

4. Laboratoriediagnostik

Blodgruppering och antikroppsscreening vid graviditet

Vid provtagning på mödravårdscentralen för blodgruppering ingår alltid bestämning av ABO och RhD samt antikroppsscreening. Syftet är att identifiera RhD negativa kvinnor som kan bli aktuella för RhD profylax samt att i tid upptäcka kliniskt signifikanta antikroppar mot erythrocytantigen, som kan påverka fostret och det nyfödda barnet och eventuellt orsaka problem vid behov av blodtransfusion till modern eller barnet.

Provet tas vid första besöket eller andra besöket på mödravårdscentralen. Antikroppsscreening rekommenderas att upprepas på alla gravida kvinnor i graviditetsvecka 27-29. För RhD negativa kvinnor bör provet tas så nära som möjligt, innan RhD profylax ges.

Vid antikroppsscreening analyseras den gravida kvinnans plasma mot två till fyra testceller som är speciellt utvalda för att täcka alla kliniskt relevanta erythrocytantigen. Screening görs med indirekt antiglobulinteknik (IAT) i lågjonlösning (LISS) för att påvisa eventuella IgG-antikroppar mot erythrocytantigen, som kvinnan kan ha bildat vid tidigare graviditet eller efter blodtransfusion. Analysen kan utföras med mikrokolonn, solid phase eller rörteknik. Metoderna har olika för- och nackdelar och har något olika sensitivitet, men alla metoder ska vara validerade och relevanta antikroppar ska detekteras. I Sverige är alla transfusionsmedicinska laboratorier ackrediterade och god kunskap om de använda analyserna ska finnas.

Antikropspsidentifiering

Vid positiv antikroppsscreening görs en antikropspsidentifiering och vid konstaterad erythrocyttimmunerisering av klinisk betydelse görs en titerbestämning av antikroppen.

Om den påvisade antikroppen har specificitet anti-D, anti-c eller anti-K ska prov tas på kvinnan för fetal genotypning. Det innebär att man utvinner cellfritt foster-DNA ur kvinnans blod och analyserar det för att påvisa en gen som kvinnan själv saknar (Se nedan, Molekylärbiologisk diagnostik). Vid påvisade antikroppar med annan specificitet kan prov tas på barnafadern för typning av det antigen som kvinnan har antikroppar emot. Man kan då göra en sannolikhetsbedömning av fostrets fenotyp.

Under den fortsatta graviditeten begärs kontrollprover med lämpligt tidsintervall som bestäms utifrån antikroppens specificitet, immuniseringens svårighetsgrad, tidigare immunisering och fostrets förväntade fenotyp/genotyp. Om fostret saknar det aktuella antigenet begärs inget ytterligare kontrollprov utöver det prov som bör ingå i screening i graviditetsvecka 27-29.

För antikropspsidentifiering används oftast primärt samma metod som vid screening men med utökat antal testceller och ofta med förstärkningsmetodik, t.ex. polyethylenglykol (PEG)- eller enzymmetod för att med hög säkerhet påvisa förekomst av en eller flera antikroppar. Det är inte möjligt att säkert skilja ett passivt överfört anti-D efter RhD profylax från ett immun anti-D. Anti-D efter RhD profylax kan påvisas upp till tre månader efter att den tillförts och har initialt en titer på cirka 4,

som successivt klingar av. Om det inte går att konfirmera om det är en immunisering eller passiva antikroppar efter en RhD-profylax som påvisats, så ska RhD profylax rekommenderas på sedvanlig indikation (1). Vid tveksamhet bör man inte svara immun-anti-D, då det kan medföra att kvinnan inte behandlas med RhD profylax fortsättningsvis.

Då det inte är ovanligt att en individ som bildat en antikropp bildar ytterligare antikroppar bör en upprepad fullständig identifiering utföras även i graviditetsvecka 27-29 för att påvisa eventuella nyttillkomna antikroppar.

Titerbestämning och kvantifiering

Semikvantitativ titerbestämning görs med IAT/LISS-teknik med mikrokolonnteknik eller rörteknik. Plasman späds i en geometrisk spädningsserie och varje spädningssteg undersöks med en testerytrocyt som är heterozygot för det antigen kvinnan har antikropp emot. Titern anges som det sista spädningssteget som ger en tydlig positiv reaktion (en 1+ reaktion), exempelvis spädnings 1/64 ger titer 64 (10, 11,12).

En kritisk titer kan variera beroende på teknik och antikroppsspecificitet, men är vanligen 64, med reservation för anti-K och anti-c som kan ge en allvarlig immunisering vid lägre titer. Då titern påverkas av testcellens antigen- uppsättning är det viktigt att samma testcell används varje gång. För signifikant titerförändring krävs minst två titerstegs förändring. Numera görs tritring ofta automatiserat, på blodgrupperinstrument.

Kvantifiering av anti-D kan göras med flödescytometrisk teknik eller med autoanalyser. Kvantifiering görs mot en standardkurva med en känd koncentration och anges i IU/mL eller µg/mL. En studie utförd 2018 av Wikman et al visade att anti-D-kvantifiering är likvärdig med anti-D-titer när det gäller detektion av kritisk antikropps nivå och efterföljande övervakning med ultraljudsmätning av blodflödes hastighet i fostrets a. cerebri media för att följa upp graviditetsimmunisering (2). Kvantifiering av anti-D är tids- och resurskrävande och

kan inte göras akut, och rekommenderas därför inte längre i rutindiagnostik.

Direkt antiglobulin test

Direkt antiglobulin test (DAT) utförs vid blodgruppering på spädbarn eller vid misstanke om HDFN med syftet att påvisa om erytrocyt-antikroppar är bundet till barnets blodkroppar in vivo. Testet kan utföras automatiserat eller manuellt med mikrokolonnteknik eller med rörteknik med anti-human globulin- AHG eller anti-IgG som sätts till de röda blodkropparna. Positiv DAT hos ett nyfött barn betyder att IgG från modern passerat över placenta till barnet och bundit till barnets röda blodkroppar. Antikropparna kan vara ABO-antikroppar, immunantikroppar eller profylax anti-D som modern fick i slutet av graviditeten. Positiv DAT p.g.a. ABO-antikroppar eller immunantikroppar kan innebära en ökad risk för hemolytisk sjukdom medan svag DAT-positivitet p.g.a. profylax anti-D är ofarligt.

Molekylärbiologisk diagnostik

Genotypning av fostrets blodgruppsantigen är indicerat vid potentiellt allvarliga immuniseringar (3). Tidigare användes celler från amniocentes eller chorionvillibiopsi, men invasiv diagnostik medför en risk för komplikationer och kan förvärra immuniseringar och utförs därför endast om det finns en annan indikation. Idag kan genotypning för RHD, RHCE och KEL göras med non-invasiv prenatal diagnostik (NIPD (4)), d.v.s. cellfritt fosterDNA extraheras ur ett blodprov från den gravida kvinnan. Analysen kan utföras med olika PCR metoder. RHDgenen som består av över 400 baspar kan påvisas tidigt, med säker diagnostik från graviditetsvecka 10, medan typning av generna RHCE (övrige Rh antikroppar, t.ex. anti-c, -C, -E) och KEL (anti-K) som ofta har ett baspars skillnad mellan alleler måste göras lite senare (graviditetsvecka 12-16) för säker diagnostik. För att uppnå en säker diagnostik av RHDgenen rekommenderades initialt att man skulle använda kombi-

nationer av exoner, t.ex. 5, 7 och 10. Men även påvisande av en exon, t.ex. exon 4, kan ge hög säkerhet, om man med den valda exonen täcker relevanta varianter av RHD. Fördelen med ett test baserat på en exon är också att tolkning och svarsrutin förenklas (5).

Fetal typning av RHD utförs på de flesta regionblodcentraler, RHc i Lund och KEL i Bristol och Amsterdam, men metoder är under utveckling och kommer sannolikt bli tillgängliga på fler laboratorier. För instruktion om provtagningen kan närmaste universitetslaboratorium kontaktas.

RhD negativ BAS-test för gravida som fått RhD profylax

Alla RhD negativa kvinnor som bär på ett RhD positivt foster, där immunisering mot anti-D inte har kunnat påvisas, ges antenatal RhD profylax i graviditetsvecka 28-30. Det medför dock att BAS-test (Blodgruppskontroll och antikroppsscreening = förenlighetsprovning) kan bli positivt. Det finns därför ett behov av RhD negativa BAS-testceller för att minska antalet positiva BAS-tester, efterföljande serologiska utredningar och för att spara tid i samband med reservation av blod. Enbart RhD negativt blod får lämnas ut på ett RhD negativt BAS-test. Alternativt kan man testa kvinnans plasma mot RhD negativ minipanel eller MG (mottagar-givar test) testa blod i förväg.

Diagnostik av fetomaternell blödning

Vid misstanke på fetomaternell blödning analyseras förekomst av fetala blodkroppar i ett maternellt blodprov. Den tidigare använda Kleihauer-Betke metoden har ersatts av flödescytometrisk analys som har högre sensitivitet och specificitet (6). I metoden används antikropp riktad mot fetalt hemoglobin (HbF), som finns i de röda blodkropparna hos fostret och i små halter även i de röda blodkropparna hos vuxna (så kallade F-celler). Ofta används en kombination med ytterligare en antikropp riktad mot karbanhydras (CA), ett

enzym som endast finns i röda blodkroppar hos vuxna och i fosterceller i ett mycket sent stadium. Detektionsgränsen är ca 1 mL fetalt blod i mammans cirkulation. Referensnivåer varierar mellan olika laboratorier. Analysen finns inte tillgänglig på alla laboratorier. Det lokala laboratoriet kan kontaktas för information om analysen och referensnivåer. Analysen bör oftast beställas med akutsvar för att man ska få svaret inom rimlig tid kliniskt.

Funktionella tester

Vid förekomst av en ovanlig antikropp där den kliniska betydelsen är okänd eller varierande, kan in vitro tester göras för att bedöma antikroppens aktivitet. I dessa tester analyseras nedbrytningen av erythrocyter mantlade med IgG antikroppar från den gravida kvinnan, för att få en uppfattning om risken för hemolys hos fostret. Exempel på sådana analyser är:

- Monocyte Monolayer Assay (MMA) - mäter fagocytos av sensibiliserade erythrocyter av monocyter från perifert blod (7).
- Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) - mäter den antikroppsmedierade frisättningen av inmärkt Cr51 från testblodkroppar som hemolyserats med lymfocyter eller monocyter som effektorceller (8).
- Chemiluminiscens test (CLT) - mäter effektorcellernas adhesion och fagocytos av de IgG mantlade cellerna i närvaro av reagenset lumino (7, 8).

Dessa tester utförs endast vid specialiserade centra nationellt och internationellt. Aktiviteten anges i procent lyserade celler och i svaret ingår en tolkning och referensvärden.

Intrauterina transfusioner

Vid misstanke på fetal anemi remitteras den gravida kvinnan till Centrum för Fostermedicin vid Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm för eventuell intrauterin transfusion (IUT). Erythrocyter identiska med moderns fenogenotyp för relevanta antigen (Rh, K, Jka/b, Fya/b), kompatibla med identifierad antikropp används vid IUT. MG test

mot den gravida kvinnans plasma krävs före transfusionen. Erytrocyterna reserveras på ofött barn (reservnummer) och ska vara fär-ska (< fem dagar), leukocytreducerade och bestrålade. Erytrocyterna suspenderas i kok-salt med ett högt EVF (hematokrit), cirka 0,8. Det är viktigt med information till Trans-fusionsmedicin på Karolinska Universitets-sjukhuset om eventuell IUT så tidigt som möj-ligt, särskilt vid sällsynta blodtyper. När behandling med intrauterina transfusioner har påbörjats görs fortsatta antikroppsanalyser och titerbestämningar vid Transfusionsmedicin, Karolinska Universitetssjukhuset.

FAKTARUTA

- Vid blodgruppering inom mödravår-den ingår ABO- och RhD gruppering samt erytrocytantikropps-screening. (9)
- Vid positiv antikropps-screening utförs antikropps-identifiering och fortsatt provtagning görs efter bedömning av antikroppens kliniska betydelse.
- Identifierade antikroppar titreras (semikvantitativ metod) vid upprepa-de tillfällen under graviditeten. Antikroppstiter och ultraljudsmät-ning av blodflödes-hastighet i fostrets a. cerebri media används för att följa upp graviditets-immunisering.
- Vid allvarliga immuniseringar som kräver behandling med intrauterina transfusioner sköts antikropps-utred-ningar och titreringar vid Transfu-sionsmedicin, Karolinska Universi-tetssjukhuset.

Referenser

1. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, et al. BCSH guide-lines for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion Medicine* 2014; 24:8-20.
2. Wikman A. et al. Anti-D quantification in relation to anti-D titre, middlecerebral artery Doppler measurement and clinical outcome in RhD immunized pregnancies. *Vox Sanguinis* (2018) 113, 779–786.
3. Clausen FB. Integration of noninvasive prenatal prediction of fetal blood group into clinical prenatal care. *Prenat Diagn* 2014; 34:409-15.
4. SBU rapport, Analys av foster-DNA i kvinnans blod: icke-invasiv fosterdiagnostik för blodgrupps- eller könsbestämning
5. Taune Wikman A, Tibblad E, Karlsson A et al. Non-invasive single-exon determination of fetal RHD in a routine screening programme in early pregnancy. *Obstetr Gynecol* 2012 Aug 120; 227-34.
6. Sandler SG, Delaney M, Gottschall JL. Proficiency tests reveal the need to improve laboratory assays for fetomaternal hemorrhage for Rh immunoprophylaxis. *Transfusion* 2013; 53: 2098-102.
7. Arndt PA, Garratty G. A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion* 2004;44:1273-81.
8. Hadley AG. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Transpl Immunol* 2002; 10: 191-8.
9. Handbok för blodcentraler, Svensk förening för Klinisk immunologi och Transfusionsmedicin www.kitm.se