



Eri vasta-aineiden ilmeneminen entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla

Anna Särkkä

Hanna Lahtinen

OPINNÄYTETYÖ
Elokuu 2019

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

SÄRKKÄ, ANNA & LAHTINEN, HANNA:

Eri vasta-aineiden ilmeneminen entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Elokuu 2019

Ennen jokaista verensiirtoa täytyy tehdä useita verensiirtoserologisia tutkimuksia, jotta voidaan varmistua siitä, onko verivalmiste turvallista siirtää potilaalle. Ensimmäisenä määritetään potilaan veriryhmä ja tämän jälkeen ennen verensiirtoa tehdään veriryhmän tarkistus ja veriryhmävasta-aineiden seulonta. ”Type & Screen”-käytäntöä noudattavissa verikeskuksissa, seulonnan ollessa negatiivinen, verensiirrossa ei tarvitse huomioida kuin ABO-veriryhmä. Jos seulonta on positiivinen, täytyy jatkotutkimuksilla tunnistaa mikä vasta-aine saa positiivisen reaktion aikaan. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, saataisiinko eri vasta-aineita paremmin esille entsyymikäsitellyillä testisoluilla LISS/Coombs-geelikortteja käyttäen. Normaalisti vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsitellyillä soluilla tutkitaan NaCl/Enzyme-korteilla eikä LISS/Coombs-korteilla.

Tutkimuksen näyteaineisto koottiin Fimlab Laboratoriot Oy:n potilasnäytteistä ja tutkimukseen otettiin mukaan vasta-aineseulonta-negatiivisia ja -positiivisia näytteitä. Työn tavoitteena oli tarjota toimeksiantajalle Fimlab Laboratoriot Oy:lle tietoa, olisiko kyseisestä menetelmästä hyötyä vasta-aineiden tunnistuksessa. Vasta-aineseulonta-positiivisista näytteistä analysoitiin LISS/Coombs-korttipaneelit, NaCl/Enzyme-entsyymikorttipaneelit ja LISS/Coombs-entsyymikorttipaneelit, ja saadut reaktiot koottiin taulukoihin. Näiden eri korttien reaktiivoimakkuuksia vertailtiin toisiinsa. Erityisesti kiinnostuksen kohteena oli tutkia anti-Jka:n ilmenemistä, mutta vasta-aineen harvinaisuuden vuoksi sitä ei saatu tutkimukseen mukaan.

Reaktiivoimakkuuksia vertailemalla voidaan tehdä johtopäätös, että suurimassa osassa näytteistä vasta-aineiden ilmeneminen entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla oli reaktiivoimakkuuksiltaan voimakkaampia tai reaktiot olivat yhtä voimakkaita kuin entsyymimenetelmällä NaCl/Enzyme-korteilla. Tutkittavalla menetelmällä saatiin myös reaktioita sellaisilla testisoluilla, joilla ei muilla menetelmillä tapahtunut reaktiota. Näytemäärä oli kuitenkin pieni, joten tutkimustulosten varmistamiseksi tarvitaan jatkotutkimuksia. Jatkotutkimukset tulisi toteuttaa isommalla näytemäärällä, jotta tuloksista voitaisiin paremmin arvioida kyseisen menetelmän hyötyjä. Jatkotutkimuksia suositellaan erityisesti Rh- ja Kell-veriryhmäjärjestelmien vasta-aineille. Rh- ja Kell-veriryhmäjärjestelmien vasta-aineet ilmenivät tutkimuksessa paremmin tutkittavalla menetelmällä ja jos vastaavia tuloksia saataisiin enemmän, voisi kyseistä menetelmää mahdollisesti käyttää vasta-aineiden tunnistuksen apuna.

Asiasanat: verensiirtoserologia, veriryhmävasta-aine, entsyymimenetelmät, pylvasagglutinaatiomenetelmä

ABSTRACT

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

SÄRKKÄ, ANNA & LAHTINEN, HANNA:
Identification of Different Antibodies with Enzyme-Treated Cells and LISS/Coombs-Cards.

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 3 pages
August 2019

The aim of this study was to clarify whether different blood group antibodies could be better identified with enzyme-treated cells and LISS/Coombs-gel cards. In practice antibodies are identified with NaCl/Enzyme-cards not LISS/Coombs-cards when using enzyme-treated cells. All the data used in this study were collected and analyzed in Fimlab laboratories blood bank. The purpose was to gather more information for Fimlab laboratories if the method used in this study could be used in practice to identify blood group antibodies.

Antibody screening negative and positive samples were collected to the study. Antibody screening positive samples were analyzed with three different methods: LISS/Coombs-cards, NaCl/Enzyme-cards with enzyme-treated cells and LISS/Coombs-cards with enzyme-treated cells. The results from three different methods were combined into Excel-table and they were compared. Antibody anti-Jka was the main subject of interest in this study but due to its rarity it could not be included.

The results show that the majority of the antibody identification reactions were more sensitively or equally shown with LISS/Coombs-cards than NaCl/Enzyme-cards when using enzyme-treated cells. Reactions were also shown with test cells which had no reactions with other methods than LISS/Coombs-cards and enzyme-treated cells. Rh- and Kell blood group antibodies were noticed to have stronger reactions with LISS/Coombs-cards and enzyme-treated cells than other methods. The small amount of data used in this study requires further studies with larger data to prove whether this method is beneficial and can be used in practice.

Key words: blood group serology, blood group antibody, enzyme techniques, column agglutination technology

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	VERIRYHMÄJÄRJESTELMÄT	8
	2.1. Punasoluantigeenit.....	8
	2.2. Punasoluvasta-aineet.....	8
	2.3 Veriryhmät.....	10
	2.4 Verensiirto ja sen haittavaikutukset.....	13
3	VERENSIIRTOSEROLOGISET TUTKIMUKSET	14
	3.1 Suora ja epäsuora antiglobuliinimenetelmä	15
	3.2 Veriryhmävasta-aineiden seulonta ja tunnistus	16
	3.3 Entsyymimenetelmät.....	19
	3.4 Pylväsagglutinaatiomenetelmä geelikorteilla.....	22
	3.5 Automaatio.....	25
4	KOKEELLINEN TUTKIMUS.....	27
5	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS	28
6	TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	29
	6.1 Tutkimusaineisto	29
	6.2 Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden vertailu	30
	6.3 Vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden vertailu.....	32
	6.4 Johtopäätökset.....	36
7	POHDINTA	37
	7.1 Tulosten arviointi	37
	7.2 Eettisyys ja luotettavuus.....	38
	7.3 Jatkotutkimukset	39
	7.4 Opinnäytetyöprosessin kulku ja arvio.....	39
	LÄHTEET	40
	LIITTEET	43
	Liite 1. Esimerkki antigeenikartasta.....	43
	Liite 2. Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden seulonnat.....	44
	Liite 3. Vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden tunnistuspaneelit. 45	

ERITYISSANASTO

Agglutinaatio	Punasolujen sakkautuminen vasta-aineen sitoutumisen seurauksena
AHG	Antihumaaniglobuliini
Alleeli	Alleelit eli geenimuodot ovat saman geenin vaihtoehtoisia muotoja, joilla on kromosomissa sama paikka
Anti-D-suojaus	Pääasiallisesti käytetään RhD-negatiivisten äitien suojaukseen RhD-immunisaatiota vastaan raskauksien ja synnytyksien yhteydessä
Autoagglutinaatio	Punasolujen sakkautuminen potilaan omien vasta-aineiden takia ilman lisättyä vasta-ainetta
DAT	Direct antiglobulin test, suora antiglobuliinikoe
Fenotyyppi	Ilmiasu, millaisia antigeenejä punasolujen pinnalla on
Fenotyyppitys	Verensiirtoserologinen tutkimus, jolla tutkitaan millaisia antigeenejä punasolujen pinnalla on
HDN	Hemolytic disease of the newborn, vastasyntyneen hemolyyttinen tauti
Hemolyysi	Punasolujen hajoaminen
IAT	Indirect antiglobulin test, epäsuora antiglobuliinikoe
ISBT	International society of blood transfusion
in vitro	Koeputkessa suoritettu tutkimus
in vivo	Elävässä organismissa suoritettu tutkimus
Monoklonaalinen vasta-aine	Yhden solukloonin tuottama vasta-aine
Monospesifinen	Yhteen antigeeniin tai epitooppiin kohdistuva
Polyspesifinen	Useampaan kuin yhteen antigeeniin tai epitooppiin kohdistuva
Tukilaboratorio	Laajan tutkimusvalikoiman ja asiantuntijuuden omaava laboratorio

1 JOHDANTO

Suomessa toimitetaan vuosittain sairaaloihin noin 260 000 verivalmistetta 50 000 potilaalle (Ekblom-Kullberg, Savolainen, Koski, Mahlamäki, Sainio, Salmela & Tienhaara 2018, 206). Veripalvelun veriturvatoimistoon ilmoitettiin vuonna 2015 yhteensä 223 verivalmisteiden siirrosta johtuvaa haittavaikutusta ja näistä 12 oli vakavia (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 6). Jokaisessa verensiirrosta on mahdollisuus haittavaikutukseen. Haittavaikutukset voivat olla lieviä tai vakavia ja henkeä uhkaavia. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 180-181.) Yleensä haittavaikutukset ilmenevät siirron aikana tai viimeistään vuorokauden kuluttua siirrosta (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 54). Muita verensiirtotoimintaan liittyviä haittapähtumia ovat väärä verensiirto, verivalmisteen laatuun tai turvallisuuteen liittyvä vaaratilanne sekä verensiirtotoimintaan liittyvä vaaratilanne (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 182, 186). Turvallisen verensiirron kannalta on tärkeää, että kaikki tarvittavat verensiirtotutkimukset on tehty ennen verensiirtoa ja potilas sekä verivalmiste on tunnistettu luotettavasti (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 11).

Verensiirtotutkimuksiin kuuluvia tutkimuksia ovat veriryhmämääritys ja veriryhmätarkistus sekä punasoluvasta-aineiden seulonta ja tarvittaessa tehtävä punasoluvasta-aineiden tunnistus. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 46.) Lisäksi tehdään sopivuuskoe siirrettäväksi suunnitelluille valmisteille. Jos laboratoriossa on käytössä ”Type and Screen”-käytäntö, sopivuuskoetta ei tehdä, ellei potilaalla ole tai aiemmin ole ollut punasoluvasta-aineita. (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 10-11.) Mikäli punasoluvasta-aineiden seulonta tulee positiiviseksi, vasta-aine täytyy tunnistaa, jotta saadaan selville, onko kyseessä kliinisesti merkityksellinen vasta-aine (McCullough 2017, 244). Vasta-aineen tunnistaminen on tärkeää, sillä tunnistamaton ja kliinisesti merkityksellinen vasta-aine voi aiheuttaa verensiirrosta hemolyyttisen verensiirtoreaktion (Murphy, Roberts & Yazer 2017, 60).

Kun vasta-aineseulonnasta saadaan positiivinen tulos, täytyy tehdä vasta-aineiden tunnistus (Harmening 2018, 237). Myös positiivinen tulos sopivuuskokeessa tai ylimääräinen reaktio ABO-määrityksen plasmapuolella ovat syitä tunnistuksen tekemiselle. Suomessa vasta-aineiden tunnistuksessa käytetään solupaneeleja,

joissa on yleensä 11 punasolususpensiota, joiden fenotyyppi tunnetaan. Näytteessä mahdollisesti olevat vasta-aineet tarttuvat reagenssipunasoluihin ja ne voidaan osoittaa antiglobuliinireagenssin avulla. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 64.) Vasta-aineiden tunnistuksessa käytetään usein entsyymejä, sillä osa vasta-aineista saadaan esille paremmin entsyymimenetelmää käytettäessä. Osa vasta-aineista kuitenkin tuhoutuu entsyymikäsittelyssä, joten joidenkin vasta-aineiden kohdalla menetelmästä ei ole hyötyä. (Harmening 2018, 70.)

Opinnäytetyön aiheena on tutkia eri vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsittelyillä soluilla LISS/Coombs- korteilla. Normaalisti vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsittelyillä soluilla tutkitaan NaCl/Enzyme-korteilla eikä LISS/Coombs-korteilla. Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, saataisiinko eri vasta-aineita paremmin esille entsyymikäsittelyillä testisolulla LISS/Coombs-kortteja käyttäen. Fimlab Laboratoriot Oy:n on tärkeä saada tietoa, olisiko kyseisestä menetelmästä hyötyä vasta-aineiden tunnistuksessa.

Opinnäytetyön toimeksiantajana on Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen verikeskus. Fimlab Laboratoriot Oy on yritys, joka tuottaa laboratoriopalveluita Pirkanmaan, Kanta-Hämeen, Keski-Suomen ja Päijät-Hämeen alueilla ja sillä on lähes sata toimipistettä. Yrityksen omistavat Pirkanmaan, Kanta-Hämeen ja Keski-Suomen sairaanhoitopiirin kuntayhtymät ja Päijät-Hämeen hyvinvointikuntayhtymä. Veriryhmävasta-aineiden ilmenemistä tutkitaan Fimlab Laboratoriot Oy:n hematologian laboratorion verikeskuksessa. Verikeskuksen tehtävänä on tehdä verensiirtoja edeltävät sopivuustutkimukset sekä verivalmisteiden varastointi ja jakelu. (Fimlab Laboratoriot Oy n.d.)

Opinnäytetyössä käsitellään aluksi teorialtietoa veriryhmäjärjestelmistä. Lisäksi käsitellään verensiirtoserologisia tutkimuksia, jossa perehdytään vasta-aineiden tunnistukseen. Tutkimusmenetelmiä on kuvattu kappaleessa neljä ja tutkimustuloksia kappaleessa kuusi, jossa kerrotaan tutkimusnäytteistä, tutkimuksen tuloksista ja johtopäätöksistä.

2 VERIRYHMÄJÄRJESTELMÄT

2.1. Punasoluantigeenit

Molekyylillä voidaan kutsua antigeeniksi, jos se pystytään tunnistamaan sille spesifisen vasta-aineen avulla. Antigeenit voivat olla proteiineja, glykoproteiineja tai glykolipidejä, jotka toimivat punasolujen pintamarkkereina niiden solukalvojen pinnalla. Ne ovat punasolun solukalvoon kiinnittyneitä kiinteitä rakenteita ja ne voivat läpäistä solukalvon kerran, useamman kerran tai ne voivat olla ankkuroituneina lipidihännän avulla solukalvoon läpäisemättä solukalvoa. (Daniels & Bromilow 2014, 1-3.) Punasolujen pinnalla olevat antigeenit määrittävät yksilön veriryhmän (Dean 2005). Punasolujen pinnalta löytyy monia erilaisia punasoluantigeenejä ja perimä määrittää sen, mitä eri antigeenejä yksilön punasolujen pinnalla ilmenee (Choudhury & Bharucha 2017, 91). Eri veriryhmäjärjestelmien veriryhmäantigeenien määrä punasolujen pinnalla voi vaihdella 1500:sta yli miljoonaan per punasolu (McCullough 2017, 173).

Immuunipuolustus aktivoituu antigeenien kautta. Esimerkiksi jos potilas saa verensiirrossa sellaisia punasoluja elimistöönsä, joiden pinnalla on elimistölle vieraita antigeenejä, elimistö hyökkää näitä punasoluja vastaan. Elimistö voi siis hyökätä sellaisia soluja vastaan, joiden antigeenirakenteita se ei tunnista. Elimistön omien solujen antigeenit ovat sille tuttuja, joten terveen ihmisen immuunipuolustus ei aktivoitu näitä omia rakenteita vastaan. (Dean 2005.)

2.2. Punasoluvasta-aineet

Vasta-aineet ovat rakenteellisesti samankaltainen joukko proteiineja, joita kutsutaan immunoglobuliineiksi (Ig) (Klein & Anstee 2014, 62). Ne tunnistavat elimistölle vieraita antigeenejä. Tarttumalla antigeeniin vasta-aineet saavat aikaan sen määräämän biologisen reaktion elimistössä. (Choudhury & Bharucha 2017, 94; Klein & Anstee 2014, 62.)

Punasoluvasta-aineet voivat olla luonnollisia vasta-aineita tai allovesta-aineita. Allovesta-aineet ovat syntyneet jonkin immunisoivan tapahtuman, kuten verensiirron tai raskauden seurauksena. (Daniels & Bromilow 2014, 3.) Luonnolliset vasta-aineet ovat muodostuneet ilman immunisoivaa tapahtumaa. Esimerkiksi ABO-veriryhmäjärjestelmän vasta-aineet anti-A ja anti-B ovat luonnollisia vasta-aineita. (Klein & Anstee 2014, 71.) Näitä anti-A ja -B vasta-aineita kutsutaan isoagglutiniineiksi. Oletetaan, että ruuansulatuskanavan bakteerit laukaisevat isoagglutiniinien muodostumisen varhaislapsuudessa. (Murphy, Pamphilon & Heddle 2013, 17.)

Punasoluvasta-aineet voivat olla myös autovasta-aineita. Tällaiset vasta-aineet reagoivat henkilön omia veriryhmätekijöitä kohtaan. Ne tulevat esiin verensiirtoserologisissa tutkimuksissa, kun potilaan plasma reagoi kaikilla punasoluvasta-aineiden tunnistuspaneelin reagenssisoluilla sekä potilaan omilla punasoluilla. (Murphy ym. 2013, 245.) Autovasta-aineiden kliininen merkitys vaihtelee ja verensiirroissa ne huomioidaan potilaskohtaisesti (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 14-15).

Punasoluvasta-aineet voidaan jakaa myös kliinisesti merkityksellisiin ja kliinisesti merkityksettömiin vasta-aineisiin (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 16-17). Kliinisesti merkitykselliset vasta-aineet voivat aiheuttaa hemolyyttisiä verensiirto-reaktioita ja sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia (HDN) (Ilmakunnas 2019, 48). Kaikki kliinisesti merkitykselliset punasoluvasta-aineet on huomioitava punasoluvalmisteita valittaessa, mukaan lukien aikaisemmin todetut vaikka niitä ei enää todettaisi vasta-aineseulonnessa. Tällaisessa tilanteessa verensiirtoon valitaan sellaisia valmisteita, joista puuttuvat ne veriryhmätekijät, joita kohtaan potilaalla on vasta-aineita. (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 16.) Kliinisesti merkityksettömät vasta-aineet voivat taas häiritä verensiirtoserologisia tutkimuksia, mutta ne eivät aiheuta verensiirtoreaktioita (Ilmakunnas 2019, 48).

Luonnolliset vasta-aineet ovat yleensä IgM-luokan vasta-aineita, ja allovesta-aineet ovat IgG-luokan vasta-aineita. Joskus veriryhmävasta-aineet voivat olla myös IgA-luokan vasta-aineita. (Daniels & Bromilov 2014, 3.) Jotta agglutinaatio tapahtuu, vasta-aineen täytyy tarttua useampaan punasoluun kerralla. IgM-luokan vasta-aineet pystyvät agglutinoimaan punasoluja suoraan, koska niillä on

useampi sitoutumiskohta, joten ne voivat tarttua useampaan punasoluun kerrallaan. IgG-luokan vasta-aineet taas eivät pysty suoraan agglutinaatioon, koska ne voivat kiinnittyä vain yhteen punasoluun kerrallaan, sillä niillä on vain kaksi sitoutumiskohtaa. (Daniels & Bromilow 2014, 10; Choudhury & Bharucha 2017, 96, 98.) Tämän takia IgM-luokan vasta-aineet reagoivat parhaiten suorassa antiglobuliinimenetelmässä, kun taas IgG-luokan vasta-aineet epäsuorassa antiglobuliinimenetelmässä (Reid, Lomas-Francis & Olsson 2012, 20).

2.3 Veriryhmät

The International Society of Blood Transfusionin (ISBT) mukaan nykyisin tunnetaan 36 eri veriryhmäjärjestelmää ja erilaisia punasoluantigeenejä yli 300. Veriryhmäjärjestelmät voivat sisältää joko yhden tai useamman punasoluantigeenin. (ISBT n.d.) Veriryhmät ovat kliinisesti erittäin merkityksellisiä verensiirroissa. Monet veriryhmävasta-aineet pystyvät aiheuttamaan nopean siirrettyjen punasolujen tuhoutumisreaktion, ja näin syntyy hemolyyttinen verensiirtoreaktio joko heti tai useamman päivän kuluttua verensiirron jälkeen. (Daniels & Bromilov 2014, 3.) Verensiirron kannalta tärkeimmät veriryhmäjärjestelmät ovat ABO- ja Rh-veriryhmäjärjestelmät (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 8). Muita veriryhmäjärjestelmiä ovat esimerkiksi Kell, Duffy, Kidd, MNS ja Lutheran. Näiden veriryhmäjärjestelmien vasta-aineita kohdataan ABO- ja Rh-veriryhmäjärjestelmien jälkeen eniten verensiirtoserologisissa tutkimuksissa. (Harmening 2018, 175).

ABO-veriryhmäjärjestelmässä on kaksi antigeeniä, A ja B antigeenit. Geenien alleelit määrittävät, mitkä antigeenit esiintyvät punasolujen pinnalla. ABO-veriryhmän alleelit ovat A, B ja O. Jos omistaa alleelin O, se tarkoittaa, että ei tuota A eikä B antigeenejä. Punasolujen pinnalla ei siis ole kumpaakaan antigeeniä. Näin ollen nämä kolme alleelia muodostavat neljä erilaista fenotyyppiä: A, B, AB ja O. (Daniels & Bromilow 2014, 22.) ABO-veriryhmäjärjestelmä on verensiirron kannalta tärkein veriryhmäjärjestelmä, koska ABO-ryhmän antigeenit ovat kaikista antigeeneistä immunogeenisimpiä sekä immuunisysteemi kehittää vasta-aineita luonnostaan niitä antigeenejä kohtaan, joita punasolujen pinnalla ei ole (Dean 2005). Esimerkiksi henkilö, jolla on veriryhmä A, on muodostanut vasta-aineita antigeeniä B kohtaan, kun taas veriryhmä O muodostaa vasta-aineita sekä A:ta

että B:tä kohtaan. ABO vasta-aineet ovat IgM luokan vasta-aineita ja ne aktivoituvat 37°C:ssa, joten ne aiheuttavat välittömästi punasolujen tuhoutumisen, joka voi aiheuttaa vakavan ja jopa kuolemaan johtavan hemolyyttisen verensiirtoreaktion. (Murphy ym. 2017, 33.)

Rh- veriryhmäjärjestelmän D-antigeeni on erittäin immunogeeninen. Jos D positiivista verta siirretään D negatiiviselle, 90 % tapauksissa veren vastaanottaja kehittää anti-D vasta-ainetta. D negatiivinen nainen voi myös kehittää vasta-aine anti-D:n jos hän on raskaana ja sikiö on veriryhmältään D positiivinen, ellei äiti saa anti-D-suojauksia. Punasoluja pääsee jonkin verran istukan kautta sikiöstä äitiin ja näin hän immunisoituu. Seuraavassa raskaudessa, jos sikiö on veriryhmältään D negatiivinen, voi raskaus johtaa sikiön hemolyyttiseen tautiin. (Klein & Anstee 2014, 167.) Rh-veriryhmäjärjestelmään kuuluu 56 eri antigeeniä. D-antigeenin lisäksi tärkeimpiä ovat C, c, E ja e. Rh-ryhmän antigeenit ovat todella immunisoivia ja näistä D-antigeeni on kaikista immunogeenisin. (Harmening 2019, 158.) Se on jopa 20 kertaa immunogeenisempi kuin toiseksi immunogeenisin Rh-antigeeni c. Tämän takia yleensä puhutaan D positiivisesta Rh positiivisena ja D negatiivisesta Rh negatiivisena. (Klein & Anstee 2014, 167.)

Kell-veriryhmäjärjestelmän antigeeniä K vastaan muodostunut vasta-aine, anti-K, voi aiheuttaa vakavan verensiirtoreaktion. 10 % K-negatiivisista potilaista, jotka ovat saaneet verensiirrossa K-positiivisia verivalmisteita, alkavat muodostaa vasta-ainetta antigeeniä K kohtaan. Tämän takia se on D-antigeenin jälkeen toiseksi immunogeenisin antigeeni. (Murphy ym. 2017, 39). Suomessa noin 4 % väestöstä on K positiivisia mutta muualla länsimaissa antigeeni on yleisempi, 9 % luokkaa. Muita tunnetuimpia Kell-veriryhmäjärjestelmän antigeenejä ovat k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb ja Ula (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 28; Harmening 2018, 194-195). Ula-antigeeni on niin sanotusti suomalainen Kell-järjestelmän antigeeni ja sen esiintyvyys väestössä on noin 2 % (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 28).

Duffy-veriryhmäjärjestelmän tärkeimmät antigeenit verensiirtoserologiassa ovat Fya ja Fyb. Anti-Fya on yleinen vasta-aine, vaikka sen esiintyvyys onkin kolme kertaa pienempi kuin anti-K:n. Anti-Fyb vasta-aineen esiintyvyys on taas 20 kertaa pienempi kuin anti-Fya:n, joten se ei ole niin yleinen. (Harmening 2018, 198).

50 % suomalaisista kuuluu yleisimpään fenotyyppiin $Fy(a+b+)$, eli punasolun pinnalta löytyy molemmat antigeenit. 23 % suomalaisista kuuluu $Fy(a-b-)$ fenotyyppiin ja 27% $Fy(a-b+)$ fenotyyppiin. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 30).

Kidd-veriryhmäjärjestelmään kuuluu vain kolme antigeeniä, Jka, Jkb ja Jk3. Jos ihminen kuuluu $Jk(a-b-)$ fenotyyppiin, eli molemmat antigeenit puuttuvat, kutsutaan fenotyyppiä nimellä Jk3. Tämä fenotyyppi on erittäin harvinainen ja sitä on löydetty eurooppalaisista suvuista esimerkiksi Suomesta. (Harmening 2018, 199, 201.) Suomalaisista noin 50 % väestöstä on fenotyyplitään $Jk(a+b+)$. $Jk(a+b-)$ fenotyyppiin kuuluu noin 25 % ja $Jk(a-b+)$ fenotyyppiin noin 25 % suomalaisista. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 31).

MNS-veriryhmäjärjestelmän antigeenejä ovat M, N, S ja s. Anti-M ja anti-N vasta-aineet ovat kliinisesti merkityksettömiä vasta-aineita. Joissain tapauksissa anti-M on kuitenkin aiheuttanut viivästyneitä verensiirtoreaktioita. Anti-S ja anti-s taas ovat aina kliinisesti merkityksellisiä vasta-aineita, eli ne voivat aiheuttaa verensiirtoreaktion. (Dean 2005.) Lewis-veriryhmäjärjestelmään kuuluvat antigeenit Lea ja Leb. Suomessa fenotyypit esiintyvät seuraavasti: $Le(a+b-)$ 12 %:lla, $Le(a-b+)$ 78 %:lla ja $Le(a-b-)$ 10 %:lla väestöstä. Lewis-järjestelmän punasoluvasta-aineet ovat luonnollisia vasta-aineita, joten niitä ei pidetä verensiirron kannalta merkityksellisinä. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 40.) Lutheran-veriryhmäjärjestelmän antigeenit ovat Lua ja Lub. Anti-Lua ei ole kliinisesti merkityksellinen vasta-aine, kun taas anti-Lub on ja se tulee aina huomioida verensiirroissa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 39.)

Muita veriryhmäjärjestelmiä ovat Landsteiner-Weiner-järjestelmä, P1PK-järjestelmä, Vel-järjestelmä, Colton-järjestelmä, Cromer-järjestelmä, Gerbich-järjestelmä, Chido/Rodgers-järjestelmä, Xg-järjestelmä ja Bg (HLA) -veriryhmät. Henkilöllä voi myös olla harvinainen veriryhmä, jolloin punasolujen pinnalla on jokin punasoluantigeeni, jota juuri kukaan toisella ei tavata tai henkilön punasoluista puuttuu jokin veriryhmätekiä, jota on väestössä melkein kaikilla muilla. Harvinaisiin veriryhmiin kuuluvilla henkilöillä punasoluvasta-aineet ovat yleensä immuni-soitumisen seurausta. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 33-43.) Veriryhmätekiä luokitellaan harvinaiseksi, kun sen esiintyvyys väestössä on noin 1:1000 henkilöä (Veripalvelu 2018).

2.4 Verensiirto ja sen haittavaikutukset

Verensiirrossa veriryhmällä on suuri kliininen merkitys. ABO-veriryhmäjärjestelmän löytyminen oli yksi tärkeimmistä verensiirtoja mahdollistavista tekijöistä. Jos elimistö on kehittänyt jotain vasta-ainetta tiettyä antigeeniä kohtaan, ja siirretyissä punasoluissa on kyseistä antigeeniä, syntyy hemolyyttinen verensiirtoreaktio. (Daniels & Bromilov 2014, 3.) Tavallisimpia hemolyyttisen verensiirtoreaktion haittavaikutuksia ovat kuume, vilunväristykset, urtikaria ja hengenahdistus. Vakavia, henkeä uhkaavia ovat akuutti hemolyysi, sepsis, anafylaksia, akuutti keuhkovaurio ja verenkierron ylikuormitus. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 181.) Useimmiten hemolyyttinen verensiirtoreaktio johtuu ABO-virheestä, joka usein johtuu potilaan virheellisestä tunnistamisesta jossain vaiheessa verensiirtoketjua (Ilmakunnas 2019).

Hemolyysi tapahtuu intra- tai ekstravaskulaarisesti. Pieni osa veriryhmävasta-aineista kykenee intravaskulaariseen hemolyysiin, jolloin vasta-aine aktivoi komplementin loppuun saakka suoraan punasolun pinnalla, jolloin punasolut tuhoutuvat muutamassa minuutissa intravaskulaarisesti. Tällaisia ovat esimerkiksi ABO-isoagglutiniinit ja anti-Jk-vasta-aineet. Suurin osa vasta-aineista aiheuttaa hemolyysin ekstravaskulaarisesti. Tällöin kudismakrofagit poistavat veriryhmävasta-aineiden merkkamat punasolut verenkierrosta pernassa ja maksassa. (Ilmakunnas 2019.)

Verensiirtoreaktiot jaotellaan myös välittömiin tai viivästyneisiin verensiirtoreaktioihin (Reid ym. 2012, 21). Useimmiten haittavaikutukset ilmenevät verensiirron aikana tai viimeistään 24 tunnin kuluttua siirrosta. Jotkin harvinaiset verensiirtoreaktiot voivat ilmentyä vasta useiden viikkojen tai jopa vuosien kuluttua verensiirrosta. (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 54.) Lievät verensiirrosta johtuvat haittavaikutukset tai väärät verensiirrot ilmoitetaan oman sairaalan verikeskukseen tai laboratorioon, jossa ne tilastoidaan ja ilmoitetaan vuosittain veriturvatoimistoon. Vakavat haitat ja vaaratilanteet on ilmoitettava Veripalvelun veriturvatoimistoon. (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 58.)

3 VERENSIIRTOSEROLOGISET TUTKIMUKSET

Verensiirtotutkimuksiin kuuluvat kerran tehtävä veriryhmänmääritys (E-ABORh), veriryhmävasta-aineiden seulonta (P-VRAb-O) ja tarvittaessa sopivuuskoe (X-koe) ja punasoluvasta-aineiden tunnistus (B-VRAbTu1). Veriryhmäntarkistus tehdään sopivuusnäytteestä ennen jokaista punasolujen siirtoa. Veriryhmämääritys ja sopivuuskoe tulee määrittää kahden eri näytteenottajan toimesta otetuista näytteistä. Kun veriryhmä tarkastetaan eri näytteestä ennen jokaista verensiirtoa, saadaan kiinni virheet potilaan tunnistuksessa, ja näin minimoitua virheelliset verensiirrot. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 46, 114.) Verensiirtoserologisissa tutkimuksissa voidaan käyttää näytemateriaalina joko plasmaa tai seerumia. Seerumissa voi esiintyä fibriinihiyytymiä, joka voi aiheuttaa tiettyjä tekniikkoja käytettäessä vääriä positiivisia tuloksia, joten plasman ja tarkemmin EDTA-plasman käyttö on suositeltavaa. (Choudhury & Bharucha 2017, 237.)

Veriryhmämäärityksessä määritetään potilaan ABO- ja RhD-veriryhmät. ABO-veriryhmä tulee määrittää potilaan punasoluista monoklonaalisilla IgM-luokan anti-A ja anti-B reagensseilla ja plasmasta A1- ja B-reagenssipunasoluilla. (Murphy ym. 2013, 244.) Niiden avulla selvitetään, onko punasolujen pinnalla A- tai B-punasoluantigeenejä ja onko plasmassa luonnollisia anti-A tai anti-B isoagglutiiniineja (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 57). RhD-veriryhmä määritetään potilaan punasoluista IgM luokan monoklonaalisella anti-D reagenssilla (Murphy ym. 2013, 244). Tampereen Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksessa veriryhmämäärityksissä käytetään Bio-Rad:in DiaClon ABO/D + Reverse grouping ID-kortteja, jossa Ctl-mikrokyvetti toimii kontrollipylväänä, jossa reaktion tulee aina olla negatiivinen (Bio-Rad d. n.d.). Kontrollipylväällä varmistetaan, ettei esimerkiksi autoagglutinaatio johda väärin positiivisiin tuloksiin. Sopivuusnäytteestä tehtävä veriryhmäntarkastus tehdään vain punasolupuolelta ja tätä tulosta verrataan aiemmin tehtyyn veriryhmämääritykseen. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 57.)

”Type & Screen” eli veriryhmä ja seulonta –käytännössä kaikille potilaille tehdään veriryhmämääritys (ABO/Rh) ja punasoluvasta-aineiden seulonta ennen punasolujen siirtoa (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 11). ”Type & Screen”-käytäntö

sopii niille potilaille, joiden vasta-aineseulonta on negatiivinen eli noin 90%:lle potilaista. Kun vasta-aineseulonta on negatiivinen, potilas on ”Type & Screen” –kelpoinen, jolloin serologista sopivuuskoetta ei tehdä ollenkaan, vaan verensiirtotietojärjestelmä varmistaa elektronisesti, että siirrettävät punasolut vastaavat potilaan ABO- ja RhD-veriryhmiä. (Ilmakunnas 2019, 51.) ”Type & Screen”-käytännöstä on hyötyä verivarastojen ylläpidossa. Verivalmisteet eivät ole nimikoitu tietyille potilaille, joten valmisteet saadaan tehokkaammin käyttöön. (Pathak, Chandrashekar & Wankhede 2011.) Valmisteet voidaan käyttää kelpoisuusajan mukaisessa järjestyksessä, jolloin saadaan vähennettyä verivalmisteiden vanheneemisesta johtuvaa hävikkiä (Verivalmisteiden käytön opas 2016, 11). ”Type & Screen”-käytäntö on ideaali verikeskuksille, joissa käytetään automaatiota, ja se on vähemmän aikaa vievää kuin sopivuuskoekäytäntö (Pathak ym. 2011).

”Type & Screen”-käytäntö ei sovi potilaille, joille on joskus tehty kantasolujen- tai maksansiirto tai joilla on joskus todettu veriryhmävasta-aineita, vaikka ne olisivatkin kliinisesti merkityksettömiä. Näillä potilailla käytetään sopivuuskoekäytäntöä. Sopivuuskoekäytännössä veriryhmäntarkistuksen ja vasta-aineseulonnan lisäksi serologisen sopivuuskokeen avulla testataan siirrettävien punasolujen sopivuus potilaalle. (Ilmakunnas 2019, 51.) Sopivuuskoekäytäntö edellyttää veritilausta etukäteen, jotta sopivuuskokeet ehditään tehdä ennen verensiirron suunniteltua ajankohtaa. Verikeskus toimittaa osaston käyttöön punasoluvalmisteet niille potilaille, joiden sopivuuskoe on negatiivinen, eli valmisteen punasolut eivät reagoi potilaan plasman vasta-aineiden kanssa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 47-48, 117-118.)

3.1 Suora ja epäsuora antiglobuliinimenetelmä

Normaaleissa olosuhteissa elimistön punasoluihin ei ole kiinnittyneenä IgG luokan vasta-aineita tai komplementin komplementteja (C3d). Erilaiset kliiniset tilat, kuten autoimmuunihemolyyttinen anemia (AIHA), jonkin lääkeaineen vaikutus tai verensiirtoreaktio siirrettyjä punasoluja vastaan voi aiheuttaa IgG:n tai komplementaaristen proteiinien kiinnittymisen potilaan punasoluihin. Suoralla antiglobuliinimenetelmällä (DAT, direct antiglobulin test) tutkitaan näitä punasolujen pintaan tarttuneita immunoglobuliineja tai komplementin komplementteja in vivo. (Blaney & Howard 2008, 25; Ekblom-Kullberg ym. 2018, 51.) Komplementti on

ryhmä proteiineja, joita kutsutaan komplementin komponenteiksi ja jotka vaurioittavat aktivoituessaan punasolujen solukalvoja aiheuttaen hemolyysin (Johns 2015, 444). Suorassa antiglobuliinikokeessa käytetään monoklonaalisia reagensseja, jotka sisältävät anti-IgG:tä ja anti-C3d:tä (Johns ym. 2015, 47). Tällaista reagenssia kutsutaan Coombsin reagenssiksi tai antihumaaniglobuliiniksi, josta käytetään lyhenteitä AG ja AHG (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 51) Suorassa antiglobuliinimenetelmässä voidaan käyttää myös monospesifisiä reagensseja, joilla pystytään määrittämään tietty immunoglobuliini (IgG) tai komplementin komplementti (C3) joka on kiinnittynyt punasoluantigeeniin (McCullough 2017, 215).

Epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä (IAT, indirect antiglobulin test) taas tutkitaan IgG-luokan vasta-aineiden kiinnittymistä punasoluihin in vitro. Seerumin sisältävien vasta-aineiden annetaan ensin kiinnittyä reagenssipunasolujen anti-geeneihin inkubaation aikana. Tämän jälkeen vasta-aineet, jotka eivät ole kiinnittyneet punasoluantigeeneihin täytyy pestä pois, jotta ne eivät häiritse reaktiota, kun antihumaaniglobuliini lisätään reaktioon. (Blaney & Howard 2008, 27.) Pylväsagglutinaatiomenetelmässä punasoluja ei tarvitse pestä, koska punasolususpensio lisätään mikrokvyetteihin ennen plasmaa (tai seerumia), jolloin geelin pinnalle muodostama kerros estää seerumin sisältämää IgG:tä neutralisoimasta AHG:ta. (Bio-Rad b. n.d.) Tämän jälkeen lisätään antihumaaniglobuliinia (AHG), joka saa aikaan näytteen agglutinoinnin. Epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää käytetään esimerkiksi vasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa. (Blaney & Howard 2008, 27-28.)

3.2 Veriryhmävasta-aineiden seulonta ja tunnistus

Verensiirron saaneista potilaista noin 2 % kehittää veriryhmävasta-aineita. Mitä useamman verensiirron saa, sitä todennäköisempää on vasta-aineen kehittyminen. (Ilmakunnas 2019, 49.) Veriryhmävasta-aineiden seulonnan avulla detektoidaan kliinisesti merkittäviä punasoluvasta-aineita, joiden tiedetään aiheuttavan hemolyyttisiä verensiirtoreaktioita (Johns 2015, 112). Vasta-aineiden seulonnan tulisi aina olla mukana verensiirtoserologisissa tutkimuksissa ja vasta-aine-seulonta-positiivisten näytteiden kohdalla myös vasta-aineiden tunnistuksen. Veriryhmävasta-aineiden seulonnan ja tunnistuksen kaksi tärkeintä tekniikkaa ovat

epäsuora antiglobuliinimenetelmä ja entsyymitekniikat. Yleisimmin käytetty on epäsuora antiglobuliinitesti, joka tehdään LISS/Coombs-geelikorteilla. (Shin ym. 2009).

Seulonnassa käytettävät reagenssit sisältävät punasoluja, joiden fenotyypit tunnetaan ja jotka ovat antigeeni-positiivisia yleisimmin esiintyviä vasta-aineita kohtaan. Seulontasolut ovat yhden verenluovuttajan soluista tehtyjä suspensioita. Veriryhmävasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa reagenssisoluina käytetään vain ABO-ryhmältään O-ryhmän punasoluja. Tällöin eliminoidaan mahdollisuus löytää ABO-ryhmän vasta-aine potilaan plasmasta. Vasta-aineiden tunnistuksessa halutaan esille odottamattomia vasta-aineita, eli muita kuin ABO-ryhmän vasta-aineita, joten on tärkeää käyttää vain O-ryhmän punasoluja. Vasta-aineiden seulonnalla ja tunnistuksella on erona se, että niissä käytetään eri määrä testisoluja. (Johns 2015, 129.)

Seulonnassa käytetään yleensä kahdesta neljään eri luovuttajan punasolususpensioita. (Johns 2015, 129-130.) Seulontasolujen lukumäärällä ei ole merkitystä, kunhan niissä esiintyy vaadittavat punasoluantigeenit. Seulontasoluissa tulee olla edustettuina ainakin antigeenit D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka ja Jkb. Näiden lisäksi Suomessa ”Type & Screen”-käytännössä käytetään lisäsoluina kahden luovuttajan suspensiota (SF-solut), jotta seulontasolut kattavat myös tärkeimmät Suomessa esiintyvät verensiirtojen kannalta merkitykselliset harvinaiset antigeenit (Cw, Cx, Ula ja LWb). (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 60.)

Jos potilaan plasmassa on jotakin vasta-ainetta reagenssipunasolun antigeeniä kohtaan, saadaan vasta-aineseulonnasta yleensä positiivinen tulos (Maitta 2018, 45). Silloin vasta-aine täytyy tunnistaa ja selvittää onko se kliinisesti merkittävä verensiirron kannalta (Harmening 2018, 237). Suomessa veriryhmävasta-aineiden tunnistuksessa käytetään yleensä 11 eri punasolususpensiota (Ekblom-Kullberg 2018, 64). Potilaan plasma testataan näiden fenotyypiltään tunnettujen punasolupaneelien avulla. Jokaisesta solupaneelistä on tehty antigeenikartat taulukon muotoon (ks. Liite 1), jotka kertovat, mitä punasoluantigeneja löytyy puna-

solususpensioiden punasolujen pinnalta. Saatuja reaktivoimakkuuksia verrataan antigeenikarttaan, jolloin saadaan tunnistettua vasta-aineet näytteestä. (Johns 2015, 129.)

Esimerkiksi anti-Jka reagoi sellaisten reagenssisolujen kanssa, jotka ovat Jka-positiivisia, mutta se ei reagoi Jka-negatiivisten solujen kanssa. Näin voidaan päätellä, mikä tai mitkä vasta-aineet ovat kyseessä. (Ekblom-Kullberg 2018, 64.) Antigeenikartan käyttö perustuu siis sellaisten vasta-aineiden poissulkemiseen, jotka eivät ole aiheuttaneet positiivista reaktiota. Vain niistä soluista, joissa reaktio on negatiivinen, voidaan suorittaa poissulku. Poissulkutekniikkaa tulisi käyttää vain solujen kohdalla, joissa antigeeni on homotsygootti. (Harmening 2018, 238.) Antigeeni tulisi poissulkea antigeenikartan kahden reagoimattoman solun avulla ja vastaavasti löytynyt vasta-aine tulisi mahdollisuuksien mukaan varmistaa kahden sellaisen solun avulla, jotka ovat tuottaneet positiivisen reaktion (Poole 2012).

Verensiirtoserologisissa tutkimuksissa reaktivoimakkuuteen vaikuttaa, onko henkilö hetero- vai homotsygootti antigeeniä määräävän alleelin suhteen. Kun kromosomien antigeeniä ilmentävät alleelit ovat samanlaiset, eli henkilö on perinyt molemmilta vanhemmilta samat alleelit, henkilö on antigeeniä määräävän alleelin suhteen homotsygootti. Esimerkiksi, jos henkilö on perinyt molemmilta vanhemmiltaan JKA-alleeliin, hän on fenotyybiltään $Jk(a+b-)$, eli hän on Jka:n suhteen homotsygootti. Jos henkilö on puolestaan perinyt eri alleelit, on henkilö antigeeniä määräävän alleelin suhteen heterotsygootti. Esimerkiksi jos henkilö on perinyt toiselta vanhemmaltaan JKA-alleelin ja toiselta JKB-alleelin, hän on fenotyybiltään $Jk(a+b+)$ eli Jka:n ja Jkb:n suhteen heterotsygootti. Homotsygooteilla on solunpinnalla enemmän antigeenejä kuin heterotsygoottisolun pinnalla. Tätä ilmiötä kutsutaan annosvaikutukseksi. Esimerkiksi, jos henkilön fenotyyppi on Duffy-veriryhmän suhteen homotsygootti $Fy(a+b-)$, punasolujen pinnalla on enemmän Fya-antigeeniä kuin heterotsygoottisolun $Fy(a+b+)$ pinnalla. Annosvaikutuksen takia homotsygoottien reaktiot ovat voimakkaampia kuin heterotsygoottien. (Johns 2015, 29.)

Panagglutiniinit ovat autovasta-aineita, jotka reagoivat verensiirtoserologisissa tutkimuksissa kaikkien testipunasolujen, siirrettäväksi aiottujen sekä potilaan

omien punasolujen kanssa (Johns 2015, 143). Ne voivat aiheuttaa hankaluuksia vasta-aineiden tunnistuksessa, koska panagglutiniini peittää alleen hemolyysiä aiheuttavat allovasta-aineet verensiirtoserologisissa tutkimuksissa. Vasta-aineiden tunnistuksessa käytetään autokontrollia, jossa potilaan omat punasolut testataan potilaan omaa plasmaa kohtaan panagglutiniinin tunnistamiseksi. Autokontrolli jää negatiiviseksi, kun positiiviset reaktiot aiheuttaa allovasta-aine. Jos autokontrolli on positiivinen, potilaan punasolut ovat reagoineet potilaan oman plasman kanssa, jolloin kyseessä on panagglutiniini. (Harmening 2018, 236, 240.) Tämän takia tavanomaisilla menetelmillä potilaalle ei löydy serologisesti sopivia punasoluvalmisteita, vaan joudutaan käyttämään erikoismenetelmiä allovasta-aineiden todentamiseksi. Tällaisia verensiirtotutkimuksia varten näyte saatetaan joutua lähettämään tukilaboratorioon tai tarvittaessa Veripalveluun. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 152-153.)

Vasta-aineet voivat olla myös kylmävasta-aineita, jotka reagoivat parhaiten 4-25°C:ssa. Ne voivat olla joko autovasta-aineita tai allovasta-aineita. Tällaiset vasta-aineet harvemmin aiheuttavat hemolyyttisiä verensiirtoreaktioita, sillä ne aktivoituvat yleensä ruumiinlämpöä (37°C) alemmissa lämpötiloissa. Ne kuitenkin voivat aiheuttaa ongelmia verensiirtoserologisissa tutkimuksissa ja näin viivästyttää oikean valmisteiden löytymistä. (Johns 2015, 143.)

3.3 Entsyymimenetelmät

Entsyymikäsiteltyjä soluja käytetään vasta-aineiden seulonnassa ja -tunnistuksessa (Daniels & Bromilov 2014, 14). Entsyymitekniikat ovat hyödyllisiä erityisesti silloin, kun vasta-aine reagoi heikosti tai jos näytteessä ilmenee useampi vasta-aine (Bio-Rad c. n.d.; Poole 2012). Verensiirtoserologiassa yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat papaiini ja fisiini. Entsyymit pilkkovat siaalihappomolekyylejä punasolun solukalvolta, jolloin punasolun negatiivinen varaus alenee ja vasta-aine pystyy helpommin kiinnittymään antigeeniin. (Johns 2015, 136.)

Kaikki antigeenit eivät kuitenkaan reagoi samalla tavalla. Entsyymikäsitteily voi myös tuhota joitakin veriryhmäantigeenejä, jolloin ne eivät tule entsyymikäsitellyllä lainkaan esille. (Johns 2015, 136.) Entsyymit voimistavat erityisesti Rh-,

Kell- ja Kidd- järjestelmien vasta-ainereaktioita. (Bio-Rad a. n.d.) Entsyymimenetelmiä ei tulisi koskaan käyttää ainoana menetelmänä, koska erityisesti MNS- ja Duffy-veriryhmien antigeenit tuhoutuvat entsyymejä käytettäessä. (Blaney & Howard 2008, 165-166.) Taulukossa 1 on esitetty, kuinka entsyymikäsittely vaikuttaa eri veriryhmävasta-aineisiin. Vaaleansinisellä pohjavärillä merkityjä vasta-aineita ei tarvitse huomioida valittaessa punasoluvalmisteita sopivuuskokeisiin, koska ne ovat kliinisesti merkityksettömiä vasta-aineita. (Ekblom-Kullberg 2018, 26-27.)

TAULUKKO 1. Entsyymikäsittelyn vaikutus eri veriryhmävasta-aineisiin (Ekblom-Kullberg 2018, 26-27, muokattu).

Rh		Kell		Duffy		Kidd		MNS	
anti-D	+++	anti-K	+	anti-Jk ^a	++	anti-Fy ^a	-	anti-S	var
anti-C	+++	anti-k	+	anti-Jk ^b	++	anti-Fy ^b	-	anti-s	var
anti-C ^w	+++	anti-Ul ^a	+	anti-Jk ³	++			anti-M	-
anti-C ^x	+++	anti-Kp ^a	+					anti-N	-
anti-E	+++								
anti-c	+++								
anti-e	++								
anti-f	+								
anti-G	+++								

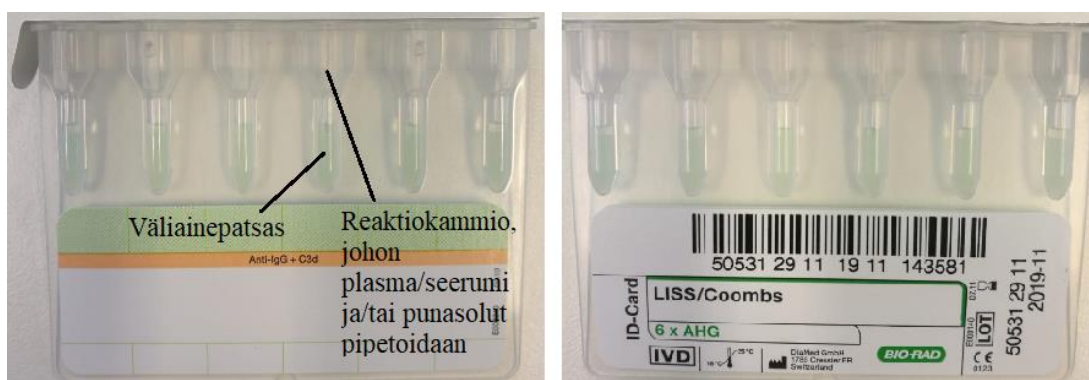
Muut					
anti-LW ^a	++	anti-An ^a	-	anti-Ch	-
anti-LW ^b	++	anti-Lu ^b	(+)	anti-Rg	-
anti-P	+++	anti-Lu ^a	(+)		
anti-PP1P+	+++	anti-P1	+++		
anti-Vel	+++	anti-Le ^a	+++		
anti-Co ^b	+	anti-Le ^b	+++		
anti-WES ^a	(+)				
anti-Ls ^a	-				

Lyhen- teet	
+++	Vasta-ainereaktio voimistuu merkittävästi.
++	Vasta-ainereaktio voimistuu
+	Vasta-aine reagoi selvästi.
(+)	Vasta-aine reagoi heikosti.
-	Antigeeni tuhoutuu entsyymikäsittelyssä, vasta-ainetta ei pystytä osoittamaan.
var	Vasta-aineen reaktiotapa vaihtelee.

3.4 Pylväsagglutinaatiomenetelmä geelikorteilla

Suomessa käytetyin menetelmä verensiirtoserologisissa tutkimuksissa on pylväsagglutinaatiomenetelmä. Tutkimuksissa voidaan käyttää myös koeputkimenetelmää, jota käytetään usein hätäverensiirroissa tai ongelmallisissa vasta-ainetunnistuksissa ja sopivuustutkimuksissa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 55, 69.) Pylväsagglutinaatiotekniikka on helppo suorittaa nopeassa ajassa sekä helppo standardisoida ja lukea, joten siitä on tullut käytetyin tekniikka verikeskuksissa. (Shin ym. 2009). Pylväsagglutinaatiomenetelmä suoritetaan geelikorttien avulla ja sitä voidaan käyttää mm. ABO-veriryhmän määrittämiseen, Rh(D) määrittämiseen, vasta-ainetunnistamiseen ja tunnistukseen, fenotyypin määrittämiseen ja suoraan antiglobuliinimenetelmään. Menetelmä voidaan suorittaa joko käsin tai automaation avulla. (Johns 2015, 115).

Geelitekniikka perustuu punasolujen sentrifugoitumiseen mikropylvään väliainepatsaan geelin läpi. Mikropylvään ylempää osaa kutsutaan reaktiokammiksi ja pylvään kapeassa ja pidemmässä osassa sijaitsee geeli, jonka läpi punasolut liikkuvat sentrifugoitaessa (ks. Kuva 1). (Harmening 2018, 269.) Vasta-ainemäärityksessä potilaan plasmaa ja reagenssina käytettävää punasolususpensiota inkuboidaan +37°C asteessa tai huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen geelikortti sentrifugoidaan valmistajan antamien ohjeiden mukaan. Sentrifugoinnin aikana punasolut kulkeutuvat väliainepatsaan läpi pylvään pohjaa kohti. Väliainepatsas voi sisältää geelikortista riippuen AHG:ta tai jotain spesifistä vasta-ainetta (esim. anti-A:ta). Joissakin määrittämissä, esimerkiksi plasmasta tehtävissä veriryhmämäärittämissä, väliainepatsaaseen ei ole lisätty vasta-ainetta. (Johns 2015, 48-49; Ekblom-Kullberg 2018, 55.)



KUVA 1. Geelikortti (Lahtinen 2018).

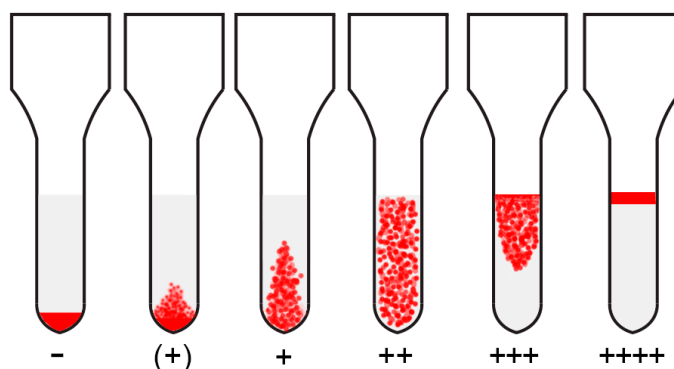
Bio-Rad:in LISS/Coombs-geelikortteja käytetään allovesta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa, sopivuuskokeessa sekä suorassa antiglobuliinimenetelmässä. LISS/Coombs-geelikortin mikrokyvetit sisältävät polyspesifistä anti-humaaniglobuliinireagenssia (AHG), joka sisältää kanin anti-IgG:tä ja monoklonaalista anti-C3d:tä. (Bio-Rad b. n.d.) Punasoluvasta-aineiden tunnistusta herkistetään käyttämällä pienen ioniväkevyyden omaavaa liuosta, LISS:iä (low ionic strength solution). Se lisää punasoluantigeenien ja -vasta-aineiden välistä vetovoimaa voimistamalla molekyylien varausta suuremmaksi, jolloin ne pääsevät lähemmäksi toisiaan ja reaktio saadaan helpommin muodostumaan. (McCullough 2016, 213.) LISS lisätään reaktioon inkubaatiovaiheessa. On tärkeää noudattaa valmistajan ohjeita reagensseja käytettäessä, jotta vältetään heikoilta tai vääriltä positiivisilta reaktioilta. (Johns 2015, 45.)

Bio-Rad:in NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins-kortti soveltuu vasta-aineiden seulontaan ja tunnistukseen, sopivuuskokeisiin ja käänteisveriryhmien määrittämiseen. Korttia käytetään tutkittaessa vasta-aineita, jotka reagoivat parhaiten 4 °C tai 18-25 °C eli huoneenlämmössä. Kortteja käytetään myös entsyymitekniikassa, kun vasta-aineiden seulonnassa tai tunnistuksessa tarvitaan lisäherkyyttä. Entsyymimenetelmä voimistaa tiettyjen, kuten Rh-, Kell- ja Kidd-järjestelmiin kuuluvien vasta-aineiden reaktiota. Kortin mikrokyvetit sisältävät neutraalia geelisuspensiota. (Bio-Rad a. n.d.)

Reaktivoimakkuuteen vaikuttaa inkubaatioaika, sitoutumisvoima ja vasta-aineen sekä antigeenin määrä (Daniels & Bromilow 2014, 18). Valmistajan ennalta määritettyä sentrifugointiaikaa ja -nopeutta noudattamalla saadaan reaktiotuloksiin parempi toistotarkkuus. Tulosten tulkinnassa ei ole tarpeen käyttää apuvälineitä, vaan tulokset luetaan paljain silmin vaaleaa taustaa vasten. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 67.)

Positiivinen reaktio tapahtuu, kun pylväässä voidaan havaita agglutinaatio. Jos potilaan plasman vasta-aineet reagoivat reagenssipunasolujen kanssa, syntyy agglutinaatio, joka ei pysty lainkaan tai osittain läpäisemään pylväässä olevaa geeliä. Agglutinaation voimakkuus arvioidaan yhdestä neljään ja se kirjataan ylös

käyttäen +-merkkiä. Reaktio on negatiivinen, kun agglutinaatiota ei tapahdu. Punasolut pystyvät läpäisemään geelin ja ne muodostavat tiiviin napin pylvään pohjalle. (Maitta 2018, 42.) Reaktiona voi olla myös kaksoispopulaatio (KP). Silloin osa soluista agglutinoituu ja osa ei lainkaan agglutinoidu. Kaksoispopulaatiota esiintyy mm. allogeenisen kantasolujen siirron jälkeen, kun potilaan veriryhmä on muuttumassa. (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 68.) Kuvassa 2 on esitetty, miltä eri reaktiovoimakkuudet näyttävät pylväsagglutinaatiomenetelmissä ja taulukossa 2 on selvitetty, mitä eri reaktiot tarkoittavat (Särkkä 2019; Ekblom-Kullberg ym. 2018, 68).



KUVA 2. Verensiirtoserologisten reaktioiden tulkinta pylväsagglutinaatiomenetelmiä käytettäessä (Särkkä 2019).

TAULUKKO 2. Reaktiovoimakkuudet (Ekblom-Kullberg ym. 2018, 68, muokattu).

Negatiivinen	-	Solut nappina pohjalla.
Positiivinen	(+)	Punasolunappi epätasainen väliainepatsaan pohjalla.
	+	Agglutinaatti puolivälin alapuolella, solunappi pohjalla.
	++	Agglutinaatio väliainepatsaan koko alueella, pohjalla voi olla pieni solunappi.
	+++	Agglutinaatio väliainepatsaan puolivälin yläpuolella, pohja on vapaa soluista.
	++++	Kaikki solut agglutinoituneet väliainepatsaan päälle.

3.5 Automaatio

Verikeskuksiin on saatavilla eritasoisia automaatteja täysautomaateista puoliau-
tomaatteihin. Oikean automaattilaitteen valinta riippuu verikeskukseen saapu-
vasta näytemäärästä, resursseista ja tilan määrästä. (Bajpai, Kaur & Gupta
2012.) Täysautomaatit suorittavat koko analyysin alusta loppuun niin, että manu-
aalisia työvaiheita ei tarvita ollenkaan. Puoliautomaatit taas tarvitsevat manuaa-
lisiä työvaiheita sentrifugointi- ja inkubaatiovaiheissa. (De Silvesto, Veronesi &
Vicarioto 2013, 60). Suuriin verikeskuksiin hankitaan yleensä täysautomaatteja.
Ne tekevät kaikki analyysin vaatimat työvaiheet solususpension teosta tulosten
tulkintaan. Pienemmissä laboratorioissa reaktioiden lukulaitteesta voi olla enem-
män hyötyä, sillä se korvaa veriryhmämäärityksessä toisen luennan. (Ekblom-
Kullberg ym. 2018, 56.)

Jos verensiirtoserologisten tutkimusten kaikki vaiheet tehdään manuaalisesti, on
virheiden sattumisen todennäköisyys suuri. Automaatiolla halutaan parantaa
analyyttistä tarkkuutta, vähentää virheitä ja säästää kustannuksissa. (De Silvesto
ym. 2013, 60.) Automaatio siis kokonaisuudessaan mahdollistaa verensiirtoserolo-
gisten tutkimusten laadun paranemisen. Automaation avulla saadaan poistet-
tua inhimilliset virheet näytteiden tunnistamisessa, kirjaamisessa ja tulosten tul-
kinnassa ja muissa tutkimuksen suoritusvaiheissa, kuten pipetoinnissa. (Bajpai,
Kaur & Gupta 2012.) Vaikka laboratorio olisi täysin automatisoitu, se ei kuiten-
kaan tarkoita sitä, että laitteiden käyttäjien ei tarvitsisi enää juurikaan kiinnittää
huomiota analysointivaiheisiin (De Silvesto ym. 2013, 63). Automaatit saavat myös
paljon ei-luettavia tuloksia, joten laitteen käyttäjältä vaaditaan pätevyyden ylläpi-
toa tulosten validoinnissa (Bhagwat, Sharma, Jose & Modi 2015). Laitteiden käyt-
täjillä on siis iso vastuu tulosten validoinnissa ja siinä, onko tulos luotettava ja
tarkka (De Silvesto ym. 2013, 63).

Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen verikeskuksessa on käytössä kaksi Bio-Ra-
din IH-1000 täysautomaattia. IH-1000 on Bio-Radin täysin automatisoitu laite,
jolla voidaan analysoida ID-korteilla erilaisia verensiirtoserologisia tutkimuksia
kuten veriryhmämäärityksiä (ABO/RhD), fenotyyppityksiä, vasta-aineseulontoja ja
-tunnistuksia. Laitteeseen pystyy lataamaan 180 näytettä kerralla ja reagensseja

laitteeseen voi laittaa maksimissaan 28 kappaletta. ID-kortteja laitteeseen mahtuu kerrallaan 240. Näytteitä ja reagensseja voi lisätä jatkuvasti ja nesteiden ja jätteiden vaihdon pystyy tekemään kesken näytteiden ajon. Laitteessa on kaksi pipetointivartta ja kolme sentrifugia. Päivystysnäytteet pystytään syöttämään laitteeseen päivystysnäytteille tarkoitetuilla telineillä niin, että laite alkaa analysoida niitä mahdollisimman nopeasti. Analysaattori vaatii vain kolme manuaalista työvaihetta, jotka ovat ID-korttien ja reagenssien lisääminen, nesteiden vaihto ja näytteiden syöttö. (IH-1000 2016.)

4 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Kokeellinen tutkimus on yksi kolmesta perinteisestä tutkimusstrategiasta. Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan yhden käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttajaan. Tyypillisesti kokeellisessa tutkimuksessa valitaan tietyistä populaatioista näyte, jota analysoidaan systemaattisesti olosuhteita muunnellen ja muutokset mitataan numeerisesti. Tämä sisältää tavallisesti hypoteesien testaamisen. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2014, 134.)

Kokeellisessa tutkimuksessa koeaineiston analyysissa voidaan hyödyntää erilaisia laadullisia ja määrällisiä analyysimenetelmiä. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään saamaan mahdollisimman luotettavia tutkimustuloksia. Kokeellinen tutkimus voidaan jakaa varsinaiseen eli laboratiiviseen kokeelliseen tutkimukseen ja kvasikokeelliseen tutkimukseen. Varsinaisessa kokeellisessa tutkimuksessa tutkija pystyy kontrolloimalla kaikkia ilmiöön liittyviä tekijöitä havainnoimaan ilmiöiden vaikutuksia sekä syy-seuraus-suhteita. Kvasikokeellisessa tutkimuksessa varsinaisen kokeelliseen tutkimuksen peruslähtökohta puuttuu eli siinä ei ole satunnaisesti jaoteltu tutkittavia kohteita koe- ja kontrolliryhmiin. (Jyväskylän yliopiston Koppa 2015.)

5 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön aiheena on tutkia eri vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla. Tarkoituksena on selvittää, saataisiinko tällä menetelmällä eri vasta-aineita paremmin esille vertailemalla reaktivoimakkuuksia kahden verikeskuksessa rutiinissa käytettävän vasta-aineiden tunnistuspaneelin välillä. Opinnäytetyön toimeksiantajana on Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskus. Fimlab Laboratoriot Oy:n on tärkeä saada tietoa, olisiko kyseisestä menetelmästä hyötyä vasta-aineiden tunnistuksessa.

Erityisesti kiinnostuksen kohteena tutkimuksessa oli anti-Jka:n ilmeneminen, sillä Fimlab Laboratoriot Oy:n tekemissä testipaneeleissa oli saatu anti-Jka:n reaktiovoimistumaan entsyymisoluiilla LISS/Coombs-korteilla. Kidd-järjestelmän punasoluvasta-aineet ovat usein laboratoriokokeissa reaktioltaan heikkoja, mutta verensiirron kannalta merkittäviä (Ekblom-Kullberg 2018, 31). Tämän takia opinnäytetyönsuunnitelmassa tämä vasta-aine kiinnosti eniten, mutta näytteitä ei saatu tutkimukseen yhtäkään vasta-aineen harvinaisuuden takia. Tutkimus toteutettiin Tampereella Fimlab Laboratoriot Oy:n verikeskuksessa syksyllä 2018.

6 TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Tutkimusaineisto

Tutkimuksen näyteaineisto koottiin Fimlab Laboratoriot Oy:n potilasnäytteistä. Tutkimukseen otettiin joukko vasta-aineseulonta-negatiivisia ja -positiivisia näytteitä. Vasta-aineseulonta-negatiivisille näytteille tehtiin vasta-aineseulonta LISS/Coombs-kortilla, entsyymisoluilla NaCl/Enzyme-kortilla ja entsyymisoluilla LISS/Coombs-kortilla (ks. Liite 2). Positiivisille näytteille ei tehty vasta-aineseulontoja, mutta vastaavilla kolmella menetelmällä vasta-aineiden tunnistuspaneelit (ks. Liite 3). Taulukosta 3 nähdään vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden näytteenottopäivämäärät, määrittämisspäivämäärät ja näytteissä ilmenevät vasta-aineet. Näytteissä 43 ja 46 vasta-aineseulonnat ovat olleet negatiivisia, mutta potilaalla on todettu vasta-aine joskus aikaisemmin. Henkilö ei tällöin ole enää ”Type & Screen”-kelppoinen, joten tällaisten henkilöiden näytteille täytyy aina tehdä myös vasta-aineiden tunnistus heidän loppu elämänsä ajan. Näytteen 43 potilaalta on löydetty vasta-aine 16.4.2018 ja näytteen 46 potilaalta 29.5.2018. Koska tutkimukseen valitut näytteet määritettiin noin 1-2 viikkoa myöhemmin näytteiden ottamisesta, niitä säilytettiin jääkaapissa +4°C asteessa. Ennen määrittämiä näytteet sentrifugoitiin uudelleen.

TAULUKKO 3. Vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden näytetiedot

Näyte	Näytteenottopvm	Määrittämisspvm	Vasta-aine
Näyte 39	3.8.2018	15.8.2018	Anti-M
Näyte 43	2.8.2018	15.8.2018	Anti-E (16.4.18)
Näyte 44	2.8.2018	17.8.2018	Anti-D-suojaus
Näyte 46	11.8.2018	15.8.2018	tunnistamaton v-a (29.5.18)
Näyte 48	13.8.2018	15.8.2018	Anti-E, (panagglutiniini)
Näyte 50	3.8.2018	15.8.2018	Anti-Fya
Näyte 57	13.8.2018	15.8.2018	Anti-C, Anti-D
Näyte 58	3.8.2018	15.8.2018	Anti-K
Näyte 59	7.8.2018	15.8.2018	tunnistamaton v-a, Auto-C
Näyte 62	6.8.2018	15.8.2018	Anti-Cw, tunnistamaton v-a
Näyte 63	4.8.2018	15.8.2018	Anti-D

Keväällä 2019 selvisi, että tutkimuksen teossa oli vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden kohdalla käytetty kahta reagenssierää päällekkäin, jolloin saman näytteen eri paneelit oli tehty eri reagenssierillä. Tämän takia kaikki tulokset eivät olleet luotettavia, joten opinnäytetyöstä täytyi jättää pois puolet tutkimusnäytteistä. Lisäksi näytemäärää jouduttiin supistamaan, sillä osa näytteistä oli sellaisia, joissa näytteestä löytyvä vasta-aine ei reagoi entsyymikäsittelyssä tai kyseessä oli panagglutiniini. Kriteereinä näytteen hyväksymiselle oli:

1. Vasta-aine ei tuhoudu entsyymikäsittelyssä eikä kyseessä ole panagglutiniini.
2. Vasta-aineen tunnistuspaneeli LISS/Coombs-kortilla, entsyymisolulla NaCl/Enzyme-kortilla ja entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla on tehty samalla reagenssierällä.

Tutkimusaineistoon kuitenkin jätettiin kaksi näytettä (näytteet 39 ja 50), joille kriteeri 1 ei toteudu. Näillä haluttiin varmistaa ja esittää, että väite on tosi. Tutkimusaineistoon soveltuvia vasta-aineseulonta-positiivisia näytteitä siis kertyi yhteensä 11 kappaletta, joista voitiin tehdä reaktivoimakkuuksien vertailua kolmen eri menetelmän välillä. Lisäksi tutkimukseen otettiin 36 kappaleen vasta-aineseulonta-negatiivisen näytteen joukko, jolle tehtiin vasta-aineidenseulonnat kolmella eri menetelmällä. Tulokset on kerätty taulukoiden muotoon, jotka on sijoitettu liitteisiin.

6.2 Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden vertailu

Tutkimus aloitettiin ottamalla joukko näytteitä, jotka verikeskuksessa oli todettu vasta-aineseulonta-negatiivisiksi näytteiksi (ks. Liite 2), kun ne oli analysoitu vasta-aineiden seulontasoluilla LISS/Coombs-kortilla. Näytteitä oli 36 kappaletta ja niistä ajettiin LISS/Coombs-seulonnan lisäksi entsyymiseulonta NaCl/Enzyme-korteilla sekä entsyymiseulonta LISS/Coombs-korteilla. SF-soluja ei analysoitu entsyymiseulonnoissa, koska niistä ei ole entsyymikäsiteltyjä soluja saatavilla. Oletuksena oli, että kaikkien näytteiden kaikki seulonnat olisivat negatiivisia. Negatiivisten näytteiden joukosta neljä näytettä reagoi kuitenkin positiivisesti entsyymipaneelilla NaCl/Enzyme-kortilla ja/tai entsyymipaneelilla LISS/Coombs-kortilla. Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden positiiviset reaktiot sekä seulonnassa että tunnistuksessa ovat odottamattomia reaktioita, joiden syytä ei tunneta. Positiivisten reaktioiden taustan selvittely vaatisi laajempaa tutkimusta,

joten tässä tutkimuksessa esitettävät päätelmät näytteistä 8, 12, 23 ja 26 ovat hypoteeseja.

Liitteestä 2 nähdään, että Näyte 8 reagoi NaCl/Enzyme-kortilla testisolulla II. Näyte 12 reagoi entsyymipaneelilla LISS/Coombs-kortilla testisoluilla I ja III. Näyte 23 reagoi molemmilla entsyymipaneeleilla testisoluilla I, II ja III. Näyte 26 reagoi NaCl/Enzyme-kortilla testisoluilla I, II ja III. Näytteet 8, 12, 23 ja 26 ovat verikeskuksessa verensiirtoserologisissa tutkimuksissa todettu vasta-aineseulonta-negatiivisiksi näytteiksi. Kun näytteistä tehtiin vasta-aineseulonnat myös entsyymisolulla ja NaCl/Enzyme-kortilla sekä entsyymisolulla ja LISS/Coombs-korteilla, saatiin vasta-aineseulonta-positiiviset vasta-aineseulonnat joko toisella tai molemmilla menetelmillä.

Positiivisista reaktioista herää kysymys, miksi vasta-aineiden seulonnassa (ks. Liite 2) näytteissä 8 ja 26 reaktio on tullut entsyymisolulla NaCl/Enzyme-kortilla, mutta ei entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla, ja vastaavasti miksi näyte 12 on reagoanut positiivisesti entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla, mutta ei entsyymisolulla NaCl/Enzyme-kortilla. Näillä tiedoilla ei voida kuin olettaa, että kyseessä voisi olla esimerkiksi jokin virhereaktio. Näyte 23 on reagoanut vasta-aineiden seulonnassa ja tunnistuksessa kaikilla entsyymitestisoluilla sekä NaCl/Enzyme-kortilla että LISS/Coombs-kortilla positiivisesti. Tällainen tulos voisi viitata entsyymisolulla reagoivaan panagglutiniiniin. Nämä neljä positiivisesti reagoivaa näytettä ajettiin myös vasta-aineen tunnistuspaneelilla.

Taulukosta 4 nähdään, että vasta-aineiden tunnistuksessa näytteissä 8 ja 12 saatiin tulokseksi täysin negatiiviset paneelit. Tämän perusteella voidaan olettaa vasta-aineseulonnassa (ks. Liite 2) saatuja positiivisia reaktioita virheellisiksi. Näyte 23 reagoi molemmilla entsyymipaneeleilla jokaisessa solussa positiivisesti. Positiiviset reaktiot kaikilla soluilla molemmissa entsyymipaneeleissa vahvistavat oletusta entsyymisolulla reagoivaan panagglutiniiniin. Näyte 26 reagoi molemmilla entsyymipaneelilla kaikissa muissa soluissa positiivisesti kuin testisoluissa II ja IX. Kun vasta-ainetta yritetään tunnistaa poissulkutekniikkaa käyttäen, ei näillä soluilla saada vasta-ainetta tunnistettua. Tulosten perusteella kyseessä olisi siis tunnistamaton vasta-aine, ellei näytteen positiivinen reaktio ole virheellinen.

TAULUKKO 4. Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden vasta-aineiden tunnistuspaneelit.

Testisolu	I			II			III			IV			V			VI			VII			VIII			IX			X			XI					
Kortti	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P			
Näyte 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Näyte 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Näyte 23	-	+	2+	-	+	2+	-	2+	2+	-	2+	2+	-	2+	2+	-	+	2+	-	+	2+	-	+	2+	-	2+	2+	-	+	+	-	2+	2+	-	+	+
Näyte 26	-	+	+	-	-	-	-	2+	+	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	+	+	-	+	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)

L = LISS/Coombs-kortti, N = NaCl/Enzyme-kortti, L/P = LISS/Coombs-kortti ja entsyymisolut

6.3 Vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden vertailu

Vasta-aineseulonta-positiivisista näytteistä tehtiin vasta-aineiden tunnistuspaneelit kolmella eri menetelmällä: LISS/Coombs-kortilla, entsyymisolulla NaCl/Enzyme-kortilla ja entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla (ks. Liite 3). Taulukosta nähdään, miten näyte on reagoinut kullakin testisolulla, kaikissa kolmessa eri paneelissa. Jokaisen näytteen kohdalle on merkattu tapahtuneet reaktivoimakkuudet kullakin testisolulla. Taulukkoon on vahvistettu tummemmilla reunoilla ne numeeriset arvot, joissa LISS/Coombs-kortti entsyymisolulla on reagoinut vahvemmin kuin NaCl/Enzyme-korttimenetelmä. Näin taulukosta voidaan nähdä ne näytteet, joissa opinnäytetyössä tutkittavasta menetelmästä on voinut olla hyötyä.

Näytteessä 39 ilmenee vasta-aine anti-M, joka on MNS-veriryhmäjärjestelmän antigeeni ja näytteessä 50 ilmenee Duffy-veriryhmäjärjestelmän vasta-aine anti-Fya. Näiden veriryhmäjärjestelmien antigeenit ovat sellaisia, jotka tuhoutuvat entsyymikäsittelyssä. Liitteestä 3 voidaan nähdä, että näytteet reagoivat oletetulla tavalla. Positiivisia reaktioita havaitaan vain LISS/Coombs-kortilla ja reaktiot häviävät kahdessa muussa menetelmässä, joissa käytetään entsyymireagenssisoluja. Opinnäytetyössä tutkittava menetelmä ei siis sovellu anti-M:n ja anti-Fya:n tunnistukseen.

Näytteessä 43 ilmenee Rh-veriryhmäjärjestelmän vasta-aine anti-E. Näytteen LISS/Coombs-paneeli on kokonaan negatiivinen. Entsyymimenetelmät ovat reagoineet testisolulla III ja V. Testisolun III reaktiot ovat samanlaiset, mutta testisolun V reaktio entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla on yhden asteen voimakkaampi kuin entsyymisolulla NaCl/Enzyme-kortilla. Tästä voidaan päätellä, että

anti-E reagoi hieman voimakkaammin opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä.

Näytteessä 44 on kyseessä anti-D-suojauksen saanut henkilö. Näytteessä reaktiot LISS/Coombs-paneelissa ovat heikommat kuin kahdella muulla menetelmällä. Siinä reaktiot ovat tapahtuneet testisolulla II ja III. Testisolulla I, II, III sekä VIII reaktiot ovat tapahtuneet entsyymimenetelmillä. Molemmilla entsyymimenetelmillä nämä reaktiot ovat yhtä voimakkaat. LISS/Coombs-paneelissa anti-D-suojaus tulee esiin vain testisolulla II ja III, kun taas molemmilla entsyymipaneelilla anti-D-suojaus näkyy testisolulla I, II, III ja VIII. Koska reaktivoimakkuudet molemmissa entsyymipaneeleissa ovat samat, opinnäytetyössä tutkittava menetelmä ei ole tarpeellinen, mutta entsyymimenetelmistä on selvästi hyötyä anti-D-suojauksen tunnistuksessa.

Näytteessä 46 on kyseessä tunnistamaton vasta-aine. Tässä näytteessä vastaineseulonta on ollut negatiivinen, mutta koska potilaalla on aikaisemmin ollut tunnistamaton vasta-aine, täytyy vasta-aineiden tunnistus aina tehdä. Tämän takia LISS/Coombs-paneelissa kaikki reaktiot ovat negatiivisia. Molemmilla entsyymimenetelmillä on tapahtunut reaktioita. Testisolulla II ja V reaktiot ovat hieman voimakkaammat opinnäytetyössä tutkittavalla entsyymimenetelmällä kuin NaCl/Enzyme-menetelmällä. Testisolulla VII reaktio on tapahtunut ainoastaan NaCl/Enzyme-paneelissa. Testisolulla VIII reaktio on hieman voimakkaampi NaCl/Enzyme-menetelmällä kuin entsyymimenetelmällä LISS/Coombs-paneelissa. Testisolulla IV ja XI reaktiot ovat tapahtuneet ainoastaan entsyymimenetelmällä LISS/Coombs-paneelissa. Tutkittavalla menetelmällä siis saatiin reaktioita, joita ei tapahtunut muissa paneeleissa. Poissulkutekniikkaa käytettäessä vasta-ainetta ei kuitenkaan saada opinnäytetyössä käytettävän menetelmän avulla tunnistettua.

Näytteessä 48 ilmenee anti-E ja panagglutiniini. Näytteessä panagglutiniini vaikuttaa reaktioihin. Reaktiot entsyymimenetelmillä ovat selkeästi voimakkaammat kuin LISS/Coombs-menetelmällä. Muuten reaktiot entsyymimenetelmissä ovat samanlaiset, mutta testisolulla VIII reaktio on yhden asteen voimakkaampi NaCl/Enzyme-menetelmällä kuin opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä. Ky-

seessä voi olla entsyymillä reagoiva panagglutiniini, joten opinnäytetyössä tutkitavasta menetelmästä ei ole apua. Voidaan kuitenkin huomata, että entsyymiteknikoilla testisolut III ja V ovat reagoineet voimakkaammin panagglutiniinin alta, joten entsyymimenetelmät vahvistavat anti-E:n reaktiota. Poissulkutekniikkaa käyttäen kuitenkin vain LISS/Coombs-menetelmästä on hyötyä anti-E:n tunnistamisessa.

Näytteessä 57 ilmenee vasta-aineet anti-C ja anti-D. Näytteessä 57 reaktiot ovat kaikilla menetelmillä melko voimakkaat testisoluilla I, II, III, IV ja VIII. Entsyymimenetelmillä reaktiot ovat hieman voimakkaammat kuin LISS/Coombs-menetelmällä. Testisolulla VIII reaktio on opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä hieman voimakkaampi kuin kahdella muulla menetelmällä, mutta reaktiovoimakkuudet eivät eroa juurikaan NaCl/Enzyme-menetelmästä, joten tässä näytteessä anti-C ja anti-D saadaan tunnistettua myös ilman opinnäytetyössä käytettävää menetelmää.

Näytteessä 58 ilmenee vasta-aine anti-K. Tässä näytteessä reaktiot ovat tapahtuneet testisoluilla II ja VI kaikissa paneeleissa. Molemmissa testisoluissa opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä reaktio on yhden asteen voimakkaampi kuin kahdella muulla menetelmällä. Tässä näytteessä siis huomataan, että tutkitavasta menetelmästä voisi olla hyötyä, koska reaktiot ovat voimakkaammat.

Näytteessä 59 on kyseessä tunnistamaton vasta-aine ja auto-C. Jokaisella testisolulla on tapahtunut reaktio vähintään yhdellä menetelmällä. Reaktiot LISS/Coombs-paneelissa ovat kuitenkin heikommat kuin entsyymimenetelmillä tehdyissä paneeleissa. Testisoluilla III, IV, VII, VIII, IX, X ja XI reaktiot ovat voimakkaammat tutkittavalla menetelmällä kuin kahdella muulla menetelmällä. Lisäksi testisoluilla V ja VI tutkittava menetelmä on ainoa, jossa tapahtuu reaktio. Näissä molemmissa reaktiovoimakkuus on 2+. Opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä reaktio on tapahtunut jokaisessa testisolussa, joten vasta-aineen tunnistusta poissulkutekniikalla on mahdotonta tehdä. Tästä syystä Liss/Coombs-paneelista entsyymikäsitellyillä soluilla ei ole hyötyä, eikä tunnistamatonta vastaainetta saada tälläkään menetelmällä tunnistettua.

Näytteessä 62 ilmenee vasta-aine anti-Cw ja tunnistamaton vasta-aine. Reaktiot ovat pääasiassa tapahtuneet entsyymimenetelmillä. LISS/Coombs-paneelissa vain testisolu I on reagoanut. Entsyymimenetelmät ovat reagoineet kaikilla muilla testisoluilla pois lukien testisolut III ja V. Testisoluilla II, IV, IX ja XI reaktiot ovat voimakkaammat tutkittavalla menetelmällä kuin NaCl/Enzyme-menetelmällä. Testisolulla VII reaktio on voimakkaampi NaCl/Enzyme-menetelmällä kuin entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla. Testisolu I on reagoanut kaikista voimakkaimmin kaikilla menetelmillä, josta voidaan päätellä anti-Cw poissulkutekniikalla. Opinnäytetyössä tutkittava menetelmä on reagoanut samalla tavalla kuin NaCl/Enzyme-menetelmä testisolussa I eikä tunnistamatonta vasta-ainetta saada tunnistettua poissulkutekniikalla, joten menetelmästä ei ole sen suurempaa hyötyä.

Näytteessä 63 ilmenee vasta-aine anti-D. Näytteessä reaktiot ovat tapahtuneet testisoluilla I, II, III ja VIII. Tutkittavalla menetelmällä on saatu voimakkain reaktio testisoluilla I, II ja III. Testisolulla VIII reaktio on molemmilla entsyymimenetelmillä yhtä voimakas. LISS/Coombs-menetelmällä reaktiot ovat tapahtuneet ainoastaan testisoluilla III ja VIII ja molemmissa reaktio on heikompi kuin entsyymimenetelmillä. Voidaan todeta, että anti-D saadaan paremmin esiin entsyymimenetelmillä ja tässä näytteessä anti-D:n reaktio saatiin voimakkaimmin esiin opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä.

6.4 Johtopäätökset

Vasta-aineiden ilmeneminen entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla oli reaktivoimakkuuksiltaan voimakkaampia tai reaktioiltaan yhtä voimakkaita verrattuna entsyymimenetelmään NaCl/Enzyme-korteilla suurimmassa osassa tapauksista. Tällä menetelmällä saatiin myös esille reaktioita sellaisilla testi-soluilla, joilla muilla menetelmillä ei saatu. Tämä vahvistaa oletusta siitä, että opinnäytetyössä tutkittavassa menetelmässä vasta-aineet reagoivat herkemmin kuin muilla menetelmillä.

Näytteissä 43, 58 ja 63 voidaan todeta, että opinnäytetyössä tutkittavasta menetelmästä on käytännön hyötyä. Näytteessä 43 on kyseessä anti-E, näytteessä 58 anti-K ja näytteessä 63 anti-D. Tässä tutkimuksessa siis Rh- ja Kell-veriryhmäjärjestelmien vasta-aineiden tunnistuksessa voidaan havaita, että vasta-aineet ilmenevät paremmin entsyymisolulla LISS/Coombs-korteilla kuin muilla menetelmillä. Muissa näytteissä opinnäytetyössä tutkittavasta menetelmästä ei ollut hyötyä, koska yhtä voimakkaat reaktiot saatiin entsyymisolulla ja NaCl/Enzyme-kortilla.

Vasta-aineseulonta-negatiivisista näytteistä saatiin positiivisia reaktioita entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla. Tämän takia ei voida poissulkea virheellisten reaktioiden mahdollisuutta. Koska opinnäytetyössä tutkittavalla menetelmällä saatiin voimakkaampia reaktioita kuin muilla menetelmillä, voidaan epäillä, onko menetelmä liian herkkä ja antaako se vääriä positiivisia tuloksia.

7 POHDINTA

Opinnäytetyön aiheena oli tutkia eri vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs- korteilla. Normaalisti vasta-aineiden ilmenemistä entsyymikäsitellyillä soluilla tutkitaan NaCl/Enzyme-korteilla, mutta tässä opinnäytetyössä tutkimus tehtiin käyttäen LISS/Coombs- kortteja. Tarkoituksena oli selvittää, saataisiinko eri vasta-aineita paremmin esille entsyymikäsitellyillä testisoluilla LISS/Coombs kortteja käyttäen. Työn tavoitteena oli tarjota Fimlab Laboratoriot Oy:lle tietoa, olisiko kyseisestä menetelmästä hyötyä vasta-aineiden tunnistuksessa.

7.1 Tulosten arviointi

Tutkimuksessa käytetty näyteaineisto koottiin Fimlab Laboratoriot Oy:n keräämistä potilasnäytteistä. Tutkimukseen otettiin vasta-aineseulonta-negatiivisia ja -positiivisia näytteitä. Vasta-aineseulonta-negatiivisille näytteille tehtiin vasta-aineseulonta LISS/Coombs-kortilla, entsyymisoluilla NaCl-kortilla sekä entsyymisoluilla LISS/Coombs-kortilla. Positiivisille näytteille ei tehty ollenkaan vasta-aineseulontoja, mutta samoilla kolmella menetelmällä tehtiin vasta-aineiden tunnistuspaneelit.

Tutkimustuloksista kävi ilmi, että suurimmassa osassa näytteistä vasta-aineiden ilmeneminen entsyymikäsitellyillä soluilla LISS/Coombs-korteilla oli reaktiivomakkuuksiltaan voimakkaampia tai reaktiot olivat yhtä voimakkaita kuin entsyymimenetelmällä NaCl/Enzyme-korteilla. Tutkittavalla menetelmällä saatiin myös reaktioita sellaisilla testisoluilla, joilla ei muilla menetelmillä tapahtunut reaktioita. Tästä syystä voidaan olettaa, että opinnäytetyössä tutkittavalla entsyymimenetelmällä vasta-aineet reagoivat herkemmin kuin muilla menetelmillä ja tästä syystä menetelmästä voisi olla hyötyä myös Fimlab Laboratoriot Oy:lle.

7.2 Eettisyys ja luotettavuus

Näytteitä käsiteltiin koko tutkimuksen ajan niin, että tuloksista ei selviä henkilötietoja eikä niitä pysty jäljittämään. Näytteet numeroitiin heti tutkimuksen alussa juoksevilla näytenumeroilla. Tutkimusaineiston vastaukset eivät siis tallentuneet analysaattoreille henkilötiedoilla vaan niille spesifioituilla näytenumeroilla. Tutkimuksen teon aikana näyteputkissa oli sekä näytenumerotarra että potilastarra. Näin pystyttiin käyttämään hyödyksi verikeskuksen tuloksia, jotta kaikkia tutkimuksia ei tarvinnut uudestaan tutkimusta varten analysoida. Tutkimuksen tulosten analysoinnin jälkeen näytteet heitettiin pois, jolloin näytenuumeron ja potilastarran välinen jäljitettävyyden saatiin estettyä.

Siitä syystä, että tutkimuksenteon jälkeen potilastiedot eivät olleet enää saatavilla, opinnäytetyön teossa tuli reagenssierien sekaannuksen takia ongelmia. Koska osa tutkimuksien tuloksista oli otettu verikeskuksen analysoimista tuloksista, niitä ei pystytty enää jäljittämään verikeskuksen arkistoista reagenssierän varmistamiseksi. Näin ollen suurin osa näytteistä täytyi jättää tutkimuksesta pois, jotta tutkimustulokset olisivat luotettavia. Lisäksi osa näytteistä jouduttiin jättämään pois tutkimuksesta, koska näytteestä löytyvä vasta-aine ei reagoanut entsyymikäsittelyssä tai kyseessä oli panagglutiniini.

Näin ollen näytteet eivät täyttäneet kriteerejä, joita näytteen hyväksymiselle oli asetettu. Ensimmäisenä kriteerinä oli, että vasta-aine ei tuhoudu entsyymikäsittelyssä eikä kyseessä ole panagglutiniini. Toisena kriteerinä näytteen hyväksymiselle oli se, että vasta-aineen tunnistuspaneeli LISS/Coombs-kortilla, entsyymisolulla NaCl-kortilla ja entsyymisolulla LISS/Coombs-kortilla on tehty samalla reagenssierällä. Opinnäytetyön näytemäärä oli pieni, joten tutkimustuloksien varmistamiseksi tarvitaan jatkotutkimuksia.

7.3 Jatkotutkimukset

Jatkotutkimuksena suositellaan tehtäväksi tutkimusta tästä menetelmästä isomalla näytemäärällä, jotta tuloksista voitaisiin paremmin arvioida tämän menetelmän hyötyjä. Jatkotutkimuksessa voitaisiin erityisesti kiinnittää huomiota Rh- ja Kell-veriryhmäjärjestelmien vasta-aineiden ilmenemisen tutkimiseen opinnäytetyössä käytetyllä menetelmällä sekä myös muiden järjestelmien, joita tähän tutkimukseen ei saatu mukaan. Esimerkiksi Kidd-veriryhmäjärjestelmästä olisi hyvä saada lisätietoa sen kliinisen merkittävyyden vuoksi. Rh- ja Kell-veriryhmäjärjestelmien vasta-aineiden ilmenemisen tutkiminen olisi tärkeää, koska näissä vastaaineet ilmenivät paremmin tutkittavalla menetelmällä kuin muilla menetelmillä. Jos jatkotutkimuksessa saataisiin samankaltaisia tuloksia kuin tässä opinnäytetyössä, niin menetelmää voitaisiin mahdollisesti alkaa käyttää vasta-aineiden tunnistuksen apuna.

7.4 Opinnäytetyöprosessin kulku ja arvio

Opinnäytetyön tekeminen ei sujunut täysin alkuperäisen suunnitelman mukaan, mutta työ saatiin kuitenkin tehtyä suunnitellun aikataulun mukaisesti. Työn tekeminen aloitettiin tutkimusosuudella, mikä ei ollut paras ratkaisu. Olisi ollut parempi aloittaa teorian kirjoittamisella, koska silloin olisimme ehkä välttyneet ongelmilta, jotka hidastivat työn tekemistä. Ongelmana työn tekemisessä oli työssä käytetyistä reagenssieristä johtuva näytemäärän pieneneminen. Näytemäärää oli kuitenkin pakko rajata työn luotettavuuden vuoksi. Teorian rajaaminen oli melko helppoa ja työn edetessä rajaaminen sujui luontevasti. Haasteena opinnäytetyön tekemisessä oli luotettavien ja ajantasaisten lähteiden löytäminen. Työtä tehdessä lähdekriittisyys oli tärkeää, koska osassa lähteistä tieto oli selvästi vanhentunutta. Opinnäytetyötä tehdessä oppi paljon uutta teoriatietoa aiheesta ja myös työstä verikeskuksessa. Opinnäytetyötä tehdessä oppi tarkastelemaan lähteitä tarkemmin ja kriittisemmin sekä rajaamaan lähteitä niiden luotettavuuden kannalta.

LÄHTEET

Bajpai, M. Kaur, R. & Gupta, E. 2012. Automation in Immunohematology. Asian journal of transfusion science, 6(2): 140-144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439752/#>

Bhagwat, S.N. Sharama, J.H. Jose, J. & Modi, C.J. 2015. Comparison between conventional and automated techniques for blood grouping and crossmatching: Experience from a Tertiary care centre. Journal of laboratory physicians, 7(2): 96-102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559636/>

Bio-Rad a. N.d. NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins. Pakkausseloste. Luettu: 26.10.2018. https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B005014_50520_06.13_FI.pdf

Bio-Rad b. N.d. LISS/Coombs. Pakkausseloste. Luettu: 26.10.2018. https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B004014_50531_02.13_FI.pdf

Bio-Rad c. N.d. LISS/Coombs + Enzyme test. Pakkausseloste. Luettu: 26.3.2019. https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B004514_50581_07.15_GEFISP.pdf

Bio-Rad d. N.d. DiaClon ABO/D + Reverse Grouping. Pakkausseloste. Luettu: 27.4.2019. https://www.bio-radsecretarea.com/documents/all/pdfs/B001228_50092_06.13_FI.pdf

Blaney, K.D. & Howard, P.R. 2008. Basic & applied concepts of immunohematology. 2 painos. St. Louis (MO): Mosby Elsevier.

Choudhury, N. & Bharucha, Z. S. 2017. A textbook on laboratory and clinical transfusion medicine: Volume 2, Basics of blood bank practices (process control). New York: Nova Biomedical.

Daniels, G. & Bromilow, I. 2014. Essential guide to blood groups. 3 painos. Chichester, West Sussex, U.K.: John Wiley & Sons Inc.

Dean, L. 2005. Blood groups and red cell antigens. Bethesda (MD): National center for biotechnology information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>

De Silvestro, G. Veronesi, A. & Vicarioto, M. 2013. Transfusion medicine and patient safety. Berlin: Boston: De Gruyter.

Eklom-Kullberg, S. Savolainen, E-R. Koski, T. Mahlamäki, E. Sainio, S. Salmela, K. & Tienhaara, A. 2018. Verensiirto-opas. 1.painos. Tallinna: Kustannus Oy Duodecim.

Fimlab Laboratoriot Oy. N.d. Luettu: 29.8.2019. https://www.fimlab.fi/sivu.tmpl?sivu_id=138

- Harmening, D.M. 2018. Modern blood banking & transfusion practices. 6th edition. Philadelphia, Pa.: F.A. Davis Co.
- Hirsjärvi, S. Remes, P. & Sajavaara, P. 2014. Tutki ja kirjoita. 19. painos. Helsinki: Tammi.
- IH-1000: Fully automated system for ID-cards. 2016. Laite-esite. Bio-Rad Laboratories. Luettu: 29.1.2019.
<https://www.diagnostics-bio-rad.com/wp-content/uploads/2016/12/2016-IH-1000-Brochure-EN.pdf>
- Ilmakunnas, M. 2019. Apua, potilaallani on veriryhmävasta-aine! Finnanest 1/2019, 48-55. http://www.finnanest.fi/files/ilmakunnas_veriryhmavastaaina.pdf
- ISBT. N.d. Red cell immunogenetics and blood group terminology. Luettu: 17.4.2019. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
- Johns, G. S. 2015. Clinical laboratory blood banking and transfusion medicine: Principles and practice. Boston: Pearson Education.
- Jyväskylän yliopiston Koppa. 2015. Kokeellinen tutkimus. Päivitetty: 23.4.2015. Luettu: 16.8.2019. <https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/tutkimusstrategiat/kokeellinen-tutkimus>
- Klein, H.G. & Anstee, D. J. 2014. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. Twelfth edition. Chichester, England; Oxford, England: Wiley Blackwell.
- Maitta, R. 2018. Clinical principles of transfusion medicine. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- McCullough, J. 2017. Transfusion medicine. Fourth edition. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Murphy, M.F. Roberts, D.J. & Yazer, M.H. 2017. Practical transfusion medicine. 5th edition. Chichester, West Sussex, England: Wiley Blackwell.
- Murphy, M.F. Pamphilon, D.H. & Heddle, N.M. 2013. Practical transfusion medicine. 4th edition. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell.
- Pathak, S. Chandrashekhar, M. & Wankhede, G.R. 2011. Type and screen policy in the blood bank: Is AHG crossmatch still required? A study at a multispecialty corporate hospital in India. Asian journal of transfusion science. 5(2): 153–156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159246/>
- Poole, J. 2012. What methods and process flow can assist in alloantibody identification. ISBT Science Series, 7: 58-61. <https://onlinelibrary-wiley-com.lib-proxy.tuni.fi/doi/epdf/10.1111/j.1751-2824.2012.01574.x>
- Reid, M.E. Lomas-Francis, C. & Olsson, M.L. 2012. The blood group antigen factsbook. 3rd edition. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press.

Shin, J.H. Lee, J.Y. Kim, J.H. Kim, H.R. & Lee, J.N. 2009. Screening and identification of unexpected red cell antibodies by simultaneous LISS/Coombs and NaCl/Enzyme gel methods. The Korean academy of medical sciences, 24(4):632-635. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2719182/>

Veripalvelu. 2018. Veriryhmätutkimukset. Suomen punainen risti. Päivitetty: 22.5.2018. Luettu: 27.3.2019. <https://www.veripalvelu.fi/terveydenhuollon-ammattilaiset/laboratoriopalvelut/veriryhma>

Verivalmisteiden käytön opas 2016. 2016. Helsinki: Punainen Risti. <http://view.24mags.com/mobilev/b9ad37e2509de8d040d6a2bb320f77ab#/page=1>

Liite 1. Esimerkki antigenikartasta

BIO-RAD

Set ID-DiaPanel: 45161.41.x (Japan: 4516.41.xx) **LOT 06171.41.x - 06271.41.x** (Japan: 0617.41.xx - 0627.41.xx) **2018.09.10** (Japan: 10.09.18)

Set ID-DiaPanel P: 45171.41.x (Japan: 4517.41.xx) **05361.41.x - 05461.41.x** (Japan: 0536.41.xx - 0546.41.xx) **V.I.P. Software: N/A**

Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabla de antígenos / Identification d'anticorps / Identificación de anticuerpo / Identificação do anticorpo

Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identificazione anticorpale / Identificación de anticuerpo / Identificação do anticorpo

ID-DiaPanel

ID-DiaPanel-P

CE 0123

Rh-ir	Rh-ir				Kell				Duffy		Kidd		Lewis		P		MNS			Luth.		Xg		Spez. Antigene Special types Antigènes part. Otros Antígenos Tipos especiais	Bemerkungen Remarks Note Observações
	D	C	E	c	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	P ₂	M	N	S	L ^u ^a	L ^u ^b	Xg ¹	Xg ²		
1	CCC ^W D ₁ ee	R ₁ ^W R ₁	240365	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	1	
2	CCD ₁ ee	R ₁ R ₁	063714	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	2	
3	ccD ₁ EE	F ₂ R ₂	595723	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	3	
4	Ccd ₁ ee	r ₁ r	081303	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	4	
5	ccddEe	r ₁ r	437734	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	5	
6	ccddeee	rr	536002	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	6	
7	ccddeee	rr	452419	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	7	
8	ccD ₁ ee	R ₀ r	706352	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	8	
9	ccddeee	rr	038226	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	9	
10	ccddeee	rr	356070	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	10	
11	ccddeee	rr	127894	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	11	
Patient/Patient/Paciente/Paciente/Paciente																								Especímenes/Autocombos/ Autocombos/Autocombos/Autocombos	

Anmerkungen siehe rückseitig / Remarks see overleaf / Voir les remarques au verso / Per le note consultare il retro / Ver observaciones en el reverso / Ver observações no verso

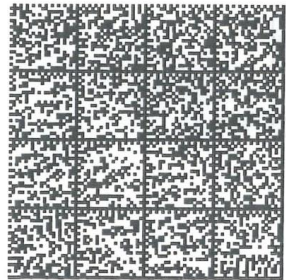
Name
Name
Nom
Nome
Nome

Blutgruppe + Antigene
Blood group + antigens
Groupe sanguin + antigènes
Grupo sanguíneo + antígenos
Grupo sanguíneo + antígenos

Interpretation
Interpretation
Interpretation
Interpretation

Datum
Date
Date
Data
Fecha
Data

B004115 03.18 26.06.2018 / 14:22 V.02 DialMed GmbH, Pra Rond 23, 1785 Cressier FR, Switzerland, www.bio-rad.com



Liite 2. Vasta-aineseulonta-negatiivisten näytteiden seulonnat

Testisolu	I			II			III			SF		
	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P	L	N	L/P
Näyte 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
Näyte 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 12	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-		
Näyte 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 23	-	+	2+	-	+	2+	-	+	2+	-		
Näyte 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 26	-	+	-	-	+	-	-	2+	-	-		
Näyte 27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Näyte 36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

L = LISS/Coombs-kortti, N = NaCl/Enzyme-kortti, L/P = LISS/Coombs-kortti ja entsyymisolut

Liite 3. Vasta-aineseulonta-positiivisten näytteiden tunnistuspaneelit

Testisolu	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X		XI	
	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N
Näyte 39	-	-	-	-	3+	-	2+	-	2+	-	-	-	-	-	-	2+	-	3+	-	-	-	-
Näyte 43	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Näyte 44	-	2+	(+)	2+	(+)	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-
Näyte 46	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	+
Näyte 48	-	2+	2+	2+	2+	4+	4+	-	2+	2+	4+	4+	-	2+	2+	3+	2+	-	2+	2+	-	2+
Näyte 50	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	-	2+	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	-
Näyte 57	3+	4+	3+	4+	3+	4+	4+	3+	4+	-	-	-	-	-	3+	3+	4+	-	-	-	-	-
Näyte 58	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
Näyte 59	(+)	2+	(+)	2+	2+	+	2+	3+	-	2+	-	-	2+	+	2+	+	2+	-	+	2+	-	+
Näyte 62	+	4+	-	(+)	-	-	(+)	+	-	-	-	+	2+	+	-	+	-	(+)	+	-	-	+
Näyte 63	-	2+	3+	3+	(+)	2+	3+	-	-	-	-	-	-	-	(+)	3+	3+	-	-	-	-	-

L = LISS/Coombs-kortti, N = NaCl/Enzyme-kortti, L/P = LISS/Coombs-kortti ja entsyymisolut