

Piia-Riikka Pippola, Asta Viljanen

ABO-veriryhmän alatyyppejen genotyypitysmenetelmän koestus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

30.10.2014

| | |
|---|--|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Asta Viljanen, Piia-Riikka Pippola ABO-veriryhmän alatyypien genotyyppitysmenetelmän koestus 24 sivua + 1 liitettä 30.10.2014 |
| Tutkinto | Bioanalyttikko AMK |
| Koulutusohjelma | Bioanalytiikan koulutusohjelma |
| Suuntautumisvaihtoehto | Bioanalytiikka |
| Ohjaaja(t) | Katri Haimila, laboratorioasiantuntija Hannele Pihlaja, lehtori, Metropolia AMK |
| <p>ABO-veriryhmäjärjestelmä perustuu punasolun pinnalla oleviin antigeeneihin A ja B, niiden muodostamiin veriryhmiin A, B, AB ja O sekä plasmassa oleviin vasta-aineisiin anti-A ja anti-B. ABO-veriryhmistä tunnetaan myös alatyyppejä, jotka ovat muodostuneet, kun jokin anti-geeni muuttuu geneettisesti. Alatyypit ovat populaatiosta riippuvaisia ja hankaloittavat veriryhmien serologista tunnistamista. Kun veriryhmä on epäselvä, normaalit verensiirtosäännöt eivät enää päde. Tällöin veriryhmä täytyy määrittää geenitasolla, jotta tiedetään täsmällisesti, mikä veriryhmä potilaalla on.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata, soveltuuko RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus Suomen Punaisen Ristin (SPR) Veripalveluun ABO-veriryhmäjärjestelmän alatyypien genotyyppitysmenetelmäksi. Tavoitteena oli selvittää, onko menetelmä toistettava ja luotettava.</p> <p>Käytännön toteutus suoritettiin SPR Veripalvelussa. EDTA-verestä eristetystä DNA:sta määritettiin tarkempi veriryhmä käyttäen Inno-Trainin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkausta. Näytteitä oli kaiken kaikkiaan 26. Reagenssipakkauksen 8 näytepaikassa on jokaisessa sekvenssispesifiset alukkeet (SSP= sequence specific primers), jotka tarttuvat tiettyihin mutaatiokohtiin DNA:ssa. DNA monistettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR), minkä jälkeen monistustuotteet eroteltiin geielektroforeesilla ja värjättiin ethidiumbromidilla. Erottelun jälkeen geelit kuvattiin ultraviolettivalossa ja kuvat analysoitiin tulkintakaavion avulla.</p> <p>RBC-Ready Gene ABO Subtype -menetelmä ei tunnistanut suomalaisessa väestössä yleisimmin esiintyviä ABO-veriryhmän alatyypien mutaatioita. Reagenssipakkausta ei oteta käyttöön SPR Veripalvelussa. Epäselvien veriryhmien tutkiminen jatkuu serologisesti etseen tapaan ainakin toistaiseksi.</p> | |
| Avainsanat | ABO-veriryhmäjärjestelmä, genotyyppitys, PCR-SSP, alatyypit, RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus |

| | |
|---|---|
| Author(s) Title | Asta Viljanen, Piia-Riikka Pippola Testing ABO blood group subtype genotyping method |
| Number of Pages Date | 24 pages + 1 appendices 30 October 2014 |
| Degree | Bachelor of Health Care |
| Degree Programme | Biomedical Laboratory Science |
| Specialisation option | Biomedical Laboratory Science |
| Instructor(s) | Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Katri Haimila, Clinical Expert |
| <p>ABO blood group system is based on antigens A and B on red blood cells and antibodies anti-A and anti-B in serum. The red blood cells of blood type A has antigen A and the serum contains anti-B antibody. Blood type B has antigen B and anti-A antibody. Blood type AB has both A and B antigens but no antibodies. Blood type O has no antigens but contains both anti-A and anti-B antibodies. When antigen transforms genetically, ABO subtypes are formed. Genetically, populations have their own subtypes. Serological methods are insufficient in recognizing various ABO subtypes. ABO subtypes may cause clinical situations where normal blood transfusion procedures cannot be applied.</p> <p>The purpose of our study was to find out if the most common mutations among the Finnish population can be recognized by an ABO blood group genotyping method. In our study, we focused on using the RBC-Ready Gene ABO Subtype kit. The target of our study was to study if the method was reliable and repeatable.</p> <p>Our study was executed at Finnish Red Cross Blood Service where 26 samples were analyzed by using PCR-SSP method and Inno-Train RBC-Ready Gene ABO-Subtype kit. The samples that we used were DNA isolated from EDTA-blood. The kit contains sequence specific primers (SSP) that anneals to DNA sequence, where the mutation is located. DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method. PCR products were separated by electrophoresis and shooted in UV-camera.</p> <p>Based on our study, RBC-Ready Gene ABO-Subtype test does not recognize the most common mutations among the Finnish population. Finnish Red Cross Blood Service will not use this method for ABO subtype genotyping. ABO subtyping by serological method will continue for the time being.</p> | |
| Keywords | ABO blood group, subtype, genotyping, PCR-SSP, RBC-Ready Gene ABO Subtype -kit |

Sisällys

| | | |
|-----|---------------------------------------|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet | 2 |
| 3 | ABO-veriryhmäjärjestelmä | 2 |
| 3.1 | Punasoluantigeenit | 4 |
| 3.2 | Punasoluvasta-aineet | 5 |
| 3.3 | ABO-veriryhmän alatyypit | 6 |
| 4 | Verensiirrot | 6 |
| 4.1 | Verensiirtotutkimukset | 7 |
| 4.2 | Verensiirtosäännöt | 8 |
| 4.3 | Haittavaikutukset | 10 |
| 5 | ABO-genotyyppitys | 11 |
| 6 | Polymeraasiketjureaktio eli PCR | 12 |
| 6.1 | PCR-reaktion eri vaiheet | 12 |
| 6.2 | Sequence Specific Primers (SSP) | 13 |
| 6.3 | PCR-tiloissa työskentely | 14 |
| 7 | Toteutus | 14 |
| 8 | Tulokset | 17 |
| 9 | Laadun ja luotettavuuden arviointi | 19 |
| 10 | Pohdinta | 21 |
| | Lähteet | 23 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. Tulosten tulkintakaavio | |

1 Johdanto

ABO-veriryhmäjärjestelmä perustuu punasolun pinnalla oleviin antigeeneihin (A ja B) ja niiden muodostamiin veriryhmiin (A, AB, B ja O) sekä plasmassa oleviin vasta-aineisiin (anti-A ja anti-B) (Verensiirto-opas. 2006: 16–17). ABO-veriryhmäjärjestelmässä tunnetaan myös alatyyppejä, jotka muodostuvat, kun punasolun pinnalla oleva antigeeni muuttuu geneettisesti. Tällöin normaalit verensiirtosäännöt eivät välttämättä päde ja täytyy selvittää, mikä mutaatio geenissä on tapahtunut ja mitä verta potilaalle voidaan antaa.

Tässä työssä tutkittiin, soveltuuko Inno-Trainin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus ABO-veriryhmän alatyypin genotyyppitysmenetelmäksi Suomen Punaisen Ristin (SPR) Veripalveluun. Työ toteutettiin tutkimalla serologisessa ABO-veriryhmämäärityksessä epäselviksi jääneitä näytteitä. Tavoitteena oli selvittää, onko menetelmä toimiva ja luotettava.

Suomessa ei ole vielä käytössä ABO-veriryhmien alatyypin genotyyppitysmenetelmää vaan alatyypit selvitetään nykyisillä serologisilla menetelmillä niin pitkälle, kun voidaan, ja potilaalle annetaan mahdollisimman sopivia verivalmisteita. Joissakin tapauksissa näytteet lähetetään ulkomaiseen laboratorioon tutkittavaksi. Genotyyppitysmenetelmän pystyttäminen Suomeen on tärkeää, jotta tulokset saadaan nopeammin ja potilaille voidaan antaa heidän oman veriryhmänsä mukaisia verivalmisteita. Näin ollen hätäverenä käytettäviä O-punasoluja ja AB-plasmaa ei käytetä turhaan. Myös taloudellisesti katsottuna olisi hyötyä, että näytteet voitaisiin jatkossa tutkia Suomessa.

Opinnäytetyöprojekti koostuu kirjallisesta raportista sekä käytännön toteutuksesta. Käytännön toteutus suoritettiin SPR Veripalvelussa. Tulokset esitetään SPR Veripalvelussa 7.11.2014 ja koulun seminaarissa 4.11.2014. Työ esitellään myös Laboratoriolääketiedepäivillä 8.-9.10.2014.

2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata, soveltuuko ABO-veriryhmän alatyypin tunnistamisessa käytettävä RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus SPR Veripalveluun ABO-veriryhmäjärjestelmän alatyypin genotyyppitysmenetelmäksi. Menetelmä perustuu deoksiribonukleinihapon eli DNA:n monistamiseen polymeerasiketjureaktiolla (PCR) käyttäen sekvenssispesifisiä alukkeita (SSP= sequence specific primers), eli sitä kutsutaan PCR-SSP -menetelmäksi. Tavoitteena oli selvittää, onko menetelmä toimiva ja luotettava. ABO-veriryhmän alatyypin tunnistaminen tällä tavoin nopeuttaa huomattavasti vastausten valmistumista, ja sen vuoksi potilaat saavat mahdollisimman nopeasti oman veriryhmänsä mukaisia verivalmisteita. Yleisesti ottaen olisi hyvä, jos voitaisiin vähentää hätäverenä käytettävien O-punasolujen ja AB-plasman antamista potilaille, joille voitaisiin antaa myös heidän oman veriryhmänsä mukaisia verivalmisteita.

Taloudellisesta näkökulmasta ABO-veriryhmän alatyypin genotyyppitysmenetelmän pystyttäminen Suomeen vähentäisi lähetyskustannuksia, kun näytteitä ei tarvitsisi lähettää ulkomaille tutkittavaksi.

Opinnäytetyössä pohditaan seuraavia asioita:

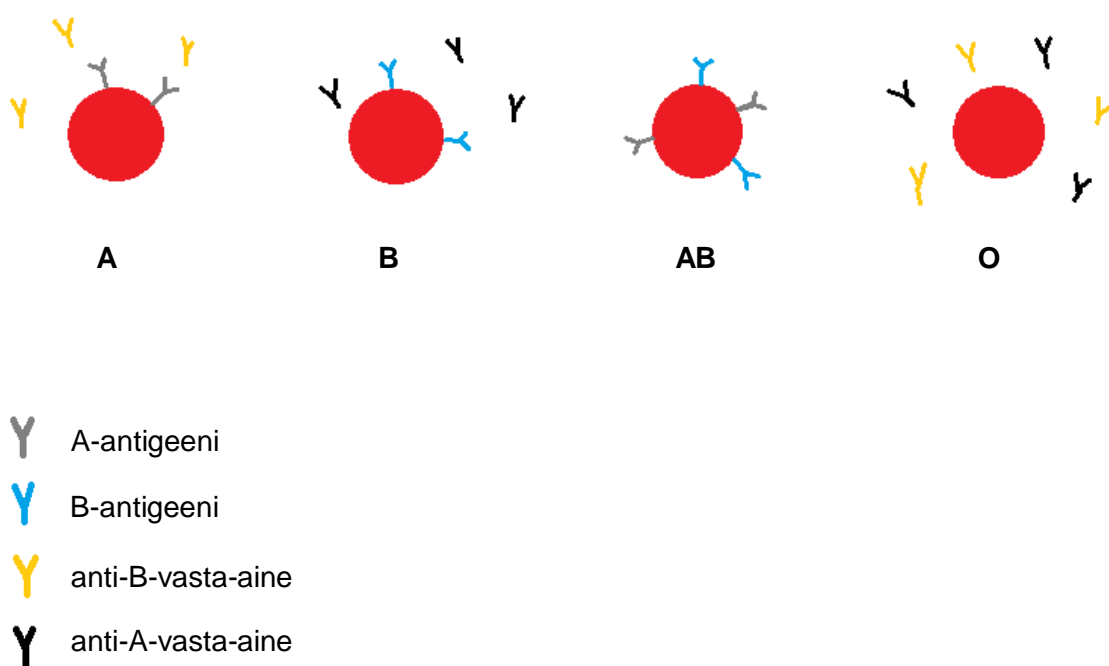
1. Kuinka hyvin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus soveltuu ABO-veriryhmän alatyypin genotyyppitykseen SPR Veripalvelussa?
2. Kuinka luotettava ja toistettava menetelmä on?
3. Onko hyödyllistä ottaa menetelmä käyttöön SPR Veripalvelussa?

3 ABO-veriryhmäjärjestelmä

ABO-veriryhmäjärjestelmä keksittiin 1900-luvulla. Itävaltalainen tutkija Karl Landsteiner sekoitti kollegoidensa seerumia ja punasoluja keskenään ja tarkkaili niiden muodostamia agglutinaatioreaktioita. Agglutinaatioreaktioiden perusteella Landsteiner nimesi ensimmäiset veriryhmäantigeenit A:ksi ja B:ksi. Hän huomasi myös, että O-veriryhmässä kumpikaan seerumeista (A ja B) eivät aiheuttaneet tietyille punasoluille agglutinaatioreak-

tiota. Aluksi veriryhmät nimettiin roomalaisilla numeroilla mutta sekaannusten välttämiseksi suuressa osassa maailmaa siirryttiin käyttämään A-, AB-, B- ja O-nimiä. (Reid – Lomas-Francis 2004:19.)

Ihmisellä on normaalisti noin puolen vuoden iästä lähtien plasmassaan vasta-aineita niitä ABO-veriryhmäjärjestelmän antigeenejä kohtaan, joita hänellä itsellään ei ole (Kuvio 1). Huomattiin, että vasta-aineet aiheuttavat vaarallisen verensiirtoreaktion, jos henkilölle annetaan verivalmisteita, jotka eivät ole hänen veriryhmänsä mukaisia. (Verensiirto-opas. 2006:15–16.)

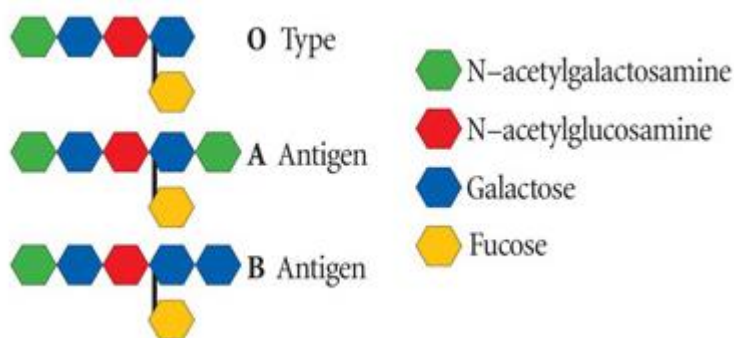


Kuvio 1. Veriryhmien muodostuminen.

3.1 Punasoluantigeenit

Punasolun pinnalla on antigeenejä, jotka ovat glykolipidejä, glykoproteiineja ja proteiineja. Veriryhmäantigeeneillä voi olla monenlaisia tehtäviä: ne voivat toimia muun muassa kuljetusproteiineina, punasolun pinnan entsyymeinä tai sytokiinireseptoreina. Antigeenien lukumäärä punasolun pinnalla voi vaihdella suuresti riippuen siitä, mistä antigeenistä on kyse. Esimerkiksi A- ja B-antigeenirakenteita on arvioitu olevan yhdessä punasolussa noin 800 000 kappaletta. (Verensiirto-opas. 2006: 11–12).

B- ja O-veriryhmät ovat muodostuneet A-antigeenistä mutaatioiden kautta. Antigeenit eroavat rakenteellisesti toisistaan niihin liittyvän spesifin päätesokerin perusteella (Kuvio 2). (Yamamoto – Clausen – White – Marken – Hakomori 1990.) ABO-veriryhmäjärjestelmää koodittavat geenit sijaitsevat kromosomissa 9, ja kaksi aminohappoa kohdissa 266 ja 268 määräävät A- ja B-spesifisyyden eli sen, kumpi alleeli ilmenee (Reid - Lomas-Francis 2004: 20, 23). Spesifit transferaasit, jotka muodostuvat A- ja B-alleelien emäsjärjestyksen mukaan, kiinnittävät päätesokerin hiilihydraatti H:n, joka on osa veriryhmien esiastetta. A-antigeenillä päätesokeri on N-asetyyli-D-galaktosamiini (GalNAc) ja B-antigeenillä D-galaktoosi (Gal). Emäsjärjestys A- ja B-antigeenin välillä poikkeaa toisistaan vain kahden emäksen kohdalla. (Taulukko 1). O-veriryhmällä ei ole toimivaa transferaasia, joten silloin punasolujen pinnalla olevaan H-antigeeniin ei kiinnity spesifistä päätesokeria. (Reid – Lomas-Francis 2004: 20, 24–25.) O-alleelissa on tapahtunut yhden emäksen deletio, minkä vuoksi toimivaa transferaasia ei muodostu. Tästä seuraa, että niillä, joilla on O-veriryhmä, punasolun pinnalla on vain ABO-veriryhmän esiastetta eli H-antigeeniä. (Yamamoto – Clausen – White – Marken – Hakomori 1990.)



Kuvio 2. Antigeenien spesifit päätesokerit. (Criswell 2008.)

Taulukko 1. A- ja B-alleelien emäsjärjestyksen eroavuus. (Ségurel – Thompson – Flutre – Lovstad – Venkat – Margulis – Moyse- Ross – Gamble – Sella – Ober – Przeworski: 2012: 2.)

| A-alleelin emäsjärjestys | B-alleelin emäsjärjestys |
|--------------------------|--------------------------|
| CTGgggGGG | ATGgggGCG |

3.2 Punasoluvasta-aineet

ABO-veriryhmäjärjestelmän luonnollisia vasta-aineita (anti-A ja anti-B) kutsutaan isoagglutiniineiksi. Ne muodostuvat jo varhaislapsuudessa, kun ruoansulatuskanavassa tapahtuu altistus sellaisten bakteereiden pintarakenteiden kanssa, jotka muistuttavat veriryhmäantigeenien hiilihydraatteja. Vasta-aineita voi muodostua myös immunisaation kautta, jos henkilö altistuu vieraan veren antigeeneille, esimerkiksi raskauden tai verensiirron seurauksena. Sekä luonnolliset että immunisaation kautta syntyneet vasta-aineet ovat verensiirron kannalta merkityksellisiä. Vasta-aineen spesifiteetti, reaktiotapa ja voimakkuus laboratoriokokeissa ovat tärkeitä arviointiperusteita, kun arvioidaan vasta-aineen kliinistä merkitystä. Potilaalle täytyy antaa sellaisia punasoluja, joita kohtaan hänellä ei ole vasta-aineita. (Verensiirto-opas. 2006:14–15.)

3.3 ABO-veriryhmän alatyypit

ABO-veriryhmäjärjestelmässä on mutaatioista johtuvia A- ja B-antigeenien heikompia muotoja. Nämä muodot johtuvat yleensä siitä, että veriryhmäspesifistä päätesokeria siirtävä transferaasi ei toimi tehokkaasti. Tästä johtuu punasoluantigeenin määrän väheneminen punasolun pinnalla. Alaryhmät ovat huomattavasti yleisempiä A-veriryhmällä kuin B-veriryhmällä. Yleisin ja tunnetuin alatyyppejä on A₂. A₂-alatyypin punasoluissa on A-antigeenirakenteita vain 1/10 verrattuna normaaleihin A-veriryhmän eli A₁-veriryhmän punasoluihin. (Verensiirto-opas. 2006:16–17.) Alatyypit ovat muodostuneet sattuman kautta, eikä niistä ole ihmisille todennäköisesti hyötyä. (Haimila 2014.) ABO-veriryhmän alatyyppejä tunnetaan tällä hetkellä noin 300 erilaista (Goebel – Halm-Heinrich – Parkner – Rink – Heim – Bugert 2013: 454).

4 Verensiirrot

Punasolut kuljettavat happea keuhkojen kautta kudoksiin, kuten aivoihin ja lihaksiin. Happi sitoutuu keuhkoissa hemoglobiiniin ja vapautuu solujen käyttöön kudoksissa. Kudoksista punasolut kuljettavat hiilidioksidin takaisin keuhkoihin uloshengitettäväksi. (Veren osat ja niiden tehtävät. 2014.)

Punasoluja siirretään potilaalle kroonisen anemian hoitona mahdollisen spesifin hoidon tueksi. Punasoluja siirretään myös syövän ja pahanlaatuisten veritautien tukihoitona sekä akuuteissa verenvuodoissa. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013: 9.) Veri- ja plasmavalmisteista suurin osa käytetään leikkausten yhteydessä. Esimerkiksi hätäleikkauksissa potilas voi menettää suuria määriä verta, jolloin erityisesti tarvitaan verensiirtoja. (Hiippala 2004.) Anemiassa hemoglobiinipitoisuus on alhainen. Syynä voi olla esimerkiksi häiriö punasolujen esiasteiden muodostumisessa, punasolujen kypsymisessä tai se, että punasoluja menetetään tai niitä tuhoutuu tavallista enemmän. Punasoluja siirretään, kun veren hemoglobiini laskee liian alhaiseksi. Punasoluja ei kuitenkaan siirretä välttämättä heti, kun hemoglobiiniarvo laskee viiterajojen alle, vaan punasolujen siirron tarve katsotaan tapauskohtaisesti. (Salonen 2014.) Syöpien hoidossa käytettävät solunsalpaajahoidot voivat aiheuttaa huomattavaa hemoglobiinin laskua, jolloin voidaan tarvita verensiirtoja (Syövän tukihoito. 2010).

4.1 Verensiirtotutkimukset

ABO-veriryhmä tulee määrittää ennen punasolujen siirtoa kahdesti eri näytteistä, jotka on otettu eri aikaan. Näytteet toimivat toistensa kontrolleina ja ehkäisevät vääriä verensiirtoja. ABO-veriryhmä määritetään serologisesti geelikortilla (Kuvio 3). Ennen verensiirtoa tehdään laboratoriotutkimuksia, joilla varmistetaan siirrettävien valmisteiden sopivuus potilaalle. Potilaan ABO- ja RhD-veriryhmät määritetään aina ennen punasolujen, trombosyyttien, plasman ja valkosolujen siirtoa. Punasoluvasta-aineiden seulonta tehdään ennen punasolu- ja valkosoluvalmisteiden siirtoa. Mikäli seulontatuloksena on positiivinen, tulee punasoluvasta-aineet tunnistaa. Sopivuuskoe suoritetaan yleensä serologisesti. Jos tulos on positiivinen, valmiste ei ole sopiva eikä sitä saa siirtää. Punasoluvasta-aine, joka aiheuttaa positiivisen tuloksen, tulee tunnistaa mahdollisuuksien mukaan ennen verensiirtoa. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013: 11.)

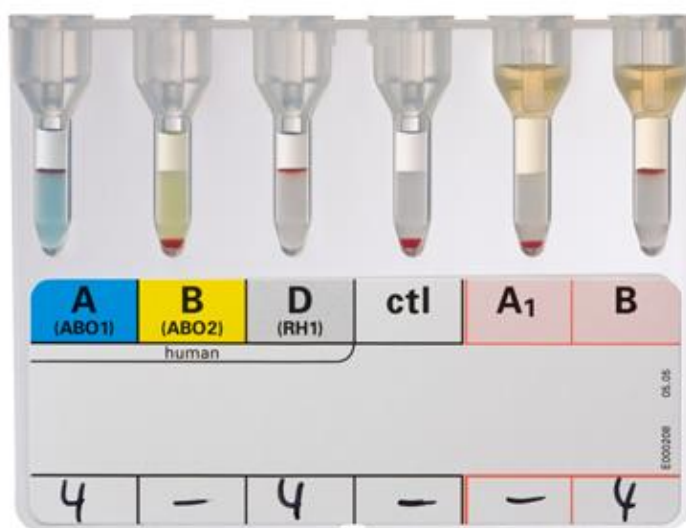
Suomessa suurin osa veriryhmämäärytyksistä, joiden tulokset ovat epäselviä tai punasolu- ja plasmareaktiot ovat ristiriitaisia, lähetetään SPR Veripalveluun jatkotutkimuksiin. SPR Veripalvelussa on käytössä menetelmiä, joilla saadaan selville heikko A/B sekä alatyypit A₂ ja A_{finn}.

Heikossa A- ja B-veriryhmässä punasolujen pinnalla antigeenirakenteita saattaa olla niin vähän, etteivät ne agglutinoidu normaalisti vastaavilla antiseerumeilla, kun veriryhmämäärytykseen käytetään tavanomaista geelitekniikkaa. Tällöin tulokseksi saadaan heikko reaktio. Heikon A:n ja B:n tunnistamiseen käytetään absorptio-eluaatio-menetelmää. Punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin kiinnittyy vasta-ainetta (anti-A tai anti-B), ja se konsentroidaan käyttämällä suurta määrää punasoluja, joiden pinnalla on heikko antigeeni. Antigeeniin sitoutunut vasta-aine irrotetaan (eluoidaan) happamaan puskuriin, josta se osoitetaan titraamalla neutraloinnin jälkeen. Menetelmän avulla saadaan epäsuorasti osoitettua antigeenirakenteet punasolujen pinnalla. (Absorptio-eluaatio heikon A-/B-antigeenin osoittamiseksi. 2008.)

ABO-veriryhmäjärjestelmän A₁-veriryhmän (yleisin ”normaali” A) punasolut ilmentävät joko runsaasti tai pelkästään A-antigeeniä. A:n alatyypin A₂-veriryhmän punasolut ilmentävät sekä A-antigeeniä että H-antigeeniä, koska A₂-transferaasi ei kiinnitä yhtä tehok-

kaasti päätesokeria kuin A₁-transferaasi. Tästä seuraa, että osa H-antigeeneistä jää ilman päätesokeria. A:n alatyypin A₂ saadaan selville käyttämällä anti-H-vasta-ainetta, joka tarttuu punasolun pinnalla ilmentyviin H-antigeeneihin aiheuttaen agglutinaatioreaktion. Kyseisellä menetelmällä saadaan selville A:n alaryhmä A₂. A₁ tunnistuksessa käytetään anti-A₁-vasta-ainetta, joka reagoi muodostaen agglutinaatioreaktion punasolujen pinnalla olevien A₁-antigeenien kanssa. (A:n alaryhmien A₁ ja A₂ määrittäminen geelitekniikalla. 2012.)

A_{finn} alatyypin tunnistaminen perustuu partiaaliseen reaktioon, jossa vasta-aine agglutinoi osan punasoluista mutta osaa ei. Tämä osittainen punasolujen agglutinoituminen on A_{finn}-veriryhmälle tyypillistä mutta ei muille A-veriryhmän alatyypeille. (Haimila 2014.)



Kuvio 3. Selkeä ABO-veriryhmätulos geelikortilla. ABO1-, RH1(D)- ja B-näytepaikoissa 4+ eli selkeät positiiviset reaktiot. ABO2-, ctl- ja A₁- näytepaikoissa negatiiviset reaktiot. (ABO/D + Reverse Grouping. 2014.)

4.2 Verensiirtosäännöt

Normaalisti verensiirrot toteutetaan taulukon 2 ja 3 mukaan, kun kyse ei ole ABO-veriryhmän alatyypeistä. Henkilöllä, jolla on A-veriryhmä, on punasolun pinnalla A-antigeeniä ja plasmassa anti-B-vasta-aineita. Näin ollen hänen plasmassaan ovat anti-B-

vasta-aineet tuhoaisivat sellaiset siirrettävät punasolut, joissa on pinnalla B-antigeeniä. Jos hänelle siirrettäisiin B-veriryhmän plasmaa, siirrettävässä plasmassa olevat vasta-aineet tuhoaisivat siirron saaneen henkilön omia punasoluja. Tämän vuoksi henkilölle on aina siirrettävä hänen oman veriryhmänsä mukaisia verivalmisteita. Jos henkilön veriryhmää täysin vastaavia verivalmisteita ei ole saatavilla, hänelle voidaan antaa mahdollisimman sopivia valmisteita taulukon 3 mukaisesti.

Normaalit taulukoiden mukaiset verensiirtosäännöt eivät välttämättä päde, jos henkilöllä on ABO-veriryhmän alatyyppejä. Tällaisissa tilanteissa SPR Veripalvelussa on käytäntönä, että henkilölle, jolla on esimerkiksi A₂- tai A_{finn}-veriryhmä, annetaan A-punasoluja ja A-plasmaa. Henkilölle, jonka veriryhmä on heikko B, annetaan O-veriryhmän punasoluja ja B- tai AB-plasmaa. Tässä tapauksessa normaalit verensiirtosäännöt eivät päde, koska henkilöllä voi olla sekä anti-A- että anti-B-vasta-aineita. Jos hänelle siirretään B-punasoluja, hänen plasmassaan olevat anti-B-vasta-aineet voivat tuhota siirretyt punasolut, eikä verensiirrosta ole hyötyä. Muiden alatyyppeiden kohdalla verensiirrot katsotaan tapauskohtaisesti. (Haimila 2014.)

Taulukko 2. ABO-veriryhmät ja plasmassa esiintyvät luonnolliset vasta-aineet. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013:15.)

ABO-veriryhmät ja plasmassa esiintyvät luonnolliset vasta-aineet

| Veriryhmä | Vasta-aine plasmassa (isoagglutiiniini) | |
|-----------|---|--------|
| Antigeeni | Anti-A | Anti-B |
| A | – | +++ |
| B | +++ | – |
| O | +++ | +++ |
| AB | – | – |

Taulukko 3. Veriryhmävaihtoehdot punasolujen siirroissa oman veriryhmän loppuessa. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013:17.)

Veriryhmävaihtoehdot punasolujen siirroissa oman veriryhmän loppuessa

| Potilaan veriryhmä | Hyvä vaihtoehto | Hätävaihtoehto |
|--------------------|--|---|
| A RhD pos | O RhD pos A RhD neg O RhD neg | |
| A RhD neg | O RhD neg | A RhD pos O RhD pos |
| B RhD pos | O RhD pos B RhD neg O RhD neg | |
| B RhD neg | O RhD neg | B RhD pos O RhD pos |
| O RhD pos | O RhD neg | |
| O RhD neg | | O RhD pos |
| AB RhD pos | B RhD pos A RhD pos O RhD pos B RhD neg A RhD neg AB RhD neg O RhD neg | |
| AB RhD neg | B RhD neg A RhD neg O RhD neg | AB RhD pos B RhD pos A RhD pos O RhD pos |

4.3 Haittavaikutukset

Haittavaikutuksen mahdollisuus on olemassa aina, kun siirretään verivalmisteita potilaalle. Haittavaikutukset alkavat useimmiten siirron aikana mutta viimeistään 24 tunnin kuluttua siirrosta. Jotkut harvinaiset haittavaikutukset ovat viivästyneitä ja saattavat ilmetä viikkojen tai jopa vuosien päästä siirrosta. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013: 58.)

Lievät kuume- ja allergiatyyppiset reaktiot ovat yleisempiä, kun taas vakavat henkeä uhkaavat haittavaikutukset ovat selvästi harvinaisempia. Reaktion ilmetessä siirto täytyy keskeyttää välittömästi ja aloittaa hoito. Vakavia haittavaikutuksia ovat muun muassa verensiirtoon liittyvä akuutti hemolyyysi, viivästynyt hemolyyysi, akuutti keuhkovaurio ja verensiirtoon liittyvä käänteishyljintäreaktio. (Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013: 58–62.)

Verensiirroissa tulee ottaa huomioon erityisesti sopiva ABO-veriryhmä, sillä se on tärkein tekijä verensiirron turvallisuuden kannalta. Jos potilaalle ei anneta hänen oman ABO-veriryhmänsä mukaista tai mahdollisimman sopivaa verivalmistetta, se voi aiheuttaa hengenvaarallisia haittavaikutuksia. (Juvonen – Sareneva – Krusius 2013: 3228.)

5 ABO-genotyyppitys

ABO-genotyyppityksellä selvitetään veriryhmäantigeeniä koodaavan DNA:n emäsjärjestys (Gassner - Schmarda - Nussbaumer – Schonitzer 1996: 1852). Näin saadaan selville mahdollinen mutaatio, joka emäsjärjestyksessä on tapahtunut.

Normaalisti serologinen veriryhmämääritys riittää hyvin verensiirroissa. Serologinen määritys on helppo, nopea ja edullinen tapa määrittää veriryhmäantigeenit ja vasta-aineet. Genotyyppitystä tarvitaan, kun henkilöllä on epäselvä veriryhmä ja halutaan tietää tarkasti, mikä mutaatio on tapahtunut ja mitä verivalmisteita henkilölle voidaan antaa. Epäselvä veriryhmä näkyy useimmiten serologisessa määityksessä heikkona tai ristiriitaisena reaktiona, eli antigeeni- ja vasta-ainereaktiot eivät vastaa toisiaan.

Ihmisellä saattaa olla niin vähän antigeeniä punasolun pinnalla, että serologinen ABO-määritys ei ole tarpeeksi herkkä niiden toteamiseen. Silti häneltä puuttuvat vastaavat isoagglutiniinit, koska antigeeniä on kuitenkin jonkin verran punasolujen pinnalla eikä niitä vastaan muodostu isoagglutiniineja. Tällöin veriryhmä saattaa olla esimerkiksi heikko A tai B. On olemassa myös tapauksia, joissa henkilön veriryhmä on A:n alatyypin A_2 ja hänellä on anti- A_1 -vasta-aineita. (Haimila 2014.) Tällöinkin serologinen määritys on ristiriitainen ja veriryhmän täsmällinen selvitys vaatii jatkotutkimuksia.

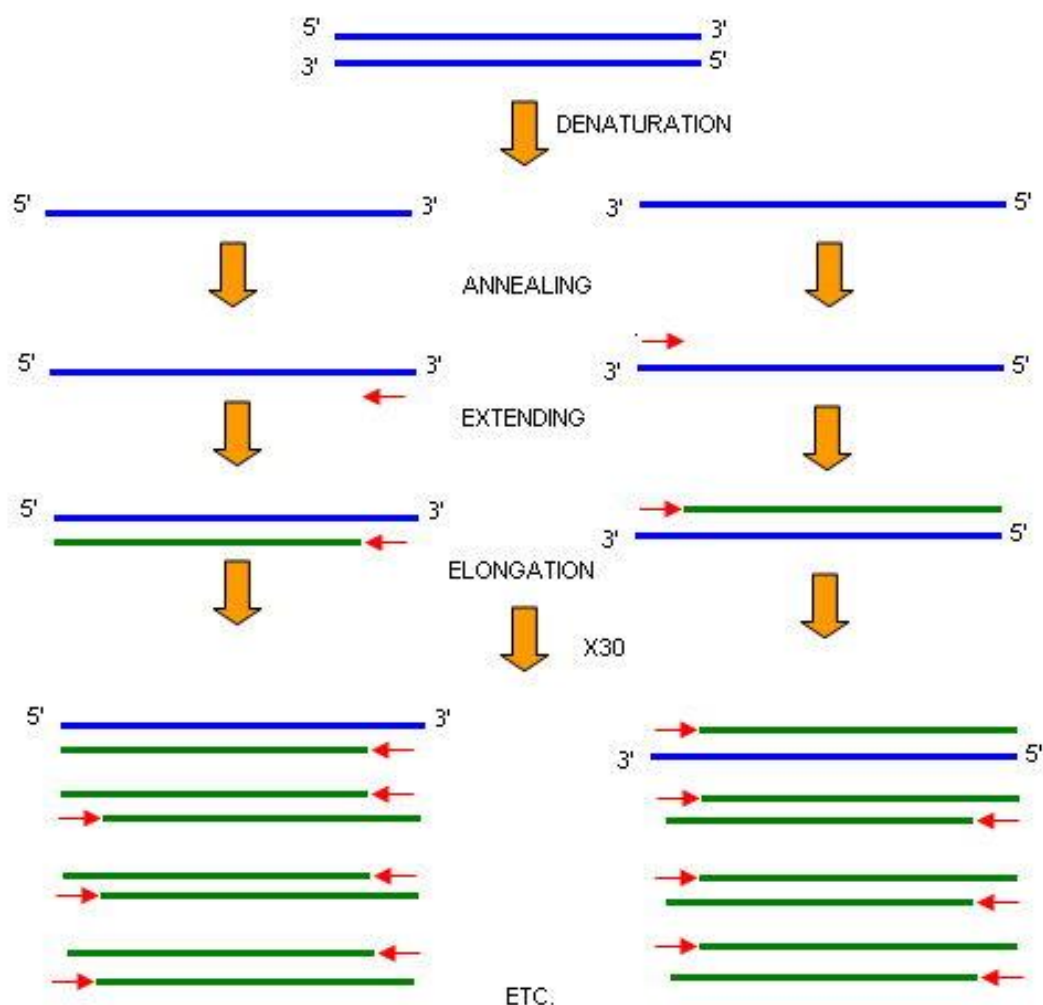
Genotyyppitys on serologiseen veriryhmämääritykseen verrattuna hitaampi ja kalliimpi menetelmä. Genotyyppitys on silti joissain tapauksissa välttämätöntä, jotta saadaan selville, mikä on potilaan täsmällinen veriryhmä ja siten mikä veri sopii potilaalle parhaiten.

6 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

PCR on menetelmä, jolla saadaan monistettua haluttua DNA-jaksoa. Jakso, jota DNA:sta monistetaan, määräytyy käytettyjen alukkeiden mukaan. Näytteenä käytetään useimmiten kokoverestä, plasmasta tai joissakin tutkimuksissa myös syljestä eristettyä DNA:ta. PCR on erittäin herkkä menetelmä, ja näytteeksi riittääkin jopa yksi solu. (Nukleiinihappojen monistaminen. 2006.) Toimiakseen reaktio tarvitsee DNA:ta, jota se monistaa, alukkeita (oligonukleotideja), DNA-polymeraasin, nukleotideja, puskuriliuoksen sekä ioneja. PCR-laite lämmittää ja jäähdyttää reaktioseosta kolmivaiheisessa syklissä, toistaen syklin yleensä 20–35 kertaa. DNA:ta saadaan monistettua jopa 10^5 kopiota. (Walker – Rapley 2008: 29.)

6.1 PCR-reaktion eri vaiheet

Denaturaatiovaiheessa eli aloitusvaiheessa reaktioseoksen lämpötilaa nostetaan niin korkealle, että juosteet irtoavat toisistaan ja DNA:sta tulee yksijuosteista. Yksijuosteinen DNA toimii mallina DNA-polymeraasientsyymille, joka rakentaa nukleotideista uutta juostetta mallijuosteen rinnalle. Yleisimmin denaturaatio tapahtuu 94–96 °C:ssa ja kestää 10 sekunnista minuuttiin. Seuraava inkubaatiolämpötila on matalampi ja määräytyy alukkeiden sulamislämpötilojen mukaan, mikä on yleensä noin 50–65 °C. Optimaalinen lämpötila auttaa alukkeita kiinnittymään niille spesifisiin paikkoihin yksijuosteisen DNA:n 5'-päässä. Kolmannessa inkubaatiossa lämpötilaa nostetaan DNA-polymeraasientsyymille optimaaliseksi eli noin 72 °C:een. Reaktioseosta inkuboidaan 20 sekunnista 2 minuuttiin, ja DNA:sta tulee taas kaksijuosteista. (Kuvio 4.) (Walker – Rapley 2008: 29–31.) PCR:n kolmivaiheista sykliä toistetaan, kunnes DNA:ta on monistunut tarpeeksi.



Kuvio 4. PCR:n syklit. (PCR. 2009.)

6.2 Sequence Specific Primers (SSP)

PCR-SSP-tekniikka perustuu geenin monistamiseen tietyillä alukkeilla. Alukeparit pariutuvat ainoastaan tietyn alleelin tai alleeliryhmän kanssa. PCR-monistuksen jälkeen DNA-fragmentit värjätään ethidiumbromidilla. DNA-fragmentit erotellaan pituuden mukaan toisistaan käyttämällä agarosigeelielektroforeesia. Ethidiumbromidi saa DNA:n näkymään ultraviolettivalossa. Tulos luetaan joko positiiviseksi tai negatiiviseksi riippuen siitä, monistuuko tuote vai ei. Tulos tulkitaan tulkintakaavion avulla. (RBC-Ready Gene. Version 2.7.)

6.3 PCR-tiloissa työskentely

PCR-valmisteluille (pre-PCR) ja PCR-laitteille sekä PCR-tuotteen analyyseille (post-PCR) täytyy olla erilliset huoneet. Huoneissa täytyy olla huonekohtaiset tarvikkeet sekä jääkaapit tai pakastimet näytteiden ja reagenssien säilytystä varten. Näytteet saavat kulkea vain yhteen suuntaan, pre-PCR-tilasta post-PCR-tilaan. Normaalin puhtaanapidon lisäksi työtilojen pinnat täytyy puhdistaa säännöllisesti nukleiinihappoja poistavalla liuoksella, esimerkiksi hypokloriittiliuoksella, ja huuhdella vedellä. Tarkat työskentelytavat ja -ohjeet PCR-tiloissa ovat tärkeitä kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. (Nukleiinihappojen monistus: Työskentelytavat ja tilat. 2010.)

Pre-PCR-tilassa käytetään aina erillisiä työvaatteita ja suojakäsineitä, joilla suojataan sekä itseä että näytteitä. Työvaatteet ja käsineet vaihdetaan heti, jos epäillään kontaminaatiota reagenssien tai näytteiden kanssa tai vaatteet tai käsineet ovat näkyvästi likaiset. Tilaan kuljetaan erillisen sulun kautta, jonka ovia ei saa pitää yhtä aikaa auki. Tällä suojellaan tilaa ulkoiselta kontaminaatiolta. Pre-PCR-tilassa tehdään näyteputkien käsittely ja DNA:n eristys. Lisäksi tiloissa säilytetään testattavia näytteitä ja PCR-reagensseja. Tilat tulisi jakaa useampaan työpisteeseen. DNA:n eristykselle, reagenssien jakamiselle ja reaktion pystytykselle tulisi olla omat pöydät tai laminaarit. Tilassa ei saa tehdä mitään PCR-tuotteiden analyysiä tai käsittelyä. Post-PCR-tilasta ei saa tuoda mitään pre-PCR-tilaan. (Nukleiinihappojen monistus: Työskentelytavat ja tilat. 2010.)

Post-PCR-tilassa tehdään varsinainen PCR-tuotteen analyysi ja jatkokäsittelyt. Tilassa täytyy olla hyvä ilmastointi sekä mielellään lievä alipaine. (Nukleiinihappojen monistus: Työskentelytavat ja tilat. 2010.)

7 Toteutus

Projektissa käytettiin potilasnäytteistä eristettyä DNA:ta. SPR Veripalvelun työntekijät olivat keränneet serologisesta ABO-veriryhmämäärityksestä epäselväksi jääneitä EDTA-näytteitä valmiiksi, koska niitä tulee tutkittavaksi suhteellisen harvoin. Näytteitä kertyi kaiken kaikkiaan 26. Näytteet nimettiin kirjaimin ja numeroin (ABO1, ABO2, ABO3...ABO26), ettei potilastietoja tarvinnut käyttää näytteiden identifioimiseen.

Näytteistä eristettiin DNA valmiiksi työn suoritusta varten ja niistä mitattiin pitoisuus ja puhtaus. Opinnäytetyössä käytettävien näytteiden DNA:t eristettiin kokoverestä QIASymphony®-eristyslaitteella. Eristyksessä käytettiin The QIASymphony DSP DNA Midi Kit -reagenssia. Aluksi laite pipetoi näytekyvetteihin lyysausliuoksen ja kokoverinäytteet. Lyysausliuos hajottaa solut, jolloin DNA vapautuu valkosolujen rikkoutuessa. Tämän jälkeen eristyslaite lisää näytekyvetteihin magneettipartikkeliliuoksen ja alkoholin. Alkoholi kiinnittää DNA:n magneettipartikkelien pinnalla olevaan silikakalvoon. Näytteitä pestään pesupuskureilla useampaan kertaan ylimääräisten solujätteiden poistamiseksi. Viimeisessä vaiheessa DNA irrotetaan magneettipartikkeleista ja eluoidaan ATE-Bufferiin. (QIASymphony DSP DNA. 2012.) DNA:n puhtaus ja pitoisuus mitattiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrillä. DNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280}) tulisi olla 1,8 – 2,0. Lisäksi laite ilmoittaa DNA-pitoisuuden ng/μl. (NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3,7 User's Manual. 2008.)

Osassa näytteistä mutaatio on jo tiedossa, koska ne on tutkittu jo aiemmin ulkomaisessa laboratoriossa Ruotsissa tai Saksassa. Näiden näytteiden avulla tutkittiin menetelmän luotettavuutta, kun verrattiin saatua tulosta aiempaan tulokseen. Lisäksi kriteerinä käyttöönotolle on, että uusintojen määrä pysyy alle 10 prosentissa, mikäli ensimmäisestä määrittämisestä ei saada tulosta. Menetelmän tulee olla myös helppokäyttöinen, jotta se voidaan ottaa rutiinikäyttöön. Sen täytyy myös olla turvallinen käyttää ja olla eurooppalaisten standardien vaatimusten mukainen eli CE-merkitty. Tässä työssä käytetyt SSP-reagenssipakkaukset ovat CE-merkittyjä.

Toteutuksessa käytettiin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkausta. Tulosten tulkintakaavio (Liite 1) tulostettiin Inno-Trainin Internet-sivuilta. Tulkintakaaviossa täytyy ehdottomasti olla sama eränumero eli LOT-numero kuin reagenssipakkauksessa. Reagenssipakkauksessa on kahdeksan näytepaikkaa, joissa jokaisessa on tietyt alukkeet. Alukkeiden avulla tunnistetaan tietyt yleisimmät ABO-veriryhmän alatyypit. Työ toteutettiin reagenssipakkauksen mukana olevan ohjeen ja SPR Veripalvelun PCR-SSP -menetelmäohjeen mukaan. Näytteiden DNA-pitoisuudet ja puhtaudet kirjattiin ylös SPR Veripalvelun potilastietojärjestelmästä. Näytteet kerättiin valmiiksi pakastamista yhteen telineeseen pre-PCR-tilan jääkaappiin ja tarkistettiin henkilötiedot oikeiksi. Näytteet nimettiin uudelleen (ABO1, ABO2, ABO3...ABO26) niin, että henkilötietoja ei ollut näkyvillä.

PCR-seokseen pipetoitiin valmista PCR-mixiä, joka tulee reagenssipakkauksen mukana, kylmässä säilytettävää DNA Polymerase AmpliTaq-entsyymiä, steriiliä vettä ja puhdasta eristettyä DNA:ta. Ensimmäiset neljä näytettä analysoitiin DNA-pitoisuudella 20 ng/μl, neljä näytettä pitoisuudella 10 ng/μl ja loput näytteet pitoisuudella 15 ng/μl. DNA:ta laimennettiin veteen, jotta lopputuloksena nähtävät tulokset eli ethidiumbromidilla värjätyt monistumistuotteet geelillä olivat selkeitä. Jos pitoisuus on liian suuri, juosteet ovat liian paksuja eivätkä ne ole tarkkarajaisia. Lisäksi liian suuri DNA-pitoisuus voi aiheuttaa niin sanottuja "haamujuosteita", eli ne eivät ole todellisia PCR-tuotteita vaan epäspesifistä monistumista.

Valmis PCR-seos pipetoitiin kuoppalevylle. Kuoppalevyn päälle laitettiin korkit ja reagenssipakkaukset siirrettiin PCR-laitteeseen. Laitteeseen on valmiiksi ohjelmoitu PCR-ohjelma monistamista varten reagenssipakkauksen ohjeen mukaan (Taulukko 4). PCR-ohjelman aikana tehtiin valmiiksi 2-prosenttinen agarosigeeli monistustuotteiden erottelua varten. Agarosigeeliin sekoitettiin ethidiumbromidia, joka värjää monistustuotteet UV-valolla näkyviksi. PCR-ohjelman jälkeen agarosigeeli siirrettiin elektroforeesialtaaseen ja näytteet pipetoitiin monistuslevyltä agarosigeelin näytepaikkoihin. Erottelussa käytetään TBE:tä puskurina. Geelille pipetoitiin näytteiden lisäksi molekyylipainomarkkeri, jonka avulla voidaan arvioida monistustuotteiden koko. Näytteet eroteltiin 200 voltin jännitteellä viidentoista minuutin ajan. Erottelun aikana monistustuotteet liikkuvat tietyn matkan geelillä. Painavat eli pidemmät monistustuotteet ehtivät kulkea lyhyemmän matkan kuin kevyet eli lyhyemmät. Pidemmissä monistustuotteissa on enemmän emäspareja (base pair = bp) kuin lyhyemmissä.

Erottelun jälkeen geeleistä otettiin kuvat UV-valossa. Kuvat siirtyivät automaattisesti tietokoneelle, josta ne tulostettiin paperille. Paperitulosteet kiinnitettiin tulkintakaaviopaperiin, jossa merkitsevien monistustuotteiden pituudet on kerrottu. Monistustuotteiden kooka verrattiin molekyylipainomarkkeriin, joka pipetoitiin aina geelille näytepaikkaan 1 (Kuvio 5). Jos jostakin näytepaikasta on monistunut sen kokoinen tuote, joka on tulkintakaaviossa ilmoitettu merkitseväksi (eli selkeäksi tulokseksi), tutkittavassa näytteessä on mutaatio, jota kyseinen näyte ilmentää.

Taulukko 4. Opinnäytetyössä käytetty PCR-ohjelma. Touch Down -periaate. (menetelmäohje)

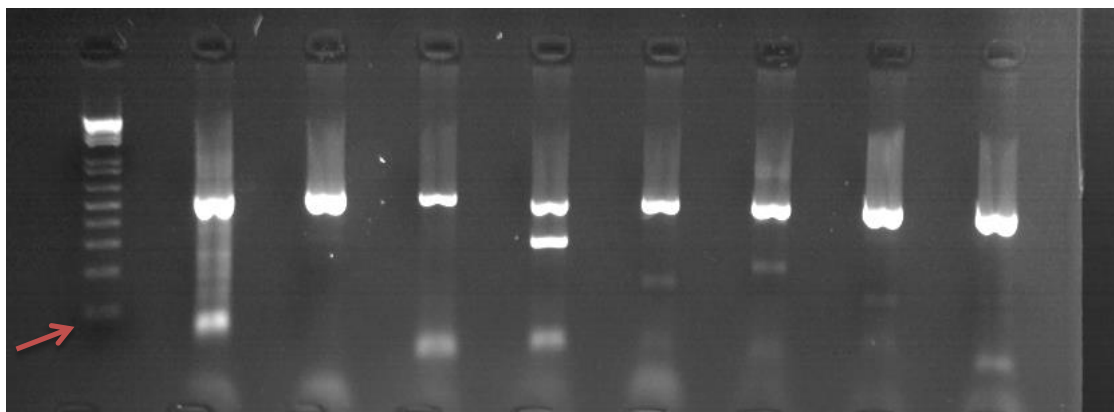
| |
|---|
| 94 °C, 2 min |
| 94 °C, 20 sek; 70 °C, 1 min (5 sykliä) |
| 94 °C, 20 sek; 65 °C, 1 min; 72 °C, 45 sek (10 sykliä) |
| 94 °C, 20 sek; 61 °C, 50 sek; 72 °C, 45 sek (20 sykliä) |
| 72 °C, 5 min |
| 4 °C, ∞ |

Opinnäytetyössä käytetty PCR tehtiin touchdown-periaatteella. Touchdown-periaate on toimiva, sillä menetelmässä on useita alukepareja ja niiden tarttumislämpötilat eroavat toisistaan, mikä vaikeuttaa monistamista. Denaturaatio- ja monistamislämpötilan lisäksi ohjelmassa on kolme eri inkubaatiolämpötilaa alukkeiden kiinnittymisen edistämiseksi (70 °C, 65 °C ja 61 °C). Lämpötilat tehostavat spesifisten alukkeiden tarttumista ja monistumista. Kun inkubaatiolämpötilaa lasketaan asteittain alkaen 70 °C:sta, alukkeet pääsevät helpommin tarttumaan. Kun mallina on jo monistettua, haluttua DNA-juostetta, epäspesifistä monistumista ei tapahdu kovinkaan paljoa. (Haimila 2014.)

Toteutukseen oli varattu kaksi viikkoa aikaa. Näytteiden analysointiin kului viikko. Näytteet analysoitiin muutaman näytteen sarjoissa. Yhden sarjan analysointiin kului useita tunteja. Toinen viikko kului tulosten tulkintaan ja raportointiin.

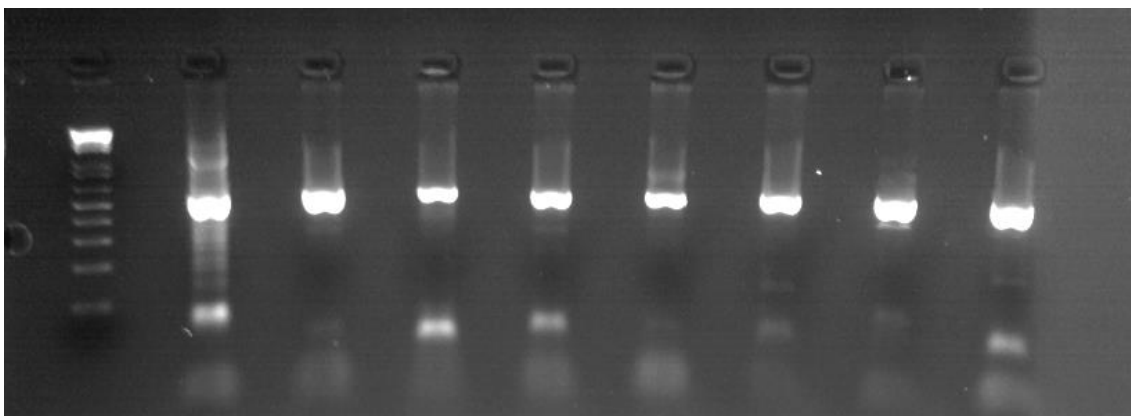
8 Tulokset

Käytännön toteutuksen aikana todettiin, että menetelmä ei tunnista suomalaisille tyypillisimpiä ABO-veriryhmän alatyyppejä. 26 näytteestä yhdestä saatiin selkeä tulos eli tarkka ABO-veriryhmän alatyyppejä (Kuvio 5). Kyseinen näyte on tutkittu myös ulkomailla, ja tulos oli sama kuin nyt tehdyssä määrittämisessä. Tästä näytteestä tehtiin käytännön toteutuksen aikana rinnakkaismäärittäminen eli se tutkittiin kahteen kertaan, jotta pystyttiin testaamaan menetelmän toistettavuutta. Molemmilla tutkimuskerroilla saatiin sama tulos, eli menetelmä on toistettava tämän yhden näytteen tulosten perusteella.

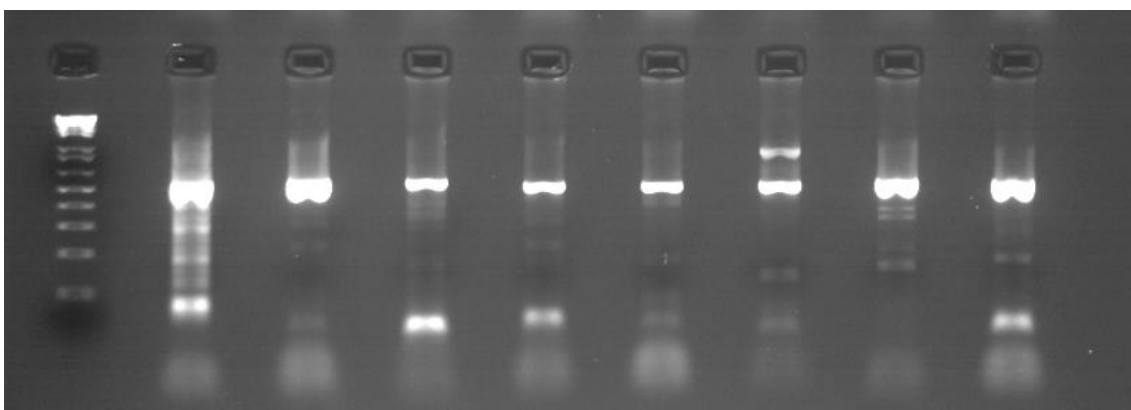


Kuvio 5. Ainoa näyte, josta saatiin selkeä tulos (näytepaikassa 5), vastaa tulkintakaaviossa ilmoitettua merkitsevää juosteen kokoa. Ensimmäisessä näytepaikassa on molekyyli-painomarkkeri. Nuolen osoittamassa kohdassa koko on 100 bp. Muissa näytepaikoissa näkyy reagenssipakkauksen sisäiset positiiviset kontrollit (540bp).

Muista 25 näytteestä ei tullut selkeitä tuloksia, eli näytteistä ei saatu selville tarkkaa ABO-veriryhmän alatyyppeä. Kuvissa näkyi haamujuosteita (Kuvio 6) eli hailakoita monistustuotteita. Haamujuosteet voivat johtua esimerkiksi siitä, että DNA-pitoisuus on liian korkea ja tapahtuu epäspesifistä monistumista. Kuvissa näkyy myös niin sanottuja primer-dimereita (Kuvio 7), eli alukkeet ovat kiinnittyneet toisiinsa, ja tästä seuraa hailakka tai heikko juoste, joka ei kuitenkaan ole merkitsevä monistustuote eli näytteestä saatava tulos. Primer-dimerit voivat muodostua menetelmässä silloin, kun alukkeet eivät tunnista DNA:sta oikeaa tarttumiskohtaa eli kyseisessä näytteessä ei ole mutaatiokohtaa, joten alukkeet alkavat tarttua toisiinsa.



Kuvio 6. Näytepaikoissa (esim. 2, 5, 7 ja 9) näkyy haamujuosteita eli epäspesifistä monistumista.



Kuvio 7. Näytepaikoissa 2,4,5 ja 9 näkyy primer-dimereita, jotka ovat aina alle 100bp. Näytepaikassa 7 on epäspesifistä monistumista. Monistustuote olisi merkitsevä, jos sen koko olisi kyseisellä näytepaikalla 134bp. Sisäiset kontrollit ovat kokoa 540bp.

9 Laadun ja luotettavuuden arviointi

Opinnäytetyön tekijät perehtyivät SSP-menetelmän periaatteeseen ja toteutukseen työelämäharjoittelun aikana, jolloin perehdyttiin erityisesti SPR Veripalvelussa jo käytössä oleviin muihin kuin ABO Subtype Inno-Trainin menetelmiin ja SSP-menetelmän luotettavuuden ja laadun arviointiin. Työelämäohjaaja arvioi tekijöiden perehdytyksen riittävy-

den. Työ toteutettiin noudattamalla SPR Veripalvelun PCR-SSP-menetelmäohjetta ja soveltamalla Inno-Trainin reagenssipakkauksen mukana tullutta ohjetta. Inno-Trainin ohjeesta poikettiin monistustuotteiden erottelun keston ja DNA-pitoisuuden osalta. Käytettäessä muita Inno-Trainin reagenssipakkauksia on huomattu, että ohjeessa kerrottu DNA-pitoisuus (25–30 ng/μl) on aivan liian vahva, joten on päädytty käyttämään pitoisuutta 20 ng/μl rutiinisti. Työssä käytettiin ensimmäisten neljän näytteen analysointiin pitoisuutta 20 ng/μl. Juosteista tuli todella vahvoja ja epäselviä, joten pitoisuutta laskettiin osassa näytteistä 15 ng/μl:aan ja osassa 10 ng/μl:aan. Eri DNA-pitoisuuksilla analysoidujen näytteiden juosteiden vahvuudet eivät eronneet merkittävästi toisistaan. Juosteiden vahvuutta arvioitiin sisäisten kontrollien avulla. Työssä päädyttiin käyttämään suurimassa osassa analyysijä DNA-pitoisuutta 15 ng/μl.

Reagenssipakkauksen sisäiset kontrollit monistuivat selkeästi. Tästä voidaan päätellä, että pipetointi on onnistunut hyvin, PCR-ohjelma on sopiva kyseiselle menetelmälle, ja monistustuotteiden erottelu on onnistunut. Positiivisten kontrollien monistuminen kertoo myös itse menetelmän toimivuudesta. Mikäli sisäiset kontrollit eivät monistu, tuloksiin ei voida luottaa. Tällöin todennäköisesti jokin työvaihe on epäonnistunut tai reagenssipakkaus on viallinen. Sisäisten kontrollien lisäksi jokaiselle näytteelle tehtiin negatiivinen kontrolli. Negatiivisiin kontrollinäytepaikkoihin (erilliset, yksittäiset näytepaikat) pipetoitiin PCR-seosta, johon ei ollut vielä lisätty DNA:ta. Lisäksi kontrollinäytepaikkaan lisättiin vettä näytteen sijaan, jotta saatiin pidettyä seoksen tilavuus samana. Negatiivisen kontrollin tarkoituksena on varmistaa, että menetelmässä käytetty PCR-seos ja vesi eivät ole kontaminoituneet DNA:lla. Negatiiviset kontrollit onnistuivat hyvin käytännön osuudessa eikä niiden osalta ollut havaittavissa monistumista.

Työn laatua arvioitiin jokaisessa työvaiheessa kriittisesti, ja suorituksessa olivat mukana molemmat opinnäytetyön tekijät. Kun toinen tekijöistä laski PCR-seokseen tarvittavien aineiden tilavuudet ja pipetoi ne menetelmässä käytetyn kuoppalevyn näytepaikkoihin, toinen tekijöistä tarkasteli, että kaikki vaiheet tehtiin oikein ja tarkasti. Geelijossa on todella tärkeää, että näytteet pysyvät oikeassa järjestyksessä, koska geeliin ei voi merkitä, mikä näyte on missäkin kohdassa. Työntekijän on hyvä keksiä itselleen muistisääntö tai järjestys, jonka avulla hän itse tietää koko ajan näytteiden paikat geelillä. Tämä korostuu erityisesti silloin, kun ajetaan kaksi geeliä samaan aikaan samassa elektrofooresialtaassa.

Luotettavuutta heikentää se, että kaikista opinnäytetyössä käytetyistä näytteistä ei ole vertailutulosta. Jos kaikki näytteet olisi tutkittu jo aiemmin, käytännön osuudessa saatuja tuloksia olisi voitu verrata aiempiin tuloksiin. Tässä tapauksessa ei voida tietää varmasti, onko käytännön suorituksessa saatu tulos oikea. Kuitenkin ainoa näyte, josta saatiin positiivinen tulos, oli tutkittu jo aiemmin, ja tulokset vastasivat toisiaan. Tästä näytteestä tehtiin myös rinnakkaismääritys menetelmän toistettavuuden varmistamiseksi. Rinnakkaismääritysten tulokset vastasivat toisiaan, eli menetelmä on toistettava.

10 Pohdinta

Opinnäytetyön perusteella voidaan todeta, että Inno-Trainin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus ei ole sopiva käytettäväksi suomalaisten ABO-veriryhmän alatyyppejen genotyyppitysmenetelmässä eikä sitä oteta käyttöön SPR Veripalvelussa. Menetelmä ei tunnista yleisimpiä suomalaisten ABO-veriryhmän alatyyppejä. ABO-veriryhmän alatyyppejä on olemassa noin 300, joista menetelmä tunnistaa vain noin 16. Yleisimmät suomalaiset ABO-veriryhmän alatyypit sattuvat olemaan muita, kuin tämän menetelmän tunnistamia variantteja. Suomalaisten yleisimmät ABO-veriryhmän alatyypit täytyisi selvittää ensin muulla tavoin, jotta voitaisiin tietää, mitkä alatyypit ovat suomalaisessa väestössä yleisimpiä ja mikä menetelmä olisi kannattava ottaa käyttöön.

Työn eettisyyttä ajatellen näytteitä analysoitaessa niiden identifioimiseen ei käytetty potilastietoja. Näytteet nimettiin uudelleen kirjain- ja numeroyhdistelmillä. Näin ollen näytteitä ei voida yhdistää yhteenkään henkilöön. Lisäksi työn osalta kirjoitettiin salassapito- ja vaitiolosopimus.

Menetelmän luotettavuudesta ei voida olla täysin varmoja, koska näytteistä puuttuivat vertailutulokset. Osa näytteistä lähetettiin tutkittavaksi ulkomaille, mutta niistä ei ehtinyt tulla vastauksia, joihin olisi voitu verrata tässä työssä saatuja tuloksia. Sisäisten kontrollien onnistuminen ja se, että yhdestä näytteestä saatu selkeä tulos saatiin kahdella eri analysointikerralla kuitenkin puoltavat menetelmän luotettavuutta ja toistettavuutta. Lisäksi menetelmä on käytössä muissa maissa, joissa se on todettu toimivaksi.

Menetelmää yritettiin optimoida muuttamalla DNA-pitoisuutta, kun huomattiin sen olevan liian vahva. Tästä ei kuitenkaan ollut merkittävää hyötyä. Sisäiset kontrollit olivat vahvoja

ja haamujuosteita ja primer-dimereita muodostui kaikilla DNA-pitoisuuksilla. Jos aika olisi riittänyt, olisi voitu testata myös muiden olosuhteiden muuttamisen vaikutusta tuloksiin. Olisi voitu testata esimerkiksi sitä, vaikuttaako näytteiden ja PCR-seoksen pipetointi kylmäalustalla juosteiden muodostumiseen. Myös PCR-ohjelman muuttamista olisi voitu testata. Kuitenkin kaikki työvaiheet on optimoitu muiden Inno-Trainin menetelmien mukaan.

Inno-Trainin RBC-Ready Gene ABO Subtype -reagenssipakkaus olisi ollut käytännöllinen ja helppo menetelmä, koska SPR Veripalvelussa on jo käytössä Inno-Trainin muita samalla periaatteella toimivia menetelmiä. Menetelmä on työntekijöille ennestään tuttu, eikä käyttöönotto olisi vaatinut laajaa erillistä perehdytystä. Menetelmä on todettu helpokäyttöiseksi, ja työn laatu pysyy samana riippumatta siitä, kuka työn tekee. Koska reagenssipakkausta ei oteta käyttöön, SPR Veripalvelussa jatketaan epäselvien veriryhmien tutkimista serologisesti entiseen tapaan ainakin toistaiseksi. Olisi kuitenkin tärkeää saada lähitulevaisuudessa SPR Veripalveluun jokin menetelmä ABO-veriryhmän alatyypien tarkkaan selvittämiseen, koska ulkomaille sekvensointiin lähetettyjen näytteiden tulosten saaminen kestää jopa useita viikkoja. Jos RBC-Ready Gene ABO Subtype -menetelmällä olisi voitu tunnistaa suomalaisten yleisimmät ABO-veriryhmän alatyypit, tulokset olisi saatu jo muutamassa päivässä.

SPR Veripalvelun kriteerinä menetelmien käytölle on, että niiden tulee olla CE-merkittyjä. CE-merkintä velvoittaa noudattamaan valmistajan antamia ohjeita. Jos huomataan, että menetelmän käytössä on ongelmia, voidaan menetelmää optimoida itse, mutta silloin on validoinnilla osoitettava menetelmän toimivuus. Esimerkiksi Inno-Trainin ohjeessa mainittu DNA-pitoisuus on todettu liian vahvaksi, joten SPR Veripalvelu on optimoinut menetelmän sopivammaksi pienentämällä DNA-pitoisuutta.

Yhtenä vaihtoehtona tulevaisuudessa ABO-veriryhmän alatyypien tunnistamiseen on sekvensointi, jolla saadaan selvitettyä DNA:n tarkka emäsjärjestys. Kaupallisesti ei ole saatavilla CE-merkittyä menetelmää ABO-sekvensointiin, joten sekvensoinnin käyttöönotto vaatisi validoinnin, joka on paljon työtä ja aikaa vaativa prosessi.

Lähteet

A:n alaryhmien A₁ ja A₂ määrittäminen geelitekniikalla. 2012. Painos 1. Menetelmäohje. SPR Veripalvelu. Päivitetty 31.1.2012. Luettu 16.10.2014.

ABO/D + Reverse Grouping. 2014. Bio-Rad. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-rad.com/en-uk/product/abod-reverse-grouping>>. Luettu 23.10.2014.

Absorptio-eluaatio heikon A-/B-antigeenin osoittamiseksi. 2008. Painos 2. Menetelmäohje. SPR Veripalvelu. Päivitetty 20.4.2008. Luettu 23.10.2014.

Criswell, Daniel 2008. ABO Blood and Human Origins. Institute for Creation Research. Artikkel. <<http://www.icr.org/article/abo-blood-human-origins/>>. Luettu 21.10.2014.

Gassner, C. - Schmarda, A. - Nussbaumer, W. - Schonitzer, D 1996. ABO glycosyl-transferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. Blood®. American Society of Hematology. Artikkel. <<http://www.bloodjournal.org/content/88/5/1852.long?sso-checked=true>>. Luettu 08.10.2014.

Goebel, Meike – Halm-Heinrich, Ines – Parkner, Andreas – Rink, Gabriele – Heim, Marcell U. – Bugert, Peter 2013. A Novel ABO Gene Variant Leads to discrepant Results in Forward/Reverse and Molecular Blood Grouping. Transfusion Medicine and Hemotherapy. Artikkel. <<http://www.karger.com/Article/Pdf/356378>>. Luettu 21.10.2014.

Haimila, Katri 2014. Laboratorioasiantuntija. SPR Veripalvelu. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 22.10.

Hiippala, Seppo 2004. Veri- ja plasmavalmisteiden käyttö akuutin verenvuodon hoidossa. Duodecim. Artikkel. <http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo94209&_dlehti-haku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=>>. Luettu 1.10.2014.

Juvonen, Eeva – Sareneva, Inna – Krusius, Tom 2013. Verensiirtovalmisteita täsmälliseen verensiirtotarpeeseen. Katsaus. Suomen Lääkärilehti 49/2013 vsk 68. <http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/2013/nosto49_1.pdf>. Luettu 12.08.2014.

NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. 2008. Thermo Scientific. Käyttöohje. <<http://nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>>. Luettu 10.9.2014.

PCR. 2009. Warwick. Verkkodokumentti. Päivitetty 20.3.2014. <<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/arodger/arodgergroup/people/msrhab/research/pcr/>>. Luettu 8.10.2014.

QIASymphony® DSP DNA Handbook. 2012. Version 1. Qiagen®.

RBC-Ready Gene. Version 2.7. Inno-Train. Menetelmäohje.

Reid, Marion E. – Lomas-Francis, Christine 2004. The blood group antigen. Facts book. London: Elsevier.

Salonen, Jenna 2014. Anemia (alhainen hemoglobiini). Duodecim. Artikkel. Päivitetty 13.8.2014. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00006>. Luettu 1.10.2014.

Ségurel, Laure – Thompson, Emma E. – Flutre, Timothée – Lovstad, Jessica – Venkat, Aarti – Margulis, Susan W. – Moyse, Jill – Ross, Steve – Gamble, Kathryn – Sella, Guy – Ober, Carole – Przeworski, Molly 2012. The ABO blood group is a trans-species polymorphism in primates. Cornell University Library. Artikkel. <<http://arxiv.org/abs/1208.4613>>. Luettu 29.9.2014.

Syövän tukihoito. 2010. Pfizer. Verkkodokumentti. <<http://www.syopainfo.fi/syovan-hoito/syovan-tukihoito.html>>. Luettu 15.09.2014.

Walker, John M. – Rapley, Ralph 2008. Molecular Biomethods Handbook. Humana Press. Käsikirja. <http://www.lvapli.ufsc.br/site/arquivos/7170_Molecular%20Biomethods.pdf>. Luettu 21.8.2014.

Veren osat ja niiden tehtävät. 2014. SPR Veripalvelu. Verkkodokumentti. Päivitetty 18.3.2014. <<http://www.veripalvelu.fi/www/3452>>. Luettu 6.10.2014.

Verensiirto-opas 2006. Hellstén, Soile (toim.). 3. painos. Kerava: Suomen Kuntaliitto.

Verivalmisteiden käytön opas 2013. 2013. Krusius, Tom – Juvonen, Eeva – Meriläinen, Katja (toim.). Libris Oy. Verkkojulkaisu. <http://extranet.libris.fi/proweb/Verivalmisteiden_kayton_opas_2014_1/>. Luettu 15.9.2014.

Yamamoto, Fumi-ichiro - Clausen, Henrik - White, Thayer - Marken, John - Hakomori, Sen-itiroh 1990. Molecular Genetic Basis of the Histo-Blood Group ABO System. Nature. Artikkel. <<http://www.nature.com/nature/journal/v345/n6272/pdf/345229a0.pdf>>. Luettu 13.10.2014.

RBC-Ready Gene ABO Subtype



LOT S9ST024



2015-12

Arbeitsprotokoll / PCR Protocol

Test-Durchführung / Test-Performance

18.9.14
Datum / DatePAP/AN
Unterschrift / Signature

ABO22 (2.090)

Bemerkungen / Comments

| Probe / Sample | | | |
|----------------|---|---|----|
| 1 | 4 | 7 | 10 |
| 2 | 5 | 8 | 11 |
| 3 | 6 | 9 | 12 |

Methodenablauf und Pipettier Volumina der Einzelkomponenten für ein PCR-Reaktionsgefäß sind in allen RBC-Ready Gene und HPA-Ready Gene kits.
Test procedure and pipetting volumina for one well are the same in all RBC-Ready Gene and HPA-Ready Gene kits.

1.) Mastermix (MM) ansetzen, gut mischen / Pipette mastermix (MM), mix well

| | Volume per well [µl] | typing (8+3* wells) [µl] | Multipliziert mit der Anzahl an Bestimmungen / multiplied by the number of typings | Endvolumen / Endvolume [µl] |
|------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------------|
| Aqua dest. | 6 | 66 | X | = |
| ReadyPCR | 3 | 33 | X | = |
| Taq-Polymerase (5U/µl) | 0,08 | 0,9 | X | = |
| Endvolume MM | 9,08 | 99,9 | X | = |

* 3 wells extra volume

Bei Mitführen einer **Negativkontrolle** (NK) 10 µl MM in das NK-Reaktionsgefäß übertragen /
When testing a **Negative Control** (NC) pipette 10 µl of MM into a NC reaction tube

2.) Aliquote 90 µl MM in 1,5 ml Tubes (je nach Anzahl der Bestimmungen / dependent on number of typings)

3.) Proben DNA zugeben, gut mischen / Add sample DNA, mix well

| | Volume per well [µl] | typing (8+2* wells) [µl] |
|-------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Mastermix (MM) | 9 | 90 |
| DNA (25-50 ng/µl) | 1 | 10 |
| Endvolume MM-DNA | 10 | 100 |

* 2 wells extra volume

4.) Je 10 µl MM-DNA pro well in PCR Streifen verteilen (Mix 1 ist schwarz markiert) /

Dispense 10 µl MM-DNA per well (8x) in PCR strip (mix 1 in black marked well).

5.) PCR Gefäße mit Deckelstreifen dicht schließen und in Thermozykler übertragen /

Close wells tightly with tube caps and place the strip into the thermocycler.

6.) PCR im Thermozykler starten (PCR Programm siehe Gebrauchsinformation) /

Start PCR in thermocycler (PCR program see user manual)

RBC-Ready Gene ABO-Subtype

Protocol for Documentation



Date:

| Reaction No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|---|----------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------|---|
| PCR-Product (Size in bp) | 144 220 375 | 226 312* | 151 264 | 223 315 | 122 176 | 134 | 157 # | 135 178 223 |
| Specificity | Aw04 Aw11 Bw03 Ael02 Ax01 Ax04 B302 Bw19 O45 Aw08 O50 | Aw07 Aw06 Bel03 O55 | Bw20 A302 | O14 Ael01 Oo8 | O15 A301 Bx01 | cis-AB01 B(A)01 B(A)03 Bel04 | Aw13 | Aw05 A205 Ax10 O23 A202 A203 B301 |
| Aw04 / Aw11 / Bw03 | 144 | - | - | - | - | - | - | - |
| Ael02 / Ax01 / Ax04 B302 / Bw19 / O45 | 220 | - | - | - | - | - | - | - |
| Aw08 / O50 | 375 | - | - | - | - | - | - | - |
| Aw07 | - | 226 | - | - | - | - | - | - |
| Aw06 / Bel03 / O55 | - | 312* | - | - | - | - | - | - |
| Bw20 | - | - | 151 | - | - | - | - | - |
| A302 | - | - | 264 | - | - | - | - | - |
| O14 | - | - | - | 223 | - | - | - | - |
| Ael01 / Oo8 | - | - | - | 315 | - | - | - | - |
| O15 | - | - | - | - | 122 | - | - | - |
| A301 / Bx01 | - | - | - | - | 176 | - | - | - |
| cis-AB01 / B(A)01 B(A)03 / Bel04 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Aw13 | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Aw05 | - | - | - | - | - | - | - | 135 |
| A205 / Ax10 | - | - | - | - | - | - | - | 178 |
| A203 / A202 / O23 / B301 | - | - | - | - | - | - | - | 223 |
| Result: | | | | | | | | |

The positive sign (+) marks the appearance and the negative sign (-) marks the absence of a specific DNA fragment.

You can enter the band pattern of the current sample in the last lane.

A-specific alleles are indicated by a single band in each "non-reaction" of RBC-Ready Gene ABO. Since only a selection of variant alleles can be detected by RBC-Ready Gene ABO Subtype, other variant A alleles can be hidden behind the PCR result "A". For separation of the alleles mentioned together in one column, the results of RBC-Ready Gene ABO should be regarded (see extra table).

The size of the internal control in all reaction mixes is 540 bp.

You will find closer explanations in the product insert.

*This band appears occasionally weak.

This mix tends to show sometimes a background band. The true positive reaction can be clearly distinguished by its intensity.

RBC-Ready Gene ABO-Subtype
Protocol for Documentation

LOT S9ST024



2015-12

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| Gel Picture: | Notes: ABO 22 |
| | Result: |
| | Signature: POP / AVI |

22
18.9.14