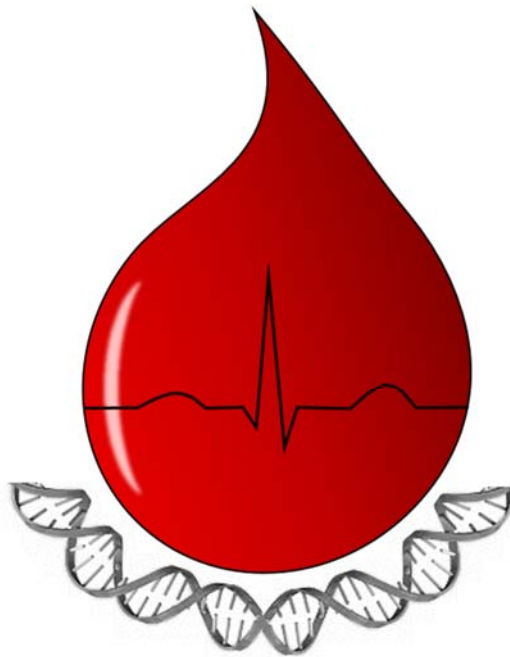




UMEÅ UNIVERSITET



BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Detektion av alloantikroppar hos nyligen transfunderade DAT- positiva patienter

Utvärdering med en experimentell *in vitro* modell

Mi Bixo

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2018



Examensarbetets engelska titel

Detection of Alloantibodies in Recently Transfused DAT-Positive Patients –
Evaluation with an Experimental *in vitro* Model

Handledare

Fredrik Toss, Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin, Norrlands
Universitetssjukhus

Läroproponent: **Mattias Forsell**

Examinator: **Mari Norgren**

Datum för godkännande: **2018 06 14**

Abstrakt

Autoimmun hemolytisk anemi (AIHA) är ett tillstånd där autoantikroppar bildas mot kroppsegna erythrocytantigen. Dessa skiljer sig från alloantikroppar som istället bildas varefter man utsätts för främmande antigen. Problematik uppstår om en individ med AIHA har båda typerna som följd av immunisering efter en transfusion, detta eftersom autoantikroppar kan dölja de mer kliniskt signifikanta alloantikropparna i identifieringsarbetet. Syftet var att med autoadsorption påvisa kliniskt relevanta alloantikroppar genom att adsorbera autoantikropparna hos direkt antiglobulin test (DAT)-positiva individer och därmed avgöra om metoden är säker nog att använda i klinisk rutin. Studien använde sig av autoadsorption där absorbatet användes för att identifiera alloantikroppar i ett indirekt antiglobulin test (IAT) i gelteknik. Resultatet visade att autoadsorption framgångsrikt adsorberade autoantikroppen utan att störa alloantikroppen, vilket var möjligt med uppemot 20% transfunderat blod närvarande. Detta bekräftades med en kvalitetskontroll som utgjordes av en antikroppsscreen. Slutsatsen var att autoadsorption tycks kunna identifiera medelstarkt till starkt reagerande alloantikroppar under vanligt förekommande kliniska förhållanden, förutsatt att alloantikroppen anträffas i en högre koncentration än autoantikroppen. En stor del transfunderat blod riskerar dock att ge falskt negativa svar, vilket kan innebära en förhöjd risk för transfusionsreaktioner om metoden skulle användas under dessa förhållanden.

Nyckelord

Transfusion, autoadsorption, gelteknik, polyetylenglykol (PEG), antikroppar

Introduktion

När blodtransfusioner började utföras drabbades individer av grava transfusionsreaktioner av till synes okänd anledning, vilket senare kom att visa sig som inkompatibilitet i ABO-systemet. Detta är ett tecken på interaktion mellan antigen, exempelvis ytstrukturer på erythrocyterna, och antikroppar, som producerats i form av ett immunologiskt svar mot antigenet i fråga. Normen är att antikroppar produceras först efter interaktion med en interaktiv struktur – ex. antigen – men ABO-systemet avviker från detta och har redan bildat antikroppar mot likartade strukturer. Dessa kallas för reguljära antikroppar och gör att ABO anses vara det kliniskt mest signifikanta blodgruppssystemet. De blodgruppsantigen som ger upphov till antikroppar varefter de utsätts för antigenet kallas för irreguljära antikroppar, och förekommer i betydligt lägre mängd än ABO-antikropparna. Dessa reaktioner är vanligen långsamma första gången en individ utsätts och en del reagerar flera dagar senare i en fördröjd hemolytisk transfusionsreaktion (1). Reaktionstiden fördröjs som följd av att fagocyterande celler tar upp opsoniserade erythrocyter i varierande takt varefter antikroppar produceras, vilket kan liknas med det antikroppssvar som sker vid en primärinfektion. Om en individ tidigare bildat antikroppar och utsätts för antigenet igen, som vid en framtida transfusion, kan detta istället resultera i en akut hemolytisk transfusionsreaktion då det finns ett immunologiskt minne för antigenet (2).

Autoimmun hemolytisk anemi (AIHA) är ett tillstånd där antikroppar bildas mot kroppsegna erythrocytantigen, och de kallas därmed för autoantikroppar, efter auto som betyder "själv". För att särskilja antikropparna benämner man de antikroppar som reagerar på främmande antigen för alloantikroppar, eftersom allo betyder "annan". AIHA i sin tur delas framförallt upp i varm AIHA (wAIHA) som reagerar vid 37°C och kall AIHA (cAIHA) som reagerar vid ca 30°C i kliniska miljöer (1). Detta medför att wAIHA kan reagera i blodbanan. Mellan 70-80% av alla former av AIHA är wAIHA, och resterande procent är nästan alltid cAIHA som i sin tur delas upp i flera sidotyper. AIHA kan bekräftas med ett direkt antiglobulin (DAT)-test på lab. Med DAT, som även är känt under namnet "direkt Coombs test", påvisas antikroppar som redan interagerat med tillhörande antigen och därmed är fästa till erythrocytens yta. Detta möjliggörs genom att tillsätta anti-humana globuliner, och om antikroppar är bundna till erythrocytantigenen kommer detta leda till en synlig agglutinationsreaktion (3). Detta test kan även påvisa om komplement har bundit till erythrocytantigenet, framförallt C3d. Direkt antiglobulin test (DAT)-positiva individer med antikroppar av IgG-typ – eller IgG och C3d – ger generellt indikationer på wAIHA, medan individer med enbart C3d indikerar cAIHA. Utöver en påvisbar positiv DAT är även synlig hemolys en indikation på AIHA (4). Mellan 2-4% av alla fall av AIHA uppvisar dock en negativ DAT, och en möjlig förklaring kan vara att antalet IgG molekyler det krävs för att inducera skada hos erythrocyter är mindre än det antal som krävs för att påvisa en positiva DAT. Flödescytometri kan då användas för att identifiera membranbundna IgG i väldigt låga koncentrationer (5, 6). De antikroppar som bildas varefter de utsätts för antigen – de så kallade alloantikropparna – kan binda så pass starkt till sina tillhörande antigen att de också inducerar en form av hemolytisk anemi (1).

Den vanligaste formen av immunisering är där alloantikroppar uppstår. Detta sker oftast vid transfusioner där >5% (7, 8) av patienterna utvecklar alloantikroppar av klinisk signifikans.

Problematik uppstår dock om en individ med AIHA genomgår en transfusion och blir immuniserad, vilket har rapporterats ha en frekvens på mellan 10-40% beroende på studie (9-12). Autoantikropparna kan ge upphov till positiva reaktioner i samtliga panelceller under identifieringsarbetet, vilket i sin tur osynliggör alloantikropparna. Detta betyder att patientens autoantikroppar reagerar med de testerythrocyter som används i identifieringsarbetet och på så vis döljer de det reaktionsmönster som tillämpas för att identifiera typen av alloantikropp. En metod att använda sig av för att särskilja autoantikropparna från alloantikropparna är adsorption. Adsorption är en teknik som använder erythrocyter med kända antigen för att avlägsna tillhörande antikroppar från plasman. Metoden går ut på att en lika stor del erythrocyter som plasma blandas för att inducera interaktion mellan antigen och antikropp. Provet får inkubera en stund och kommer därefter centrifugeras. Bundna antikroppar hamnar i pelleten och kvar i det så kallade absorbatet blir de antikroppar som inte bundit till något antigen. Autoadsorption är när patientens egna erythrocyter används, medan motsvarigheten med främmande erythrocyter kallas för alloadsorption. Alloadsorption behöver dock minst tre olika fenotypade erythrocyter, medan autoadsorption enbart använder sig av patientens egna erythrocyter (12). Vid Akademiska sjukhuset i Uppsala har autoadsorption i gelteknik implementerats baserat på tilltalande resultat från en intern studie. Resultaten från studien visade dessutom att alloantikroppar kunde detekteras hos patienter som genomgått transfusion inom tre månader (personlig kommunikation).

För att stärka inbindningen av autoantikroppar vid en autoadsorption kan olika reagenser användas, såsom polyetylenglykol (PEG) eller low ionic strenght saline (LISS). PEG är en vattenlöslig polymer som stärker antigen-antikroppinteraktionen medan LISS är en högmolekylär substans som sänker jonstyrkan runt erythrocyten och följaktligen ger en större attraktionskraft mellan erythrocytantigen och antikropp (13). LISS är en mer tidskrävande metod än PEG, men båda metoderna har visat sig ge liknande resultat (1, 9). Det finns dock flera studier som trycker på att PEG är att föredra över LISS ur flera aspekter (14, 9), men att det även finns nackdelar med PEG som på vissa håll kan täckas upp av LISS. LISS kan exempelvis tänkas användas om multipelt transfunderade patienter, eller gravida, inte kan ge upphov till reaktioner under identifieringsarbetet där PEG använts (9). PEG valdes att användas i denna studie.

I en studie från Indien där blod transfunderats till individer med wAIHA upptäcktes alloantikroppar hos cirka 30%, samtliga var av Rhesus (Rh)-systemet och vanligast var anti-E (9). Detta har även studerats på andra populationer, bland annat i USA (15). Rh-systemets antigen är kliniskt relevanta då de är starkt immunogena och har en förmåga att inducera akuta och fördröjda transfusionsreaktioner. E-antigenet finns hos 29% av den kaukasiska befolkningen, 22% av den afrikanska och 39% av den asiatiska, till skillnad från D-antigenet som finns hos 85%, 92% respektive 99% av befolkningen. Det finns inte heller rutin för att matcha för E-antigenet som det gör för D-antigenet, och anti-E är därav en vanligare antikropp att stöta på vid transfusionsreaktioner i stora delar av världen (16).

Syftet var att med autoadsorption och gelteknik påvisa en kliniskt relevant anti-E alloantikropp hos DAT-positiva individer och i enlighet med detta avgöra om metoden är säker nog att använda i klinisk rutin som ett enklare alternativ till dagens praxis, vilket är alloadsorption och rörteknik.

Material och metoder

Helblod från försöksperson

Blod taget i EDTA-rör från en A RhD positiv försöksperson separerades så att A+ plasma och A+ erythrocyter erhöles. Erythrocyterna förvarades i ID-CellStab (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). Försökspersonen var sedan innan fenotypad som C+, c+, E-, e+, Fy^a+, Fy^b- med hjälp av en standardiserad metod för fenotypning. Utifrån detta var avsaknaden av E-antigenet lämpad inför valet av alloantikropp, och förekomsten av Fy^a-antigenet inför valet av autoantikropp.

Testceller och panelogram

Heterozygota, homozygota och negativa testerythrocyter selekterades utifrån ett panelogram tillhörande Transfusionsmedicin/Blodcentralen, Norrlands Universitetssjukhus (NUS). De valdes ut med tanke på förekomst och avsaknad av antigenen E och Fy^a. Erythrocyter från blodpåsar har använts för att göra suspensioner av kända testerythrocyter. De har beretts med ID-CellStab till 0,8% för att kunna användas i gelteknik.

Humant anti-sera

Humant serum med antikroppar av intresse användes som material för auto- och alloantikroppar. De var konserverade med natriumazid (NaN₃) och kom från blodgivare med blodgrupp A RhD positiv. Anti-E (LOT: LBD 430207, NUS 171213) titrerades med försökspersonens plasma från 1:1 till 1:2048 för att erhålla varierande reaktionsstyrkor medan Anti-Fy^a (LOT: 680329, NUS 100317) användes som en konstant variabel spädd 1:2.

IAT-gelteknik

Indirekt antiglobulintest (IAT), även känt som "indirekt Coombs test", går ut på att introducera kända erythrocytantigen till okända antikroppar från en patients plasma och därefter stimulera agglutination med tillsats av anti-humana globuliner. På så vis kan eventuella antikroppars förekomst påvisas, eller deras frånvaro bekräftas. Detta kan utföras i rörteknik och gelteknik (3). I denna studie användes gelteknik med gelkort (DiaMed, Cressier s, Morat, Schweiz) som hade sex skilda brunnar innehållande en gel med anti-IgG, de anti-humana globulinerna. Gelkorten användes i enlighet med etablerad rutin på Blodcentralen NUS. I brunnarna blandades utvalda erythrocytersuspensioner på 0,8% tillsammans med prov innehållande antikroppar, vilket antingen var plasma, humant sera eller absorbat, beroende på tidpunkt i studien. Erythrocytsuspensionerna var av olika typ beroende på vilka antigen som var av intresse för att kunna identifiera tillhörande antikropp. Gelkorten fick sedan inkubera i 15 min vid 37°C för att låta erythrocytantigenen och antikropparna interagera. Därefter centrifugerades korten med en gelkortscentrifug vid 1000g i 10 min för att filtrera blandningen genom gelen mot botten av brunnen. Resultaten avläsas visuellt beroende på vart i brunnen provet agglutinerat. Prov som når till botten har inte interagerat med det anti-IgG som finns i gelen, vilket konstaterar en avsaknad av antikropp. Prov som agglutinerar högt upp i brunnen tyder däremot på en stor förekomst av antikroppar. Det kallas att det har skett reaktioner i brunnarna. Utifrån detta graderades proven i enlighet med de nationella riktlinjer som finns, där svagaste reaktionen är 0 och starkaste är 4.

Simulerat transfunderat blod

En sex-gradig procentskala benämnda 100%, 95%, 90%, 80%, 70% och 50% erhöles genom att blanda försökspersonens erythrocyter (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-}) med R2R2 erythrocyter (NUS 253, E+, e- och Fy^{a-}, Fy^{b+}). Högst procent innehöll enbart egna erythrocyter medan 95% innehöll till största del egna erythrocyter och 5% främmande, och så vidare.

Autoadsorption i frånvaro och närvaro av autoantikropp

Lika del av erythrocytblandningarna blandades i glasrör med lika stor del av respektive plasmaspädning av anti-E. Detta utfördes för varje procent så att 36 olika kombinationer erhöles (Fig. 1). Sist tillsattes en lika stor del PEG så att vardera komponent utgjorde en tredjedel av totalvolymen. Rören blandades och provet inkuberades i 15 min vid 37°C för att därefter centrifugeras vid 1 000 g i 5 min.

Erythrocyterna trycktes till botten av röret och absorbatet förflyttades till ett nytt rör. Absorbatet testades därefter i IAT-gelteknik mot homozygota, heterozygota och negativa testceller med avseende på E antigenet. Proceduren upprepades på samma sätt men med plasmaspädning innehållande både anti-E och anti-Fy^a. Den andra plasmaspädningen erhöles genom att dubblera koncentrationen anti-E vid spädning med försökspersonens plasma för att därefter blandas 1:2 med anti-Fy^a. På så sätt hade båda adsorptionstillfällena samma koncentration anti-E. Absorbatet testades som vid föregående autoadsorption mot homozygota, heterozygota, och negativa testceller med avseende på E antigenet, men denna gång användes även en testcell som agerade kontroll för Fy^a antigenet genom att vara den enda Fy^a positiva cellen.

Kontroll mot panel- och screenceller

Utifrån resultatet vid den andra autoadsorptionen med båda antikropparna närvarande, selekterades den lägsta procenten med så hög reaktionsstyrka som möjligt för att utföra en kontroll. De scenarion som valdes ut hade uppvisat reaktion med både homo- och heterozygota testceller utan att reagera med Fy^a-kontrollen. Autoadsorption utfördes ännu en gång för de utvalda procenten för att därefter följa upp med en antikroppsscreen enligt etablerad rutin. Tretton testerythrocyter är uppdelade i så kallade panel- och screenceller och är specifikt utvalda av Blodcentralen i Umeå. De redogörs i ett schema (panelogram, NUS 2018-03-03) där alla erythrocyter har en varierande förekomst av olika antigen för att kunna ge specifika reaktionsmönster när de interagerar med okända antikroppar. Dessa mönster används för att identifiera vilken antikropp det handlar om beroende på vilka panel- och screenceller som uppvisar förekomst eller avsaknad av agglutination. En patients egna erythrocyter används som en kontroll i form av en fjortonde testcell. Identifieringsprocessen utfärdas med IAT-gelteknik där absorbatet från de två olika procenten kontrolleras mot samtliga av dessa testceller. Utifrån reaktionsmönstret tolkas antikroppsspecificiteten.

DAT-sensibilisering

DAT-sensibilisering är när erythrocyter får reagera med antikroppar som har tillhörande antigen på erythrocytens yta. Försökspersonens koncentrerade erythrocyter (Fy^{a+}, Fy^{b-}) tvättades tre gånger med PBS (NaCl, 0,9%) vid 1 000 g i 5 min, sedan inkuberades det med en lika stor volym anti-Fy^a i 60 min vid 37°C. Därefter centrifugeras de igen vid 1000g i 5 min så att supernatanten kunde skiljas från pelleten där erythrocyter med bundna antikroppar återfanns. Erythrocyterna tvättades ytterligare tre

gångar med PBS för att avlägsna eventuella ospecifika bindningar och användes därefter för att bereda en 0,8% suspension. Denna erythrocytsuspension användes för att bekräftades sensibiliseringen med DAT specifik gelteknik. Det fungerar precis likadant som IAT-gelteknik förutom att det även finns brunnar som binder C3d-komplement och brunnar utan någonting utöver gelen som agerar kontroll. Supernatanten kontrollerades även den, och detta mot tre testceller med varierande mängd antigen, en heterozygot, en homozygot och en negativ, för att få en indikation på hur stor del antikroppar som absorberats. Detta jämfördes med rent anti-Fy^a som kontrollerades mot samma testceller.

Autoadsorption i närvaro av två antikroppar med DAT-sensibiliserade egna erythrocyter

Procenten 90 och 95 av det simulerade blodet blandades på motsvarande sätt som vid tidigare autoadsorption (se "Autoadsorption i frånvaro och närvaro av autoantikropp") men denna gång med DAT-sensibiliserade egna erythrocyter. Plasmaspädningen med högst koncentration på 1:2 tillsattes till vardera rör, i detta fall med hälften anti-E och hälften anti-Fy^a. Lika stor del PEG tillsattes så att alla komponenter utgjorde en tredjedel var. Rören blandades och inkuberades i 15 min vid 37°C för att därefter centrifugeras vid 1000g i 5 min. Absorbatet från båda rören testades mot homozygota, heterozygota och negativa testceller som alla var Fy^a negativa, samt mot en testcell som agerade kontroll för Fy^a.

Etiska överväganden

Studien är ett kliniskt utvecklingsarbete och behöver inte etikgranskas. Helblodet som användes donerades av den som utförde studien, och individen utsattas inte för några risker utöver provtagningen. Individen var därtill väl informerad och att den potentiella nyttan tydligt översteg de eventuella riskerna med att ge blod till studien. De testceller och humana serumet med antikroppar som användes var från Blodcentralen, NUS, och användes i enlighet med de lokala föreskrifter som gäller. Givarna har i och med blodgivning godkänt att deras blod kan användas till forskning/utveckling. Mängderna av erythrocyter och plasma som användes påverkade inte det dagliga arbetet på avdelningen.

Resultat

Reaktionsstyrkor från titrering

Reaktionsstyrkan för titrering av anti-E utlästes i IAT-gelteknik mot en heterozygot 0,8% erythrocytsuspension. Utifrån detta kunde sex olika reaktionsstyrkor erhållas och graderas 0; 0,5; 1; 2; 3 och 4, där 0 inte gav någon synlig reaktion och 4 gav den starkaste reaktionen. Den starkaste reaktion var vid 1:2 och den svagaste på 1:64 (Tab. 1). Vid kontroll mot homozygota och negativa erythrocyter gav de homozygota cellerna kraftigare reaktioner än de heterozygota, vilket var förväntat.

Autodsorption i frånvaro och närvaro av autoantikropp

Vid autoadsorption med endast anti-E närvarande presenterades ett tydligt mönster över hur anti-E påverkades av adsorptionsprocessen (Tab. 2). Detta reaktionsmönster påvisades även när både auto- och alloantikroppen närvarade (Tab. 3) utan att autoantikroppen anti-Fy^a kunde observeras i kontrollen. För den högsta koncentrationen på 1:2 kunde alloantikroppen observeras som lägst vid 80% och vid 90% med lite tydligare resultat. Utifrån detta utfördes en kvalitetskontroll där resultatet visade tydliga anti-E vid båda procenten (Tab. 4).

DAT-sensibilisering

De DAT-sensibiliserade erythrocyterna gav reaktionsstyrkor på 2-3 i IgG brunnen samt 0 i C3d och kontrollbrunnarna. Supernatanten reagerade med testcellerna och gav reaktionerna 0,5 för de homozygota (Fy^{a+}, Fy^{b-}) testcellerna, samt 0 för de heterozygota (Fy^{a+}, Fy^{b+}) och negativa (Fy^{a-}, Fy^{b+}) testcellerna. Rent anti-Fy^a gav reaktionsstyrkorna 2-3 för de homozygota, 2 för de heterozygota och 0 för de negativa testcellerna.

Autoadsorption vid användandet av DAT-sensibiliserade erythrocyter

Autoadsorption av 90% och 95% med både anti-E och anti-Fy^a närvarande uppvisade ett likadant, dock svagare, reaktionsmönster som vid användandet av icke DAT-sensibiliserade erythrocyter (Tab. 5).

Diskussion

Blodcentralen på NUS i Umeå använder idag alloadsorption i rörteknik för att detektera eventuella alloantikroppar hos DAT-positiva patienter. Detta är tidskrävande och betydligt mer arbeidskraftsintensivt än att istället använda sig av autoadsorption i gelteknik. Gelteknik har tidigare visat sig fungera vid identifiering av antikroppar efter både auto- och alloadsorption (9, 17). Studien som ledde till rutininförande i Uppsala har en styrka i att de använt faktiska patientfall i jämförelse med denna studie som baseras på simulerade scenarion, men det finns även brister i att de inte kan se vilka antikroppar de missat. Det är av intresse att se vart de eventuella gränserna går för hur pass mycket transfunderat blod en patient kan motta för att fortfarande kunna nyttja autoadsorption i identifieringsarbetet av alloantikroppar. I deras studie användes patientfall där variabeln transfunderat blod inte var kontrollerbar, något som däremot kunde justeras i denna studie då allt simulerades i provrör. De gränsvärden som eventuellt föreligger är individuella beroende på antikroppens affinitet och aviditet, samt i vilken koncentration den förekommer. Att tvätta erythrocyter med kall NaCl samt att använda en kylcentrifug har uppvisat att låg-affinitiva IgG autoantikroppar binder lättare med tillhörande antigen (5), men huruvida detta skulle kunna tillämpas som metodval vid en misstänkt falskt negativ DAT bör studeras vidare. Olika individer, som fått lika mycket transfunderat blod och utvecklat likadana antikroppar, kan uppvisa helt skilda problem vid identifieringsarbetet på lab. Kanske den enes antikroppar kan identifieras med autoadsorption, medan den andres inte kan det? Denna studie har lagt grund för vidare studier inom området eftersom detta resultat enbart speglar ett scenario med två specifika antikroppar.

I en studie av Laine *et al* (18) från 2000 observerades att så lite som 2-6% transfunderade antigenpositiva erythrocyter påverkade adsorptionen av anti-D, anti-E och anti-Fy^a-negativt. Det kunde dock observeras att anti-K först adsorberats bort vid 11-17 %, vilket delvis speglar att antikroppar är unika gällande styrka och koncentration. Deras resultat erhöles med flödescytometri men kunde ej studeras visuellt med metoder som idag används rutinmässigt på blodcentralen. Det är viktigt att poängtera att denna studie istället enbart har studerat reaktioner visuellt i gelteknik. Det är även värt att poängtera att Laine *et al* i viss mån använde sig av så kallade ZZAP behandlade erythrocyter, något som inte tillämpades i denna studie. En del efterforskningar tyder på att användandet av PEG resulterat i likartade resultat (11) som vid användandet av ZZAP behandlade erythrocyter, medan andra understryker att PEG bör användas med omtanke då den har sina brister (17, 19), vilket diskuterats närmare i introduktionen.

Det finns ett flertal studier där användandet av LISS och PEG jämförs på olika sätt (9, 14, 20) och valet att använda PEG i denna studie grundades i att fördelarna avseende patientsäkerhet och tidsbesparing övervägde nackdelarna. PEG är dessutom den reagens som idag används som standard vid detektion av antikroppar på Blodcentralen vid NUS. Att utgå från samma reagens är ett kostnadseffektivt val likaväl som det ger samordningsvinster då det inte kräver ytterligare material för en ny metod. Det är även vad de i studien från Uppsala använde. Att använda gelteknik istället för rörteknik har framförallt att göra med patientsäkerhet, då det blir tydligare resultat. Denna studies resultat har visat sig kunna ge likvärdiga resultat som de resultat som vanligen erhålls vid Blodcentralen NUS när rörteknik

använts. Det är även ett tidsbesparande val att övergå till gelteknik. Något som dock är fördelaktigt med rörteknik är att den lägre sensitiviteten eventuellt skuggar störande autoantikroppar på ett positivt sätt om de förekommer i låg koncentration.

Den första autoadsorptionen som utfördes innehöll enbart alloantikroppen anti-E och erythrocytblandningen, för att se under vilka förhållanden antikroppen påverkades av de främmande erythrocyterna som var E+. Det var även av intresse att se om autoantikroppen kunde påverka autoadsorptionen av alloantikroppen genom att jämföra reaktionsstyrkorna mellan autoadsorptionerna. Anti-E uppvisade ett liknande reaktionsmönster som vid plasmatitreringen, men reaktionerna var svagare, vilket var oväntat. Kanske att plasmaspädningen påverkats av PEG eller den andra antikroppen. Något som dock var förväntat var att den heterozygota testcellen (NUS 227) reagerade svagare än den homozygota (NUS 266). När båda antikropparna närvarade vid den andra autoadsorptionen presenterades samma mönster med de heterozygota (NUS 227) och homozygota (NUS 266) testcellerna, men den homozygota testcellen visade reaktion som var aningen svagare i jämförelse med första autoadsorptionen. Det är värt att poängtera att olika homozygota testceller användes i de olika autoadsorptionerna. Första gången användes NUS 214 och andra gången NUS 266, detta eftersom NUS 214 var Fy^a positiv, vilket inte var önskvärt då även anti- Fy^a närvarade i den andra omgången. Noterbart var att reaktionsstyrkorna var aningen starkare än vid första reaktionen. När autoadsorptionen repeterades för 90% och 95% fast med DAT-sensibiliserade egna erythrocyter så erhöles samma reaktionsmönster som vid användandet av de icke DAT-sensibiliserade erythrocyterna, dock svagare. Hur pass mättade de egna erythrocyterna är *in vivo* hos en individ med AIHA är väldigt svårt att bedöma, samt att det varierar mellan olika individer, men i denna studie så var det inte någon större skillnad mellan mättade och omättade vid identifieringsarbetet.

Vad som observerades utöver detta var att även vid en relativt stor andel transfunderade antigenpositiva erythrocyter uppträdde reaktionsstyrkorna 3 och 4 för både de heterozygota och homozygota testcellerna; båda nådde ner till 80% utan att Fy^a reagerade i kontrollen. Utifrån detta utfördes en ny autoadsorption för 80% - samt 90% som hade lite tydligare reaktioner - vid reaktionsstyrka 4 för att kontrollera absorbatet mot en antikroppsscreen och på så vis se om anti-E var tydligt, eller om Fy^a störde. Anti-E visade sig vara nog tydlig vid 80% och fullt tydlig vid 90% utan att Fy^a syntes någonstans. Detta tyder på en tendens att upp till 20% transfunderat blod kan förekomma och ändå möjliggöra alloantikroppsidentifiering under villkoret att alloantikroppen finns i en högre koncentration. Något som dock uppmärksammades under studiens gång var att det humana serumet med antikropparna blev grumligt, kanske att en eventuell bakterieväxt förekom. Detta observerades mer så i anti-Fy^a än anti-E. Om detta har påverkat studien är oklart, men utifrån det konsekventa reaktionsmönstret bör det inte ha utgjort en bias.

Denna studie lägger en bra grund för vidare experiment, men då studien använder sig av simulerade scenarion *in vitro* är det även av intresse att studera faktiska patienter där delar av processen skett *in vivo*. Dessutom så har enbart två antikroppar studerats, och för att få en bättre bild av hur olika antikroppar - från olika individer därtill - beter sig vid specifikt autoadsorption, bör experimentet breddas där flera olika antikroppar och antikroppskombinationer undersöks. Det som dock kan

konstateras från detta är att autoadsorption möjliggör detektion av alloantikroppar förutsatt att alloantikroppen förekommer i en högre koncentration, fördelaktigt en högre koncentration än autoantikroppen, vilket det vanligen även gör (1). Det är också viktigt att andelen eget blod överstiger andelen transfunderat blod. Sedan hur mycket transfunderat blod som kan närvara är även det en aspekt ur denna studie som bör breddas innan en slutsats kan dras, detta med tanke på andra antikroppar och kombinationer av antikroppar.

I denna studie har det påvisats att det i provet kan finnas upp emot 20% transfunderade erythrocyter och ändå möjliggöra detektion av alloantikroppen. Detta gäller dock specifikt vid dessa två antikroppar under kontrollerade koncentrationer. Spädningsfaktorn då detta studerades var 1:2, vilket var den starkaste i studien, om den varit lägre så hade identifiering kanske inte varit möjligt. Denna iakttagelse kan inte appliceras generellt, utan bortom att observera andra typer av antikroppar vid en autoadsorption som denna, bör även kombinationen av antikroppar undersökas. Det skulle exempelvis vara av intresse att se hur antikropparna beter sig om båda var av Rhesus-typ, och inte bara alloantikroppen. De antikroppar som använts är humana polyklonala antikroppar så det skulle även vara givande hur exakt samma experiment skulle se ut vid användandet av kommersiella monoklonala antikroppar för att se hur en antikropps styrka och specificitet påverkas. Närvaron av C3d har heller inte tagits i beaktning under denna studie då de inte påvisades med DAT geltekniken, men då det kan påträffas hos en del DAT-positiva patienter skulle även det vara av intresse att studera närmare.

Utifrån resultatet och de tendenser som observerats i denna studie skulle det vara möjligt att inför autoadsorption med gelteknik på Blodcentralen vid NUS. Den skulle då lämpligen kunna användas vid närvarande av en positiv DAT med en komplett positiv antikroppsscreen. Autoadsorptionen kan dessutom genomföras flera gånger på samma prov om antikroppsscreeningen är fortsatt genomgående positiv efter en första autoadsorption. Vid en negativ DAT, eller positiv DAT med delvis negativ antikroppsscreen, är det istället lämpligt att gå vidare med mottagare/givare (M/G)-test enligt rutin. Förekomsten och mängden transfunderat blod är lite mer otydlig och måste studeras vidare för att kunna ge en klar slutsats, men klart är att det handlar om en mindre mängd transfunderat blod, eftersom risken att förbise svaga antikroppar ökar med antalet allogena erythrocyter.

Slutsatsen var att autoadsorption kan identifiera medelstarkt till starkt reagerande alloantikroppar under vanligt förekommande kliniska förhållanden, förutsatt att alloantikroppen anträffas i en högre koncentration än autoantikroppen. En stor del transfunderat blod riskerar dock att ge falska negativa svar, vilket kan innebära en förhöjd risk för transfusionsreaktioner om metoden skulle användas under dessa förhållanden.

Tack tillägnas

Jag vill tacka min handledare Fredrik Toss för möjligheten att utföra mitt examensarbete inom transfusionsmedicin, ett område jag innerligen hoppades på att få chansen att fördjupa mig i. Jag vill även tacka min handledare på lab, Fredrik Wastring, för ett otroligt engagemang. Du har alltid varit tillgänglig när jag behövt dig som mest och ställt upp med både din tid och för frågestunder.

Referenser

1. Issitt PD, Anstee DJ. (1998) *Applied Blood Group Serology*. 4th edition. Durham: Montgomery Scientific Publications. ISBN: 9780-9356-4305-3. 175-176, 907-974.
2. Zimring JC, Spitalnik SL. Pathobiology of transfusion reactions. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:83-110.
3. Matthews J, Newton S. The coombs test. *Clin J Oncol Nurs*. 2010;14(2):143-145.
4. Bass GF, Tuscano ET, Tuscano JM. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):560-564.
5. Chadhary RK, Das SS. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(1):5-12.
6. Thedsawad A, Taka O, Wanachiwanawin W. Development of flow cytometry for detection and quantitation of red cell bound immunoglobulin G in autoimmune hemolytic anemia with negative direct Coombs test. *Asian pac J Allergy Immunol*. 2011;29(4):364-367.
7. Tormey CA, Fisk J, Stack G. Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. *Transfusion*. 2008;48(10):2069-2076.
8. Mo Z, Li H, Huang L, Jiao W. Prevalence and specificity of RBC alloantibodies in the general hospitalised population in Guangxi. *Transfus Med*. 2015;25(5):313-319.
9. Das SS, Chaudhary RK. Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus*. 2009;7(4):300-304.
10. Laine ML, Beattie KM. Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies. *Transfusion*. 1985;25(6):545-546.
11. Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantobodies. *Transfusion*. 1999;39(1):11-16.
12. Barron C. Allogenic red blood cell adsorption for removal of warm autoantibody. *Immunohematology*. 2014;30(4):153-155.
13. Harmening D. (2012) *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*. 6th edition. F. A. Davis Company. ISBN: 9780-8036-2682-9, s 110-111.
14. Chiaroni J, Touinssi M, Mazet M, DeMicco P, Ferrera V. Adsorption of autoantibodies in the presence of LISS to detect alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion*. 2003;43(5):651-655.
15. Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, Bryant SC, Melton LJ 3rd, Vamvakas EC, Moore SB. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted Country, Minnesota. *Transfusion*. 2001;41(11):1413-1420.
16. Dead L. (2005) *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Center for Biotechnology Information. E-bok. Kapitel 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/> (2018-04-12)
17. Judd WJ, Dake L. PEG adsorption of autoantibodies causes loss of concomitant alloantibody. *Immunohematology*. 2001;17(3):82-85.
18. Laine EP, Leger RM, Arndt PA, Calhoun L, Garratty G, Petz LD. In vitro studies of the impact of transfusion on the detection of alloantibodies after autoadsorption. *Transfusion*. 2000;40(11):1384-1387.
19. Barron CL, Brown MB. The use of polyethylene glycol (PEG) to enhance the adsorption of autoantibodies. 1997;13(4):119-122.
20. Cheng CK, Wong ML, Lee AW. PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*. 2001;41(1):13-17.

Tabell 1. Erhållna reaktionsstyrkor vid titrering av anti-E. Resultatet konstaterades med IAT-gelteknik mot heterozygota testceller och kontrollerades därefter mot homozygota och negativa testceller.

	Anti-E spädningsfaktor					
	1:64	1:32	1:16	1:8	1:4	1:2
Testceller						
Heterozygot ^a	0	0,5	1	2	3	4
Homozygot ^b	1	2	3	3	4	4
Negativ ^c	0	0	0	0	0	0

^a NUS 227 (E+, e+), titreringen utfördes tre gånger

^b NUS 297 (E+, e-), titreringen utfördes en gång

^c NUS 266 (E-, e+), titreringen utfördes en gång

Tabell 2. Erhållna reaktionsstyrkor från första autoadsorption med endast alloantikropp närvarande. Resultatet erhöles med IAT-gelteknik där absorbatet testades mot heterozygota, homozygota och negativa testceller.

	Anti-E spådningsfaktor																	
	1:64			1:32			1:16			1:8			1:4			1:2		
	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	Ho ^a	He ^b	Ne ^c
Andel E- erythrocyter (%)																		
100	0,5	0	0	1	0	0	2	1	0	2	2	0	3	3	0	3	3	0
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	1-2	0,5	0	2	2	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	1	0,5	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Homozygot testcell, NUS 214 (E+, e- och Fy^{a+})

^b Heterozygot testcell, NUS 227 (E+, e+ och Fy^{a+})

^c Negativ testcell, NUS 225 (E-, e+ och Fy^{a+})

Tabell 3. Erhållna reaktionsstyrkor från andra autoadsorption med allo- och autoantikropp närvarande. Resultatet erhöles med IAT-gelteknik där absorbatet testades mot heterozygota, homozygota och negativa testceller, samt mot en kontroll som var Fy^a positiv. Autoantikroppen förekom alltid i spädningen 1:2.

	Anti-E spädningfaktor																								
	1:64				1:32				1:16				1:8				1:4				1:2				
	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	
Andel E- erythrocyter (%)	100	0,5	0,5	0	0	1	1	0	0	2	1-2	0	0	2	2	0	0	2-3	2-3	0	0	3-4	3	0	0
	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0	0	1-2	1-2	0	0	2-3	2-3	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0	0	1	1	0	0
	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0	0	1	0,5	0	0
	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Homozygot testcell, NUS 266 (E⁺, e⁻ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^b Heterozygot testcell, NUS 227 (E⁺, e⁺ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^c Negativ testcell, NUS 234 (E⁻, e⁺ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^d Kontroll, NUS 203 (E⁻, e⁺ och Fy^{a+}, Fy^{b-})

Tabell 4. Erhållna reaktionsstyrkor från antikroppsscreening som agerade kontroll. Absorbatet hade spädningen 1:2 för både allo- och autoantikropp. Resultatet erhöles med IAT-gelteknik.

	Reaktionsstyrka för panel- och screenceller													
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g	8 ^h	9 ⁱ	S1 ^j	S2 ^k	S3 ^l	S4 ^m	e ⁿ
Andel E- erythrocyter (%)														
90	0	0	0	1-2	0	1-2	1-2	1-2	0	0	1-2	0	0	0
80	0	0	0	1	0	0,5	1	0,5	0	0	0,5	0	0	0

^a panelcell 1, NUS 231 (E-, e+ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^b panelcell 2, NUS 232 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b+})

^c panelcell 3, NUS 225 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b+})

^d panelcell 4, NUS 214 (E+, e- och Fy^{a+}, Fy^{b-})

^e panelcell 5, NUS 228 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-})

^f panelcell 6, NUS 230 (E+, e- och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^g panelcell 7, NUS 229 (E+, e+ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^h panelcell 8, NUS 227 (E+, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-})

ⁱ panelcell 9, NUS 234 (E-, e+ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^j screencell 1, NUS 297 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b+})

^k screencell 2, NUS 266 (E+, e- och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^l screencell 3, NUS 203 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-})

^m screencell 4, NUS 236 (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-})

ⁿ egna erythrocyter (E-, e+ och Fy^{a+}, Fy^{b-}), i detta fall är det försökspersonens

Tabell 5. Erhållna reaktionsstyrkor från autoadsorption med DAT-sensibiliserade celler där både allo- och autoantikropp närvarande. Resultatet erhöles med IAT-gelteknik där absorbatet testades mot heterozygota, homozygota och negativa testceller, samt mot en kontroll som var Fy^a positiv. Autoantikroppen förekom alltid i spädningen 1:2.

	Anti-E spädningfaktor							
	1:4				1:2			
	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d	Ho ^a	He ^b	Ne ^c	K ^d
Andel E- erythrocyter (%)								
95	1	1	0	0	1-2	1-2	0	0
90	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e	1	1	0	0

^a Homozygot testcell, NUS 266 (E+, e- och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^b Heterozygot testcell, NUS 227 (E+, e+ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^c Negativ testcell, NUS 234 (E-, e+ och Fy^{a-}, Fy^{b+})

^d Kontroll, NUS 203 (E-, e+ och och Fy^{a+}, Fy^{b-})

^e Uteblivet resultat då materialet tog slut.

Reaktionsstyrka (spädning)							
Andel E- erythrocyter (%)		0 (1:64)	0,5 (1:32)	1 (1:16)	2 (1:8)	3 (1:4)	4 (1:2)
	100						
	95						
	90						
	80						
	70						
	50						

Figur 1. Spädningsschema för de 36 blandningar som blev inför varje autoadsorption. Varje blandning preparerades en gång med en antikropp och sedan ännu en gång med två antikroppar. Totalt 72 separata rör.