

Udvikling af en flowcytometrisk metode til karakterisering af ABO IgG antistoffer

Forfattere: Delphine Bonneau¹, Grethe Risum Krog¹, Henriette Lorenzen²

¹Klinisk Immunologisk Afdeling, Rigshospitalet, København

²Bioanalytikeruddannelsen, Københavns Professionshøjskole

Introduktion: Med succes af nuværende screeningsprogrammer og indgivelse af RhD profylakse er forekomsten af RhD alloimmunisering faldet fra 15% til 0,1%. ABO uforligelighed er dermed den hyppigste årsag til hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN), men der eksisterer ikke laboratorieanalyser til screening af gravide med risiko for udvikling af ABO-HDFN. Forekomst og betydning af IgG subklasser for anti-A og anti-B er ligeledes ikke undersøgt.

Formål: At udvikle en flowcytometrisk metode til karakterisering af IgG subklasser for anti-A og anti-B i en plasmaprøve fra individer af blodtype O.

Metode: Fikserede erythrocytter med blodtype A og B blev anvendt sammen med mus-anti-human IgG1-3 og anti-mus-PE til udvikling af en flowcytometrisk indirekte metode på BD FACS Canto flowcytometer. Fortynding af mus-anti-human IgG1-3 blev optimeret vha. erythrocytter sensibiliserede med anti-D_{GAN} IgG1-3. Anti-mus-PE anvendtes fortyndet 1:100 uden yderligere optimering. Plasmakontroller og plasmaprøver blev analyseret både uforyndet og fortyndet 1:10. Desuden blev der bestemt specifikke cut-off værdier for hver IgG subklasse vha. 20 plasmaprøver med blodtype AB, både uforyndet og fortyndet 1:10. Resultaterne blev fortolket ved visuel vurdering af rådata, ved beregning af signal-til-støj (S/N) ratio og ved sammenligning med cut-off værdier. Da metoden er semi-kvantitativ blev prøvernes S/N ratio for de enkelte subklasser sammenlignet. Metoden blev afprøvet på seks plasmaprøver med kendt IgG titer for anti-A og anti-B.

Resultat: Histogrammerne viste en tydelig afgrænsning mellem positive IgG sensibiliserede erythrocytter og den negative kontrol. S sammensætningen af anti-A og anti-B IgG subklasser i plasmaprøverne kunne derfor bestemmes. Optimal fortynding for mus-anti-human IgG1 blev fastlagt til 1:100, og for mus-anti-human IgG2 og IgG3 til 1:400. Det blev påvist, at prøver med høj titer gav falske negative resultater, når disse anvendtes ufortyndet. Vi tolkede dette som prozone-effekt, der imidlertid kun blev konstateret for plasmakontroller med meget høj titer. IgG2 anti-A og anti-B blev påvist i alle seks plasmaprøver, i modsætning til anti-A og anti-B af subklasse IgG1 og IgG3, som blev påvist i fem prøver. Ved sammenligningen af prøvernes S/N ratio for de enkelte subklasser blev den mest sandsynlige rækkefølge af de seks prøver beregnet, fra den højeste til den laveste IgG koncentration.

Konklusion: Den udviklede metode kan karakterisere anti-A og anti-B IgG subklasser i plasmaprøver med blodtype O. Metoden er imidlertid tidskrævende og kan derfor ikke anvendes til screening af gravide for risiko for udvikling af ABO-HDFN. Metoden kan derimod anvendes som konfirmatorisk analyse til at give ekstra præcision mht. antistoffer, der er farlige for barnet.