

Kapitel 8 – Erytrocytantikroppsidentifiering – Svensk Förening för Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin

 kitm.se/sv/kap-8-3-0

Handbok för Blodcentraler

Kapitel 8

| Erytrocytantikroppsidentifiering

Version 3.0 | utgiven 2018-04-05

Huvudansvariga: Jill Storry och Agneta Wikman

Medförfattare: Catarina Andersson och Lene Gustafsson

Förslag till ändringar skickas till agneta.wikman@sll.se

| Versionshistorik:

- o Version 1.0 1984: Gudrun Liedén
 - o Version 1.1 1995: Gudrun Liedén
 - o Version 2.0 2005: Johanna Strindberg och Jan Säfwenberg
 - o Version 3.0 2017: Jill Storry och Agneta Wikman
- Medförfattare: Catarina Andersson och Lene Gustafsson

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. DEFINITIONER

2. PREANALYTISKA FAKTORER

2.1 Provtagning

2.2 Blodprovet

2.3 Reagens

2.4 Testerythrocyter

TABELL 1. Panelen ska innehålla minst följande antigenuppsättning

3. METODER

3.1 Antikroppsscreening

3.2 Antikroppsidentifiering_____

4. ERYTROCYTANTIKROPPSSCREENING

5. ERYTROCYTANTIKROPPSIDENTIFIERING

5.1 Syfte

5.2 Princip

5.3 Akut erythrocytantikroppsidentifiering

TABELL 2. Tekniker vid antikroppsidentifiering

6. KVANTIFIERING AV ERYTHROCYTANTIKROPP

6.1 Syfte

6.2 Semikvantitativ titerbestämning

6.3 Kvantitativ bestämning av anti-D₂

7. DIREKT ANTIGLOBULINTEST (DAT)

7.1 Syfte

7.2 Princip och utförande

8. KONTROLLRUTINER

8.1 Princip

8.2 Externa kontroller

8.3 Interna kontroller

TABELL 3. Interna kontroller

9. AVLÄSNING OCH DOKUMENTATION

FAKTARUTA 1. Kontroller och tolkning

10. MISSTÄNKT HEMOLYTISK TRANSFUSIONSREAKTION

10.1 Syfte

10.2 Blodgruppserologisk utredning

10.3 Utförande vid misstänkt fördröjd hemolytisk reaktion efter erythrocytransfusion

FAKTARUTA 2: Transfusionsreaktioner

11. SVARSRUTINER

REFERENSER

1. DEFINITIONER

Se kap. 17.

2. PREANALYTISKA FAKTORER

| 2.1 Provtagning

Se kap. 7 och 9.

| 2.2 Blodprovet

Provet ska förvaras vid 2-8 °C då analys inte pågår.

Provets ålder vid erythrocytantkroppsundersökning bör vara högst 5 dygn.

| 2.3 Reagens

Se kap. 7 och 11.

2.4. Testerytrocyter

2.4.1 Antigenegenskaper

Antigenbestämning av testerytrocyter ska utföras på två vid olika tillfällen tagna prov och om möjligt med olika testreagens. Genotypning bör utföras vid ena tillfället för att identifiera ovanliga blodtyper och för att utesluta "tysta gener" och andra vanliga polymorfismer som undertrycker antigen t.ex. Fy^x . Testerytrocyterna bör ej uttrycka HLA associerade antigen (Bg).

2.4.2 Antikroppsidentifiering

Erytrocyterna ska komma från minst åtta blodgivare av blodgrupp O och ska för var och en av de vanligaste kliniskt betydelsefulla erytrocytantikropparna innehålla minst två antigenpositiva och två antigennegativa testerytrocyter. Den totala sammansättningen av antigen hos testerytrocyterna ska möjliggöra identifiering av de vanligast förekommande erytrocytantikropparna. Erytrocyter från flera givare ska inte blandas. Se **TABELL 1**.

2.4.3 Egenberedning

Hantering såsom infrysning, tining och förvaring i tinat tillstånd av testerytrocyter ska valideras/verifieras.

TABELL 1. Panelen ska innehålla minst följande antigenuppsättning

System	ISBT nomenklatur	Antigenuppsättning	Minsta antal paneltesterytrocyter
Rh	<i>RHD*01/01</i> <i>RHCE*02/02</i>	R1R1 (CCDee)	1
	<i>RHD*01/01</i> <i>RHCE*02/02.08</i>	R1 ^w R1 (C ^w CDee)	1
	<i>RHD*01/01</i> <i>RHCE*03/03</i>	R2R2 (ccDEE)	1
	<i>RHCE*01/02</i>	r'r (Ccdee)	1
	<i>RHCE*01/03</i>	r''r (ccdEe)	1
	<i>RHCE*01/01</i>	rr (ccddee)	3
Kell	<i>KEL*01</i>	K	2
	<i>KEL*02/02</i>	kk	1
Duffy	<i>FY*01/01</i>	Fy(a+b-)	1
	<i>FY*02/02</i>	Fy(a-b+)	1
Kidd	<i>JK*01/01</i>	Jk(a+b-)	1
	<i>JK*02/02</i>	Jk(a-b+)	1

MNS	<i>MNS*03</i>	S	1*
	<i>MNS*04</i>	s	1*
	<i>MNS*01/01</i>	M+N-	1
	<i>MNS*02/02</i>	M-N+	1

*) Testerytrocyter som saknar det antitetiska antigenet bör väljas.

C^w, Kp^a och Lu^a bör vara representerade.

3. METODER

Manuella och automatiserade metoder, se kap. 7.

4. ERYTROCYTANTIKROPPSSCREENING

Se kap. 7 och 9.

5. ERYTROCYTANTIKROPPSIDENTIFIERING

5.1 Syfte

Identifiering av erytrocytantikroppar utförs för att kunna bedöma om antikroppen har klinisk betydelse vid transfusion, transplantation och/eller kan orsaka hemolytisk sjukdom hos foster och nyfödd (HDFN) samt för att undvika motsvarande antigen vid MG test inför erytrocyttransfusion.

Identifiering utförs vanligen vid

- positiv erytrocytantikroppsscreening
- positiv förenlighetsprövning
- avvikande reaktionsmönster vid blodgruppering
- misstanke om hemolytisk transfusionsreaktion
- misstanke om HDFN

5.2 Principer

Specificitet av antikroppar bestäms genom att reaktioner mot testerytrocyter i en panel ger ett mönster, som tolkas till antikroppsspecificiteter.

- För att med acceptabel sannolikhet kunna identifiera en erytrocytantikropp krävs reaktivitet med minst 2 antigenpositiva testerytrocyter och negativt resultat med minst 2 antigennegativa testerytrocyter för respektive erytrocytantikropp.
- För att en alloantikropp ska fastställas ska individen sakna motsvarande antigen (bestämning av blodgruppsantigen, fenotypning, genotypning, se kap. 7).
- Vid antikroppsidentifiering ska en panel av testerytrocyter alltid analyseras med IAT, minst motsvarande känsligheten för IAT/LISS; användande av anti-IgG och AHG är likvärdigt.
- Övriga tekniker som kan vara värdefulla vid antikroppsidentifiering alt. uteslutande av antikropp är tex IAT/PEG, IAT/enzym, neutralisering av antikropp, inkubering i 4-20 °C, se **TABELL 2**.
- En serologisk teknik är tillräcklig när endast en erytrocytantikroppsspecificitet

föreligger.

- Det är inte ett krav att utesluta antikroppar mot följande antigen C^w, Kp^a och Lu^a.

5.3 Akut erythrocytantikroppsidentifiering

Rutin som kan användas vid positiv antikroppsundersökning och behov av erytrocyttransfusion innan ordinarie antikroppsidentifiering beräknas vara klar. Syftet är att hitta vanligt förekommande och kliniskt viktiga singelantikroppar som anti-D, -E, -K, -c samt ev. -Fy^a, -Jk^a och vissa kombinationer som anti-D och anti-C eller anti-K och anti-E. Den preliminära identifieringen bör inte ta längre tid än ca 1 timme.

I rutinen bör ingå

- fenotypning av patienten på C, c, E, e, K och kontroll med reagens av IgM-typ
- utvalda testerytrocyter, inklusive relevanta kontroller och autologkontroll med IAT teknik (anti-IgG)
- protokoll med förenklat antigram
- dokumenterad systematik vid tolkning av resultatet

Vid blodutlämning väljs K negativa erytrocytenheter om patienten är K negativ, samt om möjligt väljs Rh-typ efter patientens fenotyp.

TABELL 2. Övriga tekniker vid antikroppsidentifiering

TEKNIK/PRINCIP	INDIKATION
37 °C Celler och plasma värms innan de blandas	Ska användas för att eliminera korsreaktiva autoantikroppar av köldtyp
Låg temperatur Inkubering 4-20 °C, IAT eller direktagglutination	Identifiera erythrocytantikroppar med lågt temperaturoptimum, då dessa ger ospecifika reaktioner med rutinteknik. Svaga erythrocytantikroppar av IgM typ
Rörteknik	Identifiera förekomst av myntrullar
IAT/enzym, enzymbehandlade testerytrocyter	Svaga Rh och Kidd antikroppar. Förekomst av Lewis antikroppar. Används även för att utreda förekomst av flera specificiteter av antikroppar, tex MNS och Duffy antigen förstörs av enzym
Neutralisering, patientplasma blandas med pool av plasma från blodgivare alt kommersiell substans	Vid misstanke på erythrocytantikroppar mot blodgruppssystemen Chido/Rodgers, Knops och Lewis (kliniskt ej betydelsefulla, antigenen finns lösligt i plasma)
IAT/PEG	Förstärker svaga IgG antikroppar
Eluering	Utredning av hemolytisktransfusionsreaktion Utredning av oklar DAT-positivitet
Auto/alloadsorption	Utredning av DAT positiv patient Anti-G utredning Utredning av multipla antikroppar
DTT behandling av erytrocyter	Patienter som behandlas med anti-CD38 (behandling vid myelom). Utredning vid misstanke om erythrocytantikroppar mot högfrekvent antigen. Förstör K-antigen
DTT behandling av plasma	Förstör antikroppar av IgM typ

6. KVANTIFIERING AV ERYTROCYTANTIKROPP

6.1 Syfte

Bestämma mängden erytrocytantikroppar mot ett visst antigen.

Utförs vanligen vid

- graviditetsimmunisering
- ABO oförenlig transplantation, stamceller/organ
- bestämning av koncentration anti-A och anti-B hos blodgivare

6.2 Semikvantitativ titerbestämning

6.2.1 Plasma späds i en geometrisk spädningsserie eller i en singelspädning och analys utförs för

- erytrocytantikroppar av IgG-typ med IAT/LISS-teknik med mikrokolonnteknik eller rörteknik
- erytrocytantikroppar av IgM-typ med mikrokolonnteknik utan tillsats av antikroppar (sk neutralkort/kassett) eller rörteknik
- antikroppstiter anges enligt dokumenterade kriterier

6.2.2 När erytrocytantikroppstiter följs under en graviditet ska om möjligt testerytrocyt från samma givare användas. Testerytrocyten bör vara heterozygot för antigenet. Förnyad erytrocytantikroppsidentifiering med panel ska utföras minst en gång i intervallet graviditetsvecka 25-28 samt i graviditetsvecka 35.

För nationella rekommendationer se ARG rapport Graviditetsimmunisering. Rutiner för handläggning avseende provtagningsintervall, analysförfarande och svarsrutiner ska förankras med behandlande kliniker på resp. sjukhus.

6.2.3 För titerbestämning vid ABO oförenliga organtransplantationer används i första hand donatorns erytrocyter. Om inte donatorns erytrocyter finns tillgängliga används en utvald test/blodgivarerytrocyt.

6.3 Kvantitativ bestämning av anti-D

Kan utföras med flödescytometrisk teknik eller med autoanalyser. Kvantifieringen utförs mot en standardkurva med känd koncentration och analysen besvaras i IU/mL eller mikrogram/mL.

7. DIREKT ANTIGLOBULINTEST (DAT)

7.1 Syfte

Utförs för att påvisa om erytrocytantikroppar och/eller komplement är bundet till individens blodkroppar in vivo.

Undersökningen utförs vanligen vid

- utredning av autoimmun hemolytisk anemi
- blodgruppering på spädbarn/misstanke om HDFN, se kap. 7

- ABO oförenlig transplantation, stamceller/organ
- efter transfusionsreaktion.

7.2 Princip och utförande

DAT kan utföras automatiserat eller manuellt, vanligen används mikrokolonnteknik med kort/kassett som innehåller AHG (anti-IgG och anti-C3d). Vid positivt utfall med AHG utförs DAT med monospecifika reagens anti-IgG och anti-C3d. Alternativt utförs analysen direkt med monospecifika reagens, anti-IgG och anti-C3d. För korrekt bedömning av positiv DAT ska autologkontroll utföras.

Kontrollbrunn (Ctl) finns i mikrokolonnkort. Ett utökad DAT kort, som innehåller anti-IgG, -IgA, -IgM, -C3c, -C3d samt Ctl, kan användas vid specifika frågeställningar.

8. KONTROLLRUTINER

8.1 Princip

Dokumenterade rutiner ska finnas för krav på användning av positiv resp. negativ kontroll och vilka åtgärder som ska vidtas vid avvikande kontrollresultat.

8.2 Externa kontroller

Laboratorierna ska delta i externt kvalitetskontrollprogram motsvarande den egna verksamheten.

8.3 Interna kontroller

Interna kontroller, allmänt se kap. 7.

Ankomstkontroll, stabilitetskontroll, positiv och negativ kontroll se **TABELL 3**.

8.3.1 Metodkontroll ger en helhetsbild av att alla de i metodens ingående moment fungerar. Frekvensen på metodkontroller ska kunna motiveras.

Vid antikroppsidentifiering ska test med autologa erythrocyter ingå i standardmetoden. Vid IAT/PEG och enzymteknik ska positiv kontroll ingå vid varje laboration, antikroppen som används ska vara utprovad så att respektive teknik krävs för att tydligt visa förstärkt reaktivitet.

Vid manuell titerbestämning av erythrocytantikropp av IgG-typ ska prov med känd titer analyseras parallellt, tex anti-D, och denna ska inte avvika mer än ett titersteg från förväntat värde.

8.3.2 Vid automatiserad erythrocytantikroppsidentifiering ska metodkontroll utföras minst en gång i veckan. Vid titrering med automatiserad teknik krävs ej att prov med känd titer analyseras parallellt, efter adekvat validering/verifiering.

TABELL 3. Interna kontroller

Typ av kontroll	Frekvens manuell metod	Frekvens Automatiserad metod	Kommentar
-----------------	---------------------------	---------------------------------	-----------

Ankomstkontroll av reagens, ny batch och ny leverans	Vid ankomst	Vid ankomst	Positiv kontroll: Testerytrocyt som har antigenet och det antitetiska antigenet Negativ kontroll: Testerytrocyt som saknar antigenet
Beredningskontroll av egna testerytrocyter	Vid beredning	Vid beredning	Förväxlingskontroll, suspensionsstyrka (EVF)
Stabilitetskontroll av egna testerytrocyter	Minst en gång per vecka	Minst en gång per vecka	Positiv kontroll: "Svag" antikropp som ger ++ reaktioner. Anti-Fy ^a rekommenderas
<i>Positiv kontroll vid antikroppsidentifiering :</i>		Se ovan stabilitetstest	
– med IAT-LISS	Enligt lokala rutiner	Minst enligt tillverkarens rekommendationer	
– med IAT/PEG	Varje laboration	Ej tillämpligt	Positiv kontroll som kräver PEG för att visa förstärkt reaktivitet.
– med enzymteknik	Varje laboration	Ej tillämpligt	Positiv kontroll som kräver enzym för att visa förstärkt reaktivitet
<i>Positiv och negativ kontroll vid fenotypsbestämning :</i>			Positiv kontroll: Testerytrocyt som har antigenet och det antitetiska antigenet, Negativ kontroll: Testerytrocyt som saknar antigenet
– vid rörteknik	Varje laboration		
– när reagens tillsätts i t.ex. mikrokolonn	Enligt leverantörens anvisning, alt lokal rutin	Minst enligt tillverkarens rekommendationer	
– reagens tillsatta av tillverkaren	Enligt leverantörens anvisning	Minst enligt tillverkarens rekommendationer	
Kontroll vid titerbestämning	Prov med känd titer analyseras parallellt vid varje laboration eller enligt lokal dokumenterad rutin	Minst enligt tillverkarens rekommendationer	

Kontroll vid DAT mikrokolonn	Vid positiv reaktion: Som negativ kontroll analyseras autologa erythrocyter mot aktuellt diluent (kontroll brunn)	Vid positiv reaktion: Som negativ kontroll analyseras autologa erythrocyter mot aktuellt diluent (kontroll brunn)	
Kontroll vid IAT och DAT med rörteknik	Varje laboration	Ej tillämpligt	Till rör med negativ reaktion sätts sensibiliserade kontrollerythrocyter

9. AVLÄSNING OCH DOKUMENTATION

Se kap. 7.

Det ska finnas dokumenterade kriterier för gradering och tolkning av reaktioner. Leverantörernas anvisningar bör följas. Om gradering och tolkning av reaktioner avviker från leverantörens anvisningar ska detta valideras/verifieras.

FAKTARUTA 1. Krav på kontroller och tolkning

- Frekvens och kriterier för internkontroller ska dokumenteras.
- Deltagande i externt kontrollprogram för antikroppsidentifiering krävs.
- För varje identifierad alloantikropp krävs positiva reaktioner med 2 antigenpositiva och negativa reaktioner med 2 antigennegativa testerythrocyter, samt att patientens erythrocyter ska sakna motsvarande antigen.

10. UTREDNING AV MISSTÄNKT HEMOLYTISK TRANSFUSIONSREAKTION

10.1 Vid akut reaktion efter erythrocytttransfusion

Blodgruppsserologisk utredning ska alltid utföras vid reaktion efter erythrocytttransfusion. Utredning av transfusionsreaktion efter plasma- och trombocyttransfusion behöver inte rutinmässigt innefatta blodgruppsserologisk utredning.

10.2 Utförande

- Anvisning ska finnas för provtagning och hantering av blodenhet vid transfusionsreaktion.
- Blodprov och transfunderad erythrocytenhet/tom enhet ska skickas med remiss innehållande relevant information om patientens symptom.
- Svartsrutin ska finnas i akutskedet (preliminär eller akutsvar).
- Specialistläkare inom Transfusionsmedicin ska kontaktas vid allvarliga reaktioner och vid positiva utredningsfynd.
- Kontrollera i Bloddatasystemet att rätt blodgrupp har transfunderats till patienten.
- Dokumentera i Bloddatasystemet att enheten orsakat transfusionsreaktion.
- Inspektera blodenheten efter avvikande utseende tex hemolys.
- Inspektera prov efter transfusion om det finns tecken på massiv hemolys.
- Utför som kontroll blodgruppering avseende ABO, RhD och antikroppsscreening samt DAT på prov före och efter transfusion.
- Utför kontrollgruppering på prov från transfunderad erythrocytenhet.
- Utför MG-test med IAT/LISS med erythrocyter från transfunderad erythrocytenhet och på prov före och efter transfusion.

Syfte

Utreda hemolys och eller anemisymptom dygn- veckor efter erythrocyttransfusion.

Princip och utförande

- Utför DAT och ev. eluering.
- Erythrocytantikroppsscreening/identifiering.
- Vid erythrocytantikroppsfynd kontrollera i Bloddatasystemet om patienten transfunderats med erythrocyter med motsvarande antigen.
- Informera beställaren att patienten transfunderats med x antal enheter inkompatibelt blod och att hemolys kan eller har inträffat.

FAKTARUTA 2. Transfusionsreaktioner

- Blodgruppsserologisk utredning ska utföras så snart som möjligt efter reaktion på erythrocyttransfusion.
- Det ska finnas en beskriven rutin med protokoll (manuellt eller automatiserat) som minst innefattar kontrollgruppering, DAT och screening på prov före och efter reaktion, samt MG-test på prov före och efter reaktion.
- Preliminär/akutsvar ska ges till beställaren när den akuta utredningen är slutförd.

11. SVARSROUTINER

Princip

- Svarsrutiner ska beskrivas.
- Svar till beställare ska ges av läkare eller BMA som har utbildning och kompetens för det.
- Svarstexter ska vara konsekventa och tydliga.
- En rutin med preliminär/akutsvar och slutsvar kan tillämpas.
- Svarstider (tid inom vilket ett svar ges till beställaren) ska finnas angivet.
- Om telefonsvar ges ska det dokumenteras.

REFERENSER

Guidelines for pretransfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories, BCSH, 2013.

Klinisk betydelse av olika erythrocytantikroppar vid transfusion, Bilaga, kap. 9.

Graviditetsimmunisering, ARG-rapport, nr 74, 2015.

ISBT: Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party.

Klein HG and Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 12th edition, 2014.

Issitt, PD and Anstee DJ. Applied Blood Group Serology, 4th edition, 1998.

Daniels G and Bromilow I. Blodgruppsserologi, Studentlitteratur, 2008.

Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, EDQM, senaste upplagan.

Technical Manual, AABB, senaste upplagan.

Reid ME, Lomas Francis C, Olsson ML. The Blood Group Antigen FactsBook. 3:e upplagan 2012.

SWEDAC DOC 01:31 Interna och externa kontroller.

SHOT report, senaste upplagan.

Svensk Förening för Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin | Sektion inom Svenska Läkaresällskapet | Specialitetsförening inom Sveriges läkarförbund