



AF BIOANALYTIKER
BIRGIT K. CHRISTENSEN
SEROLOGILABORATORIET
H:S BLODBANK, RIGSHOSPITALET
EKSAMENSOPGAVE KLINISK IMMUNOLOGI, CVU ØRESUND, 2006
VEJLEDER: SUSANNE EGSTRAND

Hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte pga. erythrocyt allo-antistoffer



Et forslag til retningslinjer og analyser ved mistanke om udvikling af HDFN

I Danmark er der ikke fastsat generelle retningslinjer for, hvornår og hvordan en gravid kvinde, der har dannet irregulære blodtypeantistoffer, bør følges under graviditeten. Det er den enkelte klinisk immunologiske afdeling, der er tilknyttet fødestedet, som bestemmer, hvilke serologiske analyser der bliver udført. Ligesom det er den enkelte obstetriske afdeling, som den gravide er tilknyttet, som bestemmer, hvilke kliniske analyser der bliver udført.

I min opgave har jeg derfor valgt at undersøge, om det vil være muligt at fastsætte specifikke retningslinjer for, hvornår, hvordan og hvor ofte man bør følge den gravide med serologiske og kliniske undersøgelser under graviditeten.

Ifølge min gennemgang af artikler og guidelines er det ikke muligt at fastsætte specifikke grænseværdier for, hvornår der er risiko for hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN) ud fra antistoftiter eller ud fra, hvilket allo-antistof det drejer sig om. Der er nemlig flere forskellige faktorer, som er afgørende for, hvornår et allo-antistof er i stand til at forårsage HDFN.

I stedet har jeg valgt at se på tre forskellige parametre: Jeg har set på faktorer, der er afgørende for udviklingen af HDFN. Jeg har set på anbefalinger fra de anvendte guidelines, artikler og litteratur, og endelig har jeg undersøgt, hvilke allo-antistoffer der har medført intrauterin- og/eller udskiftnings-transfusion på Rigshospitalet. Ud

fra de tre parametre har jeg opstillet nogle retningslinjer for, hvor ofte en gravid bør følges, og en anbefaling af, hvilke analyser det vil være hensigtsmæssigt at udføre ved mistanke om udvikling af HDFN.

HDFN kan have alvorlige konsekvenser

HDFN er en tilstand, der kan opstå, hvis mater har dannet erythrocyt allo-antistoffer, der kan passere placenta. Fostrets erythrocytter vil have en nedsat overlevelse, og dette vil medføre anæmi. Hvis anæmien udvikler sig, vil der kunne opstå væskeophobning, som i værste fald vil medføre Hydrops foetalis. Det vil sige, at hjertet vil forsøge at kompensere for anæmien ved at øge blodvolumenet. Hjertet vil efterhånden blive forstørret, og fostret kan risikere at dø in utero.

I den beskrevne situation vil der kunne påvises frit bilirubin i fostervandet pga. af den øgede erythrocyt-destruktion. Under graviditeten bliver bilirubinen udskilt via mater, men efter fødslen er barnet ikke selv i stand til at udskille bilirubinen, da leveren ikke fungerer optimalt lige efter fødslen. Bilirubinen kan blive aflejret i hjernen, og der kan derfor opstå Kern icterus.

HDFN kan, hvis det opdages i tide, inden fødslen behandles med intrauterin-transfusioner. Efter fødslen behandles HDFN med udskiftnings-transfusioner.

Faktorer med betydning for udvikling HDFN

Ved udvikling af HDFN er der flere faktorer, der har betydning for, hvor alvorlig tilstanden vil udvikle sig. (1)

Koncentrationen af allo-antistoffet hos mater har betydning. I Danmark anvender vi en semi-quantitativ titerbestemmelse, der bliver udført løbende under graviditeten. I England anvendes desuden en kvantitativ koncentrationsbestemmelse (2). Ingen af disse analyser er dog i stand til at forudsige, om der udvikles HDFN. De er vejledende på den måde, at hvis titerværdien/koncentrationen stiger, er der en øget risiko.

En anden vigtig faktor er, hvor effektiv transporten af allo-antistoffet over placenta foregår. Transporten foregår via FcRn receptorer i placenta, starter cirka i uge 20 og vil være fuldt udviklet fra uge 24. Der er en forskel i enkeltindividens FcRn-receptorer, og ikke alle er lige effektive. Her har allo-antistoffets immunglobulinklasse betydning, da eks FcRn-receptoren for transporten af IgG3 er mere effektiv end FcRn-receptoren for IgG1.

Efter at allo-antistoffet har passeret placenta, har udviklingen af antigener hos fostret samt på hvilke celler antigenerne kan påvises, betydning for udviklingen af HDFN.

Fx kan K-antigener påvises på den myeloide stamcelle, der er forstadiet til både erythrocytter og trombocytter. I disse tilfælde vil HDFN derfor skyldes en

undertrykkelse af erythrocytter i selve erythropoiesen, frem for en destruktion af erythrocytter. Der kan være en øget blødningstendens, da produktionen af trombocytter ligeledes vil være undertrykt. Dette har betydning, hvis der foretages invasive indgreb som percutan umbilical cord blood sampling (PUBS).

Glycosylationen af antistoffet menes også at have en betydning for, om fostret udvikler HDFN. Det er blevet vist, at et højt niveau af IgG galactose promoterer K-celle-medieret lyse. Hvis der derfor er bundet meget galactose på IgG-molekylets C α 2-domæne, vil der ske en øget destruktion af erythrocytter.

Modningen af fostrets milt har betydning for selve hæmolysen af erythrocytterne. Fx er receptorerne på makrofager forskellige fra individ til individ med hensyn til, hvor effektive de er til at binde IgG-molekyler. Allerede i uge 22-24 mener man, at de foetale makrofager er i stand til at destruere IgG-sensibiliserede erythrocytter.

Cellulære assays til at måle disse forskellige faktorer er tilgængelige, men de fleste er svære at udføre i praksis og giver ikke et fuldstændigt billede af risikoen for udviklingen af HDFN.

Transfusionsmedicinske guidelines

I litteraturen er der beskrevet over 50 forskellige allo-antistoffer, der har forårsaget HDFN. (3) Det er imidlertid primært anti-D, anti-c og anti-K, der forårsager de alvorlige HDFN, som kræver behandling allerede in utero. Der er derfor udarbejdet guidelines for, hvilke allo-antistoffer der bør følges under graviditeten, samt hvilke analyser der bør udføres.

Oversigt over de anbefalede guidelines tabel 2.

British Committee for Standards in Haematology BCSH (2)

De britiske guidelines anbefaler, at Anti-D, -c og -K skal følges en gang om måneden med en semi-kvantitativ titerbestemmelse samt en kvantitativ koncentrationsbestemmelse indtil uge 28. Derefter hver 14. dag. I tilfældet anti-K behøver man ikke at følge den gravide, hvis man har undersøgt pater og fundet denne K-negativ.

For andre allo-antistoffer anbefaler BSCH titerbestemmelse først i graviditeten og derefter i uge 28. Den kritiske titer værdi er sat til 32. Hvis værdien er 32 eller derover, skal den gravide følges yderligere under graviditeten. Hvis kvinden i en tidligere graviditet har fået påvist

HDFN, følges hun under hele graviditeten.

Til titerbestemmelsen anvendes Indirekte Antiglobulin Test (IAT) med testerythrocytter suspenderet i lav ionstyrke saltvand (LISS), enten i glas, søjleagglutinationskort eller solid phase.

Desuden anbefaler de britiske kliniske immunologer at fænotype pater. Hvis han er heterozygot, anbefaler de, at der bliver udført genomisk typebestemmelse af fostret.

Transfusionsmedicinske standarder (TMS) Danmark (4)

Danmark har ingen specifikke retningslinjer for, hvornår og hvor ofte der bør udføres undersøgelser under graviditeten, og der er ikke fastsat nogen kritisk titer værdi. Allo-antistoffer indenfor Rhesus, Kell, Duffy, Kidd, Ss og Wra nævnes at kunne forårsage HDFN, mens allo-antistoffer indenfor Lutheran, Colton, M, A og B muligvis kan forårsage HDFN. Det bliver foreslået at udføre fænotypebestemmelse af pater ved påvisning af allo-antistoffer og evt. genotypebestemmelse af fostret.

Til titerbestemmelsen skal anvendes en teknik med en følsomhed, som mindst svarer til glasteknik med testerythrocytter suspenderet i LISS efterfulgt af IAT.

K J Moise, Jr., M.D. University of North Carolina USA (3)

De amerikanske guidelines anbefaler, at hvis der påvises allo-antistoffer på første prøve i graviditeten, udføres der semi-kvantitativ titerbestemmelse af antistoffet. Den kritiske titer værdi er sat til 32. Er titer værdien mindre end 32, følges den gravide en gang om måneden indtil uge 24. Derefter følges kvinden hver 14. dag for at kunne opdage en evt. re-immunisering.

Hvis titer værdien er 32 eller mere ved første eller senere undersøgelse, anbefales det at udføre antigenbestemmelse af pater både serologisk og genomisk. Hvis pater er antigen negativ, udføres ingen yderligere undersøgelser. Er pater derimod antigen positiv, heterozygot, eller hvis der er sket en titerstigning på minimum 2 trin, anbefaler de amerikanske guidelines at undersøge fostrets antigenstatus. Er pater homozygot, eller kan antigenet påvises hos fostret, anbefales det at følge den gravide med amnioncentese (måling af bilirubin-koncentrationen) eller Doppler ultralyd (PSV) 1-2 gange om ugen fra uge 24.

Undtaget er gravide kvinder med anti-K, som følges allerede fra en titer værdi på 8. Ellers udføres de samme analyser på pater og evt. foster.

Har der tidligere været påvist HDFN,

følges den gravide under hele graviditeten.

Den serologiske titrering udføres i glas IAT. Der er ikke oplyst suspensionsmedium, men jeg gætter på, at det er LISS som i BSCH guidelines, da de har den samme kritiske titer værdi.

Allo-antistoffer, der har medført behandling i Danmark

I H:S Blodbank, Rigshospitalet, er der i perioden 2001-2005 blevet fulgt 415 gravide med allo-antistoffer, der kan forårsage HDFN. Af disse var 174 anti-D, 39 anti-c samt 54 anti-K enten alene eller i kombination med andre allo-antistoffer. Det er sandsynligt, at HDFN skyldtes henholdsvis anti-D, -c og -K, da titer værdierne for disse var de højeste, hvis der var andre allo-antistoffer til stede. Resten af de 148 gravide er fordelt på andre allo-antistoffer indenfor Rhesus, Fya, Kidd, MS, Lutheran, Wra, Kpa og andre, med hovedvægten indenfor Rhesus, 91 styk.

I samme periode, 2001-2005, er der på Rigshospitalet givet 80 intrauterintransfusioner. En pga. anti-K, titer 256, og tre til samme patient med anti-Fya, titer 128. Begge kvinders børn fik desuden en udskiftningstransfusion efter fødslen.

Resten (dvs. 76) af intrauterintransfusioner er givet til gravide med anti-D, alene eller i kombination med andre antistoffer, hvor titer værdierne for anti-D varierede fra 64 til 32000. Ved titer værdien 64 blev der efter fødslen foretaget 2 udskiftningstransfusioner. De fleste værdier ligger fra 512 og op, og antallet af intrauterintransfusioner varierer fra 1-11 pr. patient. Kvinden, der fik 11 intrauterintransfusioner, havde en titer værdi på 4000, og der blev desuden foretaget en udskiftningstransfusion hos barnet efter fødslen. Se desuden tabel 3.

Ud fra vores resultater er det ikke muligt at udtale sig om, præcis hvornår der skal foretages yderligere undersøgelser. Vi har haft gravide med titer værdier på 2048, hvor vi efter fødslen kunne påvise, at barnet var antigen, og Direkte Antihumanglobulin Test (DAT) positiv, og hvor der ikke er blevet foretaget hverken intrauterin- eller udskiftningstransfusioner.

Når vi udfører titreringer, anvender vi søjleagglutinationskort IAT, og vores værdier ligger derfor højere end de anbefalede i England og USA. Da vi indførte teknikken, udførte vi en afprøvning, der viste, at titer værdier vil være 2-3 trin højere i søjleagglutinationskortene IAT end i vores tidligere anvendte glasteknik IAT. Det svarer fint til,

hvad K J Moise beskriver i de amerikanske guidelines, hvor han henviser til en opgørelse, der viser, at titerværdier vil være 3,4 højere ved brug af IAT(3).

Rigshospitalets obstetriske afdeling har valgt en kritisk titerværdi på 128. Derudover vil vi, hvis det er muligt, udføre serologisk fænotypebestemmelse af pater, da det ud fra fænotypen er muligt at udtale sig om fostrets sandsynligste genotype.

Invasive analyser er erstattet af ultralyd

De tidligere anbefalinger angående HDFN har primært gået på invasive indgreb (3). Man har foretaget amnionsenteser (fostervandsprøver) flere gange under graviditeten for at følge bilirubin-koncentrationen i fostervand, og der er foretaget chorion villus biopsier for at bestemme fostrets genotype.

Begge indgreb medfører en øget risiko for Foeto Maternal Hemorrhage (FMH). Ved amnionsentese er risikoen for FMH på mellem 2 og 11 % (5). Sker dette, vil der være fare for, at mater bliver yderligere immuniseret, og risikoen for udvikling af HDFN vil dermed blive øget.

Ved de invasive indgreb er der desuden en øget risiko for abort. Ved amnionsentese er risikoen på 0,5 %, og der er en øget risiko for andre komplikationer, eks infektion, på 1- 2 % (5).

I dag vælger man hovedsageligt at følge den gravide med Doppler ultralyd (PSV), som er et non-invasivt indgreb, hvor man vha. ultralyd måler blodgennemstrømningen i middel cerebral arterien. Hvis fostret lider af anæmi, vil det prøve at kompensere for blodmanglen ved at øge det blodvolumen, der bliver pumpet ud af hjertet. Samtidig vil anæmien bevirke en lavere blodviskositet, som vil medføre en øget blodgennemstrømning i karbanen. Det er denne øgede gennemstrømning, der kan måles i middel cerebral arterien.

Målinger over 1,5 multiples of the median (MoM) svarer til moderat til

svær anæmi. MoM fra 1,29 til 1,5 svarer til mild anæmi. (3) Se figur 1. Fostre med tegn på Hydrops foetalis kan derfor blive opdaget tidligere ved anvendelse af Doppler ultralyd. Metoden kan anvendes allerede fra uge 18 (3) og indtil uge 35, hvorefter der vil forekomme flere falsk-positive resultater.

Der er fundet en sammenhæng mellem PSV og graden af anæmi. Graden af anæmi blev forudsagt med en følsomhed på 100 % og med en falsk positiv rate på 10 % (3). I et andet studie er sammenhængen 88-100 % (5). Ved at anvende PSV vil man kunne undgå at foretage unødvendige PUBS (5) og dermed nedsætte risikoen for fostret. Op til 70 % af de invasive test vil kunne undgås, hvis fostret følges med PSV (3).

De fostre, der ikke har udviklet Hydrops foetalis, har en bedre overlevelse, hvis man anvender intrauterintransfusioner, end de fostre, som har udviklet Hydrops foetalis. Tallene er 92 % mod 70 % (3). Når man anvender intrauterintransfusioner, undertrykker man fostrets egen erythropoiese. Barnets hæmoglobin vil blive øget pga. tilførslen af de transfunderede erythrocytter, og barnet har derfor ikke behov for selv at øge produktionen. Undertrykkelsen af erythropoiesen vil imidlertid ofte medføre, at barnet efter fødslen har behov for yderligere transfusioner (3).

Anbefaling af retningslinjer og analyser

Ud fra gennemgangen af den anvendte litteratur og mine egne erfaringer mener jeg, at man fremover bør følge gravide med allo-antistoffer efter følgende retningslinjer:

Undersøgelser af moderen

Anti-D, -c og -K bør følges nøje under graviditeten, da det er disse allo-antistoffer, der forårsager de alvorligste HDFN.

Alle andre allo-antistoffer, der kan forårsage HDFN, bør undersøges i begyndelsen af graviditeten, igen i uge 28

og, alt afhængig af titerværdien, igen i uge 35. Er titerværdien mindre end 64, bør det være tilstrækkeligt at undersøge den gravide i uge 28. Der vil dog altid opstå undtagelser. Hvis der fx påvises et sjældent forekommende allo-antistof hos den gravide, vil det være nødvendigt at søge i relevant litteratur for at afgøre, om det pågældende allo-antistof kan forårsage HDFN.

Titerbestemmelse af maters allo-antistof vil også være en god indikator for, om fostret udvikler HDFN. Det vil dog altid kun være en screeningsundersøgelse, da der tidligere er set HDFN pga. af lavt titerede allo-antistoffer. Til gengæld vil en stigning i titeren under graviditeten være et klart tegn på, at mater er blevet re-immuniseret, og at fosteret derfor er antigen-positiv.

Den gravide bør desuden følges løbende under graviditeten med PSV for at få diagnosticeret en begyndende anæmi hos fostret. Ultralydsundersøgelsen har vist sig at være et sikkert og pålideligt redskab. Den er risikofri for fostret og mater i modsætning til den invasive amnionsentese, og den kan med næsten 100 % sikkerhed forudsige graden af anæmi hos fostret ifølge de artikler, jeg har anvendt i projektet.

Undersøgelser af faderen

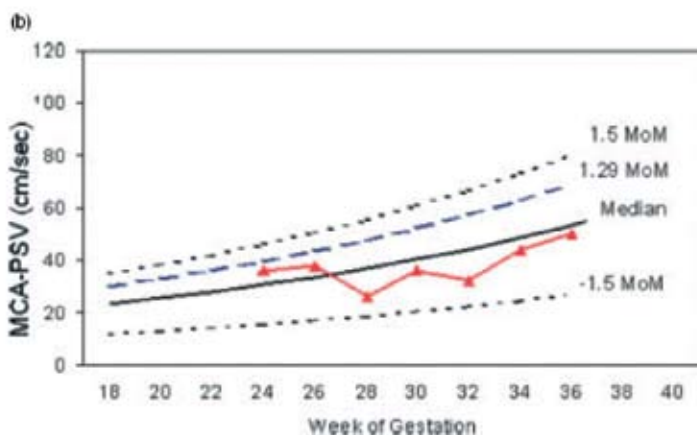
Der bør fortsat udføres serologisk, evt. genomisk, fænotypebestemmelse på den formodede pater, da fænotypebestemmelse af pater er en rimelig god indikator for, om der kan udvikles HDFN eller ej. Er pater antigen-negativ, vil der ikke være risiko for det ventede barn.

Undersøgelser af fostret

Det vil klart være en fordel, at man efterhånden bliver i stand til at bestemme fostrets genotype. Genotypen giver et præcist billede af fostret og vil dermed være den optimale indikator for, om fostret kan udvikle HDFN.

DNA-analyse af amnionvæske kan i dag udføres for RhD, RhC/c, RhE/e, K/k, Jka/Jkb, Fya/Fyb. Det er desuden muligt at udføre test for frit foetalt DNA i maters plasma over for RhD. Test for Kell, RhE og Rhc er ved at blive udviklet. Analyser til undersøgelse af frit foetalt DNA vil være at foretrække, da man undgår de invasive indgreb. (3)

FIGUR 1: MIDDLE CEREBRAL ARTERY PEAK SYSTOLIC VELOCITY (MCA-PSV)



SAMMENLIGNING MELLEM DE BRITISKE, DANSKE OG AMERIKANSKE GUIDELINES

LITTERATURLISTE

- 1: A G Hadley: A comparison of in Vitro Tests for predicting the Severity of Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn. Vox Sanguinis 1998; 74 (Suppl 2): 375-383
- 2: British Committee for Standards in Haematology: Guidelines for blood grouping and antibody testing in pregnancy,
- 3: K J Moise: Red blood cell alloimmunization in pregnancy. Semin Hematol 2005 jul;42 (3): 169-78
- 4: Dansk Selskab for Klinisk Immunologi: Transfusionsmedicinske Standarder, Version 2.3 november 2004, Appendiaks 21 og 22.
- 5: L Pereira, T M Jenkins, V Berghella: Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. American Journal of Obstetrics and Gynecology Volumen 189, Issue 4, okt 2003: 1002-1006.
- 6: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11th edition: kapitel 12.
- 7: H:S Blodbank, Rigshospitalet: optælling af levende fødte børn af immuniserede mødre i perioden 2001-2005.

ORDFORKLARING

Cerebral arterie En af arterierne i fontanellet hos fostret

Chorion villus biopsi Biopsi af moderkagen

FMH Blødning fra foster til mater

HDFN Hemolytic disease of the fetus and newborn

Homozygot Genet er repræsenteret på begge kromosomer

Heterozygot Genet er kun repræsenteret på det ene kromosom

Kritisk titer værdi Den titer-værdi, der er associeret med signifikant risiko for Hydrops foetalis

Intrauterin transfusion Transfusion af friske donor erythrocytter in utero uden det/de antigener, maters antistof er rettet mod

PUBS Blodprøve udtaget fra fosterets navlesnor

PSV Måling af middel cerebral arterie peak

Udskiftningstransfusion Udskiftning af en del af den nyfødtes blodvolumen med friske donor-erythrocytter uden det/de antigener, maters antistof er rettet mod. Samtidig vil der ske en fjernelse af bilirubin samt maters allo-antistof fra barnets cirkulation.

	Anti-D, -c, -K	Andre allo-antistoffer	Kritisk titer værdi	Pater fænotype	Pater heterozygot		
BCSH	Titres 1 gang om måneden indtil uge 28. Derefter hver 14. dag. Kvantitativ koncentrationsbestemmelse	Titres først i graviditeten og i uge 28.	1:32	Ja	Genomisk typning af fostret	Tidlige påvist HDFN eller titer mere end 1:32 følges den gravide under hele graviditeten	Anti-K: er pater K-neg udføres ingen yderligere opfølgning
TMS	Ingen anbefalinger		Ingen	Ja	Genomisk typning af fostret		
K J Moise Jr	Titres 1 gang om måneden indtil uge 24. Derefter hver 14. dag		1:32	Hvis titer er over 1:32 (1:8) serologisk og genomisk	Genomisk typning af fostret	Pater homozygot eller foster antigen-positiv: Amnionsentese eller PSV 1-2 gange om ugen fra uge 24. Foster antigen-negativ: titrering hver 8.-10. uge	

Tabel 2

ANTISTOFFER, DER HAR MEDFØRT BEHANDLING PÅ RIGSHOSPITALET I TIDSRUMMET 2001-2005.

Ved påvisning af flere antistoffer er det titer-værdien for det først nævnte antistof, der er angivet.

Specificitet	Titer-værdi	Antal intrauterin-transfusioner	Antal udskiftningstransfusioner	Kun udskiftningstransfusioner
D	2048 8000 512 8000 4096 4096 1024	1 2 2 4 2 11 3	0 1 1 1 2 1 0	Yderligere 7 er blevet udskiftet en gang, titer-værdier fra 128 - 4096
D + C	1024 4096 4096 16000 4096 64 32000 2048 1024 16000 4096 4096 8000 1024	3 5 2 5 2 1 3 8 1 2 1 1 4 3	1 1 3 0 1 2 1 1 1 1 2 1 2 1	Yderligere 3 heraf er en udskiftet to gange, titer-værdi fra 2048 - 4096
D + C + E	1024	2	1	
D + E	256	1	1	Yderligere 1 er blevet udskiftet en gang, titer-værdi 8000
D + K + C	256 2048	1 1	1 1	
D + K	4000	3	1	
K	256	3	1	
Fy ^a	128	3	1	
D + Jk ^a	4096	0	1	
E	512 128	0 0	1 1	
C	128	0	1	
E + c	16 16	0 0	1 1	Tvillinger

Tabel 3