

**Elin Hallheim Reiersøl**

Bioingeniør med spesialistgodkjenning i transfusjonsmedisin/immunhematologi og master i biomedisin. Kvalitetskoordinator på blodbanken i Arendal, Laboratorieavdelingen, Sørlandet sykehus. E-post: elin.hallheim@sshf.no

**Thomas E. Hundhausen**

Dr. med., spesialist i medisinsk biokjemi, immunologi og transfusjonsmedisin, og arbeider ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Sørlandet Sykehus HF og ved Universitetet i Agder, Institutt for naturvitenskap.

Hovedbudskap

- Identifisering av IgG-antistoff og antigenotyping av pasienter med positiv direkte antiglobulintest (DAT) er relevant både for transfusjonsterapi og oppfølging av gravide.
- Elueringsmetoder kan benyttes ved utredning av flere problemstillinger innen blodtypeserologi.
- CE-IVD-sertifiserte kit for både stripping og eluering av IgG-antistoff er tilgjengelige.

Nøkkelord

IgG-antistoff, Erytrocytter, Eluering, Direkte antiglobulintest, DAT

Sammendrag

Bakgrunn: IgG-antistoff bundet til erytrocytter kan være involvert i ulike sykdomsprosesser. Identifisering av disse antistoffene, og antigenotyping av pasienter med positiv direkte antiglobulintest (DAT) er relevant både for transfusjonsterapi og oppfølging av pasienter ved graviditet. Vi har sammenlignet elueringseffektivitet og samsvarende resultat for CE (Communauté Européenne)- og IVD (*in vitro*-diagnostisk)-merkede metoder og varmeeluering.

Metode: Elueringsmetoder for stripping av DAT-positive erytrocytter og for påvisning av antistoff i eluat ble sammenlignet. McNemars test ble benyttet til å sammenligne metodenes effektivitet. Statisk signifikansnivå ble satt til p -verdi $< 0,05$ og Holm-Bonferronis metode for multiple sammenligninger ble brukt. Andel samsvarende resultat mellom metodene ble beregnet i prosent.

Resultat: Vi påviste signifikant forskjell i diagnostisk sensitivitet mellom de ulike metodene, og andel samsvarende resultat mellom metodene var fra 64 til 90 %. Ved antigenotyping av DAT-negative erytrocytter etter stripping av antistoff ble det observert både falskt negative og falskt positive reaksjoner.

Konklusjon: Metoder for eluering av IgG-antistoff fra erytrocytter bør inngå i rutine for utredning ved visse problemstillinger. Metodene gir ikke samsvarende resultat ved alle problemstillinger, og alternative metoder bør være tilgjengelige.

Sammenligning av metoder for eluering av IgG-antistoff bundet til erytrocytter

Innledning

Antistoff bundet til erytrocytter kan være involvert i ulike sykdomsprosesser som autoimmun hemolytisk anemi (AIHA), hemolytisk sykdom hos nyfødt (HSN) og serologiske transfusjonsreaksjoner. Identifisering av disse antistoffene og antigenotyping av pasienter med positiv direkte antiglobulintest (DAT) er relevant for å kunne gi mest mulig typelikt blod ved transfusjonsterapi, og for oppfølging av pasienter, blant annet ved graviditet.

For identifikasjon av antistoff eller antigenotyping må man først dissosiere antistoff bundet til erytrocyttene i en elueringsprosess. Ikke-kovalente bindinger mellom antigen og antistoff er reversible, og ved å behandle erytrocyttene kjemisk, med varme eller ved å endre pH, kan antistoffene dissosieres. På grunn av heterogenitet i krefter som binder antigen og antistoff er det ingen elueringsmetode

som er best egnet til å bryte alle typer bindinger. Ved multiple antistoff kan eluering i kombinasjon med adsorpsjon også benyttes til å påvise de ulike antistoffenes spesifisitet (1, 2). Valg av metode avhenger av hva man ønsker å oppnå: Om målet er å identifisere antistoff i eluatet, eller om det er å antigenotype cellene etter at bundet antistoff er fjernet fra cellene (DAT-negative celler). Dersom målet er å identifisere antistoffet som er bundet til cellene ønsker man å dissosiere mest mulig antistoff, og antigenkonfigurasjonen ødelegges for å få med mest mulig antistoff over i eluatet. Er målet antigenotyping av cellene etter eluering, bruker man mildere metoder for å dissosiere antistoffene og samtidig bevare konfigurasjonen (3, 4). For å skille mellom disse to målene omtales elueringsprosessen for å framstille DAT-negative celler til antigenotyping heretter som «stripping».

I Norge finnes i dag 27 blodbanker som er godkjent av Helsedirektoratet for produksjon av blod og blodprodukter (5). De fleste av blodbankene utfører påvisning av klinisk relevante antistoff (ABO/RhD-typing og antistoffscreening), og

■ Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfelleurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

om lag 40 prosent av laboratoriene utfører utredning av antistoffenes spesifisitet med vanlige kommersielle identifiseringspanel og teknikker. Etter det vi vet, er metoder for *in-vitro*-eluering med påfølgende antistoffidentifisering i eluatet per i dag i bruk til pasientutredning ved fem større blodbanker i Norge, og når det gjelder metoder for eluering av IgG-antistoff med påfølgende antigenotyping (stripping) utføres dette kun ved to blodbanker. Ved større sykehus erstattes antigenotyping med serologiske metoder etter hvert med genomisk typing. Å etablere systemer for genomisk typing med «high-throughput» av prøver er kostbart, og serologisk typing kan fortsatt være et alternativ (6). Laboratoriene er også pålagt, i henhold til krav fra helsemyndighetene, å benytte godkjente CE (Communauté Européenne)- og IVD (*in vitro*-diagnostikk)-sertifiserte reagenser til *in vitro*-diagnostisering. Slike CE-IVD-sertifiserte elueringskit er tilgjengelig fra flere leverandører, også i Norge.

Litteraturen som beskriver ulike elueringsteknikker er uoversiktlig, og ofte av eldre dato med bruk av hjemmelagede reagenser og prosedyrer (7, 8). Vi har ikke funnet studier som presenterer sammenligning av effektivitet og samsvar mellom kommersielle CE-IVD-sertifiserte kit fra Immucor og BioRad ved søk i PubMed.

Denne studien ble utført i forbindelse med masterstudium i Biomedisin ved

OsloMet, og hovedmål for oppgaven var å utføre en systematisk sammenligning av to kommersielle CE-IVD-sertifiserte elueringskit og en eldre ikke-kommersiell metode for hver problemstilling (figur 1):

■ Sammenligne effektivitet og samsvar mellom tre elueringsmetoder for å fremstille DAT-negative celler (stripping): Varmestripping ved 45 °C, Gamma® EGA-kit (syre-EDTA) og Gamma®-Quin (klorokindifosfat)

■ Sammenligne samsvar for antigenotyping av DAT-negative celler.

■ Sammenligne effektivitet og samsvar mellom tre elueringsmetoder for å kunne påvise antistoff i eluatet: Varmeeluering ved 56 °C og syreeluering med henholdsvis Gamma® ELU-kit II og DiaCidel.

Materiale og metode

Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) sør-øst vurderte at studiet er et kvalitetsprosjekt. Prøvene ble anonymisert, og det er kun antistoffspesifisitet, resultat for DAT og blodtype som inngår i resultatbearbeiding og rapport.

Utvalg

EDTA- og ACD-blod fra etablerte blodgivere, samt EDTA-blod fra pasienter med positiv DAT, ble benyttet. Det ble også brukt EDTA-plasma med spesifikke alloantistoff nedfrosset rutinemessig i forbindelse med svangerskapsutred-

ning, og kommersielle antisera (tabell 1). For å ha tilstrekkelig prøvemateriale til å kunne sammenligne metodene ble blod fra etablerte givere sensibilisert *in vitro* med antistoff spesifikt rettet mot antigen på erythrocyttene. Det ble utført DAT etter *in vitro*-sensibilisering, og DAT-negative prøver ble ekskludert.

Prøvehåndtering og analysering

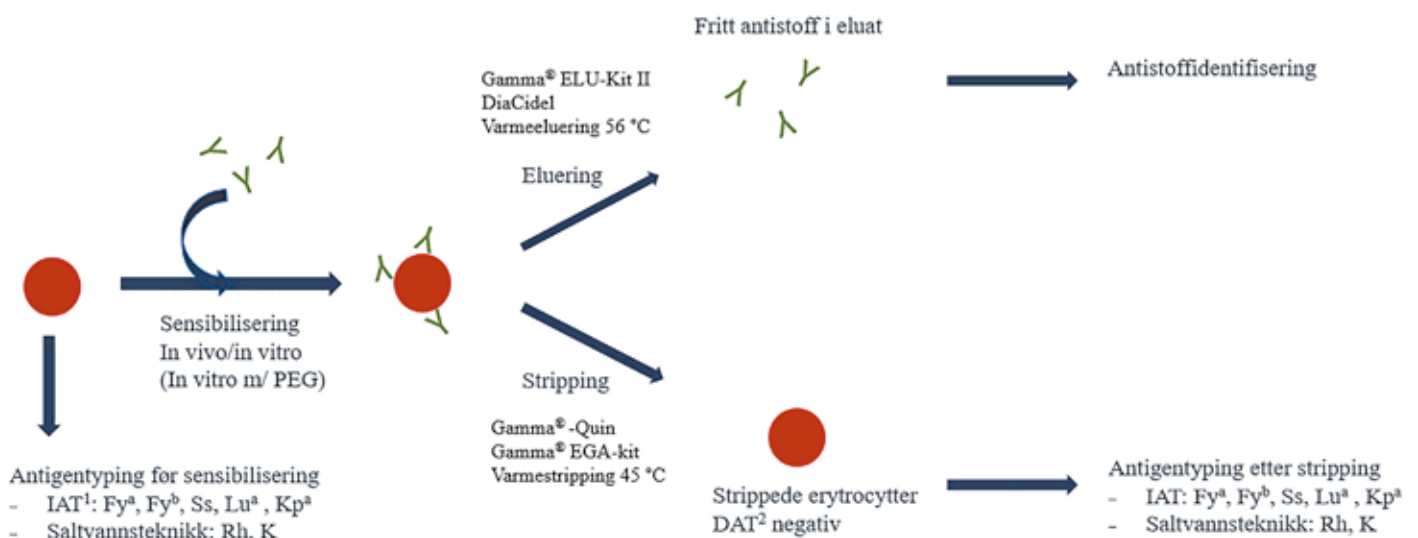
Skjematisk arbeidsflyt er vist i figur 1, og reagenser som er benyttet i studien er vist i tabell 1. Ved bruk av kommersielle kit er all utførelse gjort i henhold til pakningsvedleggene.

In vitro-sensibilisering: Celler ble vasket tre ganger med Diluent pH7, og deretter inkubert ved 37 °C i inntil to timer sammen med EDTA-plasma, eller med kommersielle antisera vist i tabell 1, og 20 % polyetylen-glycol (PEG) i forholdet 1+1+2. Cellene ble deretter vasket tre ganger med Diluent pH7.

Eluering

Stripping for antigenotyping ble utført med kommersielt tilgjengelige kit, henholdsvis EGA-kit og Gamma-Quin. DAT ble utført etter stripping for kontroll av dissosiasjon. Ved varmestripping ble sensibiliserte celler tilsatt Diluent pH7 i forholdet 1+3, og deretter inkubert i inntil 90 minutter ved 45 °C. For kontroll av dissosiasjon ble DAT utført etter inkubering i henholdsvis 30, 60 og 90 minutter.

Eluering for antistoffidentifisering ble ►



FIGUR 1. Skjematisk arbeidsflyt for antigenotyping, sensibilisering og eluering av antistoff.

¹Indirekte antiglobulinteknikk (IAT), ²Direkte antiglobulintest (DAT).

utført med kommersielt tilgjengelige kit, henholdsvis ELU-kit og DiaCidel. Ved varmeeluering av alloantistoff ble prøvene inkubert ved 56 °C i fem minutter. Ved varmeeluering av ABO-antistoff ble alle prøvene inkubert i henholdsvis fem og ti minutter. Etter inkubering ble rørene sentrifugert i tre minutter ved 2000 G, og eluatet ble overført til nye glassrør og sentrifugert før analysering.

Antigentyping

For å vurdere eventuell endring av antigenkonfigurasjon på strippede erytrocytter ble det utført antigenotyping av Duffy, Ss, Lu^a og Kp^a med indirekte antiglobulinteknikk (IAT), samt Rh, K og C^w med saltvannsteknikk før og etter stripping av antistoff. Antigenotyping ble utført med kommersielle gelkort og antisera.

Påvisning av antistoff i eluat

Ved eluering av alloantistoff ble det utført antistoffscreening i eluatet med screeningceller og gelkort fra Diagnostics Grifols S.A. Ved eluering av ABO-antistoff ble det utført påvisning av anti-A og anti-B i eluatet på gelkort Coombs Anti-IgG fra BioRad. Supernatant fra siste vask ble analysert parallelt med eluatet som kontroll på vaskeprosessen.

Dataanalyse

Data ble analysert ved hjelp av MedCalc® Software testversjon 18.11.6, IBM SPSS Statistics versjon 25, og GraphPad QuickCalcs. Metodenes elueringseffektivitet er angitt i prosent med 95 % konfidensintervall (KI), hvor KI er beregnet med modifisert Wald-metode (GraphPad QuickCalcs). For å sammenligne metodenes effektivitet med tanke på eluering og overensstemmelse mellom antigenotyping før og etter stripping av antistoff, ble McNemars test for forskjell mellom parede kategoriske data benyttet. P-verdi < 0,05 ble satt som statistisk signifikant. Ved multiple sammenligninger, ble den familievisse feilraten (family-wise error rate) kontrollert med Holm-Bonferronis metode for å redusere sannsynligheten for feilaktig forkastelse av nullhypotesen (type 1-feil) (9). For å vurdere samsvar mellom metodene ble det beregnet prosentandel prøver med samsvarende resultat og 95 % KI (Graph Pad Quick Calcs).

TABELL 1. Oversikt over reagens og gelkort som er benyttet i studien. Produkt, leverandør og produsent

A. Elueringskit		
Produkt	Leverandør	Produsent
Gamma® EGA-kit Gamma®-Quin Gamma® ELU-kit II	Nerliens Meszansky	Immucor Medical Diagnostic GmbH, USA
DiaCidel	Labex Skandinavia	BioRad, DiaMed GmbH, Sveits
B. Direkte antiglobulin test (DAT) og påvisning av antistoff i eluat		
Produkt	Leverandør	Produsent
ID-Diluent 2 LISS/Coombs ID-DC Screening II Coombs Anti-IgG	Labex Skandinavia	BioRad, DiaMed GmbH, Sveits
Screen-Cyte® 0,8 % IAT DG Gel Anti-IgG	Bergman Diagnostika	Diagnostics Grifols S.A, Spania
C. Sensibilisering av celler og antigenotyping		
Produkt	Leverandør	Produsent
Anti-D ref. reagens Albumin 6% (bovine)	Labex Skandinavia	BioRad, DiaMed GmbH, Sveits
Diluent pH 7	Labex Skandinavia	Labex Reagens AB, Sverige
Anti-Fy ^a /Anti-Fy ^b	Nerliens Meszansky	Immucor Medical Diagnostic GmbH
Anti-Jk ^a /Anti-Jk ^b Anti-K (K1) Anti-Le ^a /Anti-Le ^b Anti-M/Anti-N Anti-S/Anti-s Anti-Lu ^a /Anti-Kp ^a	Bergman Diagnostika	ANTITOXIN GmbH, Grifols, Tyskland
DG Gel Coombs DG Gel Pheno+Kell DG Gel SOL	Bergman Diagnostika	Diagnostics Grifols S.A, Spania
Polyetylen-glycol (PEG)	VWR International	Merck KGaA, Tyskland

Resultat

Sammenligning av metoder for stripping

Det ble utført stripping av 62 prøver. For åtte av prøvene ble prosedyren med varmebehandling avsluttet etter 30 minutters inkubering selv om DAT fortsatt var positiv, og prøvene ble derfor ekskludert. Antall DAT-negative prøver etter stripping av antistoff var 33 for EGA-kit, 30 for Gamma-Quin og 23 for varmestripping (figur 2A). EGA-kit viste større effektivitet enn varmestripping ($p = 0,01$) (tabell 2A), men krysstabellen i tabell 3A viser at to prøver som var DAT-negative etter varmestripping, fortsatt var DAT-positive etter stripping med EGA. Det var samsvarende resultat mellom alle metodene for 65-76 % av prøvene (tabell 4A).

Antigentyping

Det ble utført antigenotyping på alle prøver som var DAT-negative etter strip-

ping. For alle tre metoder ble det observert falskt negative reaksjoner ved typing av antigen med IAT. Etter eluering med EGA-kit og Gamma-Quin ble det også observert falskt positive reaksjoner. Ved antigenotyping med saltvannsteknikk ble det observert både falskt positive og falskt negative reaksjoner etter varmestripping, og falskt negative reaksjoner etter stripping med EGA-kit og Gamma-Quin (tabell 5A). Ved antigenotyping med saltvannsteknikk ble det observert statistisk signifikant forskjell mellom Gamma-Quin og varmestripping, i overensstemmelse av resultat før og etter eluering av antistoff ($p < 0,01$) (tabell 5B).

Sammenligning av metoder for påvisning av alloantistoff i eluat

Det ble utført eluering av 61 prøver. For ti prøver ble det ikke påvist antistoff i eluat for noen av metodene, og prøvene

ble ekskludert. Det ble påvist antistoff i 44 eluat fra ELU-kit (diagnostisk sensitivitet 86 %), 33 eluat fra DiaCidel (diagnostisk sensitivitet 65 %) og 15 eluat fra varmeeluering (diagnostisk sensitivitet 29 %) (figur 2B). Det ble observert statistisk signifikante forskjeller i elueringseffektivitet mellom henholdsvis ELU-kit og varmeeluering ($p < 0,01$), DiaCidel og varmeeluering ($p < 0,01$), og ELU-kit og DiaCidel ($p = 0,03$) (tabell 2B). Tabell 3B og 3C viser at det ble påvist antistoff i henholdsvis tre og sju eluat etter varmeeluering, som ikke ble påvist etter eluering med ELU-kit og DiaCidel. Det var samsvarende resultat mellom metodene for 31-59 % av prøvene (tabell 4B).

Sammenligning av metoder for påvisning av ABO-antistoff

Det ble utført eluering av 52 prøver. For elleve prøver, hvor det var forventet å påvise enten anti-A eller anti-B, ble begge antistoff påvist. Prøvene ble ikke ekskludert, men vurdert som «ikke

påvist» for respektiv metode. For å se om inkuberingstid påvirket resultatet ved varmeeluering, ble alle prøvene inkubert i henholdsvis fem og ti minutter. Inkubasjonstid med høyeste diagnostiske sensitivitet ble sammenlignet med de to andre elueringsmetodene; ELU-kit og DiaCidel. Det ble påvist antistoff i 37 eluat fra DiaCidel (diagnostisk sensitivitet 71 %), i 36 eluat fra både ELU-kit og varmeeluering med fem minutters inkubering (diagnostisk sensitivitet 70 %) og i 19 eluat etter varmeeluering med 10 minutters inkubering (diagnostisk sensitivitet 37 %) (figur 2C). Det ble observert statistisk signifikant forskjell i elueringseffektivitet mellom varmeeluering med henholdsvis fem og ti minutter inkubering ($p < 0,01$) (tabell 2C), og samsvarende resultat mellom metodene for 64-90 % av prøvene (tabell 4C).

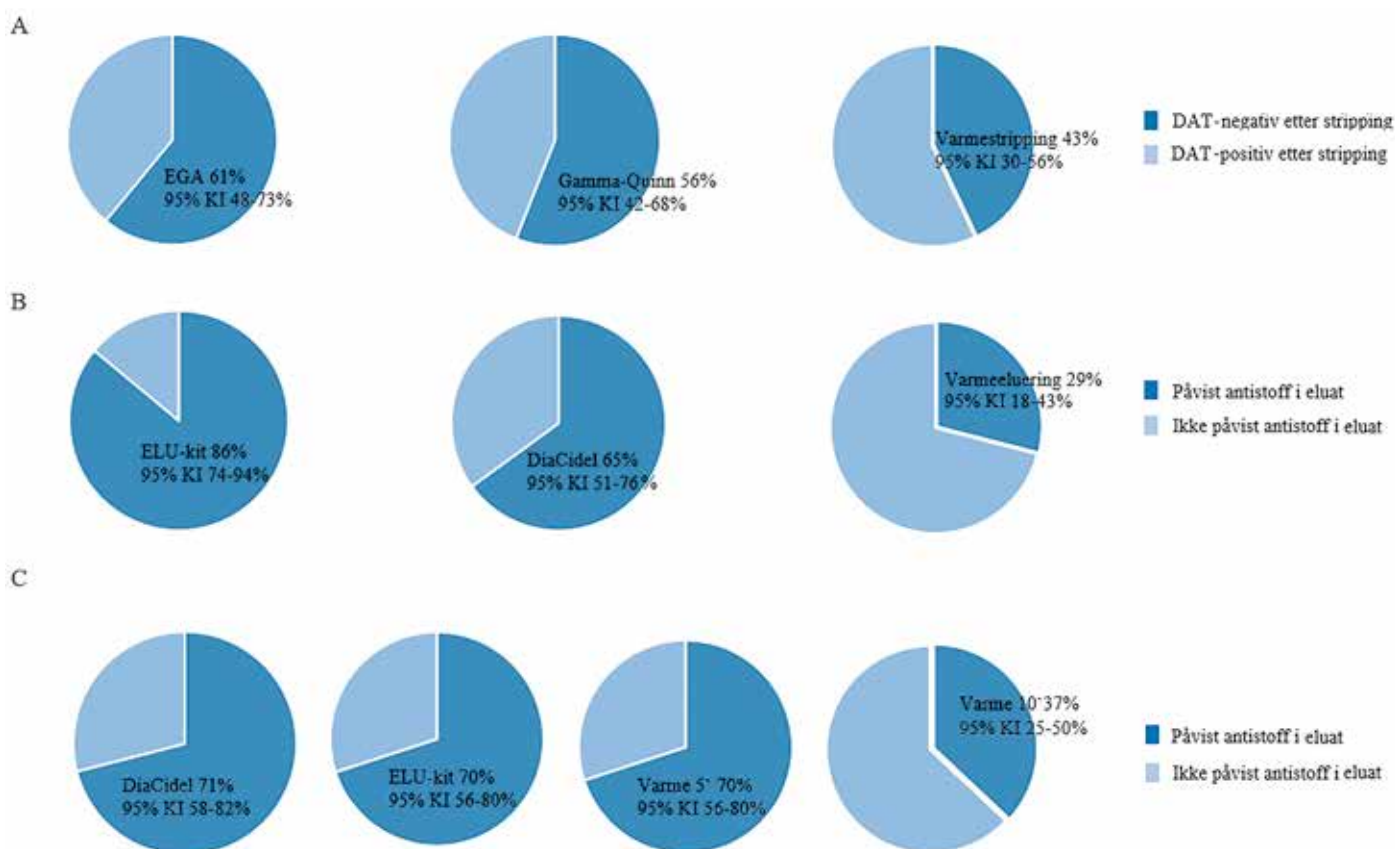
Diskusjon

Vi har utført en systematisk sammenligning av CE-IVD-sertifiserte elueringskit

og varmebehandling til eluering av antistoff bundet til erythrocytter, og vurdert klinisk nytteverdi av å implementere metoder for eluering av IgG-antistoff i laboratoriet. Vi fant at selv om eluering og stripping av IgG-antistoff med varme ved henholdsvis 45°C og 56°C er mindre effektiv enn de kommersielle metodene, kan det i enkelte tilfeller være nyttig å ha varmebehandlingsmetodene tilgjengelig.

Sammenligning av metoder for stripping

Det ble funnet signifikant forskjell i effektivitet mellom EGA-kit og varmestripping (19 % forskjell i effektivitet). Dette er i samsvar med andre studier som også viser signifikant forskjell mellom syre-EDTA og varmebehandling ved stripping av antistoff (10, 11). Studien viste også at selv om varmestripping er signifikant mindre effektiv i dissosiering av antistoff enn EGA-kit, var to prøver som ble DAT-negative etter behandling med varme, fortsatt DAT-positive etter stripping med EGA-kit. Dette er i samsvar med publi- ➤



FIGUR 2. Metodenes effektivitet.

A. Stripping av celler som er positive med direkte antiglobulintest (DAT) (n=54).

B. Eluering av alloantistoff innen Rh-, Kell-, Kidd-, Duffy-, MNSs- og Lutheran-systemene (n=51).

C. Eluering av ABO-antistoff (n=52). Varme 5' og Varme 10' = varmeeluering i henholdsvis 5 og 10 minutter.

serte data, hvor det konkluderes med at det ikke er en spesifikk elueringsmetode som er best egnet til å bryte alle typer antigen-antistoffbinding (4).

Antigentyping

Ved typing med saltvannsteknikk ble det observert færrest feiltyper etter stripping med Gamma-Quin. En studie viser at behandling med klorokindifosfat ikke endrer erytrocyttens antigenstruktur (12), mens andre igjen viser til studier hvor celler som er behandlet med klorokindifosfat gir svakere reaksjon ved D-typing (13). Det ble observert flest feiltyper etter varmestripping, blant annet falskt positive reaksjoner etter stripping av Cw-negative prøver. Dette samsvarer ikke med andre studier som viser til svakere eller falskt negative reaksjoner for antigenotyping etter behandling med varme (10, 11). Forskjell i rapportert antigenuttrykk etter varmebehandling kan skyldes forskjell i inkubering. Vi inkuberte ved 45 °C i inntil 90 minutter, mens det i andre studier er benyttet 56 °C i 10 minutter.

Ved typing med IAT ble det observert flest falskt positive reaksjoner etter behandling med EGA-kit (tabell 5A). I henhold til Kosanke kan behandling med syre-EDTA føre til svake falskt positive reaksjoner ved antigenotyping (14), mens Horn et al. ikke påviser noen falskt positive reaksjoner etter stripping med EGA-kit, men derimot en falskt negativ reaksjon (15). Det er også kjent at antigenet i Kell-systemet kan bli ødelagt ved behandling med syre-EDTA (13, 14). I denne studien ble det imidlertid observert at D-antigenet for to prøver som var typet svak D-positiv før stripping, ble svekket eller ikke påvist, og at K-antigenet for fire K-positive prøver ble svekket etter stripping med alle tre metodene. Selv om det er utført få typeringer for hvert antigen, viser resultatene at det er viktig å være klar over mulighet for feiltyper etter stripping av cellene.

Sammenligning av metoder for påvisning av alloantistoff i eluat

Det er ikke ønskelig å innføre en metode med høy grad av uspesifikke reaksjoner. Prøvene med falskt positive reaksjoner i tillegg til forventet reaksjon, ble derfor ikke ekskludert, men vurdert som «ikke påvist» for respektiv metode. I våre studier var ELU-kit mest effektiv sammen-

TABELL 2. Sammenligning av metodenes effektivitet. Der det er statistisk signifikant forskjell i effektivitet mellom to metoder er p-verdi uthevet.

A. Metoder for stripping av celler som var positive med direkte antiglobulintest (DAT) (n=54).			
	Forskjell i effektivitet angitt i % (95 %KI) ¹	p-verdi ²	Holm-Bonferroni ³ Kritisk p-verdi
EGA/Varme	19 (-3 til 28)	0,01	0,02
Gamma-Quin/Varme	13 (6 til 31)	0,17	0,03
EGA/Gamme-Quin	6 (-8 til 19)	0,58	0,05

B. Metoder for eluering av alloantistoff innen Rh-, Kell-, Kidd-, Duffy-, MNSs- og Lutheran-systemene (n=51).

	Forskjell i effektivitet angitt i % (95 %KI) ¹	p-verdi ²	Holm-Bonferroni ³ Kritisk p-verdi
ELU/Varme	57 (41-73)	<0,01	0,02
DiaCidel/Varme	35 (17-53)	<0,01	0,03
ELU/DiaCidel	22 (5-38)	0,03	0,05

C. Metoder for eluering av ABO-antistoff (n=52).

	Forskjell i effektivitet angitt i % (95 %KI) ¹	p-verdi ²	Holm-Bonferroni ³ Kritisk p-verdi
Varme 5/Varme 10	33 (15-51)	<0,01	0,01
DiaCidel/Varme 5	2 (-16-20)	1,00	
DiaCidel/ ELU	2 (-16-20)	1,00	
Varme 5/ELU	0 (0-8)	1,00	

1: Forskjell i elueringseffektivitet mellom metodene 2: McNemars test 3: Korrigering for multiple sammenligninger med Holm-Bonferroni, target alfa = 0,05. Varme 5 og Varme 10 = varmeeeluering i henholdsvis 5 og 10 minutter.

TABELL 3. Krysstabeller med sammenlikning av utvalgte metoder. Rød farge viser antall prøver hvor varmebehandling er mer effektiv enn kommersiell metode.

A. Sammenligning av EGA-kit og varmestripping				
		EGA-kit		Total
		Negativ DAT	Positiv DAT	
Varmestripping	Negativ DAT1	21	2	23
	Positiv DAT1	12	19	31
	Total	33	21	54

B. Sammenligning av ELU-kit og varmeeeluering

		ELU-kit		Total
		Ikke påvist antistoff	Påvist antistoff	
Varmeeeluering	Ikke påvist antistoff	4	32	36
	Påvist antistoff	3	12	15
	Total	7	44	51

C. Sammenligning av DiaCidel og varmeeeluering

		DiaCidel		Total
		Ikke påvist antistoff	Påvist antistoff	
Varmeeeluering	Ikke påvist antistoff	8	8	16
	Påvist antistoff	7	29	36
	Total	15	37	52

TABELL 4. Oversikt over antall prøver med samsvarende resultat mellom metodene etter stripping og eluering

A. Stripping (n=54)				
	DAT-negativ med begge metoder	DAT- positiv med begge metoder	Samsvarende resultat Antall (%; 95% KI)	DAT-negativ med en av metodene
EGA-kit/Gamma-Quin	25	16	41 (76, 63-85)	8/5
EGA-kit/Varme	21	19	40 (74, 61-84)	12/2
Gamma-Quin/Varme	17	18	35 (65, 51-76)	13/6
B. Eluering av alloantistoff innen Rh-, Kell-, Kidd-, Duffy-, MNSs- og Lutheran-systemene (n=51).				
	Påvist antistoff med begge metoder	Ikke påvist antistoff med noen metode	Samsvarende resultat Antall (%; 95% KI)	Påvist antistoff med en av metodene
ELU-kit/DiaCidel	28	2	30 (59, 49-68)	16/5
DiaCidel/Varme	11	14	25 (49, 39-59)	22/4
ELU-kit/Varme	12	4	16 (31, 23-41)	32/3
C. Eluering av ABO-antistoff (n=52).				
	Påvist antistoff med begge metoder	Ikke påvist antistoff med noen metode	Samsvarende resultat Antall (%; 95% KI)	Påvist antistoff med en av metodene
DiaCidel/ELU-kit	34	13	47 (90, 82-95)	3/2
DiaCidel/Varme 5	29	8	37 (71, 61-79)	8/7
ELU-kit/Varme 5	27	7	34 (65, 55-74)	9/9
Varme 5/Varme 10	18	15	33 (64, 54-73)	18/1

DAT = Direkte antiglobulin test. Varme 5 og Varme 10 = varmeeluering i henholdsvis 5 og 10 minutter.

TABELL 5. Samsvar mellom antigentyping utført før og etter stripping.

Metode	Saltvannsteknikk		IAT	
	n ¹	Feiltypering ² Antall (%; 95 % KI)	n ¹	Feiltypering ² Antall (%; 95 % KI)
EGA-kit	182	6 (3, 1-9)	199	12 (6, 3-13)
Gamma-Quin	154	1 (1, 0-6)	191	7 (4, 1-10)
Varme	168	14 (8, 4-15)	115	2 (2, 0-7)

1: Totalt antall typer utført etter stripping med hver enkelt metode 2: Antall typer med forskjell i resultat før og etter stripping av antistoff

B. Samsvar i antigentyping mellom metodene etter stripping. Der det er statistisk signifikant forskjell mellom to metoder er p-verdi uthevet.

Metode	n ³	p-verdi ⁴	Holm-Bonferroni ⁵ Kritisk p-verdi	Observert samsvar % (95 % KI) ⁶
Gamma-Quin/Varmes	98	<0,01	0,02	91 (84-95)
Saltvanns-teknikk	EGA-kit/Gamma-Quin	91	0,13	96 (90-99)
	Varme/EGA-kit	140	0,22	96 (90-99)
IAT	Varme/EGA-kit	110	0,63	96 (90-99)
	EGA-kit/Gamma-Quin	150	0,73	95 (86-98)
	Varme/Gamma-Quin	79	1,00	94 (86-98)

3: Antall prøver som var DAT-negative etter stripping med begge metoder 4: McNemars test 5: Korrigering for multiple sammenligninger med Holm-Bonferroni, target alfa = 0,05 6: Observert samsvar mellom metodene for antigentyping etter stripping av antistoff

lignet med de andre metodene som ble undersøkt, med en observert effektivitet på 86 %. Dette samsvarer med funn i andre studier (7). Resultatene bekrefter også her at ingen elueringsmetode er best egnet til å bryte alle typer antigen-antistoff-bindinger. Selv om DiaCidel og varmeeluering er signifikant mindre effektive til å dissosiere antistoff enn ELU-kit, påvises likevel fem antistoff i eluat fra DiaCidel og tre antistoff i eluat fra varmeeluering som ikke blir påvist i eluat fra ELU-kit.

Sammenligning av elueringsmetoder for påvisning av ABO-antistoff

Varmeeluering er antatt å være en egnet metode til eluering av ABO-antistoff (14), men det ble ikke påvist signifikant forskjell mellom eluering med syre-EDTA og varmeeluering med fem minutters inkubering. Det ble påvist falskt positive reaksjoner i eluat for alle metoder. I henhold til Judd (4) vil det ikke være vanskelig å skille mellom en sann positiv reaksjon og en falskt positiv reaksjon i disse tilfellene, da den falskt positive reaksjonen alltid vil være mye svakere. Resultatene i denne studien viser imidlertid at det ikke alltid stemmer. For ti av seksten eluat med falskt positiv reaksjon, var de falskt positive reaksjonene like sterke eller sterkere enn de sanne positive reaksjonene.

Vurdering av klinisk nytteverdi

Klinisk er det flere situasjoner hvor stripping av IgG-antistoff og elueringsstudier kan være nyttige å utføre. Ved å ha metodene tilgjengelig kan man redusere forsinkelse av transfusjonsbehandling, og behovet for genomisk typning hos pasienter med komplekse problemstillinger. Antigentyping inngår i utredning ved flere problemstillinger, og IgG-antistoff bundet til erythrocytter in vivo vil gi falskt positiv reaksjon ved typning med IAT. For å unngå at multitransfunderte pasienter danner alloantistoff av klinisk betydning, bør det gis så typelikt blod som mulig (17). For pasienter med AIHA er det, av samme årsak, anbefalt å type klinisk relevante antigen i blodtypesystemene Rh, K, Duffy, Kidd og MNSs (18, 19). Ved utredning av multiple alloantistoff kan antigentyping brukes til å si noe om hvilke antistoff pasienten kan danne, og hvilke antistoff som kan utelukkes. Også ved alloantistoff er det nyttig å kjenne pasientens Rh-, K- Duffy-, Kidd- og MNSs- ➤

fenotype. Det vil forenkle valg av donorceller, og antall ulike giverceller som brukes til adsorpsjon kan reduseres til én eller to (18, 20). For å identifisere de ulike antistoffene ved multiple alloantistoff kan elueringsstudier benyttes i kombinasjon med adsorpsjon (8, 21). Eluering kan også brukes ved positiv DAT hos nyfødte. For at barnet skal kunne affiseres av antistoff overført fra mor, må barnet ha antigenet som antistoffet er rettet mot. For antigentyping med IAT vil positiv DAT *in vivo* hos barnet normalt føre til falskt positiv reaksjon. Det er imidlertid vist at både anti-D, -K og -Fya kan blokkere tilsvarende antigen på barnets erythrocytter (22-25). Dersom barnet har kliniske symptomer på HSN med positiv DAT, og antigen for aktuelt alloantistoff ikke kan påvises, kan barnets erythrocytter strippest for antistoff før antigentyping utføres.

Studiens styrker og begrensninger

Studiens hovedstyrke er at det er utført en parvis sammenligning av metodene, med identiske prøver, og et høyt antall prøver for hver problemstilling. Sannsynligheten for feil som skyldes person-avhengige variasjoner er redusert ved at en bioingeniør med lang erfaring innen blodtypeserologiske utredninger har utført henholdsvis 89 og 95 % av analyseringen ved de to problemstillingene. Ved gjennomgang av resultatene ser man at enkelte prøver burde vært reanalysert, men fordi resultatene ble vurdert i etterkant, vanligvis dagen etter analysering, var det ikke mulig å gjenta analyseringen. Det burde vært vurdert om det var mer hensiktsmessig å analysere færre prøver, og at prøvene ble satt opp i paralleller for å sikre at tilfeldige feil ikke førte til feil resultat. Det er også mulig at DAT-positive erythrocytter fremstilt *in vitro* kan gi en forskjell i elueringseffektivitet sammenlignet med DAT-positive erythrocytter dannet *in vivo*. Vi har sammenlignet de tre metodene med de samme prøvene for å redusere usikkerheten forbundet med dette. Det kan likevel tenkes at de forskjellige metodene har ulik evne til å eluere antistoff fra DAT-positive erythrocytter fremstilt *in vitro*.

Konklusjon

CE-IVD-sertifiserte elueringskit som er brukt i denne studien er egnet til henholdsvis stripping og eluering av IgG-

antistoff bundet til erythrocytter. Metoder for eluering av antistoff bør inngå i rutine ved utredning av ulike problemstillinger innenfor avansert blodtypeserologi. Studien viser at ingen elueringsmetode er best egnet i alle situasjoner, og alternative metoder bør derfor være tilgjengelige. Det er imidlertid viktig å være klar over muligheten for feiltying, og det bør utføres typing også for andre klinisk viktige antigen enn de som er utført i denne studien. Videre studier kan også se på om forskjell i inkubasjonstemperatur og tid vil kunne påvirke antigentyping. ■

Takk:

Det praktiske arbeidet er utført ved enhet for blodtypeserologi på blodbanken i Arendal, Laboratorieavdelingen, Sørlandet sykehus. Forfatterne ønsker å takke Laboratorieavdelingen i Arendal for tilrettelegging og støtte, slik at det var praktisk mulig å gjennomføre prosjektet.

Interessekonflikter: Ingen oppgitt

Referanser

- Romphruk AV, Simtong P, Butryojantho C, Pimpumee R, Junta N, Srichai S, et al. The prevalence, alloimmunization risk factors, antigenic exposure, and evaluation of antigen-matched red blood cells for thalassemia transfusions: a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Transfusion*. 2019;59(1):177-84.
- Shastri S, Das S. A handy chart for the interpretation of sequential differential adsorption-elution procedure. *Asian J Transfus Sci*. 2017;11(2):77-8.
- Howard PL. Principles of antibody elution. *Transfusion*. 1981;21(5):477-82.
- Judd WJ. Elution – dissociation of antibody from red blood cells: Theoretical and practical considerations. *Transfus Med Rev*. 1999;13(4):297-310.
- Helsedirektoratet. Blodgivning: <https://www.helsedirektoratet.no/tema/blodgivning-og-transfusjonsmedisin> (24. 2. 2024).
- Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41(1):44-9.
- South SF, Rea AE, Tregellas WM. An evaluation of 11 red cell elution procedures. *Transfusion*. 1986;26(2):167-70.
- Hinrichs M, Keith MA. Cold acid elution (ELU Kit II). *Immunohematology*. 2014;30(3):113-6.
- Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist*. 1979;6(2):65-70.
- Katharia R, Chaudhary RK. Removal of antibodies from red cells: Comparison of three elution methods. *Asian J Transfus Sci*. 2013;7(1):29-32.

- Burin des Roziers N, Squalli S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion*. 1997;37(5):497-501.
- Edwards JM, Moulds JJ, Judd WJ. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion*. 1982;22(1):59-61.
- Issitt PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology*. 4 utg. Durham, N.C: Montgomery Scientific Publications; 1998. Kapittel 3, Principles of serological methods; s. 43-69.
- Kosanke J. EDTA glycine acid treatment of red blood cells. *Immunohematology*. 2012;28(3):95-6.
- Horn T, Hamilton J, Kosanke J, Hare VW, Kluver W, Beres W, et al. Assessment of common red blood cell pretreatments to yield an accurate serologic antigen phenotype compared with genotypepredicted phenotype. *Immunohematology*. 2017;33(4):147-51.
- Leger R, Arndt P, Ciesielski D, Garratty G. False-positive eluate reactivity due to the low-ionic wash solution used with commercial acid-elution kits. *Transfusion*. 1998;38(6):565-72.
- Bhuva DK, Vachhani JH. Red cell alloimmunization in repeatedly transfused patients. *Asian J Transfus Sci*. 2017;11(2):115-20.
- Barros MMO, Langhi Jr DM, Bordin JO. Autoimmune hemolytic anemia: transfusion challenges and solutions. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine*. 2017;5:9-18.
- Melve GK, Hervig T, Øvrebø R, Nesthus I. Blodtransfusjon og pretransfusjonsutgreiing ved autoimmun hemolytisk anemi av varmetype. *Tidsskrift Nor Laegeforen*. 2004;22:2918-20.
- Garratty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*. 2002;42(11):1390-2.
- Yazer MH, Triulzi DJ. The role of the elution in antibody investigations. *Transfusion*. 2009;49(11):2395-9.
- Lee E, Cantwell C, Muyibi KO, Modasia R, Rowley M, New H. Blocking phenomenon occurs with murine monoclonal antibodies (anti-Fya) in a neonate with a positive direct antiglobulin test due to maternal anti-Fya. *Blood Transfus*. 2015;13(4):672-4.
- Jain A, Kumawat V, Marwaha N. Blocked D phenomenon and relevance of maternal serologic testing. *Immunohematology*. 2015;31(3):116-8.
- Manfroi S, Velati C. K-antigen blocking in a case of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood transfus*. 2017;15(6):585-6.
- Lein MH. Blokkeringseffekten av maternelt anti-K i svangerskapet. Presentert på Nasjonal Blodbankkonferanse. Trondheim, Norge, 2015.