



Examensarbete, 15 hp
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Vårterminen 2018

Titerbestämning av anti-A och anti-B i trombocytenheter för transfusion över ABO gränsen

Utvärdering av rutinanalys och utveckling av
en screeningmetod

Hanna Frohm

Naturvetenskapliga Fakulteten

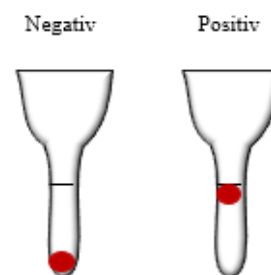
Populärvetenskaplig sammanfattning

ABO är det viktigaste blodgruppssystemet att ta hänsyn till vid transfusioner av blodkomponenter. Trombocyter är blandade i plasma som innehåller antikroppar (av typen IgG och IgM) mot den blodgrupp som individen inte har.

Trombocyter ges framförallt i syfte att förebygga eller stoppa blödningar. Trombocyter kan utvinnas genom aferes (trombocytgivning) eller genom att fyra enheter, separerade från blodpåsar, poolas ihop. På blodcentraler är lagret av trombocyter begränsat och därför sker det ofta transfusioner mellan olika blodgrupper. Detta kan öka risken att drabbas av en så kallad akut hemolytisk transfusionsreaktion som kan leda till njursvikt och i värsta fall döden. För att minimera riskerna bestäms därför titer (koncentrationen) av anti-A och anti-B i plasman.

På universitetssjukhuset i Lund bestäms titer endast vid aferesgivning vid första tappningstillfället och då på ett koncentrerat plasmaprov och inte från den färdiga enheten. I enheten som transfunderas är antikropparna utspädda i förhållande till det plasmaprov där titer bestäms. Då detta inte tas i beaktande riskerar många enheter att felaktigt bedömas som en hög titer och dessa ges enbart till patienter med samma blodgrupp. Syftet med den här studien var att kontrollera titer mellan olika blodgrupper och utvärdera rutinanalysen samt att utveckla en screeningmetod för att kunna kontrollera alla enheterna på lager.

För att bestämma titer av anti-A och anti-B användes gelkortsteknik som är en metod för att undersöka om det finns antikroppar. Titern bestämdes genom att späda trombocytenheterna i olika koncentrationer. Därefter överfördes trombocyterna tillsammans med röda blodkroppar (antigen från blodgrupp A eller B) till gelkorten. Vid centrifugering av gelkorten fungerar gelen som en sil. Om det finns antikroppar kommer dessa att binda till de röda blodkropparna som kommer att klumpa ihop sig och fastna i gelen. Om det inte finns antikroppar kommer de röda blodkropparna att hamna i botten av gelen (Figur 1).



Figur 1 visar en negativ och positiv reaktion i gelkortet

Resultatet visade att det fanns skillnader i titer mellan enheter från olika blodgrupper, där en hög titer framförallt fanns i enheter från blodgrupp O. Det var en stor skillnad mellan att analysera titer från koncentrerad plasma och från den utspädda enheten. 73 % av enheterna beräknades ha märkts, felaktigt, med en hög titer. Med en screeningmetod för enbart O-enheter med en gräns på 1:100 beräknades 86 % av alla enheterna ha en hög titer och med en gräns på 1:250 minskade andelen till 31 %.

Många studier har undersökt vilka titrar som är kritiska men resultaten tycks variera. En studie menar att titerbestämning av IgG antikroppar i sig, inte förutsäger risken att drabbas av en hemolytisk reaktion. Reaktionen har även visat sig ske trots låg titer av anti-A och anti-B. Andra studier menar att det finns andra faktorer som också kan påverka risken. Tillvägagångssättet bestäms lokalt på blodcentralerna och skiljer sig nationellt och internationellt vilket påvisar svårigheterna inom det här området.

Slutsatsen är att avskaffande av rutinanalysen och införandet av en screeningmetod på 1:250 leder till en minskad risk för hemolytiska reaktioner och ger en korrekt titer av anti-A och anti-B vilket innebär att fler enheter kan transfunderas mellan blodgrupper.

Författare/Author

Hanna Frohm

Handledare/Supervisor

Jill R. Storry, huvudhandledare, Skånes Universitetssjukhus Lund
Daniel Carlberg, skrivhandledare, Högskolan Kristianstad

Examinator/Examiner

Bodil Hernroth, Professor, Högskolan Kristianstad

Titel: Titerbestämning av anti-A och anti-B i trombocytenheter för transfusion över ABO gränsen: Utvärdering av rutinanalys och utveckling av en screeningmetod

Sammanfattning

Trombocyter är suspenderade i plasma som innehåller antikroppar mot de blodgruppsantigen som saknas på erythrocyterna. För att minimera risken för en hemolytisk reaktion bestäms titer av anti-A och anti-B. Gelkortsteknik används för att detektera antikropp-antigenreaktioner och baseras på agglutinationer i en gel. Syftet med studien var att undersöka titer av anti-A och anti-B i trombocytenheter, samt att utvärdera en rutinanalys och utveckla en screeningmetod. I studien analyserades enheter av blodgrupp O och A. De kontrollerades mot anti-A och/eller anti-B både för IgG och IgM antikroppar. En screeningmetod utvecklades för att kunna screena O-enheterna och en gräns på 1:100 respektive 1:250 undersöktes. Resultatet kunde påvisa en stor skillnad i titer mellan O- och A-enheter. Titer skiljer sig signifikant beroende på om titer bestäms i plasma eller från den färdiga (utspädda) enheten. En screeningmetod på 1:100 påvisade att 86 % av enheterna hade bedömts som hög titer och en screeningmetod på 1:250 visade att andelen sjönk till 31 %. Geltekniken är en känslig metod och är beroende av kompetent personal vid avläsning. En del studier visar liknande resultat men andelen enheter med hög titer varierar och likaså metoder och titergräns. Detta påvisar svårigheterna i att bestämma en kritisk titer och att förutse risker hos patienten. Andra faktorer tros också kunna påverka riskerna. Införande av en screeningmetod på 1:250 kan öka antalet enheter som kan transfunderas över ABO-barriären.

Ämnesord: Trombocyter, titer, anti-A, anti-B, hemolys, gelteknik

Title: Anti-A and anti-B titers in platelets for transfusion across ABO: Evaluation of a routine analyze and implementation of a screening method

Abstract

Platelets are suspended in plasma containing antibodies to the blood group antigen missing on the erythrocytes. To minimize the risk of hemolytic reaction, the titers of anti-A and anti-B are determined. The gel test is used to detect antibody-and antigen responses and is based on agglutinations in gel. The purpose was to investigate the titers of anti-A and/or anti-B in platelets. A routine analysis was evaluated and a screening method was implemented. In the study, units of blood group O and A were analyzed. They were checked against anti-A and anti-B for both IgG and IgM antibodies. A screening method was developed to screen the O-units and a limit of 1:100 and 1:250 was used. The results showed great difference in titers between O and A units. The titers differ significantly depending on whether the titers are determined in plasma or from the finished (diluted) unit. A screening method at 1:100 showed that 86 % of the units was rated as high titer while a screening method of 1:250 showed that this was reduced to 31 %. Gel technology is a sensitive method and is dependent on competent staff when reading the agglutinations. Some studies show similar results, but the proportion of high titer units, methods and critical titers varies. It proves the difficulty in determining a critical titer and predicting risks for the patient. Other factors are also believed to influence the risks. Implementation of a 1:250 screening method is believed to increase the number of units that can be transfused over the ABO barrier.

Keywords: Platelets, titer, anti-A, anti-B, hemolysis, gel test

Innehåll

1. Inledning	5
1.1. ABO systemet	5
1.2. Trombocyter – indikationer och framställning	5
1.3. Trombocyter och ABO	5
1.4. Gelkortsteknik.....	8
1.5. Syfte och frågeställningar	10
2. Material och metod	10
2.1. Provmaterial.....	11
2.2. Titerbestämning av anti-A och anti-B	11
2.3. Bedömning.....	12
2.4. Utvärdering av rutinanalys	13
2.5. Utveckling av screeningmetod	13
2.6. Statistisk bearbetning	14
2.7. Säkerhet- och miljöaspekt.....	14
2.8. Etisk reflektion.....	14
3. Resultat	14
3.1. Titerbestämning av O- och A-afereser/pooler	14
3.2. Utvärdering av rutinanalys	18
3.3. Screeningmetoden.....	20
4. Diskussion.....	21
4.1. Metoddiskussion	21
4.2. Resultatdiskussion	22
5. Slutsats	29
Tackord.....	29
Referenser.....	30
Bilagor	34

1. Inledning

1.1. ABO systemet

ABO är det viktigaste blodgruppssystemet att ta hänsyn till vid transplantationer och transfusioner. ABO återfinns förutom i blodet även i många vävnader och organ. ABO systemet består av två antigen, A och B. O innebär att antigen saknas och är därmed recessivt mot A och B. Blodgruppsantigenen särskiljs genom fyra fenotyper: A, B, AB och O, där A- antigenet kan delas upp i A₁ och A₂ där A₁ är vanligast förekommande och uttrycks starkare än A₂. Landsteiners regel säger att den som saknar A eller B antigen på erythrocyterna har motsvarande antikroppar i plasman. Vid transfusioner och transplantationer är det viktigt att ta hänsyn till ABO systemet då det annars kan leda till allvarliga hemolytiska reaktioner (Daniels & Bromilow 2014).

1.2. Trombocyter – indikationer och framställning

Trombocyter är framförallt involverade i kroppens process att stoppa blödningar. Syftet med en transfusion av trombocyter är att stoppa eller förebygga en blödning hos patienter med trombocytopeni eller med dysfunktionella trombocyter (Blumberg, Heal & Philips 2010). Trombocyter transfunderas ofta inför och under operationer och används ofta under pågående cancerbehandlingar (Cid, Harm & Yazer 2013). Trombocyter kan utvinnas genom aferes vilket innebär att blodet får vandra genom en cellseparator där trombocyterna utvinns medan resterande blodkomponenter återförs till givaren. Trombocyter kan också utvinnas genom separation från blodpåsar där 4-6 ”interimtrombocyter” sedan poolas ihop. Alla enheter leukocytreduceras och en bakteriell tillväxtkontroll utförs. För att minimera risken att drabbas av graft-versus-host disease kan enheterna bestrålas. Strålningen klyver DNA/RNA och inaktiverar därför kärninnehållande T-lymfocyter. Då trombocyter inte har en cellkärna förstörs inte dessa vid bestrålningen (Cid 2017).

1.3. Trombocyter och ABO

Trombocyter uttrycker ABO antigen på sin yta och de uttrycks olika starkt från individ till individ (Cooling 2007). Trombocyterna är suspenderade i plasma som innehåller naturligt förekommande antikroppar mot de antigen som saknas på individens erythrocyter (Cid, Harm & Yazer 2013).

Vid transfusion av trombocyter bör därför i första hand enheter med kompatibel blodgrupp transfunderas för att undvika hemolytiska reaktioner. Utbudet på många blodcentraler är dock begränsat och det är inte ovanligt att det sker inkompatibla trombocyttransfusioner (Harris, Josephson, Kost & Hillyer 2007). Trombocyter har även en kort hållbarhet på mellan 5-7 dagar vilket innebär att många enheter kasseras om de inte används (Fontaine et al. 2015). Användning av inkompatibla enheter leder dock till en ökad risk för en akut hemolytisk transfusionsreaktion hos recipienten (Harris et al. 2007).

En akut hemolytisk transfusionsreaktion kan ge symptom som frossa, dyspné, och ryggsmärter. Andra kliniska symptom är hematuri, anemi och sänkt hemoglobinvärde. Det kan också leda till intravaskulär koagulation, njursvikt och i värsta fall till döden (Josephson, Castillejo, Grima & Hillyer 2010).

Inkompatibla enheter accepteras i de flesta fall genom resonemanget att antikropparna späds ut i recipientens blod vilket inte orsakar några kliniska problem. En hemolytisk reaktion uppstår oftast vid transfusion av ABO inkompatibla enheter som innehåller en hög titer av anti-A och anti-B. Risken ökar också vid enheter med en stor andel plasma eller om de transfunderas till små barn/spädbarn där antikropparna inte späds ut i samma omfattning som hos en vuxen (Garratty 1998).

O-afere enheter orsakar de flesta fallen av akuta hemolytiska reaktioner då de innehåller en större mängd plasma och högre mängder av anti-A och anti-B (Cooling 2007; Fung, Downes & Shulman 2007). Poolade enheter har visat sig ha en minimal risk att orsaka en hemolytisk reaktion på grund av spädningseffekten som sker när enheter poolas. Till alla enheter tillsätts dessutom en PAS (Platelet Additiv Solution) lösning som späder ut antikropparna ännu mer. Trombocyter som separeras från blodpåsar innehåller även en mindre mängd plasma än afere enheterna (Cooling, Downs, Butch & Davenport 2008).

För att minimera riskerna för en hemolytisk reaktion är det vanligt att bestämma titern av antikroppar (anti-A och anti-B) av både IgG och IgM klass. Om titern bedöms hög används enheten enbart för transfusioner inom samma blodgrupp. Det finns två typer av inkompatibla transfusioner; major och minor. En så kallad major-inkompatibel transfusion innebär att donatorns trombocyter har antigen som är inkompatibla med recipientens antikroppar i plasman. Ett exempel är när en enhet med blodgrupp A ges till en patient med blodgrupp O (Josephson et al. 2010). Det innebär att det finns en risk att

antikropparna i recipientens plasma förstör de transfunderade trombocyterna och transfusionen får ingen effekt (Daniels & Bromilow 2014). En minor-inkompatibel transfusion innebär istället att donatorns plasma innehåller antikroppar som är inkompatibla med recipientens ABO antigen på erythrocyterna. Ett exempel är vid transfusion från blodgrupp O till A eller till B. Antikropparna som finns i donatorns plasma kan förstöra recipientens egna erythrocyter vilket kan leda till en akut hemolytisk reaktion (Josephson et al. 2010). Ibland kan recipienten vara refraktär för en trombocyttransfusion, vilket innebär att det sker en allosensibilisering av IgG antikroppar mot HLA-A, B antigen vilken kan bero på en tidigare graviditet eller transfusion (Blumberg, Heal & Philips 2010). I sådana fall kan HLA matchade enheter ges (Cooling 2007).

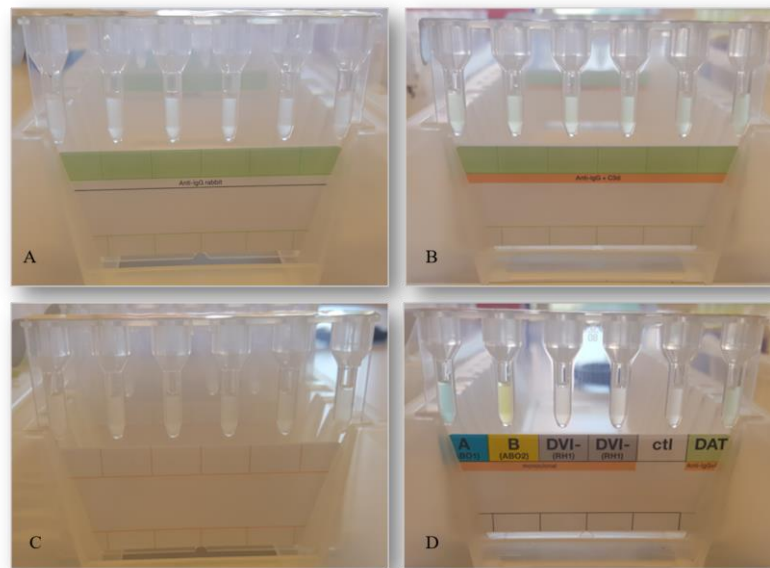
Det har sedan länge pågått en diskussion om vilken titer som är kritisk. Policyer gällande titer och hantering av trombocyter skiljer sig åt nationellt och internationellt (Pietersz, Engelfreit & Reesink 2005). Även analysmetoderna skiljer sig åt och olika analysmetoder har visats olika resultat. Det finns i Sverige ingen bestämd policy om hur titern av trombocyter ska bestämmas, både avseende titervärde och analysmetod utan det bestäms lokalt på blodcentralerna. Detta påvisar svårigheterna i att bestämma en kritisk titer och därmed avgöra vilka enheter som inte bör transfunderas över ABO gränsen. Det finns studier som menar att det finns andra faktorer som kan påverka risken att drabbas av en hemolytisk reaktion som till exempel transfusionsvolymen, recipientens blodgrupp samt beroende på om det är en pediatrik eller neonatalpatient (Garratty 1998). Det har också visat sig att hemolytiska reaktioner har skett trots transfusion av enheter med en låg titer (Karafin et al. 2012).

Trots att många enheter transfunderas över ABO gränsen är det ovanligt med allvarliga transfusionsreaktioner, men de förekommer (Cooling 2008). Enligt Blodövervakning i Sverige rapporterades år 2016, 11 fall av transfusionsreaktioner av totalt 44 383 transfusioner. Kliniska symptom var bland annat feber, allergiska reaktioner och transfusionsrelaterad akut lungskada, dock fanns ingen rapportering av en akut hemolytisk reaktion. Det är troligt att en del milda hemolytiska reaktioner undgår att identifieras vilket leder till en underrapportering av antalet fall (Murphy et al. 1990; Cooling 2007).

Vid Skånes Universitetssjukhus bestäms titern av anti-A och anti-B enbart hos aferesgivare vid första tappningstillfället och titern bestäms på ett koncentrerat plasmaproov. Trombocytenheter tappade efteråt märks med antingen låg eller hög titer baserat på det resultatet. På poolade enheter kontrolleras titern inte alls på grund av den höga spädningseffekten. Då titern bestäms utifrån plasmaprover och inte från själva trombocytenheten innebär det att det finns en spädningseffekt som inte tas i beaktande och enheterna kan felaktigt märkas med en för hög titer. En utvärdering av rutinanalysen samt att införa en screeningmetod för alla trombocytenheter skulle därför kunna öka antalet enheter som kan transfunderas över ABO gränsen samt minimera riskerna för akuta transfusionsreaktioner. Svårigheterna med att införa en screeningmetod är att det inte finns en erkänd referensmetod. Det finns inte heller en bestämd kritisk titer för att särskilja enheter med låg och hög titer, utan att påverka möjligheten till transfusion över ABO gränsen (Cooling 2007).

1.4. Gelkortsteknik

Geltestet används för att detektera antigen- och antikroppsreaktioner. Principen baseras på detektion av agglutinationer i en gel. Ett gelkort består av sex stycken så kallade mikrotuber som är inkluderade i ett plastkort. Mikrotuberna består av en reaktionskammare och en kolonn innehållande en gel gjord av dextran. Till reaktionskammaren tillsätts erythrocyter och plasma/serum som sedan inkuberas för att tillåta antikroppar att binda till antigenen. Vid centrifugering av gelkortet sker en cellseparation där gelen fungerar som en sil och de erythrocyter som inte har agglutinerat kommer att vandra genom gelen och lägga sig som en pellet i botten av kolonnen medan agglutinerade erythrocyter kommer att fastna i gelen. Plasman och oinbundna antikroppar kommer att stanna i reaktionskammaren. Därefter graderas agglutinationen beroende på styrkan och mönstret. Det finns tre olika gelkort: neutrala, specifika och antiglobulinkort (Figur 2). De neutrala korten innehåller enbart en gel med en osmotisk balanserad buffert utan specifika reagenser och används bland annat till antikroppsscreening. I de specifika korten innehåller gelen specifika reagenser som till exempel anti-A, anti-B eller anti-D och används vid bestämning av antigen. Det finns också kort som innehåller anti-humanglobulin (AHG) som har till uppgift att förstärka reaktionen av IgG antikroppar (Lapierre et al. 1989; Malyska & Weiland 1994; Duguid & Bromilow 1993).



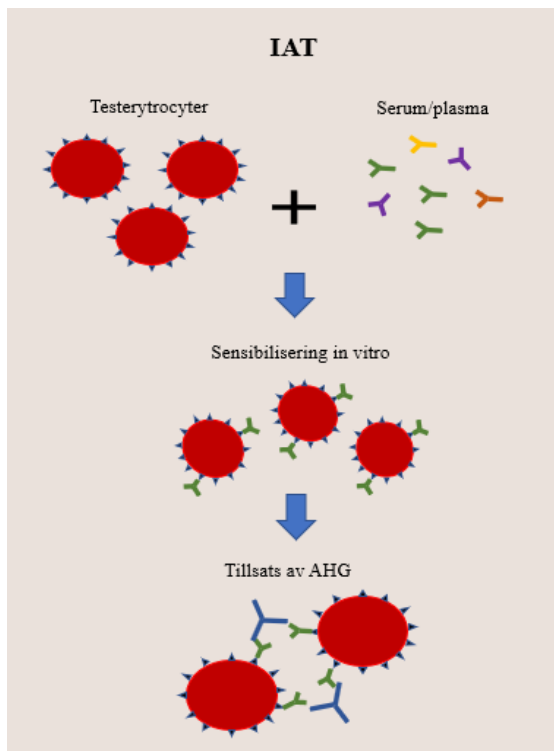
Figur 2 visar (A) ett specifikt anti-IgG kort (B) ett DAT (direkt agglutinationstest) kort (C) ett neutralt kort och (D) ett specifikt kort med olika reagens (Frohm 2018).

Blodgruppsantikroppar är oftast av klasserna IgM och IgG. IgM antikroppar har fler inbindningsplatser för antigen och är större i storlek än IgG antikroppar. Det innebär att de kan binda till flera platser på erythrocyterna och till flera erythrocyter på samma gång. På så vis kan de orsaka en direkt agglutination i en saltlösning, oftast vid låga temperaturer. IgG antikroppar som bundit till en erythrocyt kan däremot inte orsaka en direkt agglutination utan behöver tillsats av till exempel AHG som bildar en brygga mellan antikropparna och på så vis orsakar en agglutination. Detta kallas för en indirekt agglutination och sker optimalt vid 37°C (Daniels & Bromilow 2014).

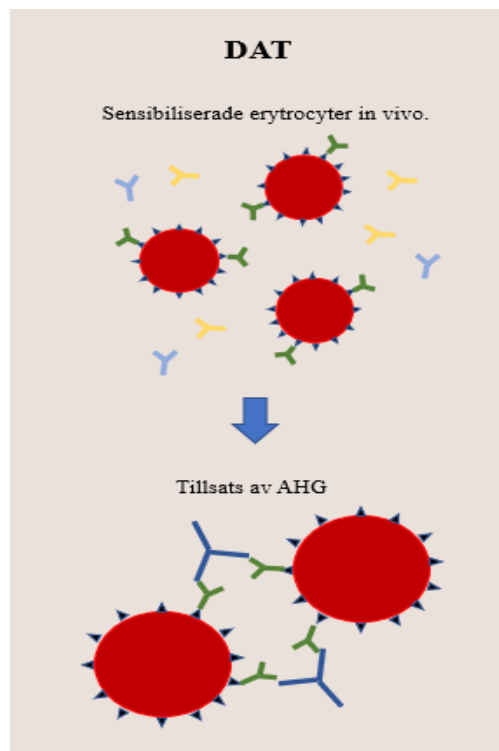
Det finns två varianter av agglutinationstestet; ett indirekt agglutinationstest (IAT) och ett direkt agglutinationstest (DAT). IAT (Figur 3a) används för detektion av antikroppar i serum/plasma. I den här analysen används tvättade testerythrocyter och om det finns antikroppar i serumet/plasman kommer de att komplexbinda till antigen på testerythrocyterna. AHG tillsätts och kommer att korsbinda till de inbundna antikropparna och bidra till att blodet agglutinerar.

DAT (Figur 3b) används för att undersöka om erythrocyterna blivit sensibiliserade *in vivo*, det vill säga att antikroppar redan finns inbundna till erythrocyterna. Enbart erythrocyter tillsätts till mikrotuben med tillsats av AHG och ofta C3d som är en komplementfaktor. Om en agglutination sker innebär det att erythrocyterna är sensibiliserade vilket kan bero

på en autoimmun- eller hemolytisk sjukdom eller efter en inkompatibel transfusion (Daniels & Bromilow 2014).



Figur 3a visar principen för ett indirekt agglutinationstest (Frohm 2018).



Figur 3b visar principen för ett direkt agglutinationstest (Frohm 2018).

1.5. Syfte och frågeställningar

Syftet med studien var att undersöka titern av anti-A och anti-B i trombocytenheter samt att utvärdera en rutinanalys för att undersöka om fler enheter kan transfunderas över ABO gränsen.

Kan vi utveckla en metod för att snabbt kunna bestämma titern på alla trombocytenheter?

2. Material och metod

Titerbestämning av trombocytenheter gjordes genom en seriespädning av trombocyter och titern bestämdes genom användning av gelkortsteknik och testerythrocyter för identifiering av anti-A och anti-B av både IgG och IgM klass.

2.1. Provmaterial

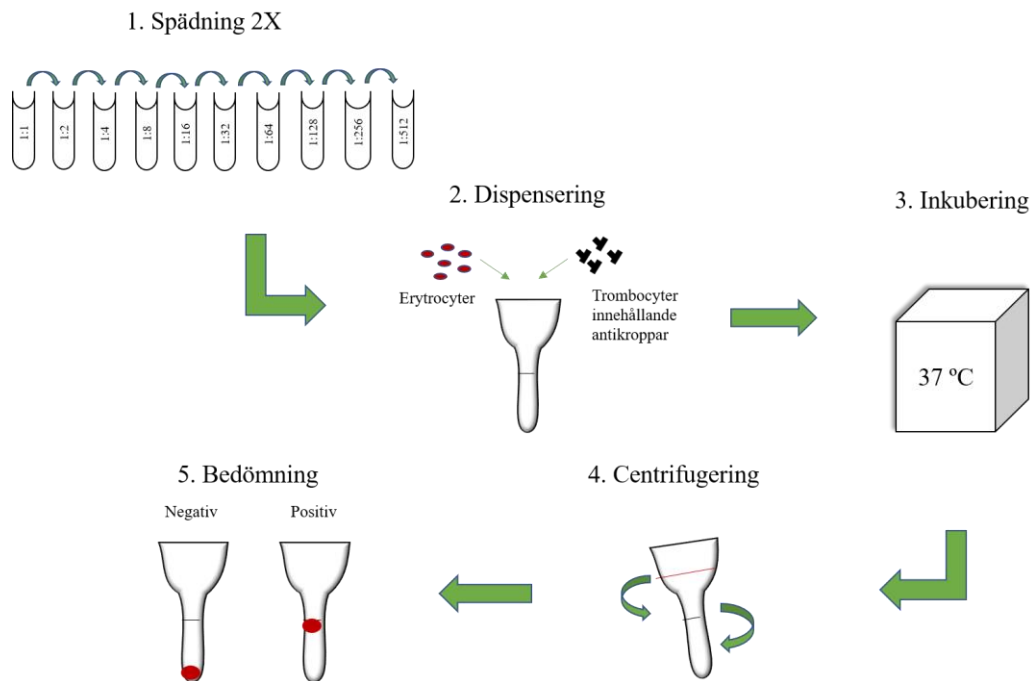
Prov togs från trombocytenheter med blodgrupp O och A som fanns att tillgå på blodcentralen på Skånes Universitetssjukhus i Lund. Både afereser-och poolade enheter användes. Aferesenheter var i de flesta fall bestrålade och innehöll mellan 150–170 mL PAS och cirka 90 mL (ca 37 %) plasma. De poolade enheterna bestod av 4 ”interimtrombocyter” från samma blodgrupp och som separerats från blodpåsar. De poolade enheterna innehöll ca 40 % plasma som var suspenderade i 200 mL PAS lösning. Alla enheter var leukocytreducerade. Trombocypåsarna blandades innan slangbitar avlägsnades för att få representativa prov. Slangbitarna avlägsnades genom försegling med en värme-svets som gav ett sterilt prov och utan att kontaminera trombocytenheten. Provmaterialet märktes med en identifieringskod enligt sekretessbestämmelser.

2.2. Titerbestämning av anti-A och anti-B

Provmaterialet överfördes till ett glaströr märkt med identifieringskoden. Nio stycken 12 mL centrifugrör märktes med spädning: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512. 200 µl ID diluent pH 7 (Labex, Sverige) tillsattes till vardera centrifugrör. Därefter gjordes en 2X seriespädning med en slutvolym på 200 µl.

Varje O-trombocytenhet (n= 36) kontrollerades mot testerytrocyter (beredda från blodgivare) med antigen A₁ och B och A-trombocytenheter (n=20) mot enbart antigen-B. Gelkorten som användes var Coombs IgG gelkort (BioRad, USA) för titrering av IgG antikroppar och Coombs NaCl gelkort (BioRad, USA) för titrering av IgM antikroppar. Gelkorten märktes med identifieringskod och brunnarna märktes med respektive spädningsfaktor (1–512). 50 µl av testerytrocyterna överfördes till respektive brunn och 25 µl av trombocypädningarna tillsattes till brunnarna. IgG-korten inkuberades (Memmert, Tyskland) i 15 minuter i 37°C. NaCl-korten inkuberades 15 minuter i rumstemperatur. Därefter centrifugerades (Allsheng Instruments, Kina) gelkorten på 85 RCF i 10 minuter (Figur 4). Innan användning av testerytrocyterna genomfördes ett DAT test för att kontrollera att testerytrocyterna inte var sensibiliserade vilket annars skulle kunna ge falska resultat. Detta gjordes genom att tillsätta 50 µl av testerytrocyterna till

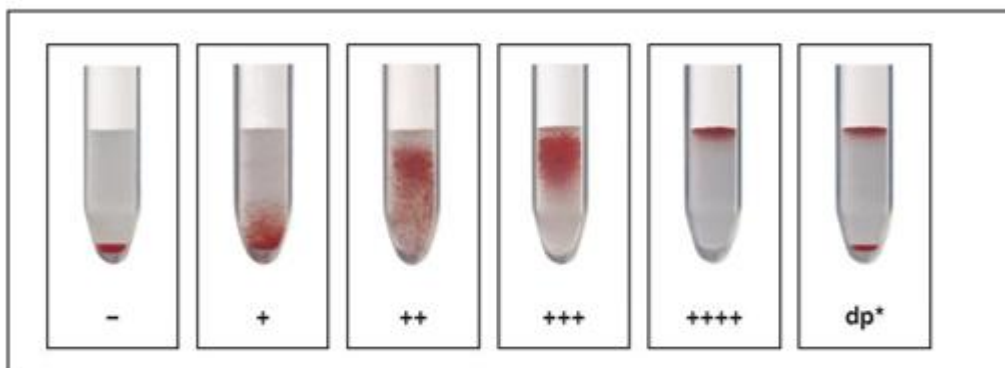
respektive brunn på ett Coombs LISS-gelkort (BioRad, USA) som sedan centrifugerades 85 RCF i 10 minuter.



Figur 4 visar principen för titrering av anti-A och anti-B (Frohm 2018).

2.3. Bedömning

Avläsning gjordes mot en ljus bakgrund. Agglutinationerna graderades enligt Figur 5. Resultatet noterades på protokollet och den första spädningen som gav första 1+ reaktionen noterades som titern. Beroende på titern bedömdes enheten som hög vid >64 för IgM och >256 för IgG enligt lokala bestämmelser.



Figur 5 hur agglutinationerna graderas beroende på mönster (Labex u.å.).

2.4. Utvärdering av rutinanalys

Utvärderingen av rutinanalysen gjordes genom att jämföra titern från trombocytenheten och jämföra mot den titern som bestämts på plasmaprov tidigare.

2.5. Utveckling av screeningmetod

En screeningmetod utvecklades för att kunna bestämma titern på alla O-trombocytenheter som finns på lagret.

För att urskilja enheter med en låg respektive hög titer späddes trombocytenheterna 1:100 (n=29) med ID diluent (Labex, Sverige). 50 µl av testerytrocyterna (anti-A₁ och anti-B) och 25 µl av provspädningen överfördes till respektive brunn på anti-IgG- och NaCl-gelkorten (BioRad, USA). Gelkorten inkuberades, centrifugerades och bedömdes som tidigare. Ett DAT test (BioRad, USA) på testerytrocyterna gjordes innan användning. De enheter som agglutinerade i spädning 1:100 späddes vidare till 1:250 samt 1:500. En positiv kontroll bereddes och för att välja en lämplig kontroll gjordes en spädning av en antikropp (2-512) som sedan titrerades mot A₁- och B testerytrocyter på både anti-IgG- och NaCl-gelkort. Kravet var att antikroppen skulle vara positiv i spädning 64 och 128. Alikvoter tillverkades genom att späda antikroppen 1:100 med en 1 % BSA-lösning. Denna bereddes genom att blanda 1 mL 30 % BSA-lösning (Sanquin Plesmanlaan, Holland) med 29 mL ID diluent (Labex, Sverige) till en 1 % BSA-lösning. 20 mL av den 1 % BSA-lösningen blandades med 200 µl av Anti-A,B (Ortho Diagnostic Systems, USA). 1 mL av antikroppsblandningen överfördes till respektive alikvottrör som märktes och frystes in för förvaring.

Ytterligare en screeningmetod undersöktes genom att späda trombocyterna till 1:250 (n=16). I den här metoden analyserades enbart IgG antikroppar. Ett DAT-test (BioRad, USA) genomfördes först på testerytrocyterna och därefter späddes trombocyterna 1:250 med ID diluent (Labex, Sverige). 50 µl av testerytrocyterna (anti-A₁ och anti-B) och 25 µl av proverna överfördes till respektive brunn på anti-IgG-gelkorten (BioRad, USA). Gelkorten inkuberades, centrifugerades och bedömdes som tidigare. Enheter som blev positiva späddes vidare till 1:500. En positiv kontroll framställdes genom att späda antikroppen 1:250 med en 1 % BSA-lösning. Detta gjordes genom att blanda 0,33 mL av en 30 % BSA-lösning (Sanquin Plesmanlaan, Holland) med 9,7 mL ID diluent (Labex, Sverige) till en 1 % BSA-lösning. 5 mL av 1% BSA-lösning blandades sedan med 20 µl

av Anti-A, B (Ortho Diagnostic Systems, USA). 1 mL pipetterades sedan över till fem alikvotrör som märktes och frystes in för förvaring.

2.6. Statistisk bearbetning

Resultaten redovisas i stapeldiagram för att jämföra de olika enheterna, anti-A/anti-B samt IgG/IgM antikroppar (Excel 2016, Microsoft, USA). Typvärde anges som de värde som är mest förekommande. Resultatet vid jämförelse mellan plasmaprov och trombocyt enheten har redovisats med ett två-sidigt teckentest (Excel 2016, Microsoft, USA) där $P < 0,05$ betraktats som en signifikant skillnad.

2.7. Säkerhet- och miljöaspekt

Allt material och alla instrument hanterades med hänsyn till säkerhet och kvalitet. Lokala hygienrutiner följdes och biologiskt material kasserades som riskavfall.

2.8. Etisk reflektion

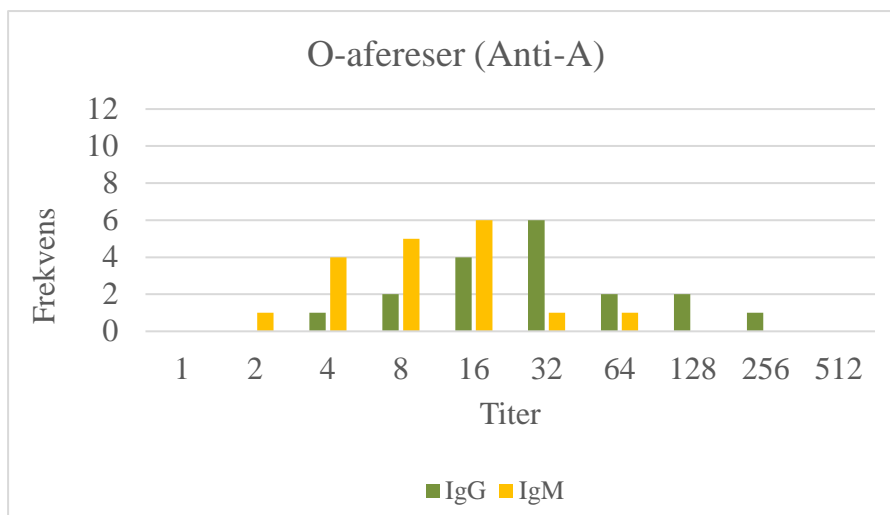
Det krävdes inga etiska tillstånd i den här studien då donatorerna vid tappningen givit sitt skriftliga samtycke till att blodet/trombocyterna får användas inom sjukvården och för kvalitetssäkring av transfusion. Alla enheter får en unik identifieringskod vilket garanterar givarens anonymitet.

3. Resultat

3.1. Titerbestämning av O- och A-afereser/pooler

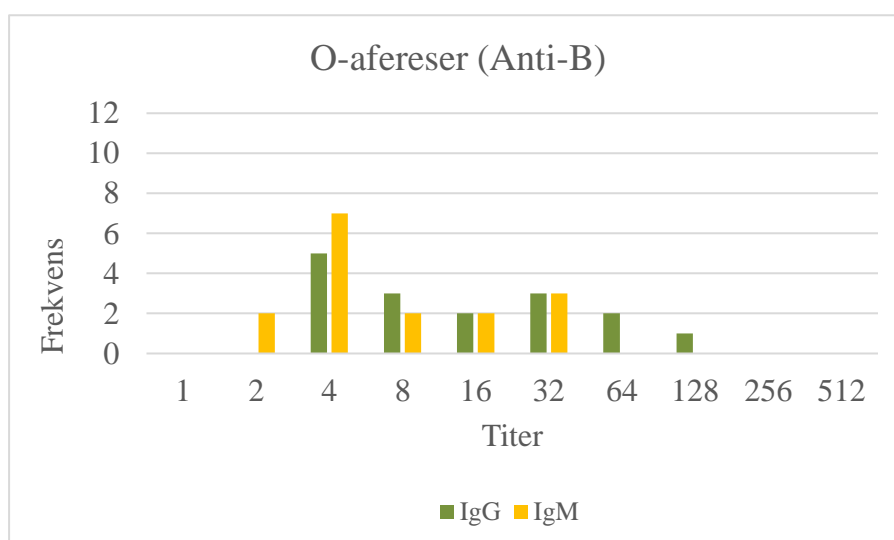
Resultaten från titerbestämningen påvisade skillnader mellan O-trombocyter och A-trombocyter men också skillnad mellan anti-A/anti-B samt IgG och IgM antikroppar.

Figur 6a visar titern av IgM och IgG antikroppar för anti-A i O-afereser (n=19) (Bilaga 1). IgM antikropparna förekommer främst i lägre titrar (<64). Typvärdet för IgM är 16 med ett minvärde på 2 och ett maxvärde på 64. IgG antikroppar förekommer i både lägre och högre titrar. Typvärdet för IgG är 32 med ett minvärde på 4 och ett maxvärde på 256. Resultatet visar att 10 % av enheterna hade en hög titer (IgM och IgG).



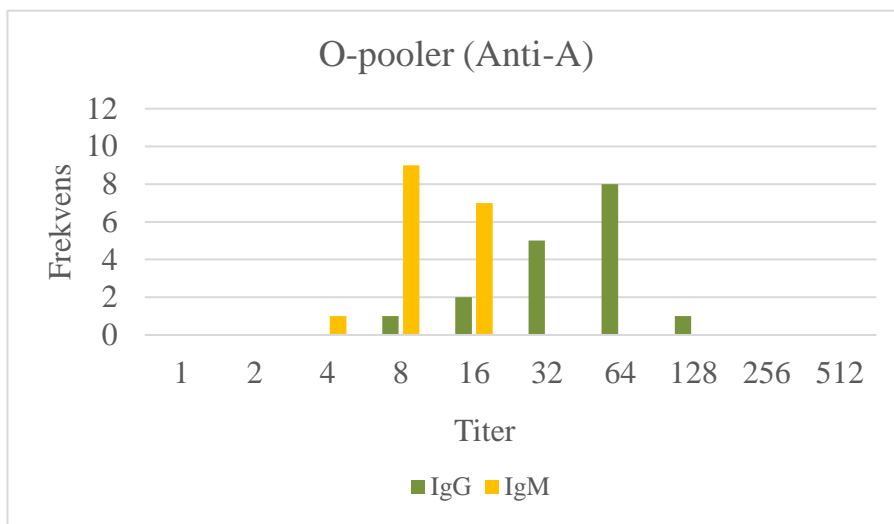
Figur 6a visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i O-afeser (anti-A).

Figur 6b visar titern av IgM och IgG av anti-B i O-afeser (n=19) (Bilaga 1). IgM förekommer främst i lägre titrar och har ett typvärde på 4 med ett minvärde på 2 och ett maxvärde på 32. IgG förekommer i både lägre och högre titrar och har ett typvärde på 4 med ett minvärde på 4 och ett maxvärde på 128.



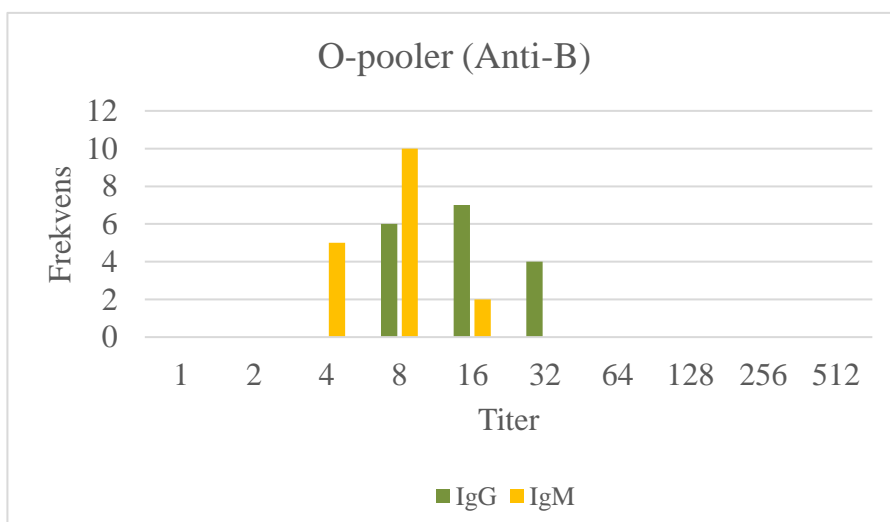
Figur 6b visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i O-afeser (anti-B).

Figur 6c visar titern av IgM och IgG för anti-A i O-pooler (n=16) (Bilaga 2). IgM förekommer främst i lägre titrar med ett minvärde på 4 och maxvärde på 16 och ett typvärde på 8. IgG förekommer främst i högre titrar med ett minvärde på 8 och ett maxvärde på 128 och ett typvärde på 64.



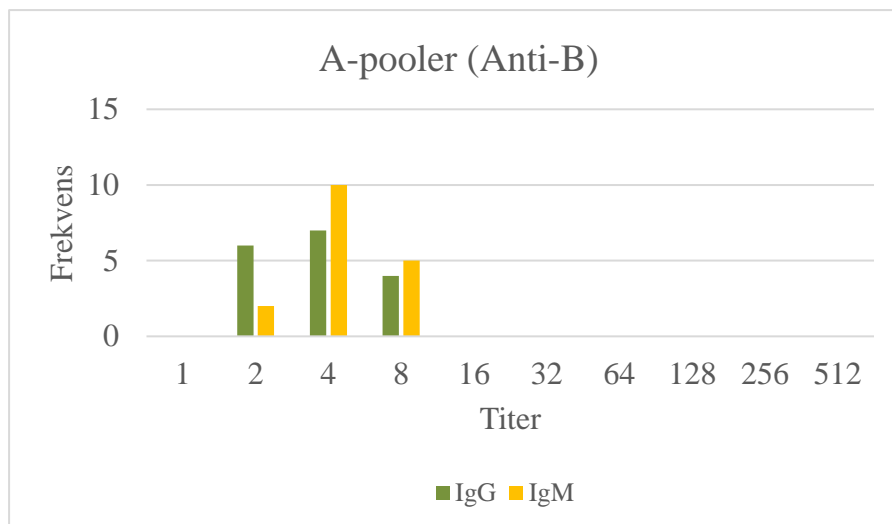
Figur 6c visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i O-pooler (anti-A).

Figur 5d visar titern av IgM och IgG för anti-B i O-pooler (n=16) (Bilaga 2). IgM förekommer främst i lägre titrar med ett typvärde på 8 och ett minvärde på 4 och ett maxvärde på 16. IgG förekommer främst i lägre titrar med ett minvärde på 8 och ett maxvärde på 32 och ett typvärde på 16.



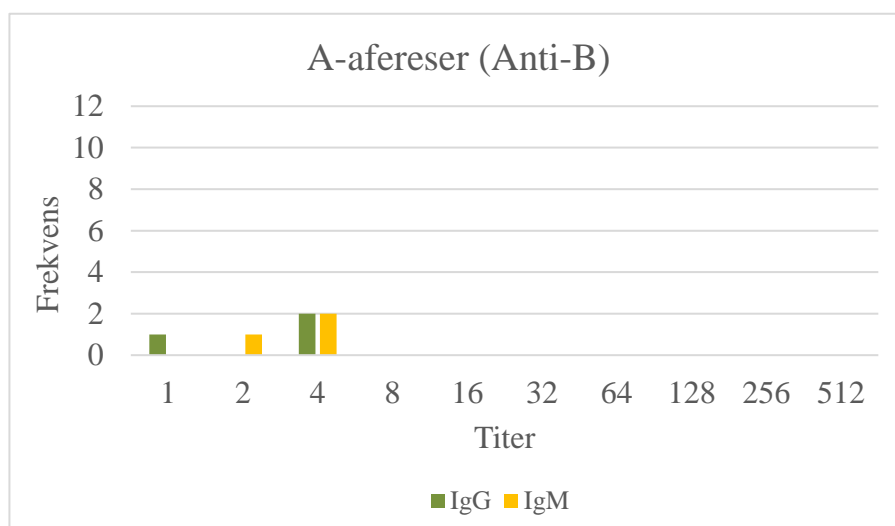
Figur 6d visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i O-pooler (anti-B).

Figur 6e visar titern av IgM och IgG för anti-B i A-pooler (n=17) (Bilaga 3). Både IgM och IgG antikroppar förekommer främst i lägre titrar. De har båda ett minvärde på 2 och ett maxvärde på 8 med ett typvärde på 4.



Figur 6e visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i A-pooler (anti-B).

Figur 6f visar titern av IgM och IgG för anti-B i A-afeser (n=3) (Bilaga 4). Både IgM och IgG antikroppar förekommer i lägre titrar. IgM har ett minvärde på 2 och ett maxvärde på 4 med ett typvärde på 4. IgG har ett minvärde på 1 och ett maxvärde på 4 med ett typvärde på 4.

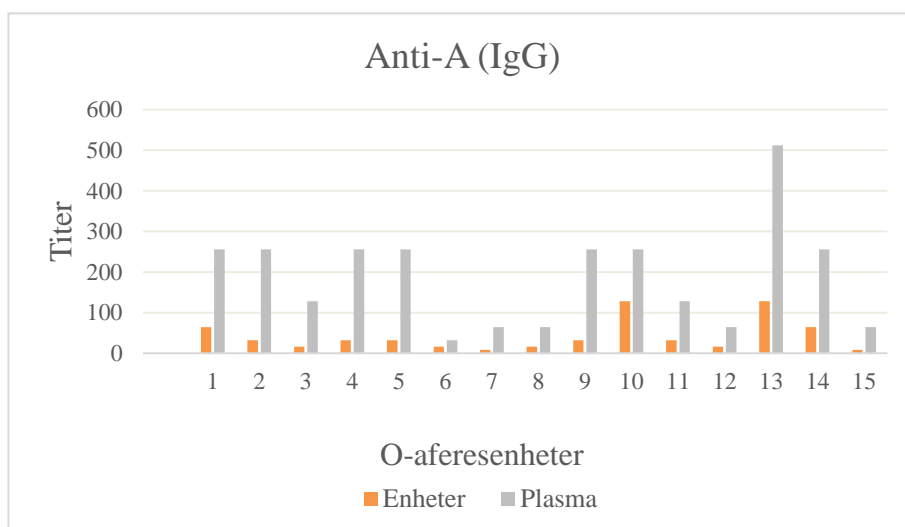


Figur 6f visar frekvensen av förekommande titrar av IgG och IgM antikroppar i A-afeser (anti-B).

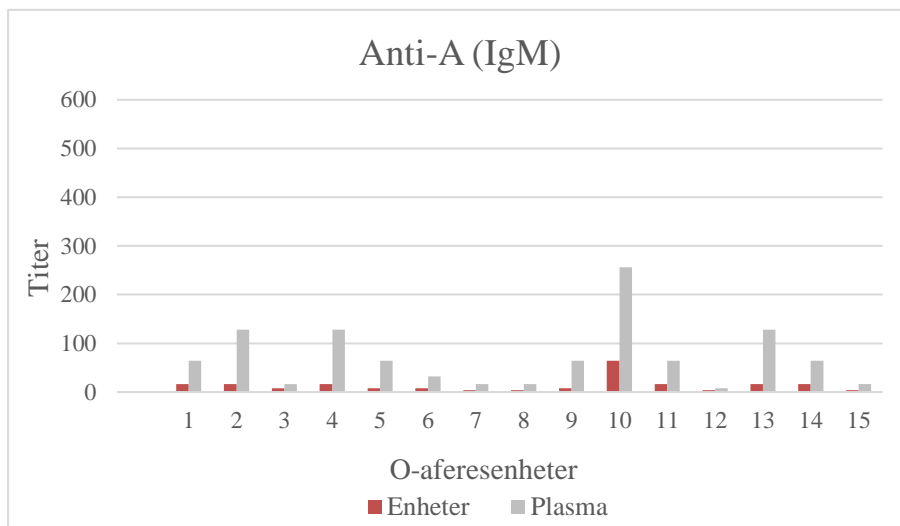
3.2. Utvärdering av rutinanalys

Skillnader i titer mellan rutinanalys på plasmaprov och analys från den färdiga enheten kunde konstateras (n=15) (Bilaga 5a och 5b). Skillnader i titer för samtliga jämförelser av anti-A och anti-B samt IgM och IgG visade att $P < 0,05$ (Bilaga 5c). Totalt 73 % av enheterna som tidigare bedömts som hög titer hade inte en hög titer i den färdiga enheten.

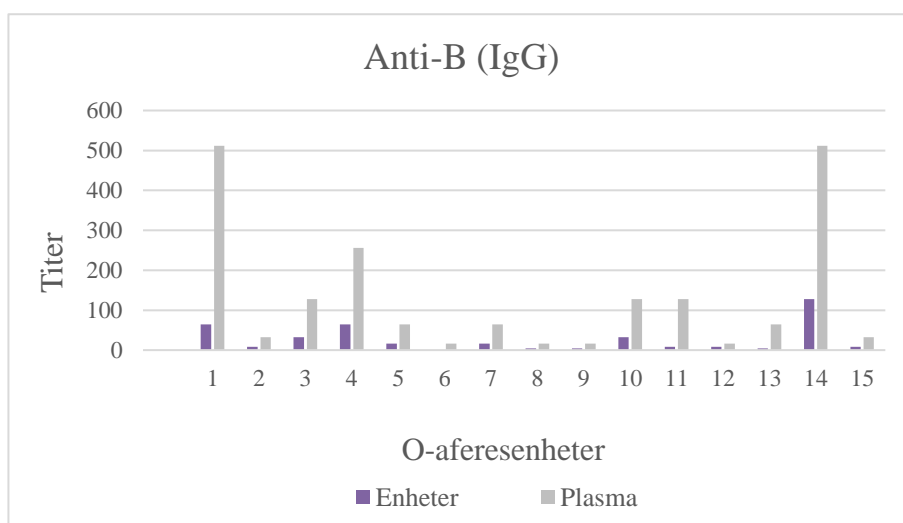
Skillnaderna mellan analyserna är presenterade i stapeldiagram nedan. Figur 7a visar skillnaderna i anti-A (IgG) mellan de två tillfällena och Figur 7b visar skillnaderna i anti-A (IgM). Figur 7c visar skillnaderna i titer i anti-B (IgG) och Figur 7d visar skillnaderna i anti-B (IgM).



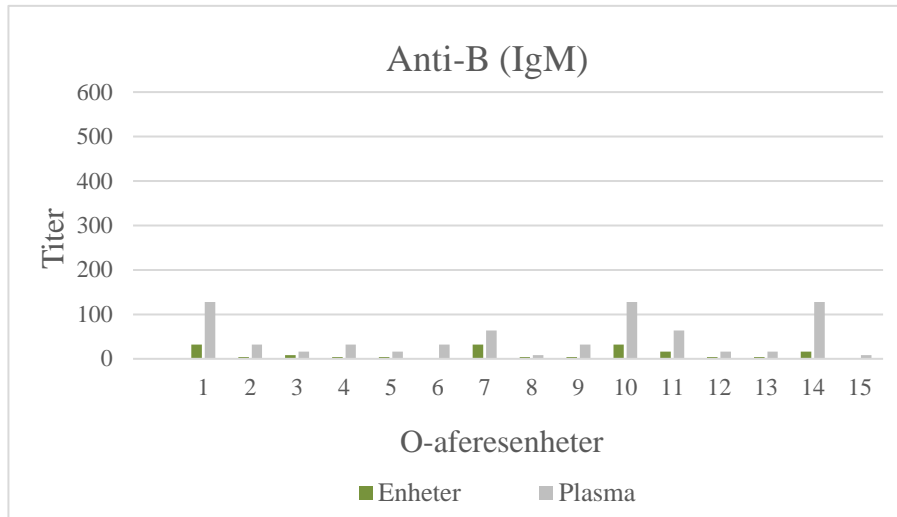
Figur 7a visar skillnaden i titer mellan den första tappningen och den senaste för anti-A (IgG).



Figur 7b visar skillnaden i titer mellan den första tappningen och den senaste för anti-A (IgM).



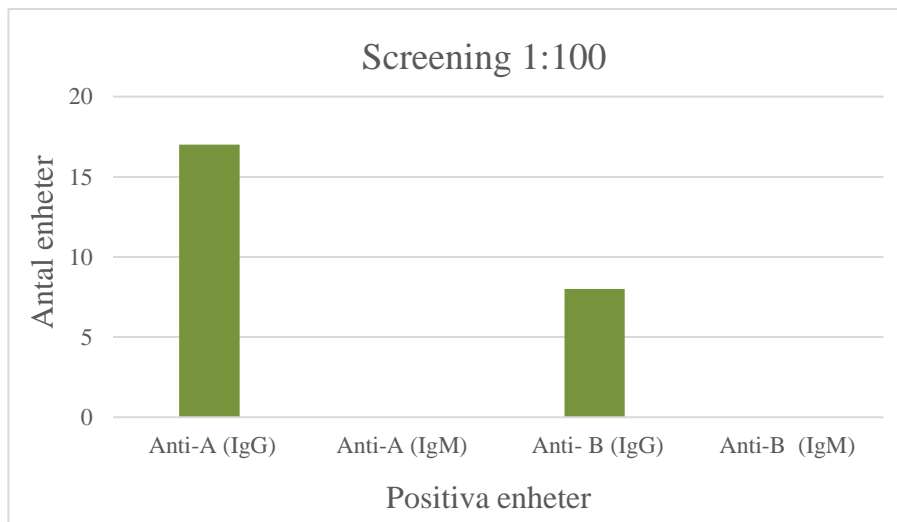
Figur 7c visar skillnaden i titer mellan den första tappningen och den senaste för anti-B (IgG).



Figur 7d visar skillnaden i titer mellan den första tappningen och den senaste för anti-B (IgM).

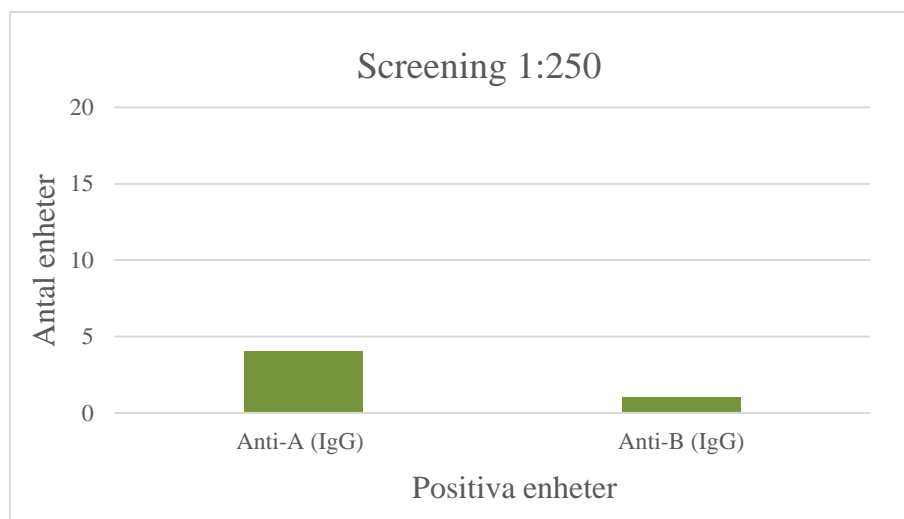
3.3. Screeningmetoden

Screeningmetoden med spädning 1:100 (n= 29) påvisade skillnader mellan IgG och IgM antikroppar då inga trombocytenheter var positiva för IgM (Figur 8a). Gällande IgG antikropparna var 17 enheter positiva för anti-A (59 %) och 8 stycken för anti-B (28 %). Det innebär att 20 stycken enheter av totalt 29 enheter (86 %) skulle märkas som hög titer.



Figur 8a visar antalet enheter som agglutinerade i spädning 1:100 och mot vilket antigen samt antikropp.

Screeningmetoden med spädning 1:250 (n=16) visade att 4 enheter var positiva för anti-A, IgG (25 %) och 1 enhet (6 %) var positiv för anti-B, IgG. (Figur 8b). Därmed skulle 5 enheter av totalt 16 (31 %) märkas som hög titer.



Figur 8b visar antalet enheter där IgG antikroppar agglutinerar i spädning 1:250 samt mot vilket antigen.

4. Diskussion

4.1. Metoddiskussion

Det finns som tidigare nämnts ingen erkänd referensmetod utan metoden bestäms lokalt på blodcentralerna. Det kan finnas skillnader i titer beroende på vilken metod som används. Josephson, Mullis och Hillyer (2004) kunde påvisa en 60 % skillnad i titer mellan gel-och rörteknik där geltekniken gav högre titer. En annan studie påvisade att gelteknik gav 1–2 gånger högre titer än med rörteknik (Cooling et al. 2008).

Gelkortstekniken är en känslig och pålitlig metod för att påvisa förekomsten av antikroppar. Det finns många fördelar med metoden, bland annat ger gelen en stabil reaktion som kan sparas i 24 timmar för avläsning (Malyska & Weiland 1994). Det krävs små provmängder och brunnarna kan täckas över vilket minskar risken för exponering av blodsmitta (Langston, Procter, Cipolone & Stroncek 1999). En stor fördel med geltekniken jämfört med andra metoder är att tvättsteget, som annars behövs för att skölja bort oinbundna antikroppar, inte behövs i gelteknik vilket sparar tid. Ytterligare en fördel är att geltestet lätt kan modifieras beroende på önskad analys. Det är en enkel metod som också går att automatisera (Malomgré & Neumesiter 2008). Cate och Reilly (1999)

beskriver det som en känslig, reproducerbar metod som inte offrar kvalitet eller ökar kostnader.

En felkälla i gelkortsteknik är att variationer i bedömning av agglutinationen kan förekomma (Langston et al. 1999). På Universitetssjukhuset i Lund bedöms titern vid första +1 reaktionen medan de på andra laboratorium anger den sista 1+ reaktioner som titern. Nackdelen med att bedöma titern vid första 1+ reaktionen är att efterföljande 1+ reaktioner inte tas med vilket blir fel då provet fortfarande agglutinerar i den titern. Därav avläses ibland den första 1+ reaktion som en 2+ reaktion för att den sista 1+ reaktionen inte ska förbises. Därav borde rutinen ändras till att titern avläses vid sista 1+ reaktionen.

I gelen kan det ibland bildas ett fibrinlager som lägger sig som en hinna ovanpå gelen vilket kan leda till att resultatet avläses som en positiv agglutination och därmed ger ett falskt resultat. Cellsuspensioner som är starkare än 0,8% kan också påverka geltestet och ge falska resultat (Cate & Reilly 1999). Geltestet är känsligt för andra kemiska och fysiska faktorer som till exempel pH, temperatur, jonstyrka, tid och koncentrationsskillnader mellan antigen och antikropp. Reaktionerna påverkas också av neutrala krafter som den repellerande kraften mellan erythrocyter (Malyska & Weiland 1994). Även centrifugeringen är kritisk då en för hög/lång eller för låg/kort centrifugering kan leda till falska positiva och negativa resultat. Det krävs också selektion och specificitet vid val av reagenser för att inga ospecifika reaktioner ska ske. Det är viktigt att erythrocyterna kontrolleras innan användning så att de inte ger ett positivt DAT test (Lapierre et al. 1989). En studie menar att det finns vissa tveksamheter gällande geltestet då de uppmärksammat svaga reaktioner med heterozygota celler (Duguid & Bromilow 1993). Variationer i pipetteringar kan också påverka resultatet (Beattie 1980) vilket också kunde påvisas under studiens gång. Styrkan i agglutinationerna kunde variera från en svag reaktion till en starkare trots en större spädning, vilket tros bero på variationer i pipetteringar.

4.2. Resultatdiskussion

Resultaten visade att IgG antikroppar förekom oftare i högre titrar jämfört med IgM, både gällande anti-A och anti-B. Typvärdet för både IgM och IgG var dock betydligt lägre vid analys av anti-B, vilket tyder på att anti-A oftare förekommer i högre titer än anti-B. Detta bekräftas även av Josephson, Mullis och Hillyer (2004) och Karafin et al. (2012).

Till skillnad från O-enheter har A-enheter en betydligt lägre titer av anti-B och överstiger inte 8 i titer både gällande IgM och IgG antikroppar. Cooling et al. (2007) påvisade att inga A-enheter i deras studie överskred gränsen på 64.

Med en gräns på 64 för IgM och 256 för IgG kunde det konstateras att 5 % av O-aferesenhetererna hade en hög titer för IgM och 5 % för IgG. Detta är en lägre siffra jämfört med Josephson, Mullis och Hillyer (2004), som med gelkortsteknik, analyserade 100 stycken O-aferesenheter där enheterna bedömdes ha en hög titer vid ≥ 64 för IgM och ≥ 256 för IgG. Utifrån dessa kriterier bedömdes 28 % av enheterna ha en hög titer för IgM och 39 % ha en hög titer för IgG.

För att kunna kontrollera alla enheter på blodcentralens lager samt för att kunna få en titer som representerar den färdiga enheten, inkluderade studien att utveckla en screeningmetod. Efter resultatet från titerbestämningen valdes att enbart utveckla en screeningmetod för O-enheter, då A-enhetererna hade en låg titer. Då få O-enheter hade en titer på över 1:100 beslutades att använda den titern som en gräns för att skilja mellan låg och hög titer. En positiv kontroll framställdes för att kvalitetssäkra metoden, dels för att kontrollera materialet som används, men också för att kontrollera utförandet från personalen.

Totalt screenades 29 enheter och det visade sig att många enheter var positiva i spädning 1:100. 86 % av enheterna hade med den här screeningmetoden märkts med hög titer. Några av de enheter som blev positiva späddes vidare till 1:250 där 35 % av enheterna fortfarande agglutinerade. Efter att ha resonerat kring resultatet av screeningmetoden valdes att höja gränsen. Detta gjordes på grund av begränsningar med att ha en metod som sorterar bort 86 % av enheterna, då det innebär att andelen enheter som kan transfunderas över ABO minskar, vilket också kan begränsa möjligheten för transfusion till patienter.

I den nya screeningmetoden valdes därför en gräns på 1:250 och då inga enheter var positiva för IgM antikroppar valdes att inte inkludera dessa. Screeningmetoden inkluderade 16 enheter där resultatet visade att med en gräns på 1:250 kunde antalet enheter med hög titer minskas till 31 %, vilket är jämförbart med studien av Josephson, Mullis och Hillyer (2004) där 39 % av IgG beräknades ha en hög titer vid en gräns på 1:256. Fontaine et al. (2015) gjorde en studie för att införa en automatiserad screening för alla donatorer. De kunde påvisa att i en spädning på 1:128 bedömdes 30 % av enheterna

ha en hög titer (52 % av O-enheterna, 13 % av A-enheterna och 14 % av B-enheterna). Vid en screening på 1:256 hade istället 17 % av enheterna en hög titer (31 % av O-enheterna, 5 % av A-enheterna och 11 % av B-enheterna). Detta är en lägre andel än vad som har påvisats i den här studien.

En studie med Quillen, Sheldon, Daniel-Johnson, Lee-Stroka och Flegel (2011) screenade totalt 1277 enheter med en initial spädning på 1:150. Resultatet visade att 50 % av enheterna hade hög titer av anti-A/anti-B. Därefter höjde de titergränsen till 1:200 och då minskade andelen enheter med hög titer till 36 %. Med ytterligare en spädning på 1:250 minskade procenthalten till 25 %. Dock visade den här studien att 14 % av A-afeserna hade en titer på 1:150 för anti-B och vid spädning 1:250 var den 5 %. Detta resultatet motsätter resultaten i den här studien där ingen A-enhet gick över 1:8. Det bör noteras att i studien av Quillen et al. (2011) analyserades titern på plasma som centrifugerats från helblod och inte från den färdiga trombocytenheten. Detta kan förklara varför resultatet skiljer sig åt. Det är intressant att de hade en lägre andel O-afeser, jämfört med den här studien, med en hög titer vid en spädning på 1:250 trots att de analyserat direkt från plasma.

Karafin et al. (2012) undersökte istället aferesenheter (IgG) med en bestämd gräns på 1:512. Resultaten visade att varken A- eller B-afeser hade en titer på 1:128 och 9,7 % av O-afeserna hade en titer på 1:512. Om titergränsen hade sänkts till 1:256 hade 26 % av O-enheterna bedömts som hög titer vilket är ungefär samma resultat som Josephson, Mullis & Hillyer (2004) kom fram till.

I den här studien valdes att inkludera poolade enheter i screeningmetoden, även om poolade enheter anses ha en minimal risk för att ge en hemolytisk transfusionsreaktion på grund av spädningseffekten (Cooling et al. 2008). En studie av Cooling et al. (2008) menar däremot att titern för O-afeser och O-pooler är jämförbara. De bestämde titern, med direkt agglutination, av anti-A och anti-B i 185 poolade enheter och kunde konstatera att med en gräns på 1:64 bedömdes 60 % av enheterna ha en hög titer. Detta var en högre andel än de 28 % av O-afeserna med en hög titer i studien av Josephson, Mullis & Hillyer (2004). I den här studien kunde det också påvisas att O-afeser och O-pooler är jämförbara, både gällande titer men också att O-pooler visade sig ha ett högre typvärde för anti-A (IgG) än O-afeserna. Dessutom identifierades en poolad enhet under screeningen med en titer på minst 1:512.

Eftersom andelen enheter med hög titer för IgG tidigare var relativt låg (5 %) och att det i screeningmetoden steg till 31 %, fick det oss att fundera på varför? Det som skiljde metoderna åt var att i screeningmetoden gjordes en direktspädning medan det tidigare använts en seriespädning. För att utreda detta kontrollerades några av enheterna med hög titer från screeningen genom att göra en 2X seriespädning från 2-512. Resultatet visade att det var skillnader mellan spädningsteknikerna där seriespädningen gav 1-2 steg lägre i titer än direktspädningen. En studie av Sadani, Urbaniak, Bruce och Tighe (2006) konstaterade att det fanns skillnader beroende på om det var en seriespädning eller en direkt spädning. Dock visade deras resultat att titern istället var högre vid en seriespädning än vid en direkt spädning, vilket är tvärtemot vad den här studien visade. Även Quillen et al. (2011) konstaterade att en direkt spädning inte gav samma resultat som vid en seriespädning. Det här visar att det kan uppstå skillnader beroende på vilken spädningsteknik som används. Innan screeningmetoden införs kan det därför vara av värde att analysera fler enheter för att jämföra skillnader mellan en seriespädning och en direktspädning. Om en seriespädning minskar titern i jämförelse med en direktspädning kan antalet enheter med hög titer minska ytterligare. Vid direktspädningen användes en liten volym (2 µl) som utgång vid spädningen medan det i seriespädningen användes en större volym (200 µl), vilket också kan ha bidragit till skillnader i titern.

På Universitetssjukhuset i Lund bestäms titern enbart på aferesenheter vid första tappningen, vilket görs på plasmaprover. De färdiga enheterna märks därefter utifrån det värdet oavsett om det var flera år sedan titern bestämdes. Att analysera direkt från plasma ger en högre koncentration av antikropparna. Den färdiga enheten innehåller enbart runt 37-40 % plasma och är dessutom utspädd med 150-200 mL PAS lösning, vilket innebär att titern av anti-A/anti-B är betydligt lägre i den färdiga enheten. Efter att ha analyserat titern direkt från enheten och jämfört med det värdet som bestämts på plasmaprovet vid första tappningen kunde den här studien påvisa att 73 % av enheterna som tidigare bedömts som hög titer inte hade en hög titer i den färdiga enheten. Genom att ta hänsyn till spädningseffekten av den färdiga produkten och analysera titern direkt från trombocyt enheten kan antalet enheter som kan transfunderas över ABO öka och kasseringen av enheter minska.

Att bestämma en kritisk titer har, som tidigare nämnts, varit en pågående diskussion i många år och det finns fortfarande inget svar på den frågan. En studie av Pieterz,

Engelfreit & Reesink (2005) undersökte hur det såg ut runt om i världen. De ställde bland annat frågor om medvetenheten om riskerna kring anti-A och anti-B, vilka åtgärder som fanns för att minimera risker för hemolys samt vilken titer som uppfattades som kritisk. Det visade sig att alla länderna kände till riskerna med hemolys på grund av anti-A och anti-B och försökte i första hand att transfundera med ABO kompatibla enheter. Alla länder bestämde inte titern av anti-A och anti-B, men hade då andra åtgärder för att minimera riskerna. I vissa länder utfördes enbart titerbestämning i specifika fall. Några av åtgärderna som istället gjordes var att reducera mängden plasma, ersätta plasman med PAS-lösning, ersätta plasman med AB plasma samt att tvätta trombocyterna. Trombocyter utspädda i PAS-lösning har visat sig ge mindre transfusionsreaktioner än trombocyter utspädda i plasma. Dock kan PAS-lösning minska antalet trombocyter under förvaring i jämförelse med plasma (Kerkhoffs et al. 2006). De kritiska titrarna varierade mellan 16-512 (Bilaga 6). Det var anmärkningsvärt att vissa länder enbart kontrollerar IgM antikroppar och inte IgG. En deltagare i studien menade dessutom att IgG inte hade en signifikant roll i minor inkompatibla transfusioner, vilket motsätter den här studiens och andra studiers resultat. En annan deltagare som inte använde sig av titerbestämning menade att de ansåg det som en opålitlig metod för att förutse risker hos en patient. Ytterligare en deltagare ansåg att O-afeser var säkra då det visat sig att enheterna vid en undersökning haft en låg titer där 5–7 % (n=139) hade en titer över 32 men ingen över 128, vilket motsätter den här studiens resultat (Pietersz, Engelfriet & Reesink 2005).

För att undersöka skillnaderna nationellt skickades ett mail ut till fem institutioner runt om i Sverige. Det kunde därefter konstateras att det fanns skillnader i kritisk titer och även analysmetod (Tabell 7).

Tabell 7 visar hur titern och analysmetoder skiljer sig åt runt om i Sverige.

Ort	Metod	Titer IgM	Titer IgG
Stockholm	Gelteknik	100	400
Umeå	Rörteknik	100	400
Linköping	Gelteknik	64	128
Lund	Gelteknik	64	256
Göteborg	Gelteknik	100	400

Ort	Metod	Titer IgM	Titer IgG
Uppsala	Gelteknik	100	200

Trots att det inom länder och mellan länder skiljer sig i hur man hanterar trombocyterna och vilken titer samt metod som används är antalet fall av hemolytiska fall sällsynta. Frekvensen av hemolys i inkompatibla enheter har redovisats som 1:6600 (Larson, Welsh & Ladd 2000) och 1:9000 (Mair & Benson 1998). Tabell 8 visar studier som har undersökt olika fall av hemolytiska reaktioner och det kan konstateras att titern av anti-A varierar mellan 32-16384 för IgM/Salin och 32-16384 för IgG/AHG. Alltså har hemolytiska reaktioner skett trots låg titer, vilket tyder på att fler faktorer kan påverka risken att drabbas av en hemolytisk reaktion.

Tabell 8 visar fall av hemolytiska reaktioner och vilken titer trombocytenheten hade vid transfusion.

Författare	Recipient Blodgrupp	Enhet	Titer
Larsson, Welsh & Ladd (2000)	A	O aferes	Saline: 16, 384 AHG: 4096
Harris et al. (2007)	A	O aferes	IgG: 4096, IgM: 256
Sapatnekar et al. (2005)	A	O aferes	Salin: 2048 AHG: 16,384
Sadani et al. (2011)	A	O aferes	IgG:160 IgM: 640
Josephson et al. (2009)	A	O aferes	1: IgG: 8192 IgM: 256 2: IgG: 1024
Mair & Benson (1998)	A	O aferes	Salin: 128
Lundberg & McGinniss (1975)	AB	O pool	Salin: 64 AHG: 128
Fauzie, Shirey, Thoman, Bensen-Kennedy & King (2004)	A	O aferes	IgM: 32, IgG: 32

En studie av Karaffin et al. (2012) menar i motsättning till många andra att titerbestämning av IgG antikroppar från trombocytenheter ger en begränsad förutsägning

om riskerna för hemolys. Under deras studie genomfördes 4228 transfusioner varav 647 (15,1 %) var inkompatibla. Inga hemolytiska reaktioner kunde noteras under studiens gång, dock fanns det 26 fall av reaktioner med feber. Av dessa 26 fall hade 15,4 % av recipienterna blivit transfunderade med en inkompatibel trombocyt enhet, 30,8 % med en major ABO inkompatibel enhet och 53,8 % med en ABO identisk enhet. 17 patienter hade fått enheter med en titer på över 512 och för den gruppen rapporterades 19 stycken transfusionshändelser. En kontrollgrupp fick enheter med en titer under 32 och där rapporterades 23 händelser medan det i en annan kontrollgrupp, med ABO identisk transfusion, rapporterades 28 händelser. Dock hade ingen av grupperna fått hemolytiska reaktioner men alla grupperna hade en sänkning av hemoglobinvärdet. De kunde också i studien konstatera att det fanns en större sänkning av hemoglobinvärdet vid transfusion av enheter med en ökad ABO titer, men också vid större volymer av inkompatibla enheter. De menar att plasmakompatibilitet är viktigt för att förutse hemolys, men att titerbestämning av IgG antikroppar i sig ger ett begränsat värde för att förutse risker hos patienten. Volymen som transfunderas och andra recipientfaktorer tros påverka risken att drabbas, vilket stöds av Josephson et al. (2009). Cooling et al. (2007) menar också att faktorer som ABO typ, kön, ABO-styrka, trombocytaktivering och lagringstid påverkar posttransfusionsreaktioner. Det behövs därför mer forskning inom området för att påvisa vilka faktorer och på vilket sätt de kan påverka patienten och om det finns vissa patienter som har större risker att drabbas.

Variationer i titern kan också förekomma, vilket styrker införandet av en screeningmetod. En studie av Daniel-Johnsson et al. (2009) rapporterade om en donator som gett trombocyter 134 gånger tidigare. Den nyligen tappade enheten fördelades till två patienter (blodgrupp B) som båda fick en hemolytisk transfusionsreaktion. Vid titerbestämning av donatorn kunde det konstateras en hög titer anti-B på 16384 för både IgM och IgG. Det visade sig att donatorn sedan 3 år ätit probiotika, men hade under de senaste tre veckorna ökat dosen. Studien kunde påvisa att intag av probiotika ökade produktionen av anti-B. Även immuniseringar efter vaccinationer, transfusioner och graviditeter kan bidra till variationer i titer. Pollen, födoämnen, virus och bakterier kan ha liknande strukturer som blodgruppsantigen vilket innebär att kroppen börjar att producera antikroppar (Malomgré & Neumesiter 2008).

En svaghet i den här studien är att det är ett relativt litet antal enheter som har undersökts i jämförelse mot andra studier, vilket kan ha påverkat resultaten. Ytterligare fler enheter hade behövts analyseras inför införandet av screeningmetoden och även variationerna gällande spädningsteknikerna hade behövts undersökas mer.

5. Slutsats

Det finns ingen bestämd kritisk titer eller referensmetod för hur man ska bestämma titern av anti-A och anti-B i trombocytenheter. Andelen enheter med hög titer varierar mellan studier och hemolytiska reaktioner kan ske trots låg titer, vilket påvisar svårigheterna med att bestämma en kritisk titer och att förutse risker hos patienten. Alla studier påvisar att förebyggande åtgärder tas för att minimera riskerna och trots olikheterna i dessa är antalet fall med akuta hemolytiska reaktioner sällsynta.

Då titern bestäms på plasma riskerar många enheter att felaktigt bedömas som hög titer då spädningseffekten i den färdiga enheten inte tas i beaktande. Då skillnaderna var signifikanta bör en omvärdering göras kring om den här rutinanalysen ska kvarstå. En screeningmetod på 1:250 visade sig ge ett bra resultat som är jämförbara med andra studier och anses därför vara lämplig att införa som en ny rutinanalys. En screeningmetod tillåter att på ett snabbt och enkelt sätt kunna bestämma titern på O-enheterna. Det minimerar riskerna för hemolytiska transfusionsreaktioner, uppmärksammar variationer i titer och framförallt ger den en korrekt titer för den färdiga trombocytenheten. Detta i sig leder till att fler enheter kan transfunderas över ABO och på ett säkert sätt för patienten.

Tackord

Ett stort tack till min handledare Jill Storry som gjorde det här arbetet möjligt och som hjälpt och stöttat mig under arbetets gång. Ett stort tack till min skrivhandledare Daniel Carlberg för allt läsande, alla tips och feedback. Ett stort tack till alla kollegor på Transfusionsmedicin i Lund som hjälpt mig under det laborativa arbetet. Sist men inte minst ett stort tack till min familj som stöttat mig under arbetet och under alla dessa tre åren.

Referenser

Beattie, K. (1980). Control of the antigen-antibody ratio in antibody detection/compatibility tests. *Transfusion*, 20, ss. 277-284.

Blodövervakning i Sverige (2016). *Hemovigilans i Sverige 2014–2016*. <http://www.kitm.se/sv/wp-content/uploads/2017/08/Hemovigilans-i-Sverige-2014-2016.pdf> [20180520]

Blumberg, N., Heal, J. M. & Philips, G. L. (2010). Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks. *Medicine Reports*, 2(5), ss. 1-5. DOI: 10.3410/M2-5

Cate, J. C. & Reilly, N. (1999). Evaluation and Implementation of the Gel Test for Indirect Antiglobulin Testing in a Community Hospital Laboratory. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 123, ss. 693-697.

Cid, J. (2017). Prevention of transfusion -associated graft-versus-host disease with pathogen -reduced platelets with amotosalen and ultraviolet A light: a review. *Vox Sanguinis*, 112, ss. 607-613. DOI: 10.1111/vox.12558

Cid, J., Harm, S. K. & Yazer, M. H. (2013). Platelet Transfusion – the Art and Science of Compromise. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40, ss. 160-171. DOI: 10.1159/000351230

Cooling, L. (2007). ABO and platelet transfusion therapy. *Immunohematology*, 23 (1), ss. 20-33.

Cooling, L. L., Downs, T. A., Butch, S. H. & Davenport, R. D. (2008). Anti-A and anti-B titers in pooled group O platelets are comparable to apheresis platelets. *Transfusion*, 48, ss. 2106-2113. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01814.x

Daniels, G. & Bromilow, I. (2014). *Essential Guide to Blood Groups*. Chichester: Wiley Blackwell.

Daniel-Johnsson, J., Leitman, S., Klein, H., Alter, H., Lee-Stroka, A., Scheinberg, P., Pantin, J. & Quillen, K. (2009). Probiotic-associated high-titer anti-B in a group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 49(9), ss. 1845-1849. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02208.x

Duguid, J. K. M. & Bromilow, I. M. (1993). New technology in hospital blood banking. *Journal of Clinical Pathology*, 46, ss. 585-588.

Fautzi, D., Shirey, R. S., Thoman, S., Bensen-Kennedy, D. & King, K. E. (2004). The risk of hemolytic transfusion reactions due to passively-acquired ABO antibodies: a retrospective study of non-group O adult recipients of group O plateletapheresis transfusions. *Transfusion*, 44.

Fontaine, M. J., Webster, J., Gomez, S., Pham, T. D., Goodnough, L. T. & Galel, S. A. (2015). How do I implement an automated screen for high-titer ABO antibody as an inventory management tool for ABO plasma-incompatible platelets? *Transfusion*, 55, ss. 2783-2789. DOI: 10.1111/trf.13374

Fung, M. K., Downes, K. A. & Shulman, I. A. (2007). Transfusion of Platelets Containing ABO-Incompatible Plasma: A survey of 3156 North American Laboratories. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 131, ss. 909-916.

Garratty, G. (1998). Problems associated with passively transfused blood group alloantibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 109(6), ss. 769-777.

Harris, S. B., Josephson, C. D., Kost, C. B. & Hillyer, C. D. (2007). Nonfatal intravascular hemolysis in a pediatric patient after transfusion of a platelet unit with high-titer anti-A. *Transfusion*, 47, ss. 1412-1417. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01283.x

Josephson, C. D., Castillejo, M.-I, Grima, K. & Hillyer, C. D. (2010). ABO-mismatched platelet transfusions: Strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfusion and Apheresis Science*, 42, ss. 83-88. DOI: 10.1016/j.transci.2009.10.013

Josephson, C. D., Mullis, N. C. & Hillyer, C. D. (2004). Significant numbers of apheresis-derived group O platelet units have “high-titer” anti-A/A,B: implications for transfusion policy. *Transfusion*, 44, ss. 805-808.

Karafin, M. S., Blagg, L., Tobian, A. A. R., King, K. E., Ness, P. M & Savage, W. J. (2012). ABO Antibody Titers are not Predictive of Hemolytic Reactions Due to Plasma Incompatible Platelet Transfusions. *Transfusion*, 52(10), ss. 2087-2093. DOI: 10.1111/j.1637-2995.2012.03574.x

Kerkhoffs, J.-L. H., Eikenboom, J. C., Schipperus, M. S., Van Wordragen-Vlaswinkel, R. J., Brand, R., Harvey, M. S., De Vries, R. R., Barge, R., Van Rhenen, D. J. & Brand, A. (2006). A multicenter randomized study of the efficacy of transfusions with platelets

stored in platelet additive solution II versus plasma. *Blood Journal*, 108 (9), ss. 3210-3215. DOI: 10.1182/blood-2006-04-020131

Labex. (u.å.). *Gradering av reaktioner i rör och gelkort*. Lund: Metodbeskrivning

Langston, M. M., Procter, J. L., Cipolone, K. M. & Stroncek, D. F. (1999). Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing. *Transfusion*, 39, ss. 300-305.

Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J., Josef, D., Meyer, F., Greber, S. & Drot, C. (1989). The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*, 30, ss. 109-113.

Larsson, L. G., Welsh, V. J. & Ladd, D. J. (2000). Acute intravascular hemolysis secondary to out-of-group platelet transfusion. *Transfusion*, 40, ss. 902-906.

Lundberg, W. B. & McGinniss, M. H. (1975). Hemolytic transfusion reaction due to anti-A. *Transfusion*, 15, ss. 1-9.

Mair, B. & Benson, K. (1998). Evaluation of changes in hemoglobin levels associated with ABO-incompatible plasma in apheresis platelets. *Transfusion*, 38, ss. 51-55.

Malomgré, W. & Neumeister, B. (2009). Recent and future trends in blood group typing. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 393, ss. 1443-1451. DOI: 10.1007/s00216-008-2411-3

Malyska, H. & Weiland, D. (1994). The Gel Test. *Laboratory Medicine*, 25(2), ss. 81-85.

Murphy, M. F., Hook, S., Waters, A. H., Sterlini, J., Whelan, J., Davis, C. & Lister, T. A. (1990). Acute haemolysis after ABO-incompatible platelet transfusion. *Lancet*, 335, ss. 974-975

Pietersz, R. N. I., Engelfreit, C. P. & Reesink, H. W. (2005). International forum: Transfusion of apheresis platelets and ABO groups. *Vox Sanguinis*, 88, ss. 207-221.

Quillen, K., Sheldon, S. L., Daniel-Johnson, J. A., Lee-Stroka, A. H. & Flegel, W. A. (2011). A practical strategy to reduce the risk of passive hemolysis by screening plateletapheresis donors for high-titer ABO antibodies. *Transfusion*, 51(1), ss. 92-96. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02759.x

Sadani, D. T., Urbaniak, S. J., Bruce, M. & Tighe, J. E. (2006). Repeat ABO-incompatible platelet transfusions leading to haemolytic transfusion reaction. *Transfusion Medicine*, 16, ss. 375-379. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00684.x

Sapatnekar, S., Sharma, G., Downes, K. A., Wiersma, S., McGrath, C. & Yomtovian, R. (2005). Acute Hemolytic Transfusion Reaction in a Pediatric Patient Following Transfusion of Apheresis Platelets. *Journal of Clinical Apheresis*, 20, ss. 225-229. DOI: 10.1002/jca.20072

Bilagor

Bilaga 1: Titern för anti-A och anti-B i O-afeser.

Tabell 1 visar titern för alla O-afeser i anti-A och anti-B (IgG och IgM).

O-afeser	Anti-A		Anti-B	
	IgG	IgM	IgG	IgM
A0-01	64	16	64	32
A0-02	32	16	8	4
A0-03	16	8	32	8
A0-04	32	16	64	4
A0-05	32	4	0	0
A0-06	32	8	16	4
A0-07	16	8	0	0
A0-08	8	4	16	32
A0-09	16	4	4	4
A0-10	32	8	4	4
A0-11	128	64	32	32
A0-12	4	2	4	0
A0-13	32	16	8	16
A0-14	256	32	32	8
A0-15	16	4	8	4
A0-16	16	8	4	2
A0-17	128	16	4	4
A0-18	64	16	128	16
A0-19	8	0	8	2
Typvärde	32	16	4	4

Bilaga 2: Titern för anti-A och anti-B i O-pooler.

Tabell 2 visar titern för alla O-pooler i anti-A och anti-B (IgG och IgM).

O-pooler	Anti-A		Anti-B	
	IgG	IgM	IgG	IgM
P0-01	64	16	32	16
P0-02	64	8	16	8
P0-03	32	8	8	8
P0-04	64	4	32	8
P0-05	16	8	16	8
P0-06	32	8	32	8
P0-07	64	8	8	4
P0-08	32	16	8	4
P0-09	64	8	16	8
P0-10	64	8	16	8
P0-11	64	16	16	8
P0-12	16	8	16	8
P0-13	32	16	16	4
P0-14	32	16	8	8
P0-15	8	8	8	4
P0-16	128	16	32	16
P0-17	64	16	8	4
Typvärde	64	8	16	8

Bilaga 3: Titern av anti-B i A-pooler.

Tabell 3 visar titern för alla A-pooler i anti-B (IgG och IgM).

A-pooler		
Enheter	Anti-B	
	IgG	IgM
PA-01	2	4
PA-02	4	8
PA-03	4	4
PA-04	4	4
PA-05	2	4
PA-06	8	8
PA-07	4	4
PA-08	8	8
PA-09	4	2
PA-10	8	8
PA-11	4	8
PA-12	4	4
PA-13	8	4
PA-14	2	4
PA-15	2	4
PA-16	2	4
PA-17	2	2
Typvärde	7	4

Bilaga 4: Titern av anti-B i A-afereser.

Tabell 4 visar titern för alla A-afereser i anti-B (IgG och IgM).

A-afereser		
Enheter	Anti-B	
	IgG	IgM
AA-01	4	4
AA-02	1	2
AA-03	4	4
Typvärde	4	4

Bilaga 5: Skillnaderna i titern av anti-A och anti-B för O-afeser mellan den första tappningen och den senaste tappningen (5a och 5b) och resultatredovisning av teckentestet (5c).

Tabell 5a visar skillnaderna i titer (anti-A) från trombocytenheten och plasmaprovet för O-afeser.

Enheter	Anti-A					
	IgG			IgM		
	Trc enhet	Plasma	Skillnad titersteg	Trc enhet	Plasma	Skillnad titersteg
1	64	256	2	16	64	2
2	32	256	3	16	128	3
3	16	128	3	8	16	1
4	32	256	3	16	128	3
5	32	256	3	8	64	3
6	16	32	1	8	32	2
7	8	64	3	4	16	2
8	16	64	2	4	16	2
9	32	256	3	8	64	3
10	128	256	1	64	256	2
11	32	128	2	16	64	2
12	16	64	2	4	8	1
13	128	512	2	16	128	3
14	64	256	2	16	64	2
15	8	64	3	4	16	2

Tabell 5b visar skillnaderna i titer (anti-B) från trombocytenheten och plasmaprovet för O-afeser.

Enheter	Anti-B					
	IgG			IgM		
	Trc enhet	Plasma	Skillnad titersteg	Trc enhet	Plasma	Skillnad titersteg
1	64	512	2	32	128	2
2	8	32	2	4	32	3
3	32	128	2	8	16	1
4	64	256	2	4	32	3
5	16	64	2	4	16	2
6	0	16	5	0	32	6
7	16	64	2	32	64	1
8	4	16	2	4	8	1
9	4	16	2	4	32	3
10	32	128	2	32	128	2
11	8	128	4	16	64	2
12	8	16	1	4	16	2
13	4	64	4	4	16	2
14	128	512	1	16	128	3
15	8	32	2	2	8	2

Tabell 5c visar resultaten och beräkningarna av teckentestet som gjordes på O-afeserna. Samma resultat erhöles för de fyra olika jämförelserna. Teckentestet gjordes i Excel (2016) med funktionen binomialfördelning.

Anti-A						Anti-B					
IgG			IgM			IgG			IgM		
Efter	Innan	+/-	Efter	Innan	+/-	Efter	Innan	+/-	Efter	Innan	+/-
64	256	-	16	64	-	64	512	-	32	128	-
32	256	-	16	128	-	8	32	-	4	32	-
16	128	-	8	16	-	32	128	-	8	16	-
32	256	-	16	128	-	64	256	-	4	32	-
32	-	0	4	-	0	0	-	0	0	-	0
32	256	-	8	64	-	16	64	-	4	16	-
16	32	-	8	32	-	0	16	-	0	32	-
8	64	-	4	16	-	16	64	-	32	64	-
16	64	-	4	16	-	4	16	-	4	8	-
32	256	-	8	64	-	4	16	-	4	32	-
128	256	-	64	256	-	32	128	-	32	128	-
4	-	0	2	-	0	4	-	0	0	-	0
32	128	-	16	64	-	8	128	-	16	64	-
256	-	0	32	-	0	32	-	0	8	-	0
16	64	-	4	8	-	8	16	-	4	16	-
16	-	0	8	-	0	4	-	0	2	-	0
128	512	-	16	128	-	4	64	-	4	16	-
64	256	-	16	64	-	128	512	-	16	128	-
8	64	-	4	16	-	8	32	-	2	8	-

Antal försök = 15

Antal lyckade försök = 15

Sannolikhet = 0,5

Kumulativ = FALSKT

P-värde för tvåsidigt test = 6,10E-05

□

Bilaga 6: Redovisning av skillnader mellan länder gällande screening, metod och kritisk titer (Pietersz, Engelfreit & Reesink 2005).

Tabell 6 visar skillnaderna mellan olika länder gällande rutiner för screening, analysmetod och kritisk titer.

Land	Screening av enheter	Metod alt. åtgärd	Kritisk titer
Australien	Ja (afereser)	IAT	100
Tjeckien	Ja (afereser)	Salin	64
Tyskland	Ja (afereser)	Rörteknik	IgM: 100
Tyskland	Ja	Rörteknik	128
Italien	Nej	Gelteknik	IgM: 64 IgG: 256
Japan	Nej	IAT	512
Holland	Nej	Volymreduktion	anti-A:128 anti-B: 250
Norge	Nej	Salin och IAT	IgM & IgG: 250
Polen	Nej	Plasmareduktion	-
Spanien	Nej	Plasmareduktion	-
Sverige	Ja (O-afereser)	Rörteknik	IgM 100 IgG 400
Schweiz	Ja (afereser)	Mikroplatta	16 (Hemolysin)
England	Ja (afereser och poolade)	Automatiserad-salin	20
USA	Nej	Tvättning	-
Finland	Nej	ABO identisk	-