

Niina H. Pylkki

# Raskaudenaikaisen anti-G-vasta-aineen (Rh) erottaminen anti-DC-vasta-aineyhdistelmästä (Rh) absorptioeluaatiomenetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Terveys- ja hoitoala

Bioanalyytikko

Opinnäytetyö

13.4.2015

## Alkusanat

Opinnäytetyö on kuin purjehdus, päämäärä häämöttää jossain kaukana. Tietää että on maltettava silloinkin, kun tuuli ei ole myötäinen. Hyvällä tuulella mennään varmasti ja kovaa, välillä ollaan eksyksissä ja laineet heittelevät eikä aina muista missä se määränpää olikaan. Toisinaan myrskyä, on annettava meren raivota ja kuohujen kastella posket. Ja taas on tehtävä kaikkensa löytääkseen suojaisan rannan.

Sitä suojaista rantaa ei olisi löytynyt ilman ohjausta ja kaikkea sitä kannustusta mitä minulle tämän matkan varrella suotiin. Haluan osoittaa lämpimän kiitokseni Suomen Punaisen Ristin Veripalvelulle ja Veriryhmätutkimusten laboratoriohenkilökunnalle. Oli ilo tehdä tätä opinnäytetyötä joukossanne. Suuri kiitos kuuluu myös Anna Kärkkäiselle, opponointiparilleni vilpittömästä vertaistuestasi. Erityiskiitoksen osoitan opinnäytetyöni ohjaajille, filosofian maisteri, laboratorioasiantuntija Anu Korhoselle sekä lehtori Irma Niittymäelle. Työ muovautui Teiltä saamani positiivisen kritiikin ja asiantuntemuksenne avulla sellaiseksi kun se nyt valmiina on.

Tämä opinnäytetyö ei olisi myöskään valmistunut ilman rakkaan perheeni ja läheisteni tukea. Haluan eritoten kiittää aviopuolisoani Karia kärsivällisyydestäsi ja jatkuvasta kannustuksesta ja siitä, ettet lakannut uskomasta minuun vaikka itselläni meinasi välillä usko loppua.

Kantvikissa 13.4.2015

Niina Pylkki

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Niina H. Pylkki Raskaudenaikaisen anti-G-vasta-aineen erottaminen anti-DC-vasta-aineyhdistelmästä absorptioeluaatiomenetelmällä</p> <p>60 sivua + 5 liitettä 13.4.2015</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto Bioanalytiikka, AMK</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Bioanalytiikan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Lehtori Irma Niittymäki FM, Laboratorioasiantuntija Anu Korhonen</p>
<p>Sikiö perii veriryhmätekijät molemmilta vanhemmiltaan. Äidin ja sikiön veriryhmätekijöiden poiketessa toisistaan voi äidin immuunijärjestelmä aktivoitua tuottamaan vasta-aineita sikiön isältään perimiä punasolujen pintarakenteita kohtaan. Suurimman osan raskaudenaikaisista immunisaatioista aiheuttaa Rh-vasta-aine anti-D. Se on tärkein vastasyntyneen hemolyyttistä tautia aiheuttava punasoluvasta-aine ja suurimmassa immunisaatoriskissä ovat ne RhD-negatiiviset äidit, jotka synnyttävät RhD-positiivisen lapsen. Koska G-antigeenin tiedetään olevan harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta läsnä lähes kaikissa D- ja C-antigeenin suhteen positiivisissa punasoluissa, on sitä vastaan muodostuvan anti-G-vasta-aineen todettu häiritsevän RhD-negatiivisten äitien vasta-ainetunnistuksia.</p> <p>Opinnäytetyön empiirinen osuus toteutettiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa, Veriryhmätutkimusten laboratoriossa. Työtä varten oli kerätty potilas- ja neuvolanäytteitä, joista anti-G-vasta-aine erotettiin alloabsorptiomenetelmää käyttäen. Happoeluaatiolla punasolun pintaan kiinnittyneet punasoluvasta-aineet irrotettiin happamaan puskuriiin, josta ne osoitettiin vasta-ainetunnistuksella. Vasta-aineet tunnistettiin ID-geelitekniikkaa käyttäen ja vasta-ainepitoisuudet määritettiin titraamalla. Kontrollisolut oli käsitelty papaiinilla.</p> <p>Tavoitteena oli ottaa käyttöön menetelmä, jolla anti-G-vasta-aine voidaan luotettavasti erottaa anti-DC-vasta-aineyhdistelmästä. Oli myös tarpeen selvittää kriteerit, jotka herättivät epäilyn anti-G-vasta-aineesta ja laimeneeko vasta-ainepitoisuus absorptiokäsittelyn aikana.</p> <p>Absorptiolla punasoluvasta-aineet voitiin erottaa toisistaan ja eluaatiolla absorption tulos pystyttiin varmistamaan. Kun kyseessä oli anti-G-vasta-aine, tulokset osoittivat että C-positiiviset solut reagoivat D-positiivisiä soluja vahvemmin. Vasta-ainepitoisuuksien ei myöskään todettu laimenevan merkittävästi absorption aikana. Johtopäätöksenä vahvojen vasta-aineiden kohdalla todettiin, että absorptiota voidaan tarvittaessa jatkaa, koska sen ei todettu heikentävän merkittävästi vasta-ainepitoisuuksia. Anti-G-vasta-ainetta voidaan epäillä, jos anti-D- ja anti-C-vasta-aineiden osalta todetaan samankaltaiset titterit. Kontrollisoluina tullaan jatkossa käyttämään entsyymillä käsittelemättömiä soluja.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>anti-G, anti-D, punasoluvasta-aine, alloabsorptio, happoeluaatio, sikiön- ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti, raskausimmunisaatio, Rh-veriryhmäjärjestelmä</p>

Author Title	Niina H. Pylkki Separation of Anti-G (Rh) Antibody from the Anti-D and Anti-C- (Rh) Antibody Combination with the Absorption-Elution Method During Pregnancy
Number of Pages Date	60 pages + 5 appendices 13 April 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor	Irma Niittymäki, Senior Lecturer Anu Korhonen, MSc, Laboratory Specialist
<p>The fetus inherits blood group factors from both parents. If maternal and fetal blood group factors diverge, the mother's immune system may be activated to produce antibodies against fetal red blood cells. Most of the immunization during pregnancy cases are caused by anti-D antibody and mothers who give birth to a RhD-positive child, are at the risk of getting immunization. Since G-antigen is known to be present in almost all the D- and C-positive red blood cells, anti-G antibody has been found to interfere with the antibody detection of a D-negative mother.</p> <p>I conducted the empirical part of my study at the Blood Group Research Laboratory of the Finnish Red Cross, Blood Service. The samples for this study (n=17) were collected at a Finnish maternity welfare clinic and the patient samples. Anti-G antibody was separated with the alloabsorption method. Using the elution method, antibodies were removed into an acidic buffer. Antibodies were identified using the ID-gel technique, and antibody concentrations were determined by titration. Control cells were treated with papain.</p> <p>The purpose of my study was to design a method for the separation of anti-G (Rh) antibody from the anti-D (Rh) and anti-C (Rh) antibody combination. It was necessary to establish the criteria, of when an anti-G antibody test should be carried out and if antibody concentration was diluted during an absorption process.</p> <p>The results showed that antibodies might be separated with the absorption method and using elution method, the result might be ensured. The results showed also that when a native sample of antibody concentration was similar to the anti-D and C, anti-G antibody might be present as well. Moreover, it was found that the antibody concentration was not diluted significantly during absorption.</p> <p>The results lead to the conclusion that in the case of a strong antibody, absorption may be extended, if necessary, because the absorption does not significantly weaken antibody levels. In the future, this method may be used for control cells, which have not been treated with enzymes.</p>	
Keywords	anti-G, anti-D, red cell antibody, alloabsorption, acid elution, HDFN, alloimmunized pregnant women, Rh blood group system

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Vasta-ainevälitteinen immuniteetti	3
3	Immunisaation kannalta tärkeimmät antigeenit ja vasta-aineet	3
3.1	Geenien sijainti kromosomissa	6
3.2	Biokemiallinen rakenne	7
3.3	G-antigeeni ja anti-G-vasta-aine	8
3.4	Aikaisemmat tutkimukset anti-G immunisaatioista	9
3.5	Rh-järjestelmän veriryhmävasta-aineet	10
4	Raskaudenaikaisen veriryhmäimmunisaation syntymekanismi	12
5	Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti	13
5.1	Historiaa	14
5.2	Esiintyminen Suomessa	15
5.3	Oireet ja seuranta	16
5.4	Hoito	18
6	Raskaudenaikaisen immunisaation seulonta ja ehkäisy Suomessa	19
6.1	Rutiinimainen suojaus	20
6.2	Riskiperusteinen suojaus	21
6.3	Synnytyksen jälkeinen suojaus	21
7	Laboratoriomenetelmät Rh-vasta-aineiden tutkimiseen	22
7.1	Veriryhmäserologiset menetelmät	22
7.2	Alloabsorptio	23
7.3	Eluaatio	25
7.4	Punasoluvasta-aineiden tunnistus ID-geelitekniikalla	26
7.5	Sopivuuskoe geelitekniikalla	28
7.6	Vasta-ainetason eli titterin määrittäminen	28
7.7	Veriryhmäserologisten reaktiivoimakkuuksien arviointi	28

7.8	Menetelmien luotettavuuden arviointi ja toiminnan laatu	29
8	Opinnäytetyön toteutus ja tavoitteet	29
9	Rh-vasta-aineiden tutkiminen	31
9.1	Aineisto	31
9.2	Punasolut	32
9.3	Välineet, laitteet ja reagenssit	32
9.4	Punasolujen käsittely ennen työvaiheita	34
9.5	Työn vaiheiden kuvaus	34
9.6	Punasolujen entsyymikäsittely	35
9.7	Anti-G-plasman-absorptio	36
9.8	Happoeluaatio	37
9.9	Vasta-ainepitoisuuden määrittäminen	39
9.10	Absorption ja eluaation jälkeen tehtävät tutkimukset	41
9.11	Tulosten kirjaaminen	42
10	Tulokset	43
10.1	Reaktiot vasta-aineiden tunnistuksessa	44
10.2	Vasta-ainepitoisuuden laimenemisen arviointi	46
10.3	Esimerkkitapaus	46
10.4	Tulosten luotettavuuden arviointi	48
11	Johtopäätökset ja pohdinta	50
	Lähteet	55
	Liitteet	
	Liite 1. Alloabsorptio pikaohje	
	Liite 2. Välineet, laitteet ja reagenssit	
	Liite 3. Tulosten tulkintakaavio	
	Liite 4. Kuvalupa	
	Liite 5. Tulokset	

## Opinnäytetyössä esiintyviä käsitteitä

- ☞ antigeeni = immuunivasteen aiheuttava molekyyli
- ☞ allovasta-aine = vasta-aine, joka muodostuu elimistölle vieraalte proteiinille
- ☞ bilirubiini = punasolun hajotessa muodostuva keltainen väriaine
- ☞ coombs = suora antiglobuliinikoe
- ☞ dosage effect = annosvaikutus
- ☞ geeni = DNA-sekvenssi, joka sisältää geneettisen informaation proteiinin tuottamiseksi
- ☞ fenotyyppi = ilmiasu punasolun pinta-antigeenille
- ☞ hemolyysi = punasolun hajoaminen
- ☞ heterotsygootti = vastinkromosomin samassa lokuksessa kaksi eri alleelia
- ☞ homotsygootti = vastinkromosomin samassa lokuksessa kaksi samaa alleelia
- ☞ immunisaatio = elimistö tunnistaa vieraat veriryhmätekiöt, aiheuttaen immuunivasteen niitä kohtaan
- ☞ immunoprofylaksia = immunologista suojaa parannetaan tuomalla elimistöön antigeenejä tai vasta-aineita
- ☞ invasiivinen = elimistön sisään kajoava tutkimus
- ☞ *in vitro* = menetelmä koeputkessa
- ☞ *in vivo* = menetelmä elävässä solussa
- ☞ lokus = geenin tietty paikka kromosomissa
- ☞ MoM = Multiple of Median
- ☞ RES = retikuloendoteliaalijärjestelmä eli syöjäsolujärjestelmä, johon kuuluu endoteelisolut, monosyytit, kudosten syöjäsolut, imusolut sekä verisolujen esisolut
- ☞ titteri = vasta-ainetason määrittäminen laimennossarjalla
- ☞ vastingeeni = alleeli
- ☞ vastinkromosomi = kaksi keskenään samanlaista kromosomia muodostavat parin, joista toinen tulee äidiltä ja toinen isältä

## 1 Johdanto

Sikiön periessä veriryhmätekijät molemmilta vanhemmiltaan, voi äidin immuunijärjestelmä aktivoitua tuottamaan vasta-aineita sikiön isältään perimiä punasolujen pintarakenteita kohtaan (Ruutu 2007: 638). Raskautta voidaan näin pitää immunologisena haasteena odottavalle äidille (Jarva – Meri 2011: 187). Immunisaatiossa soluvälitteinen immunitetti ja vasta-aineiden tuotanto käynnistyvät (Peltola – Käyhty 2011: 770). Vasta-aineiden muodostus riippuu aiheuttaja-antigeenistä ja altistuksen määrästä. Äidin muodostamat IgG-luokan vasta-aineet pystyvät läpäisemään istukan. Vasta-aineilla peittyneet sikiön punasolut tarttuvat fagosytoivien solujen Fc-reseptoreihin tuhoutuen pernassa retikuloendoteliaalijärjestelmässä (RES, Reticuloendothelial System), aiheuttaen anemian kehittymisen sikiölle. Raskaudenaikaisen immunisaation seurauksena kehittynyt sikiön- ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti on yhä huomattava terveyshaitta, joka voi hoitamattomana johtaa sikiön kuolemaan jo kohdussa. (Daniels – Bromilow 2007: 65; Sainio – Kuosmanen 2014: 16 -18; Strohm 2005: 423–424.)

Suomen Punaisen Ristin Veripalvelussa on tutkittu jo vuodesta 1990 lähtien keskitetysti raskaana olevien naisten veriryhmät ja veriryhmävasta-aineet tarkoituksena seuloa ne äidit, joiden lapset ovat vaarassa sairastua sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttiseen tautiin. Keskitetyn toiminnan ansiosta tutkimustulokset on saatavilla kansallisesta rekisteristä äidin asuinpaikasta riippumatta. Näin myös immunisaatioiden määrää on voitu seurata vuositasolla. (SPR 2014.) Tuoreimpia tilastoja on nähtävissä taulukossa 1.

Kaikkiaan eri veriryhmäjärjestelmiä tunnetaan tällä hetkellä kolmekymmentäkolme. Ne sisältävät yli kolmesataa veriryhmäantigeeniä, joita kaikkia vastaan voi veriryhmävasta-aineita muodostua. Huolimatta siitä, että immunisaatioiden kannalta tärkeitä vasta-aineita esiintyy myös muissa veriryhmäjärjestelmissä, tässä opinnäytetyössä keskityttiin ainoastaan Rh-veriryhmäjärjestelmään. Suurimman osan immunisaatioista aiheuttaa Rh-vasta-aine anti-D ja suurimmassa immunisaatoriskissä ovat ne RhD-negatiiviset äidit, jotka synnyttävät RhD-positiivisen lapsen. Anti-D:n jälkeen tärkein Rh-vasta-aine on anti-c joka voi aiheuttaa vakavan vastasyntyneen hemolyyttisen taudin, vaikka sen pitoisuus äidin veressä ei tavallisesti nouse merkittävän korkealle. Veriryhmävasta-aineet seulotaan jokaisen raskauden aikana, koska vasta-aineiden muodostus ja immunisaation riski kasvaa synnytysten myötä. Veripalvelussa tutkitaan noin 65 000 raskaana olevan naisen näytteet vuodessa ja noin kolmellasadalla heistä, todetaan



jokin kliinisesti merkittävä vasta-aine. (Klein – Anstee 2005: 525; Korhonen 2015; Sareneva 2013a; SPR Veripalvelu 2014.)

Harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta Rh-järjestelmään kuuluva G-antigeeni esiintyy punasolun pinnalla yhdessä D- tai C-antigeenin kanssa. Sitä vastaan muodostuvan anti-G-vasta-aineen on todettu häiritsevän RhD-negatiivisten äitien raskaudenaikaisia punasoluvasta-ainemäärityksiä sen käyttäytyessä samankaltaisesti anti-D- ja C-vasta-aineen kanssa. Tulkittaessa virheellisesti tämä tutkimuksia sekoittava punasoluvasta-aine anti-D-vasta-aineeksi, voi vaikutus olla merkittävä niiden äitien kohdalla, jotka saattaisivat jäädä väärän tulkinnan vuoksi ilman anti-D-suojausta muodostaen vasta-aineen ja immunisoitua. Tämän vuoksi oli tarpeen ottaa käyttöön menetelmä, jolla nämä punasoluvasta-aineet voidaan luotettavasti erottaa toisistaan. Tutkimuksen merkityksellisyys korostuu juuri niiden RhD-negatiivisten äitien kohdalla, joiden näytteestä anti-D-vasta-aine on jo osoitettu. Heille ei jatkossa anneta anti-D-suojausta. (Korhonen 2015; Yeowon – Makar 2011: 417; Cash – Brown – Strupp 1999: 531.)

Suomessa RhD-negatiiviset äidit ovat jo vuodesta 1969 alkaen saaneet anti-D-immunoglobuliinisuojausten synnytyksen jälkeen. Tämä on ennaltaehkäissyt merkittävästi raskausimmunisaatioiden syntyä ja näin sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. (Jarva – Meri 2011: 187.) Suojausohjelmasta riippumatta 1,8 %:lla RhD-negatiivisista äideistä löytyy tämä kliinisesti merkittävä punasoluvasta-aine (Sainio – Kuosmanen 2012: 151–7).

Aiemmissä tutkimuksissa oli osoitettu, että absorptiomenetelmällä nämä vasta-aineet voidaan erottaa toisistaan. Menetelmään lisättiin vielä eluaatio, jolla voitiin varmistaa absorptio toimivuus. Lisäksi oli tarpeen löytää ne tekijät, jotka herättivät epäilyn näytteessä mahdollisesti esiintyvistä anti-G-vasta-aineista. Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää, laimentaako absorptiokäsittely merkittävästi näytteiden vasta-ainepitoisuuksia.

Päätavoitteena opinnäytetyössä oli löytää vastaukset seuraaviin tutkimuskysymyksiin menetelmän käyttöönottoa varten. *Millaiset reaktiot vasta-ainetunnistuksessa antavat aiheen anti-G-vasta-aineen epäilyyn ja laimeneeko vasta-ainepitoisuus absorptiokäsittelyn aikana?*

## 2 Vasta-ainevälitteinen immuniteetti

Vasta-aineet huolehtivat yhdessä veren luontaisen komplementtijärjestelmän kanssa humoraalisesta immuniteetistä sen perustuessa B-lymfosyytien toimintaan. Vasta-aineiden esiasteet ovat syntyneet B-lymfosyytin muuttuessa plasmasoluksi sen aktivoituessa tuottamaan reseptorinsa mukaisia liukenevia vasta-aineita. B-lymfosyyttejä kehittyä jatkuvasti luuytimessä, joskin sikiökaudella B-solujen esiasteita tuotetaan lisäksi maksassa. Kypsän B-solun pinnalla esiintyy antigeeneille spesifisiä reseptoreja. Ne ovat kehittyneet eri geeneistä muodostaen B-soludiversiteetin eli laajan kirjon monenlaisia antigeenejä tunnistavia B-soluja. (Seppälä – Meri 2011: 102–137.)

Vasta-aineet kuuluvat glykoproteiineihin ja vaikuttavat solunulkoisten nesteiden välityksellä immuunijärjestelmään. Ne ovat kehittyneet syntymän jälkeen elimistön kohdassa uusia taudinaiheuttajia kuuluen näin hankittuun immuniteettiin. Myös rokottamisen ja immunisoitumisen seurauksena voi vasta-aineita syntyä. Immunisoitumisen veriryhmätekijöitä vastaan voi saada aikaan joko raskaus tai verensiirrot. (Murphy – Travers – Waport 2008: 12–23.)

Vasta-aineet jaetaan viiteen eri ryhmään, immunoglobuliiniluokkaan, jotka ovat IgG, IgM, IgA, IgE ja IgD. Nämä luokat määräytyvät raskaan ketjun mukaan. Keskeisesti vasta-aineiden tehtävänä on tunnistaa antigeeni ja sitoutua siihen. Veriryhmävasta-aineista tärkeimmät luokat ovat IgG ja IgM. Altistuessaan vieraalle antigeenille alkaa immuunijärjestelmä ensimmäisenä tuottaa IgM-luokan vasta-aineita. Altistuessaan uudesta samalle antigeenille, immuunijärjestelmä tuottaa IgG-luokan vasta-aineita. Uusi vaste on edellistä voimakkaampi ja sen aiheuttavat B-muistisolut. Niiden pinnalla on juuri antigeenille spesifisiä reseptoreita, joiden vuoksi immuunivaste elimistössä herää. (Seppälä – Meri 2011: 102–137; Murphy ym. 2008: 12–23.)

## 3 Immunisaation kannalta tärkeimmät antigeenit ja vasta-aineet

Eri veriryhmäantigeenejä, joita vastaan veriryhmävasta-aineita voi muodostua, tunnetaan tällä hetkellä kolmesataa (Sareneva 2013a). Tämän opinnäytetyön kannalta olennaisia ovat Rh-veriryhmäjärjestelmän antigeenit ja vasta-aineet. Kuitenkin immunisaatioiden kannalta tärkeitä vasta-aineita esiintyy myös muissa veriryhmäjärjestelmissä, joista mainittakoon tärkeimmät pääpiirteittäin.

Muun muassa Kell-veriryhmäjärjestelmän anti-K on kliinisesti merkityksellinen ja varsin immunogeeninen vasta-aine aiheuttaen vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. Immuniisaation ehkäisemiseksi vuodesta 1994 alkaen, on Suomessa määrätty verenluovuttajista K-antigeeni. Työille ja fertiili-ikäisille naisille suositellaan annettavaksi aina K-negatiivisia verivalmisteita. (Hellstén 2006: 24–25.)

Harvinaisimpia immunisaatioita aiheuttavia veriryhmäantigenejä ovat Duffy-veriryhmäjärjestelmän  $Fy^a$ -, ja  $Fy^b$ -antigeenit. Duffy-veriryhmän vasta-aineista anti- $Fy^b$ -vasta-aine on poikkeuksellisempi kuin anti- $Fy^a$ -vasta-aine, joskin väestötasolla näitä antigeenejä esiintyy yhtä paljon molempia. (Daniels – Bromilow 2007: 49.) Duffy-veriryhmäjärjestelmän kohdalla eroavaisuutta on todettu annosvaikutuksessa (dosage effect) juuri homotsygoottisten ja heterotsygoottisten välillä. Tämä ilmenee siten, että sikiön periessä molemmilta vanhemmiltaan eri vastingeenin, on hän tietyn antigeenin suhteen heterotsygootti ja taas periessään molemmilta vanhemmiltaan saman vastingeenin, on hän sen suhteen homotsygootti. Veriryhmävasta-aineita tutkittaessa, merkitys ilmenee ainoastaan homotsygoottisten punasolujen pinta-antigeenien reagoitessa siihen kohdistuvaan vasta-aineeseen. Duffy-veriryhmäjärjestelmän vasta-aineiden reaktiot ovat vähäisiä ja ne saadaan esille antiglobuliinimenetelmällä. Entsyymikäsittelyssä nämä vasta-aineet tuhoutuvat. (Blaney – Howard 2000: 61; Hellstén 2006: 12.)

Kidd-veriryhmäjärjestelmään kuuluvat tavallisimmat antigeenit ovat Jka ja Jkb. Samoin kuin Duffy-veriryhmäjärjestelmässä, punasoluvasta-aineet osoittautuvat reaktioissa lieviksi, mutta eivät yhtään vaarattommiksi verensiirtojen kannalta. Annosvaikutus pätee näidenkin vasta-aineiden kohdalla *in vivo* ja *in vitro*, hankaloittaen vasta-aineiden esiintymistä. Puolet suomalaisista on heterotsygootteja Jk (a+b+) fenotyypin suhteen ja homotsygoottista fenotyyppiä kantaa noin neljäsosa. Toisin kuin Duffy-veriryhmäjärjestelmässä, Kidd-veriryhmäjärjestelmän vasta-aineet voivat reagoida jopa paremmin entsyymikäsitellyillä soluilla. (Hellstén 2006: 24–25.)

Rh-veriryhmäjärjestelmä, johon tässä opinnäytetyössä keskitytään, on yksi monimuotoisimmista ja immunogeenisimmistä veriryhmäjärjestelmistä. Tämän hetkisen tiedon mukaan se koostuu 54 antigeenistä. (ISBT 2015: 1–5.) Rh-antigeenit esiintyvät ainoastaan punasolujen pintarakenteissa ja ovat sikiöllä jo täysin kehittyneet kahdeksanteen raskausviikkoon mennessä. Kliinisesti merkittävin on D-antigeeni joka voi aiheuttaa anti-D-vasta-aineen muodostuminen sellaisilla henkilöillä, joiden punasolujen pinnalla

D-antigeeniä ei esiinny. Muut tärkeimmät ja yleisimmin määritettävät antigeenit ovat C, c, E ja e. (Avent – Reid 2000: 375; Hellstén 2006: 18.)

Viime vuosikymmenen aikana intensiivinen tutkimus on tuottanut merkittävää molekyyli-tason tietoa tästä järjestelmästä. Kyky kloonata komplementaarista DNA:ta ja sekvensoida geenejä jotka koodaavat Rh-proteiineja, ovat tuoneet lisää arvokasta tietoa Rh-veriryhmäjärjestelmästä ja Rh-yhteensopimattomuudesta. (Avent – Reid 2000: 375; Hellstén 2006: 18.)

Nimiperusta Rh-järjestelmälle luotiin 1940–1950-luvulla kahden teorian pohjalta. Toisen ja käytetympään nimistön pohjana oli kolmen erittäin läheisesti kytkeytyneen Rh-lokuksen teoria, niin kutsuttu Fisherin ja Racen CDE-nimistö. Kilpailevana nimistönä toimi Wienerin yhden Rh-superlokuksen teoriaan pohjautuva nimistö, joka kuvasi hiukan monimutkaisempaa nimistövaihtoehtoa. (Avent – Reid 2000: 375; Hellstén 2006: 14.)

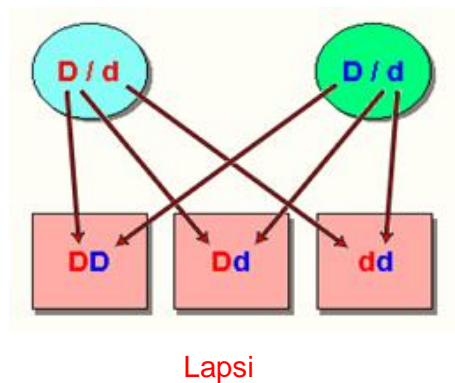
Jokaisella järjestelmän antigeenillä on kirjainyhdistelmään perustuvan nimisymbolin lisäksi numero. Vaikka useita nimikkeistöjä on käytetty kuvaamaan antigeenejä, nykyään suositellaan käytettäväksi Kansainvälisen Verensiirtoyhdistyksen (ISBT, International Society of Blood Transfusion) käyttämää terminologiaa. Rh-järjestelmässä kirjain-symboli on RH. Henkilön Rh-veriryhmä voidaan ilmoittaa joko kirjain- tai numeroyhdistelmällä ja punasoluantigeenien fenotyyppityksessä on mahdollista käyttää kumpaakin tapaa. Koska Rh-järjestelmästä tunnistetaan aina D, C, c, E, e-antigeenit, henkilöllä todetut antigeenit merkitään kirjaimen perään plusmerkillä ja mikäli antigeeniä ei ilmene, sen perään merkitään miinusmerkki. Toisena vaihtoehtona voidaan ilmoittaa RH-symbolin perään antigeenien numerot. (Avent – Reid 2000: 375; Hellstén 2006: 14.)

Veriryhmäantigeenit, jotka kuuluvat juuri tiettyyn järjestelmään, ovat joko saman tai erittäin läheisesti kytkeytyneiden geenilokusten säätelemiä. Rh-veriryhmäantigeenit ovat suoran geenisäätelyn alaisia punasolumembraanin proteiineja, jotka periytyvät kodominantisti. Punasoluantigeeneistä puuttuu siis jokin ominaisuus ja sen tilalta löytyy yleensä jokin alleelisesti periytyvä rakenne. Kodominantti periytymissääntö ei päde D-antigeenin kohdalla sen polymorfian perustessa joko antigeenin olemassaoloon tai sen puuttumiseen punasolun pinnalta. RhD-negatiivisuus on näin peittyvä ominaisuus, jossa perintötekijän on tultava kummaltakin vanhemmalta. Kuviossa 1. on havainnollistettu RhD-tekijän periytyvyyttä sen perusteella. Periytyvyydessä noudatetaan Mendelin

lakia. RhD-negatiivisten äitien sikiöllä, isän RhD-tekijä määrää sen onko sikiö RhD-positiivinen vai RhD-negatiivinen. Jos isä on heterotsygootti RhD-tekijän suhteen, todennäköisyys sikiön RhD-positiivisuudesta on 50 %. Isän ollessa D-tekijän suhteen homotsygootti, on sikiö RhD-positiivinen 100 %:n varmuudella. (Deshpande – Wadde 2013: 276–279.) Suomalaisesta väestöstä RhD-positiivisia on 87 % ja RhD-negatiivisia 13 % (Sainio – Kuosmanen 2014:1239-1245a).

Äiti: Rh +

Isä: Rh +

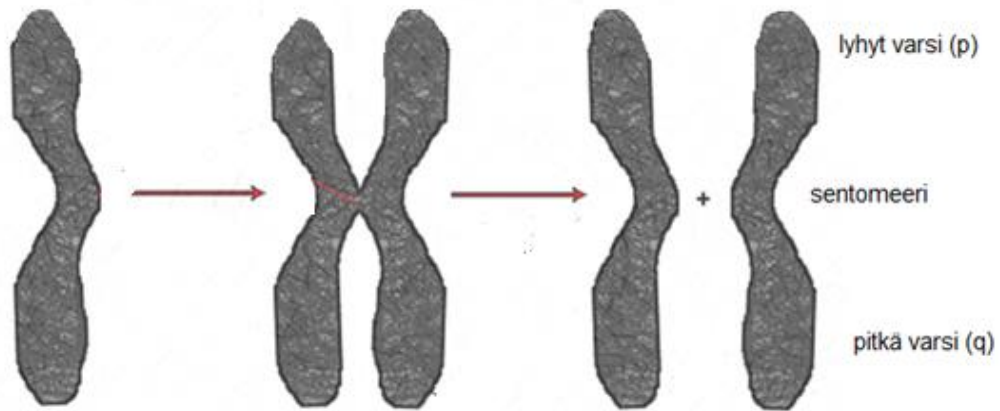


Rh-DD	= Rh-positiivinen
Rh-Dd	= Rh-positiivinen
Rh-dd	= Rh-negatiivinen

Kuvio 1. RhD-tekijän periytyvyys. (Mukailleen: Copyright © by Dia Med Ag 1785-Cressiers/Morat Switzerland)

### 3.1 Geenien sijainti kromosomissa

Rh-veriryhmäjärjestelmän geenit on paikannettu ihmisen genomissa kromosomiin 1. kohtaan 1p36.1-1p34.3, jossa on lähekkäin kaksi hyvin samankaltaista geeniä. Toinen geeneistä, RHD, koodaa D-antigeeniä ja RHCE taas koodaa CE-antigeeniä. RHD-antigeeni on syntynyt kopioitumalla alkuperäisestä RH-antigeenistä. Molemmilla geeneillä on kummallakin 10 eksonia. Kunkin geenin paikkaa kromosomissa kuvataan kirjain-numero-lyhenteen mukaisesti. Kromosomin pääosat on esitetty kuviossa 2. Esimerkiksi Rh-lokuksessa 1p36.1-1p34.3 numero 1 viittaa paikkaan kromosomissa, kirjain p osoittaa sijainnin juuri lyhyessä käsivarressa ja numerot 36.1 ja 34.3 ilmaisevat tietyn sijainnin kromosomin käsivarressa. Sentromeeri on se kohta kromosomia, joka liittää vastinparit toisiinsa. Sentomeerin molemmiin puolin jäävät kromosomin käsivarret näkyvät kuviossa nimettyinä, p-lyhyt varsi ja q-pitkä varsi. (Reid – Lomas – Francis – Olsson 2012: 146–195; Daniels – Bromilow 2010: 33–36, 41.)

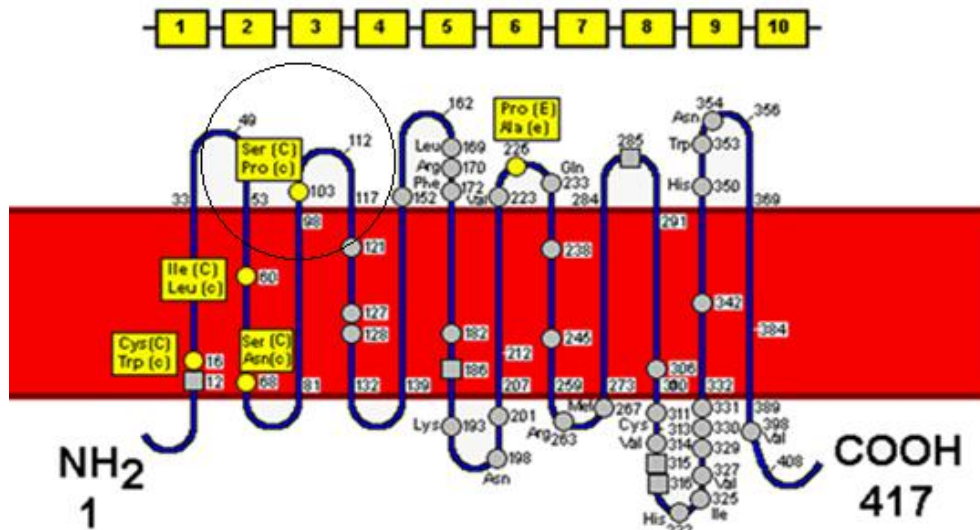


Kuvio 2. Kromosomin duplikoituminen ja kromosomin pääosat. (Mukaillen: Dia Med Ag 1785-Cressier s/Morat Switzerland)

### 3.2 Biokemiallinen rakenne

Rh-proteiinimolekyylin biokemiallinen rakenne koostuu 417 aminohaposta ja sen tiedetään olevan vettä hylkivä (hydrofobinen), jonka vuoksi suurin osa siitä on punasolun membraanin sisällä (Avent – Reid 2000; Gahmberg 1997: 814). Proteiinin molekyylikoko on 32 kDa. Sen N- ja C-terminaaliset päät ovat sytosolin sisällä. Aminohapposekvenssin tulkinnassa voidaan kuviossa 3. nähdä Rh-proteiinin ylittävän solukalvon kaksitoista kertaa muodostaen näin kuusi solunulkoista silmukkaa, jotka ovat potentiaalisia ilmentämään Rh-antigenejä. (Daniels – Bromilow 2010: 35–36.)

D-antigeeni esiintyy RHD-proteiinissa kun taas RhCcEe proteiini sisältää C,- tai c-antigenejä yhdessä E-, tai e-antigeenien kanssa samassa proteiinissa. RHCcEe-geenin vastingeenit ilmaistaan isoilla ja pienillä kirjaimilla, E ja e sekä C ja c. Ne ovat D-antigeenin tapaisia polypeptidiketjuja, jotka periytyvät yhdessä esimerkiksi CDE tai cde. D-antigeenille merkitään myös vastinpariksi "d", osoittamaan D-negatiivinen fenotyyppi. Merkintätavasta riippumatta "d" on hypoteettinen eli D-antigeenillä ei ole vastingeeniä. Alla esitetyssä kuviossa 3. on ympyröity G-antigeenin sijainti (seriini) kohdassa 103, kolmannessa eksonissa. Tämä kohta on sekä RhD-proteiinissa että RhC-proteiinissa. Rhc-proteiinissa sen tilalla on (proliini), joka nähdään myös kuvassa. (Juvonen – Salmi – Savolainen 1996: 122–126; Daniels – Bromilow 2010.)



Kuvio 3. Rh-geenin rakenne. (Copyright © by Dia Med Ag 1785-Cressier s/Morat Switzerland)

### 3.3 G-antigeeni ja anti-G-vasta-aine

Vaikka Rh-järjestelmään kuuluvaa G-antigeeniä tai anti-G-vasta-ainetta ei kotimaisessa kirjallisuudessa ole juuri mainittu, on siihen kiinnitetty niin Suomessa kuin muualla maailmassa huomiota enenevässä määrin sen häiritessä raskaudenaikaisia vastaainemäärityksiä. Sen olemassa olosta on näyttöä jo vuosikymmenten takaa. Jo vuonna 1958 Allenin ja Tippetin ensimmäiset tutkimukset G-antigeenistä osoittivat harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta sen olevan läsnä lähes kaikissa D,- tai C-antigeenin suhteen positiivisissa punasoluissa. Sen sijaan D- ja C-negatiivisilla henkilöillä ei punasoluissa G:tä osoitettu esiintyvän. cdE- ja cde-geeniyhdistelmistä G:n tiedettiin siis puuttuvan. Tämä tieto osoitti varmemmin sen, että G:n suhteen negatiiviset henkilöt, voisivat muodostaa anti-G-vasta-ainetta altistuttuaan sen suhteen positiivisille punasoluille. G-antigeenin löytymisellä voitiin perustella miksi RhD-negatiiviset äidit, joiden lapset olivat genotyypiltään cDe/cde tai cDE/cde näyttivät muodostavan useasti myös anti-C-vasta-ainetta anti-D:n lisäksi, vaikkei lapsilla C-antigeeniä todettu. Kyseessä olikin anti-D- ja anti-G-vasta-aineiden yhdistelmä, jota D-, C-, ja G-antigeenin suhteen negatiivinen äiti oli muodostanut altistuessaan niiden suhteen positiivisille punasoluille. (Huber – Leonard – Driggers – Learn – Gilstaddc 2006: 166–170; Koistinen 1974: 55–56; Shirley – Mirabella – Lumadue – Ness 1997: 493–496.)

Muodostuvan anti-G-vasta-aineen on todettu vaikeuttavan luultua useammin D-negatiivisten äitien vasta-ainetunnistuksia. Se käyttäytyy veriryhmäserologisissa tutkimuksissa samankaltaisesti anti-D- ja C-vasta-aineen kanssa häiriten tutkimuksia. Nämä vasta-aineet voidaan erottaa toisistaan absorptiomenetelmällä. (Cash ym.1999: 531; Korhonen 2015.)

### 3.4 Aikaisemmat tutkimukset anti-G immunisaatioista

Anti-G:n kuuluessa IgG-vasta-aineluokkaan, se pääsee kulkeutumaan istukan läpi saaden aikaan immunisoitumisen. Kuitenkaan sen kyvystä yksinään aiheuttaa vaikeaa vastasyntyneen hemolyyttistä tautia, ei vuonna 1999 julkaistun tutkimusartikkelin (Cash ym. 1999.) mukaan ollut vielä raportoitu tapauksia. Tutkimuksen johtopäätöksessä kerrottiin sikiön invasiivisen seurannan olevan tarpeetonta, anti-G-vasta-aineen ollessa ainoa syy fetomaternaalisessa yhteensopimattomuudessa. Siinä kuitenkin huomautettiin lisätutkimusten aiheesta olevan tarpeen. (Cash ym. 1999: 531.) Uudemmissa tutkimuksissa kuvattiin jo muutamia tapauksia joissa anti-G oli yksinään aiheuttanut kohtalaista, jopa hoitoa vaativaa vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. (Huber ym. 2006: 166–170; Palfi – Gunnarsson 2001).

Myös meillä Suomessa asiaa oli ryhdytty selvittämään entistä enemmän. Veripalvelussa oli tutkittu vuonna 2013 suomalaisnaisen anti-G-immunisaation aiheuttamaa vastasyntyneen hemolyyttistä tautia. Tutkimuksessa luonnehdittiin immunisoitumista ja sen seurauksia naisen eri raskauksien aikana. Ensimmäisessä raskaudessa vasta-aineseulonnan kerrottiin olleen negatiivinen. Toisen raskauden alussa sen sijaan havaittiin anti-D- ja C-vasta-aineen muodostuminen. Koska anti-C:n osalta titteri oli korkeampi kuin anti-D:n, alettiin vasta-ainetta epäillä anti-G:ksi. Kyseessä oli RhD-negatiivinen nainen. Kolmannen raskauden alussa, hänellä todettiin anti-C ja G sekä heikko anti-Jka-vasta-aine. Anti-C:n ja G:n titterin todettiin olevan 16. Vasta-ainetason ei kuitenkaan siitä kerrottu nousseen. Sikiötä oli seurattu tarkasti raskauden aikana. Hemoglobiinin laskun vuoksi sikiölle oli annettu yhteensä viisi kohdunsisäistä verensiirtoa onnistuneesti. (Sareneva – Haimila – Korhonen – Stefanovic – Kuosmanen – Sainio 2013b.) Kuvattu tutkimus oli hyvänä esimerkkinä anti-G-vasta-aineen mahdollisuudesta aiheuttaa myös vakavaa sikiön- ja vastasyntyneen hemolyyttistä tautia useammin kuin yleisesti on kuviteltu. Tutkimusmenetelmänä oli käytetty absorptioeluaatiotutkimusta ja tulokset oli varmistettu referenssilaboratoriossa Bristolissa. (Sareneva ym. 2013b.) Tutkimuksen johtopäätöksestä voitiin todeta, että anti-G-vasta-aineesta herää



epäily, kun veriryhmältään RhD-negatiivisella naisella todetaan veriryhmäserologisissa tutkimuksissa anti-D- ja C-vasta-aineiden osalta samankaltaiset titterit. Jos titteritulokset anti-C:n osalta on vielä korkeampi kuin anti-D:n, on selvítettävä onko vasta-aine todella anti-D vai mahdollisesti anti-G-vasta-aine. (Sareneva ym. 2013b.) Kyseisessä tutkimuksessa ollut näyte oli mukana myös tässä opinnäytetyössä siinä varmennetun anti-G-vasta-aineen vuoksi.

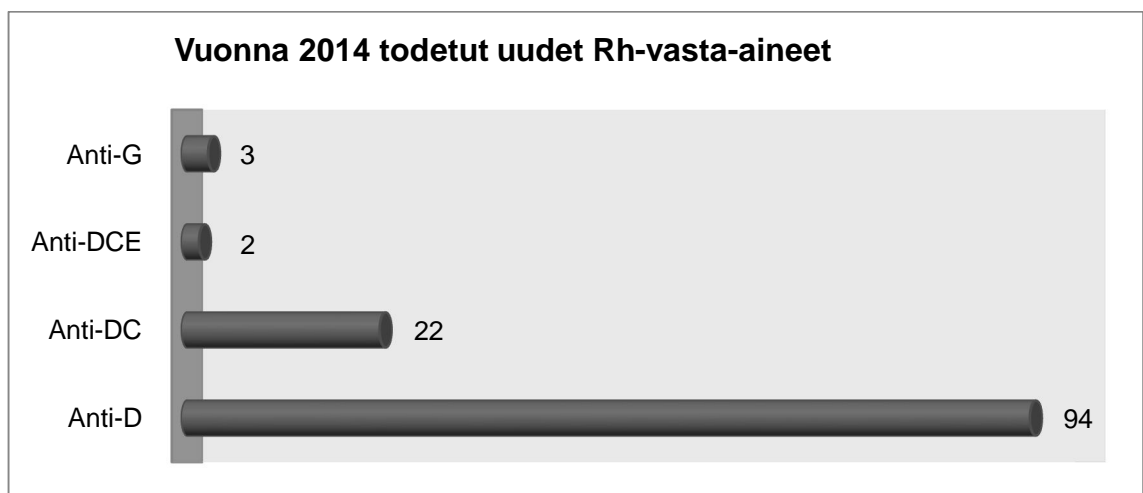
### 3.5 Rh-järjestelmän veriryhmävasta-aineet

Veriryhmävasta-aineiden muodostumiseen tarvitaan altistus joko raskauden tai verensiirron seurauksena. Anti-D-vasta-aineen lisäksi muita merkittäviä Rh-veriryhmäjärjestelmään kuuluvia raskaudenaikaisten immunisaatioiden aiheuttajia ovat anti-c, anti-C, anti-e ja anti-E-vasta-aineet. Useimmiten veriryhmävasta-aineet kehittyvät henkilön altistuessa vieraille antigeneille joko raskauden tai verensiirron aikana. Veriryhmävasta-aineet voivat kuulua joko IgM tai IgG-luokkaan. Rh-järjestelmässä vasta-aineet kuuluvat yleensä IgG-luokkaan ja pystyvät läpäisemään istukan kokonsa ansiosta. Ne kulkeutuvat myös luonnollisesti aktiivisen kuljetuksen kautta. Aktiivinen kuljetus alkaa 17. raskausviikolla, lisääntyy raskauden viimeisellä kolmanneksella ja kiihtyy aina raskauden loppua kohden. Sikiö saa valtaosan siirtyvistä vasta-aineista neljän viimeisen raskausviikon aikana. (Ruutu ym. 2007: 638.) Kun raskausimmunisaatiossa arvioidaan vasta-aineen kliinistä merkitystä, on immunoglobuliiniluokalla suuri merkitys. Tärkeänä pidetään myös vasta-aineen spesifiteettiä, voimakkuutta ja reaktiotapaa. (Krusius – Auvinen 2011: 359–360; Hellstén 2006: 11–19.)

Kun raskaudenaikainen veriryhmävasta-aineiden seulontatulokset on positiivinen, vasta-aine tunnistetaan. Jos kyseessä on kliinisesti merkittävä vasta-aine, myös sen pitoisuus määritetään. Raskauden aikana merkityksellisin immuunivasta-aine on anti-D, joka esiintyy yhdessä anti-C ja anti-E-vasta-aineen kanssa. Anti-E on yleisin vasta-aine, koska sitä esiintyy luonnollisena. Kuitenkaan vain harvoin sen on todettu aiheuttavan ongelmia raskauden aikana. Vaikka anti-E on usein luonnollinen, se saattaa olla myös immuunivasta-aine ja on siksi otettava huomioon. Myös muut Rh-järjestelmän vasta-aineet voivat esiintyä luonnollisina, joskin harvoin. Toiseksi yleisin veriryhmävasta-aine on anti-c, joka on anti-D:n jälkeen merkittävin vastasyntyneen hemolyyttistä tautia aiheuttava Rh-vasta-aine. (Krusius ym. 2011: 359–360; Hellstén 2006: 11–19.)

Vasta-ainepitoisuuksia määritettäessä, anti-D:n suhteen pidettävä kriittinen titteritulos on 16. Muilla Rh-järjestelmän vasta-aineilla ei selkeää rajaa ole. Anti-E:n esiintyminen on merkittävä korkeilla tittereillä, mutta useinkaan immunisaatio ei ole niin vaarallinen. Anti-C:n titteri voi olla hankalasti tulkittavissa ja sen kohdalla on huomioitava, että se saattaa myös vähäisempänä olla merkityksellinen. (Aittokallio-Tallberg 2013.) Jos anti-D:n pitoisuus ylittää titterin  $\geq 16$ , on pitoisuus määritettävä lisäksi kvantitatiivisesti entsyymi-immunologisella menetelmällä (ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay). (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008).

Alla (kuvio 4.) nähdään Veripalvelussa vuonna 2014 todetut uudet anti-D, -C ja G-vasta-aineet. Ne ovat sekä potilas-, että neuvolanäytteistä todettuja. Veripalvelun tilastoissa oli tietoa lisäksi anti-D-suojauksista johtuvista vasta-aineista, joita oli todettu 2638 uutta tapausta. Kaikilla näistä vasta-aineen muodostuminen johtui varmuudella annetusta anti-D-immunoprofylaksiasta eikä immunisaatiosta. Tilastosta kävi ilmi myös 126 sellaista näytettä, joissa anti-D-vasta-aine todettiin mutta joiden kohdalla ei varmuudella tiedetty, johtuiko vasta-aine annetusta suojauksesta vai oliko kyseessä immunisaatio. Suojauksista johtuvia tai epäselviä tapauksia ei ole huomioitu alla olevassa kuviossa. (Korhonen 2015.)



Kuvio 4. Vuonna 2014 todetut uudet Rh-vasta-aineet (Tiedot lähteestä: SPR Veripalvelu 2015: Tilastot; Korhonen 2015.)

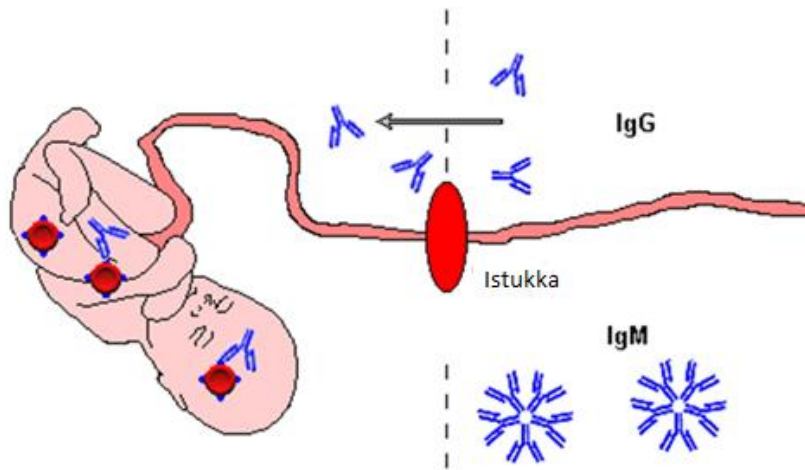
#### 4 Raskaudenaikaisen veriryhmäimmunisaation syntymekanismi

Raskaudenaikainen veriryhmäimmunisaatio syntyy, kun sikiön punasoluantigeenit eroavat ominaisuuksiltaan äidin punasoluantigeeneistä. Äidin immuunijärjestelmä voi aktivoitua tuottamaan veriryhmävasta-aineita näitä vieraita tekijöitä kohtaan. (Krusius – Auvinen 2011: 359–360; Haimila 2012: 1–2; Juvonen – Savolainen 2007: 202–204.) Ensimmäisessä raskaudessa ei yleensä esiinny vakavia veriryhmäimmunisaatioita äidin tuottaessa lähinnä IgM-luokan vasta-aineita, jotka ovat liian suuria siirtyäkseen istukan läpi sikiöön. Immunisoituminen voi tapahtua myös niin myöhään, ettei se ehdi aiheuttamaan vastasyntyneen hemolyyttistä tautia vielä ensimmäisen raskauden aikana. Jos vasta-aineita esiintyy jo alkuraskauden aikana, ne ovat voineet kehittyä myös verensiirtojen seurauksena. (Juvonen – Savolainen 2007; Aittokallio-Tallberg 2013.)

Yleensä vasta seuraavassa raskaudessa altistuminen RhD-positiivisille punasoluille on kliinisesti merkityksellinen (Aittokallio-Tallberg 2013). Immunologinen muisti aktivoituu tehokkaasti seuraavassa raskaudessa ja vain 0,2 ml sikiön verta eli noin 0,1 ml punasoluja mahdollistaa nopeasti kehittyvän IgG-luokan vasta-aineiden muodostumisen (Sainio 2013: 1–2). Immunisaatiossa nämä vasta-aineet voivat siirtyä kuviossa 5. esitetyn mekanismin mukaisesti istukan kautta sikiön elimistöön hajottaen sikiön punasoluja. Vaikka istukka muodostaakin tehokkaan esteen sikiöstä äitiin tapahtuvaan verenvuotoon (fetomaternaaliavuotoon) on silti tavallista, että pieniä määriä sikiön punasoluja pääsee äidin verenkiertoon joko raskauden tai synnytyksen aikana. Kaikkien raskaudenaikaisten invasiivisten toimien tiedetään lisäävän verenvuodon riskiä sikiöstä äitiin. Tällaisia toimenpiteitä ovat muun muassa istukanäytteen ottaminen, lapsivesipunktio sekä perätilan ulkokäännös. Raskaudenkeskeytyksessä ja keskenmenossa on olemassa aina sikiön ja äidin välisen verenvuodon mahdollisuus, joka osaltaan lisää tulevien raskausimmunisaatioiden riskiä. (Aittokallio-Tallberg 2013; 1- 6; Krusius ym. 2011: 358–360; Daniels – Bromilow 2007: 65.) Raskaudenaikainen immunisaatio voi kehittyä myös loppuraskaudessa ja tulla yllätyksenä (Klemetti – Hakulinen-Viitanen 2013: 116-118; Sainio 2013).

Mekanismissa ensin pieniä määriä sikiön punasoluja pääsee äidin verenkiertoon juuri fetomaternaalisesta vuodon seurauksena, jonka jälkeen äidin vasta-ainetuotanto niitä vastaan stimuloituu. Vasta-aineiden muodostus riippuu aiheuttaja-antigeenistä sekä altistuksen määrästä. Äidin muodostamat IgG-luokan vasta-aineet läpäisevät istukan. Ne kiinnittyvät sikiön punasolujen pinnan antigeenirakenteisiin. Vasta-aineilla peittyneet

punasolut tarttuvat fagosytoivien solujen Fc-reseptoreihin tuhoutuen pernassa retikuloendoteliaalijärjestelmässä, aiheuttaen anemian kehittymisen sikiölle. (Ketola 2013: 1–6; Aittokallio-Tallberg 2013: 1–5; Strohm 2005: 420–445.)



Kuvio 5. Raskaudenaikaisen immunisaation mekanismi. (Mukaillen: Copyright © by Dia Med Ag 1785-Cressier s/Morat Switzerland)

## 5 Sikiön ja vastasyntyneen hemolyttinen tauti

Hankinnaisiin immunohe-molyttisiin anemioihin kuuluva sikiön ja vastasyntyneen hemolyttinen tauti (HDFN, Haemolytic Disease of the Fetus and the Newborn) tunnetaan myös nimellä erythroblastosis fetalis. Sen aiheuttajina ovat allovasta-aineet. Kuten edellisessä kappaleessa jo kuvattiin raskausimmunisaation mekanismia sen seurauksena kehittyvä sikiön ja vastasyntyneen hemolyttinen tauti voi olla kohtalokas. Tautiin viittaavat tyypilliset merkit ja taudin huono ennuste on tunnettu jo vuosisatoja. (Santavy 2010.) Taudin vaikeimmat muodot aiheutuvat D-, c (Rh) ja K (Kell)– immunisaatioista. Raskauden kannalta merkityksellisiä immunisaatioita liittyy myös muihin veriryhmiin, joskin tärkeimpänä pidetään juuri anti-D-immunisaatiota. (Klemetti – Hakulinen-Viitanen 2013: 116.)

HDFN taudissa sikiö anemisoituu ja vaikeissa tapauksissa anemia voi johtaa sydämen vajaatoimintaan, sikiön turvotukseen tai sikiön kuolemaan jo raskauden aikana (Aittokallio-Tallberg 2013; Krusius – Auvinen 2011). Punasolujen hajoamisen (hemolyysin) ollessa lievä, pyrkii sikiön elimistö kompensoimaan anemian kehittymistä lisäämällä punasolujen tuotantoa (hematopoiesia). Sikiöllä punasolujen tuotanto on keskittynyt

maksaan ja pernaan, josta se siirtyy vähitellen luuytimeen syntymän lähestyessä. Hemolyysin ollessa vaikea, sikiön perna ja maksa suurentuvat. Hemolyysin seurauksena vapautuu punasolujen hajoamistuotetta (bilirubiinia) ja keskushermoston tiedetään olevan erityisen altis sen haittavaikutuksille. (Ketola 2013; Aittokallio-Tallberg 2013.) Istukka pystyy onneksi poistamaan sikiön elimistöön kertyvää bilirubiinia varsin tehokkaasti. Kuitenkin sikiön hemoglobiinitason ollessa matala (50 g/l) voi seurauksena olla sikiön sydämen vajaatoiminta tai turvotus (hydrops). (Ketola 2013; Krusius – Auvinen 2011: 358–360.) Lievissä tilanteissa vauva on oireeton syntyessään, kellastuen nopeasti ja voimakkaasti ensimmäisten elinpäivien aikana. Vaikeissa tilanteissa vauva oireilee jo kohdussa ja voi syntyä aneemisena. (KYS 2012.)

Tuoreimpien tutkimusartikkelien mukaan asiantuntijatahot ympäri maailmaa ovat antaneet erilaisia suosituksia ja käynnistäneet kansallisia ohjelmia raskausimmunisaatioiden ehkäisemiseksi. Jatkuvan tieteellisen kehityksen myötä myös aikaisemmin annettuja suosituksia on uusittu. Suositusten perustana ovat lukuisten tutkimusten ja asiantuntijoiden yksimielisyys terveydelle koituvista hyödyistä, sekä immunisaatioita ennaltaehkäisevien toimien kustannustehokkuudesta. Yhteisinä piirteinä artikkeleissa kulminoituu RhD-yhteensopimattomuus merkittävimpänä immunisaation aiheuttajana sekä se, että uusia tapauksia ilmenee jatkuvasti edelleen vaikka immunoprofylaksian toteutankin vähentäneen merkittävästi taudin esiintymistä. (Bennardello – Coluzzina – Curciarello – Todors – Villa 2015: 109–134; Kacem ym. 2015: 59–65.)

Kroatiassa, Splitin yliopistollisessa sairaalassa oli tutkittu anti-D-suojauksen vaikutusta kymmenen vuoden aikana. Laajan tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää suojauksen vaikutus taudin esiintyvyyteen. Tutkimuksessa todettiin RhD-immunisaatioiden ja sitä seuraavien sikiön hemolyyttisten tautitapausten vähenevän yli puoleen, jos anti-D-immunoglobuliinisuojaus annettaisiin ensimmäisen raskauden aikana. (Dajak – Roje – Željka – Maglić 2014: 410–415.) Lienee siis turhaa todeta, millainen merkitys RhD-negatiivisten äitien anti-D-suojauksella on ja kuinka tärkeää on jatkuva tutkimus raskaudenaikaisten immunisaatioiden välttämiseksi.

## 5.1 Historiaa

Sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin löytyminen oli yksi lääketieteen suurimmista saavutuksista. Ranskalainen kätilö Louise Bourgeois kuvaili jo 1609-luvulla julkaistussa kirjassaan ensimmäisenä vastasyntyneen hemolyyttisestä taudista, jossa

kyse oli epäilemättä Rh-immunisaatiosta. Hänen kerrottiin avustaneen kaksosten synnytyksessä, jossa toinen syntyneistä lapsista oli huomattavan hydrooppinen ja käytännössä hänet todettiin jo kuolleeksi. Toiselle taas kehittyi muutaman tunnin kuluessa voimakas keltaisuus ja lapsen kerrottiin kuolleen kolme päivää syntymänsä jälkeen. (Relati 2007: 3–6.)

Paljon myöhemmin, vuonna 1939 Philip Levine ja Rufus E. Stetson kuvailivat erään tapauksen, jossa äiti oli hiljan synnyttänyt kuolleen sikiön. Vaikka äiti oli saanut verensiirron omalta mieheltään ABO-sopivuussäännön mukaisesti, hänen seeruminsa agglutinoi saadut punasolut. Äidistä otetun seerumin todettiin agglutinoivan myös suurimman osan muilta luovuttajilta saaduista punasoluista. Levine ja Stetson käsittivät verensiirto-reaktion johtuvan äidin ja sikiön veriryhmien välisestä epäsoyvuudesta, jossa vasta-aine muodostuikin sikiön isältään perimää antigeeniä vastaan. (Yousuf – Abdul – Yusof – Fun 2012: 71.) Tämän vasta-aineen osoitettiin toimivan saman reaktion mukaisesti kun pian 1940-luvulla Karl Landsteinerin ja Alexander Solomon Wienerin löytämän Rh-tekijän. Heidän kerrottiin immunisoineen Rhesusapinan (*Macacus rhesus*) punasoluilla kaniineja sekä marsuja aiheuttaen niissä anti-Rh-vasta-aineen muodostumisen. Eläimillä tuotetut vasta-aineet reagoivat sitten ihmisten punasolujen kanssa. Rh-järjestelmä sai siten nimensä. Aikojen saatossa huomattiin kuitenkin löydetyn antigeenin poikkeavan RhD-antigeenistä ja sen todettiin kuuluvan Landsteiner-Wiener-veriryhmäjärjestelmään (anti-LW), Rh-nimi pysyi siitä huolimatta ennallaan. (Blaney – Howard 2000: 87; Hellstén 2006: 13; Harmening 2005: 135; Huovinen ym. 2003: 669; Santavy 2010: 147–151.) Vuonna 1940 Landsteiner ja Wiener saivat tunnusta löytämästään Rh-tekijästä. Levine ja Stetson taas huomioitiin heidän osoittaessaan sen suoran yhteyden sikiön punasolujen hajoamiseen. (Santavy 2010.)

## 5.2 Esiintyminen Suomessa

Suojausohjelmien ja hoitomahdollisuuksien myötä taudin kuva on muuttunut viime vuosikymmenen aikana. Tuoreesta katsauksesta käy ilmi, että tänä päivänä perinataalikuolleisuusluku Suomessa on pieni 1,7/100 000 vastasyntyntä kohden. Vielä 1960-luvun alussa kerrotaan merkittävimmän perinataalikuolleisuuden syyn olleen juuri sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti. Tapausten määrän todettiin silloin olleen 150/100 000 vastasyntyntä kohden. Hoidon puuttuessa yli 40 %:n näistä lapsista kerrottiin menehtyneen. Taulukossa 1. esitetään syitä vuosina 2003–2012 hoidossa olle-

den lasten vastasyntyneen hemolyyttisen taudin syntymiseen. Uusimmista tapauksista ei ole vielä saatavilla tilastoja. (Sainio – Kuosmanen 2014.)

Kansallisesta suojausohjelmasta huolimatta tautiin sairastuneista lapsista edelleen yli 200 lasta vuodessa tarvitsee hoitoa. Nykyään yli 90 %:a sikiöistä, joita on hoidettu kohdunsisäisesti, jää henkiin. Tilastotietoa HDFN tautia sairastavien lasten pitkäaikaisesta ennusteesta ei juuri ole saatavilla. (Sainio – Kuosmanen 2014.) Sainio ja Kuosmanen kuitenkin totesivat jo vuonna 2012 julkaistussa katsauksessaan 5–13 %:lla näistä lapsista todettavan jälkeinpäin kuulovammaa, häiriöitä puheenkehityksessä sekä vakavia neurologisia ongelmia kuten CP-oireyhtymää. (Sainio – Kuosmanen 2012).

Taulukko 1. Sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttinen tauti Suomessa vuosina 2003–2012. Merkinnot: (1) Lapsen diagnoosit 7 vrk ikään mennessä tai sitä ennen sairaalasta poistuessa. (2) Kohdunsisäisiä punasolusiirtoja (IU) saaneet äidit sikiön anemian hoitoon toimitettujen punasolujen mukaan (SPR Veripalvelu). (3) Perinataalikuolleisuus (PNM): kuolleena syntyneet ja 1. elinviikon aikana kuolleet (Tilastokeskus, Terveystilasto, Kuolemansyyt) THL, Syntymärekisteri, Hoitoilmoitusrekisteri HILMO) Taulukon tiedot lähteestä: Sainio, S – Kuosmanen M. 2014. (Mukailten: Suomen Lääkärilehti)

<b>Sikiön tai vastasyntyneen hemolyyttinen tauti Suomessa 2003-2012.</b>										
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Rh-immunisoituminen</b>	70	48	50	56	55	60	60	64	67	77
<b>ABO-immunisoituminen</b>	116	154	163	147	134	123	118	115	122	128
<b>Muu hemolyyttinen sairaus</b>	11	8	17	14	13	16	13	9	4	15
<b>Immunisoitumisen aiheuttama vesipöhö</b>	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
<b>Immunisoitumisen aiheuttama kernikterus</b>	1	0	3	0	1	1	1	0	1	1
<b>Yhteensä</b>	<b>198</b>	<b>210</b>	<b>233</b>	<b>217</b>	<b>205</b>	<b>202</b>	<b>192</b>	<b>188</b>	<b>194</b>	<b>221</b>
<b>Immunisaation takia verenvaihdon saaneita lapsia (1)</b>	25	10	15	15	9	7	9	10	5	7
<b>IU-punasolusiirtoja saaneet äidit (2)</b>	13	4	8	11	6	14	16	14	12	16
<b>Kuolleita (3)</b>	3	1	2	1	0	1	0	1	1	0

### 5.3 Oireet ja seuranta

Anemian seurauksena sikiön punasolujen tuotanto kiihtyy, punasolujen elinikä lyhenee ja sikiön vereen kertyy punasolujen hajotessa keltaista väriainetta eli bilirubiinia. Taval-

lisesti hyperbilirubenemiaa ei synny, koska istukka pyrkii tehokkaasti eliminoimaan bilirubiinia äidin puolelle. Bilirubiinin kulkeutuessa äidin verenkiertoon istukan läpi, äidin maksa konjugoi sen liukoiseen muotoonsa. Lapsiveteen erittynyt bilirubiinipitoisuus voidaan määrittää ja näin arvioida sikiön anemian vaikeusaste ja ennuste. Tämä määrittäminen on kuitenkin jäämässä historiaan, siihen liittyvien riskien vuoksi. (Aittokallio-Tallberg 2013.)

Ultraäänitutkimuksella sikiön kasvua sekä mahdollista turvotusta voidaan tarkkailla. Verenvirtaustutkimuksella (Doppler) seurataan virtausnopeuksien kasvua, jotka kertovat myös anemian asteesta. Ensisijaisesti käytetään sikiön keskimmäisen aivovaltimon (MCA, arteria cerebri media) virtauksen mittaamista. (Aittokallio-Tallberg 2013.) Napaverenvirtaus on kääntäen verrannollinen sikiön hemoglobiinipitoisuuteen. Sikiön KTG (kardiotokografia) tutkimuksella selvitetään anemialle tyypillisiä muutoksia. KTG:n todetaan kuitenkin olevan immunisaatioiden havaitsemisessa epäspesifinen tutkimus, koska anemian aiheuttamia muutoksia havaitaan vasta hemoglobiinin laskiessa alle 80 g/l. Napalaskimopistolla voidaan määrittää sikiön anemian aste. Tutkimus tehdään kaikuohjauksessa. Napaverinäytteestä määritetään sikiön veriryhmä, hemoglobiinin ja bilirubiinin pitoisuus, hematokriitti, sekä retikulosyyttien määrä. Toimenpiteen ollessa invasiivinen, siihen liittyy aina pieni komplikaatoriski. (Ketola 2013; Ulander – Halmesmäki – Ämmälä 2004: 2897–904.) Epäiltäessä vaikeaa immunisaatiota, synnytyksen ajankohta suunnitellaan etukäteen ja raskausviikolla 34 annetaan antenataalinen kortikosteroidipistos. Sen tarkoituksena on varmistaa sikiön keuhkojen kypsyttää ennenaikaisessa synnytyksessä. (Bhutani ym 2010; Ketola 2013; Käypä-hoito 2009.)

Vastasyntyneellä vauvalla kellastuminen ilmenee yleensä noin vuorokauden kuluttua syntymästä. Vauvalla maksan entsyymien kehittymättömyys voi näyttäytyä keltaisuutena, vaikka itse bilirubiinipitoisuuden nousu olisi vähäistä. Bilirubiini konjugoituu glukuronihappoon sen kulkeutuessa maksasoluihin. Tämä tila on erittäin vakava bilirubiinipitoisuuden ylittäessä albumiinin kyvyn sitoa sitä itseensä. Kun vereen kertyy ylen määrin bilirubiinia, sen konjugoitunut muoto pystyy läpäisemään aivoveriesteen kertyen aivojen tyvitumakkeisiin (basaaliganglioihin). Tilaa kutsutaan kernikterukseksi (kernicterus). (Juvonen – Savolainen 2007; Hoppu 1999: 100; Bhutani ym. 2010: 86–100.)



#### 5.4 Hoito

Raskaudenaikaisessa hoidossa keskitytään sikiön anemian korjaamiseen ja näin aivoaurion torjumiseen. Sikiön MCA huippuvirtauksen ollessa  $\geq 1,5$  MoM tai sikiöllä on todettu muita merkkejä anemiasta kuten turvotuksia, on otettava napaverinäyte josta sikiön hemoglobiini todetaan. Vaikeassa anemiassa sikiötä hoidetaan kohdunsisäisesti (IU, intra uterina), jolloin napalaskimoon siirretään erikoiskäsiteltyjä punasoluja. Sikiölle siirrettävät punasolut valmistetaan erikseen tuoreesta kokoverestä. Ne on tilattava aina etukäteen Veripalvelusta. Äidiltä istukan kautta sikiöön siirtyneet immuunivasta-aineet otetaan verivalmisteissa huomioon. Verivalmisteet ovat veriryhmää O, RhD-, E- ja C- ja ne ovat aina sädetettyjä. Näitä valmisteita varten kutsutaan erikseen verenluovuttaja. Punasolusiirron jälkeen sikiön hemoglobiiniarvo mitataan ja hoito uusitaan tarpeen mukaan. (Aittokallio-Tallberg 2013: 3; Juvonen – Sareneva – Krusius 2013: 3227-3230a.)

Vastasyntyneen hoito valitaan lapsen voinnin mukaisesti (Ketola 2013). Jos lapsen vointi on hyvä ja hemoglobiinin arvo ylittää 100 g/l hoidetaan keltaisuutta ensisijaisesti valohoidolla (kuvio 6.) sekä antamalla maitoa runsaasti, jolloin bilirubiini poistuu elimistöstä normaalin vatsantoiminnan kautta. Valohoidossa lasta pidetään sinivalolampun alla. Valohoito perustuu iholle suunnattuun sinivaloon. Sinivalo pystyy hajottamaan ihon hiussuonissa virtaavaa bilirubiinia muuttaen sen myrkyttömäksi yhdisteeksi. (Ketola 2013; Bhutani ym. 2010.) Sinivalo muuntaa bilirubiinia myös fotoisomeeriksi joka erittyy helpommin virtsaan ja poistuu luonnollista kautta. Hoidossa vastasyntyneen silmät on peitettävä kuvion 6. mukaisesti, vaikka hoito on todettu muuten turvalliseksi. Toisinaan lapselle tarvitaan nopeammin vaikuttavaa hoitoa. Tällöin lapselle tehdään verenvaihto, jotta bilirubiini saadaan poistetuksi elimistöstä. (Ketola 2013; HUS n.d.)



Kuvio 6. Lapsi valohoidossa (Pöllänen, Ilona 2015)

## 6 Raskaudenaikaisen immunisaation seulonta ja ehkäisy Suomessa

Suomessa raskaudenaikaisia immunisaatioita koskeva toiminta on todettu onnistuneeksi ja immunisaatioiden ehkäisemiseksi noudatetaan asiantuntijaryhmän suosituksia. Suositukset toteutuvat kansallisten ohjelmien mukaisesti yhteistyössä äitiyshuollon, Veripalvelun sekä THL: n (Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen) kanssa. Raskaudenaikaisella veriryhmävasta-aineseulonnalla, synnytyksen jälkeisellä suojauksella sekä RhD-negatiivisten äitien anti-D-rutiinisuojauksella, on pystytty merkittävästi vähentämään äitien immunisoitumista ja näin sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttisen taudin riskiä. Vuonna 2014 Veripalvelussa oli otettu käyttöön tutkimusmenetelmä sikiön veriryhmän määrittämiseksi äidin plasmanäytteestä. (Klemetti – Hakulinen-Viitanen 2013; Sainio – Kuosmanen 2014: 1239–1245a.)

Äitiysneuvolassa otetaan verikoe ainakin kerran jokaisen raskauden aikana immunisaatioiden havaitsemiseksi. Ensimmäinen seulontanäyte otetaan jo raskausviikolla 8–12. THL: n suosituksesta RhD-negatiivisten äitien veriryhmävasta-aineet seulotaan vielä uudestaan 24–26 sekä 36 raskausviikolla. Ne RhD-positiiviset äidit, jotka ovat saaneet verensiirtoja tai joiden aikaisemmin syntyneitä lapsia on hoidettu syntymän jälkeen keltaisuuden vuoksi, seulotaan uudestaan 36 raskausviikolla. (Klemetti – Hakulinen-Viitanen 2013.)

Immunisaatioiden ennalta ehkäisemiseksi, pyritään RhD-negatiiviselle henkilölle antamaan aina RhD-negatiivista verivalmistetta. Kun kyseessä on tyttö tai fertiili-ikäinen nainen, on tämä erityisen tärkeää. Näin voidaan välttää myöhemmin raskaudessa esiintyvä anti-D-vasta-aineen muodostuminen ja siitä johtuva sikiön ja vastasyntyneen hemolyyttinen tauti. Yleisesti ei muunlaisia Rh-antigeenejä huomioida ennaltaehkäisevästi, ellei nimenomaan tiedetä henkilöllä olevan sellainen punasoluvasta-aine, jonka vuoksi oman fenotyypin mukaisia verivalmisteita suositellaan. (Sainio – Kuosmanen 2014; 1239-1245a; Hellstén 2006: 19).

## 6.1 Rutiinimainen suojaus

THL: n 2013 antamasta suosituksesta jokainen RhD-negatiivinen raskaana oleva nainen suojataan anti-D-immunoglobuliinipistoksella. Äitiysneuvolan seurantakäynnillä, raskausviikolla 28–30 suojataan vain ne RhD-negatiiviset äidit, joiden sikiö on todettu RhD-positiiviseksi. Mikäli sikiön veriryhmää ei tiedetä, saa äiti suojauksen. Tällä pystytään estämään loppuraskauden immunisaatioita. Rutiinimaisesta suojauksesta huolimatta 1,8 %:a raskaana olevista naisista immunisoituu. (Klemetti – Hakulinen-Viitanen 2013; Sainio – Kuosmanen 2014: 1239–1245a.)

Suomessa vuonna 2014 osana rutiinimaisesta suojausta, otettiin käyttöön sikiön RhD-veriryhmän määrittäminen. Raskausviikolla 24–26, kun RhD-negatiivisesta äidistä seulotaan toistamiseen veriryhmävasta-aineet, otetaan samalla näyte sikiön RhD-veriryhmämäärittystä varten. Tutkimus määritetään äidin plasmasta. Menetelmänä käytetään reaaliaikaista PCR:ää (rtPCR), jossa DNA:n monistuminen havaitaan fluoresenssin nousuna. Koska RhD-negatiivisella äidillä ei RHD-geeniä ole, on monistuva DNA peräisin sikiöstä. (Haimila 2014: 1–3; Sainio – Kuosmanen 2014: 1239–1245a.)

Tutkittua tietoa tämän menetelmän käyttämisestä sikiöperäisen DNA:n tutkimiseen löytyi paljon ja tulokset osoittivat menetelmän herkkyydeksi lähes 100 %:a. Kansallinen seulontakäytäntö on otettu käyttöön ainakin Ruotsissa, Alankomaissa sekä Tanskassa. Lisäksi Belgia, Ranska sekä Iso-Britannia ovat ottaneet alueellisia ohjelmia käyttöönsä sikiön RhD-veriryhmän määrittämiseksi. Vastikään Suomessa raportoidussa tuoreessa katsauksessa *Raskaudenaikaisten veriryhmäimmunisaatioiden seulonta ja ehkäisy* Sainio ja Kuosmanen kertovat sikiön RhD-veriryhmän merkityksestä raskaudenaikaisen anti-D-suojauksen kohdentamiseksi. Katsauksessa todettiin jopa 40 %:a anti-D-suojauksista olevan turhia, sikiön ollessa RhD-negatiivinen. Samalla huomautettiin anti-D-suojauksen kohdentamisen säästävän yli 3000 anti-D-rokoteannosta vuodessa. Myös eettiset kysymykset rokotteen valmistuksessa ja saatavuudessa tulisi Sainion ja Kuosmanen mukaan ottaa huomioon. Euroopan maiden todetaan olevan lähestulkoon riippuvaisia Yhdysvalloista tuotavasta anti-D-rokotteesta. (Sainio – Kuosmanen 2014: 1239–1245a; Haimila 2014.)

Asiaan on kiinnitetty huomiota myös muualla maailmassa. Isossa-Britanniassa rutiinimaisen rokottamisen eettisiä kysymyksiä on tutkittu juuri sikiön RHD-genotyyppityksen

myötä. Asiantuntijat ovat kyseenalaistaneet rokotusperusteita eritoten rutiininomaisesti kaikille RhD-negatiivisille äideille annettavasta suojauksesta. Varsinkin sikiön ollessa RhD-negatiivinen, rokottamisen todetaan olevan turhaa. Tutkimuksessa kyseenalaistetaan myös raskaana olevien naisten altistaminen verituotteille rokottamisen seurauksena, nykyteknologian mahdollistaessa sikiön veriryhmän määrittämisen vaivattomasti äidin plasmasta. (Kenti – Farrell – Soothill 2014: 87.)

## 6.2 Riskiperusteinen suojaus

Riskiperusteinen suojaus aloitettiin 1970–1980-luvulla todettujen hyötyjen perusteella. Anti-D-suojaus oli todettu synnytyksen jälkeen niin hyödylliseksi, että sen käyttöä laajennettiin muihinkin immunisaatiolle altistaviin tilanteisiin. Rokotteen tuoman suojan todettiin olevan kustannustehokasta verrattuna immunisaatioiden hoitoon. Suojausta alettiin käyttää alkuraskauden komplikaatioissa, kuten keskenmenon jälkeen ja raskaudenkeskeytyksissä. (Sainio – Kuosmanen 2014: 1239-1245a.) THL on suositellut anti-D-suojausta annettavaksi aina raskauksissa, joihin liittyy suurentunut verenvuodon riski. Suojaus annetaan silloin uudestaan, vaikka se olisi jo rutiinistikin annettu. Tällaisia riskejä voivat aiheuttaa muun muassa invasiiviset toimenpiteet, kuten lapsivesipunktio. Myös perätilan ulkokäännös on syy suojauksen antamiselle. (Klemetti – Hakulinen–Viitanen 2013; SPR 2013.)

## 6.3 Synnytyksen jälkeinen suojaus

Suomessa kaikki RhD-negatiiviset äidit ovat saaneet vuodesta 1969 alkaen anti-D-suojauksen synnytyksen jälkeen. Anti-D-immunoglobuliinilla äidin verenkiertoon päässeet sikiön punasolut poistetaan ennen äidin immuunijärjestelmän reagoitua niitä vastaan. Anti-D-suojaus annetaan synnytyksen jälkeen niille äidille, joiden lapsi on RhD-positiivinen. Lapsen veriryhmä selvitetään napaverinäytteestä. Äiti suojataan pistoksella jo synnytyslaitoksella, 72 tunnin kuluessa synnytyksestä. Ilman tätä suojausta niistä RhD-negatiivista äideistä, joiden lapsi on RhD-positiivinen, immunisoituisi 13–16 %:a. (Sainio – Kuosmanen 2014: 1239; Jarva – Meri 2011.) Koska myös muut veriryhmäantigeenit voivat aiheuttaa immunisoitumista, on huomioitava, että anti-D-suojauksella ehkäistään yksinomaan anti-D-immunisaatiota (Jarva – Meri 2011; Sainio – Kuosmanen 2012: 152).

## 7 Laboratoriomenetelmät Rh-vasta-aineiden tutkimiseen

Tässä kappaleessa on esitelty opinnäytetyön empiirisessä osuudessa käytetyt laboratoriomenetelmät. Näyteplasmasta voitiin erottaa anti-G-vasta-aine alloabsorptiomenetelmää käyttäen. Tämän jälkeen eluaatiomenetelmällä punasolun pintaan kiinnittyneet vasta-aineet irrotettiin happamaan puskuriin, josta ne osoitettiin vastaainetunnistuksella. Vasta-aineet tunnistettiin ID-geelitekniikkaa käyttäen sekä entsyymittettä antiglobuliinimenetelmällä. Vasta-ainepitoisuudet määritettiin titraamalla.

### 7.1 Veriryhmäserologiset menetelmät

Veriryhmäserologisissa menetelmissä tutkitaan vasta-aineen ja punasoluantigeenin välistä reagoitua. Määrityksissä käytetään testipunasoluja. IgM-luokan vasta-aineet agglutinoivat punasolut ilman käsittelyä tai reagensseja, mutta IgG-luokan pienikokoisten vasta-aineiden agglutinoitumiseen tarvitaan antihumaaniglobuliinia (AHG, anti human globulin) tai punasolujen käsittely reaktioita herkistävällä entsyymillä. Agglutinaatiossa punasolujen pintaan kiinnittyneet vasta-aineet saavat aikaan sakkautumisen, kun vasta-ainemolekyylit muodostavat siltoja punasolujen välille (kuvio 7.) Sakkautumisen muodostumista hankaloittaa punasolujen pinnalla vallitseva sähköinen varaus. Tämä negatiivinen sähkövaraus estää soluja pääsemästä riittävän lähelle toisiaan. Entsyymikäsittelyllä voidaan vähentää ionipilveä punasolun pinnalta. Tähän käytetään esimerkiksi papaiinia tai bromeliinia. (Hellstén 2006; Daniels – Bromilow 2010.) Näin IgG-luokan vasta-aineet saadaan reagoimaan näkyvästi ja punasoluantigeenin pintaan tarttunut vasta-aine voidaan osoittaa joko punasolujen hajoamisena tai punasolujen sakkautumisena. Antigeeni-vasta-ainereaktioon *in vitro* vaikuttavat ionikonsentraation lisäksi antigeenin määrä, vasta-aineen määrä ja spesifisyys, sekä inkubaatioaika- ja lämpötila. (Seppälä – Söderlund - Lappalainen – Hedman 1994: 178; Seppälä – Meri 2011: 91–92; Hellstén 2006: 45–46.)

Spesifisyydellä tarkoitetaan vasta-aineen sitoutumista erittäin voimakkaasti vain tiettyyn epitooppiin. Kuitenkin erilaisista antigeeneistä löytyy samankaltaisuuksia, joiden vuoksi jokin yksittäinen vasta-aine voi tarttua eri molekyylin vastaavanlaiselle pinta-alueelle. Siihen, kuinka voimakkaasti vasta-aine tarttuu jonkin toisen antigeenin pintaan vaikuttaa sitoutumisvoima, joka dominoi kahden molekyylin välillä yhdessä sitoutumiskohdassa. Tämä antigeenin ja vasta-aineen muodostama keskinäinen sidosvoima (affiniteetti) vaikuttaa vasta-aineen voimakkuuteen, koska antigeeni-vasta-ainepari on muo-

dostanut yhteisen kompleksin keskenään. Tällaisen, jopa usean toisiinsa sitoutuvan voiman (aviditeetin) tiedetään vaikuttavan reaktion voimakkuuteen. Diagnostiikkaa tulkittaessa voidaan tuoreessa immunisaatiossa todeta matala aviditeetti, sen noustessa ajan kuluessa. (Seppälä ym 1994; Seppälä – Meri 2011; Hellstén 2006.) Opinnäytetyössä luovutetut punasolut käsiteltiin papaiinilla. Geelitekniikassa käytössä oli sekä LISS/Coombs että NaCl-geelikorit. Reagenssitiedot löytyvät liitteestä 2.



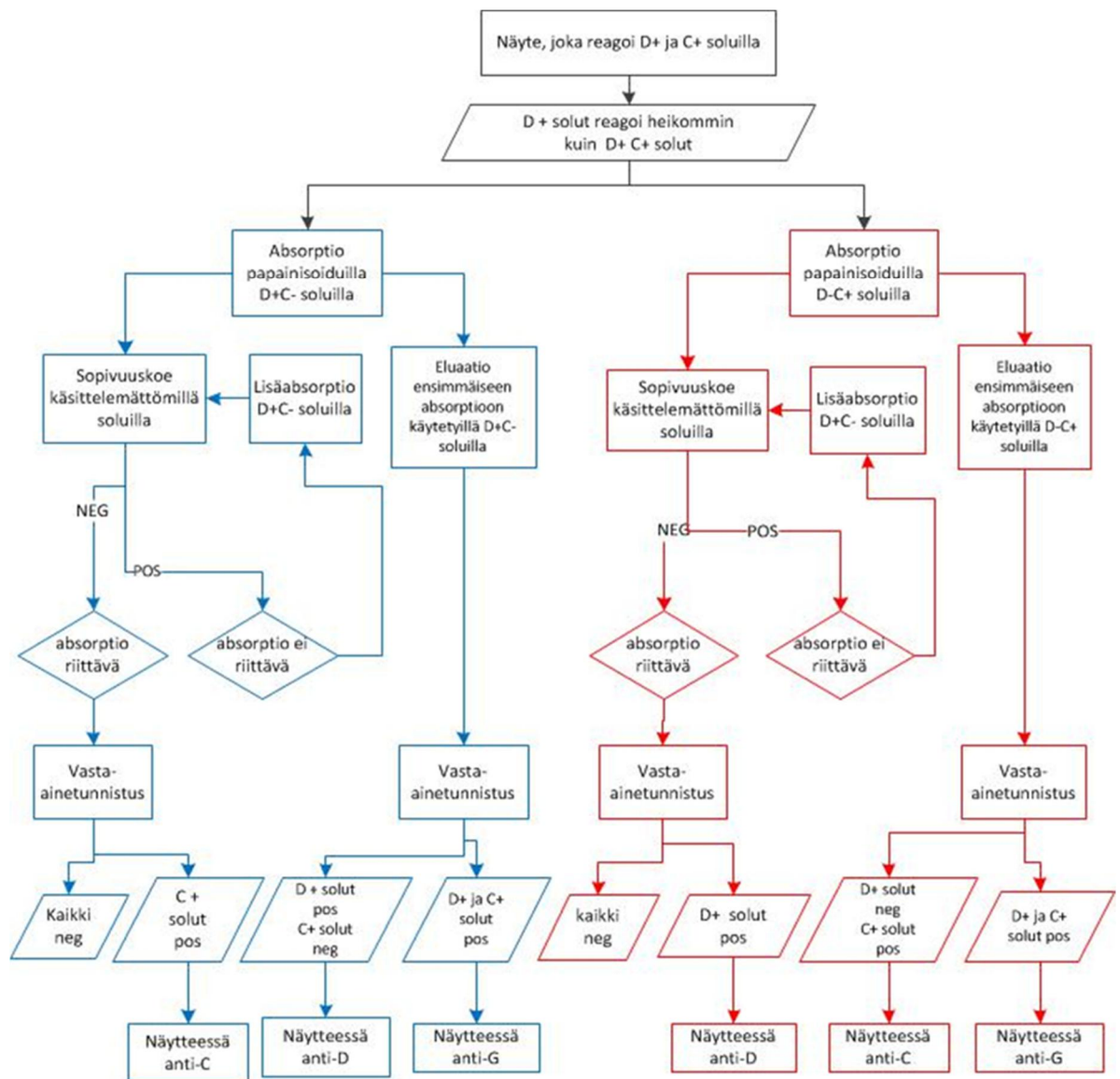
Kuvio 7. Vasemmalla nähdään vasta-ainemolekyyleiden muodostamat sillat punasolujen välillä, oikeanpuoleisessa kuvassa siltoja ei ole muodostunut. (Mukaillen lähteestä Daniels – Bromilow 2007.)

## 7.2 Alloabsorptio

Alloabsorptiomenetelmässä halutut punasoluvasta-aineet poistetaan näyteplasmasta lisäämällä vasta-aineeseen kohdistuvan antigeenin sisältäviä punasoluja, jolloin vasta-aine sitoutuu punasolun pinnalle. Tutkittava plasma on absorboitava vähintään kolme kertaa. Tämän jälkeen plasma tutkitaan antigeeneiltään tunnettujen punasolujen avulla. Mikäli absorptio ei poista vasta-ainetta näytteestä, voi kyseessä olla vasta-aine, joka ei lainkaan reagoi käytettävien punasolujen kanssa. (Roback – Grossman – Harris – Hillyer 2011: 506.)

Anti-G vasta-aine voidaan tutkia absorboimalla tutkittavaa plasmaa kuviossa 8. esitetyn tulkintakaavion mukaisesti D+C- ja D-C+ solupareilla. D+C- soluilla absorboidaan plasmasta anti-D- ja anti-G-vasta-aine, jolloin plasmaan jää mahdollinen anti-C. D-C+ soluilla taas absorboidaan anti-C- ja anti-G-vasta-aine, jolloin plasmaan mahdollisesti

jää anti-D. Vasta-ainetunnistuksella osoitetaan plasmaan jääneet vasta-aineet. (Korhonen 2015). Alloabsorptiota voidaan käyttää myös vasta-ainetunnistusta häiritsevien panagglutiiniityyppisten vasta-aineiden poistamiseen (Tsimba – Chitsva – Bishop – Kezeor 2012: 88–90; Korhonen 2015a).



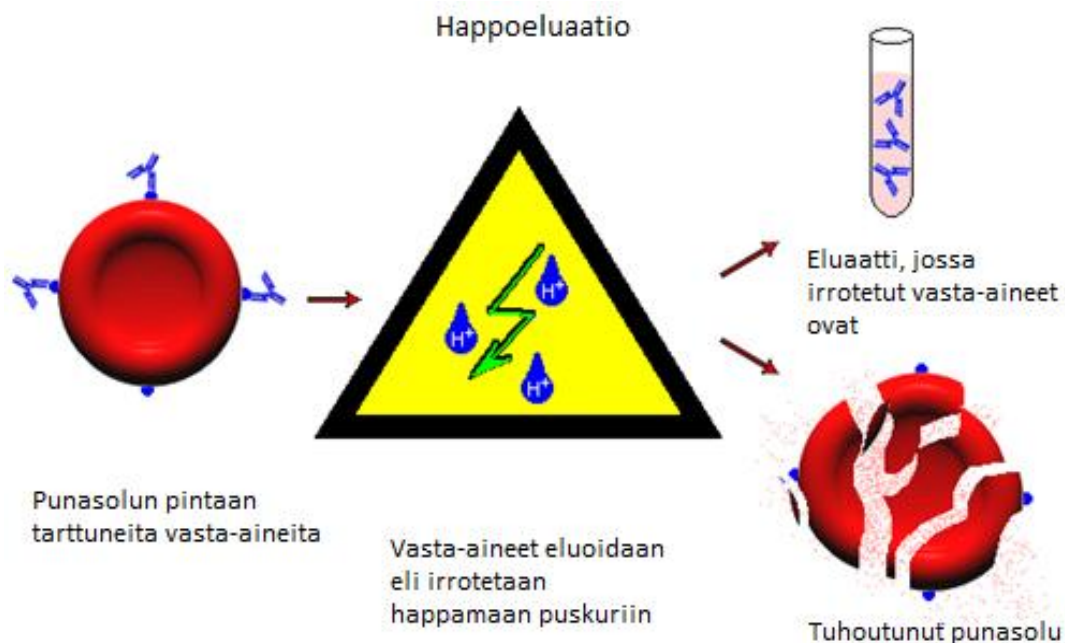
Kuvio 8. Anti-G tulkintakaavio (Korhonen 2015.)

### 7.3 Eluaatio

Punasolun pintaan kiinnittynyt vasta-aine voidaan eluoida (irrottaa) sitoutuneesta anti-geeni-vasta-aine-kompleksista, häiritsemällä näiden kompleksien sidosvoimaa. Tämä voidaan tehdä muuttamalla liuoksen pH:ta. Menetelmässä IgG-luokan vasta-aineilla päällystetyt punasolut pestään perusteellisesti. Pesun tarkoituksena on poistaa kaikki sitoutumattomat proteiinit säilyttäen kuitenkin punasoluun sitoutunut vasta-aine hajottamatta punasolua. Solujen pesuliuksella pestyt punasolut suspendoidaan eluointipuskuriin, jonka pH on alhainen. Sen tarkoituksena on erottaa toisistaan punasolut ja siihen sitoutuneet vasta-aineet. Hajonneet punasolut ja irrotetut vasta-aineet erotetaan sentrifugoimalla suspensio. Supernatantti, joka sisältää punasoluista irrotetut vasta-aineet, neutraloidaan takaisin normaaliin pH:n neutralointipuskurilla. Jäljelle jäävästä eluaatista irronneet vasta-aineet voidaan osoittaa veriryhmäserologisilla menetelmillä. Pesuliuosta testaamalla, voidaan havaita lopullisten pesukertojen riittävyys. Sen ollessa negatiivinen, eluointi on onnistunut ja eluaatissa havaittu vasta-aine on punasoluvasta-aine eikä mikään muu plasman epäspesifinen osa. (Hinrichs – Keith 2014: 113–6.) Opinnäytetyössä käytettiin happoeluaatiota, jonka periaatetta selvitetään kuvion 9. avulla. Siinä punasolujen pintaan kiinnittyneet vasta-aineet eluointiin pH-arvoltaan happamaan eluointipuskuriin, josta ne osoitettiin neutraloinnin jälkeen titraamalla. Titrattu vasta-aine tunnistettiin tunnistuspaneelilla. Opinnäytetyössä happoeluaatio tehtiin ensimmäisessä absorptiossa käytetyillä D+C- sekä D-C+ soluilla. (Korhonen 2015a.)

Eluaatti eli eluoinnissa syntynyt liuos, sisältää happoeluaatiossa punasolujen pinnasta tarkoituksenmukaisesti poistetut vasta-aineet. Eluaatista tehtiin vasta-ainetunnistus, jonka tuloksia verrattiin absorboidun plasman tuloksiin. (Korhonen 2015a.)





Kuvio 9. Happoeluaation periaate (Copyright © by Dia Med Ag 1785-Cressier s/Morat Switzerland)

#### 7.4 Punasoluvasta-aineiden tunnistus ID-geelitekniikalla

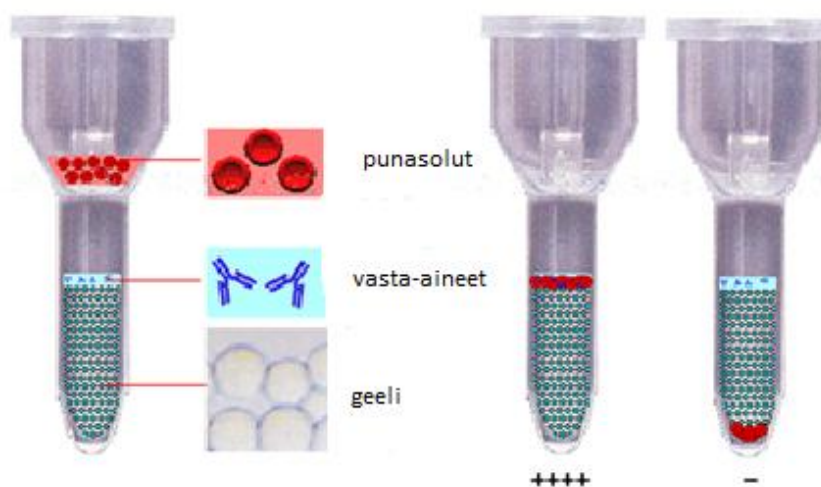
Geelitekniikka toimii ensisijaisena menetelmänä tunnistettaessa punasoluvasta-aineita potilas-, verenluovuttaja- tai neuvolanäytetutkimuksissa. Punasoluvasta-aineiden tunnistus tehdään sekä entsyymi- että antiglobuliinimenetelmällä. Punasoluvasta-aineiden tunnistuksessa käytetään yhdentoista fenotyypitetyn O-veriryhmään kuuluvan punasolun paneelia. Yhdessä geelikortissa on kuusi pylvästä, joten yhtä näytetutkimusta varten tarvitaan kaksi geelikorttia. Viimeiseen pylvääseen pipetoidaan tunnettu punasolususpensio kontrolliksi. Periaatteena menetelmässä on, että vasta-aineen ja antigeenin välinen reaktio tapahtuu mikropylväässä. (Veripalvelu 2014: Tutkimusmenetelmä VR-3463.)

Geelikortteihin, kyvettiosan reaktioalueelle pipetoidaan hyvin sekoitetut punasolupaneelin solususpensiot sekä tutkittava näyteplasma. Geelikortteja inkuboidaan lämpöhauteessa, jonka jälkeen ne sentrifugoidaan ja reaktiot luetaan valopöydällä. Agglutinoituneet punasolut voidaan todeta kuvion 10. mukaisesti mikropylväistä niiden jäädessä joko pylvään pinnalle tai geeliin suuremmalle alueelle. Mikropylvään pohjaan

painuneiden punasolujen pintaan ei ole vasta-aineita tarttunut ja tulos on negatiivinen. (Veripalvelu 2014: Tutkimusmenetelmä VR-3463.)

Antiglobuliinimenetelmässä käytetään LISS/Coombs–geelikortteja, joiden mikropylväiden sisältämässä geelissä on antiglobuliinireagenssia. (valmistajatiedot geelikorteista löytyvät liitteestä 2.) Se agglutinoi punasoluja, joiden pinnalle vasta-aineet ja komplementin komponentit ovat takertuneet. Mikäli kyseessä on EDTA-näyte, ei komplementilla ole osuutta reaktiossa EDTA:n inaktivoimassa komplementin komponentin. Menetelmässä käytetään vasta-aineen ja antigeenin sitoutumista nopeuttavaa liuosta, jonka ionivahvuus on matala. (LISS, low ionic strength solution). (Veripalvelu 2014: Tutkimusmenetelmä VR-3463.)

NaCl–kortit sisältävät geeliä sekä puskuria. Entsyymikäsittelyn pilkkoessa solun pinnasta negatiivisesti varautuneita sialoglykoproteiineja, pääsevät punasolut lähemmäksi toisiaan ja myös IgG-luokan vasta-aine pystyy agglutinoimaan ne. (Veripalvelu 2014: Tutkimusmenetelmä VR-3463.)



Kuvio 10. Geelitekniikan periaate (Mukaillen: Copyright © by Dia Med Ag 1785-Cressier s/Morat Switzerland)

### 7.5 Sopivuuskoe geelitekniikalla

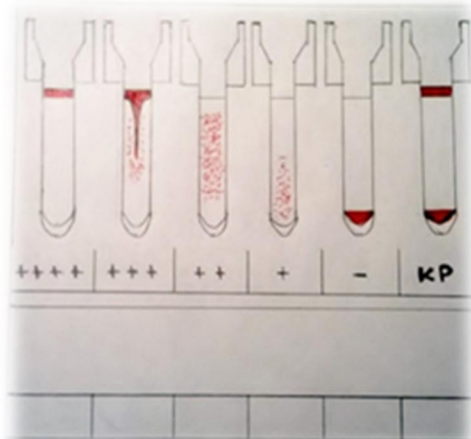
Sopivuuskokeessa tarkoituksena on löytää potilaan plasman ja siirrettäväksi aiottujen punasolujen välinen serologinen epäsopevuus. Serologinen epäsopevuus selvitetään tutkimalla, onko potilaan plasmassa vasta-aineita, jotka reagoivat siirrettyjen punasolujen kanssa. Sopivuuskoe tehdään LISS/Coombs-geelikortteja käyttäen. (Veripalvelu 2013: Tutkimusmenetelmä VR-3462.)

### 7.6 Vasta-ainetason eli titterin määrittäminen

Vasta-ainetason eli titterin määrittäminen on semikvantitatiivinen menetelmä, jonka tarkoituksena on selvittää vasta-ainepitoisuus plasmasta tai seerumista. Titterimäärittäystä varten valmistetaan laimennossarja, jonka jälkeen tunnettujen punasolujen avulla laimennossarja tutkitaan joko epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä tai suoraa agglutinaatiomenetelmää käyttäen. Tulos eli titteri on sen laimennoksen käänteisluku josta agglutinaatio on edelleen silmämääräisesti havaittavissa. Mitä suurempi on titteri, sitä suurempi on vasta-ainepitoisuus. Vasta-ainetitterin tulos luetaan silmämääräisesti suurimmasta laimennoksesta pienempään, tarkoituksena niin kutsutun prozone-ilmion aiheuttaman virhetulokinnan poissulkeminen. Prozone-ilmio on seurausta vasta-ainepitoisuuden liian suuresta pitoisuudesta, jolloin antigeeni ei riitä agglutinoimaan kaikkia vasta-aineita. Ne vasta-aineet, jotka eivät ole agglutinoituneet, voivat laskeutua testikuopan pohjalle antaen virheellisen negatiivisen tuloksen. Titterimenetelmää voidaan käyttää myös punasolun pinnalla olevan antigeenin määrän määrittämiseen. (Grossman – Harris – Hillyer – Robak 2011: 907; Veripalvelu 2015b: Tutkimusmenetelmä VR-90-40-2974-L5; Renton – Hancock 1958: 49–52.)

### 7.7 Veriryhmäserologisten reaktivoimakkuuksien arviointi

Vasta-ainepitoisuus, aviditeetti ja affiniteetti punasolujen antigeenirakenteiden määrän ohella vaikuttavat siihen, kuinka voimakas reaktio on. Nämä reaktiotulokset on kirjattava aina voimakkuuden ennalta sovittua gradeerausasteikkoa käyttäen kuvion 11. mukaisesti. (Seppälä – Meri 2011: 91–92; Veripalvelu 2009: Yleisohje VR-YO-043.)



Kuvio 11. Gradeerausasteikko ++++ kaikki solut nähdään geelin päällä, +++ suurin osa soluista on tasaisena kerroksena geelin päällä ja osa soluista taas on kulkeutunut alaspäin, ++ soluja nähdään koko geelin alueella, + osa soluista on geelin alueella ja osa taas pylvään pohjalla. – kaikki solut ovat nappina pylvään pohjalla. **KP** tarkoittaa kaksoispopulaatiota, jossa osa soluista agglutinoituu ja osa ei. (Pylkki, Niina 2015. Mukailten: Veriryhmäserologisten tulosten lukeminen VR-YO-043

## 7.8 Menetelmien luotettavuuden arviointi ja toiminnan laatu

Veripalvelun toimintaa valvoo säännöllisin tarkastuksin Lääkealan turvallisuus ja kehittämiskeskus Fimea (Finnish Medicines Agency). Toimintaa ohjaavat Veripalvelulaki ja kansalliset määräykset. Laatua ylläpidetään Veripalvelun toimintajärjestelmän avulla. Veripalvelun laboratorio on FINAS akkreditoitu. Laboratoriomenetelmien ja työskentelyn laadunohjaus on toteutettu sekä sisäisin että ulkoisin laadunohjauksen keinoin. Käytetyt perusmenetelmät ovat rutiinikäytössä. Menetelmät ovat validoituja ja virheiden mahdollisuus on minimoitu oikeilla työskentelytavoilla. Jokaiselle työvaiheelle on olemassa ohjeet ja kaikki perustuu niiden mukaan toimimiseen. Reagenssierien toimivuutta valvotaan ja analyysisarjoihin lisätään aina tunnetun reaktion antavat kontrollinäytteet. Kaikkien laitteiden toimintaa ylläpidetään säännöllisesti tarkastuksilla ja kaikki kirjataan asianmukaisesti. (Veripalvelu 2008.)

## 8 Opinnäytetyön toteutus ja tavoitteet

Opinnäytetyö oli yhteensä 15 opintopisteen arvoinen opintosuoritus, jonka tarkoituksena oli kehittää opiskelijan valmiuksia oman koulutusalan opintoihin liittyvissä asiantuntijatehtävissä (Metropolia ammattikorkeakoulu 2014). Opinnäytetyötä varten tarvittiin tutkimuslupa, joka myönnettiin heinäkuussa 2014. Työ eteni suunnitellun aikataulun mukaisesti valmistuen maaliskuussa 2015. Empiirinen osuus toteutui Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun Veriryhmätutkimusten osastolla, Helsingin Kivihaassa tammi-kuussa 2015.

Aiempien tutkimustulosten perusteella luotiin opinnäytetyölle selkeät tavoitteet. Oli tarpeen ottaa käyttöön menetelmä, jolla anti-G-vasta-aine voidaan luotettavasti erottaa anti-D- ja anti-C-vasta-aineyhdistelmästä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli antaa vastaukset alla esitettyihin tutkimuskysymyksiin. Vastaukset näihin kysymyksiin olivat erittäin tärkeitä menetelmän käyttöönottoa ajatellen. Vasta-ainetunnistuksessa näkyvien reaktioiden voimakkuutta vertailtiin keskenään, jotta jatkossa voitaisiin tunnistaa juuri ne näytteet, joista anti-G-vasta-ainetta olisi tulosten perusteella syytä epäillä. Aiemmissä tutkimuksissa vasta-ainepitoisuuksien oli todettu laimenevan absorptiossa joten oli merkittävää saada tietoa, kuinka paljon laimennemista tapahtuu. Pää tavoitteeksi asetettiin seuraavat tutkimuskysymykset, joihin opinnäytetyön toivottiin tuovan vastaukset.

1. *Millaiset reaktiot vasta-ainetunnistuksessa antavat aiheen anti-G (Rh) vasta-aineen epäilyyn?*
2. *Laimeneeko vasta-ainepitoisuus absorption aikana?*

Opinnäytetyö toteutui pääosin laadullisena tutkimuksena, jonka tuloksena syntyi konkreettinen työelämän tarpeita kehittävä tuotos. Otettaessa käyttöön uutta tutkimusmenetelmää, yksinkertaiseksi työhypoteesiksi asetettiin onnistuminen tai epäonnistuminen. Eri menetelmien taustateoria ja tutkittu tieto toimivat opinnäytetyössä sekä keinona että päämääränä. Teoreettinen aineisto koostui pääosin artikkeleista, aiemmista aiheita koskevista tutkimuksista sekä aiheita käsittelevästä kirjallisuudesta. Suomenkielistä materiaalia ei juuri ollut saatavilla, jonka vuoksi valtaosa käytetyistä lähteistä oli kansainvälisiä.

Eettisyys ja tutkimusmateriaalin ainutkertaisuus sekä Veripalvelun arvot huomioitiin opinnäytetyön aikana. Näytteitä käsiteltiin samoin kuin aina potilasnäytteitä, tietosuoja huomioiden. Käsitellyt näytteet esiintyvät opinnäytetyössä vain annetuilla juoksevilla tutkimusnumeroilla. Tutkittavia näytteitä työstettiin vastuullisesti, erityistä huolellisuutta noudattaen. Opinnäytetyön kaikki työvaiheet suoritettiin bioanalytikolta vaadittavien eettisten periaatteiden mukaisesti ottaen huomioon Veripalvelun tarkat laatuksiteerit.

Luovutettujen punasolujen sekä plasman käyttö tutkimustarkoituksessa on tarkoin määritelty Veripalvelussa. Käytäntönä on, että verenluovuttajalta kysytään verenluovutuksen yhteydessä lupa käyttää luovutettua verta Veripalvelun toiminnan kehittämistarkoitukseen. Opinnäytetyössä käytettävät punasolut hankittiin juuri tutkimustarkoitusta

varten. Reagenssisoluja varten Veripalveluun kutsutaan erikseen sellaiset luovuttajat jotka käyvät vapaaehtoisesti luovuttamassa vertaan vasta-ainetunnistuksissa käytettyjen tunnettujen paneelisolujen valmistusta varten. (Korhonen 2015.) Verta tarvitaan sairaaloiden ja potilaiden lisäksi jatkuvasti tiedon ja menetelmien kehittämistä varten myös tutkimustarkoituksiin. Veripalvelussa painotettiin, että jokainen luovutettu veripussi on tärkeä, käytettiinpä siitä tehty verivalmiste sitä tarvitsevalle potilaalle, paneelisoluihin tai tutkimusta varten (Korhonen 2015).

## 9 Rh-vasta-aineiden tutkiminen

Koko empiirisen vaiheen strateginen osuus kuvataan tässä kappaleessa. Alloabsorptioeluaatio oli monivaiheinen ja hidaskäyttöinen menetelmä. Työvaiheet tehtiin pääosin käsityönä ja inkubaatioajat vaikuttivat työvaiheiden joustamattomuuteen. Rh-vasta-aineiden tutkimusvaiheeseen oli varattu kahden viikon työstöaika ja tutkimustulokset käsiteltiin vasta sen jälkeen. Alkuperäisestä työsuunnitelmasta poiketen, kaikkia näytteitä ei ehditty tutkia. Vaikka tutkimukseen valikoitujen näytteiden määrä poikkesi suunnitellusta, katsottiin määrän riittävän tulosten luotettavaan tulkintaan ja niistä tehtäviin johtopäätöksiin.

Asiantuntija valitsi kaikista kerätyistä näytteistä tutkittavat näytteet eri vasta-ainepitoisuuksien perusteella siten, että tutkimuksessa oli mukana niin heikkoja kuin vahvoja vasta-ainepitoisuuksia. Koska menetelmää validoitiin opinnäytetyön ohella, tutkimuksessa oli mukana sekä neuvola- että potilasnäytteitä, joka oli edellytys validointia varten. (Korhonen 2015).

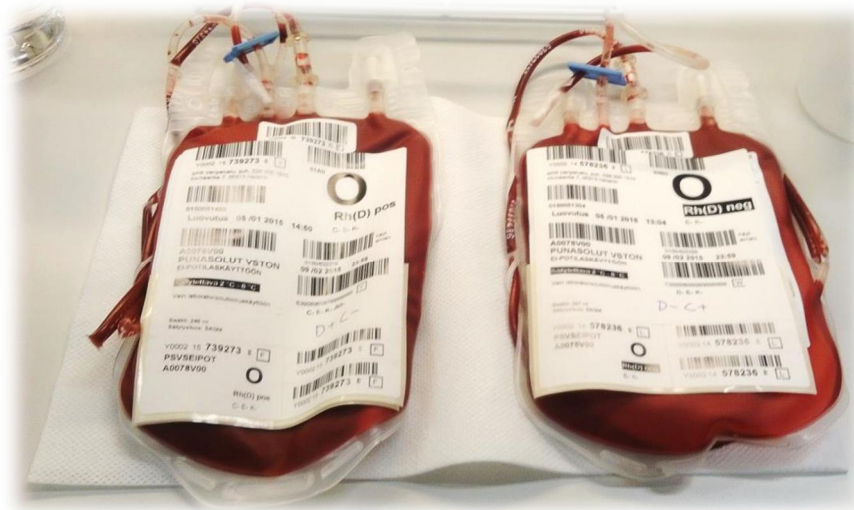
### 9.1 Aineisto

Aineisto koostui Veripalvelun keräämistä ja pakastamista potilas-, luovuttaja- sekä neuvolanäytteitä, joista oli jo todettu anti-D-, C-, tai G-vasta-aine tai jokin näiden kolmen yhdistelmästä. Näytteitä tutkittiin yhteensä 17 (n= 17) 3 potilasnäytettä, 2 luovuttajanäytettä ja 10 neuvolanäytettä. Opinnäytetyössä mukana oli myös näyte, joka oli aiemmin tutkittu kansainvälisessä referenssilaboratoriossa Bristolissa, samaa absorptioeluaatiomenetelmää käyttäen. Näyttemateriaalina oli EDTA-plasma. Näytteitä oli säilytetty asianmukaisesti pakastimessa -20 °C asteessa. Käsittelemättömistä näytteis-

tä oli ennen absorptiota tehty ABO- ja Rh-veriryhmämäärityksen lisäksi punasoluvasta-aineiden tunnistus, sopivuuskoe, suora antiglobuliinikoe sekä tyypitykset ja titterit.

## 9.2 Punasolut

Anti-G-vasta-aineen osoittamista varten käytettiin fenotyyppitettyjä luovuttajasolupareja D+C- ja D-C+. Luovutetut punasolut olivat O-veriryhmää ja Rh-fenotyypin mukaisesti tyypitettyjä punasoluja, jotka oli hankittu juuri tätä tutkimusta varten (kuvio 12.).



Kuvio 12. Tutkimuksessa käytetyt punasoluparit

## 9.3 Välineet, laitteet ja reagenssit

Työvaiheen aikana käytetyt välineet ja laitteet olivat jokapäiväisessä käytössä Veriryhmätutkimusten laboratoriossa, ne olivat kalibroituja ja huollettuja. Huollot ja ylläpitotoimet oli kirjattu asianmukaisesti ja laitteilla oli nimetyt vastuhenkilöt. Kaikki opinnäytetyössä käytetyt laitteet ja välineet on esitelty tarkemmin liitteessä 2.

Jokapäiväisenä rutiinina, ennen työn aloittamista oli huomioitava, että inkubaattorin lämpötilan tuli olla työohjeen määräämällä tasolla ennen käyttöä. Lukema kirjattiin joka aamu ylös. Vesihauteen lämpötila tuli myös tasata oikeaan +37 °C lukemaan ennen absorptio aloittamista. Kuviossa 13. ja 14. nähdään punasoluvasta-aineiden tunnistukseen käytettävä ID-inkubaattori ja ID-korttisentrifugi. (valmistajatiedot löytyvät liitteestä 2).

Veripalvelun oma liuoslaboratorio valmistaa suurimman osan Veripalvelussa käytettävistä liuoksista. Liuokset, joita ei työn alkaessa ollut saatavilla, oli valmistettava itse. PBS-käyttöliuos sekä papaiinireagenssi valmistettiin välittömästi työn alkaessa punasolujen entsyymikäsittelyä varten. Valmistettu liuos oli käytettävä saman päivän aikana. Toiselle viikolle oli sen vuoksi tehtävä uusi oma eränsä. Papaiinireagenssia valmistettaessa papaiinia sulatettiin  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  asteen lämpöhauteessa ja se jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi ennen käyttöä. Papaiini oli pakastettuna 5 ml:n lasipulloihin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  asteeseen. Papaiinireagenssi valmistettiin mittalasia käyttäen lisäten Rh-papaiinia PBS-puskurin käyttöliuokseen. (Korhonen 2015.) Muut työssä käytetyt reagenssit tulivat liuoslaboratoriosta ja olivat käyttövalmiita. Reagenssilista löytyy liitteenä 2.



Kuvio 13. ID-Inkubaattori sekä ID-Sentrifugi.



Kuvio 14. Geelikortit ID-sentrifugissa.



#### 9.4 Punasolujen käsittely ennen työvaiheita

Tutkimusta varten tarvittiin pestyjä punasoluja. Soluja pestiin valmiiksi noin viikon ajalle. Luovutettujen punasolujen seassa oli säilöntäliuos, joka oli poistettava ennen pesua. Ensin punasolupussista laskettiin letkun kautta punasoluja useampaan 50 ml:n Falcon-putkeen kuten kuviossa 15. Putkiin oli merkitty asianmukaisesti D+C- ja D-C+.

Sentrifugoimalla putkia kymmenen minuuttia, säilöntäliuos saatiin erotettua punasoluista. Supernatantti (säilöntäliuos pinnalla) poistettiin pipetoimalla pinta mahdollisimman tarkasti. Loput säilöntäliuoksesta poistui pesujen yhteydessä. Säilöntäliuoksen poistamisen jälkeen punasolut oli pestävä kolme kertaa. (Veripalvelu 2015: Valmistusohje VR-40- 2974.)

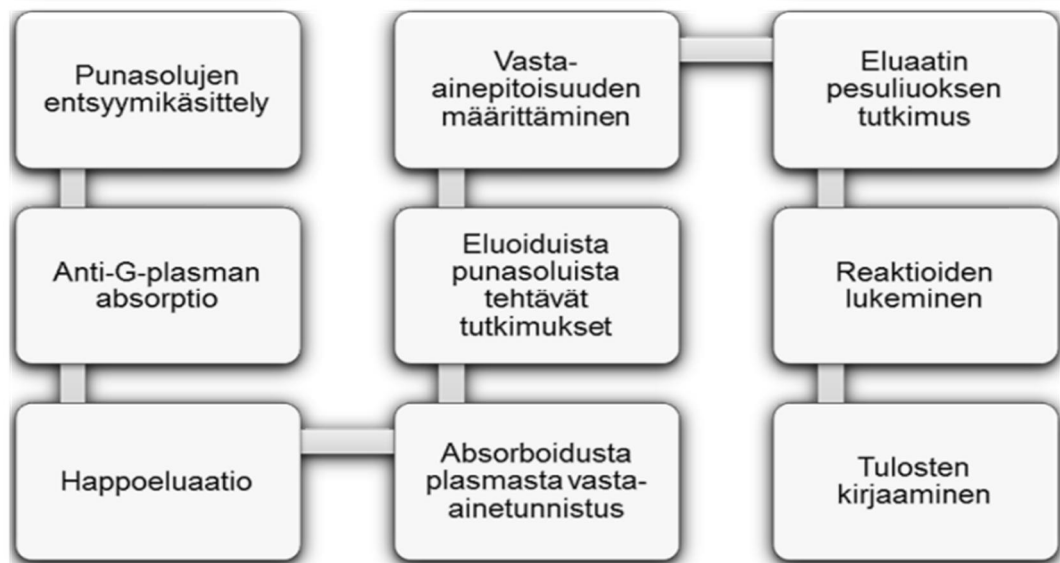
Punasolujen pesua varten Falcon-putkeen lisättiin fysiologista keittosuolaliuosta sekoittaen putkia sen jälkeen huolellisesti. Putkia johon keittosuola oli lisätty, sentrifugoitii kymmenen minuuttia 2100 g:n kierroksilla ilman jarrua. Tämän jälkeen supernatantti imettiin vesi-imulla pois. Viimeisen pesun jälkeen keittosuolaliuos imettiin erityisen huolellisesti pois näytteen laimenemisen estämiseksi. (Veripalvelu 2015: Valmistusohje VR-40- 2974.)

#### 9.5 Työn vaiheiden kuvaus

Kuvioon 16. on koottu havainnollistamaan työn vaiheet ja etenemisprosessi säilöntäliuoksen poistamisen ja punasolujen pesujen jälkeen. Vaiheista kerrotaan tarkemmin tässä osiossa. Pikaohje laboratoriotyön vaiheista löytyy opinnäytetyön liitteenä 1.



Kuvio 15. Punasolujen siirto



Kuvio 16. Työn vaiheiden kuvaus

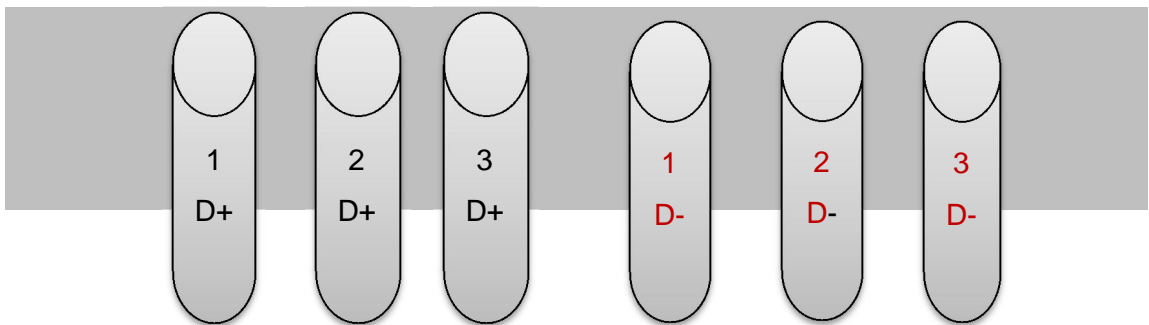
## 9.6 Punasolujen entsyymikäsittely

Ennen absorptiota punasolut oli käsiteltävä entsyymillä, koska entsyymikäsittely tehostaa absorptiota erityisesti Rh-vasta-aineilla. Punasolut käsiteltiin papaiinilla niin, että pestyjen ja pakattujen solujen päälle lisättiin papaiiniliuosta suhteessa 1:3. Putket sekoitettiin huolellisesti, inkuboitii sitten kolmekymmentä minuuttia, kymmenen minuutin välein sekoittaen 37 °C vesihautessa. Inkuboinnin jälkeen putkia sentrifugoitiin kymmenen minuuttia 2100 g:n kierrosnopeudella ilman jarrua, jonka jälkeen supernatantti imettiin vesi-imulla pois. Solut pestiin fysiologisella keittosuolaliuoksella kolme kertaa samalla tavoin kuin edellisen vaiheen pesukäsittelyn aikana. Viimeisellä pesukerralla keittosuolaliuos imettiin huolellisesti pois, koska putkeen jäänyt keittosuolaliuos sekoituu plasmaan absorptioiden aikana ja saattaa siten laimentaa näytettä. Jos näyte laimenee liikaa, heikot vasta-aineet eivät tule esiin vasta-ainetunnistuksessa absorption jälkeen.

Lopuksi yhdestä putkesta pestyjä, pakattuja ja papainisoituja soluja tehtiin 0,8 % solususpensio ID-Diluent-2-liuokseen ja 0,8 % solususpensio PBS-liuokseen. Liuokset toimivat punasoluvasta-aineiden tunnistuksessa kontrolleina, ID-2 AG-geelikortilla ja PBS NaCl-geelikortilla. (Veripalvelu 2015: Valmistusohje VR-40- 2974.)

### 9.7 Anti-G-plasman-absorptio

Absorptio aloitettiin jakamalla punasoluja sama määrä kolmeen 10 ml:n muoviputkeen. Putket merkittiin näytetunnisteen lisäksi kuten kuviossa 17. numeroituna yhdestä kolmeen. Putkiin oli myös merkitty, oliko kyse D-positiivisista vai D-negatiivisista punasoluista.



Kuvio 17. Absorptioputkien merkintä (Pylkki, Niina 2015)

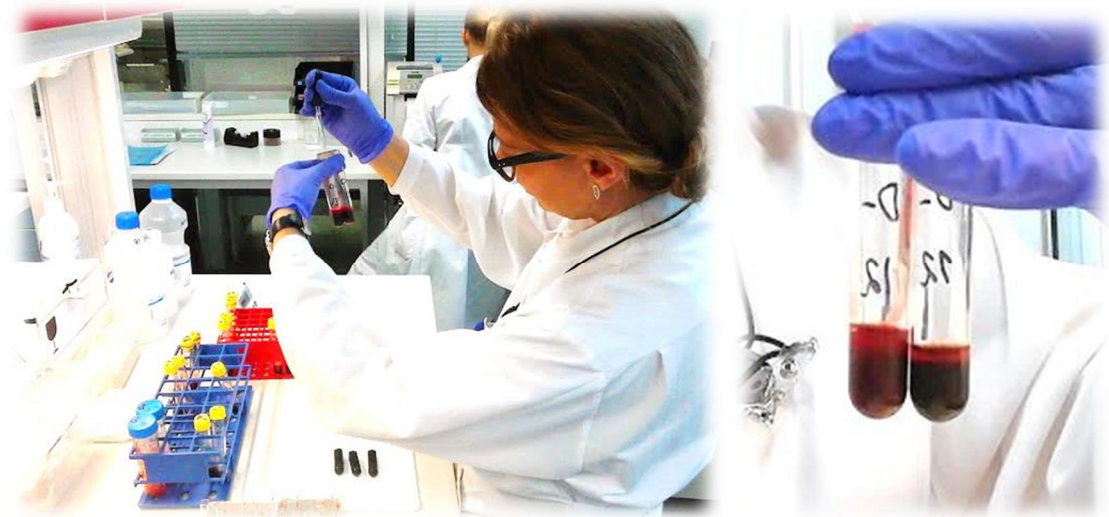
Kuhunkin putkeen lisättiin papainisoituja punasoluja yhtä paljon. D(+) putkeen D-positiivisia ja D(-) putkeen D-negatiivisia punasoluja. Sen jälkeen ensimmäisiin putkiin (D+1) ja (D-1) lisättiin saman verran absorboitavaa plasmaa kun putkissa oli punasoluja. Korkit suljettiin ja putkia sekoitettiin huolellisesti, jonka jälkeen niitä inkuboitiin 37 °C vesihautessa kolmekymmentä minuuttia. Inkuboinnin aikana putkia oli sekoitettava (vorteksointi) kymmenen minuutin välein huolellisesti mutta varovaisesti Vortexputkisekoittajalla (kuvio 18.)

Inkuboinnin jälkeen punasolut ja plasma erotettiin sentrifugoimalla putkia viisi minuuttia 2100 g:n nopeudella. Eroteltu plasma pipetoitiin seuraaviin putkiin (D+2) ja (D-2), jonka jälkeen ensimmäisessä absorptiossa käytetyille punasoluille aloitettiin välittömästi happoeluaatio.



Kuvio 18. Vorteksointi

Sen vaiheita kuvataan jäljempänä. Putkien (2D+) ja (2D-) absorptiota jatkettiin ensimmäisen absorptio mukaisesti, jonka jälkeen absorboitu plasma siirrettiin putkiin (D3+) ja (D3-) ja absorboitiin vielä kerran samaa kaavaa noudattaen. Viimeisessä vaiheessa kolmannen absorptio jälkeen, plasma eroteltiin Wasserman-putkiin ja merkittiin tunnistetietojen lisäksi ”*absorboitu plasma*” merkinnällä. (Veripalvelu 2015: Työohje VR-40-2974.)



Kuvio 19. Plasma pipetoitiin varovasti seuraavassa putkessa olevien punasolujen päälle

## 9.8 Haploeluaatio

Ensimmäiseen absorptioon käytettyjen punasolujen haploeluaatio aloitettiin välittömästi. Eluaatiossa kerran absorboidut solut pestiin ensin jääkaappikylmällä solujen pesuliuksella viisi kertaa sekoittaen ja sentrifugoiden aina pesujen välissä (kuvio 20.) Solujen pesuliuksen tuli olla kylmää, jotta absorptiossa kiinnittyneet vasta-aineet eivät irtoa punasolujen pinnalta. Pesut oli tehtävä huolellisesti ja pesuliuksen poistoon käytettiin vesi-imua. Viimeisen pesun jälkeen, pesuliusta otettiin talteen Wasserman-putkeen (kuvio 21). Pesuliusta varten otettava määrä ei ollut tarkka. Pesuliuos toimi kontrollina eluaation onnistumiselle. Seuraavaksi pestyjä punasoluja lisättiin kuvion 21. mukaisesti puhtaaseen Wasserman-putkeen. Solujen päälle pipetoitiin eluointipuskuria niin, että punasoluja ja eluointipuskuria oli kumpaakin sama määrä aina näytemäärästä riippuen. Putki korkitettiin ja sitä sekoitettiin varovasti käännelleen muutamia kertoja. Sen jälkeen putkea sentrifugoitiin välittömästi serologisella sentrifugilla 1000 g:n kierrosnopeudella kahden minuutin ajan. Sentrifugoitu eluaatti (supernatantti) siirrettiin

lasisella Pasteur-pipetillä tarkasti puhtaaseen Wassermann-putkeen. Eluaatti neutraloitiin lisäämällä eluaattia ja neutralointipuskuria täsmälleen sama määrä molempia sekoittaen sitten Vortex-putkisekoittajalla huolellisesti. Tämän jälkeen putkea sentrifugoitii jälleen kaksi minuuttia. Viimeisenä kirkas eluaatti siirrettiin Pasteur-pipetillä puhtaaseen putkeen, joka oli merkitty asianmukaisesti. Eluaatti säilyi tutkimuskelpoisena seitsemän vuorokautta. (Veripalvelu 2008: Työohje VR-5282; Korhonen 2015.)



Kuvio 20. Absorboitujen punasolujen päälle lisätään solujen pesuliuos ja putkea sekoitetaan ennen sentrifugointia

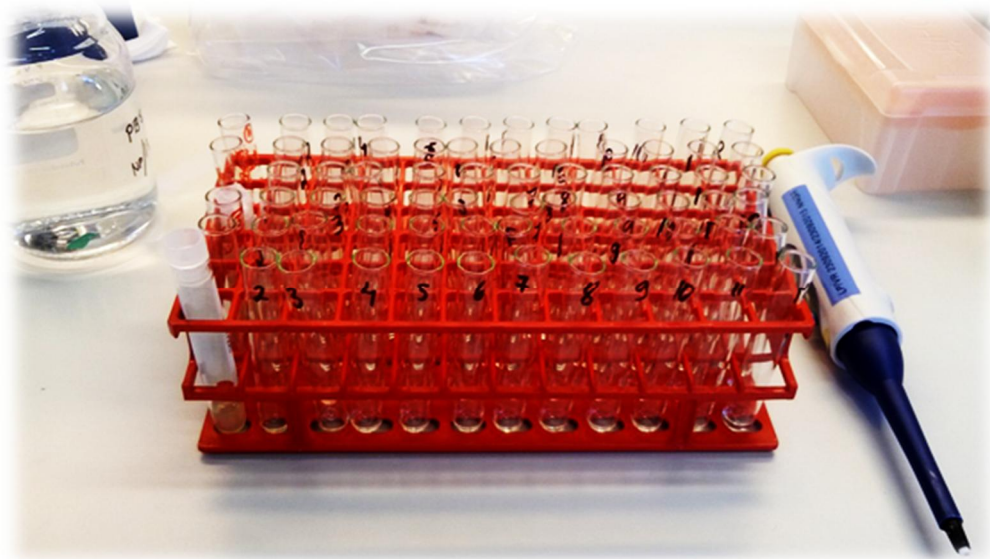


Kuvio 21. Pesuliuos siirretään kertakäyttöpipetillä Wassermann-putkeen ja pestyjä punasoluja siirretään tarkka määrä puhtaaseen putkeen automaattipipetillä



## 9.9 Vasta-ainepitoisuuden määrittäminen

Vasta-ainepitoisuuden määrittystä varten oli tehtävä laimennossarja johon tarvittiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta eli PBS-liuosta. Tämä liuos säilyi viikon. Jokaista näytettä varten tarvittiin yksitoista Wassermann-putkea. Ne asetettiin putkitelineeseen ja numeroitiin 2–12 kuvion 22. mukaisesti. Laimennossarjan ensimmäisenä putkena oli natiiviplasma, absorboitu plasma ja solujen eluaatti omilla riveillään. Ensin putkiin 2–12 pipetoitiin kuhunkin sama määrä PBS-liuosta automaattipipetillä. Sen jälkeen sama määrä tutkittavaa näytettä pipetoitiin alkuperäisestä näytteestä putkeen 2 ja laimennos sekoitettiin huolellisesti Vortex-putkisekoittajalla. Laimennossarjaa jatkettiin pipetoimalla putkesta 2. sama määrä laimennosta putkeen 3 ja niin edelleen aina laimennossarjan loppuun saakka. Uusi pipetinkärki vaihdettiin jokaisen laimennoksen välillä ja laimennos sekoitettiin aina huolellisesti joka välissä. (Veripalvelu 2015: Työohje VR-90-40-2974-L5.)



Kuvio 22. Laimennossarja vasta-ainetitteriä varten

Laimennossarjan jälkeen vasta-ainetitteri määritettiin epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää käyttäen. Tutkimus tehtiin ID-geelitekniikalla käyttäen Liss/Coombs-kortteja. Geelikortin kaivot numeroitiin 1–12. Tutkimukseen käytettävät testipunasolut olivat R1r, R2r sekä 6. solu. (Veripalvelu 2015: Työohje VR-90 -40- 2974-L5.) Reagenssisolujen fenotyytit on esitetty tarkemmin taulukossa 2.

Taulukko 2. Titterin reagenssisolujen fenotyypit.

<b>R1r</b>	<b>D+ C+ ja G+ (heterotsygootti D:n ja C:n suhteen)</b>
<b>R2r</b>	<b>D+ G+ ja C- (heterotsygootti D:n suhteen)</b>
<b>6. solu r'r</b>	<b>C+ G+ ja D- (heterotsygootti C:n suhteen)</b>

Reagenssisolut sekoitettiin huolellisesti ja jokaisen kaivon yläosaan pipetoitiin 50 µl soluja. Sen jälkeen laimennossarjan ensimmäisestä putkesta lisättiin 25 µl näytettä kaivon yläosaan ja vaihdettiin uusi pipetinkärki. Laimennossarja pipetoitiin järjestyksessä geelikorttien reaktiokaivoihin vasta-ainetitterisarjan loppuun saakka. Geelikortteja inkuboitiin viisitoista minuuttia + 37 °C:ssa ID-korttihuuteessa, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin kymmenen minuuttia ID-korttisentrifugilla. Tulokset luettiin valopöydällä silmämääräisesti viimeisestä putkesta alkaen ja arvioitiin reaktiivoimakkuus. Vasta-ainetitteri luettiin aina aloittaen suurimmasta laimennoksesta pienempään päin. Tämän tarkoituksena oli niin sanotun prozone-ilmion aiheuttamien virhetulkintojen poissulkeminen. Lukumenettelyn käytännöllä oli myös pyrkimyksenä parantaa tuloksen toistettavuutta. Päätöksenteko vastausta tulkittaessa eron -/+ suhteen on objektiivisempi kuin eron 2+/1+ suhteen. (Veripalvelu 2015: Työohje VR-90-40-2974-L5.)

Tulokset kirjattiin alla näkyvän (kuvion 23.) mukaisesti lomakkeeseen, josta on nähtävissä myös käytetyt laimennossuhteet. Reaktioiden tulkinnassa huomioitiin plusreaktiot suurimpana huomioon otettavana laimennoksena, kun taas -<sup>r</sup> reaktioita ei huomioitu tulkinnassa, vaikka osoitettavissa oli yksittäisiä soluja geelin alueella. Heikko positiivinen (+) taas oli merkki reaktioista, joissa soluja todettiin selvästi geelin alueella. (Korhonen 2015; Veripalvelu 2009: Yleisohje VR-YO-043; Veripalvelu 2008 Tutkimusmenetelmä VR-5282.)

Solu	Fenotyyppi	Titteri											
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1000	2000
	R <sub>1r</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	(+)	-	-	-	-
	R <sub>2r</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	- <sup>r</sup>	-	-	-
6	r'r	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	- <sup>r</sup>	-	-	-

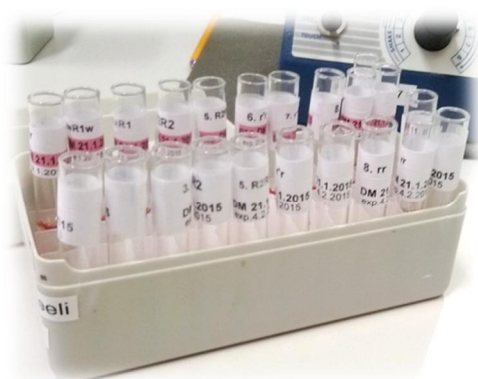
Pvm: 22.1.2015 Tekijä: NIINA PULLI

Kuvio 23. Titterituloksen merkitseminen

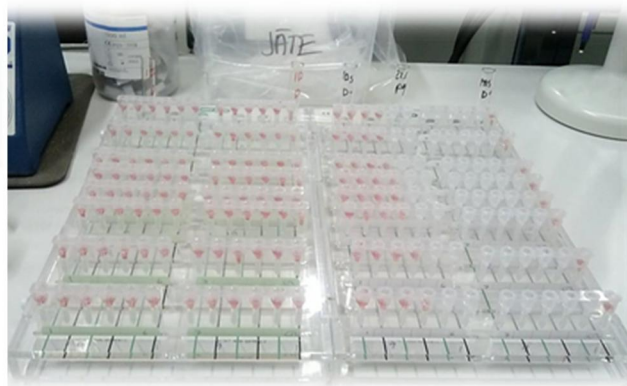
## 9.10 Absorption ja eluaation jälkeen tehtävät tutkimukset

Absorboidusta plasmasta tehtiin ID-geelitekniikkaa käyttäen punasoluvasta-aineiden tunnistus ja sopivuuskoe. Punasoluvasta-aineiden tunnistuksessa käytettiin yhdenteosta fenotyyppitetyn O-veriryhmään kuuluvan punasolun paneelia (kuvio 24). Punasoluvasta-aineiden tunnistus tehtiin sekä antiglobuliini- että entsyymimenetelmällä.

Jokaista tutkittavaa näytettä varten varattiin kaksi Liss/Coombs geelikorttia sekä kaksi NaCl-entsyymigeelikorttia. Ne asetettiin työskentelypöydälle kuviossa 25. esitetyn mukaisesti. Geelikortit tuli silmämääräisesti tarkastaa siltä varalta, ettei geeli ollut kuivunut eikä siinä havaittu ilmakuplia. Myös suojana olleen folion tuli olla ehjä. Folio repäistiin pois vasta pipetointia aloitettaessa. (Korhonen 2015; Veripalvelu 2013: Tutkimusmenetelmä VR-3462.)



Kuvio 24. Punasolupaneelin solut



Kuvio 25. Geelikortit työskentelytasolla

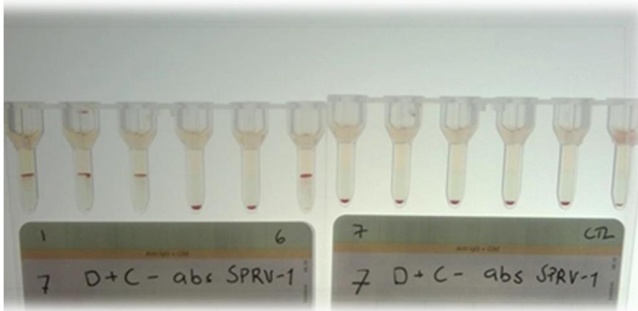
Paneelisolut sekoitettiin huolellisesti putkisekoittajalla, jonka jälkeen ensimmäiseen mikropyväaseen lisättiin 50 µl ensimmäistä paneelisolua, toiseen seuraavaa paneelisolua ja niin eteenpäin aina toisen geelikortin yhdenteentoista kuoppaan saakka. Samalla tavoin pipetoitiin omat testisolut NaCl-geelikorteille. Viimeiseen kuoppaan lisättiin kontrollisolususpensiota, joka oli tehty papinisoiduista punasoluista. AG-kortteihin ID-2-suspensio ja NaCl-kortteihin pipetoitiin PBS-suspensio. Solut pipetoitiin niin, että ne jäivät kaivon leveään osaan, reaktioalueelle. Sen jälkeen tutkittavaa natiivinäytettä, absorboitua plasmaa ja eluaattia pipetoitiin 25 µl kunkin kaivon mikropyväisiin solujen päälle kuvion 26. mukaisesti. Kortit asetettiin tämän jälkeen lämpöhauteeseen ja inkuboiden niitä viisitoista minuuttia. Geelikortteja sentrifugoitiin viimeisenä vielä kymmenen minuuttia, jonka jälkeen tulokset olivat luettavissa valopöytää vasten (kuvio 27.) Tulok-



set kirjattiin tutkimuslomakkeelle ja kuitattiin omalla nimikirjoituksella sekä päiväyksellä. (Veripalvelu 2014: Työohje VR-3463.)



Kuvio 26. Näyte pipetoidaan punasolujen päälle



Kuvio 27. Liss/Coombs-geelikortit valopöydällä tulkintaa varten

### 9.11 Tulosten kirjaaminen

Tulokset taulukoitiin ensin neuvolanäytteiden tutkimuslomakkeelle. Lopuksi ne siirrettiin excel-taulukkoon, johon oli merkitty näytteen numero, käytetyt paneelisolut sekä luovuttajasolujen fenotyyppi. Lisäksi taulukkoon kirjattiin tutkitun natiiviplasman vasta-ainepitoisuudet kullakin solupaneelin solulla. Absorboidun plasman ja solun eluaatin tulokset kirjattiin sekä D+C- että D-C+ soluilla omiin sarakkeisiinsa.

Punasoluvasta-aineiden tunnistuksessa tuloksista tulkittiin ainoastaan reagointi kuuden ensimmäisen solupaneelin solun kanssa. Vaikka ainoastaan kuuden ensimmäisen so-

lun reagoinnilla oli merkitystä tässä tutkimuksessa, tunnistus tehtiin kuitenkin normaalia yhdentoista solun paneelia käyttäen. Loput viisi paneelisolua oli myös tutkittava, koska haluttiin varmistaa, ettei näytteisiin havaittu tulleen epäspesifisiä reaktioita absorptio- aikana. Viimeisenä taulukkoon oli merkitty tulkintasarake johon kirjattiin, mikä tai mitkä vasta-aineet tutkittavasta plasmasta voitiin havaita. Titteritulokset merkittiin omiin sarakkeisiinsa. Niistä pääteltiin, oliko vasta-ainepitoisuus heikentynyt näytteessä absorptio- aikana. Titteri tutkittiin absorboidusta plasmasta epäsuoraa antiglobuliinimenetelmää käyttäen. Tuloksia tulkittaessa verrattiin tuloksia vielä natiiviplasman tuloksiin. Siinä käytetyt solut oli valittu jokaiselle näytteelle fenotyypistään riippuen. Laimenemisen arviointia varten valikoitiin erikseen näytteitä tulosten joukosta (taulukko 5).

Jokaisesta näytteestä tutkittiin myös näytekontrollit, joiden tarkoituksena oli kertoa absorptioiden riittävydestä. Näytekontrollin ollessa negatiivinen, absorptioiden määrä tulkittiin riittäväksi, jolloin ne vasta-aineet jotka haluttiin absorptiossa poistaa, eivät reagoineet enää. Näytekontrollin positiivinen tulos eluaattissa taas kertoi, että eluointi oli tehty oikein.

Eluaation aikana solut pestiin viisi kertaa solujen pesuliuksella. Viimeisestä pesusta otettiin punasolujen päällä ollutta pesuliuosta talteen. Pesuliuksesta tehtiin sopivuuskoe ID-geelitekniikalla Liss/Coombs geelikortteja käyttäen. Negatiivinen pesuliuksen tulos varmisti eluaation luotettavuuden, jolloin tiedettiin, että kaikki sitoutumattomat vasta-aineet oli saatu pestyä pois.

## 10 Tulokset

Reaktioiden voimakkuutta sekä vasta-ainepitoisuuksien laimenemista käsitellään tulososuudessa. Tuloksia tarkastellaan lisäksi esimerkin kautta. Tulosten luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä sekä absorptioeluaatiomenetelmän toimivuutta arvioidaan lopuksi. Tulostaulukot löytyvät opinnäytetyön liitteenä 5. Kaikki tulokset on tarkastettu ja epäselviin tuloksiin on paneuduttu asiantuntijan kanssa. Tulosten tulkintakaavio löytyy opinnäytetyön liitteenä 3.

## 10.1 Reaktiot vasta-aineiden tunnistuksessa

Kahdeksassa näytteessä (näytteet 1, 2, 5-10 ja 12) kolme kertaa tehty absorptio ei riittänyt poistamaan absorboitavaa vasta-ainetta kokonaan plasmasta. Kuudella näistä (näytteet 1, 2, 5, 7, 9 ja 10) vasta-aine näkyi kuitenkin vain entsyymikäsitellyillä soluilla. Lisäksi yhdellä näytteellä (näyte 4) absorptio onnistui muuten, mutta sopivuuskoe painisoiduilla D(-)C(+) soluilla antoi positiivisen tuloksen. Näiden näytteiden vasta-ainetitterit geelitekniikkaa käyttäen olivat 4 tai enemmän.

Niiden näytteiden kohdalla, joissa kolme absorptiota riitti poistamaan vasta-aineen kokonaan, titteritulokset olivat kahden näytteen osalta 8 (näytteet 3 ja 11) kahdella näytteellä 4 (näytteet 4 ja 11) kahdella (näytteet 14 ja 17) 2 ja yhdellä 1 (näyte 6). Näytteen 6. anti-D-vasta-aine oli erittäin heikko. Vasta-ainetitteri geelitekniikalla oli 1 ja tunnistuspaneelissa lähinnä entsyymikäsitellyt solut reagoivat. Vasta-aine heikentyi absorptiossa niin paljon, ettei se ollut osoitettavissa vasta-ainetunnistuksessa eikä titrauksessa. Näytteessä 13. oli anti-C:n lisäksi heikko anti-G-vasta-aine. Anti-G reagoi antiglobuliinimenetelmällä heikosti (reaktiot 1+) eikä sitä ollut osoitettavissa D(+)C(-) solujen elu-aatista.

Näytteiden 13. ja 14. kohdalla, toisessa ja kolmannessa absorptiossa putkiin oli alun perin lisätty kaksi osaa soluja ja yksi osa plasmaa, jolloin vasta-ainetta sitovia anti-geenejä oli normaalia enemmän. Ensimmäisessä absorptiossa soluja ja plasmaa käytettiin kumpaakin yhtä paljon. Molemmissa näytteissä absorptio oli onnistunut vaikka näytteen 13. anti-G-vasta-aine reagoikin heikosti. Taulukossa 3. nähdään yhteenveto tuloksista.

Taulukko 3. Tulostaulukko

Näyte	Tulos	Tulkinta
1	anti-D anti-C anti-G	D+C- soluilla tehdyssä absorptiossa vahvan anti-C:n lisäksi entsyymisoluilla osoitetaan anti-D ja anti-G. D+C- solujen eluaatissa on osoitettavissa sekä anti-D että anti-G, joista anti-G on heikompi. Samoin D-C+ soluilla voidaan osoittaa anti-D:n lisäksi anti-C ja anti-G entsyymipuolella. Eluaatissa nähdään anti-G ja -C.
2	anti-C anti-G	D+C- absorboidulla plasmalla nähtävissä vahvan anti-C:n lisäksi anti-G ja anti-D, jotka reagoivat entsyymisoluilla. D-C+ absorboidulla plasmalla ei ole osoitettavissa anti-D-vasta-ainetta, joten kyseessä on anti-C ja anti-G. Eluaattien tulokset ovat epäselvät, näyte on riittämätön.
3	anti-C anti-G	Absorptio on onnistunut. Titteritulos on 8.
4	anti-D anti-C anti-G	Absorptio on riittävä, vaikka D-C+ solujen näytekollit ovat positiiviset.
5	anti-C anti-G anti-D?	D-C+ absorption jälkeen, plasma reagoi entsyymikäsitellyillä soluilla hieman vahvemmin D+ soluilla kuin C+ soluilla, joten heikon anti-D:n mahdollisuutta ei voida pois sulkea.
6	anti-D	Heikko vasta-aine, joka ei näy absorption jälkeen. Myöskään D+C- eluaatissa ei ole nähtävissä anti-D:tä. Titteri on laskenut absorptiossa yhdestä nollaan.
7	anti-C anti-G	Vahvat vasta-aineet. Voidaan todeta, että kolme absorptiota D+C- soluilla ei riitä. Eluaatissa on nähtävissä anti-G. D-C+ solujen absorptiossa ei ole anti-D:tä, joten tulos on tulkittavissa
8	anti-D anti-C anti-G	Vahvat anti-C ja anti-G vasta-aineet. Lisäksi nähdään heikko anti-D. Kolme absorptiota ei riitä kummallakaan solulla, tulkinta on kuitenkin selvä.
9	anti-C anti-G	D+C- soluilla absorptio ei ole riittävä. Entsyymipuolen soluilla on osoitettavissa anti-G ja D-C+ solujen eluaatissa on nähtävissä anti-C.
10	anti-G anti-C	D+C- soluilla absorptio ei riitä, entsyymipuolen soluilla on osoitettavissa anti-G. Tulos on absorption riittämättömyydestä huolimatta kuitenkin selvä.
11	anti-C	Absorptio on onnistunut. Vasta-ainetitteri ei ole heikentynyt absorptiossa, joka voidaan tulkita vertaamalla natiivinäytteen ja D+C- näytteiden R1r tittereitä, joissa ei nähdä eroa. Molemmissa titteritulos 2.
12	anti-D	D+C- soluilla tehty absorptio ei riitä. Tulos on kuitenkin selvä ja tulkittavissa. Vasta-ainetitteri heikkeni 1 laimennuksen verran (256 → 128).
13	anti-C anti-G <sub>w</sub>	Anti-G on heikko eikä näy toisessa, D+C- eluaatissa, anti-C voidaan todeta. (w= heikko vasta-aine)
14	anti-C anti-G	Tuloksissa todetaan anti-C ja anti-G.
17	anti-G	Tuloksissa todetaan anti-G.
anti-D (1)	anti-D	Tuloksena on anti-D. Vasta-ainetitteri heikkeni yhden laimennuksen (2 → 1)
anti-D (2)	anti-D	Tuloksena on anti-D. Vasta-ainetitteri heikkeni yhden laimennuksen (2 → 1).

## 10.2 Vasta-ainepitoisuuden laimenemisen arviointi

Opinnäytetyössä oli tarpeen tutkia, laimeneeko vasta-ainepitoisuus absorptiokäsittelyn aikana. Tulosten joukosta valikoitiin laimenemisen arviointia varten näytteitä, joissa oli ainoastaan anti-D tai anti-C (taulukko 4).

Kun natiivinäytteen 11. titteriä verrattiin D(+)C(-) absorboidun plasman R1r titteriin, ei tuloksissa havaittu eroa. Titteritulos on molemmissa 2. Näytteessä 12. todettiin suuri anti-D-vasta-ainepitoisuus. Natiivinäytteessä titteri oli 256 ja D(-)C(+) absorboidusta plasmasta saatiin tulos 128. Anti-D kontrollinäytteissä natiivinäytteestä R1r ja R2r fenotyypeillä todetut vasta-ainetitterit olivat 2. D(-)C(+) absorboidusta plasmasta saatiin tulokseksi 1.

Taulukko 4. Laimenemisen arviointi

Vasta-ainetitteri					
näyte	natiivi (R1r)	natiivi (R2r)	natiivi (6.solu r''r)	abs.plasma D+C-	abs. plasma D-C+
11	2		8	2	
12	256				128
anti-D	2	2	0	0	1
anti-D (2)	2	2	0		1

## 10.3 Esimerkkitapaus

Tutkimustuloksia käsitellään esimerkin kautta. Esimerkkitapauksen potilas on miespotilas, veriryhmältään A RhD-negatiivinen. Potilas oli saanut yhden verensiirron, jonka seurauksena hän immunisoitui. Seuraavaa verensiirtoa suunniteltaessa havaittiin, että punasoluvasta-aineiden seulonta oli positiivinen. Vasta-ainetunnistuksessa kaikki D- ja C-positiiviset reagenssisolut reagoivat hänen plasmansa kanssa. (kuvio 28.) Sairaalan verikeskuksesta varmistettiin, että hänen saamansa punasoluvalmiste oli RhD-negatiivinen. Samalla kuitenkin oli selvinnyt, että valmiste oli C-positiivinen ja samalla myös G-positiivinen. Koska kyseessä oli mieshenkilö, raskausimmunisaatiokaan ei ollut mahdollinen. (Korhonen 2015.)

Solu	Rh - hr	RH										MNS				P	LE	KEL	FY	JK	LU	DO	XG	Käytetty tekniikka:	DM				
		D	C	Cw	Cx	E	c	s	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lua		Aub	Doa	Xga	Muut fenotyypit	Solu
1	R1r	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+	Ch+w	1	4+	1+	
2	R1wR1w	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	Rh-51 Rg+w Hukka-	2	4+	1+	
3	R1xR1	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	LW(a+b+) Bgb	3	4+	2+	
4	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0		4	4+	1+	
5	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	LW(a-b+) Bgc	5	4+	2+	
6	r'r	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	Sd(a+s)	6	4+	2+	
7	r'r	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	Val var	7	-	-	
8	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	U(a+) Co(a+b+) Bgc Ch-	8	-	-	
9	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	Bga Ch+w	9	-	-	
10	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	WES(a+) Ch+w	10	-	-	
11	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	Kp(a+b+) Sd(a-) Ch+w	11	-	-	
12																									AUTOK	12	-	-	

Kuvio 28. Punasoluvasta-aineiden tunnistus

Tietojen perusteella heräsi epäily, että vasta-ainetunnistuksessa D+ soluilla reagoiva vasta-aine olisi todennäköisesti anti-G. Sillä hetkellä ei kuitenkaan ollut mahdollista varmistaa, oliko kyseessä anti-G-vasta-aine. Potilaalle suositeltiin verensiirtoihin jatkossa annettavaksi K- (Kell), D-, C,- ja E- (Rh) - negatiivisia punasoluja hänen Rh-fenotyyppinsä mukaisesti. Tällaisten yksiköiden ollessa myös G-negatiivisia, tulevien verensiirtojen kannalta ei olisi merkitystä oliko potilaalla anti-C:n lisäksi anti-G vai anti-D-vasta-aine. (Korhonen 2015.) Loppunäyte oli pakastettu myöhempää tutkimusta varten ja otettiin nyt mukaan tähän tutkimukseen menetelmän validointia varten. (näytenumero 3.)

D(+)/C(-) soluilla tehdyn absorptio testin jälkeen plasmassa oli osoitettavissa anti-C-vasta-aine. D(+)/C(-) solujen pinnalta eluoitu vasta-aine reagoi kaikkien D ja/tai C-positiivisten solujen kanssa sopien anti-G-vasta-aineeseen. (Korhonen 2015.) Huomiona todettakoon, ettei anti-C-vasta-aine tartu C-negatiivisten solujen pintaan (kuvio 29.)

Solu	Rh - hr	RH										MNS				P	LE	KEL	FY	JK	LU	DO	XG	Käytetty tekniikka:	DM				
		D	C	Cw	Cx	E	c	s	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lua		Aub	Doa	Xga	Muut fenotyypit	Solu
1	R1r	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+	Ch+w	1	++	-	++ (+)
2	R1wR1w	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	Rh-51 Rg+w Hukka-	2	++	-	++ (+)
3	R1xR1	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	LW(a+b+) Bgb	3	++	-	++ (+)
4	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0		4	-	-	++
5	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	LW(a-b+) Bgc	5	-	-	++
6	r'r	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	Sd(a+s)	6	++	-	++
7	r'r	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	Val var	7	-	-	-
8	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	U(a+) Co(a+b+) Bgc Ch-	8	-	-	-
9	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	Bga Ch+w	9	-	-	-
10	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	WES(a+) Ch+w	10	-	-	-
11	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	Kp(a+b+) Sd(a-) Ch+w	11	-	-	-
12																									AUTOK	12	-	-	++

Pvm: \_\_\_\_\_ Tekijä: \_\_\_\_\_ Paneli pvm: 04.06.2014

RESULUOS

Kuvio 29. D+C- solujen absorptio ja eluaatio



D(-)C(+) soluilla absorboidussa plasmassa ei ollut osoitettavissa vasta-aineita, sopien oletukseen, ettei potilaalla anti-D-vasta-ainetta ole. Myös D(-)C(+) soluista tehdyssä eluaatissa oli osoitettavissa anti-G-vasta-aine (kuvio 30.).

Solu	Rh - Itr	RH										MNS			P	LE	KE L	FY	JK	LU	DO	XG	Käytetty tekniikka: DM ABS ELW	Muut fenotyypit						
		D	C	Cw	Cx	E	c	s	f	M	N	S	s	Pf	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb		Lua	Aub	Doa	Xga	Solu	Ents	AG
1	R1r	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	+	Ch+w	1	-	-	HH	(+)
2	R1wR1w	+	+	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	Rh:-S1 Rg+w Huikka-	2	-	-	HH	(+)
3	R1xR1	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	LW(a+b+) Bgb	3	-	-	HH	(+)
4	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0		4	-	-	HH	-r
5	R2R2	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	LW(a-b+) Bgc	5	-	-	HH	-
6	r'r	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sci(a+s)	6	-	-	HH	+
7	r'r	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	Vel var	7	-	-	-	-
8	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	UJ(a+) Co(a+b+) Bgc Ch-	8	-	-	-	-	
9	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	Bgc Ch+w	9	-	-	-	-	
10	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	WES(a+) Ch+w	10	-	-	-	-
11	rr	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	Kp(a+b+) Sd(a-) Ch+w	11	-	-	-	-
12																									AUTOK	12	-	-	HH	+

Pvm: \_\_\_\_\_ Tekijä: \_\_\_\_\_ Paneli pvm: 04.08.2014 **PESULIUS**

Kuvio 30. D-C+ solujen absorptio ja eluaatio

Vasta-ainetitrit kaikilla käytetyillä soluilla (R1r, R2r ja r'r) oli geelitekniikkaa käyttäen 8. Myös tämä tuki oletusta, ettei näytteessä anti-D-vasta-ainetta ole. Anti-D nostaisi R1r titterin 6. solun r'r titteriä korkeammaksi (kuvio 31.).

Solu	Fenotyyppi	Titteri											
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1000	2000
	R <sub>1r</sub>	++	+	+	+	(+)	(-)	-	-	-	-	-	-
	R <sub>2r</sub>	HH	HH	+	+	(+)	-r	-	-	-	-	-	-
6.	r'r	HH	HH	HH	+	(+)	→	-	-	-	-	-	-

Pvm: 15.1.2015 Tekijä: MIINA PYLEKI

Todettu vasta-aine: R<sub>1r</sub> Titteri: 8 Pakast  
R<sub>2r</sub> 8  
6. solu 8

Kuvio 31. Vasta-ainetitrit käsittelemättömästä plasmasta

10.4 Tulosten luotettavuuden arviointi

Tutkimuksessa käytetyillä veriryhmäserologisilla menetelmillä seulotaan Veripalvelussa joka päivä suuri määrä näytteitä ja toimintaa ohjaa sekä sisäinen että ulkoinen laatujär-

jestelmä. Käytetyt laitteet ja perusmenetelmät ovat rutiinikäytössä. Kaikissa vaiheissa noudatettiin sovittuja työtapoja ja työohjeita. Niistä poikettiin vain asiantuntijan antamasta määräyksestä. Bioanalyytikolta vaadittavia eettisiä ohjeita sekä kliinisen laboratoriotyön eettisiä periaatteita kunnioitettiin myös tämän opinnäytetyöprosessin aikana. Kliinisen laboratoriotyön eettiset periaatteet ohjaavat bioanalytikkaa täyttämään velvollisuutensa potilaille, ammattikunnalle sekä yhteiskunnalle. Bioanalyytikon eettisten ohjeiden mukaan bioanalyytikon on toimittava hyväksytyjen toimintatapojen mukaisesti vastaten laboratoriotutkimusten laadusta ja luotettavuudesta. (Suomen Bioanalytikoiliitto ry 2006.)

Raportoinnissa kuvattiin kokonaisuudessaan empiirisen vaiheen kulku, kaikki käytetyt menetelmät ja tulkinnan perusteet. Tulosten raportoinnissa pääpaino oli saavutetuissa tuloksissa sekä niissä seikoissa, jotka tekivät tuloksista luotettavia. Jokaiselta tutkimukselta edellytetään aina sellaista pätevyyttä, joka on perusteltava jo teoriaa muodostettaessa. Tällä tarkoitetaan yhtenäisyyttä, jossa tutkimuksen tulos antaa vastauksen asetettuun tavoitteeseen. Jotta tutkimusta voitaisiin pitää pätevänä, on sen vastattava annettuihin tutkimuskysymyksiin. (Varto 1992: 103.) Aiemmat tutkimukset sekä kerätty teorian tieto loivat pohjan tutkimukselle, jossa tarkoituksena oli uuden menetelmän käyttöönotto. Otettaessa nyt käyttöön uutta menetelmää, yksinkertaiseksi työhypoteesiksi asetettiin onnistuminen tai epäonnistuminen. Saavutetut tavoitteet toimivat mittareina arvioitaessa luotettavuutta ja näin työn onnistumista. Opinnäytetyö toteutui jokaisessa vaiheessa ottaen huomioon hyvän tieteellisen käytännön. Työn aikana noudatettiin hyvien eettisten työtapojen mukaisesti erityistä huolellisuutta, tarkkuutta ja rehellisyyttä (Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta 2012 - 2014).

Kvalitatiivisessa tutkimuksessa kuvatut tutkimustulokset edellyttävät, että tutkimuksen eteneminen ja sen kautta syntyvät johtopäätökset muodostuvat tematisoidusta yhtenäisyydestä. Tematisoinnilla tarkoitetaan sitä, että tutkimuskohteesta nostetaan esille juuri se, mitä tutkimuksessa on tarkoitus tutkia. Samalla määritetään tutkimuksen näkökulma. (Varto 1992: 51,103.) Koska kyse oli pääosin kvalitatiivisesta tutkimuksesta, tulos perustui joko vasta-aineen olemassa oloon tai sen puuttumiseen. Näytteen alkuperäiset tiedot ja aiemmat tutkimustulokset esiintyvien vasta-aineiden lähtöpitoisuuksista olivat kvalitatiivisen jäljitettävyyden vuoksi tärkeitä. Sen sijaan vasta-aineepitoisuuden mittaamiseen käytetty titrausmenetelmä oli semikvantitatiivinen ja tästä syntyvä tulos oli osin määrällinen. (Grossman ym 2011.)



Tulosten reliabiliteetti (reliability) eli luotettavuus oli menetelmän käyttöönottoa ajatellen tärkeimpiä asioita tutkimuksen aikana. Reliaabelilta tutkimukselta odotetaan toistettavuutta, joka tässä opinnäytetyössä toteutettiin vertaamalla tuloksia natiivinäytteiden tuloksiin. (Hirsjärvi – Remes - Sajavaara 2010; Vilka 2007.) Lisäksi opinnäytetyössä oli mukana näyte, joka oli tutkittu samaa menetelmää käyttäen referenssilaboratoriossa Bristolissa. Tulokset olivat vertailukelpoisia tässä opinnäytetyössä saatujen tulosten kanssa. Osaltaan työn luotettavuutta lisäsi se, että kaikki työn vaiheet kuvattiin tarkasti ja vaiheita oli näin helppo tarkastella myös jälkikäteen. (Varto 1992: 114.) Aikaisemmin natiivinäytteistä tehdyt vasta-ainetunnistusten tulokset sekä vasta-ainepitoisuudet tukivat opinnäytetyössä saatuja tuloksia absorboidusta plasmasta ja eluoiduista punasoluista. Alkuperäisiä natiivinäytteiden tuloksia tarkasteltiin vasta tulosten vastaanamisen jälkeen, siirrettäessä tuloksia excel-tulkintakaavioon, tämä toimintatapa lisäsi osaltaan tulosten luotettavuutta. Luotettavuus taattiin myös käyttämällä näytekontrolleja. Jokaisesta näytteestä tutkittiin näytekontrollit, joiden perusteella määritettiin menetelmän toimivuutta tarkoitukseensa ja samalla tulosten oikeellisuutta. Pesuliuksen analysoinnilla varmistettiin eluaation luotettavuus. Se oli jokaisen näytteen kohdalla negatiivinen, joten kaikki sitoutumattomat vasta-aineet oli saatu pestyä ja tulokset olivat myös siltä osin luotettavia.

Validiteetti (validity) eli pätevyys toteutui menetelmän toimivuutta tarkasteltaessa. Validiteetillä tarkoitetaan, että tutkimusmenetelmän on mitattava juuri sellaista ominaisuutta, mitä tutkimuksessa on tarkoitus mitata (Hirsjärvi ym 2010; Vilka 2007). Käytetty absorptiomenetelmä todettiin toimivaksi ilmaisemaan vasta-aineiden sitoutumista punasolun pinnalle ja eluaatiolla punasolun pintaan kiinnittynyt vasta-aine voitiin irrottaa sitoutuneesta antigeeni-vasta-aine-kompleksista. Absorptioeluaatiomenetelmä todettiin toimivan halutussa tarkoituksessa ja menetelmä otettiin käyttöön opinnäytetyön tulosten julkistamisen yhteydessä.

## **11 Johtopäätökset ja pohdinta**

Jos ensin tarkastellaan opinnäytetyön empiirisen vaiheen tuloksia ottamatta kantaa näytekontrollien tuloksiin, voidaan tulosten perusteella todeta että plasmassa olevat punasoluvasta-aineet voidaan absorboida kyseisen antigeenin suhteen positiivisten punasolujen pinnalle absorptiomenetelmää käyttäen. Menetelmällä saadaan poistettua

myös tunnistusta häiritsevät vasta-aineet sekä erotettua päällekkäiset vasta-aineet toisistaan. Absorption tulos voidaan varmistaa eluaatiolla.

Kun lähdetään tarkastelemaan tuloksissa ilmeneviä reaktioita, todetaan kaikkiaan kahdeksan näytteen kohdalla, ettei kolme absorptiota riittänyt poistamaan absorboitavaa vasta-ainetta täydellisesti näyteplasmasta. Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että tulevaisuudessa vahvojen vasta-aineiden kohdalla absorptiota on mahdollista jatkaa kontrollinäytteen ollessa positiivinen. Tutkimuksen aikana, kahden näytteen (näytteet 13,14) kohdalla kokeiltiin käyttää kahteen viimeiseen absorptioon punasoluja suhteessa 2:1. Punasoluja oli lisätty kahteen viimeiseen absorptioputkeen kaksi osaa ja ensimmäisestä absorptiosta käytetty plasma jota oli suhteessa 1:1, siirrettiin solujen päälle. Näiden näytteiden osalta molemmat absorptiot onnistuivat.

Osassa näytteitä voitiin selvästi havaita kolmen absorption riittävän, vaikka solujen näytekontrolli olikin positiivinen. Kontrollinäytteen positiivisuutta selittää osin papainisointi, jonka vuoksi ne reagoivat herkemmin epäsuoralla antiglobuliinimenetelmällä. Solujen papainisointi on kuitenkin tarpeen, koska solujen entsyymikäsittely ennen absorptiota tehostaa absorptiota erityisesti Rh-vasta-aineilla. Opinnäytetyössä myös kontrollisolut suspensiota varten otettiin vasta papainisoinnin jälkeen. Kontrollisuspensioihin tullaan kuitenkin jatkossa käyttämään käsittelemättömiä soluja. Se voidaan toteuttaa helposti ottamalla kontrollisuspensioita varten solut luovuttajanäytteistä ennen solujen entsyymikäsittelyä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vastata tutkimuskysymykseen, *Millaiset reaktiot vasta-ainetunnistuksessa antavat aiheen anti-G- vasta-aineen epäilyyn?*

Jos palataan vielä Suomessa vuonna 2013 tehtyyn tutkimukseen, tutkimuksessa todettiin, että anti-G-vasta-aineesta herää epäily, jos D(-)C(+) solujen titteri on korkeampi kuin D(+)C(-) solujen titteri. Opinnäytetyöni tulokset tukivat tätä päätelmää. Natiivinäytteiden titterituloksista voidaan päätellä, onko anti-G-vasta-aine tarpeen tutkia. Kriteerinä tulee toimimaan juuri se, että anti-G-vasta-ainetta tulee epäillä, jos C-positiiviset solut reagoivat vahvemmin kuin D-positiiviset solut. Mikäli anti-C:n titteri on näytteessä vielä korkeampi, on se vahva syy tutkia anti-G:n mahdollinen olemassa olo absorptio-eluaatiomenetelmää käyttäen.

Toisena tutkimuskysymyksenä opinnäytetyössä haettiin vastausta, *Laimeneeko vasta-ainepitoisuus absorptio aikana?*

Laimenemisen arvioimista varten valikoitiin tulosten joukosta näytteitä, joissa oli ainoastaan joko anti-D tai anti-C. Tällöin absorptiokäsittelyn aikana plasmasta ei poistunut mitään vasta-ainetta (=anti-G va), vaan titterin mahdollinen heikkeneminen johtui ainoastaan näytteen laimenemisestä. Ensimmäisenä verrattiin näytteen 11 (josta oli todettu anti-C) titteriä D(+)*C*(-) näytteiden R1r titteriin, eikä tuloksissa nähty eroa. Absorptio oli onnistunut, eivätkä vasta-ainepitoisuudet heikentyneet absorptiokäsittelyssä. Titteritulokset oli sekä natiivinäytteessä että absorboidussa plasmanäytteessä 2. Toisena tarkasteltiin suurimman anti-D-pitoisuuden omaavaa näytettä (näyte 12). Siinä natiivinäytteen titteri oli 256. D(-)*C*(+) absorboidusta plasmasta titteritulokset heikkeni yhden laimennoksen verran, joten vasta-ainepitoisuus oli siinä absorptio jälkeen 128. Anti-D kontroleissa (anti-D1, anti-D2) natiivinäytteen titteri R1r ja R2r fenotyypeillä oli 2. Absorptio jälkeen todetut vasta-ainetitterit heikkenivät yhden laimennoksen verran kumpikin. Yhden laimennoksen muutos titterituloksessa ei ole merkittävä, vaan se voi olla normaalia menetelmästä johtuvaa vaihtelua. Neuvolanäytetutkimuksissa muutoksen tulee olla vähintään kahden laimennoksen verran, jotta se katsotaan muuttuneeksi.

Tulokset osoittavat, etteivät näytteet laimene merkittävästi. Kun voidaan todeta, ettei laimeneminen absorptiokäsittelyn jälkeen ole merkittävää, voidaan näytteen absorptiota tarvittaessa jatkaa vielä neljännellä absorptiolla, joka taas parantaa vasta-aineen tunnistettavuutta näytteestä. Heikkojen vasta-aineiden kohdalla, toisena ääripäänä laimenemisen tutkimisessa voitiin osoittaa natiivinäytteessä todetun heikon vasta-aineen häviävän niin, ettei sitä pystytty enää absorptio jälkeen osoittamaan. Tämä johtunee osittain näytteen laimenemisestä absorptioissa ja mahdollisesti anti-C-vasta-aineen sitoutumisesta D-positiivisten solujen pintaan D- ja C-antigeenien muistuttaessa toisiaan. Tätä voidaan selittää antigeeni-vasta-aineparin sidosvoiman vaikutuksella niiden muodostaessa yhteisen kompleksin keskenään. Kuitenkaan vahvoissa ja selkeissä reaktioissa absorptiokäsittely ei merkittävästi heikentänyt vasta-ainepitoisuutta ja heikkojen vasta-aineiden tunnistamisessa ei ole edes perusteltua käyttää tätä menetelmää.

Opinnäytetyössä löydettiin vastaukset tavoitteeksi määriteltyihin tutkimuskysymyksiin. Huolimatta positiivista kontrollinäytteistä työ onnistui ja tuloksia voidaan pitää luotettavina. Tutkimuksen avulla löydettiin myös tulevaisuutta varten parannuskeinoja mene-

telmän toimivuutta ajatellen. Tulokset olivat vertailukelpoisia ja absorptioeluaatiomenetelmä otettiin käyttöön anti-G-vasta-aineen osoittamiseksi opinnäytetyön tulosten julkistamisen yhteydessä.

Pohdin tutkimussuunnitelmassani, *Pitäisikö Suomessa kaikilta raskaana olevilta naisilta, joilla anti-D- tai C-vasta-aine todetaan, tutkia lisäksi rutiininomaisesti anti-G-vasta-aine*. Iso-Britanniassa tämä käytäntö on jo voimassa. Koska uudemmat tutkimukset osoittivat, että anti-G-vasta-aineella on kyky aiheuttaa myös yksinään vaikeaa vastasyntyneen hemolyyttistä tautia, oli vastauksen saaminen pohdintaani aiheellinen. Opinnäytetyön tulosten pohjalta voitiin osoittaa sellaiset kriteerit, joiden perustella anti-G-vasta-ainetta on syytä epäillä. Tuloksista voitiin myös tehdä päätelmä, ettei rutiininomaisella tutkimuksella saavuteta haluttua hyötyä. Tutkimukset tullaan kohdistamaan juuri niille äideille, joilla vasta-ainepitoisuudet antavat aiheen anti-G-vasta-aineen epäilyyn.

Absorptioeluaatiomenetelmää voidaan käyttää myös muiden kuin anti-G- ja anti-DC-vasta-aineiden erottamiseen. Periaatteessa antigeneiltään sopivilla solupareilla mikä tahansa punasoluvasta-aine saadaan absorboitua pois ja jäljelle jääneet vasta-aineet voidaan sen jälkeen tunnistaa. Ehdotuksena jatkoa varten, punasolujen määrän nostamista voitaisiin kokeilla kahden suhteessa yhteen (2:1) kahden viimeisen absorption aikana ja tutkia, onko sillä järjestelmällisesti positiivinen vaikutus absorptioon vai onko tulos sama punasolujen määrästä riippumatta. Opinnäytetyön aikana kokeilimme tätä vain kahden näytteen kohdalla ja tulos oli niiltä osin lupaava. Tällä voitaisiin mahdollisesti säästää hieman aikaa varsinkin vahvojen vasta-aineiden kohdalla, jos muuten päädyttäisiin neljanteen absorptioon.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyössä saavutettiin haluttu hyöty uuden menetelmän käyttöönottoa ajatellen. Anti-D-suojauksen ollessa tärkein ennaltaehkäisevä toimi immunisaatioiden välttämiseksi, lienee turhaa painostaa näiden vasta-aineiden erottamisen tärkeyttä toisistaan immunoprofylaksian kohdentamiseksi.

Henkilökohtaisena motivaation lähteenä työn edetessä toimi mielenkiintoinen aihe. Opinnäytetyö kirjoitettiin tiedonnälkäisenä aihetta kohtaan. Hyödynsaajina pääosassa ovat raskaana olevat naiset ja heidän lapsensa. Tieto siitä lisäsi entisestään henkilökohtaista motivaatiotani etsiä tutkimustietoa tärkeästä ja mielenkiintoisesta aiheesta. Tämän prosessin aikana koin haastavimmaksi teoreettisen viitekehyksen luomisen.

Aiheen rajaamiseen kului loppujen lopuksi yllättävän paljon aikaa, koska halusin etsiä tietoa perinpohjaisesti. Jatkuvasti syvenevä tietopohja tuki kuitenkin valtavasti prosessin etenemistä. Työn looginen eteneminen pitäen mielessä tutkimuskysymykset ja aiheen rajauksen, toimivat henkilökohtaisena mittarina tarkastellessani valmista tuotosta. Myös sisällöllisesti valmis opinnäytetyö vastaa juuri niitä kriteerejä, jotka asetin oman teoreettisen tietopohjan perustaksi. Vahva teoriapohja ja työelämän harjoittelut niin Veripalvelussa kuin muuallakin ovat syventäneet ammatillista kasvua kohti oman alani asiantuntijuutta. Tulevaisuudessa, ammatillista kasvua tulevat ohjaamaan lisäksi henkilökohtainen etiikka ja arvomaailmani. Näitä taitoja olen pystynyt hyödyntämään myös tämän oppimisprosessin aikana. Opinnäytetyö käynnistyi aidosta työelämän tarpeesta luoda uusi menetelmä ja työn tulokset ovat vastanneet näihin tarpeisiin.

## Lähteet

Aitokallio-Tallberg, Ansa erikoislääkäri 2013. Raskaudenaikainen seuranta ja hoito. Raskaudenaikaiset veriryhmäimmunisaatiot - koulutuspäivä Helsinki: Veripalvelu.

Avent, Neil D – Reid, Marion E 2014. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000; 95 (2): 375 Verkkodokumentti: [Bloodjournal.hematologylibrary.org](http://www.bloodjournal.org/content/95/2/375.article-info)  
< <http://www.bloodjournal.org/content/95/2/375.article-info> > Luettu 27.6.2014.

Bennardello, Francesco – Coluzzi, Serelina – Curciarello, Giuseppe – Todors, Tullia – Villa, Stefania 2015. Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) and Italian Society of Gynaecology and Obstetrics (SIGO) working group. *Blood Transfus.* 2015 Jan; 13(1): 109–134.

Bhutani, Vinod K – Zipursky, Alvin – Blencowe, Hannah – Khanna, Rajesh – Sgro, Michael – Ebbesen, Finn – Bell, Jennifer – Mori, Rintaro – Slusher, Tina M – Fafmy, Nahed – Paul, Vinod K – Du, Lizhong – Okolo, Angela A – de Almeida, Maria-Fernanda – Olusanya, Bolajoko O – Kumar, Praveen – Cousens, Simon and Lawn, Joy E 2010. Neonatal Hyperbilirubinemia and Rhesus disease of the newborn: incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. *Pediatr Res.* 2013 Dec; 74 (Suppl 1): 86–100.

Blaney, Kathy – Howard, Paula 2000. *Basic & Applied Concepts of Immunohematology.* St. Louis, Missouri: Mosby. 27, 61.

Cash K – Brown T and Strupp A 1999. Anti-G in a pregnant patient. *Transfusion.* 1999; 39: 531–533.

Dajak, Slavica – Roje, Damir – Željka, Hundrić Hašpl – Maglić, Pera Erceg 2014. The importance of antenatal prevention of RhD immunisation in the first pregnancy. *Blood Transfus.* 2014 Jul; 12(3): 410–415.

Daniels, Geoff and Bromilow, Imelda 2007. *Essential Guide to Blood Groups.* First edition. Publication: Blackwell Publishing Ltd. 49,65.

Daniels, Geoff and Bromilow Imelda 2010. *Essential Guide to Blood Groups.* Second edition. Publication: Wiley-Blackwell. 33–36, 41.

Deshpande, R.H – Wadde S. K 2013. Distribution of Blood Groups in Blood Donors in Blood Banks of Latur Sch. *J. App. Med. Sci.* 2013;1(4): 276–279.

Gahmberg, Carl G 1997. Solukalvon kiehtova maailma–perustutkimuksesta klinisiin sovelluksiin. *Matti Äyräpään luento 1997:* 814.

Haimila, Katri 2014. FT, Biologi. Sikiön RHD-veriryhmä suojausten kohdentamisessa. *Verikeskuspäivä – esitysmateriaali.* 2014: 1–6.

Harmening, D 2005. *Modern blood banking & transfusion practices.* 5. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company.

Hellstén, Soile 2006. *Verensiirto-opas.* (toim.) Helsinki. 3.uudistettu painos. Suomen kuntaliitto.

Hinrics, M – Keith M.A 2014. Cold acid elution (ELU KIT II) Immunohematology. Volume 30 number 3. 2014: 113–116.

Hirsjärvi, S – Remes, P – Sajavaara, P 2010. Tutki ja kirjoita. 15 -16 Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 23, 130–131, 134–140, 164, 177–184, 231–233.

Hoppu, Kalle 1999. Vastasyntyneen keltaisuus. Vastasyntyneen sairaudet ja kehityshäiriöt. Teoksessa Suomalaisen lapsiperheen lääkärikirja. (toim.) Porvoo. 8. painos WSOY.

Huber, A.R – Leonard, G.T – Driggers, R.W. – Learn, S.B. – Gilstaddc, C.W 2006. Case report: moderate hemolytic disease of the newborn due to anti-G. I Immunohematology. Volume 22, number 4, 2006: 22: 166 -170.

Huovinen, P – Meri, S – Peltola, H – Vaara, M – Vaheri, A. ja Valtonen, V. (toim.) 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 1. painos. Helsinki: Duodecim.

HUS n.d. Vastasyntyneen keltaisuus. Neuvoja vanhemmille. Verkkodokumentti: <[http://www.hus.fi/sairaanhoito/lasten-sairaanhoito/kun-lapsi-sairastuu/Vastasyntyneen\\_keltaisuus/Sivut/default.aspx](http://www.hus.fi/sairaanhoito/lasten-sairaanhoito/kun-lapsi-sairastuu/Vastasyntyneen_keltaisuus/Sivut/default.aspx)> Luettu 25.3.2015.

ISBT 2015. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. System Table of Blood Group antigens. Verkkodokumentti < <http://www.isbtweb.org/working-parties/redcell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>> Luettu 17.3.2015.

Jarva, H – Meri, S 2011. Immuunipuolustus eri ikäkausina. Teoksessa: K. Hedman, T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri ja M. Vaara (toim.) Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet osa 2. Porvoo: Bookwell Oy, 187–195.

Juvonen, Eeva – Sareneva, Inna – Krusius, Tom 2013. Verivalmisteita täsmälliseen verensiirtotarpeeseen Suomen Lääkärilehti 2013: 49/2013 vsk 68: 3227–3230a.

Juvonen, Eeva – Savolainen, Eeva-Riitta 2007. Immuunihemolyttiset anemiat. Vastasyntyneen hemolyyttinen tauti. Teoksessa: Veritaudit. 3. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim 2007: 202–204.

Juvonen, Eeva – Salmi, Toivo – Savolainen, Eeva-Riitta 1996. Hemolyttiset anemiat. Teoksessa: Veritaudit. 1. painos. Duodecim 122–126.

Kacem, Narjes – Jemni-Yacoub, Saloua – Chiaroni, Jacques – Bailly, Pascal – Silvy, Monique 2015. Paternal RHD zygosity determination in Tunisians: evaluation of three molecular tests. Blood Transfus. 2015 Jan; 13(1): 59–65.

Kenti, Julie – Farrell, Anne-Maree – Soothill, Peter 2014. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice .BMC Pregnancy Childbirth 2014: 14: 87.

Ketola, Ilkka 2013. LT, Lastenlääkäri, Neonatologi. Veriryhmäimmunisaatiot ja vastasyntyneen hoito ja seuranta. Raskaudenaikaiset veriryhmäimmunisaatiot koulutuspäivä 2013: 1–6.

Klein, Harvey G and Anstee, David J 2005. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11<sup>th</sup> edition. Edited by Klein HG, Anstee DJ. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd 2005: 496–545.

Klemetti, Reija – Hakulinen-Viitanen, Tuovi 2013. Äitiysneuvolaopas. Suosituksia äitiysneuvolatoimintaan. THL. Juvenes Print – Suomen Yliopistopaino Oy. 2013: 116–118.

Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008. Veriryhmätutkimukset. Veripalvelu.

Koistinen, Jukka 1974. *Ortho Diagnostics 1969*. Raritan. New Jersey 08869. ABO- ja Rh- Veriryhmäjärjestelmät. 1974: 6–59.

Korhonen, Anu 2014. FM, Laboratorioasiantuntija. Opinnäytetyön ohjauskeskustelu. 19.9.2014.

Korhonen, Anu 2015. FM, Laboratorioasiantuntija. Suullinen tiedonanto. Veripalvelu. 2015.

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

KYS 2012. Veriryhmäimmunisaatiot. Potilasohje 10.2 Vastasyntyneiden teho-osasto. Kuopion yliopistollinen keskussairaala. Verkkodokumentti. <verkkoinfo.kuh.fi/ohjeet/files/100016/204909\_1\_0.DOC> Luettu: 26.12.2014.

Käypä hoito- suositus 2009. Kortikosteroidihoito ennenaikaisen synnytyksen uhatessa. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Perinatologinen Seura ry:n asettama työryhmä.

Metropolia 2014. Verkkodokumentti. < <https://tuubi.metropolia.fi/> > Terveiden ja hoitamisen opinnäytetyö. Luettu: 18.9.2014.

Murphy, Kenneth – Travers, Paul – Walter, Peter 2008. *Janeways Immunobiology* 7<sup>th</sup> edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC New York 2008:112–139.

Palfi, M – Gunnarsson, C 2001. The frequency of anti-C + anti-G in the absence of anti-D in alloimmunized pregnancies. *Transfusion Medicine*.

Peltola, Heikki – Käyhty, Helena 2011. Mitä rokotus ja rokotteet ovat? Teoksessa: *Infektiosairaudet. Kirjasarja. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. 1. painos. Duodecim. 770.

Roback, John D, MD, PhD – Grossman, Brenda J. MD, MPH – Harris, Teresa MT(ASCP)SBB, CM, CQIA, CQA(ASQ) – Hillyer, Christopher D. MD 2011. *Technical Manual*. USA, Maryland: AABB.2011: 506.



Reid, Marion E – Lomas-Francis, Christine – Olsson, Martin L 2012. The Blood Group Antigen Facts Book, Third Edition. Published by Academic Press 2012: 146–195.

Relati, Giorgio 2007. Forty years of anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfusion*. Jan 2007; 5(1): 3–6.

Renton P. H and Hancock Jeanne A 1958. Rh Antibodies and the Prozone Phenomen. From the National Blood Transfusion Service Manchester 1 Received for Publication April 10, 1957; *J Clin Pathol* 1958 11: 49–52.

Ruutu, Tapani – Rajamäki, Allan – Lassila, Riitta – Porkka, Kimmo (toim.) 2007. Veritaudit 3. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Sainio, Susanna – Kuosmanen, Malla 2012. Vastasyntyneen hemolyyttinen tauti ei ole hävinnyt Suomesta. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim Katsaus* 2012: 128(2): 151-7.

Sainio, Susanna 2013. LT, Erikoislääkäri. Vastasyntyneen hemolyyttinen tauti. Raskaudenaikaiset veriryhmäimmunisaatiot - koulutuspäivä 2013: 1–3. Helsinki: Veripalvelu.

Sainio, Susanna – Kuosmanen, Malla 2014. Raskaudenaikaisten veriryhmäimmunisaatioiden seulonta ja ehkäisy. *Suomen Lääkärilehti* 16–17/2014 vsk 69.2014: 1239–1245a.

Santavy, Jiri 2010 Hemolytic disease in the newborn-history and prevention in the world ant the Chech Republic. *Pap Med Fac Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010 Jun; 154(2): 147–151.

Sareneva, Inna 2013a. Laboratoriasiantuntija. Verensiirtoa edeltävät sopivuustutkimukset ja niiden oikea ajoitus. Helsinki: Veripalvelu.

Sareneva, Inna – Haimila, Katri – Korhonen, Anu – Stefanovic, Vedran – Kuosmanen, Malla – Sainio, Susanna 2013b. Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-G. *Finnish Red Cross Blood Service*.

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

Seppälä, Ilkka – Söderlund, Maria – Lappalainen, Maija – Hedman, Klaus 1994. Katsauksessa: Vasta-aineen aviditeetti immuunivasteessa ja infektiotautien diagnostiikassa *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 1994; 110(2): 178.

Shirley, R.S. – Mirabella, D.C. – Lumadue, J.A. – Ness, P.M 1997. Differentiation of anti-D, -C, and -G: clinical relevance in alloimmunized pregnancies. *Transfusion Volume* 37, May 1997; 37: 493–496.

SPR Veripalvelu 2013. Ohje immunisoituneelle odottavalle äidille. Helsinki: Veripalvelu.

SPR Veripalvelu 2014. Raskaudenaikaisten veriryhmävasta-aineiden seulontaohjelma Suomessa. Helsinki: Veripalvelu.

Strohm, Patricia L 2005. Hemolytic disease of the fetus and newborn Teoksessa: Rudmann, Sally V. (toim.): Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company 2005: 420–445.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006. Bioanalytiikon, Laboratoriohoitajan eettiset ohjeet.

Veripalvelu 2008. Absorptio-eluaatio heikon A-/B-antigeenin osoittamiseksi. Menetelmäohje VR-5282. Painos 2. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2009. Veriryhmäserologisten tulosten lukeminen ja reaktivoimakkuuksien arviointi. Yleisohje VR-YO-043. Painos 3. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2010. Näytteiden käsittely manuaalisesti tehtäviä veriryhmäserologisia tutkimuksia varten. Valmistusohje VR-40-2977. Painos 5. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2013. Sopivuuskoe geelitekniikalla LISS/COOMBS- korteilla. Tutkimusmenetelmä VR-3462. 8. painos. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2014. Punasoluvasta-aineiden tunnistus ID-geelitekniikalla. Tutkimusmenetelmä VR-3463. 8. painos. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2015a. Punasoluvasta-aineiden absorptio tutkittavasta plasmasta. Valmistusohje VR-40-2974. Painos 5. Helsinki: Veripalvelu.

Veripalvelu 2015b. Vasta-ainetitteri. Tutkimusmenetelmä VR-90-40-2974-L5. Helsinki: Veripalvelu.

Tsimba – Chitsva, F – Bishop, S – Kezeor, K. 2012 Warm autoadsorption with enzyme-treated red blood cells. Immunohematology: Volume 28, number 3. 88–90.

Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta. 2012–2014. Hyvä tieteellinen käytäntö <<http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanta> > Luettu 5.4.2015.

Ulander, Veli-Matti – Halmesmäki, Erja – Ämmälä, Pirkko 2004. Rh-immunisaation muuttuva hoito. Katsaus. Duodecim. 120(24). 2897–904.

Varto, Juha 1992. Teorianmuodostuksen erityispiirteet laadullisessa tutkimuksessa. Laadullisen tutkimuksen raportointi. Teoksessa: Laadullisen tutkimuksen metodologia. Kirjayhtymä Oy 1992: 101–114.

Vilka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi 18–26, 152–154.

Yeowon A. Kim – Robert S. Makar 2011. Detection of fetomaternal hemorrhage American Journal of Hematology 417–423. Verkkodokumentti:  
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.22255/pdf>> Luettu: 3.1.2015.

Yousuf, Rabeya – Abdul Aziz, Suria – Yusof, Nurasyikin – Fun Leong Chooi 2012. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-D and anti-S alloantibodies: a case report Journal of Medical Case Reports 2012.

## Alloabsorptio

1. 1. absorptio D+C- ja D-C+ soluilla (30 min + 37 °C)
  - a. Plasma 2. absorptioon
  - b. Eluaatio käyttäen 1. abs. soluja
    - i. Pesu 5x → Ota viimeisestä pesuliuksesta näyte talteen
    - ii. 700 ul pestyjä soluja + 700 ul eluointipuskuria → fuugaus
    - iii. Eluaatti (= supernatantti) tarkasti puhtaaseen putkeen
    - iv. 500 ul (tai niin paljon kuin saa) eluaattia uuteen putkeen + saman verran neutralointipuskuria → fuugaus
    - v. Siirrä valmis eluaatti puhtaaseen putkeen
  - c. Tee plasmalle vielä kolmas absorptio
  
2. Tee vasta-ainetitterit
  - a. käsittelemättömästä: R1r, R2r, 6.(r'r) soluilla
  - b. D+C- abs. plasmasta: R1r
  - c. D-C+ abs.plasmasta: R1r
  
3. Tee vasta-ainetunnistus (kontrolleina papainisoidut solut, PBS NaCl-kortilla ja ID-2 AG-kortilla)
  - a. D+C- abs. plasmasta
  - b. D+C eluaatista
  - c. D-C+ abs.plasmasta
  - d. D-C+ eluaatista
  
4. Tee sopivuuskokeet (ID-2)
  - a. D+C eluaatin pesuliuksesta D+C- soluilla
  - b. D-C+ eluaatin pesuliuksesta D-C+ soluilla

## REAGENSIT

<u>Rh-papaiini</u>	valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Steriili fysiologinen keittosuolaliuos NaCl, 9 g/l</u>	Natriumkloridi 0,9 % 1000 mL, B.Braun Melsungen Ag
<u>ID-Diluent 2</u>	Modified LISS , 500 mL, DiaMed AG, Switzerland
Puskurin käyttöliuos, PBS-liuos	valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Fosfaattipuskuri 67 mmol/L pH 7,3</u>	valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Solujen pesuliuos pH 6,8</u>	Fosfaattipuskuroitu EDTA-liuos, pH 6,8 punasolujen pesuun /valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Eluointipuskuri pH 2,8</u>	Hapan puskuri pH 2,8 vasta-aineen eluointiin /valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Neutralointipuskuri pH 10,4</u>	Alkaalinen puskuri pH 10,4 eluaatin neutralointiin /valmistetaan liuoslaboratoriossa
<u>Testipunasolut</u>	SPRV:n paneelisolut, tunnetut O-veriryhmän solut 0,8 % suspensiona CellStab-säilytysliuoksessa
	R1r, R2r ja 6. solu r"r punasolut suspensiossa/valmistetaan liuoslaboratoriossa
	SPRV:n entsyymikäsitellyt (papaiini) paneelisolut 0,8 % suspensiona CellStab-säilytysliuoksessa
ID-geelikortit	ID-Card "LISS/Coombs" Indirect and direct antiglobulin test, Bio-Rad Switzerland
<u>NaCl-entsyymigeelikortit</u>	ID-Card "NaCl, enzyme test and cold agglutinins" Bio-Rad Switzerland

VÄLINEET	LAITTEET
10 ml kierrekorkillisia muoviputkia	Serologinen sentrifugi, Dia-Med DiaCent-12
Pasteur-pipettejä	Lämpöhaude, DiaMed ID-Incubator
automaattipipetti 5µ ja 5ml ja pipetinkärjet	Koeputkisekoitin, Vortex-Genie
kello	Laboratoriosentrifugi, Heraeus labofuge 400
50 ml Falcon- putkia	Serologinen sentrifugi, Dia-Med DiaCent-12
lasisia pipettejä	Vesihaude, Grant JB2
Wasserman-putkia ja korkit	Korttisentrifugi, Dia-Med ID-Centrifuge
Putkitelineitä	Laboratoriosentrifugi, Heraeus labofuge 400
	Valopöytä

## Tulkintakaavio

Paneeli-solut	natiivi-plasma	D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
		abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+	+	+	+	+	+	<b>Anti-D Anti-C Anti-G</b>
D+C-	+	-	+	+	+	
D-C+	+	+	+	-	+	

Paneeli-solut	natiivi-plasma	D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
		abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+	+	+	+	+	+	<b>Anti-D Anti-C</b>
D+C-	+	-	+	+	-	
D-C+	+	+	-	-	+	

Paneeli-solut	natiivi-plasma	D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
		abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+	+	-	+	+	+	<b>Anti-D Anti-G</b>
D+C-	+	-	+	+	+	
D-C+	+	-	+	-	+	

Paneeli-solut	natiivi-plasma	D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
		abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+	+	+	+	-	+	<b>Anti-C Anti-G</b>
D+C-	+	-	+	-	+	
D-C+	+	+	+	-	+	

Paneeli-solut	natiivi-plasma	D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
		abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+	+	-	+	-	+	<b>Anti-G</b>
D+C-	+	-	+	-	+	
D-C+	+	-	+	-	+	

Tutkittava näyte		D+C- solut		D-C+ solut		Tulkinta
Paneeli-solut	natiivi-plasma	abs. plasma	Eluaatti soluista	abs. plasma	Eluaatti soluista	
D+C+		+				
D+C-						
D-C+						



Lupa: 19.3.2015. Pöllänen Ilona













