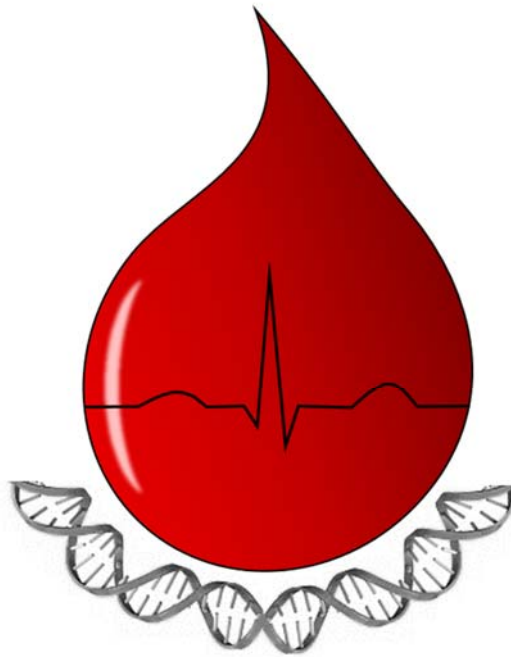




UMEÅ UNIVERSITET



BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Autolog adsorptionsteknik hos nytransfunderad patient med autoantikroppar – en experimentell metodutvärdering

Paulina Andersson

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2018



Examensarbetets engelska titel

Autologus Adsorption Technique in Recently Transfused Patients with
Autoantibodies – an Experimental Method Evaluation

Handledare

Fredrik Toss, Institutionen för Klinisk mikrobiologi/infektion och immunologi

Läroponent: Mattias Forsell

Examinator: Mari Norgren

Datum för godkännande: 2018 06 13

Abstrakt

Denna studie syftar till att utvärdera vilka situationer autoadsorption kan vara lämplig och är baserad på en metod av autoadsorption som används vid Uppsala sjukhus. Metoden utgår från patienter med varm-reaktiva autoantikroppar vilka adsorberas för att detektera eventuella alloantikroppar.

Alloantikroppar detekteras för att förhindra hemolytisk transfusionsreaktion vilket kan vara ett livshotande tillstånd för en patient. Syftet med studien var att undersöka om det är säkert att använda autolog adsorption med polyetylen glykol i gelteknik för användning vid utredning hos nyligt transfunderade DAT-positiva patienter. Adsorption utfördes med lika delar polyetylen glykol, erythrocyter samt antisera och analyserades med indirekt antiglobulin test på gelkort. Förmågan att detektera alloantikroppar var beroende av andel antigenpositiva erythrocyter samt koncentrationen av alloantikroppen. Reaktionsstyrkorna som erhöles från adsorption med endast alloantikropp var högre än adsorptionen som utfördes med en blandning av alloantikropp och autoantikropp. Detta tyder på att adsorptionen av den autologa antikroppen har lyckats. Konklusionen av studien var att metoden fångar de flesta alloantikroppar när andelen antigenpositiva erythrocyter var låg. För att fastställa en lämplig cut-off nivå bör fler studier inom området utföras.

Nyckelord

Alloantikropp, autoantikropp, adsorption, Direkt antiglobulintest (DAT), Indirekt antiglobulintest (IAT), Autoimmun hemolytisk anemi (AIHA)

Introduktion

Transfusion av erythrocyter kräver matchning mellan en givare och en mottagare med avseende på erythrocytantigen. Transfunderas icke-matchade erythrocyter kommer mottagaren bilda alloantikroppar mot de främmande erythrocytantigenen som exponerats för. Detta kan leda till hemolytisk transfusionsreaktion där kroppen bryter ner de givna erythrocyterna då de ses som främmande. Hur farlig en felaktig transfusion blir beror på IgG-klass, subtyp av antikropp som är involverad samt hur stor mängd blod som är givet. Reaktionen är farlig för patienten då den orsakar en systemisk inflammation vilket innebär feber, hypotension samt leukocyt tillströmning från benmärg. Detta leder i sin tur till att adhesionsmolekyler och vävnadsfaktor från endotelceller strömmar till. Neutrofiler aktiveras, proteas frisätts och detta orsakar till sist utöver hemolys även endotelskada. Hemolytisk transfusionsreaktion blir livshotande när kroppen till följd av symptomen går i chock och till sist multiorgansvikt (1). Det finns både intra- och extravasal hemolys. Extravaskulär hemolys sker i mjälten och levern när makrofager fagocyterar erythrocyter helt eller delvis till sfärocyter. Intravaskulär hemolys sker när erythrocyterna förstörs i det intravaskulära utrymmet och hemoglobin frisätts i plasman. Ruptur av erythrocyter startas då av den klassiska komplementkaskaden. Likheter för de två hemolyserna är att fagocytosen leder till bildandet av icke-konjugerat bilirubin. Detta kan sedan konjugeras i levern och vidare utsöndras till gallan. En ökad mängd bilirubin kan bero på hemolys, men också på nedsatt leverfunktion eller hinder för att utsöndra bilirubinet. En konsekvens av intravasal hemolys är fritt hemoglobin i plasma s.k. hemoglobinemi (2-4).

Autoimmun hemolytisk anemi (AIHA) är en sjukdom där autoantikroppar binder till antigen på de egna erythrocyterna, vilket leder till hemolys genom aktivering av komplement och nedbrytning via reticulo-endotelsystemet (5-7). Vid utredning av AIHA tittar man på hemoglobin- och hematokritvärden, antal retikulocyter, morfologi för erythrocyter, bilirubin, haptoglobin samt laktatdehydrogenas- (LDH) nivå (2, 3). Den vanligaste varianten av AIHA är den med varm-reaktiva autoantikroppar som kallas varm autoimmun hemolytisk anemi (WAIHA). Att transfundera en patient med AIHA kan innebära en förhöjd risk för transfusionsreaktioner då autoantikroppar kan maskera förekomst av alloantikroppar (6). Autologa antikroppar bildas mot kroppens egna antigen vilket inte ska ske hos en frisk person men kan uppstå vid en autoimmun sjukdom som följd av bristande tolerans av egna antigen. Autolog adsorption är en metod där man använder sig av patientens egna erythrocyter vid adsorption, vilket gör att det finns risker med att tillämpa denna på patienter vilka fått en transfusion inom de senaste 3 månaderna (8). Detta på grund av att det efter transfusion finns erythrocyter med okänd antigenuppsättning som gör att vi riskerar adsorbiera bort antikroppar med hjälp av dess antigen.

Det är påvisat att så lite som <10% antigenpositiva erythrocyter tar bort alloantikropsreaktivitet (2, 3). Detta till skillnad från allogen adsorption där man använder sig av en panel av fenotypmatchade erythrocyter för att först adsorbiera autoantikropparna och att inte adsorbiera bort alloantikroppar av intresse. Alloantikropparna i serum kan sedan identifieras med en panel. Panelen består av celler med en noga utvald antigenuppsättningsprofil. Denna metod är på så vis användbar när man nyligt blivit transfunderad (9). Vid låga hemoglobinnivåer är blodets syrgastransporterande förmåga nedsatt. Vid AIHA kan transfusion av erythrocyter därför behövas för att minska patientens anemisymptom. För att

möjliggöra en säker transfusion försöker man hitta eventuella alloantikroppar. Som tidigare diskuteras så görs detta vanligen genom en allogen adsorption om patienten transfunderats inom de tre senaste månaderna (6).

Direkt antiglobulintest (DAT) används för att se om celler har blivit täckta med komplement, immunglobuliner eller både och, i en patient. När en DAT utförs på lab kommer en AIHA patient att alltid slå positivt. Det utförs därför alltid vid upptäckt av hemolys hos patienten för att avgöra om denne har en autoimmun hemolytisk anemi, vilket är viktigt att veta inför en transfusion. Sannolikheten att en DAT slår positivt för en patient med hemolytisk anemi är 83% men bara 1,4% hos en patient som inte har sjukdomen (2, 3). Man har även sett ett samband mellan reaktionsstyrkan av DAT och hemolys som sker *in vivo* (7). Sialin-tvättade erythrocyter testas mot antiglobulin-reagens med anti-IgG och anti-C3d. Anledningen att man tvättar erythrocyterna är för att få bort fria plasmaglobuliner och komplement. Resultatet kan bli falskt negativt om reagens fastnar i plasmaglobulinerna. 60% av alla WAIHA patienter har plasmaantikroppar som reagerar med obehandlade sialinsuspenderade erythrocyter. Principen för DAT är att de tunga kedjorna på en antikropp, främst Fc-delen är den mest reaktiva, samt den komplementära delen för komplement. Dessa bildar en bro mellan erythrocyter och därmed sker agglutination av dessa. Styrkan av agglutinationen är proportionell mot mängden bundet protein. Efter tillsats med polyetylen glykol (PEG) syns mer än 90% av dessa plasmaantikroppar (2, 3). Detta är en känslig metod där en positiv DAT kan uppstå redan vid så låga mängder som 500 molekyler IgG/erythrocyt samt upp till 1100 molekyler C3d/erythrocyt, olika resultat beroende på vilka reagenser som använts. En positiv DAT kan vara av intresse vid diagnostik av AIHA. För vidare utredning tittar man även på tidigare graviditet, transfusion samt läkemedel som använts (2, 3). PEG är en vattenlöslig polymer som används vid adsorption och vanliga antikropsutredningar då den ökar aviditet samt affinitet mellan antikroppar och erythrocyter (6, 10). Lösningen är en fosfatbuffrad saltlösning (11). PEG används vid adsorptionen för att förstärka bindningen mellan antigen och antikropp (6).

Vid Uppsala sjukhus används adsorption där metoden utgår från patienter med varm-reaktiva autoantikroppar vilka adsorberas för att detektera alloantikroppar. De delar in patienterna efter hur nyligt de blivit transfunderade <1 mån, 1-2 mån samt 2-3 mån. Deras resultat visar detektion av alloantikroppar i 22% av fallen vilket ger viktig information inför en kommande transfusion med avseende på vilket blod som kan ges. Det negativa med denna studie är att de nyligt transfunderade erythrocyterna kan adsorbera alloantikroppar och därmed ge falskt negativa resultat. I denna studie används en försökspersons blod vilken är (B+, K-, k+). Autoantikropp kommer syfta till anti-D och alloantikropp till Anti-K. Syftet med studien var att undersöka om det är säkert att använda autolog adsorption med PEG i gelteknik för användning vid utredning för transfusion till DAT-positiva patienter (12).

Material och metoder

Patienter

Helblod (B+, K-, k+) från försöksperson taget vid venprovtagning i EDTA-rör på blodcentralen, Norrlands universitetssjukhus (NUS). Givarerythrocyt rr (0-, K+, k+) från en och samma givare taget vid blodgivning på Blodcentralen, Skellefteå sjukhus. Givarerythrocyterna erhöles från leukocytreducerat helblod vilket förvarats i SAGMAN-lösning innehållande salt, adenin, glukos och mannitol vilket hjälper bevara blodet. Anti-K (LOT: 780421, NUS: 060607) samt anti-D (LOT: 900525, NUS: 180122) är båda ospätt humant serum från givare vid Blodcentralen NUS.

Titring i gelteknik

Försökspersonens plasma samt humant anti-K titrerades med 0,8% suspension av testerythrocyt R2R2 (K+, k+) i gelteknik. Gelteknik utförs med IgG-rabbit gelkort (DiaMed, Cressies s/Morat, Schweiz) vilka inkuberas i 15 min vid 37°C och centrifugeras 10 min i gelkortscentrifug. Utifrån titreringen valdes sex spädningar med reaktionsstyrkorna 0; 0,5; 1; 2; 3 och 3-4 mot testerythrocyterna. Spädningarna var 1/1, 1/4, 1/16, 1/64, 1/128 samt 1/256. Avläsningen gick till så att graderingen gjordes visuellt, där en starkare reaktion har en stark agglutination i ett klart övre lager i gelens brunn. En svag reaktion visade lägre agglutination i brunnens botten.

DAT sensibilisering

Försökspersonens erythrocyter tvättades tre gånger genom centrifugering (900 g, 3 min) för att få bort fria plasma-globuliner och komplement och påfyllnad med PBS (fosfatbuffrad 0,9% NaCl). Lika delar tvättade erythrocyter och anti-D inkuberades 60 min vid 37°C. Efter centrifugering sparades supernatant och erythrocyternas tvätt upprepas. En kontroll gjordes genom DAT-specifik gelteknik på gelkort med IgG-rabbit, C3d samt ctl (negativ kontroll).

Autoadsorption med alloerythrocyter av anti-K

Lika delar av försökspersonens titrerade plasma, erythrocytblandning och PEG-lösning inkuberades 15 min vid 37°C. Erythrocytblandningen bestod av 100%, 95%, 90%, 80%, 70% och 50% av försökspersonens egna erythrocyter blandat med givarerythrocyter vilka var positiva för Kell-antigenet. Efter centrifugering vid 1000 g i 5 min separeras supernatanten och pelleten. Supernatanten analyserades med IAT på gelkort som utfördes mot homozygot (K+, k-, D+), heterozygot (K+, k+, D+) och (K-, k+, D+) testcell. Dessa analyser utfördes med 0,8% erythrocytsuspension.

Autoadsorption med alloerythrocyter av anti-K samt anti-D

Anti-K späds med försökspersonens plasma till dubbel koncentration i jämförelse mot föregående steg med autoadsorption med alloerythrocyter. Detta för att en spädning 1/2 sker vid tillsats av extra antikropp. Undantag koncentration 1:1 som inte kan dubbleras. Lika delar av spädd anti-K och anti-D blandades. Antiserablandning, erythrocytblandning samt PEG alla i lika delar blandas och inkuberas 15 min vid 37°C. Respektive supernatant analyseras med IAT på gelkort mot 0,8% suspension av testceller vilka var homozygot (K+, k-, D-), heterozygot (K+, k+, D-), samt (K-, k+, D+) och (K-, k+, D-).

Screen- och panelceller

Supernatanten som erhöles efter autoadsorption med anti-K och anti-D kontrollerades mot fyra screenceller, nio panelceller samt försökspersonens egna erythrocyter, alla som 0,8% erythrocytsuspension med IAT på gelkort. Erythrocytblandning med 95% av försökspersonens erythrocyter användes samt lika delar av anti-K och anti-D, koncentration $\frac{1}{2}$ samt 20% polyethylen glykol PEG (20g PEG-lösning, 100ml PBS) (Blodcentralen, NUS).

Etiska överväganden

Helblod om använts var från student som utfört projektet och som gett sitt medgivande till användning för denna studie. De testceller och eventuell patientplasma som används är från Blodcentralen NUS och används i enlighet med de föreskrifter som gäller. Blodgivaren utsattes inte för några risker utöver provtagningen. Detta är ett kliniskt utvecklingsarbete som därmed ej behöver etikgranskas.

Resultat

Autoadsorption med alloerythrocyter av anti-K

Resultat i form av reaktionsstyrkor erhöles från autoadsorption med IAT-teknik på gelkort. Testcellen som var en negativ kontroll (K-, k+, D+) fick reaktionsstyrka 0 i alla brunnar. Den homozygota testcellen (K+, k-, D+) gav starkast reaktionsstyrkor jämfört mot heterozygoten (K+, k+, D+). Den lägsta antikroppspädningen som gav reaktionsstyrka >0 var 1/16 mot 100% egna erythrocyter. Den lägsta andelen egna erythrocyter var 70% mot koncentration 1/1 av antikroppen. Alla övriga brunnar gav reaktionsstyrka 0 (Tab. 1).

Autoadsorption med alloerythrocyter av anti-K samt anti-D

Testcell (K-, k+, D+) samt (K-, k+, D-) visade reaktionsstyrka 0. Lägsta spädningen av de två antikropparna som gav reaktionsstyrka >0 var 1/16 mot 100% egna erythrocyter. Den lägsta andelen egna erythrocyter var 90% mot koncentration $\frac{1}{2}$ av antikroppspädningen. Alla övriga brunnar gav reaktionsstyrka 0 (Tab. 2).

Screen- och panelceller

Den lägsta andelen av försökspersonens erythrocyter samt svagaste spädning som gett resultat i autoadsorption med alloerythrocyter av anti-K samt anti-D testades mot screen- och panelceller för kontroll av resultat. Negativa resultat erhöles vid 90% och därför gjordes testet på 95% egna erythrocyter. För förväntad reaktionsstyrka 4 (koncentration $\frac{1}{2}$) erhöles reaktionsstyrka 2 vid avläsning av gelkort med IAT-teknik för alla de testceller som förväntades ge en reaktionsstyrka >0, både homo- och heterozygota celler.

Diskussion

I början av projektet utfördes adsorptionen med två antikroppar vilket gav två variabler i förhållande till erythrocytblandningen vilket gjorde resultaten svårtolkade. Studieprotokollet justerades och en antikropp med fast koncentration användes. Ett undantag där metoden inte kunde följas var när koncentrationen skulle dubblas för reaktionsstyrkorna vid autoadsorption med anti-K och anti-D, för att matcha den med endast en antikropp (anti-K). För att erhålla reaktionsstyrka 4 togs koncentration 1/1 men därmed blir den inte dubblad utan $\frac{1}{2}$ vid autoadsorption med anti-K och anti-D.

Erhållna resultaten från adsorption med anti-K visade att den heterozygota testcellen gav svagare reaktionsstyrkor än den homozygota vilket var förväntat. Detta eftersom att det finns fler antigen på erythrocyterna som matchar anti-K och därmed ger större del inbindningar. Det krävs en viss mängd givarerythrocyter och en viss koncentration antikroppar för att få en positiv reaktion. Dessa koncentrationer visar vilken påverkan en viss andel antigenpositiva erythrocyter kan få. Resultaten kan användas för att skatta risken för falskt negativa reaktioner till följd av kvarvarande transfunderade erythrocyter (13). Enligt resultat från denna studie går gränsen för adsorption av anti-D för påvisande av anti-K vid 90% egna erythrocyter samt titer 2 av antikropp. En högre procent givarerythrocyter eller lägre koncentration på antikroppen kan därmed ge falskt negativa resultat.

Resultaten från adsorptionen med anti-K, och anti-K samt anti-D, skiljde sig vid visuell avläsning. Adsorptionen av den autologa antikroppen anti-D anses därför lyckad. Anti-K kunde däremot finnas kvar vid adsorption där de två antikropparna blandades. Detta tyder på att förekomsten av autoantikroppen inte hade någon större inverkan på reaktionerna för alloantikroppen. För att kontrollera resultaten analyserades en panel mot fyra screenceller samt nio panelceller på gelkort med IAT-teknik (14). Först kontrollerades den högsta spädningen med resultat >0 i adsorptionen med två antikroppar vilken var titer 2 samt 90% egna erythrocyter. Detta gav en svaga reaktionsstyrkor och krävde en anpassning till 95 procent. De screen- och panelceller som var K+ gav alla reaktionsstyrka 2 och man kunde därmed bekräfta att anti-K fanns kvar i supernatanten.

Uppsalametoden har ett stort antal antikroppar i sin utredning vilket denna studie inte haft. De använder sig av DAT-positiv plasma som innehåller autoantikroppar, vilket de påvisat med IAT, oberoende av styrkan på DAT (2, 3). I jämförelse har denna studie endast använt en alloantikropp vilket inte ger en lika exakt bild av vad som sker i verkligheten. De utförde totalt 311 autoadsorptioner där 16 patienter nyligt blivit transfunderade. Tre av dessa patienter (18.8%) visade reaktioner för alloantikropparna anti-E, anti-Kell respektive anti-C/-D/-E. För sex (37,5%) av patienterna visade reaktionerna ett bredspektrum av antikroppar och för 7 (43.8%) av patienterna inga reaktioner alls. Detta visar på att Uppsalas metod ger resultat vilka teoretisk kan vara falskt negativa, vilket kräver vidare utveckling av metoden (12).

Resultaten i studien visade att en blandning av erythrocyter gav ett mer exakt resultat än metoden som används i Uppsala. Detta med avseende på hur mycket transfunderat blod som kan störa vid analys. resultat skulle kunna användas för att anpassa adsorption efter patienten utefter hur lång tid det gått

sedan senaste transfusionen. Det fanns en varierade koncentration av erythrocyter föra att efterlikna transfusion i en patient, för att på så vis detektera en gräns för hur stor del transfunderat blod som kan störa en autolog adsorption (2, 3). Adsorptionen av autoantikroppar och detektion av alloantikroppen var lyckad och man kunde följa de ökande reaktionsstyrkorna med minskad mängd transfunderat blod. Konklusionen av studien är att metoden tycks fånga de flesta alloantikroppar när andelen antigenpositiva erythrocyter är låg. För att fastställa en lämplig cut-off bör fler studier inom området utföras.

Tack tillägnas

Jag vill tacka min handledare Fredrik Toss för bra handledning och Fredrik Wastring för teknisk assistans med de laborativa momenten i denna studie. Jag vill även tacka avdelningen för Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin för tillhandahållande av lokaler och material.

Referenser

1. Strobel E. Hemolytic Transfusion Reactions. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(5):346-353.
2. Riktlinjer för autoadsorption inför förenlighetsprovning” (internt dokument ID: AL6626-4)
3. Metodbeskrivning från Uppsala sjukhus: Autoadsorption med PEG” (internt dokument ID: AL6555-4)
4. Eclinpath. Hemolys. <http://www.eclinpath.com/hematology/anemia/mechanisms-of-anemia/extravascular-hemolysis-new/> (180515)
5. Issitt P, Antsee D. 4th ed 1998. *Applied blood group serology*. Durham, N.C. : Montgomery Scientific Publications. ISBN 0-935643-05-2. 175-176, 326-330.
6. Cheng KC, Wong ML, Lee AW. PEG adsorption of autoantibodies and detection of alloantibodies in warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*. 2001;41(1):13-17.
7. R.K. Chaudhary, Sudipta Sekhar Das. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(1):5-12.
8. Chiaroni J, Touinssi M, Mazet M, De Micco P, Ferrera V. Adsorption of autoantibodies in the presence of LISS to detect alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion*. 2003;43(5):651-655.
9. LabCE. Allogeneic adsorption. https://www.labce.com/spg670237_allogeneic_adsorption.aspx (180416)
10. Branch DR, Petz LD. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion*. 1999;39(1):6-10.
11. Das SS, Chaudhary R. Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus*. 2009;7(4):300-304.
12. Lubenow N, Englund Å, Säfwenbergs J. Autoadsorption after recent (< 3 months) transfusion of red cells – review of a five year single centre experience. *Clinical Immunology and Transfusion Medicine*, University Hospital, Uppsala, Sweden.
13. El Kenz H, Efira A, Le PQ, Thiry C, Valsamis J, Azerad MA, Corazza F. Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: how could the blood group genotyping help? *Transl Res*. 2014;163(1):36-42.

14. Dara RC, Tiwari AK, Arora D, Mitra A, Acharya DP, Aggarwal G, Sharma J. Alloimmunization in autoimmune hemolytic anemia patient: The differential adsorption approach. *Asian J Transfus Sci.* 2017;11(1):53-57.

Tabell 1. Reaktionsstyrkor efter autoadsorption med erytrocytblandning.

	Titrerad reaktionsstyrka (anti-K) ^a																	
	0			0,5			1			2			3			4		
	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺
	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻	κ ⁺	κ ⁺	κ ⁻
	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺	D ⁺
Försökspersonens erythrocyter (%) ^b																		
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	2	2	0	4	4	0
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	4	3	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	3	3	0
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Tabellen visar förväntade reaktionsstyrkor 0, 0,5, 1, 2, 3 och 4 vilka motsvarar koncentrationerna 1/1, 1/4, 1/16, 1/64, 1/128 samt 1/256 av alloantikropp anti-K, spädd med försökspersonens plasma vid titrering på gelkort. För varje reaktionsstyrka används 3 stycken panelceller med olika fenotyp.

^b Andel erythrocyter anges i procent där blandningen består av försökspersonens erythrocyter spädda med givarerythrocyter.

^c Resultaten erhöles genom att avläsa reaktionsstyrkor på gelkort vilka analyserats IAT-teknik.

Tabell 2. Reaktionsstyrkor efter autoadsorption med erythrocytblandning.

	Titrerad reaktionsstyrka (anti-K) ^a																							
	0				0,5				1				2				3				4			
	K- K+ D- D+	K+ K- D- D+	K+ K- D+ D-	K+ K- D- D+	K- K+ D- D+	K+ K- D+ D-	K+ K- D- D+	K+ K- D+ D-	K- K+ D- D+	K+ K- D+ D-	K+ K- D- D+	K+ K- D+ D-	K- K+ D- D+	K+ K- D+ D-	K+ K- D- D+	K+ K- D+ D-	K- K+ D- D+	K+ K- D+ D-	K+ K- D- D+	K+ K- D+ D-				
Försökspersonens erythrocyter (%) ^b	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	0	2	2	0	0	3	2	0	0
	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0
	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Tabellen visar förväntade reaktionsstyrkor 0, 0,5, 1, 2, 3 och 4 vilka motsvarar koncentrationerna 1/2, 1/4, 1/16, 1/64, 1/128 samt 1/256 av alloantikropp anti-K spädd med försökspersonens plasma samt autoantikropp anti-D, vid titrering på gelkort. För varje reaktionsstyrka används fyra testceller med olika fenotyp.

^b Andel egna erythrocyter anges i procent där blandningen består av försökspersonens erythrocyter spädda med givarerythrocyter.

^c Resultaten erhöles genom att avläsa reaktionsstyrkor på gelkort vilka analyserats IAT-teknik.