktio kortilla. Anti-D-näytteiden tutkimisessa käytettäväksi valittiin R1r-solu, koska sillä tehdään tavallisesti kaikki anti-D-titterit ja se antoi korttitestauksessa vahvemmat ja selkeämmät

reaktiot eroamatta kuitenkaan suuresti valmistajan ohjeen suosittelemasta R2r-solusta. Laimennosliuokseksi valittiin ID-diluent 2 -liuos, koska siihen laimennetut solut antoivat korttitestauksessa selkeämmät reaktiot ja se oli myös valmistajan ohjeen mukainen laimennosliuos.

7.4.4 Näytteiden tutkimisessa käytettyjen reagenssi- ja näytemäärien testaaminen

Ennen varsinaisten potilasnäytteiden analysoimista testattiin vielä käytettävät reagenssi- ja näytemäärät. Valmistaja suosittelee käyttämään testaukseen 0,4 ml plasmaa, mutta suuresta osasta näytteitä ei ollut niin paljon plasmaa käytettävissä. Korttia testattiin työohjeen suosittelemalla määrällä sekä puolitetulla määrällä. Testaukseen valittiin kaksi näytettä, joilla oli vahva titteri. Testauksessa käytettiin valmista noin 5 % R1r-solususpensiota. Kahteen putkeen pipetoitiin 200 µl ja kahteen putkeen 100 µl solususpensiota. Tämän jälkeen lisättiin 200 µl plasmaa 100 µl solususpensiota sisältävään putkeen ja 400 µl plasmaa 200 µl solususpensiota sisältävään putkeen. Seuraavaksi näytteitä inkuboitiin +37 °C:ssa vesihauteessa ja putket pestiin NaCl:lla automaattisella solupesuseentrifugilla kolme kertaa. Seuraavaksi lisättiin alun perin 400 µl plasmaa ja 200 µl solususpensiota sisältäviin putkiin 1 ml ID-diluent 2 -liuosta ja 200 µl plasmaa ja 100 µl solususpensiota sisältäviin putkiin 0,5 ml ID-diluent 2 -liuosta. Kortit merkittiin näytenumeroilla ja reagenssimäärällä sekä tarkastettiin mahdollisten silmin havaittavien vikojen, kuten esimerkiksi ilmakuplien, varalta. Jokaista suspensiota pipetoitiin 50 µl omalle merkitylle kortilleen, kortin jokaiseen kuuteen kaivoon. Kortteja sentrifugoitiin ID-sentrifugilla 10 minuuttia, jonka jälkeen tulokset luettiin valopöydällä ja tulkittiin Veripalvelun yleisohjeen VR-YO-043 mukaisesti (taulukko 5).

Käytettyjen reagenssi- ja näytemäärien välillä ei havaittu eroja, joten yhdessä asiantuntijan kanssa päätettiin käyttää varsinaisten potilasnäytteiden tutkimiseen puolitettuja reagenssi- ja näytemääriä valmistajan ohjeesta poiketen.

7.5 Näytteiden tutkiminen

Anti-D-näytteiden tutkimiseen käytettiin solua R1r, anti-c- ja anti-E-näytteiden tutkimiseen R1R2-solua ja anti-K-näytteiden tutkimiseen SPRV-punasolupaneelin solua 6, joka on fenotyypiltään heterotsygootti K-antigeenin suhteen (K/k). Korkeintaan 24

näytettä analysoitiin kerrallaan. Ensimmäiseksi putket merkittiin tutkittavien näytteiden näyttenumeroilla. Jokaiseen putkeen pipetoitiin automaattipipetillä 100 µl solususpensiota, minkä jälkeen putkiin lisättiin 200 µl tutkittavaa plasmaa. Putkia inkuboitiin +37 °C:ssa vesihauteessa, jonka jälkeen ne pestiin 0,9 % natriumkloridilla automaattisella solupesusentrifugilla kolme kertaa. Seuraavaksi jokaiseen putkeen lisättiin 500 µl ID-diluent 2-liuosta automaattipipetillä ja tarkistettiin suspension tasaisuus. Mahdolliset rakeiset suspensiot jätettiin pipetoimatta kortille, koska niistä olisi tullut kaikki kaivot, myös kontrolli, positiiviseksi. Tulos ei olisi ollut tulkittavissa positiivisesta kontrollista johtuen, minkä vuoksi kortteja ei haluttu tuhjata. Kortit merkittiin näyttenumerolla ja tarkistettiin mahdollisten silmin havaittavien vikojen, kuten esimerkiksi ilmakuplien, varalta. Jokaista suspensiota pipetoitiin 50 µl omalle merkitylle kortilleen, kortin jokaiseen kuuteen kaivoon. Kortteja sentrifugoitiin ID-sentrifugilla 10 minuuttia, jonka jälkeen tulokset luettiin ja tulkittiin valopöydällä Veripalvelun yleisohjeen VR-YO-043 mukaan (taulukko 4).

7.6 Tutkimustulosten käsittely

Tutkimuksessa saadut tulokset kirjattiin Excel-taulukoon, johon oli jo aikaisemmin kirjattu näytteiden tiedot ja vasta-aineet sekä mahdollisen titterin ja anti-D-kvantitaation tulos. Näytteistä, joiden anti-D-vasta-aineen oli todettu johtuvan suojauksesta, nimettiin anti-D-suojaus-näytteiksi ja näytteet, joiden anti-D-vasta-aineen epäiltiin johtuvan suojauksesta, nimettiin anti-D-suojaus?-näytteiksi.

Tulokset syötettiin Excel-taulukosta SPSS-tilastolaskentaohjelmaan (Statistical Package for Social Sciences), jolla ne käsiteltiin. Tuloksia luokiteltiin niiden sisältämien vasta-aineiden, tittereiden ja kortin antaman vasta-syntyneen hemolyyttisen taudin riskin mukaan ja näistä luokista tehtiin ristiintaulukointeja. Tarkemmin tuloksista tehdyistä luokista ja ristiintaulukoinneista on kerrottu luvussa 6.3 Näytteiden jakautuminen riskiluokkiin.

8 TUTKIMUSTULOKSET

8.1 Geelikortin toimivuuden testauksen tulokset

Geelikorttitestauksen tulokset osoittivat, että kortti toimii. Kortin kaivot antoivat positiivisia reaktioita ja kortilla oli myös nähtävissä ero IgG1- ja IgG3-alaluokkien välillä. Kortin antaman tuloksen perusteella anti-D Fortessa oli havaittavissa enemmän IgG3-alaluokkaa suhteessa kykyyn aiheuttaa punasolujen fagosytoituminen. Tuloksista on kerrottu tarkemmin luvussa 5.4.3 Geelikortin testauksen tulokset. Kaikki tulokset ovat nähtävillä taulukossa 8.

8.2 Koko aineiston tulokset

Potilasnäytteiden tuloksissa saman vasta-aineen sisällä oli havaittavissa eroja IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisissä suhteissa. Osassa näytteistä oli kontrollikaivo positiivinen, joten niiden näytteiden tuloksia ei otettu huomioon.

Anti-D-vasta-aineen sisältävien näytteiden alaluokkien välinen suhde vaihteli eri äitien välillä (taulukko 10). Osassa näytteistä oli vain anti-IgG1 kaivot positiivisia, osassa vain anti-IgG3 kaivot positiivisia ja osassa molemmat olivat positiivisia. Joissakin näytteissä taas kaikki kaivot olivat negatiivisia tai vain anti-IgG 1:10 kaivo oli positiivinen. Kokonaan negatiivisia tai vain anti-IgG 1:10 -positiivisia olivat anti-D-suojaus- ja anti-D-suojaus?-näytteet sekä näytteet, joiden titteri oli ≤ 1 . Myös reaktioiden voimakkuudet vaihtelivat eri näytteiden ja eri potilaiden välillä.

TAULUKKO 10. Anti-D- ja anti-DC-vasta-aineen sisältävien näytteiden tulokset.

Äiti	Näyte	Vasta-aine	Titteri	Kvantit. (IU/ml)	anti-IgG1 1:1	anti-IgG1 1:100	anti-IgG3 1:1	anti-IgG3 1:100	ctl	anti-IgG 1:10
1	2.	D	16	7	3+	-	4+	3+	-	4+
	1.	D	8	5	3+	-	4+	3+	-	4+
2	1.	DC	8	8	4+	3+	-	-	-	4+
4	1.	DC	8	9	4+	2+	-	-	-	4+
5	1.	D	32	3	4+	2+	2+	(+)	-	4+
6	2.	D	16	6	4+	3+	1+	-	-	4+
	1.	D	8	6	4+	1+	(+)	-	-	4+
7	1.	D	32	14	4+	3+	-	-	-	4+
8	1.	DC	128	46	4+	3+	4+	3+	-	4+
9	2.	D	0	-	-	-	-	-	-	1+
	1.	D	0	-	-	-	-	-	-	1+
10	2.	D	4	-	1+	-	4+	3+	-	4+
	1.	D	4	-	2+	-	4+	3+	-	4+
11	2.	D	32	52	4+	3+	4+	3+	-	4+
	1.	D	16	32	4+	3+	4+	3+	- ^f	4+
12	2.	DC	-	-	-	-	-	-	-	1+
15	2.	D	32	45	- ^f	-	4+	4+	-	4+
	1.	D	64	40	- ^f	-	4+	3+	-	4+
16	1.	D	16	10	3+	-	3+	2+	-	4+
19	2.	DC	32	19	4+	2+	4+	3+	-	4+
	1.	DC	32	19	4+	2+	4+	3+	-	4+
20*	2. b	D	16	6	4+	1+	-	-	-	4+
	1. b	D	16	8	4+	2+	-	-	-	4+
	1. a	D	64	11	4+	3+	-	-	-	4+
21	1.	D	64	66	4+	3+	2+	1+	-	4+
23	3.	D	32	17	4+	3+	3+	1+	-	3+
	2.	D	32	13	4+	2+	3+	1+	-	4+
	1.	D	64	13	4+	3+	3+	1+	-	4+
25	1.	DC	1	-	-	-	-	-	-	1+
26	1.	D	32	11	2+	- ^f	4+	3+	-	4+
27	2.	D	2	-	1+	-	-	-	-	3+
	1.	D	2	-	1+	-	-	-	-	3+
28	4.	D	16	5	4+	2+	- ^f	- ^f	- ^f	4+
	3.	D	8	-	4+	2+	- ^f	- ^f	- ^f	4+
29	1.	D	64	20	4+	3+	-	-	-	4+
30	2.	D	16	8	-	-	4+	3+	-	4+
	1.	D	16	8	-	-	3+	3+	-	3+
33	2.	D	32	-	2+	- ^f	4+	3+	-	4+
34	1.	D	16	29	3+	-	4+	3+	-	4+
35	1.	D	4	-	-	-	3+	2+	-	3+
36	2.	D	0	-	-	-	2+	-	-	2+
	1.	D	0	-	-	-	2+	-	-	2+

* Äidiltä numero 20 oli näytteitä kahdesta eri raskaudesta (a ja b).

Näytteissä, joissa vasta-aineena oli joko anti-c tai anti-E, alaluokkien välinen suhde vaihteli eri potilaiden välillä kuten aiemmin käsitellyn anti-D:n kohdalla (taulukko 11). Näytteissä oli havaittavissa pelkästään anti-IgG1, pelkästään anti-IgG3 tai molempia. Lisäksi joissakin näytteissä vain anti-IgG 1:10 kaivo oli positiivinen.

TAULUKKO 11. Anti-c-, anti-cE- ja anti-E-vasta-aineen sisältävien näytteiden tulokset.

Äiti	Näyte	Vasta-aine	Titteri	anti-IgG1 1:1	anti-IgG1 1:100	anti-IgG3 1:1	anti-IgG3 1:100	ctl	anti-IgG 1:10
38	2.	cE	2	2+	-	-	-	-	3+
	1.	cE	2	1+	-	-	-	-	3+
39	3.	c	16	3+	-	4+	3+	-	4+
	2.	c	32	2+	-	4+	3+	-	4+
	1.	c	32	2+	-	4+	3+	-	4+
40	1.	c	8	2+	-	-	-	-	3+
41	1.	cE	1	1+	- ^f	2+	1+	- ^f	3+
42	1.	cE	0	2+	-	-	-	-	3+
43	2.	cE	2	2+	-	-	-	-	4+
	1.	cE	2	2+	-	-	-	-	4+
44	2.	cE	16	4+	1+	-	-	-	4+
	1.	cE	16	3+	1+	-	-	-	4+
45	3.	c	2	-	-	1+	(+)	-	2+
	2.	c	1	-	-	2+	1+	-	3+
	1.	c	1	-	-	2+	1+	-	2+
46	4.	E	16	3+	-	3+	3+	-	4+
	3.	E	16	3+	-	4+	3+	-	4+
	2.	E	16	3+	-	4+	3+	-	4+
	1.	E	16	3+	-	4+	3+	-	4+
47	2.	E	1	- ^f	-	1+	- ^f	- ^f	2+
	1.	E	1	-	-	-	-	-	2+
48	2.	E	4	4+	1+	-	-	-	4+
	1.	E	4	3+	- ^f	-	-	-	4+
49	1.	E	1	1+	-	-	-	-	2+
50	2.	E	2	-	-	2+	1+	-	3+
	1.	E	2	-	-	1+	- ^f	-	3+

Kaikissa kuudessa näytteessä, joissa vasta-aineena oli anti-K, oli ainoastaan anti-IgG1-kaivot positiivisia eikä näytteissä ollut havaittavissa IgG3-alaluokkaa lainkaan tällä menetelmällä (taulukko 12).

TAULUKKO 12. Anti-K-vasta-aineen sisältävien näytteiden tulokset.

Äiti	Näyte	Vasta-aine	Titteri	anti-IgG1 1:1	anti-IgG1 1:100	anti-IgG3 1:1	anti-IgG3 1:100	ctl	anti-IgG 1:10
52	1.	K	1	3+	1+	-	-	-	4+
53	1.	K	32	3+	- ^f	-	-	-	4+
54	3.	K	64	2+	-	-	-	-	4+
	2.	K	64	2+	-	-	-	-	3+
	1.	K	64	2+	-	-	-	-	4+
55	1.	K	256	2+	-	-	-	-	2+

Koko aineistosta saadut tulokset luokiteltiin kuuteen eri luokkaan sen mukaan, oliko näytteissä IgG1- vai IgG3-alaluokkaa enemmän, molempia alaluokkia yhtä paljon, ainoastaan IgG 1:10 -kaivo positiivinen, kaikki kaivot negatiivisia vai kontrolli positiivinen. Taulukossa 13 on nähtävillä, mihin edellä kuvattuihin luokkiin näytteiden tulokset jakautuivat vasta-aineittain. Anti-D:n sisältävistä näytteistä 16 sisälsi enemmän IgG1-alaluokkaa ja 15 näytteistä sisälsi enemmän IgG3-alaluokkaa, eli ne jakautuivat melko tasaisesti. Kahdessa anti-D:n sisältävistä näytteistä alaluokkia oli yhtä paljon ja kahdessa näytteessä oli ainoastaan IgG 1:10 -kaivo positiivinen. Kuudessa anti-D-vasta-aineen sisältävässä näytteessä kontrolli oli positiivinen. Anti-DC-vasta-ainekombinaation sisältävissä näytteissä kahdessa oli enemmän IgG1-alaluokkaa, kahdessa oli enemmän IgG3-alaluokkaa ja yhdessä oli molempia alaluokkia yhtä paljon. Kahdessa anti-DC:n sisältävässä näytteessä oli ainoastaan IgG 1:10 -kaivo positiivinen ja kolmessa oli kontrolli positiivinen.

Anti-c:n sisältävistä näytteistä kuudessa oli IgG3-alaluokkaa enemmän ja yhdessä näytteessä IgG1-alaluokkaa enemmän. Anti-cE-vasta-ainekombinaation sisältävissä näytteissä seitsemässä oli IgG1-alaluokkaa enemmän, yhdessä IgG3-alaluokkaa enemmän ja yhdessä positiivinen kontrolli. Anti-E:n sisältävistä näytteistä seitsemässä oli IgG1-alaluokkaa enemmän, kolmessa IgG3-alaluokkaa enemmän, yhdessä vain IgG 1:10 -kaivo positiivinen ja kolmessa kontrolli positiivinen.

Anti-K:n sisältävistä näytteistä kaikissa kuudessa oli IgG1-alaluokkaa enemmän. Neljässä anti-D-suojaus-näytteessä vain IgG 1:10 -kaivo oli positiivinen ja 10:ssä kaikki kaivot olivat negatiivisia.

TAULUKKO 13. Näytteen jakautuminen eri luokkiin vasta-aineittain.

	Luokka	Luokka					Yhteensä	
		IgG1- alaluokkaa enemmän	IgG3- alaluokkaa enemmän	Molempia alaluokkia yhtä paljon	Vain IgG 1:10 positiivinen	Kaikki negatiivisia		Kontrolli positiivinen
Vasta-aine	D	16	15	2	2	-	6	41
		39,0%	36,6%	4,9%	4,9%	-	14,6%	100,0%
	DC	2	2	1	2	-	3	10
		20,0%	20,0%	10,0%	20,0%	-	30,0%	100,0%
	c	1	6	-	-	-	-	7
		14,3%	85,7%	-	-	-	-	100,0%
	cE	7	1	-	-	-	1	9
		77,8%	11,1%	-	-	-	11,1%	100,0%
	E	3	7	-	1	-	3	14
		21,4%	50,0%	-	7,1%	-	21,4%	100,0%
K	6	-	-	-	-	-	6	
	100,0%	-	-	-	-	-	100,0%	
D-suojaus	-	-	-	4	10	-	14	
	-	-	-	28,6%	71,4%	-	100,0%	
Yhteensä		35	31	3	9	10	13	101
		34,7%	30,7%	3,0%	8,9%	9,9%	12,9%	100,0%

8.3 Näytteen jakautuminen riskiluokkiin

Saadut tulokset luokiteltiin valmistajan antaman ohjeen mukaisesti korkeaan sekä keskinkertaiseen vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiin. Näytteitä, joissa kontrolli oli positiivinen, ei otettu huomioon. Lisäksi näytteen titterit luokiteltiin mataliksi (titterit 0-8) ja korkeiksi (titterit 16 ylöspäin). Titterit luokiteltiin mataliksi ja korkeiksi sen perusteella, että Veripalvelussa äitien näytteitä tutkiessa on rutiinikäytäntönä määrittää anti-D-vasta-aineen kvantitatiivinen määrä, jos titteri on 16 tai sitä korkeampi. Jos titteri on 8 tai sitä matalampi, kvantitaatiota ei tehdä rutiinisti. Käytännön kokemus ja vastasyntyneiden oireet ovat osoittaneet, että titteri 16 luokitellaan korkeaksi kaikilla vastasyntyneen hemolyyttistä tautia aiheuttavien vasta-aineiden kohdalla.

Näytteen jakautumista riskiluokkiin tarkasteltiin ottaen huomioon koko aineiston jokainen näyte, ottaen huomioon ainoastaan yksi näyte kultakin äidiltä sekä ottaen huomioon ainoastaan anti-D-vasta-aineen sisältävät näytteet.

8.3.1 Koko aineisto

Edellä kuvatuista luokitteluista tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 14), käyttäen SPSS-tilastolaskentaohjelmaa. Ristiintaulukointi tehtiin koko aineistosta, eli mukana oli myös useampia näytteitä samalta äidiltä raskauden eri vaiheista. Ristiintaulukoinnissa on nähtävissä selvä ero matalan ja korkean titterin välillä riskiluokituksessa. Suuri osa (87,8 %) korkeatitterillisistä näytteistä luokiteltiin korkeaan riskiin, kun taas matalatitterillisistä näytteistä 51,7 % luokiteltiin korkean riskin luokkaan ja 48,3 % keskinkertaisen riskin luokkaan. Tämä titterien välinen ero on tilastollisesti erittäin merkitsevä, koska Pearson χ^2 -testissä saadaan pieni merkitsevyysluku $p = 0,001$. Tällöin otetaan korkeintaan 0,1 % riski, että muuttujien välinen ero johtuu sattumasta.

Esimerkkinä tapauksista, joissa titteri ja riskiluokka olivat ristiriitaisia, oli äidin numero 41 anti-cE:n sisältävä näyte sekä äidin numero 45 anti-c:n sisältävä näyte. Kyseisten näytteiden titteri oli yksi, mutta geelikortilla saadut tulokset viittasivat kuitenkin hemolyysin korkeaan riskiin molempien anti-IgG3-kaivojen antaessa positiivisen reaktion. Anti-K:n sisältävistä näytteistä äidillä numero 52 oli myös titteri ainoastaan yksi, mutta geelikortin antama tulos viittasi tässäkin tapauksessa hemolyysin korkeaan riskiin. Äidillä numero 55, jolla oli myös todettu anti-K, titteri oli 256, mutta geelikortin antama tulos luokiteltiin ainoastaan keskinkertaiseksi hemolyysin riskiksi.

TAULUKKO 14. Koko aineiston luokitellut titterit ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskit.

	Riskiluokka		Yhteensä
	Korkea riski	Keskinkertainen riski	
Matala titteri 0 - 8	15	14	29
	51,7%	48,3%	100,0%
Korkea titteri 16 ->	36	5	41
	87,8%	12,2%	100,0%
	51	19	70
Yhteensä	72,9%	27,1%	100,0%

Lisäksi titterit luokiteltiin vielä niin, että matalaan titteriin tuli näytteet, joiden titteri oli nollasta neljään ja korkeaan titteriin tuli näytteet, joiden titteri oli kahdeksan tai korkeampi. Haluttiin nähdä, millainen matalaan titteriin luokiteltujen näytteiden jakauma korkean ja keskinkertaisen riskin suhteen on. Näistä luokista tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 15). Tässäkin ristiintaulukoinnissa on nähtävissä selvä ero matalan ja korkean titterin välillä riskiluokituksessa. Suuri osa (87,2 %) korkeatitterillisistä näytteistä luokiteltiin korkeaan riskiin, kun taas matalatitterillisistä näytteistä 43,5 % luokiteltiin korkean riskin luokkaan ja 56,5 % keskinkertaisen riskin luokkaan. Tämä titterien välinen ero on tilastollisesti erittäin merkitsevä, koska Pearson χ^2 -testissä saadaan pieni merkitsevyysluku $p = 0,000$. Tällöin otetaan korkeintaan 0,1 % riski, että muuttujien välinen ero johtuu sattumasta.

TAULUKKO 15. Koko aineiston uudelleen luokitellut titterit ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskit.

	Riskiluokka		Yhteensä
	Korkea riski	Keskinkertainen riski	
Matala titteri 0 - 4	10	13	23
	43,5%	56,5%	100,0%
Korkea titteri 8 ->	41	6	47
	87,2%	12,8%	100,0%
	51	19	70
Yhteensä	72,9%	27,1%	100,0%

Koko aineistosta saadut tulokset luokiteltiin kahteen eri luokkaan sen mukaan, oliko näytteissä IgG1- vai IgG3-alaluokkaa enemmän. Näytteistä, joissa alaluokkia oli yhtä paljon, ei voitu muodostaa omaa luokkaa, koska tällaisia näytteitä oli liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun. Käyttäen riskiluokitusta sekä IgG-alaluokkien mukaan tehtyä luokitusta tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 16). Korkean riskin näytteistä hie- man suuremmassa osassa oli enemmän IgG3-alaluokkaa. Enemmän IgG3-alaluokkaa oli korkean riskin tapauksista 56,5 %:ssa ja enemmän IgG1-alaluokkaa puolestaan 43,5 %:ssa. Keskinkertaisen riskin tapauksissa ero alaluokkien välillä oli suurempi. IgG1-alaluokkaa oli enemmän 78,9 %:ssa näytteistä ja IgG3-alaluokkaa 21,1 %:ssa näytteistä. Pearson χ^2 -testissä saadaan merkitsevyysluvaksi $p = 0,009$, mikä tarkoittaa tilastolli- sesti merkitsevää eroa alaluokkien välillä. Tällöin on korkeintaan 1 % riski, että muuttu- jien välinen ero johtuu sattumasta.

TAULUKKO 16. Koko aineiston vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiluokat ja IgG-alaluokat.

Riskiluokka		IgG-alaluokka		Yhteensä
		IgG1-alaluokkaa enemmän	IgG3-alaluokkaa enemmän	
Korkea riski		20	26	46
		43,5%	56,5%	100,0%
Keskinkertainen riski		15	4	19
		78,9%	21,1%	100,0%
Yhteensä		35	30	65
		53,8%	46,2%	100,0%

8.3.2 Jokaiselta äidiltä vain yksi näyte

Seuraavaksi jokaiselta äidiltä poimittiin vain yhden (uusimman) näytteen tulos. Näytteiden tulokset oli luokiteltu edellä kuvatulla tavalla valmistajan antaman ohjeen mukaisesti korkeaan sekä keskinkertaiseen vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiin. Näytteiden titterit oli luokiteltu matalaan (0-8) ja korkeaan (≥ 16) luokkaan. Näistä luokista tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 17), jotta nähtäisiin muuttuvatko taulukoinnin tulokset verrattuna koko aineistosta tehtyyn vastaavaan ristiintaulukointiin. Haluttiin nähdä aiheuttaako saman äidin useat näytteet vääristymää tulosjakaumaan. Ristiintaulukoinnissa prosenttiosuudet pysyivät kuitenkin lähestulkoon samoina. 87,5 % korkeatitterillisistä näytteistä luokiteltiin korkeaan riskiin ja matalatitterillisistä näytteistä 52,9 % luokiteltiin korkean riskin luokkaan ja 47,1 % keskinkertaisen riskin luokkaan. Pearson χ^2 -testissä saadaan merkitsevyysluvuksi $p = 0,014$, mikä tarkoittaa tilastollisesti melkein merkitsevää eroa matalan ja korkean titterin välillä. Tuloksia oli kuitenkin liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun.

TAULUKKO 17. Luokitellut titterit ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskit otettuna huomioon vain yksi näyte kultakin äidiltä.

	Riskiluokka		Yhteensä
	Korkea riski	Keskinkertainen riski	
Matala titteri 0 - 8	9	8	17
	52,9%	47,1%	100,0%
Korkea titteri 16 ->	21	3	24
	87,5%	12,5%	100,0%
Yhteensä	30	11	41
	73,2%	26,8%	100,0%

Ristiintaulukointi (taulukko 18) käyttäen riskiluokitusta sekä IgG-alaluokkien mukaan tehtyä luokitusta ja ottaen huomioon vain uusimman näytteen tulokset yhdeltä äidiltä antoi suurin piirtein samat prosenttiosuudet kuin vastaava ristiintaulukointi koko aineistosta. IgG3-alaluokkaa enemmän oli korkean riskin tapauksista 51,9 %:ssa ja IgG1-alaluokkaa enemmän oli 48,1 %:ssa. Keskinkertaisen riskin tapauksissa IgG1-alaluokkaa oli enemmän 81,8 %:ssa näytteistä ja IgG3-alaluokkaa enemmän 18,2 %:ssa näytteistä. Pearson Chi²-testissä saatiin merkitsevyyksiluvuksi $p = 0,057$, mikä tarkoittaa 10 %:in mahdollisuutta, että alaluokkien välinen ero johtuu sattumasta. Tämä prosenttiosuus on liian suuri, jotta alaluokkien välistä eroa tästä aineistosta voitaisiin pitää tilastollisesti merkitsevänä. Lisäksi näytteitä oli liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun.

TAULUKKO 18. Vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiluokat ja IgG-alaluokat otettuna huomioon vain yksi näyte kultakin äidiltä.

Riskiluokka		IgG-alaluokka		Yhteensä
		IgG1-alaluokkaa enemmän	IgG3-alaluokkaa enemmän	
Korkea riski		13	14	27
		48,1%	51,9%	100,0%
Keskinkertainen riski		9	2	11
		81,8%	18,2%	100,0%
Yhteensä		22	16	38
		57,9%	42,1%	100,0%

8.3.3 Anti-D-vasta-aineen sisältävät näytteet

Titterin yhteyttä korkean ja keskinkertaisen riskin jakaumaan tarkasteltiin vielä ottaen huomioon ainoastaan anti-D- ja anti-DC-vasta-aineen sisältävät näytteet, koska anti-D-immunisaatio on vaikutukseltaan merkittävin. Riskiluokista sekä tittereistä, jotka oli luokiteltu matalaan (0-8) ja korkeaan (≥ 16) luokkaan tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 19). Matalan titterin (0-8) näytteistä kahdeksan jakautui korkeaan riskiin ja neljä keskinkertaiseen riskiin. Korkean titterin (≥ 16) näytteistä kaikki luokiteltiin korkeaan riskiluokkaan. Tuloksia oli kuitenkin liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun, joten niistä ei voida tehdä yleistäviä johtopäätöksiä.

TAULUKKO 19. Anti-D-vasta-aineen sisältävien näytteiden luokitellut titterit ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskit.

	Riskiluokka		Yhteensä
	Korkea riski	Keskinkertainen riski	
Matala titteri 0 - 8	8 66,7%	4 33,3%	12 100,0%
Korkea titteri 16 ->	27 100,0%	0 0%	27 100,0%
	35	4	39
Yhteensä	89,7%	10,3%	100,0%

Anti-D- ja anti-DC-vasta-aineen sisältäville näytteille tehtiin myös ristiintaulukointi riskiluokista sekä luokittelemalla titterit siten, että matalaan titteriin tuli näytteet, joiden titteri oli nollassa neljään ja korkeaan titteriin tuli näytteet, joiden titteri oli kahdeksan tai korkeampi (taulukko 20). Matalatitterillisistä näytteistä kolme luokiteltiin korkeaan riskiin ja neljä keskinkertaiseen riskiin. Korkeatitterillisistä näytteistä kaikki 32 luokiteltiin korkeaan riskiin. Tuloksia oli kuitenkin liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun, joten niistä ei voida tehdä yleistäviä johtopäätöksiä.

TAULUKKO 20. Anti-D-vasta-aineen sisältävien näytteiden uudelleen luokitellut titterit ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskit.

	Riskiluokka		Yhteensä
	Korkea riski	Keskinkertainen riski	
Matala titteri 0 - 4	3	4	7
	42,9%	57,1%	100,0%
Korkea titteri 8 ->	32	0	32
	100,0%	0%	100,0%
	35	4	39
Yhteensä	89,7%	10,3%	100,0%

Lisäksi tehtiin ristiintaulukointi (taulukko 21) käyttäen riskiluokitusta sekä IgG-alaluokkien mukaan tehtyä luokitusta ja ottaen huomioon ainoastaan anti-D- ja anti-DC-vasta-aineen sisältävät näytteet. Tässä ristiintaulukoinnissa sekä korkean että keskinkertaisen riskin näytteet jakautuivat tasaisesti luokkaan, jossa oli enemmän IgG1-alaluokkaa ja luokkaan, jossa oli enemmän IgG3-alaluokkaa. Näytteitä oli kuitenkin liian vähän luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun, joten niistä ei voida tehdä yleistäviä johtopäätöksiä.

TAULUKKO 21. Anti-D-vasta-aineen sisältävien näytteiden vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiluokat ja IgG-alaluokat.

Riskiluokka		IgG-alaluokka		Yhteensä
		IgG1-alaluokkaa enemmän	IgG3-alaluokkaa enemmän	
Korkea riski		16	15	31
		51,6%	48,4%	100,0%
Keskinkertainen riski		2	2	4
		50,0%	50,0%	100,0%
Yhteensä		18	17	35
		51,4%	48,6%	100,0%

Taulukossa 22 on esitetty, mitä IgG-alaluokkaa oli vanhoissa immunisaatiotapauksissa äideillä, joiden syntyneen lapsen vointi ja saama hoito oli tiedossa. Jokaisen äidin näytteen geelikortin antama tulos luokiteltiin korkeaan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiin.

TAULUKKO 22. Esimerkkejä lapsen tilasta ja hoidosta, kun tiedetään anti-D vasta-aineen titteri, kvantitaatio ja IgG-luokka.

Äiti	Vasta-aine	Titteri	Kvanti-taatio	IgG-luokka	Syntymä Hb	Syntymä bilirubiini	Hoitto	Lapsen tila
4	DC	8	9	IgG1	53		hätäveri, koosteveri, 3 sinivalohoitoa	anemia
5	D	32	3	IgG1	141	211	sinivalohoito	
7	D	32	14	IgG1	80		verenvaihto	Hb laski 69
8	DC	128	46	IgG1 IgG3	140		IvG, 2 punasolusiirota	
11	D	32	52	IgG1 IgG3	137		koosteveri, 2 IvG-hoitoa, verenvaihto	mahdollinen aivovaurio
20	D	64	11	IgG1	111		verenvaihto	kellastuminen
21	D	64	66	IgG1	105		3 verenvaihtoa, IvG-hoitoja	hyvin rajua HDN jyrkkä bilirubiinin nousu
23	D	64	13	IgG1	219		3 sinivalohoitoa	
29	D	64	20	IgG1	169	98		
34	D	16	29	IgG3	160	240	tuplasinivalohoito	Hb laski 149

8.4 Saman raskauden näytteiden tulokset

Verratessa saman äidin raskauden eri vaiheissa otettujen näytteiden tuloksia keskenään ei ollut havaittavissa muutoksia alaluokkien suhteiden välillä. Havaittavissa oli kuitenkin pieniä muutoksia alaluokkien määrissä. Reaktiot olivat joissain tapauksissa heikompia ja joissain tapauksissa vahvempia verrattuna aiempaan näytteeseen, mutta muutokset eivät saaneet kuitenkaan aikaan varsinaista IgG1- ja IgG3-alaluokkien suhteiden muuttumista näytteiden välille. Muutokset olivat aina yhden plussan verran korkeampia tai matalampia kahden peräkkäisen näytteen välillä, mikä voi johtua myös reaktiivoimakkuuksien tulkinnan vaihtelusta. Taulukossa 23 on nähtävillä esimerkkinä yhden äidin IgG3-alaluokan määrän muutos peräkkäisten näytteiden välillä. Kyseisellä äidillä ei ole havaittavissa IgG1-alaluokkaa, mutta IgG3-alaluokan määrä on kasvanut ensimmäisen ja toisen näytteen välillä. Tässä tapauksessa ei voida katsoa IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen muuttuneen, koska IgG1-alaluokkaa ei ole ollut alun perinkään havaittavissa.

TAULUKKO 23. Äidin numero 50 tulokset geelikortilta, jossa on havaittavissa IgG3-alaluokan määrän nouseminen peräkkäisten näytteiden välillä.

Äiti	Näyte	Vasta-aine	Titteri	anti-IgG1 1:1	anti-IgG1 1:100	anti-IgG3 1:1	anti-IgG3 1:100	ctl	anti-IgG 1:10
50	2.	anti-E	2	-	-	2+	1+	-	3+
50	1.	anti-E	2	-	-	1+	- ^r	-	3+

9 TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Tutkituista näytteistä oli tehty jo tarvittavat rutiinitutkimukset Veripalvelussa. Näytteistä oli määritetty vasta-aine, sekä tarvittaessa vasta-ainetitteri ja anti-D vasta-aineen kvantitatiivinen määrä. Nämä tiedot oli saatavissa Veripalvelun atk-tietojärjestelmästä.

Tutkimuksen validiteetilla tarkoitetaan tutkimuksen kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksessa oli tarkoitus mitata (Vilkka 2007: 150). Tässä opinnäytetyössä voidaan katsoa validiteetin olevan melko hyvä, sillä käytetyillä tutkimusmenetelmillä saatiin vastaus kaikkiin paitsi yhteen asetettuun tutkimusongelmaan. Tutkimusaineiston olisi pitänyt olla laajempi, jotta olisi voitu tarkastella luotettavasti IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen muuttumista raskauden aikana.

Tutkimuksen reliabiliteetilla tarkoitetaan tutkimuksen luotettavuutta, mikä tarkoittaa tulosten pysyvyyttä eli sen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tutkimuksen reliabelius on hyvä, jos samat tulokset pystytään toistamaan eri tutkijoiden toimesta. (Vilkka 2007: 149.) Tämän opinnäytetyön suoritus on dokumentoitu niin, että sen pystyy toinen tutkija toistamaan niin halutessaan. Työ on suoritettu ohjeiden mukaisesti, joko Veripalvelun menetelmäohjeiden tai Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin valmistajan ohjeen mukaisesti. Reliabiliteettia lisää se, että kortin testausta varten määritetyt tunnetun anti-D Forte laimennosten titterit määritettiin molempien opinnäytetyön tekijöiden toimesta. Näin saatiin rinnakkaismääritykset vasta-ainetitrauksista, mikä lisäsi tuloksen luotettavuutta. Lisäksi laboratorion henkilökunta oli suorittanut titrauksen anti-D Forten tietyllä laimennoksella aiemmin ja näihin tuloksiin pystyttiin myös vertaamaan titrauskäsialoja.

Kortin testaukseen valittiin tittereiltään potilasnäytteitä vastaavat laimennokset, mikä teki testauksen mahdollisimman vastaavaksi potilasnäytteiden määrittämisen kanssa. Tutkittavien näytteiden tulosten toistettavuutta pystyttiin arvioimaan samalla, kun testattiin reagenssimäärän vaikutusta tuloksiin. Tässä testauksessa määritettiin kahden eri äidin kaksi näytettä puolitetulla sekä geelikortin valmistajan ohjeen suosittelemalla määrällä. Tulokset olivat yhteneväiset keskenään. Tämän voidaan osaltaan katsoa lisäävän tutkittavien näytteiden tulosten toistettavuutta, vaikka varsinaisessa näytteiden tutkimisessa ei rinnakkaismäärityksiä tehtykään. Tutkimuksen kokonaisluotettavuutta

lisäsi käytetyssä Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortissa oleva kontrollikaivo, joka toimi negatiivisena näytekontrollina.

Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset -tutkimuspaketti on FINASin akkreditoima eli kaikki siihen kuuluvat tutkimukset ovat akkreditoituja. Esimerkiksi tässä opinnäytetyössä käytetty vasta-ainetitterin määrittäminen kuuluu tähän tutkimuspakettiin. Kaikki tutkimuksessa käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit ovat Veripalvelun rutiinikäytössä olevia. Käytetyt reagenssit ja testisolot olivat käyttökelpoisia vanhentumis- ja avaamispäivämääriltään. Käytettyjen geelikorttien kunto tarkastettiin ennen niiden käyttöä, ettei geelissä ollut ilmakuplia ja että kortit näyttivät päällisin puolin hyviltä. Kaikkien käytettyjen reagenssien eränumerot ja vanhentumispäivämäärät merkittiin ylös, jotta ne ovat jäljitettävissä.

Tutkimusta suoritettaessa toimittiin yhteistyössä Veripalvelun asiantuntijan kanssa. Esimerkiksi päätökset käytetyistä laimennosliuoksista ja testisoluista tehtiin yhdessä asiantuntijan kanssa. Lisäksi käytännön työhön liittyvissä kysymyksissä oli saatavilla Veripalvelun laboratoriossa työskentelevän henkilökunnan apu. Henkilökunta opasti muun muassa vasta-ainetitterin määrittämisessä sekä neuvoi, mistä tarvittavat välineet, laitteet ja reagenssit löytyivät.

Tutkimuksen kaikista tuloksista ei voida tehdä yleistäviä johtopäätöksiä, koska aineisto oli liian suppea. Yleisten päätelmien tekemiseen vaikuttaa myös osaltaan se, että jokainen tapaus on omanlainen ja immunisoituneiden äitien määrä on vain noin 0,5 % kaikista raskaana olevista naisista. Osasta tuloksia SPSS-tilastolaskentaohjelmalla lasketut tilastolliset tunnusluvut kertovat, kuinka yleistävinä tuloksia voidaan pitää.

10 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin soveltuvuutta osaksi immunisoituneiden äitien seurantaprosessia Veripalvelussa. Tavoitteena oli selvittää, millaisissa tilanteissa kyseistä geelikorttia kannattaisi käyttää ja millaista lisätietoa se antaisi äidin vasta-ainetilanteesta. Tavoitteena oli myös saada selville, toimiiko kortti ja antaako se eroja IgG1- ja IgG3-alaluokkien välille. Haluttiin

myös nähdä, millaisia IgG-alaluokkien suhteiden välisiä eroja kortilla saadaan eri vasta-aineiden sekä eri potilaiden välillä.

Tutkimuksen alussa tehty korttitestaus osoitti kortin toimivuuden. Testitulokset osoittivat, että geelikortilla on havaittavissa mahdollinen IgG1- ja IgG3-alaluokkien suhteiden välinen ero. Tulosten perusteella huomattiin, että myös matalatitterilliset näytteet voivat sisältää kyseisiä alaluokkia riittävästi aiheuttamaan punasolujen fagosytoitumisen, mikä nähdään positiivisena reaktiona geelikortilla. Näin ollen myös matalatitterillisiä näytteitä voi olla kannattavaa tutkia kortilla.

Tämän aineiston näytteiden tuloksissa esiintyi IgG1- ja IgG3-aluokkien suhteiden välisiä eroja sekä saman vasta-aineen sisällä eri potilaiden välillä, että eri vasta-aineiden välillä. Esimerkiksi anti-D-vasta-aineen sisältävissä näytteissä oli osassa havaittavissa vain jompaakumpaa alaluokista tai toista alaluokkaa enemmän kuin toista. Vaikka tutkimusaineistossa oli anti-K-vasta-aineen sisältäviä näytteitä vähän, niissä kaikissa oli havaittavissa ainoastaan IgG1-alaluokkaa, mikä havaittiin myös eräässä tutkimuksessa, jossa todettiin 95,9 % anti-K:sta olevan IgG1-alaluokkaa (Ahaded ym. 2000: 1244).

Tulosten perusteella näytteistä, joiden titteri oli nollassa kahdeksaan, jopa puolet jakautui kortin valmistajan ohjeen mukaisesti korkeaan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiin. Lisäksi korkeaan riskiin luokiteltiin myös näytteitä, joiden titteri oli nollassa neljään. Näissä tilanteissa titteri on luultavimmin lähdössä nousemaan. Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia voitaisiin mahdollisesti hyödyntää tällaisissa tilanteissa, joissa titteri on matala ja halutaan lisätietoa siitä, miten tilanne on kehittymässä. Veripalvelussa on anti-D kvantitaation rajana pidetty titteriä 16, mutta tämän aineiston anti-D-vasta-aineen sisältävien näytteiden tulosten perusteella jo tätä alemmilla tittereillä saattaa olla korkea riski vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin. Tulosten perusteella voitaisiin harkita kvantitaation tekemistä myös tilanteessa, jossa anti-D titteri on 8.

Tutkitussa aineistossa IgG-alaluokat jakautuivat melko tasaisesti korkean riskin tapauksissa. Tämän tuloksen perusteella ei voida sanoa, että jompaakumpaa alaluokkaa olisi enemmän silloin, kun vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riski on korkea. Keskinertaisen riskin tapauksissa puolestaan oli havaittavissa noin 80 %:ssa tapauksista enemmän IgG1-alaluokkaa ja vain noin 20 %:ssa enemmän IgG3-alaluokkaa. Kyseinen ilmiö

voisi liittyä esimerkiksi siihen, että IgG1-alaluokka läpäisee istukan aikaisemmassa vaiheessa kuin IgG3-alaluokka (Strohm 2005: 428). Jos keskinkertaisen riskin tapauksissa näytteet on otettu alkuraskaudesta, ei IgG3-alaluokan taso ole välttämättä vielä noussut. Jotta tätä ilmiötä voitaisiin pohtia luotettavasti, olisi otettava huomioon, missä vaiheessa raskautta näyte on otettu.

Yhtenä tutkimuksen tarkoituksena oli myös tarkastella, millä tavalla IgG1- ja IgG3-alaluokkien välinen suhde muuttuu raskauden aikana. Tutkitussa aineistossa ei ollut havaittavissa näiden alaluokkien välisten suhteiden muuttumista. Tulosten perusteella ei voida kuitenkaan sulkea pois mahdollisuutta IgG-alaluokkien välisten suhteiden muuttumiselle, sillä tutkittu aineisto ei ollut riittävän laaja luotettavaan tulosten tarkasteluun. Näytteitä olisi täytynyt olla enemmän saman raskauden ajalta sekä useammalta potilaalta kuin mitä tässä aineistossa oli. Lisäksi tarkasteltaessa IgG1- ja IgG3-alaluokkien välisen suhteen muuttumista raskauden aikana olisi hyvä olla tiedossa, onko äiti immunisoitunut juuri kyseisessä raskaudessa vai aiemmin sekä myös mahdollinen tieto siitä, onko lapsella kyseistä antigeeniä. Nämä tekijät voivat vaikuttaa oleellisesti IgG-alaluokkien suhteiden muuttumiseen raskauden edetessä, minkä vuoksi tutkimus edellyttäisi systemaattista näytteiden keräystä pitkältä aikaväliltä.

Tutkitussa aineistossa oli liian vähän eri äitien näytteitä luotettavaan tilastolliseen tarkasteluun. Näytteitä olisi täytynyt olla vielä enemmän eri äideiltä, jotta olisi saatu monipuolisempaa tietoa IgG-alaluokkien suhteiden vaihtelusta eri äitien välillä sekä myös IgG-alaluokkien suhteiden vaihtelusta eri vasta-aineiden välillä.

Tutkimuksissa on todettu IgG1-alaluokan korkean pitoisuuden äidin seerumissa aiheuttavan vakavamman vastasyntyneen hemolyyttisen taudin sikiövaiheessa sekä syntymähetkellä kun taas IgG3-alaluokan suuren osuuden äidin seerumin vasta-aineesta on todettu liittyvän viivästyneeseen vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin syntymän jälkeen (Brossard ym. 2002: 1543). Tämän mahdollistaa se, että IgG1-alaluokka läpäisee istukan aikaisemmassa vaiheessa kuin IgG3-alaluokka (Strohm 2005: 428). Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortti antaa tiedon siitä, onko äidin plasmassa tarpeeksi IgG1- tai IgG3-molekyylejä aiheuttamaan punasolujen fagosytoitumisen (Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin pakkausseloste). Tarkasteltaessa tässä opinnäytetyössä tutkittuja näytteitä vanhoista immunisaatiotapauksista äideiltä, joiden syntyneen lapsen vointi ja saama hoito oli tiedossa, huomattiin osan tuloksista tukevan

edellä esitettyä teoriaa. Esimerkiksi äidillä numero 4 havaittiin geelikortin antaman tuloksen perusteella olevan enemmän IgG1 alaluokkaa ja syntyneen lapsen hemoglobiini syntymähetkellä oli vain 53. Toisaalta taas äidillä numero 34 havaittiin geelikortin tuloksen perusteella olevan enemmän IgG3 alaluokkaa ja syntyneen lapsen hemoglobiini oli 160 (taulukko 23).

Tutkimusten antamaan tietoon pohjaten kortin tuloksen perusteella voitaisiin arvioida sitä, onko hemolyyttisen taudin riski suuri jo sikiöllä vai vasta viivästyneenä reaktiona syntymän jälkeen vastasyntyneellä. Jos äidin plasman vasta-aineesta vahvemman reaktion kortilla antaa anti-IgG1, voidaan olettaa, että tämä vasta-aine läpäisee istukan jo aikaisessa vaiheessa ja aiheuttaa vaikeuksia jo raskausaikana. Jos taas vahvemman reaktion kortilla antaa anti-IgG3, voidaan varautua viivästyneeseen vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin syntymän jälkeen.

Tämä opinnäytetyö toimii hyvänä pohjana arvioitaessa Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikortin soveltuvuutta osaksi immunisoituneiden äitien seurantaprosessia. Jotta kyseinen geelikortti voitaisiin ottaa Veripalvelun asiakkaille myytäväksi tutkimukseksi, tarvittaisiin vielä lisätietoa ja tarkempia tutkimuksia. Erityisesti lisätietoa syntyneiden lasten tilasta suhteutettuna kortin antamaan tulokseen tarvittaisiin. Geelikorttia voitaisiin käyttää koko raskauden ajan, jolloin sen antama tulos voitaisiin suhteuttaa titterin ja anti-D kvantitaation kehittymiseen sekä lapsen tilaan syntymähetkellä. Tällöin saataisiin käytännön kokemusta geelikortista pidemmältä aikaväliltä. Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 -geelikorttia voitaisiin jo nyt alkaa käyttää Veripalvelun sisäisissä lisäselvityksissä.

LÄHTEET

- Ahaded, Abdellah - Brossard, Yves - Debbia, Martine - Lambin, Patrick 2000: Quantitative determination of anti-K (KEL1) IgG and IgG subclasses in the serum of severely alloimmunized pregnant women by ELISA. *Transfusion* 40. 1239-1245.
- Anstee, David - Klein, Harvey G. 2005: *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.
- Bjålie, Jan G. - Haug, Egil - Sand, Olav - Sjaastad, Øysten V. - Toverud, Kari C. 1999: *Ihminen: Fysiologia ja anatomia*. Helsinki: WSOY.
- Bromilow, Imelda – Daniels, Geoff 2007: *Essential guide to blood groups*. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.
- Brown, D. - Contreras, M. - Garner, S. F. - Gorick, B. D. - Hughes-Jones, N. C. - Lai, W.Y.Y. - Lubenko, A.- Taverner, J. 1995: Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn: Quantitative IgG anti-D subclass determinations explain the correlation with functional assay results. *Vox Sanguinis* 68. 169-176.
- Brossard, Yves - Debbia, Martine - Lambin, Patrick - Puillandre, Philippe 2002: IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. *Transfusion* 42. 1537-1546.
- Brostoff, Jonathan - Male, David - Roitt, Ivan 2001: *Immunology*. Edinburgh : Mosby.
- Diamed-ID DAT IgG1/IgG3 –geelikortin pakkausseloste.
- Eklund, Jarl - Kuosmanen, Malla - Renlund, Martin - Teramo, Kari 1995: Raskaudenaikainen veriryhmäimmunisaatio ja vastasyntyneen hemolyyttinen

tauti. Teoksessa Leikola, Juhani - Myllylä, Gunnar (toim.): Verensiirrot. Helsinki: Duodecim. 265-275.

Greiss, M. A. – Urbaniak, S. J. 2000: RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. Blood reviews 14. 44-61.

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

Koskinen, Sinikka – Kuosmanen, Malla 2005: Raskaudenaikaisen immunisaation vuoksi sikiölle kohtuun tehdyt verensiirrot. Kätilölehti 110 (1). 24-27.

Leikola, Juhani 1987: Verensiirtojen immunologia. Helsinki: Grafiteks Oy.

Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset. 2008. SPR Veripalvelu. Verkkodokumentti. Päivitetty 14.2.2008. <<http://www.veripalvelu.fi/www/2294>>. Luettu 20.4.2009.

Salmi, Toivo T. - Pihkala, Ulla - Siimes, Martti A. - Rajantie, Jukka - Riikonen, Pekka 2007: Lasten sytopeniat: Vastasyntyneen hemolyttinen tauti. Teoksessa Ruutu, Tapani - Rajamäki, Allan - Lassila, Riitta - Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit. Helsinki: Duodecim. 638-642.

Seppälä, Ilkka J. T. 2005: Vasta-aineet eli immunoglobuliinit. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Duodecim. 624-635.

Stevens, Christine Dorresteyn 2003: Antibody structure and function. Teoksessa Stevens, Christine Dorresteyn (toim.): Clinical immunology and serology: a laboratory perspective. Philadelphia: F. A. Davis Company. 59-76.

- Strohm, Patricia L. 2005: Hemolytic disease of the fetus and newborn. Teoksessa Rudmann, Sally V. (toim.): Textbook of blood banking and transfusion medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 420-445.
- Sulin, Kati 2008: Raskaudenaikaiset veriryhmävasta-ainetutkimukset. PowerPointesitys. Verensiirtoserologian koulutus lääketieteen kandidaateille. Helsinki. 12.6.
- Tiilikainen, Anja S. 1997: Immuunipuolustus iän funktiona. Teoksessa Tiilikainen, Anja S. - Vaara, Martti - Vaheeri, Antti (toim.): Lääketieteellinen mikrobiologia. 8. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 131-136.
- Tutkimusmenetelmäohje VR-3405 2008: Vasta-ainetitteri. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki.
- Turgeon, Mary Louise 2009: Immunology and serology in laboratory medicine. St. Louis: Mosby.
- Ulander, Veli-Matti – Halmesmäki, Erja – Ämmälä, Pirkko 2004: Rh-immunisaation muuttuva hoito. Duodecim 120. 2897-2904.
- Verensiirto-opas 2006. 2006. 3. uudistettu painos. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.
- Verivalmisteiden käytön opas 2009. 2009. Helsinki: SPR Veripalvelu.
- Viisainen, Kirsi (toim.) 1999. Seulontatutkimukset ja yhteistyö äitiyshuollossa – suositukset 1999. Helsinki: Sosiaali- ja terveysalan tutkimus- ja kehittämiskeskus.
- Vilka, Hanna 2007: Tutki ja mittaa: Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.
- Yleisohje VR-YO-043 2009: Veriryhmäserologisten tulosten lukeminen ja reaktivoimakkuuksien arviointi. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje VR-YO-048 2008: Neuvolanäytteiden kulku, tutkimukset ja vastauskäytännöt potilaslaboratoriossa. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki.

Yleisohje VR-YO-073 2008: Neuvolanäytteiden veriryhmätutkimusten kulku ja tiedonsiirto tuotantolaboratoriossa. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki.