

Abstracts NVB-Symposium

01 Wetenschappelijk onderzoek

Detectie van donor leukocyte-reactieve antistoffen bij 91 TRALI meldingen: evaluatie van "cellular-based" versus "bead-based" technieken

E.A.M. Beckers¹, L. Porcelijn², D. van Stein³, R.A. Middelburg³,

N.M. Lardy², K. Sintnicolaas⁴, A.Brand³, D.J. van Rhenen⁴

¹Maastricht Universiteits Medisch Centrum, afd. Interne geneeskunde- hematologie

²Sanquin Diagnostiek Amsterdam

³Sanquin-LUMC Jon J. van Rood centrum voor klinisch transfusie onderzoek Leiden

⁴Sanquin Bloed Bank klinisch consultatieve dienst Rotterdam

Inleiding: transfusion-related-acute-lung-injury (TRALI) is een ernstige complicatie bij transfusie. De diagnose wordt klinisch gesteld op basis van consensus criteria. Het aantonen van leukocyte-reactieve antistoffen in betrokken donor(s) ondersteunt de klinische diagnose en definieert een alloïmuun oorzaak voor TRALI. Het management van donors betrokken bij TRALI meldingen is vooral gebaseerd op het wel of niet aantreffen van antistoffen en gericht op secundaire preventie. In dit onderzoek werden "cellular-based" testen vergeleken met "bead-based" technieken om donor antistoffen in TRALI casus aan te tonen.

Materiaal en methoden: Alle donors betrokken bij TRALI meldingen, die voldeden aan de consensus criteria en gerapporteerd aan de Sanquin Bloed Bank in de periode 2005-2009 werden getest met zowel cellular-based technieken: complement dependent cytotoxicity test (CDC); lymfocyten immunofluorescentie test (LIFT); granulocyten agglutinatie test (GAT); granulocyten immunofluorescentie test (GIFT) en MAIGA; en bead-based assays zoals Luminex[®] technologie. Incompatibiliteit van donorantistoffen werd aangetoond ofwel een positieve kruisproef tussen donor's serum en de cellen van de patiënt, ofwel door aantonen van de corresponderende HLA antigenen. HNA antistoffen werden aangetoond door GIFT/GAT/MAIGA mbv uitgetypeerde granulocyten; positieve kruisproeven in GIFT/GAT bewezen incompatibiliteit.

Resultaten: Gedurende 5 jaren werden 91 opeenvolgende TRALI casus onderzocht. In 62 gevallen werden donorantistoffen gevonden; bewezen incompatibiliteit in 44. In totaal waren bij deze meldingen betrokken 451 bloedproducten (ECs, buffycoats of TCs), van 290 mannelijke en 161 vrouwelijke donors. In 43 mannelijke donors en in 75 vrouwelijke donors werden antistoffen aangetoond. 59 hiervan bleken incompatibel (m:v=16:43); in 59 andere donors werden compatibele donorantistoffen geïdentificeerd (m:v=27:32). Incompatibele casus hadden een gemiddeld aantal producten van 7.09 ontvangen; compatibele casus gemiddeld 4.33 en casus zonder antistoffen gemiddeld 2.27. In 5 mannelijke donors werden alleen granulocyte-reactieve antistoffen aangetroffen met GIFT/MAIGA, 5 overige granulocyte-reactieve antistoffen werden gevonden in combinatie met HLA antistoffen (1 man, 4 vrouwen). In de overgrote meerderheid van de gevallen werden HLA antistoffen ontdekt door bead-based assays. Van de in totaal 113 donors met HLA antistoffen werden er 84 alleen ontdekt door bead-based technologie; 17 door zowel cellular-based en bead-based

testen. In 12 donors waren alleen cellular-based testen positief, waarvan 7 met aspecifieke IgM in CDC, 3 met aspecifieke LIFT reactiviteit en 2 met HLA specifieke-CDC resultaten. Positieve resultaten in CDC of LIFT waren meestal niet specifiek voor HLA antistoffen. In 103 donors (m:v=34:69) werden HLA antistoffen geïdentificeerd, overeenkomend met 12% van alle geteste mannelijke en 42% van alle geteste vrouwelijke donors. 59 donors hadden HLA-I antistoffen (m:v=28:31), 20 hadden HLA-II antistoffen (m:v=5:15), en 24 zowel HLA-I als HLA-II (m:v=1:23). **Conclusies:** in 62/91 TRALI casus werden leukocyte-reactieve antistoffen ontdekt in 118 van de 451 betrokken donors. In 44/91 gevallen kon een alloïmuun TRALI worden vastgesteld. Ondanks uitgebreide analyse met gevoelige technieken werden in 25 % van de TRALI casus geen donorantistoffen aangetoond. In deze serie werden 10 granulocyte-reactieve antistoffen gevonden. Bead-based technologie in combinatie met HLA genotypering bleek superieur aan cellular-based testen om antistoffen aan te tonen en incompatibiliteit te bewijzen. HLA-II antistoffen werden in aanzienlijk aantal aangetoond, met name bij vrouwelijke donors. Donors betrokken bij TRALI meldingen tonen een hoger percentage HLA alloïmmunisatie vergeleken met de random donor populatie (ref: Middelburg RA et al. Vox Sang. 2010 Oct 15. Epub ahead of print).

02 Wetenschappelijk onderzoek

Prioritering van opkomende infecties met betrekking tot de potentiële dreiging voor de veiligheid van de bloedtransfusieketen

W. Oei, M.P. Janssen, M. Kretzschmar, J.E. van Steenberghe, C.L. van der Poel

UMC Utrecht, RIVM

Inleiding: Er is in toenemende mate bezorgdheid over opdoemende infectieziekten (Emerging Infectious Diseases, EID's), en in het bijzonder over de vraag in welke mate deze een bedreiging vormen voor de bloedtransfusieketen. In de meeste landen zijn veiligheidsmaatregelen getroffen om de risico's van bloedtransfusie overdraagbare infectieziekten te minimaliseren. Deze maatregelen zijn in sommige gevallen waarschijnlijk maar in beperkte mate afdoende om overdracht van EID's te voorkomen. Maar op welke van de vele EID's moeten we onze aandacht richten?

Doel: Binnen het MITCH (Modelling Infectious diseases in the Transfusion CHain) project is een gereedschap ontwikkeld waarmee EID's op een systematische manier kunnen worden geordend naar hun potentiële bedreiging voor de bloedtransfusieketen.

Methoden: Gepubliceerde vakliteratuur (PubMed) en het internet (Google Scholar) werden doorzocht met de zoekwoorden: emerging infections, Europe, transmission by transfusion, blood safety, screening, tests, and risk model. Daarnaast zijn abstracts van relevante congressen en factsheets over infectieziekten verzameld zoals beschikbaar gesteld op de websites van verschillende volksgezondheids- en bloedtransfusieorganisaties. Uiteindelijk is informatie over zeventig EID's verzameld en beoordeeld. Er zijn acht dimensies geselecteerd die het risico van



overdracht door bloedtransfusie bepalen. Dit zijn: waarschijnlijkheid op ziekteoverdracht door bloedtransfusie, kans op sterfte, de ernst en behandelbaarheid van de ziekte, het bestaan van specifieke screeningsvragen, de beschikbaarheid van een screeningstest, de aanwezigheid en verblijfstijd van een agens in het bloed, en het gemak waarmee het werkzame agens kan worden verwijderd. Elke dimensie wordt afzonderlijk gewogen en gescoord. De totale score per EID wordt vervolgens verkregen door optelling van alle subscores. De tool werd getest voor dertig verschillende combinaties van weegfactoren.

Resultaten: De 15% hoogst scorende EID's zijn geïdentificeerd als hoogste bedreiging voor de bloedtransfusieketen. Acht van deze hoogst scorende ziektes blijken relatief ongevoelig voor de specifieke keuze van de weegfactoren. Dit zijn: vCJD, HIV-varianten, hepatitis E, O-koorts, yersiniosis, babesiosis, humane Afrikaanse trypanosomiasis en West-Nile virusinfecties.

Conclusie: Met behulp van het ontwikkelde gereedschap is het mogelijk EID's te ordenen naar hun potentiële bedreiging voor de bloedtransfusieketen. Dit kan beleidsmakers ondersteunen bij het beoordelen van de adequaatheid van geïmplementeerde veiligheidsmaatregelen.

03 Toegepast onderzoek

Wacht- en doorlooptijden in het donorcentrum

*K. van den Toren, K. Habets, W. Hoekstra, F. Atsma
Sanquin Bloedvoorziening, Nijmegen*

Inleiding: Sanquin streeft ernaar om de wachttijden van donors tot een minimum te beperken en de doorlooptijd van het donatieproces te verkorten. Om een beeld te krijgen van de huidige situatie is er een onderzoek uitgevoerd met een tweeledig doel. Enerzijds het verkrijgen van inzicht in de wacht-, proces- en doorlooptijden van donors, anderzijds het nagaan of de doorlooptijdnorm, waarbij 85% van de volbloeddonors binnen 60 minuten het donatieproces doorloopt, wordt gehaald.

Methode: Het onderzoek is uitgevoerd onder volbloed- en plasmadonors bij 77 afnamelocaties in regio Zuidoost (2009), Noordoost (2010), Zuidwest (2011) en Noordwest (2011). Per regio is middels een enquête de totale doorlooptijd van het donatieproces onderzocht. Daarnaast zijn wachttijden en processtijden van verschillende onderdelen in het donatieproces gemeten. De enquête is door 14065 volbloeddonors en 8876 plasmadonors ingevuld.

Resultaten:

Volbloeddonors

De gemiddeld gemeten doorlooptijd voor volbloeddonors is 43 minuten. Deze doorlooptijd bestaat uit twee onderdelen: de wachttijden en processtijden. In totaal zijn volbloeddonors 16 minuten aan het wachten tijdens het donatieproces, waarvan 3 minuten bij de balie, 8 minuten voor de keuring en 5 minuten voor de donatie. De processtijd bedraagt gemiddeld 27 minuten: over het invullen van het keuringsformulier doen volbloeddonors 5 minuten, de keuring duurt 5 minuten en de donatie zelf 17 minuten. Van de volbloeddonors door-

loopt 91% het donatieproces binnen 60 minuten.

Plasmadonors

De gemiddelde doorlooptijd van plasmadonors is 69 minuten. Plasmadonors wachten bij de balie gemiddeld 3 minuten, voor de keuring 6 minuten en voor de donatie 4 minuten. De totale wachttijd tijdens het donatieproces bedraagt 13 minuten. De processtijd voor plasmadonors bedraagt gemiddeld 58 minuten. Ze zijn 5 minuten bezig met het invullen van het keuringsformulier, 5 minuten met de keuring en 48 minuten met de donatie.

Conclusie: De resultaten maken inzichtelijk dat zowel volbloed- als plasmadonors het langst wachten bij de keuring. Toch wachten plasmadonors minder lang op de keuring dan volbloeddonors. Dit wordt mogelijk verklaard doordat plasmadonors voorrang krijgen bij de keuring op volbloeddonors. Uit het onderzoek blijkt verder dat de doorlooptijdnorm voor volbloeddonors ruimschoots wordt gehaald. Voor plasmadonors bestaat er momenteel nog geen norm. De onderzoeksuitkomsten verschaffen aanknopingspunten voor een nieuw te formuleren doorlooptijdnorm voor plasmadonors.

04 Wetenschappelijk onderzoek

Sociaal cognitieve determinanten van fysieke reacties en stress bij de eerste bloeddonaatie

Anne van Dongen, Sanquin Bloedvoorziening, Nijmegen, Ingrid Veldhuizen, Sanquin Bloedvoorziening, Nijmegen, Charles Abraham, University of Exeter, Exeter, UK, Rob Ruiter, Maastricht University, Maastricht.

Inleiding: Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat veel bloeddonaors minder gaan doneren, of zelfs stoppen met doneren, na het ervaren van een fysieke reactie bij de bloeddonaatie. Bovendien hebben we recentelijk ontdekt dat de subjectieve stress die de donor ervaart bij de reactie veel invloed heeft op het donatiegedrag. We hebben de sociaal cognitieve determinanten van fysieke reacties en subjectieve stress onderzocht bij nieuwe bloeddonaors.

Methoden: We hebben nieuwe donors (N=1783), voor hun eerste donatie, een vragenlijst gestuurd. In deze lijst hebben we zowel gevraagd naar dispositionele factoren (conscientiousness, angst) als sociaal cognitieve factoren (intentie, attitude). Na de eerste donatie hebben we deze donors gevraagd naar fysieke reacties en subjectieve stress.

Resultaten: Uit de analyses is gebleken dat aanprikreacties voorspeld worden door angst (Beta = 1.272, p=.001). Donors met een lagere affectieve attitude (zij die verwachten dat doneren onplezierig gaat zijn) ervaren meer (pre-)syncope reacties zoals misselijkheid en duizeligheid (Beta = .971, p=.002). Donors die angstiger zijn, een lagere affectieve attitude hebben of een hogere conscientiousness score, ervaren meer stress als gevolg van de fysieke reactie (Beta's = .105 - .137, p's<.05).

Conclusie: Door het screenen van nieuwe donors op angst, affectieve attitude en conscientiousness, en het inzetten van interventies bij angstige donors met een lage affectieve attitude en conscientiousness, kunnen we positieve resultaten bereiken bij het behouden van nieuwe bloeddonaors.

05 Wetenschappelijk onderzoek Welke rol spelen psychologische, organisatorische en donatie-gerelateerde factoren in het voorspellen van opkomstgedrag van bloeddonors?

A. Wevers¹, I. Veldhuizen¹, W. de Kort¹, R. van Baaren², D. Wigboldus².

¹Sanquin Research, Afdeling Donorstudies, Nijmegen

²Radboud Universiteit Nijmegen, Sectie sociale- en cultuurpsychologie, Nijmegen

Inleiding: Ongeveer 50% van de donors die in Nederland een oproepkaart ontvangt komt naar de bloedbank om bloed te doneren. Dit onderzoek heeft tot doel het opkomstgedrag van bloeddonors te voorspellen met behulp van psychologische, organisatorische en donatie-gerelateerde factoren. Daarnaast is ook gevraagd hoe donors in de toekomst het liefst opgeroepen willen worden voor een donatie. **Methoden:** Volbloed donors (N=3.000) en plasma donors (N=500) ontvingen een vragenlijst (respons 74%). De vragenlijst bevatte psychologische factoren (bijv. gewoontegedrag), organisatorische factoren (bijv. tevredenheid met de bloedbank), donatie-gerelateerde factoren (bijv. lichamelijke reacties na doneren). Daarnaast werd ook gevraagd naar voorkeuren voor verschillende oproepmethoden. De eerste 457 geretourneerde vragenlijsten van volbloed donors werden geanalyseerd met behulp van bivariate correlaties en t-toetsen.

Voorlopige resultaten: Gewoontegedrag bleek de sterkste positieve correlatie te hebben met opkomstgedrag ($r=.42$).

Donors die veel druk ervaren vanuit de bloedbank om te doneren en donors die angst hebben om te doneren correleren negatief met opkomstgedrag (respectievelijk $r=-.18$ en $r=-.14$), terwijl tevredenheid met de bloedbank positief geassocieerd is ($r=.13$). Donors die vaker een lichamelijke reactie hadden na een donatie, hadden een significant lagere opkomst ($p<.05$).

Ook laten de resultaten zien dat 34% van de donors openstaat voor andere manieren van oproepen (bijv. e-mail of sms). Tevens stelt 44% van de donors het op prijs om in de toekomst een herinnering te krijgen van hun oproep. Echter, 84% van de donors geeft aan geen behoefte te hebben om een afspraak voor donatie op datum en tijd in te plannen.

Discussie: Het is wenselijk dat het geven van bloed een gewoonte wordt in een vroeg stadium van de donorcarrière. Negatieve donatie-ervaringen en angst om te doneren lijken dit proces te verstoren. Daarnaast lijkt het wenselijk om de oproepfrequentie en de manier van oproepen meer af te stemmen op de individuele wensen van de donor. Verdere analyses moet de relatie tussen opkomstgedrag, gewoontegedrag en andere factoren verduidelijken.

06 Wetenschappelijk onderzoek Seizoenspatroon in vingerprik Hb, veneus Hb en het Hematocriet van donoren, gerelateerd aan temperatuur en luchtvochtigheid.

P.C.M. Pasker-de Jong, G. Hetterscheit, W. de Kort, P. van Noord

Sanquin, Research Unit Donorstudies Nijmegen

Achtergrond: Seizoensgebonden fluctuaties bij bloed donoren zijn waargenomen voor Hb in capillair bloed en Ht in twee verschillende bloeddonor studies. Fluctuaties in Hb met lagere waarden in warme perioden zouden het gevolg (kunnen) zijn van verdunnings effecten weerspiegeld in Ht veranderingen die indicatief zijn voor vocht retentie om te kunnen zweten. Beide parameters zijn echter in de studies niet gelijktijdig bij dezelfde donoren gemeten. Dergelijke descriptieve tijdseries laten niet toe een uitspraak te doen over de bovenstaande hypothese. Dit vormde de rationale voor een verdere exploratie.

Methoden: Secundaire analyse van Sysmex cel indices van 1964 Kwaliteits Controle (QC) donaties afgenomen tussen jan 2008 en dec 2009 bij 1246 mannelijke en 718 vrouwelijke donoren en hun capillair bepaalde Haemocue Hb's met focus op de relaties tussen Hb, Ht en MCV gelijktijdig gemeten bij dezelfde donoren. Daarbij is gekeken naar de samenhang met seizoenen, temperatuur en luchtvochtigheid, waarover de data afkomstig zijn van het KNMI. De analyses werden gedaan in SPSS.

Voorlopige resultaten: De relatie van Hemoglobine en seizoen was voor vrouwen anders dan voor mannen. De vrouwen hadden een dip in april en een piek in november, en de mannen een dip in augustus en een piek in mei. Voor Hematocriet was de dip bij beide geslachten in april. Dit viel eveneens samen met het minimum van de relatieve luchtvochtigheid. MCV fluctueerde niet met de seizoenen en was evenmin statistisch significant gerelateerd aan Hb of Ht.

Discussie: Het verschil in seizoensvariatie in Hb tussen mannen en vrouwen is niet simpel te verklaren. De theorie dat een verlaagd Hb in de zomer samenhangt met een verlaagde Hematocriet wordt voor vrouwen in dit onderzoek wel en voor mannen niet echt onderbouwd. Nadere analyses met de gegevens van het KNMI over het weer en meer gedetailleerde voorspellers van Hb zullen op de NVB worden gepresenteerd.

07 Toegepast onderzoek De prevalentie van sub-klinische ijzerdeficienties met verhoogde Zinc ProtoPorphyrine (ZPP) gehalten bij 1500 Eerste Donatie Donors met een normaal Hb.

W. Verhagen, G.Nuboer, G.Hetterscheit, W. de Kort

Sanquin

Achtergrond: Optreden van anemie en sub-klinisch ijzergebrek bij trouwe donors is lang bekend en recent opnieuw bevestigd (de RISE studie) Transfusion 3-2011). In hoeverre sub-klinisch ijzergebrek al bestaat bij Eerste Donatie Donors (EDDonors) is onbekend. Bepalen van de prevalentie van sub-klinisch ijzergebrek mbv Zinc Proto Porphyrine (ZPP) is een manier om dit in kaart te brengen. Normale waarden $25 > ZPP < 60$, indicatie voor subklinisch ijzergebrek bij $ZPP > 80$ micromol/mol heme.

Methoden: Bepaling van ZPP uit het samplezakje van de afnamezak bij voor Hb goedgekeurde EDDonors die vervolgens een volledige eerste



donatie hebben gegeven. Statistisch analyse inclusief exploratie van mogelijk "predictieve" rol van bij aanmelding nu al beschikbare donorkenmerken.

Resultaten: Tussen 10-2009 en 302001 is bij 1500 EDDonors (35% mannen en 65% vrouwen) hun pre-donatie ZPP gehalte bepaald. Gemiddeld ZPP gehalte bij mannen 54,80 (25 - 214) en bij vrouwen 63,57 (25 - 176). Bij 11% van alle voor Hb goedgekeurde EDDonors (4% mannen en 14% vrouwen) werden ZPP waarden van 80 of meer gevonden.

Discussie: De prevalentie vansub-klinisch ijzergebreek bij EDDonors is aanzienlijk. Ze lijkt niet goed voorspelbaar op grond van algemene donorkenmerken. De gevonden prevalenties zijn een onderschatting omdat de studie zich beperkte tot reeds goedgekeurde EDDonos, dwz met normale (capillaire) Hb waarden.

Conclusie: De subgroep EDDonors met verhoogd ZPP lijkt extra aandacht te verdienen aangezien ze een verhoogd risico lopen o.a. om al na de eerste donatie een afkeuring te krijgen voor een te laag Hb. Het lijkt tevens een subgroep met verhoogd risico op (post)-donatie klachten variërend van collaps tijdens en/of meer vermoeidheid etc. na eerste donatie, hetgeen de kans op stoppen met verder donorschap verhoogd. Om dit te voorkomen zou bij het aanmeldingsbezoek naast een bloedgreep ook een ZPP bepaling moeten gebeuren. Daarmee kan bij opkomst voor de eerste donatie, aan deze sub-group EDDonors met verhoogd ZPP extra aandacht gegeven worden.

08 Wetenschappelijk onderzoek

Het Hemoglobinegehalte Hb gemeten in capillair bloed is gemiddeld hoger dan dat gemeten in veneus bloed van eenzelfde volbloed donor.

*M. van Kraaij, G. Nuboer, P.Pasker, H. Geerligts, W. de Kort
Sanquin*

Achtergrond: Donorartsen constateerden in het verleden bij Hb screening hogere capillaire waarden indien bij afkeurtwijfel ook veneus bloed van de donor getest werd. De oorspronkelijke assumptie was dat knippen in de vinger weefselvocht kan bijmengen en dus verdunning veroorzaakt (wat het Ht beïnvloedt) waardoor een capillaire waarde wel lager, maar niet hoger zou kunnen uitvallen dan een veneuze waarde.

Methode: Bij n=1964 QC donaties van 1246 mannen en 718 vrouwen zijn de capillaire screenings Hb, het veneuze Hb, de veneuze Sysmex cel indices (Ht, MCV etc) en de ZPP gehalten vergeleken. Van deze groep zijn ook donorkenmerken bepaald (Leeftijd, geslacht, BMI, geschat bloedvolume, Systole, Diastole, Polsdruk, Mean Arterial Pressure).

Resultaten: Binnen de populatie was er een groep donoren met hogere capillaire dan veneuze Hb waarden (C>Vhb n=1448=74%) een groep met lagere capillaire dan veneuze waarden (C<Vhb n=360 =18% en een groep van n=156 =8% met identieke capillaire en veneuze waarden. Gemiddeld Hb capillair 9,10 versus veneus 8,80 (verschil 0,30 p <0,000). Correlatie capillair Hb en veneus Hb r = 0,79 (p < 0,000). De uni-variate verschillen waren significant voor diverse erythrocyten parameters (Tabel1). Ook WBC aantallen verschilden significant maar niet de plaatjes aantallen het Ht verschil was minimaal en nauwelijks significant.

Van de beschikbare donorkenmerken verschilden alleen lengte en polsdruk niet. Multivariate regressie analyse verklaarde 7% van de variatie in capillair minus veneuze Hb waarden.

Discussie: De resultaten verwerpen een simpele capillaire verdunning hypothese middels verlaging van de haematocrit (Ht). Het grote verschil in aantallen (C>Vhb= 1448 versus C<Vhb = 360) wijst op een systematische verschuiving in de distributies van capillaire Hb waarden tov de distributie van veneus gemeten Hb waarden en niet op random ruis meet effecten.

09 Wetenschappelijk onderzoek

Associatie tussen totaal aantal donaties en sub-klinische atherosclerose in bloeddonors

*K. Peffer¹, Martin den Heijer², Wim de Kort¹, Suzanne Holewijn³,
Jacqueline de Graaf⁴, André Verbeek⁴, Femke Atsma¹*

¹Sanquin Research, Afdeling Donorstudies, Nijmegen

²UMC St Radboud, Afdeling Epidemiologie, Biostatistiek en HTA, Afdeling Endocrinologie, Nijmegen

³UMC St Radboud, Afdeling Endocrinologie, Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Divisie Vasculaire Geneeskunde, Nijmegen

⁴Afdeling Algemeen Interne Geneeskunde, Divisie Vasculaire Geneeskunde, Nijmegen

Inleiding: Men speculeert al decennia lang over een beschermend effect van een verlaagd ijzergehalte op hart- en vaatziekten. Bloeddonors kunnen als gevolg van frequent bloed geven een verlaagd ijzergehalte hebben en zodoende een lager risico op hart- en vaatziekten. In bloed-donors is al eerder een verband gevonden tussen een verlaagd ijzergehalte en een verbeterde vasculaire functie. Echter, epidemiologisch onderzoek onder bloeddonors heeft tot op heden geen uitsluitel kunnen geven over het effect van bloed geven op vasculaire functie. In het huidige onderzoek wordt de relatie tussen totaal aantal donaties en vasculaire functie onderzocht in een substantiële groep bloeddonors.

Methoden: Deelnemers (50-70 jaar) van de Nijmeegse Biomedische Studie, een grootschalig onderzoek uitgevoerd door het Universitair Medisch Centrum Nijmegen, werden uitgenodigd voor de huidige studie. Subklinische atherosclerose werd bepaald aan de hand van Intima Media dikte (IMT), Polsgolfsnelheid (PWV) en de Enkel-Arm Index (ABI). Het cumulatief aantal donaties werd door middel van een vragenlijst verkregen en donors werden vervolgens geclassificeerd als laag-frequent (1 tot 30 donaties) of hoog-frequent (meer dan 30 donaties).

Resultaten: Gegevens afkomstig van 347 volbloed donors werden gebruikt in lineaire regressie (gemiddelde leeftijd 61,4 jaar, 56% man). Gemiddelde verschillen in IMT, PWV en ABI tussen hoog-frequente donors (N=150) en laag-frequente donors (N=197) werden gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, BMI en roken. Hoog-frequente donors hadden een lagere gemiddelde IMT dan laag-frequente donors (-0,022 mm; 95%BI: -0,051 tot 0,007). PWV en ABI waren vergelijkbaar tussen beide groepen (gemiddeld verschil PWV: 0,18 m/s; 95%BI: -0,78 tot 0,41; gemiddeld verschil ABI: 0,01; 95%BI: -0,01 tot 0,03).

Conclusie: Dit onderzoek suggereert een enigszins verbeterde IMT in

hoog-frequente donors ten opzichte van laag-frequente donors. We kunnen echter niet concluderen dat hoog-frequente donors een betere vasculaire functie hebben dan laag-frequente donors, omdat de PWV en de ABI slechts minimaal verschillen.

10 Toegepast onderzoek Implementatie van een vernieuwd coderingssysteem voor registratie van donorcomplicaties en afwijkingen bij procedures

J.C. Wiersum-Osselton, T. Marijt-van der Kreek, R. van Dongen, W de Kort

Sanquin Bloedvoorziening

Inleiding: Een betrouwbare registratie van complicaties van bloedafname is noodzakelijk voor het leveren van goede donorzorg, voor de kwaliteitsbewaking en voor het voldoen aan internationale wetgeving (2005/61/EC). De unit donorzaken van Sanquin Bloedvoorziening heeft een nieuw coderingssysteem geïmplementeerd met als doel de verschillende typen donorcomplicaties beter te kunnen registreren conform internationale definities. Ook was er behoefte aan nieuwe codes voor complicaties van specifieke procedures, zoals bijvoorbeeld immunisaties.

Methoden: Het vernieuwde coderingssysteem is ontworpen om meer relevante (sub) typen van donorcomplicaties met ernstniveau en het moment van optreden (tijdens afname, na afname in de afnamelocatie of na verlaten van de afnamelocatie) te kunnen registreren. Tevens kunnen andere afwijkingen tijdens de procedure worden geregistreerd, waarbij een tweede code wordt toegevoegd als dit resulteert in een donorcomplicatie. Als er geen problemen zijn, wordt dit ook geregistreerd. Omdat voor ernstige complicaties een speciaal afhandelingstraject van toepassing is, worden deze eveneens in het landelijk kwaliteitsstelsel opgenomen. De overgang is per regio doorgevoerd in de eerste helft van 2010.

Resultaten: Medewerkers zijn ingelicht en getraind tijdens werksprekingen en nascholingsbijeenkomsten. Door middel van downloads uit het computersysteem eProgesa zijn maandoverzichten gemaakt, die gebruikt zijn om aan medewerkers terugkoppeling te geven over verkeerd gebruikte codes met het verzoek deze te corrigeren.

Met de nieuwe codes zijn gegevens af te leiden over meer soorten complicaties o.a. flauwvalreacties, arteriële puncties, complicaties van stamcel-donatie en/of van vaccinatie. Jaaroverzichten zijn vervaardigd ten behoeve van kwaliteitsregistraties en beoordeling van mogelijke verbeterpunten zoals optreden van specifieke bedieningsproblemen. Samenvattende resultaten (Tabel) tonen o.a. dat meer donorcomplicaties zijn geregistreerd bij volbloeddonoratie in 2010 dan in 2009. Er bestaat variatie tussen geregistreerde complicaties tussen regio's, die neigt tot afnemen en die doet vermoeden dat er nog enige onderregistratie kan zijn.

Conclusie: De introductie van het vernieuwde systeem en de actieve begeleiding van het proces, zijn gepaard gegaan met een stijging van geregistreerde complicaties van volbloeddonoratie. De verbeterde specificatie van de complicaties biedt mogelijkheden voor analyses ter aansturing van het proces, onderzoek naar methoden om complicaties

te verminderen en internationale vergelijking.

	Aantal afnames	Donor-complicaties totaal (%)	Flauw-vallen tijdens bloedafname (%)	Flauw-vallen na bloedafname (%)	Codes met ernstgraad 2 of hoger
2009, Volbloed	574994	3609 (0,63%)	723 (0,13%)	*	*
2009, Plasmaferese	333722	4304 (1,29%)	203 (0,06%)	*	*
2010, Volbloed	552842	4050 (0,73%)	553 (0,10%)	325 (0,06%)	4
2010, Plasmaferese	345569	4499 (1,30%)	48 (0,01%)	301 (0,09%)	5
* Niet apart gecodeerd					

11 Wetenschappelijk onderzoek Defining the role of Caprin2 in megakaryopoiesis/hematopoiesis

Marjolein Meinders¹, Reinier van der Linden², Sylvia Dekker², Sarah Baxendale³, Anja J. Gerrits¹, Iris M. De Cuyper¹, Alex Maas², John Kong a San², Philip W. Ingham³, Frank Grosveld², Sjaak Philipsen², Timo K. van den Berg¹, Laura Gutiérrez^{1,2}

¹Dept. of Blood Cell Research, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

²Dept. of Cell Biology, ErasmusMC, Rotterdam, The Netherlands.

³Dept. of Biomedical Science, MRC Centre for Developmental and Biomedical Genetics, Sheffield, United Kingdom.

Background: My project focuses on Caprin2, a protein which has a C1q domain, and can heterotrimerise and locate to the cell surface displaying a tumour necrosis factor-like domain. Caprin2 was first described as GCT1 (germ cell tumor 1), a novel gene overexpressed in human testicular seminomas. Soon after, it was reported that Caprin2, this time named EEG1 (embryonic epithelial gene 1), is expressed in erythroid cells and upregulated upon erythroid differentiation. Overexpression of EEG1 leads to a decrease in cell growth rate and apoptosis and recently, there have been two publications linking Caprin2 with canonical Wnt signalling in zebrafish and with FGF signalling in the mouse lens.

Caprin2 is expressed in the hematopoietic system, in the gonads and central nervous system. In our group Caprin2 KO mice have been generated. Preliminary data show that KO mice display higher numbers of red blood cells (similar to erythrocytosis or polycythemia vera) and lower platelet counts. In human, such kinetics and interplay between erythroid and megakaryocytic lineages has been described for a number of mutations (MPL or JAK).

Objectives: In my project I will characterise the role of Caprin2 in hematopoiesis and in particular megakaryopoiesis. We want to know whether the lower platelet counts are due to a direct defect in the megakaryo-



cytic line. We also want to study the function of Caprin2 KO platelets.

Methods and Results: I will look at the hematopoietic and in particular megakaryocytic development of Caprin2 KO mice *in vivo* and *in vivo* cultures by using histology, flowcytometry and molecular biology techniques. I will perform these studies in steady state mice and in mice either treated with thrombopoietin or depleted of platelets. This will allow me to study megakaryopoiesis in normal and stress conditions. Regarding platelet function we have developed in our group platelet aggregation and adhesion tests that will be used with the Caprin2 KO mice under different conditions. I am currently optimising the methodology to be used, and preliminary data will be presented.

12 Wetenschappelijk onderzoek Caprin2, a new player in platelet production

Iris M de Cuyper, Marjolein Meinders, Timo K van den Berg and Laura Gutiérrez

Sanquin Research, Department of Blood Cell Research

Although several proteins have been described to play a role in the differentiation from hematopoietic stem cell to platelet-producing megakaryocytes, much of the molecular mechanisms that regulate this process remain unknown.

In the present study we focus on the role of the cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 2 (Caprin2) in megakaryocyte differentiation and platelet formation. Caprin2 is expressed in the nervous and hematopoietic systems and in the gonads. It was first described as GCT1 (germ cell tumour 1), a novel gene overexpressed in human testicular seminomas. Soon after, expression of Caprin2, this time named EEG1 (embryonic epithelial gene 1) was demonstrated in erythroid cells, where its levels are enhanced upon differentiation.

We have generated Caprin2 deficient mice, which display mild thrombocytopenia linked to increased numbers of red blood cells, implicating Caprin2 in cell fate decision making (M. Meinders, unpublished data). At present we do not know whether this is due to a cell-intrinsic defect or to alterations in the microenvironment

To study the role of Caprin2 in human megakaryopoiesis, we have used DAMI megakaryoblastic leukemia cell line and lentiviral-mediated short-hairpin RNA (shRNA) technology. Knockdown of Caprin2 was confirmed by Western blot and qPCR and resulted in decreased cell proliferation, higher ploidy status and decreased expression levels of several megakaryocytic surface markers (cKit, CD41, CD61, CD63). Levels of GATA1, as well as its target gene cMPL/thrombopoietin receptor, were increased and expression of the antagonizing transcription factor PU.1 was decreased. Preliminary results indicate that phosphorylated retinoblastoma protein (pRB) sequestered by excess GATA1 could be the reason for cell cycle defects and aberrant ploidy status. In addition, the number of CD61/CD41+ platelet-like particles that are shed by mega-

karyocytes were decreased in Caprin2 knockdown cells.

These data suggest that Caprin2 plays a role in megakaryopoiesis and in the production of platelets by megakaryocyte

13 Wetenschappelijk onderzoek Gata1 regulation in dendritic cells

Maaïke R. Scheenstra, Iris M. de Cuyper, Timo K. van den Berg, Laura Gutiérrez

Department of blood cell research, Sanquin.

Dendritic cells (DCs) are key initiators and regulators of the immune system, both priming the immune response and inducing tolerance. Therefore, DCs are a valuable tool for immune therapy against, i.e., tumors, autoimmune diseases, allergies and engraftment rejections. However, the short lifespan of DCs limits the efficacy of their therapeutic application. Two major types of DC have been defined in mouse and human based on differential surface marker expression, origin or function in the immune response: conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC) which rise from DC progenitors. A third type derives from monocytes under inflammatory conditions.

Human cDC are cultured generally from monocytes, which generate mostly inflammatory DCs and do not reflect the steady-state DC subtypes generated *in vivo*. Recently described, human pDCs can be also cultured from monocytes. We are currently optimizing culture methods to obtain both cDCs and pDCs in an "inflammatory unbiased" manner from the monocyte-depleted PBMC or CD34+ fractions. We would like to study the therapeutic efficacy of generated "unbiased-derived" DC vs monocytic-derived DC.

DC commitment, survival and function require orchestrated regulation of transcription. Gata1 is a transcription factor expressed in several hematopoietic lineages and recently found to be important in survival and function of DCs. This makes Gata1 a potent tool for DC manipulation prior to immunotherapy. From other studies on other hematopoietic lineages, the hematopoietic Gata factors (Gata1, Gata2, Gata3) are known to regulate each other's expression (so-named Gata switch). However, it has not been described whether Gata factors do so in DCs. We therefore are currently characterising the expression dynamics of Gata1, Gata2 and Gata3 in mouse and human DCs.

To further analyse the role of Gata1 in dendritic cells *in vivo* we make use of DC-specific Gata1 knockout mice. We plan to study the response of DCs lacking Gata1 during DC development and upon specific immunochallenges. These studies will be paralleled *in vitro* by studying Gata1 loss or gain of function by shRNA or cDNA lentiviral transduction in mouse and human DC. Gata1 interacting partners and target genes will be characterized by immunoprecipitation followed by mass spectrometry or chromatin immunoprecipitation followed by high throughput sequencing, of which preliminary data will be presented.



Schrijven in het TvB

Algemeen

Het Tijdschrift voor Bloedtransfusie (TvB) beoogt op een snelle en goed toegankelijke wijze de actuele ontwikkelingen in de immunohematologie/bloedtransfusie en aanverwante medische vakgebieden te volgen en objectieve informatieverstrekking te waarborgen.

Het TvB is het officiële wetenschappelijke tijdschrift van de Nederlandse Vereniging voor Bloedtransfusie (NVB) en is een praktisch en informatief medisch tijdschrift dat viermaal per jaar verschijnt en via gecontroleerde circulatie kosteloos wordt aangeboden aan de leden van de Nederlandse Vereniging van Bloedtransfusie (NVB) en overige geïnteresseerde specialisten en diegenen in opleiding hiervoor.

De artikelen die worden aangeboden aan TvB, worden beoordeeld door experts (vakgenoten) voor publicatie. De redactie zal na inzending bekijken of uw manuscript qua onderwerp niet recentelijk aan bod is gekomen en aansluit bij de redactionele formule van het tijdschrift, alsmede of het manuscript voldoet aan de auteursrichtlijnen van de rubriek waarvoor u uw manuscript indient. Om de kans van het in behandeling nemen van uw bijdrage zo groot mogelijk te maken, kunt u op onze website via de zoekmachine onder het tijdschrift zelf screenen of het onderwerp van uw bijdrage eventueel dubbeleert met eerdere recent verschenen artikelen.

Het TvB streeft naar actief taalgebruik (bijvoorbeeld: 'Jansen, et al. toonden aan' in plaats van 'Er werd aangetoond'). De wij-vorm dient echter vermeden te worden (dus niet 'Wij toonden aan'). In dat geval wel gebruik maken van de passieve vorm, bijvoorbeeld 'Er werd aangetoond'.

Redactionele format van de diverse rubrieken

1. Overzichtsartikelen en Hemovigilantie

De artikelen in de rubrieken Overzichtsartikelen en Hemovigilantie behandelen nieuwe en bestaande inzichten in de bloedtransfusie en aangrenzende gebieden die klinisch toepasbaar en relevant zijn. Het artikel mag maximaal 2.500 woorden bevatten exclusief 25 referenties.

Opbouw van uw artikel:

1. Titel
2. Samenvatting
3. Trefwoorden
4. Inleiding
5. Bodytekst (graag naar eigen inzicht indelen)
6. Conclusie (hierin geen verwijzingen naar referenties)
7. Aanwijzingen voor de praktijk (praktische 'take home messages', 2 tot 6 punten)
8. Referenties (Vancouverstijl; maximaal 25)
9. Correspondentieadres, titel, geslacht en functie van alle auteurs
10. Disclaimer inzake belangenconflict en financiële ondersteuning door commerciële bedrijven (verklaring of u en/of de coauteurs in het verleden financiële ondersteuning heeft/hebben ontvangen of nog ontvangen van farmaceutische bedrijven, die de neutraliteit van uw bijdrage in het geding kunnen brengen).

2. Casuïstiek

In de rubriek 'Casuïstiek' wordt een patiëntencasus besproken met de belangrijkste aanwijzingen c.q. valkuilen voor de diagnostiek en het te volgen beleid naar de patiënt. Bijdragen voor deze rubriek mogen maximaal 2.000 woorden bevatten, exclusief 15-20 referenties. Uw bijdrage dient opgebouwd te worden zoals beschreven onder de rubriek 'Overzichtsartikelen'.

3. Vraag en antwoord

Deze rubriek behandelt een actuele, praktische vraag over een onderwerp dat relevant is voor de doelgroep van het TvB. Een vraag en het bijbehorende antwoord kunnen worden aangeleverd door een expert die regelmatig een vraag over hetzelfde onderwerp krijgt. De vraag kan ook door een lezer worden ingestuurd naar het redactiesecretariaat (tvb@ariez.nl). Beantwoording vindt dan plaats door een expert van de hoofdredactieraad of een externe expert. Vraag en antwoord mogen maximaal 500 woorden bevatten, exclusief maximaal 10 referenties.

4. Proefschriftbespreking

In deze rubriek worden besprekingen van recent verschenen dissertaties geplaatst. In totaal mag uw bijdrage uit maximaal 1.000 woorden bestaan, exclusief 10 referenties.

De bijdrage dient als volgt gestructureerd te worden:

Nederlandse titel, samenvatting van de gegevens van de promotie (datum van de promotie en aan welke universiteit, namen, titels en locaties van de promotors, uw eigen naam, initialen, geslacht, huidige functie en volledige adresgegevens, disclaimer), bodytekst naar eigen inzicht ingedeeld in diverse hoofdstukken en een conclusie. Indien mogelijk enkele 'Aanwijzingen voor de praktijk'. Bij de proefschriftbespreking wordt een foto van uzelf of van de cover van uw proefschrift geplaatst. Gaarne deze en een exemplaar van uw proefschrift met uw manuscript meezenden.

5. News & views

Nieuws en interessante ontwikkelingen wereldwijd kunnen in deze rubriek worden besproken. De maximale lengte van een bijdrage in deze rubriek is 500 woorden.

6. Mededelingenagenda

De agenda van het TvB staat open voor mededelingen van ziekenhuizen, beroepsverenigingen, congresorganisatiebureaus en onafhankelijke nascholingsinstellingen. In de agenda worden activiteiten van verenigingen en geaccrediteerde bijeenkomsten op het gebied van bloedtransfusie gemeld die relevant zijn voor de lezersgroepen van het TvB. Ook aankondigingen van congressen (lokaal en internationaal), alsmede van geaccrediteerde, regionale nascholingsbijeenkomsten en dergelijke zijn welkom.

7. Lopende studie

In de rubriek 'Lopende studie' wordt één nationale en/of internationale klinische studie beschreven die binnenkort wordt gestart of net is opgestart. Het is mogelijk een oproep voor inclusie van patiënten te plaatsen in het artikel. Studies van de industrie worden niet in deze rubriek geplaatst. Bijdragen voor deze rubriek zijn beperkt tot maximaal 500 woorden, exclusief 10 referenties.

8. Richtlijnen

Deze rubriek, die niet bij elk nummer verschijnt, is bedoeld om nationale en internationale standpunten, richtlijnen en protocollen te behandelen. De inhoud kan variëren van breedgedragen consensusstukken vanuit nationale of internationale verenigingen tot minder formele standpunten en richtlijnen. Bijdragen in deze rubriek zijn bedoeld om de praktiserende arts handvatten te bieden voor zijn of haar klinische denken en handelen. Het artikel mag maximaal 2.500 woorden bevatten, exclusief 25-30 referenties. Uw bijdrage dient opgebouwd te worden zoals beschreven onder de rubriek 'Overzichtsartikelen'.

9. Ingezonden mededelingen

Ingezonden mededelingen mogen maximaal 500 woorden bevatten. Als wordt gereageerd op een TvB-publicatie, dan dient uw reactie uiterlijk 6 weken na het verschijnen binnen te zijn bij het redactiesecretariaat. Tevens dient vermeld te worden op welke eerdere publicatie gereageerd wordt. De hoofdredactieraad en uitgever behouden het recht inzendingen na deze termijn niet te publiceren.

10. Boekbespreking

In deze rubriek worden nieuw verschenen boeken gerecenseerd. De lengte ligt tussen 250 en 500 woorden. Vermeld altijd titel, auteur(s) en uitgever van het besproken boek.

11. Congresverslag

De rubriek 'Congresverslag' staat open voor verslagen van congressen en symposia waarvoor de doelgroep van TvB interessante ontwikkelingen zijn gepresenteerd. Bijdragen mogen maximaal 1.000 woorden bevatten. In uw bijdrage dienen de datum, locatie en officiële titel van het congres te worden vermeld. Verslagen dienen 2 maanden na afloop van een congres binnen te zijn bij het redactiesecretariaat.

12. In memoriam

Deze rubriek staat open voor bijdragen die de geschiedenis van de bloedtransfusie betreffen (personen, gebeurtenissen). Bijdragen mogen maximaal 2.500 woorden inclusief 25 referenties zijn, en dienen te worden opgebouwd zoals beschreven bij de rubriek 'Overzichtsartikelen'.

Illustraties

Illustraties, zoals grafieken, tabellen en foto's zijn van harte welkom. De illustraties dienen digitaal (per e-mail) te worden aangeleverd in TIFF- of JPEG-bestand en dienen minimaal 300 dpi in resolutie te zijn met een afmeting van minimaal 6 x 6 cm of groter. Nummer de illustraties in de volgorde waarin ze in de tekst worden genoemd. Verklaar in de legenda alle symbolen, eenheden en afkortingen die in het figuur worden genoemd.

Referenties

Geef verwijzingen naar de literatuur aan met nummers in de volgorde waarin de verwijzingen in de tekst voorkomen. Verwijzingen die in tabellen en figuurbijschriften voor het eerst voorkomen, krijgen het nummer dat overeenkomt met de eerste plaats in de tekst, waarnaar in de desbetreffende tabel of figuur wordt verwezen. Rangschik de literatuurlijst in overeenstemming met de verwijzingsnummers in de tekst (vanaf nummer 1 olopend). Graag alle verwijzingsnummers in superscript (aan het einde van de zin, na de punt) in de tekst opnemen. Volg a.u.b. onderstaande voorbeeld voor de referenties:

Douwes J, Van Strien R, Doekes G, Smit J, Kerkhof M, Gerritsen J, et al. Does early indoor microbial exposure reduce the risk of asthma? The Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1067-73.

Noem alle auteurs als het er 6 of minder zijn. Indien er 7 of meer auteurs zijn, noem dan alleen de eerste 6 auteurs voluit, gevolgd door ', et al.' Kort tijdschrift-namen af conform de 'Index Medicus'.

De referenties niet opmaken via de voetnootopties of andere macro-opties maar als standaardtekst.

Richtlijnen voor het inzenden van de kopij

Het TvB volgt de uniforme voorschriften voor inzending naar biomedische tijdschriften. Hieronder volgt een samenvatting van de belangrijkste richtlijnen.

De kopij kan per e-mail worden verzonden naar tvb@ariez.nl.

Het artikel dient te worden aangeleverd in Word (versie 6.0 of hoger). Gebruik regelafstand 1,5 en nummer de pagina's van uw bijdrage.

In alle gevallen gaarne meezenden:

1. Correspondentieadres met telefoonnummer en faxnummer waarop de auteur tijdens werkdagen bereikbaar is.
2. Indien uw bijdrage reeds eerder is gepubliceerd of als u van plan bent uw bijdrage in een ander tijdschrift te publiceren of aan een ander tijdschrift aan te bieden, dan stellen wij het op prijs hiervan op de hoogte te worden gesteld.
3. Schriftelijke toestemming van betroffende uitgever(s) of personen voor gebruik van eerder gepubliceerd materiaal en van foto's waarop personen (bijvoorbeeld patiënten) herkenbaar zijn. U dient zelf toestemming bij andere uitgevers aan te vragen voor het gebruik van materiaal uit eerder publicaties.

Writing coach

Om de drempel voor het insturen van artikelen te verlagen, stelt de hoofdredactieraad een zogenoemde "writing coach" beschikbaar. Deze persoon kan helpen/adviseren bij het schrijven van een artikel. Voor meer informatie kunt u contact opnemen met de redactie van het tijdschrift.

Mochten er na het doornemen van deze instructies nog onduidelijkheden zijn, dan kunt u altijd contact opnemen met het redactiesecretariaat.

Redactiesecretariaat Tijdschrift voor Bloedtransfusie

Ariez Publishing
Redactiesecretariaat TvB
T.a.v. Medical Publishing Manager TvB
Nieuweweg 108 A
1531 AH Wormer
Tel.: 075 642 94 20
Fax: 075 642 94 21
E-mailadres: tvb@ariez.nl

14 Wetenschappelijk onderzoek

Critical band 3 multiprotein complex interactions are established early during erythropoiesis

Emile van den Akker^{1,2,3}, Timothy J. Satchwell¹, Geoff Daniels², Kay Ridgwell¹, David J. Anstee² and Ashley M. Toye¹

¹School of Biochemistry, Medical Sciences Building, University Walk, Bristol, U.K.; ²Bristol Institute for Transfusion Sciences, NHS Blood and Transplant, Bristol, U.K.; ³Sanquin research, department of hematopoiesis, Plesmanlaan 125, Amsterdam, The Netherlands

Band 3 forms the core of a large multiprotein complex in the erythrocyte membrane that also includes proteins of the Rhesus complex (Rh and RhAG), here termed the band 3 macrocomplex. Mutations of proteins within this complex can result in hereditary spherocytosis with various severities. The effects of several protein mutations and deficiencies on the band 3 macrocomplex in erythrocytes have been studied in detail. These revealed important functional and structural properties of individual proteins and their relationships with other proteins within the band 3 macrocomplex. Nevertheless, considerably less is known about the mechanisms behind the observed faults within the band 3 macrocomplex. Therefore, attention has to focus on the process of erythropoiesis.

Using confocal microscopy and western blotting, significant pools of intracellular band 3 and RhAG were found in the basophilic normoblast. These intracellular pools gradually decreased in the polychromatic normoblast and were absent or low in the orthochromatic normoblast and reticulocytes. Antibody epitope reappearance experiments after pronase cleavage of intact cells to remove the extracellular epitopes for antibodies detecting band 3 and RhAG combined with cycloheximide treatment, confirmed the presence of these intracellular pools and showed that band 3 and RhAG are synthesized between the early basophilic and polychromatic stage. Immunoprecipitations on cell lysates of cells incubated with pronase revealed that protein 4.2 and band 3 interact in intracellular pools, possibly as early as the ER, and traffick together to the plasmamembrane. Interestingly, although Rh was co-immunoprecipitated with RhAG from the cell membrane and from total cell lysates, we were unable to co-immunoprecipitate Rh with intracellular pools of RhAG. Nevertheless, knockdown of RhAG in differentiating erythroblasts revealed a concomitant drop in Rh but not band 3, revealing that the observed dependency of Rh on RhAG seen in Rhnull syndrome erythrocytes ("Rh regulator type") originates early during erythropoiesis possibly in the plasmamembrane.

In conclusion, we have demonstrated that some of the key interactions within the band 3 macrocomplex occur early during erythroblast differentiation and found the subcellular localisation and kinetics of these interactions during erythropoiesis. Precise knowledge of the timing and localisation of band 3 macrocomplex assembly will allow for the search of mechanisms behind specific mutations causing haemolytic anemia.

15 Wetenschappelijk onderzoek

CD47 acts as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis

Patrick Burger, Petra M. Hilarius, Dirk de Korte, Timo K. van den Berg and Robin van Bruggen

Department of Blood Cell Research, Sanquin Research, Amsterdam, The Netherlands

Old and damaged erythrocytes are cleared in the spleen by red pulp macrophages. Clearance of erythrocytes is believed to be induced by the expression of so-called "eat me" signals such as phosphatidylserine (PS). However, erythrocytes display "don't eat me" signals as well, of which CD47 is the best established. CD47 on the erythrocyte inhibits phagocytosis through interaction with the inhibitory immunoreceptor SIRP α expressed by macrophages. Thus, the CD47-SIRP α interaction is generally believed to be a negative signal for clearance of erythrocytes. However, we report here that CD47-SIRP α interactions may also promote erythrocyte phagocytosis. In particular, CHO cells transfected with full-length SIRP α were shown to bind and phagocytose a proportion of erythrocytes freshly isolated from full blood. This could be prevented by blocking antibodies against CD47 and SIRP α suggesting a role for CD47-SIRP α interactions. To identify which subset of erythrocytes bound to the CHO cells, young and old erythrocytes from whole blood were separated and incubated with the SIRP α -expressing CHO cells. Strikingly, only old erythrocytes bound to the SIRP α -transfected CHO cells.

During ageing circulating erythrocytes accumulate oxidative damage, which leads to conformational changes in certain membrane proteins, such as those of the Band 3 complex that includes CD47 itself as well. In order to investigate this possibility further we induced oxidative damage in erythrocytes by Cu²⁺ treatment and incubated these with CHO-SIRP α cells. Cu²⁺-treated erythrocytes indeed showed strong binding to SIRP α -transfected CHO cells. However, preincubation of the erythrocytes with serum prior to the binding assay was found to be an absolute requirement. Again, binding was strictly CD47 and SIRP α dependent. We hypothesized that a plasma component might opsonize oxidized erythrocytes after which they would bind to SIRP α -transfected CHO cells. A protein that is well-known to interact with CD47 on erythrocytes is thrombospondin-1 (TSP-1). Indeed, when we treated the oxidized erythrocytes with a TSP-1-peptide containing the CD47 binding site a large portion of Cu²⁺-treated erythrocytes bound to CHO-SIRP α cells. Finally, we found that these oxidatively damaged erythrocytes were also recognized and phagocytosed by red pulp macrophages in a TSP-1-dependent manner.

These findings identify a more complex role for CD47-SIRP α interactions in erythrocyte phagocytosis, and likewise *in vivo* clearance, than previously anticipated, with CD47 acting as a molecular switch for controlling erythrocyte phagocytosis.



16 Wetenschappelijk onderzoek Bacterial binding to Complement Receptor 1 on Red Blood Cells

Robin van Bruggen and Timo K. van den Berg

Department of Blood Cell Research, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Complement receptor 1 (CR1, CD35) is a major receptor mediating the recognition and clearance of C3b-opsonized immune complexes and microbes by phagocytes. Interestingly, human red blood cells also express CR1 (also known in this context as the Knops blood group antigen) on their surface. Moreover, the surface levels of CR1 vary considerably among donors. Although the physiological function of red cell CR1 has not been characterized in detail, available evidence suggests that red cell CR1 can mediate complement-independent capture of bacteria and deliver them to macrophages in the spleen.

The primary role of splenic red pulp macrophages is to clear aged red blood cells, but apparently they also have the capacity to selectively engulf bacteria delivered by red cells, leaving the red cells themselves intact. Our aim is to investigate this process in detail, including the mechanism by which the red blood cells recognize bacteria, and subsequently deliver these to the spleen macrophages.

We are developing an assay to monitor binding of *S.aureus* and *E.coli* to red blood cells and to study the role of CR1 and other potential receptors on erythrocytes. Next, we will set up an assay to determine erythrocyte-mediated delivery to macrophages by means of flow cytometry and fluorescence microscopy.

These studies would further support a contribution for red cells to host defense during bacterial infection.

17 Wetenschappelijk onderzoek A novel flow cytometric test to detect (defects in) platelet aggregation

Iris M. De Cuyper, Marjolein Meinders, Dirk de Korte, Leendert Porcelijn, Masja de Haas, Arthur J. Verhoeven, Timo K. van den Berg and Laura Gutiérrez.

Sanquin Research, Amsterdam, the Netherlands

Platelets are the blood cells responsible of maintaining the organism hemostasis. They have been implicated in many processes, however their main function is to provide a basis for blood clotting formation and wound healing. Bleeding disorders summon a wide range of genetic-traits and acquired pathologies whose origin lies on either inefficient platelet production and/or on defective platelet function.

There are different essential aspects of platelet function that can be tested in vitro, i.e. platelet adhesion, activation and aggregation. Adhesion and activation parameters can be extrapolated from a vast batch of tools, such as detection of relevant plasma proteins, measurement of granular content and release, measurement of surface marker expres-

sion and evaluation of signalling pathways. However, the only per se functional platelet tests used up to date are the bleeding time (which is losing popularity) and platelet aggregometry, a test that has major methodological limitations.

Platelet aggregation is routinely measured in an aggregometer, in which both the kinetics and the extent of platelet aggregation can be determined by measuring the decrease in light scatter of a platelet suspension. This test requires normal platelet counts and significant blood sample volumes. This makes it quite difficult, if not impossible, to analyse samples from newborn infants suspected of platelet aggregation defects or from in vitro culture-derived platelets. Regarding studies with small rodents, time-point studies are not possible.

In order to overcome these limitations, we have developed a novel flow cytometry assay that allows the detection of platelet aggregates using minimized blood volumes and low platelet numbers. In brief, (washed) platelets are labelled with two different dyes or surface markers and, after mixing and upon appropriate stimulation, analysed for double-coloured aggregates by flow cytometry. The protocol allows the detection of small aggregates through time after agonist incubation, as opposed to the gross aggregate formation required for the classical aggregometry tests. This characteristic allows sensitive dissection of platelet receptor function when combining agonists and antagonists in the assay. In addition, it makes easier and more affordable the study of the influence of plasma and/or drugs on platelet aggregation. We also present a whole blood aggregation option that can be used with very little blood volumes from rodent models.

Furthermore, in combination with conventional surface marker phenotyping by flow cytometry, this method stands as a promising tool for platelet function diagnosis and studies on animal models.

18 Wetenschappelijk onderzoek Studie naar pH effecten van trombocytenconcentraten gemeten in routine met de BCSI pH1000

M.J. Dijkstra-Tiekstra¹, C. Klein-Bosgoed¹, M. Kraan¹, D. de Korte², J. de Wildt-Eggen¹

¹Sanquin Research, Groningen, ²Sanquin Bloedbank, Amsterdam

Inleiding/doel: De BCSI pH1000 is een apparaat om de pH van trombocytenconcentraten (TCs) te meten op een niet-invasieve manier. De pH bepaling is gebaseerd op een optische meting met een fluorescente kleurstof. Het doel van deze grootschalige studie was het testen van deze BCSI pH1000 in een routine omgeving, waarbij tevens het effect van lage pH37°C (<6,3) op kwaliteit van de TCs, correlatie tussen pH en trombocytenopbrengst in de patiënt en of pH een voorspellende waarde kan zijn voor trombocytenactivatie onderzocht werden.

Methoden: Gedurende 15 maanden (juni 2009-aug 2010) zijn alle TCs in Sanquin bloedbank Groningen in een TC-bewaarsak met de BCSI meetpoort gemaakt. Van alle TCs is op dag 1 een Bact/Alert ingezet. Vanaf dag 2 is de pH dagelijks gemeten door de afdeling uitgifte van Sanquin of door transfusielaboratoria van verschillende ziekenhuizen tot vlak voor transfusie. De trombocytenopbrengst na transfusie (CCI) is

bepaald bij hemato-oncologische patiënten. Alle verlopen TCs (≥ 8 dagen oud) zijn onderzocht op trombocytenactivatie (CD62p expressie en annexine V binding).

Resultaten: Gedurende de studie zijn in totaal 13963 TCs geproduceerd. Het meten van de pH met de BCSI pH1000 was eenvoudig in routine in te passen. Vrijwel alle TCs hadden gedurende de hele bewaarperiode een pH $>7,1$. Er waren slechts 16 TCs met pH $<6,3$. Hiervan hadden er 4 een positieve BacT/Alert, 6 hadden een hoog trombocytenaantal ($>450 \times 10^9$ /TC), 5 metingen waren waarschijnlijk gevolg van een meetfout en er was één TC met lage pH meting door onbekende oorzaak. In deze studie werd door gebrek aan TCs met pH tussen 6,3 en 7,1 ($n=18$ van totaal $n=813$) geen correlatie gevonden tussen pH en trombocytenopbrengst in de patiënt. De pH van dag 7 had geen voorspellende waarde voor CD62p expressie op trombocyten, maar voor annexine V binding leidde een pH $<7,1$ ($n=12$) op dag 7 relatief vaker tot $>30\%$ annexine V binding op dag 9 dan wanneer de pH $\geq 7,1$ ($n=305$) was.

Conclusie/discussie: Meting van pH met de BCSI pH1000 is eenvoudig in routine in te passen. In deze studie zijn zeer weinig TCs met lage pH gevonden. Lage pH lijkt gecorreleerd te zijn aan een positieve BacT/Alert of een hoog trombocytenaantal. Er is geen correlatie gevonden tussen pH en trombocytenopbrengst in de patiënt. Een pH $<7,1$ lijkt een voorspellende waarde te hebben voor een hoge annexine V binding op dag 9. Meer onderzoek met TCs met lage pH is nodig om deze conclusies te bevestigen.

19 Wetenschappelijk onderzoek Ph als voorspellende waarde op kwaliteitsparameters in trombocytenconcentraten

M. Kraan, M.J. Dijkstra-Tiekstra, E. Gkoumassi, A. Setroikromo, J. Slegers-Kühne, J. de Wildt-Eggen
Sanquin Research, Groningen

Inleiding/doel: De kwaliteit van trombocytenconcentraten (TCs) kan door het meten van verschillende parameters beoordeeld worden. De pH is een kwaliteitsparameter welke op een eenvoudige manier gemeten kan worden. In de literatuur is een scoresysteem beschreven om TCs op kwaliteit te beoordelen (Meer et al. Vox Sang 2010; 98, 517-524). Dit systeem maakt gebruik van de CD62p expressie (maat voor activatie, score $<20\%$ 2 punten (p); 20-30% 1p, $>30\%$ 0p), Annexine A5 binding (maat voor apoptose, score $<10\%$ 2p; 10-20% 1p, $>20\%$ 0p) en de concentratie lactaat (metabolisme parameter, score <10 mmol/l 2p; 10-20 mmol/l 1p, >20 mmol/l 0p). Een score 0 staat voor slechte kwaliteit en een score 6 staat voor uitmuntende kwaliteit. Tijdens deze studie werd gekeken of de pH van TCs op dag 5 een voorspellende waarde kan zijn voor de kwaliteit van de TCs op dag 7.

Methode: TCs werden gemaakt van 5 buffycoats en plasma of een synthetische bewaarvloeistof (PAS II T-sol, PAS III Intersol, PAS III m SSP+ en Composol PS) met $n=6$ per bewaarvloeistof. Daarnaast werden er 12 TCs in plasma pathogeen geïnactiveerd met de Mirasol PRT techniek. De TCs werden schuddend bewaard bij kamertemperatuur, op dag 2, 5, en 7 werd getest op pH_{37°C}, CD62p expressie, Annexine A5 binding, lactaat

en swirl.

Resultaten: Zie tabel voor de percentages TCs die binnen de pH ranges aan de gestelde eisen voldoen.

pH range dag 5	n	Dag 7				
		% CD62p expressie $<30\%$	% Annexine A5 binding $<20\%$	% Concentratie lactaat <20 mmol/l	% Swirl ≥ 2	% Score $\geq 3^*$
6,7 - 6,8	1	0	0	0	0	0
6,8 - 6,9	4	0	25	0	75	0
6,9 - 7,0	9	0	11	44	67	0
7,0 - 7,1	5	0	0	100	100	0
7,1 - 7,2	13	38	62	100	100	62
7,2 - 7,3	9	56	67	100	100	67
7,3 - 7,4	1	100	100	100	100	100

* Score volgens Meer et al. Vox Sang 2010; 98, 517-524

Voor CD62p expressie, Annexine A5 binding, lactaatconcentratie en totaal score leidde respectievelijk een pH op dag 5 van $<7,2$; $<7,1$; $<7,0$ en $<7,1$ relatief vaker tot een slecht resultaat. Voor swirl ligt de grens op pH dag 5 $<6,8$.

Conclusie/discussie: Een pH $>7,1$ op dag 5 geeft over het algemeen TCs met acceptabele kwaliteit op dag 7. De voorspellende waarden gevonden tijdens deze studie zijn gebaseerd op de metingen in verschillende bewaarvloeistoffen. Meer experimenten zijn nodig om te testen of de voorspellende waarden voor alle bewaarvloeistoffen gelijk zijn.

20 Wetenschappelijk onderzoek Invloed van de kleur van plasma op de BCSI pH meting

M. Kraan, M.J. Dijkstra-Tiekstra, E. Gkoumassi, A. Setroikromo, J. de Wildt-Eggen
Sanquin Research, Groningen

Inleiding/ doel: De BCSI pH1000 is een pH meter met een pH detectiesysteem om de pH van trombocytenconcentraten (TCs) te meten zonder een monster te nemen. Dit gebeurt via een optische meting door een speciale poort in de BCSI TC bewaarzak die een membraanschijf bevat, geïmpregneerd met een pH gevoelige fluorescente kleurstof. Bij een multicenterstudie is gebleken dat de pH van "bruin" plasma niet in alle gevallen met de BCSI pH1000 te meten was, terwijl de pH meting op de bloedgasmeter (Rapidlab 860) wel een meetbare pH gaf. Tijdens dit onderzoek werd de invloed van de kleur van TCs op de BCSI pH meting onderzocht en de resultaten werden vergeleken met de pH van de Rapidlab.

Methode: Er werden TCs gemaakt van buffycoats en bewaarvloeistof waarbij de bewaarvloeistof bestond uit verschillende verdunningen gekleurd plasma (groen, rood, vet en bruin) verdund met normaal "gekleurd" plasma of PAS II (T-sol). Per kleur zijn er 5 verdunningen in plasma (0; 30; 50; 70; 100% normaal plasma) en 4 verdunningen in PAS II (25; 50; 70; 100% PAS II) gemaakt. De pH werd gemeten op dag 2; 3;



6 en 7 op 3 verschillende BCSI pH1000 meters en de Rapidlab, waarbij een verschil tussen BCSI pH1000 en Rapidlab van 0,16 pH eenheden acceptabel was.

Resultaten: De gemiddelde pH metingen van de 3 BCSI pH1000 meters vielen bij alle verdunningen en kleuren m.u.v. TC in 100% PAS II buiten de eis van verschil $\pm 0,16$ pH eenheid t.o.v. de Rapidlab. Het pH verschil van de BCSI pH1000 t.o.v. Rapidlab was in alle gevallen het kleinst bij verse TCs en het grootst bij TCs vanaf dag 6.

In de tabel wordt het verschil in pH metingen (Rapidlab - BCSI) op dag 7 voor alle kleuren weergegeven.

% plasma (normaal)	Δ Rood	Δ Vet	Δ Groen	Δ Bruin
0	-0,26	-0,28	-0,20	-0,40
30	-0,22	-0,21	-0,18	-0,33
70	-0,18	-0,17	-0,21	-0,26
% PAS II				
25	-0,26	-0,24	-0,21	-0,42
70	-0,20	-0,26	-0,24	-0,33
100	0,00	0,06	0,03	0,08

Bij alle kleurverdunningen kon de pH gemeten worden. Bij de TCs met verdunningen van rood of bruin gekleurd plasma was een trend te zien. Des te hoger het percentage gekleurd plasma, des te groter de gemiddelde afwijking t.o.v. de Rapidlab.

Conclusie/ discussie: Alleen voor TCs met rood of bruin plasma werd een toenemende afwijking gevonden in pH gemeten met de BCSI pH1000 t.o.v. de Rapidlab. Om bovenstaande te verklaren zou meer onderzoek gedaan moeten worden en hierbij zou de mogelijkheid om te kalibreren een rol kunnen spelen.

21 Wetenschappelijk onderzoek Het testen van de robuustheid van de bcsi ph1000 door middel van een rondzending

C. Klein-Bosgoed¹, M.J. Dijkstra-Tiekstra¹, M. Kraan¹, D. de Korte², J. de Wildt-Eggen¹

¹Sanquin Research, Groningen, ²Sanquin Bloedbank, Amsterdam

Inleiding/doel: De BCSI pH 1000 is een apparaat om de pH van trombocytconcentraten (TCs) te meten op een niet-invasieve manier (Transfusion 2009;49:1233-42). De pH bepaling is gebaseerd op een optische meting met een fluorescente kleurstof. Rondzendingen kunnen gebruikt worden om de betrouwbaarheid van apparaten na een initiële validatie te controleren. Het doel was om te onderzoeken of rondzendingen gebruikt kunnen worden om de robuustheid van de BCSI pH1000 te testen.

Methoden: Initieel werden er 12 apparaten gevalideerd door 3 monsters van TCs in plasma in de TC bewaarzak met BCSI meetpoort op ieder apparaat te meten in duplo. Vervolgens werd er iedere drie maanden een rondzending georganiseerd waarbij monsters van 2 TCs op alle apparaten werden gemeten in duplo. De gemiddelde individuele resul-

taten werden vergeleken met de totaal gemiddelden. De robuustheidspecificatie werd gezet op een totaal gemiddelde $\pm 0,06$ pH eenheid. Bij een afwijking van $>0,06$ van het totaal gemiddelde werden er extra testen uitgevoerd om het eerste resultaat te bevestigen of te verwerpen.

Resultaten: Na de validatie voldeden alle apparaten aan de robuustheidspecificatie. Gedurende de rondzendingen werden er voor 3 apparaten een 'buiten specificatie' (BS) resultaat gevonden met een afwijking $>0,06$ pH eenheid (vetgedrukt in de tabel).

Wanneer extra testen de BS resultaten verwierpen zijn apparaten weer vrijgegeven voor verder gebruik. Wanneer extra testen de BS resultaten bevestigden (vetgedrukt en cursief in de tabel) werden de apparaten afgekeurd voor gebruik in routine. Na de 5e afsluitende rondzending zijn geen extra testen meer uitgevoerd om de BS resultaten te bevestigen of verwerpen.

De resultaten, afwijkingen van het totaal gemiddelde in pH eenheden, zijn samengevat in de tabel.

Gebeurtenis [*] → Apparaatnr. ↓	V	R1	R2	R3	R4	R5 [*]
1	0,06	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	0,05
2	0,00	-0,03	0,06	0,03	-0,02	-0,01
3	0,04	0,02	-0,03	-0,02	0,06	-0,04
4	0,02	0,03	-0,03	-0,07	-0,10	-0,10
5	-0,01	-0,01	-0,01	**	0,10	-0,10
6	-0,04	-0,02	0,02	0,08	**	0,10
7	-0,05	-0,02	0,02	0,02	0,06	0,11
8	-0,03	-0,04	**	0,02	0,03	0,08
9	-0,01	-0,03	0,05	0,02	-0,02	0,01
10	0,01	0,04	-0,06	-0,03	-0,06	-0,01
11	0,05	**	**	**	0,01	-0,04
12	-0,03	0,07	**	-0,05	-0,06	-0,06

* V: Validatie, R: Rondzending, ** Niet uitgevoerd.

Conclusie/discussie: Een rondzending kan gebruikt worden om BS resultaten te vinden en daardoor de robuustheid van de BCSI pH1000 na initiële validatie te testen.

22 Wetenschappelijk onderzoek Evaluatie van automatische volbloed scheiding met de multi-unit processor Massive

J. Lagerberg, IJ Bontekoe, PF van der Meer, D de Korte

Product en Proces Ontwikkeling, Sanquin Bloedbank, Amsterdam

Inleiding: In het routine bloedbankproces wordt vol bloed (VB) gescheiden in componenten door middel van een halfautomatisch en arbeidsintensief twee-staps proces. Na een centrifugerun volgt aansluitend bewerking tot componenten op een scheidingsapparaat. CaridianBCT heeft een apparaat ontwikkeld, dat de verschillende stappen, centrifugeren, overpersen en lassen, kan uitvoeren met 4 VB tegelijk. Wij testten een prototype van het "Massive whole blood pro-

cessing system", uitgerust met een twee-componentenprogramma (2C, plasma + rode celconcentraat (RCC)).

Doel: Het doel van deze studie was het evalueren van de kwaliteit van componenten gemaakt met de Massive in vergelijking tot componenten gemaakt uit standaard bewerkt VB.

Methode: VB (500 ml) werd, na toestemming van de donor, afgenomen in 70 ml CPD in het standaardafname systeem. Na overnacht bewaren (20–24°C) werden de Massive-sets gevuld met 480–540 ml VB (inclusief CPD) en bewerkt tot plasma, RCC en een restproduct. De RCCs werden geresuspendeerd in SAGM, leukocyten verwijderd en gedurende 42 dagen bewaard bij 2–6°C. *In vitro* kwaliteitsparameters van plasma (direct na bereiding) en RCCs (tijdens bewaren) werden bepaald. Van het restproduct werd de cellulaire samenstelling bepaald.

Resultaten: De Massive procedure voor bewerking van 4 VB duurde ca. 20 minuten. De gegevens van de verschillende geproduceerde componenten zijn weergegeven in Tabel 1. Met de Massive procedure was de plasma recovery hoger en de cellulaire contaminatie van het plasma lager dan met de routine procedure. Andere plasma kwaliteitsparameters, zoals stollingsfactoren en eiwitgehalte, waren voor beide methodes vergelijkbaar. De recovery van erythrocyten in het RCC was hoger met de Massive. De veranderingen in de rode cel parameters tijdens bewaren waren voor beide methodes vergelijkbaar. Het restproduct van de Massive procedure heeft een kleiner volume en een lagere plaatjes recovery dan de buffy coat (BC) van de routine procedure.

Product	Parameter	Massive (n=20)			Controle (n=10)		
		gem	±	st. dev.	gem	±	st. dev.
Volbloed	Volume (ml)	512	±	7#	551	±	4
Plasma	Recovery volume (%)	88	±	2#	86	±	2
	RBC (x10 ¹²)	0.007	±	0.01#	0.056	±	0.040
LD-RCC	Recovery RBC (%)	88	±	2#	83	±	2
	Totaal Hb (g)	52	±	5	55	±	5
	Hemolyse (%), Dag 42	0.28	±	0.15	0.2	±	0.09
	ATP (µmol/g Hb), Dag 42	3	±	0.5	3.1	±	0.4
Rest-product/ BC	Volume (ml)	27	±	4#	47	±	2
	Hematocriet (%)	17	±	8	39	±	2
	PLT (x10 ⁹)	92	±	24	101	±	23
	Recovery PLT (%)	85	±	12#	100	±	9

#: Significant verschillend (p < 0.05) t.o.v. standaard procedure (controle).

Conclusie: De Massive 2C produceert RCCs en plasma met een hoge recovery. De kwaliteit van het plasma en de RCCs is vergelijkbaar met dat van producten gemaakt met de standaard procedure. Het restproduct had een kleiner volume en een lagere plaatjesopbrengst dan de buffy-coat uit de routine procedure. Hierbij dient opgemerkt dat het geteste systeem een twee-componenten procedure betrof. CaridianBCT heeft een drie-componenten procedure ontwikkeld waarbij naast plasma en RCC ook een "interim plaatjes unit" geproduceerd wordt dat gebruikt kan worden voor de productie van trombocytenconcentraten.

23 Wetenschappelijk onderzoek

Effect van volbloedseparatietijd op hemolyse in erythrocytenconcentraten en donorafhankelijkheid van hemolyse

M.J. Dijkstra-Tiekstra¹, M. Kraan¹, A.C. Setroikromo¹, J. Slegers-Kühne¹, D. Hoentjen², J. de Wildt-Eggen¹

¹Sanquin Research, Groningen, ²Sanquin Bloedbank, Groningen

Inleiding/doel: Eén van de eisen bij het bewaren van erythrocytenconcentraten (ECs) is dat de hemolyse $\leq 0,8\%$ moet zijn aan het einde van de bewaaruur. Er wordt aangenomen dat ECs met een langere volbloedseparatietijd (>6 minuten; EC_{>6min}) meer hemolyse laten zien. Ook is het mogelijk dat hemolyse donorafhankelijk is. Het doel van deze studie is om te onderzoeken of EC_{>6min} een hogere hemolyse hebben in vergelijking met reguliere ECs en of hemolyse donorafhankelijk is.

Methoden: Volbloed werd gescheiden in drie componenten met behulp van de Compomat G4, waarbij een EC, een buffycoat en een plasma-eenheid werden verkregen. Voor iedere EC_{>6min} werd tevens een reguliere EC met dezelfde bloedgroep en van dezelfde afnamesessie genomen. Beide ECs werden op dag 1 getest op hematocriet, hemoglobine en hemolyse.

Donorafhankelijkheid is retrospectief onderzocht door voor 100 ECs met een hemolyse >0,8% alle donaties van de corresponderende donor terug te zoeken tot 1-1-2006 en te controleren op hemolyse. Omdat alleen verdachte ECs zijn getest op hemolyse is er ook teruggezocht op klachten uit de ziekenhuizen.

Resultaten: Resultaten van EC_{>6min} versus EC_{regulier} (n=172) zijn te zien in de tabel (gemiddelde \pm SD).

	EC _{>6min}	EC _{regulier}
Hematocriet (%)	57 \pm 2	57 \pm 2
Hemoglobine (mmol/L)	11,6 \pm 0,5	11,6 \pm 0,5
Hemolyse (%) [range; n>0,8%]	0,06 \pm 0,10* [0,01-3,18; 4]	0,03 \pm 0,02* [0,01-0,40; 0]

* p<0,001 (gepaarde t-test) en n=169 door 3 uitbijters met >3 SD afwijking van het gemiddelde.

Donorafhankelijkheid: Per donor waren er sinds 1-1-2006 8 \pm 3 donaties (gemiddelde \pm SD). Van al deze donors werd alleen een hemolyse van >0,8% gevonden voor de donatie waarvoor zij geselecteerd waren. Verder zijn er van de ziekenhuizen geen klachten gevonden die gerela-



teerd konden worden aan verhoogde hemolyse van één van deze donaties. De intentie was om dit te herhalen voor ECs van dezelfde bloedgroep en donatiesessie zonder hemolyse, maar dit bleek niet langer zinvol omdat er geen extra donaties met >0,8% hemolyse waren gevonden.

Conclusie/discussie: ECs_{>6min} lieten een verhoogde hemolyse zien en waren vaker >0,8% vergeleken met ECs_{regulier}. Voor de hemolyse is geen donorafhankelijkheid gevonden.

24 Wetenschappelijk onderzoek

Verlenging van de houdbaarheid van ontdooide erythrocyten door achterwege laten van supernatant glycerol reductie voor vriezen

Johan WM Lagerberg, Vincent WK Paeper, Werner K Hagen and Dirk de Korte

Afdeling Bloedcelresearch, Sanquin Research Amsterdam

Inleiding: Een voorraad rode celconcentraten (RCC) met zeldzame bloedgroeyperingen is ingevroren in de Sanquin Bank of Frozen Blood. Voor het invriezen wordt aan het RCC glycerol toegevoegd. In de huidige procedure wordt, voor invriezen, het volume gereduceerd door verwijdering van supernatant glycerol.

Doel: Het doel van deze studie was om het effect van achterwege laten van volume reductie voor invriezen op de stabiliteit van de ontdooide RBC tijdens koud bewaren te onderzoeken.

Methoden: Leukocyten gereduceerde RCCs in SAGM werden 6 dagen bewaard bij 2-6°C waarna de RCCs per 2 werden samengevoegd (n=4) en gesplitst. Na verwijdering van SAGM, werd m.b.v. een ACP215 (Haemonetics) glycerol toegevoegd tot een eindconcentratie van 40%. De geglyceroliseerde RCCs werden ofwel direct ofwel na volume reductie ingevroren. Na tenminste 14 dagen bewaten bij -80°C, werden de RCCs ontdooid, gedeglyceroliseerd en geresuspendeerd in SAGM. Vier extra RCCs, ingevroren zonder volume reductie, werden na ontdooien geresuspendeerd in AS-3. Tijdens koud bewaren (2-6°C), werden de stabiliteit en de in vitro kwaliteitsparameters van de ontdooide cellen bepaald.

Resultaten: Volume gereduceerde RCCs hadden een volume van 219±5 mL en een Hct van 69±4% voor invriezen. Voor de niet-gereduceerde RCCs waren deze waarden respectievelijk 437±32 mL en 35±1%. De vries/dooi/was recovery was voor beide groepen vergelijkbaar (75-80%). Gedurende koud bewaren in SAGM, vertoonden de niet-gereduceerde RCCs significant minder kalium lekkage, hemolyse en zwelling dan de volume gereduceerde RCCs (zie Tabel). ATP gehalten werden iets beter gehandhaafd in niet volume-gereduceerde RCC. Volgens EU richtlijnen mag aan het eind van de bewaarperiode de hemolyse maximaal 0.8% bedragen. Hemolyse van volume-gereduceerde RCCs bleef gedurende 3 dagen na ontdooien onder 0.8%, terwijl niet-gereduceerde RCCs gedurende 9 dagen na ontdooien onder deze grens bleven. Hemolyse kon nog verder onderdrukt worden door de ontdooide RCCs te resuspenden in de bewaarvloeistof AS-3: zelfs 28 dagen na ontdooien bleef de hemolyse van niet-volume gereduceerde RCCs onder 0.8%.

Conclusie: Achterwege laten van glycerol supernatant reductie voor invriezen vereenvoudigd de invriesprocedure en vergroot de stabiliteit en daarmee de houdbaarheid van ontdooide RCCs. Verlengde houdbaarheid van ontdooide RCCs vergroot de praktische bruikbaarheid van gecryopreserveerde RCCs zowel in de burger (zeldzaam bloed) als in de militaire bloedtransfusie praktijk.

Tabel. RBC kwaliteitsparameters gedurende bewaren na ontdooien.

	Volume gereduceerd, in SAGM (n=4)			Niet vol. gereduceerd in SAGM (n=4)			Niet vol. gereduceerd, in in AS-3 (n=4)		
	Gem	±	St. dev.	Gem	±	St. dev.	Gem	±	St. dev.
Extracell K+ (mmol/L)									
Dag 0	2.6	±	0.32	1.1	±	1.1	1.4	±	0.8
Dag 7	20.9	±	2.33	7.7	±	0.9	7.9	±	0.8
Dag 14	22.5	±	1.59	12.1	±	1.1	12.7	±	1.5
Dag 21	n.d.			15.7	±	1.5	16.3	±	1.5
Hemolysis (%)									
Dag 7	2.4	±	1.2	0.53	±	0.14	0.25	±	0.05
Dag 14	4.9	±	3.5	0.84	±	0.15	0.43	±	0.09
Dag 21	n.d.			1.2	±	0.32	0.42	±	0.10
Dag 28	n.d.			n.d.			0.52	±	0.13
MCV (fL)									
Dag 0	102.9	±	4.2	102.2	±	4.4	105.6	±	1.7
Dag 7	104.7	±	3.9	102.3	±	4.4	101.9	±	1.9
Dag 14	106.6	±	3.7	102.8	±	4.0	103.4	±	2.7
Dag 21	n.d.			104.0	±	3.7	103.4	±	4.0
ATP (µmol/g Hb)									
Dag 0	6.0	±	0.73	5.7	±	0.67	5.4	±	0.9
Dag 7	3.1	±	0.32	3.4	±	0.26	3.3	±	0.6
Dag 14	2.1	±	0.28	2.5	±	0.18	3.2	±	1.1
Dag 21	1.3	±	0.26	1.8	±	0.25	2.2	±	0.5

25 Wetenschappelijk onderzoek

Hogere initiële DMSO-concentraties beïnvloeden de vitaliteit van hematopoïetische progenitor cellen

M.J. Dijkstra-Tiekstra, A.C. Setroikromo, E. Gkoumassi, J. de Wildt-Eggen Sanquin Research, Groningen

Inleiding: Dimethyl sulfoxide (DMSO) wordt aan hematopoïetische progenitor cellen (HPC) toegevoegd om de cellen tijdens de cryopreservatie te beschermen. DMSO wordt verdund in plasma of een albumine oplossing voordat het aan de HPC wordt toegevoegd. Hiervoor kunnen verschillende initiële concentraties DMSO worden gebruikt, zoals 20% en 50%. Zo wordt 50% DMSO gebruikt om het eindvolume te reduceren. Het toevoegen van DMSO aan HPC veroorzaakt een exotherme

reactie waarbij de cellen aan hogere temperaturen worden blootgesteld. De initiële DMSO-concentratie kan dus van belang zijn voor de celoverleving na ontdooien.

Doel: Het bestuderen van het effect van 20% versus 50% DMSO op leukocytenvitaliteit. Het eindvolume en het absolute leukocytenaantal zijn gebruikt als controle parameters.

Methoden: Omdat HPC niet standaard beschikbaar is voor onderzoeksdoeleinden is er in deze studie gebruik gemaakt van een HPC simulant welke gemaakt is van buffycoats en plasma met vergelijkbare cel aantallen en hematocriet maar afwezigheid van CD34+-cellen. Het HPC simulant was verdeeld in vier porties en de DMSO/plasma-oplossing werd langzaam toegevoegd onder voortdurend mengen van het product resulterend in vier studie condities die varieerden voor initiële DMSO-concentraties, eindvolume en aantal leukocyten. Het volume van de vierde conditie was vóór het toevoegen van DMSO gereduceerd door centrifugeren. Voor alle condities was de eind DMSO-concentratie 8%. Het product werd gecontroleerd ingevroren en overgeplaatst in de gasfase van vloeibare stikstof. Na een bewaarduur van tenminste een week werd het product ontdooid in een 37°C waterbad en direct verdund met Iscove's Modified Dulbecco's Media/albumine 10% om aggregatie van de cellen te voorkomen. Eindvolume, leukocytenaantal, leukocytenuitvoerendheid (gemeten met Trypaan Blauw) en hematocriet zijn bepaald.

Resultaten: Zie tabel (gemiddelde±SD, n=6)

	50% DMSO referentie	20% DMSO eindvolume gematched	20% DMSO leukocyten gematched	20% DMSO eindvolume en leukocyten gematched
Eindvolume, ml	39,0 ± 0,6	38,7 ± 0,5	56,4 ± 2,4	38,7 ± 0,9
Leukocyten, x10 ⁹ /unit	2,4 ± 0,2 ^{1,2}	1,6 ± 0,2 ^{1,3,4}	2,3 ± 0,2 ³	2,3 ± 0,2 ^{2,4}
Leukocytenuitvoerendheid, %	88 ± 3 ^{1,2}	93 ± 3 ¹	94 ± 2 ²	91 ± 3
Hematocriet, %	3,9 ± 0,9 ^{1,2}	2,7 ± 0,7 ^{1,3}	2,7 ± 0,6 ^{2,4}	3,9 ± 0,9 ^{3,4}
^{1,2,3,4} p<0,05 (ANOVA voor herhaalde metingen met Tukey-Kramer als post test)				

Conclusie/discussie: De leukocytenuitvoerendheid na ontdooien is hoger bij 20% DMSO dan bij 50% DMSO als initiële concentratie om aan HPC simulant toe te voegen. Het eindvolume en het leukocytenaantal van het product zijn niet van invloed. Het reduceren van het volume door centrifuge kan tot een lagere vitaliteit leiden.

26 Toegepast onderzoek

'Stamcellen' invriezen in buis of zak?

*M.J. Dijkstra-Tiekstra, A.C. Setroikromo, J. de Wildt-Eggen
Sanquin Research, Groningen*

Inleiding/doel: In het verleden werden stamcellen ingevroren in buizen met een invriesprogramma ontwikkeld voor buizen. Tegenwoordig worden bij ons speciale invrieszakken gebruikt om stamcellen in te vriezen met een programma ontwikkeld voor deze invrieszakken. Samen met deze zakken worden buisjes met een productmonster voor kwaliteitscontrole ingevroren waarbij hetzelfde invriesprogramma voor zakken wordt gebruikt. Het doel is het bestuderen van het effect van het invriesprogramma op de WBC en CD34+-celrecovery.

Methoden: Omdat stamcellen niet standaard beschikbaar zijn voor onderzoeksdoeleinden is er in deze studie gebruik gemaakt van een simulant stamcelproduct welke gemaakt is van buffycoats en plasma en waaraan gezuiverde CD34+-cellen zijn toegevoegd, resulterend in een product met vergelijkbare cel aantallen en hematocriet. Deze 'stamcellen' werden in drie condities ingevroren in vloeibare stikstof met een gecontroleerd programma en bewaard in de gasfase van vloeibaar stikstof: in buizen met behulp van het buizeninvriesprogramma (B/B), in zakken met behulp van het zakkeninvriesprogramma (Z/Z) en in buizen met behulp van het zakkeninvriesprogramma (B/Z). Na een bewaarduur van tenminste een week werd het product ontdooid in een 37°C waterbad en direct verdund met Iscove's Modified Dulbecco's Media/albumine 10% om aggregatie van de cellen te voorkomen. WBC- en CD34+-cel aantallen en vitaliteit (gemeten met 7AAD) zijn bepaald voor bewerken, na toevoegen van DMSO en na ontdooien. De recovery is berekend ten opzichte van voor bewerken.

Resultaten: Zie tabel (gemiddelde±SD, n=9)

	Voor bewerken	Na toevoegen DMSO	Na invriezen en ontdooien		
			B/B	Z/Z	B/Z
WBC, x10 ⁹ /L	170±23	170±25	171±25 ¹	170±24	167±23 ¹
WBC vitaliteit x10 ⁹ /L	163±24	150±19 ³	98±9 ^{1,3}	103±13 ^{2,3}	77±11 ^{1,2,3}
WBC vitaliteit % recovery	-	93±5	61±8 ¹	63±5 ²	48±1 ²
CD34, x10 ⁶ /L	371±335	349±373	312±349	327+385	296±362
CD34 vitaliteit, x10 ⁶ /L	226±176	203±221 ³	156±183 ³	189+202 ³	132±119 ³
CD34 vitaliteit % recovery	-	79±28	61±26	75+39	57±29

^{1, 2} p<0.05 (ANOVA voor herhaalde metingen gevolgd door Tukey Kramer); ³concentratie is gecorrigeerd voor verdunning met DMSO

Conclusie/discussie: Invriezen van 'stamcellen' met gebruik van B/Z lijkt te leiden tot een slechtere recovery voor zowel WBC als CD34+-cellen (totaal en vitaal) dan met gebruik van B/B of Z/Z, alhoewel het



verschil voor CD34⁺-cellen niet statistisch significant was.

27 Toegepast onderzoek

Is hydroxyethyl starch nodig om erythrocyten van hematopoietische progenitorcellen te verwijderen?

*M.J. Dijkstra-Tiekstra, A.C. Setroikromo, E. Gkoumassi, J. de Wildt-Eggen
Sanquin Research, Groningen*

Inleiding: Hydroxyethyl starch (HES) wordt gebruikt om erythrocyten (RBC) te verwijderen van hematopoietische progenitorcellen (HPC) na beenmergpunctie. Het tot nu toe gebruikte HES met een molekulgewicht van >200kDa wordt minder beschikbaar op de markt vanwege de bijwerkingen die het geeft.

Doel: Het bestuderen van het effect op RBC verwijdering en leukocyten (WBC) recovery van HES met molekulgewichten van 200 en 130 kDa versus sedimentatie zonder HES.

Methoden: Omdat HPC niet standaard beschikbaar is voor onderzoeksdoeleinden, is er in deze studie gebruik gemaakt van een HPC simulant (134 ml) welke gemaakt is van buffycoats en plasma resulterend in een product met vergelijkbare cel aantallen en hematocriet maar afwezigheid van CD34⁺-cellen. De HPC simulant werd verdeeld in vier porties waaraan respectievelijk HES van 200 kDa met 0,6% eindconcentratie (HAES; Fresenius), HES van 130 kDa met 0,6% of 0,39% eindconcentratie (Voluven; Fresenius) werden toegevoegd. De producten met 0,6% HAES en 0,39% Voluven hebben eenzelfde molariteit voor HES. Aan de vierde portie werd geen HES toegevoegd. Sedimentatie duurde 1,5-2 uur en het plasma en de buffycoat werden met een plasmaklem overgeperst naar een satellietzak. RBC aantallen, hematocriet en WBC aantallen zijn bepaald voor en na RBC verwijdering. De percentages RBC verwijdering en WBC recovery zijn berekend.

Resultaten: Zie *Tabel* (gemiddelde \pm SD, n=6)

	200 kDa HES, 0,6%	130 kDa HES, 0,6%	130 kDa HES, 0,39%	Geen HES
RBC verwijdering, %	96 \pm 0,4 ^{1,2}	90 \pm 4,6 ^{1,3}	92 \pm 4,1 ^{2,4}	96 \pm 0,5 ^{3,4}
RBC restvolume, ml	0,42 \pm 0,05 ¹	1,22 \pm 0,66 ^{1,2}	0,92 \pm 0,49	0,39 \pm 0,07 ²
WBC recovery, %	88 \pm 2,3	84 \pm 3,3	85 \pm 5,1	84 \pm 2,4
Monocyten recovery, %	81 \pm 9,2	84 \pm 13,1	82 \pm 5,5	78 \pm 4,2
Lymfocyten recovery, %	89 \pm 2,7	85 \pm 5,6	86 \pm 5,7	86 \pm 2,6
^{1,2,3,4} p<0,05 (ANOVA voor herhaalde metingen gevolgd door Tukey-Kramer posttest).				

Voor WBC-, monocyten- en lymfocytenrecovery werden geen significante verschillen gevonden. De sedimentatie was minder goed voor 'HES van 130 kDa' dan voor HES van 200 kDa of 'geen HES', resulterend in een grotere standaarddeviatie en een lagere RBC verwijdering.

Conclusie/discussie: De RBC verwijdering was het beste voor HES van 200 kDa en voor 'geen HES', terwijl WBC recovery acceptabel, dat wil zeggen >80%, was voor alle testcondities. Wel zullen er meer experimenten, waaronder ook met beenmerg, gedaan moeten worden om deze resultaten te bevestigen en om te besluiten of HES wel of niet nodig is voor RBC verwijdering van HPC.

28 Toegepast onderzoek

Factor VIII verdeling in Q-plasma in relatie tot invriestechiek en zaktype

*IJ Bontekoe, PF van der Meer, JJ Visser, D de Korte
Sanquin Bloedvoorziening, divisie Bloedbank en Plasmaproducten,
Amsterdam*

Inleiding: Voor het afnemen van quarantaine (Q-) plasma bij donoren wordt gebruik gemaakt van apparatuur en disposables geleverd door de firma Fenwal en Haemonetics.

De Fenwal Q-plasma's zijn ca. 15% dikker dan die van Haemonetics. Voor het snel invriezen van plasma eenheden worden twee invriestechieken gebruikt: 1 inblazen van mechanisch gekoelde lucht (blastfreezer), 2 inblazen van vloeibare stikstof.

De dikte van de zak en de manier van invriezen zijn parameters die de snelheid van invriezen beïnvloeden. Te langzaam invriezen veroorzaakt scheiding in het plasma in een eiwitrijke en een eiwitarme fractie waardoor denaturatie van Factor VIII optreedt.

Doel: Pilotonderzoek naar mogelijke verschillen in verdeling van totaal eiwit en FVIII in bevroren Q-plasma, in relatie tot de invriestechiek en het zaktype.

Methoden: Per invriestechiek en zaktype werden 3 eenheden onderzocht, totaal 4x3 niet gepaarde eenheden. De Q-plasma's waren alle binnen 24 uur na afname ingevroren en 6-24 maanden bewaard bij <-30°C. Uit elke zak werden 8 boormonsters genomen volgens een rechthoekig patroon plus 1 monster precies uit het midden van de zak. Elk monster is apart ontdooid, uitgevuld en opnieuw ingevroren in vloeibaar stikstof voor bepaling van FVIII en totaal eiwit.

Resultaten: Zie *Tabel*. De verschillen in standaarddeviatie, een maat

Zaktype	Invriestechiek	Fenwal Vloeibaar N ₂			Haemonetics Vloeibaar N ₂			Fenwal Blastfreezer			Haemonetics Blastfreezer		
		9 gem. \pm sd			9 gem. \pm sd.			9 gem. \pm sd			9 gem. \pm sd		
Totaal eiwit (mg/ml)	QP1	57	\pm 1	51	\pm 1	59	\pm 1	57	\pm 3	60	\pm 1	66	\pm 1
	QP2	56	\pm 1	52	\pm 1	57	\pm 2	60	\pm 1	66	\pm 1	66	\pm 1
	QP3	60	\pm 1	59	\pm 1	66	\pm 1	66	\pm 1	66	\pm 1	66	\pm 1
Factor VIII (IE/ml)	QP1	0.62	\pm 0.06	0.59	\pm 0.06	0.97	\pm 0.09	0.51	\pm 0.04	0.77	\pm 0.09	0.85	\pm 0.03
	QP2	1.02	\pm 0.07	1.21	\pm 0.08	0.77	\pm 0.09	0.85	\pm 0.03	0.77	\pm 0.09	0.85	\pm 0.03
	QP3	1.09	\pm 0.06	0.76	\pm 0.05	0.99	\pm 0.08	0.71	\pm 0.03	0.99	\pm 0.08	0.71	\pm 0.03

voor homogeniteit, zijn erg klein en een duidelijke trend waarin een van beide invriestechieken of zaktypes de grootste homogeniteit vertoont is niet aanwijsbaar. Dit wordt bevestigd indien de specifieke FVIII acti-

viteit, een maat voor denaturatie van FVIII, wordt berekend.

Conclusie: Alle plasma's zijn in vergelijkbare mate homogeen in totaal eiwit en FVIII. Een duidelijke trend waarin een van beide invriestech- niken of zaktypes de grootste homogeniteit vertoont in totaal eiwit en FVIII is niet aanwezig.

29 Toegepast onderzoek Lasmaferese en stollingsactivatie

W. Karssing, H. Vrieling, D. de Korte

Sanquin Bloedvoorziening, afdeling PPO Bloedbank, Amsterdam

Inleiding: In meerdere Sanquin divisies worden problemen met vlokken en/of stolsels in ontdooid quarantaine plasma (Q-plasma) geconstateerd. Het idee is dat activatie van het stollingssysteem door de gebruikte apparatuur en materialen een mogelijke oorzaak zou kunnen zijn. Wanneer trombocyten voldoende geactiveerd worden tijdens het plasmafereren, zou tevens de stollingscascade geactiveerd kunnen worden.

Doel: Het in kaart te brengen en met elkaar vergelijken van stollingsactivatie tijdens de plasmaferese procedure op de bij Sanquin gebruikte plasmaferese apparatuur materialen van de fabrikanten Fenwal en Haemonetics.

Materiaal en Methode: 6 Bekende Q (quarantaine)-plasma donors werden gevraagd om na ondertekening van een informed consent op 2 specifieke dagen plasma te geven. Dezelfde 3 donors doneerden de eerste dag met de Autopheresis C (Fenwal) en de tweede dag op de PCS2 (Haemonetics en omgekeerd:

Voor en na het plasmafereren is een Volbloed (VB) monster afgenomen bij de donor. Bij één van de donors is geen 2e donatie verricht.

Getest zijn de volgende parameters:

In het VB monster van de donor voor en na donatie:

Celtelling met differentiatie, Trombo-elastograaf (TEG), CD62P, Annexine-V, PAC-1, Trombine-antitrombine complex (TAT-complex), Protrombine fragmenten 1+2, D-dimeren, FVIII-antigeen, FVIII-activiteit en het totaal eiwit.

In het Q-plasma voor invriezen en na ontdooiden:

Trombine-antitrombine complex(TAT-complex), Protrombine fragmenten 1+2, D-dimeren, FVIII-antigeen, FVIII-activiteit en totaal eiwit. Voor de statistiek is de gepaarde t-toets gebruikt, als significant wordt beschouwd $p < 0.05$.

Resultaat stollingsactivatie van 5 donors: Er zijn geen significante verschillen gevonden voor en na plasmaferese in het VB van de donor.

In het afgenomen plasma verkregen met de apparatuur en sets van Fenwal en van Haemonetics werd geen activatie van stollingsfactoren gezien.

Conclusie: Met deze studie kon geen oorzaak worden vastgesteld voor de vlokvorming in ontdooid plasma. Naar de oorzaak van het vlokken-probleem zal elders in het proces moeten worden gezocht.

30 Toegepast onderzoek beoordeling kleur plasma met cm-5 kleurmeter

LAE de Laleijne-Liefting*, D de Korte*, JJ Visser*, N Jansen#, J Havinga†
Sanquin Bloedvoorziening; *Amsterdam #Nijmegen †Groningen

Inleiding/doel: Volgens de Sanquin Richtlijnen Bloedproducten moet het plasma voldoen aan de volgende omschrijving: "De kleur van het plasma varieert van lichtgeel tot groen. Het plasma mag helder tot licht troebel zijn, maar niet te lipemisch (d.w.z. dat het etiket zichtbaar moet zijn door het plasma heen). Het plasma mag geen enkel visueel teken van hemolyse of verontreiniging met erythrocyten vertonen (macroscopisch rood; erythrocyten $< 6,0 \times 10^9/l$)." Deze subjectieve benadering heeft behoefte aan een meer objectieve bepaling. Een eerdere studie toonde aan dat kleurmeting een objectieve methode kan zijn om de kwaliteit van plasma te beoordelen. Het doel van deze studie is het onderzoeken van de toepasbaarheid van de CM-5 (Konica Minolta) kleurmeter voor de beoordeling van plasma in de routine.

Methoden: De productie-afdelingen van Sanquin Bloedbank voerden visuele inspectie van de plasma's uit en stuurden de afgekeurde vette en rode plasma's op naar de research afdeling. De kleur van deze afgekeurde plasma's en goedgekeurde routine plasma's van verschillende basiskleuren (helder geel, groenig en vettig) werd bepaald met de CM-5. Daarnaast werd uit de afgekeurde plasma's een monster genomen voor telling in de Bürker telkamer (bij rood) of de bepaling van triglyceriden (bij vet).

Resultaten: In totaal werden 219 routine, 25 vette en 36 rode plasma's ontvangen en beoordeeld. Het meten met de CM-5 ging snel en was eenvoudig uit te voeren. In 7 rode plasma's was de rode cel concentratie $> 6 \times 10^9/l$ en voldeed niet aan de eisen. De gemiddelde reflectie bij 520-580 nm was lager in het rode plasma dan in routine plasma. De hoeveelheid triglyceriden in de vette plasma's varieerde van 2,27 tot 12,53 mmol/l. De gemiddelde L* waarde van het vette plasma was hoger in vergelijking met de routine plasma. Echter, de laagst gemeten L* waarde van de vette plasma's viel binnen de range van routine plasma's. De gemiddelde reflectie bij 360-740 nm was hoger bij vet plasma dan van routine plasma.

Conclusie/discussie: Op basis van reflectie metingen kan de CM-5 (Konica Minolta) onderscheid maken tussen afgekeurde vette en rode plasma's in vergelijking met goedgekeurd routine plasma's. Op basis van de resultaten van deze studie, kan de CM-5 (Konica Minolta) gevalideerd worden als een hulpmiddel voor het keuren van plasma in twijfelgevallen.

31 Toegepast onderzoek Praktijkresultaten tijdens implementatie van de CompoMat G5

IJ Bontekoe, G Mast, D de Korte

Sanquin Bloedbank Nederland, Amsterdam

Inleiding: De CompoMat G5 (Fresenius Kabi) is bij Sanquin gekozen als uniform apparaat voor het separeren van volbloed in componenten (PL: plasma, BC: buffy coat, (LV)-RCC: (leukocyten-verwijderd) rode-cel-



concentraat) en voor bereiding van trombocytenconcentraten (TC). Als eerste in Nederland is locatie Amsterdam eind 2010 overgegaan.

Methoden: Drie G5 apparaten zijn volgens een landelijk protocol gekwalificeerd en vrijgegeven waarna procesvalidatie heeft plaatsgevonden.

Vervolgens is de *in vitro* kwaliteit van 3x10 LV-RCCs en 3x6 TCs, bereid met deze 3 apparaten, gevalideerd tijdens 35 dagen bewaren bij 2-6°C respectievelijk 7 dagen schuddend bewaren bij 20-24°C.

Daarna is overgegaan tot kwalificatie van de overige G5 apparaten.

Verontreiniging van plasma met trombocyten was hoger dan bij plasma geproduceerd met de G4, maar binnen de limiet. Om dit te reduceren zijn diverse G5-programma's en centrifugecondities onderzocht. Een vergelijking is gedaan met volbloed, gecentrifugeerd volgens de huidige tweestapsdraai en een eenstapsdraai, met een 40% hoger Accumulated Centrifugal Effect bij een 3% lager toerental. Het standaard G5-programma is toegepast en alle componenten inclusief de RCCs zijn bemonsterd.

Resultaten: Kwalificatie heeft geleid tot kleine aanpassingen van het G5-programma waarna herkwalificatie heeft plaatsgevonden (zie tabel). Voor alle in gebruik zijnde trombocytenpoolsystemen werd per type een G5-programma gevonden dat zowel voor trombocyten in plasma als in PASII gebruikt kan worden.

Validatie van de *in vitro* kwaliteit van LV-RCCs en TCs is afgerond. In de prestatiekenmerken werden gedurende de hele bewaartermijn geen significante verschillen gevonden tussen de G5 apparaten.

De scheidingsresultaten van de eenstapsdraai versus tweestapsdraai zijn ook vermeld in de tabel. PLs bereid met de eenstapsdraai bevatten significant minder trombocyten en leukocyten dan PLs bereid met de tweestapsdraai. De RCCs (voor leukodepletie) bevatten met de eenstapsdraai meer trombocyten en leukocyten dan met de tweestapsdraai. De BCs bevatten gemiddeld een vergelijkbare hoeveelheid trombocyten.

Conclusie: Implementatie van de CompoMat G5 op locatie Amsterdam is succesvol afgerond. (Her)kwalificaties en validaties hebben geleid tot robuuste G5 programma's waarmee op dit moment PLs, LV-RCCs en TCs volgens de Richtlijn Bloedproducten worden bereid.

Vermindering van contaminatie van PLs met trombocyten kan worden

	QC data Tweestaps centrifugedraai n = 650	Tweestaps centrifugedraai n = 16	Eenstaps Centrifugedraai n = 16
PL			
Volume, ml	325 ± 21	322 ± 17	320 ± 16
WBC, x10 ⁶	7 ± 6	3 ± 2	1 ± 2
PLT, x10 ⁹	9 ± 5	8 ± 4	3 ± 1 ^c
TC / BC	TC*	BC	BC
Volume	328 ± 17	49 ± 1	50 ± 1 ^a
Hematocriet	n.v.t.	0.44 ± 0.05	0.41 ± 0.03 ^a
PLT, x10 ⁹	344 ± 48	100 ± 16	96 ± 13
LV-RCC			
Volume	286 ± 16	271 ± 14	272 ± 16
Hematocriet	0.56 ± 0.02	0.56 ± 0.01	0.57 ± 0.02
WBC, x10 ⁶	0.09 ± 0.12	0.15 ± 0.12	0.09 ± 0.10
PLT, x10 ⁹	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 0

* n = 5950; a p<0.05, c p<0.001 t.o.v. tweestaps centrifugedraai

bereikt door toepassing van de eenstapsdraai waarbij de kwaliteit van BCs en LV-RCCs vergelijkbaar goed is als met de tweestapsdraai.

32 Toegepast onderzoek

Een predictiemodel voor de pH van hypergeconcentreerde trombocyten

IJ Bontekoe¹, TAS Tomson², PF van der Meer¹, Á Honohan², G Kruit³, G Peeters⁴, PJ van Toledo³, D de Korte¹.

Sanquin Bloedbank Nederland ¹Amsterdam, ²Leiden, ³Rotterdam, ⁴Nijmegen

Inleiding: Hypergeconcentreerde trombocyten (PLT) in plasma (hyperTCs), zoals toegepast bij o.a. intra-uteriene transfusies en voor snelle transfusie aan poliklinische patiënten, kunnen tot 6 uur worden bewaard in een gasdoorlaatbaar PVC zakje met butyryl-trihexyl-citraat (BTHC) weekmaker. De validatie van het zaksysteem liet zien dat de pH, als surrogaat-marker voor de kwaliteit van het product bij uitgifte, afhankelijk was van bewaartijd, concentratie PLT, aantal PLT en totaal volume van het hyperTC.

Doel: Ontwikkelen van een predictiemodel voor de *in vitro* kwaliteit van hyperTCs in plasma.

Methode: Voor 3 gepaarde experimenten werden voor elke serie 7 ABO identieke buffycoat TCs in plasma na 2 dagen bewaartijd onder standaard condities gepoold en weer zodanig in 7 basis-TCs verdeeld, dat het totaal aantal PLTs per eenheid van 250 tot 450 x 10⁹ varieerde. Volgens standaard methode werden de eenheden geconcentreerd tot eindvolume variërend van 22 tot 45 ml volgens het schema in de tabel waarin steeds één parameter constant is gehouden en twee parameters gevarieerd.

Constant Volume, ml	Variabel			
	Aantal PLT, x10 ⁹	Concentratie PLT, x10 ⁹ /ml		
Concentratie PLT, x10 ⁹ /ml	10,0	25-35-45	250-350-450	
Volume, ml	22		250-350-450	11,4-15,9-20,5
Aantal PLT, x10 ⁹	350	35-27-22		10,0-13,0-15,9

Deze hyperTCs werden niet-schuddend bij kamertemperatuur bewaard en op t = 1, 3 en 6 uur bemonsterd voor *in vitro* bepalingen. Om de invloed van bewaartijd, volume, concentratie en aantal PLTs op pH te onderzoeken is gebruikt gemaakt van een multivariaat lineair regressie model (SPSS 17).

Resultaten: De hyperTCs varieerden in volume van 21±0 tot 46±1 ml, met aantal PLT van 260±14 tot 470±31 x10⁹ en een variatie in PLT concentratie van 10,0±0,6 tot 21,0±1,9 x10⁹/ml. De relatie tussen pH, volume, aantal PLT en bewaartijd wordt door de volgende formule weergegeven: $pH_{37°C} = 7,301 + 0,021 \times \text{volume [ml]} - 0,003 \times \text{aantal PLT [x10}^9] - 0,085 \times \text{tijd [u]}$

Voorbeeld: Het predictiemodel voorspelt bij een gemiddeld aantal PLT van 350 x10⁹, bij een vereiste bewaarduur van 6 uur en een gewenste minimum pH van 6,3, een minimaal volume van het hyperTC van 27 ml.

Conclusie: Een predictiemodel is ontwikkeld dat de kwaliteit van hyperTCs, als functie van volume, aantal PLT en de bewaartermijn kan voorspellen.

33 Toegepast onderzoek routinematige productie van allogene single-donor cryolijm

S. hazelaar & J. de Wildt-Eggen

Sanquin Research, Groningen, The Netherlands

Inleiding: Fibrinelijm is een humaan bloedproduct dat bestaat uit twee componenten: cryoprecipitaat en trombine. Commerciële fibrinelijmen bevatten fibrinolyseremmers of runderaprotininen en worden van multi-donor plasma's geproduceerd wat de kans op virus overdracht vergroot. Autologe fibrinelijmen verminderen het virale risico en worden vaak geproduceerd tijdens een operatie of ver van te voren. Als alternatief voor deze fibrinelijmen zou de allogene single-donor fibrinelijm cryolijm gebruikt kunnen worden.

Methoden: Vers bevroren singledonor Q-plasma werd afgenomen met behulp van het PCS-2 systeem van Haemonetics of het Autopheresis-C systeem van Fenwal. Cryolijm werd geproduceerd met behulp van het Cryoseal® FS systeem, dat in een gesloten systeem automatisch cryoprecipitaat en trombine produceert van één Q-plasma. De volgende QC eisen werden gehanteerd: een stoltijd van <10 seconden, Factor XIII (kwalitatief) aanwezig en een opbrengst tussen 5-20 ml. Additioneel is de fibrinogeen concentratie bepaald.

Resultaten: De routinematige productie van cryolijm vanaf 2008 tot en met 2010 is geanalyseerd (zie tabel). Eén procedure per jaar voldeed niet aan één van de QC eisen voor cryolijm. Cryolijm geproduceerd van plasma die afgenomen waren met het Fenwal systeem gaven de hoogste opbrengst. De hoogste fibrinogeen concentratie werd waargenomen in cryolijm geproduceerd met plasma's afgenomen m.b.v. het Haemonetics systeem. De mislukte procedures konden worden onderverdeeld in de volgende categorieën: niet halen van de QC eis, stolsels, apparaat error/disposable set probleem/onregelmatigheid tijdens procedure of overige

	N	Plasma (mL) mean (SD)	Opbrengst (mL) mean (SD)	Stoltijd range (sec)	Fibrinogeen (mg/mL) mean (SD)	Mislukte procedures (%)
2008						
Haemonetics	233	299±9,1	13±2,5	<4,5-6,2	21,5±4,4	3,4
Fenwal	270	300±14,3	14±2,8	<4,5-6,2	17,8±4,6	5,9
Totaal	503	299±12,2	14±2,7	<4,5-6,2	19,5±4,9	4,8
2009						
Haemonetics	158	300±7,9	14±2,2	<4,5-5,4	20,4±3,5	3,8
Fenwal	50	296±15,5	15±2,8	<4,5-5,6	18,7±5,1	24,0
Totaal	208	297±10,4	15±2,4	<4,5-5,6	19,0±4,0	8,7
2010						
Haemonetics	292	301±7,7	14±2,4	<4,5-5,3	21,4±3,7	1,7

oorzaken. Vanwege problemen met stolsels in het Q-plasma dat afgenomen was m.b.v. het Fenwal systeem was het percentage niet gelukte procedures in 2009 hoger dan 5%. Vanwege deze problemen is er vanaf 2010 alleen cryolijm geproduceerd van Q-plasma dat afgenomen was m.b.v. het Haemonetics systeem.

Discussie/conclusie: Cryolijm kan uitstekend routinematig geproduceerd worden. Het is geproduceerd van singledonor Q-plasma en bevat geen synthetische fibrinolyseremmers of runderaprotinine waardoor cryolijm een goed alternatief is voor multi-donor en autologe fibrinelijmen.

34 Toegepast onderzoek onderzoek naar de kwaliteit van de buffycoat pool gedurende bewaren.

BB Daal, IJ Bontekoe, PF van der Meer, D de Korte

Sanquin Bloedvoorziening afdeling Product & Proces Ontwikkeling Bloedbank, Amsterdam

Inleiding: Trombocyten concentraten (TC) worden gemaakt van 5 buffycoats (BCs) en een eenheid plasma. In de Richtlijn Bloedproducten staat dat BC-pools zo snel mogelijk verwerkt moeten worden tot TC, met een maximum van 4 uren tot aan centrifugeren. Deze maximale bewaartijd is gebaseerd op de aanname dat veel trombocyten en leukocyten in een relatief kleine poolzak leiden tot verzuring van medium, waardoor de kwaliteit van trombocyten verslechtert. Deze maximale bewaartijd is niet op onderzoek gebaseerd.

Doel: Onderzoeken van de kwaliteit van BC-pools bereid uit BCs van overnacht bewaard volbloed (VB) tot en met 5 uur na poolen.

Methode: Voor de testgroep werden BCs gebruikt die na scheiding van VB minimaal 1 uur hadden gerust. Na het poolen was er monsternamen op t=0, 1, 4 en 5 uur na poolen (wat overeenkomt met t=1, 2, 5 en 6 na scheiden). Als controle werden pools bereid uit BCs die ongeveer 4 uur hadden gerust na scheiding van VB. Dit wordt beschouwd als de huidige 'worst-case' situatie bij bewerking, omdat gewoonlijk na poolen vrijwel direct wordt gecentrifugeerd. Voor deze controlegroep werd de BC-pool nog maximaal 1 uur bewaard met monsternamen op t=0 en 1 uur

BC-POOLS					
	Testgroep n = 6 gem.±s.d.		Controlegroep n = 3 gem.±s.d.		p-waarde
	T = 0	T = 5	T = 0	T = 1	
Trombocyten (10⁹/mL)	1.04 ± 0.10	1.04 ± 0.10	0.94 ± 0.08	0.95 ± 0.11	n.s.
pH_{37°C}	6.95 ± 0.03	6.88 ± 0.05	6.97 ± 0.08	6.96 ± 0.08	n.s.
Glucose (mmol/L)	19.6 ± 0.7	18.8 ± 0.7	18.7 ± 0.6	18.7 ± 0.7	n.s.
CD62P (%)	4.5 ± 1.6	5.4 ± 2.9	4.9 ± 4.1	5.7 ± 2.8	n.s.
Annexine A5 (%)	4.2 ± 1.3	5.4 ± 1.3	5.1 ± 2.5	4.2 ± 2.1	n.s.



(wat overeenkomt met $t=4$ en 5 na scheiden).

Resultaten: Zie tabel (gem. \pm s.d.) voor resultaten van eerste en laatste monsterpunt in beide groepen. In beide groepen voldeden de concentratie trombocyten, pH37°C, glucose, CD62P en Annexine A5 aan de kwaliteitseisen, met minimale veranderingen gedurende bewaren.

Conclusie: BC-pools bereid uit BCs van overnacht bewaard VB kunnen gepoold gedurende 5 uur bij kamertemperatuur tot aan centrifugeren worden bewaard. Hierbij treedt lichte verzuring van het medium op maar geen kwaliteitsverlies van de trombocyten.

35 Toegepast onderzoek

Frequentie van vals-negatieve kweken in de bacteriële screening van trombocytenconcentraten in Nederland

Dirk de Korte, Sanquin Bloedvoorziening, Product & Proces Ontwikkeling Bloedbank, Amsterdam.

Ineke Rood, Sanquin Research, Amsterdam; Willy Karssing-van Leeuwen Sanquin Bloedbank, Amsterdam; Janny de Wildt-Eggen, Sanquin Research, Groningen; Josje Koolen Sanquin Bloedbank, Amsterdam; Jan van Zeelst, Sanquin Bloedbank, Amsterdam en Piet Geurts, Sanquin Bloedbank, Nijmegen

Inleiding: In Nederland worden sinds 2001 alle trombocytenconcentraten (TC) getest op bacteriële verontreiniging met het BacT/Alert kweeksysteem. Recent waren er diverse publicaties die het risico van vals-negatieve kweken rapporteerden als ongeveer 1 op 1000 TC. Voor de Nederlandse situatie waren geen onderbouwde gegevens aanwezig over vals-negatieven. Om de frequentie vals-negatieve kweken met het Nederlandse screening systeem te bepalen werden gedurende bijna anderhalf jaar alle verlopen TCs (voor PASII ouder dan 5 dagen en voor plasma ouder dan 7 dagen) opnieuw gekweekt in de BacT/Alert.

Methoden: Over de periode april 2009 tot oktober 2010 werden in totaal 4021 verlopen TC units (bereid uit gepoolde buffy coats) opnieuw getest (twee flesjes) met de BacT/Alert. Bij een positieve kweek werd de test bevestigd door nogmaals een kweek in te zetten en zowel het TC als de positieve kweekflesjes werden naar een microbiologisch laboratorium gestuurd voor bevestiging en identificatie. Het 16S rRNA gen werd gesequenced om de species te bevestigen. Isolaten uit de TC met de gerelateerde kweekflesjes werden met AFLP (amplified fragment length polymorphism) geanalyseerd om te zien of de stammen identiek waren. De hoeveelheid bacteriën in de vals-negatieve TC werd geschat met behulp van real time PCR en de tijd tot detectie van het kweekflesje.

Resultaten: Er werden 4 vals-negatieve TCs gevonden, resulterend in een frequentie van vals-negatieve BacT/Alert kweken van 0,10%. Drie TCs waren besmet met *Staphylococcus epidermidis* en een met *Staphylococcus hominis*. AFLP analyse liet zien de stammen die waren geïsoleerd uit een TC identiek waren aan de bijbehorende kweekflesjes. De *S. epidermidis* stammen uit de verschillende TCs waren niet identiek. De concentratie bacteriën in de vals-negatieve TCs op de dag van hertesten (gemiddeld ruim 1 dag na het moment van verlopen) werd geschat op tenminste 10^5 CFU/ml.

Conclusies: Deze studie laat zien dat in de bacteriële screening van TCs

niet alle besmette TCs opgepikt worden. Omdat deze vals-negatieve TCs een risico vormen voor patiënten die transfusies krijgen, zijn mogelijk aanvullende of alternatieve acties nodig om het risico nog verder te verlagen. Hierbij moet wel in gedachten gehouden worden dat daadwerkelijke infectie met bacteriën als gevolg van TC transfusie sinds invoering van de bacteriële screening een zeldzame gebeurtenis is in Nederland.

36 Wetenschappelijk onderzoek

Bewaarduur en TRALI

Rutger A. Middelburg^{1,2}, Barbara Borkent³, Mart Jansen³, Leo M.G. van de Watering², Johanna C. Wiersum-Osselton⁴, Martin R. Schipperus⁴, Erik A.M. Beckers⁵, Ernest Briët^{1,2}, Johanna G. van der Bom^{1,2}

¹ Department of Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

² Sanquin-LUMC Jon J. van Rood Center for clinical transfusion research, Leiden The Netherlands

³ UMC Utrecht, Julius Center for Health Sciences and Primary Care, Utrecht, The Netherlands

⁴ TRIP (Transfusion Reactions in Patients) Dutch National Hemovigilance Office, The Hague, The Netherlands

⁵ Internal Medicine-Hematology, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands

Inleiding: Selectie van donors zonder leukocyten antilichamen kan ongeveer de helft van de TRALI voorkomen. Een andere oorzaak van TRALI zijn biologisch actieve stoffen die tijdens opslag van cellulaire producten vrijkomen. Het doel van deze studie was om te onderzoeken of er een associatie was tussen bewaarduur en het risico op TRALI na transfusie van verschillende productsoorten.

Methoden: De bewaarduur van bloedproducten die getransfundeerd zijn binnen zes uur voor het optreden van de eerste symptomen van TRALI werd vergeleken met de bewaarduur van een sample van alle bloedproducten die in dezelfde periode in Nederland werden getransfundeerd. Generalized linear models werden gebruikt om te corrigeren voor mogelijke confounders.

Resultaten: Bewaarduur van erythrocyten en plasma waren vergelijkbaar voor TRALI patiënten en controles. 20 eenheden trombocyten die aan 17 TRALI patiënten gegeven werden waren 1.3 (95% betrouwbaarheidsinterval (BI): 0.58 to 2.1) dagen ouder dan die aan controles werden gegeven. Het relatief risico op TRALI, na het ontvangen van trombocyten die vier of vijf dagen bewaard waren, vergeleken met drie dagen of minder, was 9.3 (95% BI: 1.6 to 177), en nam toe tot 19 (95% BI: 3.3 to 350) na meer dan vijf dagen bewaren.

Conclusie: Transfusie van trombocyten die langer bewaard waren dan drie dagen was geassocieerd met een toegenomen risico op TRALI. Bewaren van plasma tot twee jaar en erythrocyten tot 35 dagen was niet geassocieerd met een toegenomen risico op TRALI.

Tabel: Gemiddelde bewaarduur in dagen voor producten getransfundeerd aan TRALI patiënten en controles.

Alle data zijn gemiddeldes met 95% betrouwbaarheidsinterval, geschat met behulp van generalized linear models met correctie voor jaar van

Product		TRALI patiënten	Controles	Vershil'
Erythrocyten		18 (17 tot 19)	18 (18 tot 18)	-0.24 (-1.2 tot 0.76)
FFP		380 (363 tot 397)	384 (382 tot 385)	-3.8 (-20 tot 13)
Thrombo-cyten	Plasma	5.0 (4.4 tot 5.6)	3.3 (3.3 tot 3.4)	1.7 (0.80 tot 2.5)
	PAS II	4.0 (2.7 tot 5.4)	3.0 (2.9 tot 3.1)	1.0 (-0.36 tot 2.3)
	Totaal	4.5 (3.8 tot 5.2)	3.2 (3.1 tot 3.2)	1.3 (0.58 tot 2.1)

uitgave, soort ziekenhuis (academisch of perifere). Voor thrombocyten werd hier de bewaarvloeistof (plasma of PAS II) en een interactieterm voor bewaarvloeistof en TRALI aan toegevoegd.

* Bewaarduur in TRALI patiënten min bewaarduur in controles.

37 Wetenschappelijk onderzoek Age Of Blood Evaluation (ABLE), een studie naar de effecten van bewaarduur van erythrocyten bij IC patiënten.

Esther Hogervorst, Sanquin Research, Leiden.

Leo van de Watering, Sanquin Research, Leiden. Anneke Brand, Sanquin Research Leiden. Pieter Henny, AMC, Amsterdam.

Inleiding: Erythrocytenconcentraat wordt in Nederland tot maximaal 35 dagen na donatie getransfundeerd. Uit literatuur blijkt dat de erythrocyt verschillende fysische veranderingen ondergaat tijdens de opslagperiode. "Ouder" bloed zou minder effectief kunnen zijn, bv. door verlies van vervormbaarheid, daling van 2,3 DGP en het vrijkomen van cytokinen.

Anemie op de IC komt veel voor. 40-45% van de patiënten ontvangt een erythrocytentransfusie tijdens IC opname. Veel IC patiënten zijn onderhevig aan microcirculatoire pathologie, het doel van de ABLE studie is te kijken of 'verser' bloed betere klinische uitkomsten geeft.

Methode & Materiaal: De ABLE studie is een internationale, dubbelblinde, multi-centrum RCT uitgevoerd in Europa en Canada bestaand uit twee armen. Een waarin patiënten erythrocyten < 8 dagen krijgen en één met transfusie volgens de standaard procedure. Naast het internationale ABLE protocol, zal er een Nederlandse variant (ABLE-NL) van de studie uitgevoerd worden, met dezelfde trialarmen maar met ruimere inclusiecriteria.

ABLE inclusiecriteria: minimaal 48u verwachte beademingsduur (zowel invasief als non-invasief) en een erythrocytentransfusie in de eerste week van IC opname.

Exclusiecriteria: leeftijd < 18jr, terminale aandoening met levensverwachting < 3 mnd, eerdere transfusie in dezelfde opname, electieve (cardio)chirurgie en transfusie van autoloog bloed of > 1 ongekruist erythrocytenconcentraat.

ABLE-NL inclusiecriteria: verwachte beademingsduur van tenminste 24u en erythrocytentransfusie in de eerste week van IC opname.

Exclusiecriteria: gelijk aan die van de internationale ABLE studie echter, electieve (cardio)chirurgische patiënten mogen wel geïncludeerd worden. Het doel is 2500 patiënten te includeren in de ABLE-NL waarvan 400 patiënten mede-participeren in de internationale ABLE-studie. De follow-up is 6 maanden.

Resultaten: Primaire uitkomstmaat is de mortaliteit na 90 dagen. Secundaire uitkomstmaten zijn o.a. de mortaliteit op de IC, het aantal en ernst van MODS, infecties, opnameduur en transfusiële reacties. De Nederlandse studie heeft dezelfde primaire en secundaire eindpunten als de internationale studie met als toevoeging het eindpunt alloimmunisatie. Basale data van de patiënten worden geanalyseerd middels frequentie distributie en uni-variabele beschrijvende statistiek. Statistische analyses worden volgens het "intention-to-treat" principe uitgevoerd.

Conclusie: Uit de literatuur blijkt dat 1) Er in vitro aanwijzingen zijn dat een langere bewaarduur van erythrocyten nadelige gevolgen kan hebben. 2) Observationele studies verbanden rapporteren tussen een langere bewaarduur van erythrocyten en negatieve klinische uitkomstmaten zoals MODS, verhoogde mortaliteit en pneumonieën. 3) Een grote RCT naar dit onderwerp nog nooit eerder is uitgevoerd maar wel noodzakelijk is.

38 Toegepast onderzoek Optimale timing voor het oogsten van perifere stamcellen in kinderen met kanker

*Eric Braakman, Annelous van den Boom, Cynthia So-Osman, Auke Beishuizen, Roel Reddingius, Max van Noesel, Erna Michiels, Michel Zwaan, Ferdinand de Winter, Marry van den Heuvel-Eibrink
Erasmus MC, Erasmus MC - Sophia kindziekenhuis, Sanquin bloedbank regio Zuid-West Nederland*

Inleiding: De standaard methode om stamcellen in het perifere bloed (PBSC) te mobiliseren in kinderen met kanker is middels chemotherapie gevolgd door subcutane toediening van *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Op dit moment zijn er geen gegevens beschikbaar over de optimale timing om PBSC te oogsten. Factoren die medebepalend zijn, betreffen type en stadium van de tumor en de cumulatieve dosis chemotherapie die voorafgaand gegeven wordt. De dag van de aferese procedure wordt bepaald door het aantal leukocyten en het CD34+ cel gehalte in het perifere bloed. Het zou klinisch en economisch gunstig zijn als het ideale moment van aferese voorspeld zou kunnen worden.

Methoden: 152 aferese procedures (1997-2009) in 94 kinderen met kanker zijn retrospectief geanalyseerd (neuroblastoom n=24, Ewing sarcoom n=22, hersentumor n=18, Wilms tumor n=7, kiemcel tumor n=4, acute myeloïde leukemie n=5, M. Hodgkin n=4, anders n=10). Stamcellen werden gemobiliseerd middels cyclofosfamide voorbereiding (n=13) of chemotherapie volgens internationale protocollen (n=81) gevolgd door subcutane G-CSF toediening (10-20 microg/kg/dag). Om de timing van de procedures te kunnen analyseren werd de eerste dag van G-CSF therapie gedefinieerd als dag 1.

Resultaten: In 90/94 patiënten werd de target van 3-5 x 10⁶ CD34+ cellen/kg per geplande transplantatie gehaald. Mediane tijd tot aferese



in alle patiënten was 14 dagen (spreiding 8-34 dagen). Mediane tijd tot het inzamenen van perifere stamcellen na start van G-CSF therapie in de verschillende subgroepen was: neuroblastoom 11 dagen (spreiding 6-29 dagen), Ewing sarcoom 9 dagen (spreiding 7-15 dagen), hersentumor 10 dagen (spreiding 7-15 dagen), Wilms tumor 16.5 dagen (spreiding 9-20 dagen), kiemcel tumor 7.5 dagen (spreiding 6-14 dagen), na cyclofosfamide voorbehandeling was dit 8 dagen (spreiding 8-9 dagen). **Conclusie:** Timing van het oogsten van PBSC in de verschillende tumoren is erg variabel. Het plannen van aferese is het meest eenvoudig in patiënten gediagnosticeerd met Ewing sarcoom of hersentumoren. Timing van aferese kan het best voorspeld worden in patiënten die zijn voorbereid met cyclofosfamide. De variabiliteit in timing bij de andere patiënten pleit voor een individuele aanpak. Wij stellen voor om te starten met het meten van het leukocyten gehalte op dag 5 na het starten van G-CSF therapie, starten met het meten van CD34⁺ cellen in het perifere bloed wanneer het aantal leukocyten groter is dan $2 \times 10^9/l$ en starten met aferese zodra het CD34⁺ gehalte in het perifere bloed hoger is dan $15 \times 10^9/l$.

39 Persistente anti-D productie wordt onderhouden door foetaal RHD microchimerisme

E.P. Verduin^{1,2}, A. Javadi¹, I.T.M. Lindenburg³, D. Oepkes³, E. Lopriore⁴, I.I.N. Doxiadis², A. Brand^{1,2}, H. Schonewille¹

¹ Stichting Sanquin Bloed Voorziening, Divisie Research, Afdeling Transfusiegeneskunde, Leiden, Nederland, ² Afdeling van Immunohematologie en Bloedtransfusie, ³ afdeling Verloskunde, ⁴ afdeling Neonatologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, Nederlands

Introductie: Bloedtransfusies and foetale-maternale bloedingen (FMH) tijdens zwangerschap kunnen aanleiding zijn tot de vorming van moederlijke rode bloed cel (RBC) allo-antistof vorming. Tijdens zwangerschap kunnen antistoffen van de IgG klasse de placenta passeren en bij de foetus leiden tot anemie en hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene (HZFP). In meer dan 80% van de gevallen is anti-D de veroorzaker van HZFP.

De LOTUS studie (LONg Term follow-Up after intrauterine transfusionS) is een samenwerking van Stichting Sanquin Bloed Voorziening en het LUMC; de afdelingen Verloskunde, Neonatologie en Immunohematologie & Bloedtransfusie. Wij zijn op zoek naar verschillende factoren die het ontstaan en persisteren van RBC antistoffen, bij moeders wiens kind een IUT hebben ondergaan, kunnen verklaren. Een van de hypothesen is dat zwangerschaps-geïnduceerde D-antistoffen worden onderhouden door langdurend foetaal RHD microchimerismen.

Methoden: Alle vrouwen (n=340) and hun levend geboren kinderen(n=395) die zijn behandeld met IUT voor HZFP in het LUMC tussen 1987 en 2008 zijn uitgenodigd voor deelname. Na informed consent hebben we bloed of slijmvlies monsters afgenomen. RBC antigeen profielen en antistoffen zijn bepaald. Data over RBC antigeenprofielen van IUT donoren werd uit de Sanquin database gehaald. Van alle maternale antistoffen werd het luxerende antigeen (IUT donor of foetus) bepaald. RHD foetaal microchimerisme werd bepaald door singleplex RT Q-PCR

assay voor exon 5 en exon 7.

Results: Bloed monsters van 263 moeders met 546 historisch antistoffen en een mediane follow-up (FU) na laatste IUT zwangerschap van 8.5 jaar (0-23.5) zijn getest. Het algemene antistof persistentie percentage was 81%; antistoffen verantwoordelijk voor de HZFP persisteerden in 98% and IUT-donor geïnduceerde antistoffen in 6%. Non-HZFP foetaal geïnduceerde antistoffen hebben een 8 keer hogere kans om te persisteren vergeleken met IUT donor geïnduceerde antistoffen (OR 7.9; 95%CI 3.2-19.4). De mediane persisterende anti-D titer bij 205 vrouwen was 500 (4-32.000) onafhankelijk van de FU.

DNA monsters van 163 RhD negatieve moeders met persisterende anti-D zijn getest op RhD gen: exon 5 en 7. In 43 (26%) vrouwen werd geen van beide exonen gedetecteerd. In 49 (30%) van de vrouwen werd slechts 1 exon aangetoond en in 70 (43%) van de vrouwen werden beide exonen aangetoond.

Conclusie: Foetaal geïnduceerde alloantistoffen persisteren significant langer dan IUT-donor geïnduceerde antistoffen. Ruim 40% van de vrouwen met persisterende anti-D is aantoonbaar chimeer voor RHD. De hoge persisterende anti-D titer suggereert een continue alloimmun B cel response, mogelijk onderhouden door foetaal RHD microchimerisme.

40 Toegepast onderzoek

Onderzoek naar de waarde van het gewicht en hematocriet bij de berekening van het te wisselen plasmavolume bij therapeutische plasmaferese.

C. van Bree, J. Drenth, R.M.H. Kivit, T. Huynh, W.M. Smid en J.Th.M. de Wolf

Klinisch Consultatieve Dienst en afdeling therapeutische aferese Sanquin Bloedbank Noord-Oost

Doel: In richtlijnen wordt vaak geadviseerd om 35 ml/kg plasmavolume te wisselen, waarbij wordt uitgegaan van een bloedvolume (BV) van 65 - 70 ml/kg, en een Ht van 0,40. In dit onderzoek is gekeken naar de waarde van het gewicht (G) en hematocriet (Ht) bij de berekening van het te wisselen plasmavolume bij therapeutische plasmaferese (TPF).

Materiaal en methode: Bij 171 patiënten werden 1451 TPF verricht. Het BV werd berekend volgens de gouden standaard van Nadler (BV-Na, man: $(336,9 \times L^3) + (32,19 \times G) + 604$; vrouw: $(356,1 \times L^3) + (33,08 \times G) + 183,3$; G in kg, L in m) en volgens het richtgetal 70 ml/kg (BV-R). Het plasmavolume (PV) werd berekend door het BV te vermenigvuldigen met $(1 - Ht_{\text{voorafere}})$ en met het richtgetal 35 ml/kg (PV-R). Er werd een onderverdeling gemaakt met de body mass index (BMI = G/L^2), waarbij ondergewicht gedefinieerd is als BMI < 18,5 (groep (Gr)-1), normaal gewicht als BMI 18,5 - 24,9 (Gr-2), overgewicht als BMI 25 - 29,9 (Gr-3), obesitas als BMI 30 - 39,9 (Gr-4).

Resultaten: Het BV-R is in Gr-1: $86 \pm 3\%$ van het BV-NA, in Gr-2: $104 \pm 6\%$, in Gr-3: $113 \pm 6\%$ en in Gr-4: $126 \pm 7\%$. Indien voor de berekening van het BV 80 ml/kg voor Gr-1 wordt aangehouden, 70 ml/kg voor Gr-2, 65 ml/kg voor Gr-3 en 55 ml/kg voor Gr-4 dan zijn de berekende BV per groep resp. $99 \pm 3\%$, $104 \pm 6\%$, $105 \pm 5\%$ en $99 \pm 6\%$ van de BV-NA. Het PV berekend met het BV-NA is in Gr-1: 62 ± 6 ml/kg, in Gr-2: $51 \pm$

4 ml/kg, in Gr-3: 46 ± 4 ml/kg en in Gr-4: 41 ± 2 ml/kg. Als bij de berekening van het plasmavolume uitgegaan wordt van het BV berekend met de richtgetallen op basis van de BMI (resp. 80-, 70-, 65- en 55 ml/kg voor de diverse groepen) dan komt men uit op een plasmavolume vergelijkbaar met PV-Na

Conclusie: Een forse onderschatting van het plasmavolume kan worden voorkomen als rekening wordt gehouden met BMI en Ht. Een bloedvolume van 80 ml/kg bij Gr-1, 70 ml/kg bij Gr-2, 65 ml/kg bij Gr-3 en 55 ml/kg bij Gr-4 benadert het bloedvolume volgens Nadler goed. Het plasmavolume kan worden berekend door dit bloedvolume te vermenigvuldigen met 1-Ht. Het lijkt tevens reëler om te adviseren 1 of 1.5x het plasmavolume te wisselen in plaats van 30 of 50 ml/kg.

41 Wetenschappelijk onderzoek

Pneumatic tube transport of platelet concentrates does not affect *in vitro* platelet function.

Henskens Y. M.C.* , Lancé M. D.#, Theunissen H.M.S.#, Oerle van R, Marcus M.A.E.#

* Hematological Laboratory, # Department of Anesthesiology and Pain Management University Hospital Maastricht, The Netherlands.

Background: Pneumatic tube systems (PTS) reduce workload and turnaround time in modern laboratories. PTS is used for transport of blood specimens since the seventies. However, it would be very efficient to use tube transport also for blood components for transfusion purpose. The acceleration and deceleration of PTS can cause hemolysis in red blood cell concentrates and activation or reduced function of platelets in concentrates (PC's). We investigated *in vitro* platelet function and activation in fresh and aged (non)radiated PC's before and after PTS.

Materials and Methods: Twelve random pooled platelet concentrates, each pooled from 5 healthy donors (6 radiated, 6 non-radiated) were transported once with PTS on day 2 and 7 after collection. The PTS (ErgoTrans) generates a maximum speed of 8 m/s and has a transport time between 83 and 110 seconds. Before and after transport, platelet parameters were measured: platelet count, MPV (Beckman Coulter, LH-750); pH, glucose, lactate (Chiron bloodgas analyzer); optical aggregation (Chronolog aggregometer, collagen 4µg/ml, TRAP 30µM, ADP 10µM, arachidonic acid 1mM), impedance aggregation (Multiplate™ collagen 3,2µg/ml, TRAP 32µM, ADP 6,5µM, ASPI 1mM); CD62 (Coulter Epics XL, Beckman Coulter); microparticles ((ZYMUPHEN, MP-activity kit). Statistical analysis were performed by SPSS 15 using Wilcoxon signed ranks analysis.

Results: Pneumatic tube transport of PC's on day 2 or day 7 did not affect any of the platelet parameters measured. This in contrast to storage. PC's on day 7 showed significantly lower ADP and collagen activated aggregation and more CD62 expression and higher levels of microparticles compared to day 2.

Conclusion: No significant changes *in vitro* platelet function or signs of platelet activation were seen after single pneumatic tube transport of 12 platelet concentrates (aged 2 or 7 days). Aging of platelets does reduce *in vitro* platelet function and increases markers of platelet activation significant.

42 Toegepast onderzoek

Wat heeft hemovigilantie ons gebracht?

A.M. van den Boogaard- van der Maat en R. Geelen- Geboers², J.L.P. van Duijnhoven¹

¹ Elkerliek ziekenhuis, Klinisch Chemicus en hemovigilantie functionaris, Helmond

² Elkerliek ziekenhuis, hemovigilantiemedewerkers, Helmond, hemovigilantie@elkerliek.nl

Inleiding: Sinds januari 2007 zijn twee parttime hemovigilantiemedewerkers (totaal 0,5 FTE) aangesteld om de bloedtransfusie keten te monitoren. Na signalering van problemen mede op basis van VIM-meldingen of mogelijkheden die voor verbetering vatbaar waren in de keten werden diverse kleine verbeteringen doorgevoerd die na evaluatie succesvol bleken. Daarnaast zijn in de jaren hierna grotere veranderingen gestart en de effecten hiervan werden systematisch met enkele meetbare interne procesindicatoren gevolgd.

Doel: Het aantoonbaar maken van de effecten van de interventies in de bloedtransfusieketen door hemovigilantie door structurele jaarlijkse monitoring van de interne procesindicatoren.

Werkwijze: Voor het aanleveren van data voor uitwerken van de procesindicatoren is in nauw overleg met de ICT afdeling van het (transfusie)laboratorium, een dataset samengesteld. Hiernaast werd ook gebruik gemaakt van LIS functies om o.a. aantallen en patiëntencategorieën per tijdseenheid op te roepen. Het moment van de eventuele interventies zijn vastgelegd en in relatie gebracht met het verloop van de procesindicatoren.

Resultaten: De volgende tabel met resultaten zijn tot stand gekomen in het Elkerliek ziekenhuis bij ongewijzigde structuur en patiëntenmix. Interventies, verwijzend naar de indicator:

1: In 2007 onderwijs aan specialisten over hoe het streef-Hb te bepalen. In 2008 is de 4-5-6 Flexinorm opgenomen in de medische protocollen. Het 'Sneller Beter' project 'Verminderen onterecht bloedverbruik' is ziekenhuisbreed ingevoerd. Hierna werd regelmatig feedback geleverd indien het Hb na transfusie, boven het streef Hb was. Dit resulteerde in een jaarlijks verminderd bloedverbruik ondanks een lichte toename van de OK-verrichtingen en oncologie.

2 en 3: Deze nieuwe CBO indicatoren laten zien dat het in het Elkerliek weer nodig is om aandacht te schenken aan het meten van de trombocytenwaarde voor en na een trombocytentransfusie en van de aPTT en PT voor en na een plasmatransfusie.

4, 5 en 6: Aanpassingen van procedures, tussentijdse voorraadaanpassingen en sinds 2009 onderwijs aan verpleegkundigen heeft geresulteerd in minder bloedverspilling.

7 en 8: Reductie van het verbruik van ECs heeft ertoe geleid dat meer ECs met bloedgroep A-neg en O-neg, vanaf 8 dagen voor de verloopdatum, compatibel aan patiënten zijn gegeven in plaats van identiek. Indien dit percentage stijgt, wordt de voorraad verminderd. In 2009 werd het hogere percentage O-neg mede veroorzaakt door levering van producten met een kortere houdbaarheidsdatum i.v.m. de Mexicaanse griep. Helaas kan de voorraad O-neg ECs niet verder worden verminderd.



	Procesindicator	2007	2008	2009	2010
1	Percentage EC transfusies bij volwassenen met Hb > 6,5 mmol/L binnen 24 uur na transfusie of niet gemeten t.o.v. het totaal	40%	37%	30%	28%
2	Percentage trombocytentransfusies waarbij < 30 uur pretransfusie en/of < 30 uur posttransfusie geen trombocytewaarde is gemeten t.o.v. totaal (bij hemato-oncologische patiënten)	36%	34%	22%	41%
3	Percentage plasmatransfusies > 24 uur na opname waarbij < 30 uur pretransfusie en/of < 30 uur posttransfusie de aPTT en PT niet gemeten zijn t.o.v. het totaal	45%	41%	37%	52%
4	Percentage niet toegediende ECs t.o.v. totaal	1.6%	0.8%	1.0%	0.4%
5	Percentage niet toegediende trombocyt eenheden t.o.v. totaal	5.7%	2%	5%	0.9%
6	Percentage niet toegediende plasma eenheden t.o.v. totaal	12.5%	11.8%	17.7%	2.1%
7	Percentage O-neg EC transfusies die bloedgroep compatibel uitgegeven zijn omdat deze < 8 dagen houdbaar waren t.o.v. het totaal	24%	22%	40%	21%
8	Percentage A-neg EC transfusies die bloedgroep compatibel uitgegeven zijn omdat ze < 8 dagen houdbaar waren t.o.v. het totaal	6%	5%	9%	21%
9	Percentage getransfundeerde ECs t. o. v. het aantal gereserveerde ECs (efficiency)	55%	59%	59%	63%
10	Percentage transfusies tussen 17:00 - 8:00 uur t.o.v. het totaal	38%	37%	34%	30%

9: Na onderzoek wordt sinds 2007 (bijna) geen bloed meer aangevraagd bij een heup of knie operatie, enkel kruisbloed afgenomen. In 2010 is de bloedbestellijst geactualiseerd en opgenomen in de medische protocollen.

10: In 2007 is begonnen met regelmatig controleren en geven van feed-

back en advies, indien mogelijk onnodig bloed in de avond- en nachturen word getransfundeerd. Dit o.a. door middel van het toesturen van overzichtelijke grafieken aan de aanvragers.

Discussie: Door het monitoren van de relatief eenvoudig meetbare interne indicatoren kan snel inzichtelijk worden gemaakt of de interventie het gewenste effect heeft. Feedback heeft extra aandacht nodig en bepaalt dan vooral het succes van de interventie. De professionals worden zo voorzien van een gedetailleerd en specifiek overzicht over de bloedtransfusie aanvragen en uitkomsten.

Succes is mede behaald door een goed toegankelijke database, de aanwezigheid van hemovigilantie-functionaris/medewerkers en steun van de transfusiecommissie. Dit is ook voor het ziekenhuis van grote waarde door verlaging van risico's en door kostenbesparing, wat een stimulans kan zijn om een hemovigilantiemedewerker aan te stellen of te behouden.

Conclusie: Hemovigilantie kan een uiterst doeltreffende bijdrage leveren aan efficiency en kwaliteitsverbetering van bloedtransfusie binnen een ziekenhuis. Naast de CCKL-accreditatie van de bloedtransfusie laboratoria en de NIAZ-accreditatie van de ziekenhuizen is echter aansluiting met een goed kwaliteitssysteem en audits van Sanquin bloedvoorziening noodzakelijk om te komen tot een "van vene tot vene" hemovigilantie.

43 Toegepast onderzoek

Bewaking van de bewaartemperatuur van erythrocytenconcentraten door middel van temperatuurgevoelige tags.

I.H.M van Rooyen-Schreurs, G.J. van den Akker, S.S Zeerleder, J.H. Klinkspoor.

Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

Inleiding: Tijdens een visitatie door CCKL/RvA van ons laboratorium werd geconstateerd dat van geretourneerde erythrocytenconcentraten niet voldoende gegarandeerd kon worden dat deze gekoeld waren bewaard en veilig konden worden teruggeboekt. Deze studie had als doel te onderzoeken of de bewaartemperatuur van bloedproducten bewaakt kan worden door middel van temperatuurgevoelige tags (3M MonitorMark).

Methoden: De 3M MonitorMark tag bevat een reservoir met kleurstof en vertoont bij blootstelling aan temperaturen boven 10 °C een verkleuring van het eerste afleesvenster die in een getalswaarde kan worden uitgedrukt door de migratie van de kleurstof te meten (in mm). De reproduceerbaarheid van de verkleuring werd getest met behulp van erythrocytenconcentraten die bij verschillende temperaturen werden bewaard. De bruikbaarheid van de tags werd in de praktijk getest door erythrocytenconcentraten voor uitgifte te labelen en bij de retour gekomen producten de verkleuring van de tags te meten.

Resultaten: De verkleuring van de MonitorMark tag treedt geleidelijk en reproduceerbaar op met het oplopen van de tijd en de temperatuur. Uit onze testen is gebleken dat, er van uit gaande dat een erythrocytenconcentraat maximaal een uur bij kamertemperatuur mag worden bewaard, het afleesvenster maximaal 3 mm verkleurd mag zijn.

Tijdens een pilot-studie, waarbij producten voor het OK programma en de IC werden gelabeld, bleek dat bijna 50% (44 van de 89) van de retour gekomen producten niet optimaal bewaard was (44 van de 89). Vervolgens is gestart met een uitgebreid onderzoek, waarbij gedurende 7 weken de uitgegeven erythrocytenconcentraten werden voorzien van een tag. Van de circa 1900 producten zijn er 538 retour gekomen (28.3%) en bij 144 (26.8%) liet de tag een verkleuring van > 3 mm zien. De meeste producten waren afkomstig van de OK, SEH en IC. Vooral wanneer bloedzakken van de ene afdeling werden doorgegeven naar een volgende afdeling bleken de tags verkleurd.

Conclusie/discussie: Door middel van temperatuurgevoelige tags hebben wij aangetoond dat het aantal producten dat op jaarbasis in het AMC buiten het laboratorium niet gekoeld bewaard wordt > 1100 stuks betreft. Deze producten zouden moeten worden vernietigd. Om dit te voorkomen zal er een striktere limiet moeten worden gesteld aan het aantal bloedzakken dat tegelijk opgehaald mag en aan de retourtermijn. Tevens zal het transport van de producten naar de afdelingen worden geoptimaliseerd m.b.v. koelboxen en de opslag in koelkasten op de afdeling beter worden gecontroleerd. Door regelmatige bijscholing en audits zal de betrokkenheid van de afdelingen worden verbeterd.

44 Toegepast onderzoek

Potentiële effectiviteit van TRIX om incidenten in de transfusieketen te voorkomen; retrospectieve analyse van meldingen aan TRIP

K. Spijker¹, J.C. Wiersum-Osselton¹, A.J.W. van Tilborgh¹, P.Y. Zijker-Jansen¹, K.M. Mangundap¹, I. Streefkerk-Reenalda², M.H. Beunis², M.R. Schipperus¹

¹ TRIP Landelijk Hemovigilantie Bureau, Den Haag, info@tripnet.nl

² Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Voor het selecteren van bloed voor een bloedtransfusie is het belangrijk om rekening te houden met eerder aangetoonde irregulaire antistoffen of specifieke transfusie-adviezen. Door de toegenomen mobiliteit van patiënten is het belangrijk om relevante transfusie-informatie uit het verleden dusdanig te registreren dat andere ziekenhuizen ook beschikking hebben over deze gegevens. TRIX (Transfusie Register Irregulaire antistoffen en X (kruis)-proefproblemen) is een landelijke database voor irregulaire antistoffen, IgA-deficiëntie, transplantaties en kruisproefproblemen.

Meldingen van transfusiereacties en van incidenten in de transfusieketen worden in Nederland geregistreerd door het TRIP (Transfusie Reacties in Patiënten) Landelijk Hemovigilantie Bureau. In de TRIP database is geïnventariseerd welke meldingen voorkomen hadden kunnen worden als TRIX volledig operationeel geweest zou zijn.

Methode: Alle TRIP-meldingen 2005 t/m 2009 in de categorie 'verkeerd bloedproduct toegediend' en 'overig incident' zijn geanalyseerd. Getoetst is of er sprake was van informatie die in TRIX geregistreerd wordt, die een incident had kunnen voorkomen; de door TRIX vermijdbare meldingen.

Resultaten: Van 2005-9 waren er in totaal 20 meldingen die voorkomen

hadden kunnen worden met TRIX (zie tabel 1). Bij 13 meldingen was er eerder een antistof aangetoond, onbekend in het betreffende ziekenhuis en niet meer aantoonbaar in de screening. In 7 meldingen betrof het een patiënt met een eerdere hematopoëtische stamceltransplantatie (SCT) waarbij het transfusieadvies niet is gevolgd en geen volledige kruisproef is uitgevoerd of ten onrechte onbestraalde of niet Parvovirus B19-veilige producten zijn geselecteerd. Bij 5 meldingen is bij spoedtransfusie ongekruid bloed toegediend, maar hadden door TRIX raadpleging antistofcompatibele producten geselecteerd kunnen worden. In totaal is bij deze 20 meldingen 7 keer een transfusiereactie gemeld (vijfmaal een vertraagde hemolytische transfusiereactie, 1x nieuwe antistofvorming en 1x een milde koortsreactie).

45 Casuïstiek

Aortaboog reconstructie bij een patiënt met koude agglutininen (anti-IH): serologisch en klinisch beloop

I. Hubeek¹, H. ter Heide², W. W. van Solinge¹, K.M.K. de Vooght¹

¹Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, ²Afdeling Kindercardiologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht.

Inleiding: Bij een 7-jarige jongen werd preoperatief serologisch onderzoek aangevraagd. De geplande aortaboog reconstructie zou onder circulatoir arrest en diepe hypothermie (tot 18°C) plaatsvinden. Hoewel het pre-operatief uitvoeren van een screening op koude antistoffen bij cardio-pulmonaire bypass procedures controversieel is, wordt deze screening bij kinderen die diep onderkoeld worden toch nog vaak uitgevoerd. In het plasma van de patiënt werd een koude agglutinine gevonden. De behandelend arts wilde weten of en wanneer de ingreep kon plaatsvinden.

Methoden: Bloedgroepbepaling en irregulaire antistofscreening werden uitgevoerd in de Liss techniek (Ortho). Koude antistofscreening en titerbepaling werden uitgevoerd in de zout techniek.

Resultaten: De patiënt was O positief en de irregulaire antistof screening was negatief. De koude antistofscreening liet een koude auto-antistof met specificiteit tegen het IH-antigeen zien, met reactiviteit tot 28°C (titer 1:2). Sterke koude auto-antistoffen I(H) worden meestal gevonden na infecties en zijn over het algemeen self-limiting. Het risico van een operatie onder circulatoir arrest en diepe hypothermie in aanwezigheid van deze antistof was onvoldoende in te schatten en de operatie werd uitgesteld. De aanwezigheid en titer van de anti-IH antistof werd periodiek vervolgd. Na 3 maanden was de anti-IH antistof nog aantoonbaar tot 24°C (titer 1:1). Reactiviteit tot 22°C kon na 5 maanden nog worden aangetoond. Dit bleek ook na 7 maanden nog het geval te zijn. Hierop werd besloten de operatie uit te voeren, maar de patiënt minder diep te koelen (tot 24.9°C). De operatie verliep ongecompliceerd.

Conclusie: Koude auto-antistoffen IH kunnen problemen veroorzaken bij patiënten die sterk gekoeld worden voor een cardio-pulmonaire bypass procedure. Indien uitstel van OK mogelijk is, kan gewacht worden totdat de antistof minder reactief is. Anti-IH antistoffen kunnen lang



persisteren. Periodiek vervolgen van reactiviteit en titer kan van belang zijn om vast te stellen wanneer een patiënt veilig geopereerd kan worden.

46 Casuïstiek

Herhaalde ernstige transfusiële reacties; relatie met AnWj-antistoffen

BA de Boer¹, L Porcelijn², MMW Koopman², V Wiedijk¹, K Goozen¹, FHM Cluitmans¹, A Brand³ en CC Folman²

¹ Rijnland Ziekenhuis, Leiderdorp, ² Sanquin, Amsterdam, ³ Sanquin, Leiden

Casus: Een 86 jarige patiënt met status na Burkitt lymfoom (6 jaar geleden) werd vanwege een symptomatische anemie getransfundeerd. Uit serologisch onderzoek volgde dat er warme hemolysinen aantoonbaar waren, auto antistoffen tegen het e antigeen en antistoffen die waarschijnlijk gericht waren tegen een antigeen met een hoge frequentie. De specificiteit was op dat moment niet vast te stellen. Het was niet mogelijk eenheden te selecteren met een negatieve kruisproef. De patiënt werd zo compatibel mogelijk, onder bewaking getransfundeerd. Tijdens het inlopen van het erythrocytenconcentraat (EC) kreeg de patiënt een ernstige transfusiële reactie graad III gekenmerkt door benauwdheid met saturatiedaling, heftige koude rillingen en shock. Hb bleef onveranderd 4,1 mmol/L en er waren geen tekenen van hemolyse. Vervolgtransfusie vond plaats onder premedicatie met tavegil (1 mg) en hydrocortison (100 mg). Patiënt ontwikkelde wederom een transfusiële reactie (graad II), maar nu met duidelijke symptomen van hemolyse. Een IgA deficiëntie werd uitgesloten. Vervolgtransfusies werden gestart onder premedicatie en gewassen EC's. Meerdere concentraten werden probleemloos gegeven, anderen veroorzaakten wederom een transfusiële reactie. De premedicatie werd uitgebreid met IVIG, bij gebruik van gewassen EC's en langzaam transfunderen traden hierna geen transfusiële reacties meer op. Wel werd een stijging van de hemolyse parameters waargenomen, overigens met goede opbrengst van de transfusie.

Resultaat serologisch onderzoek: Tijdens het serologisch vervolgonderzoek werd vastgesteld dat de antistoffen in het serum van de patiënt gericht waren tegen het AnWj antigeen. Dit antigeen komt met een hoge frequentie voor. Bekend is dat antistoffen tegen dit antigeen met name gevonden worden bij patiënten die een (tijdelijke) onderdrukking hebben van het eigen AnWj antigeen. Antistoffen tegen AnWj kunnen afbraak geven van AnWj positieve erythrocyten en ernstige transfusiële reacties zijn beschreven. Voor transfusie is het dan ook geïndiceerd om AnWj-negatieve erythrocyten te selecteren. Echter, deze eenheden zijn zeer zeldzaam. Een alternatief zijn erythrocyten met het Inlu fenotype. Naast een verzwakte expressie van de Lu antigenen is er ook een onderdrukking van andere antigenen waaronder het AnWj antigeen. Ook deze donors zijn echter zeldzaam wat het verzorgen van een structureel transfusiebeleid bemoeilijkt.

Hoewel de transfusiële reacties zeer waarschijnlijk veroorzaakt werden door de aanwezigheid van de AnWj antistoffen was er geen duidelijke relatie met het optreden van de transfusiële reactie en de sterkte van de antistoffen in het serum.

Conclusie: AnWj antistoffen kunnen leiden tot ernstige transfusiële reacties met variërende mate van hemolyse. Deze reacties kunnen wisselend optreden bij dezelfde patiënt.

47 Casuïstiek

Anti-Landsteiner-Wiener (LW) "in disguise"

IJM van der Linden¹, PC Ligthart², CC Folman², MWA van Driel¹, AAM Ermens¹ en AJ van Gammenen¹

¹Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis, Breda

²Sanquin Diagnostiek, Amsterdam

Inleiding: Bij een 56-jarige AML patiënt worden na talrijke transfusies positieve reacties in de indirecte antiglobuline test (Diamed LISS kolomtechniek) gevonden, passend bij een anti-RhD. Aangezien de patiënt RhD positief is, maar de autocontrole negatief is, wordt gedacht aan een RhD variant bij de patiënt en allo antistoffen anti-RhD en er worden RhD-negatieve eenheden getransfundeerd. Na enkele maanden worden ook enkele positieve reacties gevonden met RhD negatieve testerythrocyten. Bloed van de patiënt wordt opgestuurd naar Sanquin voor vervolgonderzoek.

Methode: Onderzoek naar irregulaire antistoffen is verricht in de indirecte antiglobuline test met toevoeging van PEG. Een eluaat van de erythrocyten van de patiënt is gemaakt met behulp van zure elutie (Elukit, Immucor). De antigeentyping is verricht met monoclonale reagentia. De aanwezigheid van afwijkingen in het RHD gen zijn onderzocht met een MPX PCR techniek.

Resultaten: De antistoffen in serum en eluaat zijn reactief met alle testerythrocyten maar reageren sterker met RhD positieve dan met RhD negatieve testerythrocyten. De antistoffen zijn niet reactief met een RhD positieve, Landsteiner-Wiener (LW) negatieve testerythrocyt. Het DNA onderzoek laat geen afwijkingen van het RHD gen zien. Op grond van deze resultaten kon de aanwezigheid van anti-RhD antistoffen uitgesloten worden. Het reactiepatroon van de antistoffen komt overeen met een anti-LW. Het LW antigeen komt met een hoge frequentie voor en komt sterker tot expressie op RhD positieve dan op RhD negatieve erythrocyten. De erythrocyten van de patiënt zelf hebben een sterk verminderde expressie van het LW antigeen. Geconcludeerd wordt dat de patiënt autoantistoffen heeft tegen het LW antigeen.

Discussie: De vorming van (auto) antistoffen tegen LW in combinatie met onderdrukking van het LW antigeen komt niet vaak voor. Het is doorgaans van voorbijgaande aard en meestal gerelateerd aan ziekte, zoals bijvoorbeeld AML. Serologisch kan een anti-LW verward worden met een anti-RhD. Bij de aanwezigheid van sterke antistoffen tegen LW kan ook het uitsluiten van klinische belangrijke antistoffen moeilijk zijn aangezien alle testerythrocyten dan reactief zijn. Er zijn geen ernstige hemolytische transfusiële reacties beschreven door anti-LW en er kan dan ook worden volstaan met het selecteren van RhD negatieve erythrocytenconcentraten, mits alle andere klinisch belangrijke antistoffen zijn uitgesloten.

Conclusie: Wanneer het patroon van een anti-RhD bij een RhD posi-

tieve patiënt wordt gevonden dient men, naast een auto anti-RhD en een RhD variant, tevens aan antistoffen tegen LW te denken.

48 Casuïstiek

Patiënte met kruisproblemen door antistoffen tegen k bij een hemorragische shock

A.H. Huistede-Oude heuvel¹, E. Adema², A. Ozdemir¹ en J. Slomp¹
¹Medisch Spectrum Twente ²Sanquin Bloedbank regio NO

Casus: Bij een patiënte (O RhDneg en in het verleden bekend met auto anti-I) werd na een val met een femurfractuur links, chirurgisch een gamma-nail geplaatst. Vanwege het adequate Hb en verwachte geringe bloedverlies bij OK werd er geen antistofscreening aangevraagd. Een dag na OK ontstond door verbloeding een hemorragische shock (Hb 2.8 mmol/l) en volgde opname op de IC. Het 3-cells screeningspaneel en het 11-cells identificatiepaneel gaven voor alle cellen 3+ reacties. De autocontrole was negatief met ook een volledig negatief paneel van papaïne behandelde cellen (Diamed). Differentiaal diagnostisch werd er gedacht aan antistof tegen een hoog frequent antigeen, de anti-I, een combinatie van antistoffen of een reactie met het reagens.

De aanwezigheid van (auto) anti I was niet waarschijnlijk vanwege de negatieve autocontrole en de 2+ reactie (IgG) met navelstrengbloed. Voor verdere identificatie van de antistof(fen), werd een fenotypering van de patiënte uitgevoerd (ccdee/K+/Fy(a+b-)/Jk(a-b+)/MNSs/Le(a-b+)).

Vanwege de klinische situatie van de patiënte waren er acuut erythrocyten concentraten nodig. Deze werden ongekruid toegediend en op basis van het fenotype (O, RhD-neg, Rhfenotype compatibel en Fy(b)/Jk(a) negatief). De 2 eenheden gaven een Hb stijging van 0,5 mmol/l, met een 2+ reactie in de kruisproef. Er was minimale hemolyse op basis van het LD, bilirubine en haptoglobine.

Op basis van de typeringsresultaten werd gedacht aan k antistoffen. De k antistoffen werden aangetoond en de meest voorkomende andere klinisch belangrijke allo-antistoffen werden uitgesloten. Bij Sanquin waren geen O RhD-negatieve, k negatieve zakken in voorraad. Er werden daarom 2 eenheden uit de Sanquin Bank of Frozen Blood opgevraagd en toegediend waarop het Hb steeg van 3.4 naar 5.4 mmol/l.

Beschouwing: In de acute fase is het lastig om compatibele eenheden te selecteren voor patiënten met nog onbekende antistoffen tegen hoog frequente antigenen en complexe resultaten in het identificatiepaneel. Een uitgebreide fenotypering kan hierbij behulpzaam zijn. De negatieve reacties in de Diamed kolomtechniek met papaïne behandelde cellen zorgden voor verwarring, omdat Kell antigenen (K/k) op deze cellen aanwezig blijven. De k antistoffen reageerden wel positief in een indirecte antiglobuline test met enzymbehandelde cellen met zowel kolomtechniek als buisjesmethode (Coombstechniek). Een evaluatie van verschillende sera met anti-K of anti-k liet wisselend positieve reacties zien in de kolomtechniek met papaïne behandelde cellen, terwijl deze antisera altijd positief reageerden met enzym-behandelde cellen in een kolomtechniek met anti-humaan globuline reagens. Een tijdige en goede communicatie met de aanvrager en Sanquin zorgt voor meer mogelijkheden en duidelijkheid over het tijdsplan.

49 Casuïstiek

Een ABO-discrepancie: weet wat je meet en let op de verschillen

J. Veenhof-Nout, C. Eijnsink, E.C.M. van Pampus, A.G. van den Bos
 Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen

Inleiding: een discrepantie tussen de resultaten van de ABO bloedgroep op de erythrocyten en in het plasma kan worden veroorzaakt door de aanwezigheid van koude antistoffen, (sterke) irregulaire antistoffen, pseudoagglutinatie, een subgroep, chimerisme, of een verworven antigeen.

Casus: bij de ABO-bepaling (BioVue, Innova) van een 65 jarige vrouw, bloedgroep B, Rhesus D positief, werd een onverwacht positieve reactie met de B erythrocyten gezien, ook na herhaling in de buisjesmethode. De screening op irregulaire bloedgroep antistoffen was negatief (Innova en BioVue kamertemperatuur). Screening in de buisjesmethode gaf (+) reacties, die berustten op pseudoagglutinatie, de anti-geldrol techniek was negatief; patiënt bleek een sterk verhoogd IgM te hebben.

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D	ctr	A ₁ ery	B ery
Innova	-	4+	nb	4+	-	4+	4+
Buisjes	-	4+	4+	nb	-	4+	3+

Een B-subgroep was niet aannemelijk: de reactiesterkte na incubatie van patiënten erythrocyten met serum van O en A donoren was even sterk positief als die met commercieel anti-B. Om een al dan niet specifieke reactie met de testerythrocyten te onderzoeken werd een PEG-adsorptie met A1 en B donorerythrocyten uitgevoerd. Het geadsorbeerde serum reageerde in beide gevallen zowel met de A1 als de B testerythrocyten (Ortho, BioVue); de kruisproef met de A resp. B adsorptiedonor was echter negatief. De onverklaarde reactie trad dus uitsluitend op met de testerythrocyten van de firma Ortho. Herhaling van de ABO bloedgroep bepaling met andere testerythrocyten (Biotest) gaf een positieve reactie met A₁ erythrocyten, de reactie met de B testerythrocyten was negatief, passend bij de bloedgroep B. In onze routine gebruiken wij screeningscellen van de firma Biotest, terwijl voor de bloedgroep erythrocyten van de firma Ortho worden gebruikt. Daardoor werd het probleem 'zichtbaar' bij de bloedgroep, niet bij de routine screening. Om deze hypothese te bevestigen werd een screening ingezet met screeningscellen van Ortho: deze gaf een 2+ reactie.

Conclusie: deze casus beschrijft een alternatieve oorzaak van een bloedgroep discrepantie. Het serum van de patiënt reageerde vals-positief met B erythrocyten van de firma Ortho, waarschijnlijk door antistoffen tegen een bestanddeel van de bewaarvloeistof¹. Bij een discrepantie tussen de resultaten van de ABO bloedgroep op de erythrocyten en in het plasma moet men bedacht zijn op een bewaarvloeistof probleem. Herhaling van de bepaling met andere testcellen of donor erythrocyten geeft vaak de oplossing van het probleem.

¹G.Garratty. In vitro reactions with red blood cells that are not due to blood group antibodies: a review. *Immunohematology* 1998;14: 3-13



50 Wetenschappelijk onderzoek

Persistierend A antigeen na stamceltransplantatie van een bloedgroep A patiënt met een niet-A donor

Karen M.K. de Vooght¹, Roger E.G. Schutgens² en Wouter W. van Solinge¹

¹Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, ²Afdeling Haematologie/Van Creveldkliniek, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht

Inleiding/doel: In de praktijk blijkt dat bij sommige patiënten die een ABO-incompatibele stamceltransplantatie (SCT) ondergaan, zelfs na jaren, nog een persistierend patiënt A en/of B antigeen kan worden aangetoond, ondanks dat er sprake is van 100% witte bloedcel donor chimerisme. Dit kan een behoorlijke impact hebben op de patiënt (angst dat de transplantatie niet geslaagd is of dat er sprake is van een recidief) en kan de kwaliteit van leven nadelig beïnvloeden. Er is weinig bekend over de mogelijke oorzaken van een persistierend patiënt antigeen, waardoor het voor een behandelend arts moeilijk is om de patiënt op de juiste manier voor te lichten. Het doel van deze studie is om de verschillende oorzaken voor en de klinische relevantie van een persistierend patiënt A antigeen na een SCT te onderzoeken.

Methoden: Literatuuronderzoek met behulp van PubMed and standaardwerken op het gebied van bloedtransfusie.

Resultaten: Wij zien gemiddeld 5 patiënten per 70 patiënten per jaar met een persistierend patiënt ABO bloedgroep antigen (vaak bloedgroep A) na een SCT. Een van de oorzaken hiervoor zou kunnen zijn dat er een verschil is in witte en rode bloedcel chimerisme. Een andere oorzaak kan zijn dat donor B erythrocyten gedeeltelijk omgezet worden in AB erythrocyten. Eerder is bij bloedgroep A en B patiënten die getransfundeerd worden met O bloed aangetoond dat bloedgroep O erythrocyten A en B antigenen kunnen opnemen uit plasma. Een derde benigne oorzaak voor de omzetting van donor B erythrocyten in AB erythrocyten is de aanwezigheid van sterk actieve weefsel A-transferases die in staat zijn om resterend H antigeen op circulerende B erythrocyten om te zetten in A antigeen. Verder kunnen, onder geoptimaliseerde condities, A1-transferases bloedgroep B structuren synthetiseren, en B-transferases A-actieve structuren. Tenslotte kan er naast de bovenvermelde vormen van aberrante A-antigenen, ook sprake zijn van een zwak donor A of B antigeen, zoals dat ook beschreven is in gezonde personen.

Conclusie/discussie: In de literatuur kunnen geen gegevens gevonden worden over de incidentie en de klinische gevolgen van een persistierend ABO antigeen. Echter, behalve 'graft failure', zijn de oorzaken voor een persistierend ABO antigeen, zoals hier beschreven benigne van aard. Hoewel een persistierend ABO antigeen geen klinische relevantie lijkt te hebben, kunnen de psychologische gevolgen voor de patiënt, zoals angst voor 'graft failure' of een recidief, groot zijn. Het is dan ook belangrijk om de patiënt te informeren over de mogelijke oorzaken van dit fenomeen.

51 Casuïstiek

Een mannelijke patiënt met het zeldzame –D– fenotype en verschillende alloantistoffen: een complexe transfusie casus

Karen De Vooght, Ayse Demir, Claudia Folman, Roger Schutgens, Wouter van Solinge, en Hans Kemperman

¹Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht; ²Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Meander Medisch Centrum, Amersfoort; ³Sanquin Diagnostiek, Amsterdam; ⁴Afdeling Haematologie/Van Creveldkliniek, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht

Inleiding/casus: In september 2006 werd een 56-jarige man na een ernstig ongeluk binnengebracht op onze SEH. Stolling- en hematologieparameters waren normaal, m.u.v. een laag hemoglobine (4.9 mmol/L). Zijn bloedgroep werd bepaald als O, Rhesus D positief en de antistofscreening (Diamed) was negatief. De patiënt had een negatieve transfusiehistorie. Twee eenheden erythrocyten werden toegediend. Acht dagen later was het hemoglobine gezakt naar 4.4 mmol/L. De antistofscreening was negatief en er werden twee eenheden erythrocyten toegediend. Na 20 dagen moest de patiënt geopereerd worden. De antistofscreening werd herhaald en bleek positief te zijn met alle drie screeningscellen.

Methoden en resultaten: Antistofidentificatie met meerdere celpanels liet sterk positieve reacties zien met alle cellen, suggestief voor de aanwezigheid van een alloantistof tegen een hoog-frequent antigeen. Aanvullend onderzoek liet zien dat de patiënteneroocyten negatief waren voor C, c, E en e antigenen, wat duidde op de aanwezigheid van het zeldzame –D–/–D– fenotype. Uit adsorptie en elutieassay's bleek dat er sprake was van anti-C, –E, –e, –Ce en –cE alloantistoffen en antistoffen tegen de hoogfrequente antigenen van het RhCcEe polypeptide (anti-Rh17 antistoffen). Verder werden alloantistoffen tegen Jka and Lea aangetoond. Omdat anti-Rh17 en anti-Jka antistoffen tot massale hemolyse kunnen leiden, waren alleen erythrocyten van donoren met het –D– fenotype, negatief voor Jka, geschikt voor transfusie. Er bleken wereldwijd slechts twee geschikte donoren te zijn. Omdat het risico op substantieel bloedverlies klein was, onderging de patiënt de operatie zonder geschikt donorbloed. De patiënt werd geadviseerd om bloed te doneren en dit op te laten slaan bij Sanquin Bank of Frozen Blood (SBFB). In november 2009 werd de patiënt ingepland voor een 'coronary artery bypass graft' operatie. De patiënt zou, bij optimaal gebruik van de 'cellsaver', maximaal 1 eenheid erythrocyten nodig hebben. Vijf weken voor de operatie had de patiënt een hemoglobine van 9.4 mmol/L en kon hij twee verse eenheden erythrocyten doneren. De cardiopulmonary-bypass procedure vond plaats in december 2009. Tijdens de operatie werd 1 eenheid vers autoloog bloed en 400 ml 'cellsaver' bloed toegediend. Het hemoglobine van de patiënt was postoperatief 6.9 mmol/L.

Conclusie/discussie: Tot nu toe is de klinische relevantie van het –D– fenotype vooral beschreven in zwangere vrouwen met milde tot fatale hemolytische ziekte van de pasgeborene. In deze casus beschrijven we voor de eerste keer het transfusie beleid in een patiënt met het

zeldzame –D– fenotype, die anti-Rh17, anti-Le^a en anti-Jk^a antistoffen ontwikkelde ten gevolge van alloimmunisatie na transfusie.

52 Casuïstiek

Een nieuw antigeen met een lage frequentie in het RhAG systeem, oorzaak van HZP

P.C. Ligthart¹, J. Poole², C.C. Folman¹, K.M.K. de Vooght³, M. de Haas¹

¹ Sanquin Diagnostiek, ² IBGRL Bristol, ³ Klinisch chemisch laboratorium UMCU

Casus: In verband met tekenen van hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene werd er voor een pasgeboren baby een wisseltransfusie aangevraagd. De directe antiglobulinetest met de erythrocyten van het kind was positief, echter in een eluaat werden met screeningscellen geen antistoffen aangetoond ook erythrocyten antistof screening bij de moeder was negatief. Zowel het serum van de moeder als het gemaakte eluaat reageerden wel positief met erythrocyten van de vader. Hiermee werd het vermoeden bevestigd dat het hier antistoffen betrof gericht tegen een antigeen met een lage frequentie (LFA).

Serologisch vervolgonderzoek: onderzoek met testerythrocyten die positief voor een LFA reageerden allemaal negatief. Vervolgonderzoek na behandeling van erythrocyten van de vader met ficine, DTT, trypsine en chymotrypsine liet zien dat het antigeen aantoonbaar bleef. Op grond van de antigeentypering van de vader en de resultaten van de enzym/chemische behandeling was er een vermoeden dat de antistoffen gericht waren tegen één van de eiwitten die de antigenen van het Rh systeem tot expressie brengen.

Volledige DNA sequentie van de *RH* genen liet geen mutaties zien. Echter in het *RHAG* gen waren twee mutaties te zien, G808A en G861A, waarvan alleen de eerste resulteert in een aminozuurverandering (V270I). Het *RHAG* gen codeert voor een eiwit (*RhAG*) dat noodzakelijk is voor de expressie van de Rh eiwitten. Het *RhAG* eiwit is net als de Rh eiwitten, een transmembraan eiwit. Het is niet vast te stellen of vader homozygoot is voor de mutatie of dat er sprake is De vader was "homozygoot positief" voor de aangetoonde mutaties van slechts één *RHAG* gen. In het DNA van het aangedane kind waren de mutaties heterozygoot aanwezig evenals bij een ouder broertje en bij twee eerste graad familieleden van vader. Het serum van de moeder is ook reactief met de erythrocyten van de twee familieleden van de vader.

Conclusie: Binnen een familie is een laagfrequent antigeen aantoonbaar dat tot expressie gebracht wordt door het *RhAG* eiwit. Dit eiwit is in 2010 beschreven als drager van drie bloedgroepantigenen en daarmee gedefinieerd als zijnde een bloedgroep systeem. Dit nieuwe antigeen is het vierde antigeen binnen dat nieuwe bloedgroep systeem.

53 Casuïstiek

Serologische en moleculair biologisch beschrijving van een nieuwe RhD variant: DCM in twee patiënten

P.C. Ligthart¹, B. Veldhuisen¹, D. Kogenhop¹, I. Staps², C. Heijneman², C.C. Folman¹, M. de Haas¹

¹ Afdeling Immunohematologie Diagnostiek, Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam, ² Laboratorium Medische Microbiologie en Immunologie, Tilburg

Casus 1: Bij een 44-jarige man werd bij de RhD typering een verschil in reactiviteit gezien tussen twee verschillende anti-D reagentia. Bij nader onderzoek met een set van monoclonale antistoffen gericht tegen verschillende RhD epitopen werd een variant RhD antigeen gevonden, waarbij enkele epitopen van het RhD antigeen ontbraken. Het epitoopt patroon kwam niet overeen met bekende RhD varianten. DNA analyse toonde een mutatie in exon 3 (T482G) aan. Deze mutatie resulteert in een aminozuurverandering van Phe (F) naar Cys (C) op aminozuur positie 161, en is nog niet eerder beschreven.

Casus 2: Bij een 43-jarige vrouw werd bij pre-operatief onderzoek de aanwezigheid van antistoffen anti-D en anti-Fy^a aangetoond terwijl de RhD typering positief was. De mogelijkheid van autoantistoffen anti-D werd uitgesloten op grond van een negatieve directe antiglobuline test, een negatieve autocontrole en de afwezigheid van antistoffen anti-D in het eluaat gemaakt van de erythrocyten van de patiënt. Bij nader serologisch onderzoek werd het verlies van slechts enkele epitopen van het RhD antigeen aangetoond. DNA *RHD* sequentie analyse liet een mutatie zien in exon 3 (T482G). Serologisch en moleculair-biologisch is deze RhD variant gelijk aan de RhD variant zoals beschreven bij casus 1. **Conclusie:** Wij beschrijven een nieuwe RhD variant in twee verschillende patiënten die veroorzaakt wordt door een puntmutatie in exon 3 van het *RHD* gen welke leidt tot de aminozuurverandering Phe (161) naar Cys gelegen in de 3e externe loop van het RhD eiwit. Daarnaast is aangetoond dat personen met deze RhD variant in staat zijn om allo anti-D antistoffen te vormen. Deze nieuwe RhD variant is DCM genoemd, naar de persoon waar deze variant voor het eerst is aangetoond.

54 Casuïstiek

Een patiënte met antistoffen tegen een hoog-frequent Rh antigeen: gevolgen voor de zwangerschap

P.C. Ligthart¹, L. Haer-Wigman², D. v/d Akker¹, M.M. Klaphake³, A. Leyte³, S. Hogenboom³, H. Vrieling⁴, P. v/d Burg⁴, M. de Haas^{1,2}, B. Veldhuisen^{1,2}

¹ Sanquin Diagnostiek, ² Sanquin Research, ³ Klinisch chemisch laboratorium OLVG, ⁴ Sanquin KCD NW,

Casus: Bij het antistofonderzoek van een vrouw in de 24^e week van haar zwangerschap is de aanwezigheid van antistoffen met de specificiteit anti-C, anti-e en anti-Fy^a aangetoond. Het Rh fenotype van de patiënt was D+, C-, c^{zwak} +, E-, e-. Nader onderzoek naar dit bijzondere Rh fenotype liet zien dat het E antigeen wel aantoonbaar is met behulp van een zeer gevoelige absorptie/elutie test. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) en DNA sequentie analyse hebben de aanwezigheid van een homozygoot variant *RHCE* gen aangetoond, dat eerder naast een normaal *RHCE* allel beschreven is: RH-cEMI (Noizat-Pirenne et al. Br J Haematol 2001;113:672-9). De vader is getypeerd als CcDee Fy^a-. De anti-Fy^a antistoffen zijn dus niet van



belang voor de zwangerschap, omdat het kind eveneens Fy^a- is.

In de 31^e week van de zwangerschap veranderde het serologische beeld: er was een antistof tegen een hoog-frequent antigeen ontwikkeld. Deze antistof is reactief met alle testerytrocyten met een normale expressie van Rh antigenen, maar niet reactief met testerytrocyten met de volgende bijzondere Rh fenotypen; Rh-null, -D- en Rh46-. Vastgesteld werd dat de antistoffen zeer waarschijnlijk gericht zijn tegen een nieuw hoog-frequent antigeen in het Rh systeem.

Belooft zwangerschap en transfusie beleid: Het serologische beloop is weergegeven in onderstaande tabel.

Resultaten titer en ADCC gedurende de zwangerschap

Week zwangerschap	Anti-C+e titer	Anti-e titer	Anti-C en e ADCC	Anti-RhCcEe titer	Anti-RhCcEe ADCC
24 ^e	16	8	<10%		
31 ^e	64	16	45%	Neg	<10%
33 ^e	64	64	60%	Neg	<10%

Op grond van deze resultaten heeft het kind een hoog risico op HZFP. In geval van noodzaak tot transfusie voor moeder of kind is alleen donorbloed met het -D- fenotype geschikt of autoloog donorbloed. In verband met de beperkte voorraad van donorbloed met het -D- fenotype is besloten in de 34^e week van de zwangerschap autoloog bloed af te nemen bij de moeder. In de 35^e week is de vrouw bevallen van een zoon, waarvoor een wisseltransfusie noodzakelijk was door tekenen van hemolyse en stijgend bilirubine gehalte. Omdat de ABO bloedgroep van de moeder B was en van het kind O is voor de wisseltransfusie gekozen voor -D- donorerytrocyten uit de ingevroren voorraad van de SBF. Het autologe bloed van de moeder is op dat moment niet gebruikt en ingevroren voor toekomstig gebruik.

Conclusie: We beschrijven hier de eerste bevinding van een vrouw met homozygote expressie van het bijzondere RHCE gen (RHCEM1), die tevens antistoffen heeft gevormd tegen een bij haar afwezig nieuw hoog-frequent RhcE antigeen.

55 Toegepast onderzoek

Zygotie analyse van het RHD en RHCE gen door middel van Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Remco Jonkers¹, Lonke Haer-Wigman¹, Martin Loden², Bernadette Bossers³, Barbera Veldhuisen^{1,3}, Masja de Haas^{1,3} en Ellen van der Schoot¹

¹Afdeling Immunohematologie Experimenteel, Sanquin Bloedvoorziening en Landsteiner Laboratorium, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Nederland

²MRC-Holland, Amsterdam, Nederland

³Immunohematologische Diagnostiek, locatie Amsterdam, Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam, Nederland

Introductie: Als een RhD-negatieve vrouw zwanger is van een RhD-

positief kind kan zij antistoffen tegen het RhD-eiwit maken, die ernstige complicaties tijdens de huidige en volgende zwangerschappen kunnen veroorzaken. In Nederland worden alle RhD-negatieve vrouwen in de 12e en 30e week van de zwangerschap op de aanwezigheid van RhD-antistoffen getest. Als een zwangere vrouw anti-RhD antistoffen heeft gemaakt, kan een niet-invasieve foetale RhD typering verricht worden om vast te stellen of de foetus risico loopt op hemolytische ziekte. Echter, alleen als de vader één of meerdere RHD allelen heeft is er een kans dat de foetus RhD-positief zal zijn. Het aantonen van het aantal RHD kopieën van de vader kan dit risico uitsluiten. Dit kan m.b.v. een kwantitatieve PCR, maar de RHD-zygotie analyse ligt dicht tegen de grens van de nauwkeurigheid van deze techniek. De MLPA is een techniek die veel geschikter is om zygotie te bepalen. In deze studie is de MLPA analyse getest om RHD-zygotie vast te stellen.

Methode: Met de MLPA zijn in totaal 114 personen genotyperd. Bloed van deze personen was ingestuurd vanwege afwijkende Rh-serologie. Van 23 personen is voor bevestiging van de zygotie het DNA ook getest met een kwantitatieve PCR. MLPA kan naast de zygotie ook gebruikt worden voor het aantonen van Rh-varianten. Wanneer in de MLPA een variant RHD of RHCE gen gevonden werd, is dat bevestigd met een sequentie analyse van de RHD en RHCE genen. De RhCE en RhD status van de personen is eveneens met standaard serologische methodes bepaald.

Resultaten: Van de 114 personen waren er 90 hemizygoot voor RHD (Dd), 19 homozygoot RHD-positief (DD) en 5 RHD-negatief (dd). Van de 23 samples die ook met kwantitatieve PCR bepaald waren, waren 12 personen hemizygoot, 10 personen waren homozygoot en 1 persoon was negatief voor RHD in de MLPA. Bij 75 personen werden er één of meerdere Rh-varianten aangetoond (79 RHD en 11 RHCE).

Discussie: De MLPA is een robuuste genotyperings-analyse, waarbij binnen 24 uur resultaten verkregen kunnen worden en die gemakkelijk uit te voeren is met standaard apparatuur binnen een moleculair lab (PCR apparaat en sequencer). In alle 23 geteste samples werd een identieke zygotie in zowel de MLPA als kwantitatieve PCR aangetoond. Daarnaast zijn met de MLPA in deze reeks 90 verschillende varianten gevonden. De MLPA is dus een goede methode om zygotie te bepalen in partners van RhD-negatieve zwangere vrouwen.

56 Toegepast onderzoek

MLPA assay voor de genotypering van personen met een RhD-negatief fenotype, die met RhD-positief bloed getransfundeerd kunnen worden

Yanli Ji^{1,2}, Lonke Haer-Wigman¹, Ling Wei², Barbera Veldhuisen¹, Hong Luo², Aicha Ait Soussan¹, Yang Zhao², Runqing Zhang², Guangping Luo², Yongshui Fu², Masja de Haas¹, en C. Ellen van der Schoot¹

¹Afdeling Experimentele Immunohematologie, Sanquin Bloedvoorziening en Landsteiner Laboratorium, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Nederland

²The Institute of Blood Transfusion, Guangzhou Blood Center, Guangzhou, Guangdong, China

Introductie: De beschikbaarheid van RhD-negatief donor bloed in de Aziatische transfusieroutine is erg beperkt, omdat de frequentie van RhD-negativiteit in deze bevolkingsgroep erg laag is (<1%). Niet alle Aziatische personen die serologisch RhD-negatief getypeerd zijn, hebben een deletie van het RHD-gen. Van deze personen heeft 10-30% een specifieke RhD-variant: D-elutie (D_{el}), die zorgt voor een zeer lage expressie van het RhD-eiwit. Deze variant kan alleen met de absorbtie-elutie techniek worden gedetecteerd. Personen met een Del-variant kunnen zonder problemen met RhD-positief bloed worden getransfundeerd. Omdat er geen simpele techniek is om onderscheid te maken tussen echte RhD-negatieve en Del-patiënten krijgen Del-patiënten onnodig RhD-negatief bloed.

Doel: Het testen van de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) genotyperingsassay voor de identificatie van Del varianten in een Chinese donor populatie met het RhD-negatieve fenotype. **Methode:** Van 200 Chinese donoren met een RhD-negatief fenotype uit Guangdong is bloed verkregen. De RhD en RhCE status van de donoren is bepaald via standaard serologische methodes. De MLPA assay, die onderscheid kan maken tussen 44 RhD en RhCE varianten, is gebruikt voor de genotypering van de RHD en RHCE status. De donoren, waarbij geen variant gevonden is in de MLPA, zijn gesequenced voor alle exonen van het RHD-gen.

Resultaten: Met de MLPA assay is in 197 van de 200 Chinese RhD-negatieve donoren de afwezigheid van RHD genen of de aanwezigheid van een variant RHD gen worden bepaald. In 127 personen (64%) waren alle coderende D exonen afwezig. De Aziatisch D_{el} variant (G1227A) is hemizyoot in 38 donoren, homozyoot in 4 donoren en heterozyoot in 3 donoren gevonden (23%). In de 3 heterozygote donoren werd naast de Del variant, een hybride allel RHD(1-2)-CE(3-9)-D(10) gevonden. Dit hybride allel werd ook hemizyoot in 19 en homozyoot in 4 donoren gevonden (13%). De DFR-2 en zwakke D type 15 variant waren beide hemizyoot aanwezig in 1 donor. Alle donoren met een variant RhD allel waren grote C-positief. Bij 3 donoren is met de MLPA geen variant gevonden. Twee van deze donoren bleken de RhD-negatieve variant (711delC) te hebben en 1 donor had een nieuwe mutatie (G1154T).

Conclusie: De MLPA assay is een snelle, makkelijke en robuuste methode om RhD-negatieve patiënten in de Chinese bevolking te genotypen. Door de genotypering kunnen patiënten met een D_{el}-variant onderscheiden worden van echte RhD negatieve personen. Patiënten met het D_{el} fenotype kunnen bij een transfusie RhD-positief bloed ontvangen, waardoor het gebruik van het zeldzame RhD-negatieve bloed wordt beperkt.

57 Toegepast onderzoek

Twee nieuwe methoden voor het genotypen van bloedgroep antigenen in donoren en patiënten: ID-Core+ en MLPA

Barbera Veldhuisen¹, Lonke Haer-Wigman¹, Noelia Rapún², Goedele Cheroutre¹, Martin Loden³, Masja de Haas¹ en C. Ellen van der Schoot¹
¹Afdeling Immunohematologie Experimenteel en Immunohematologische Diagnostiek, Sanquin Bloedvoorziening en Landsteiner Laboratorium, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam,

Amsterdam, Nederland; ²Progenika Biopharma, Derio, Vizcaya, Spanje; ³MRC-Holland, Amsterdam, Nederland

Inleiding: Typering van bloedgroepantigenen en toedienen van compatibel bloed is van cruciaal belang bij bloedtransfusies om transfusie-reacties en vorming van allo-antistoffen te voorkomen. Bij bloedtransfusies ontwikkelt ongeveer 5% van de ontvangers een allo-antistof tegen een incompatibel bloedgroepantigen van de bloeddonor. Van de patiënten die reeds een antistof hebben gemaakt, vormt 30% additionele antistoffen. Preventief matchen van patiënt en donor zal transfusie-gerelateerde problemen sterk verminderen, maar daarvoor is een uitgebreid getypeerd donorbestand nodig. Serologisch bepaling is niet haalbaar vanwege de hoge kosten en een tekort aan geschikte reagentia voor de bepaling van sommige antigenen. De grote voordelen van genotypering (bloedgroeptypering op DNA) zijn de mogelijkheid om in meerdere donoren een groot aantal antigenen tegelijkertijd te bepalen en de mogelijkheid om het systeem te automatiseren. Een grootschalige bloedgroeptypering resulteert tevens in een uitgebreidere collectie zeldzame donoren. We hebben twee genotyperings assays bekeken: ID-Core+ van Progenika voor typering van donoren en de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) van MRC-Holland voor typering van patiënten.

Methoden: De IDCore+ assay is een test waarbij bloedgroep-specifieke producten uit een multiplex PCR worden gehybridiseerd aan Luminex bolletjes voor de uiteindelijke analyse. In deze test kunnen 33 bloedgroepantigenen van 9 bloedgroepsystemen worden bepaald: MNS (M/N, S/s, U, U_{var}, Mur), RH (C/c, E/e, C^x, C^y, VS, r's), KEL (K/k, Kp^a/Kpb, Js^a/Js^b, K_{mod1}), FY (Fy^a/Fy^b, GATA, Fy^s), JK (Jk^a/Jk^b, Jkn_{allo}), DI (Di^a/Di^b), YT (Yt^a/Yt^b), DO (Do^a/Do^b, Hy, Jo^a), CO (Co^a/Co^b). Bij de MLPA assay worden bloedgroep-specifieke probe-paren van unieke lengte gehybridiseerd aan genomisch DNA en vervolgens geligeerd, geamplificeerd en gescheiden op een ABI-sequencer. Met de MLPA kunnen 52 bloedgroepantigenen van 18 bloedgroepsystemen bepaald worden (MNS, RH, LU, KEL, LE, FY, JK, DI, YT, SC, DO, CO, LW, GE, CROM, KN, IN en OK). De genotyperings resultaten van 48 personen zijn vergeleken met de serologische bepalingen.

Resultaten: De typering van de IDCore+ en de MLPA komen volledig overeen. In 1 monster is een verschil aangetoond tussen de genotypering en serologie (Kk versus K+k-) door de aanwezigheid van een nulmutatie in het k-allel waardoor deze niet tot expressie komt en fenotypisch afwezig is.

Conclusie: De IDcore+ assay is een snelle en betrouwbare methode voor grootschalige bloedgroeptypering in donoren. Het detecteren van nul-allelen is cruciaal voor de typering van patiënten, maar van minder groot belang bij donoren. Het grote voordeel van MLPA is de mogelijkheid om RhD-varianten te typeren en tevens gen-zygotie te bepalen en daarvoor een geschikte methode voor genotypering van patiënten.

58 Wetenschappelijk onderzoek

Nieuwe mutaties verantwoordelijk voor K null en K mod fenotypen

Y. Ji^{1,2}, P.C. Ligthart³, L.Haer-Wigman¹, M. Boujnan⁴, A.J. van Gammeren⁵,



E. v.d. Schoot¹, M. de Haas^{1,3}

¹, Sanquin research ², The Institute of Blood Transfusion, Guangzhou Blood Center, China. ³, Sanquin diagnostiek. ⁴, Nationaal Screenings laboratorium Sanquin. ⁵, Klinisch Chemisch Laboratorium Amphia ziekenhuis.

Inleiding: Bij alle donors wordt door Sanquin Bloedvoorziening de aan- of afwezigheid van het K-antigeen vastgesteld. Van alle K-positieve donors wordt vervolgens de aan- of afwezigheid van het k antigeen vastgesteld. Dit om zeldzame k negatieve donors op te sporen. Omdat de expressie van de Kell antigenen verzwakt kan zijn, wordt ter confirmatie, van alle k negatieve donors een DNA typering en zonodig vervolgonderzoek verricht. Om het voorkomen van de KEL genotypen, die ten grondslag liggen aan K_{mod} en K_{null} fenotypen in kaart te brengen is van al deze donors verder moleculair biologisch onderzoek verricht. Daarnaast is het DNA getest van een patiënt waarbij enkele jaren geleden is vastgesteld dat zij het K_{null} fenotype (geen expressie van het Kell systeem) had.

Methode: Bij het confirmatie onderzoek is de k antigeen bepaling verricht met twee verschillende commerciële reagentia, volgens het voorschrift van de fabrikant. Daarnaast is een absorptie/elutie methode toegepast om zeer zwakke expressie van het k antigeen aan te tonen. De expressie sterkte van het K en k antigeen van een aantal van deze donors (n=5) is vastgesteld met de flowcytometer gebruik makend van CD238 monoclonale antistoffen, die alle vormen van het Kell eiwit herkennen, en met anti-K and anti-k monoclonale antistoffen. De K/k genotypering is verricht met een allelische discriminatie assay gebaseerd op de TaqMan technology. Vervolgens is sequentie analyse van de KEL allelen verricht.

Resultaat: In totaal zijn 160 donors getest die serologisch k-negatief waren, bij acht daarvan was de k genotypering positief. Bij zes donors en de patiënt werden reeds beschreven KEL variant genotypes aangetoond; R516X (K_{null}), R406X (K_{null}), G573G (K_{mod}), IVS3+1G>A (K_{null} I), and R516X (K_{null}). Bij twee donors en de patiënt werd een nog niet beschreven mutatie gevonden; Q362K (K/ k_{mod}), R700X (K/ K_{null}) en R492X (K_{null}). Bij de patiënt met het Kell null fenotype zijn twee verschillende allelen aangetoond. Bij de donors met een K_{mod} allel is de lage expressie van het k antigeen aangetoond met een absorptie/elutie onderzoek.

Flowcytometrie liet een verlaagde expressie van het totale Kell eiwit zien ten opzichte van controles met een normaal K^+k^+ geno- en fenotype. Echter de expressie van het K antigeen was verhoogd, als er een K_{null} of K_{mod} allel naast een K allel aanwezig was, ten opzichte van K^+k^+ controles.

Conclusie: We beschrijven in de Nederlandse populatie drie nieuwe KEL allelen. Twee van die allelen leiden tot een K_{null} fenotype en de derde tot een K_{mod} fenotype.

59 Casuïstiek

Een pasgeborene met congenitale anemie

J. van der Weijde, J. van Oossanen, A.K.E. Hoffmann-Haringsma, M.H. Beunis
Sint Franciscus Gasthuis, Rotterdam

Inleiding: Casus. Een jongen geboren bij een amenorroeduur van 39 2/7 week met een geboortegewicht van 3660gram, Apgarscore van 6 en 6 na respectievelijk 1 en 5 minuten met een anemie. Moeder was gravida 3 para 2 met een blanco voorgeschiedenis en een ongecompliceerde zwangerschap. Twee dagen voor de partus voelde zij minder leven en een dag voor de partus werd zij door een gynaecoloog gezien. Vanwege een weinig acceleratief CTG werd zij doorgeleid en beviel zij een dag later van een zoon. Er was sprake van een snelle bevalling en een matige start waarbij hij kortdurend is bijgeblazen met 100% FiO₂. Er werd bloed afgenomen en er bleek sprake te zijn van een anemie (Hb 4.2, Ht 0.22). Hij kreeg hiervoor een erythrocytentransfusie. Vanwege een matige circulatie werd hij gevuld met NaCl 0.9%. Daarnaast krijg hij een bolus glucose bij een eerste glucose van 1.1 mmol/l. Er werden bij moeder o.a. TORCHES en parvo B19 ingezet, een Kleihauer test gedaan en antistoffen bepaald. Post transfusie steeg het Hb van het kind tot 7.5 mmol/l. Het LDH is op dag 1 (na 24 u) 5370 U/l en is 3 dagen na de geboorte nog 2483 U/l. Bilirubine steeg tot maximaal 228 µmol/l op dag 4. Het percentage reticulocyten was na 24u 5,7 % en na 48u 15,6 %. Op dag 6 is het jongetje ontslagen met een Hb van 6,9. Het Hb op dag 10 is 6,6 mmol/l.

Resultaten: De Kleihauertest was positief (2% foetale cellen, wat overeenkomt met 100 ml foetaal bloed bij de moeder). Bij de moeder werden irregulaire antistoffen aangetoond anti Jk(a). De directe antiglobuline test bij kind en moeder waren negatief (Diamed). Omdat de DAT van moeder en kind negatief waren (Diamed), maar zwak positief met Immucor, werd van beiden een eluaat ingezet. In het eluaat zowel van moeder als van kind, werden Jk(a) antistoffen aangetoond. De herhaling van de screening van de 12e week was negatief. De moeder was homozygoot Jk(b) positief, de vader was homozygoot Jk(a) positief. Het kind was heterozygoot Jk(a) Jk(b).

Conclusie: De Kleihauertest toont een sterk verhoogd aantal foetale erythrocyten van het kind bij de moeder aan. Het lage Hb en het hoog aantal reticulocyten bij de geboorte passen ook bij een langer bestaande foetomaternale transfusie. De foetomaternale transfusie heeft bij moeder een versnelde productie van anti Jk(a) antistoffen geïnduceerd, waardoor erythrocyten van het kind werden gehemolyseerd.

60 Casuïstiek

Antistof onafhankelijke hemolyse tengevolge van leukemische NK cellen: een casus

EAM Beckers¹, Y Henskens², M van Gelder¹, GMJ Bos¹

¹ Maastricht Universitair Medisch Centrum, afdeling Interne Geneeskunde – hematologie/

² Maastricht Universitair Medisch Centrum, klinische chemie- transfusielaboratorium

Inleiding: De differentiaal diagnose van hemolyse is uitgebreid: van erfelijke oorzaken (zoals membraan afwijkingen, enzym defecten, globine of haem veranderingen) en verworven mechanismen door toxische of medicijn-geïnduceerde, of immuungerelateerde oorzaken. De bepaling van de directe antiglobuline test (DAGT) heeft een prominente

plaats binnen de diagnostiek. De detectie van antistoffen en/of complement op het oppervlak van de rode cel duidt op een immuun pathogenese (auto/allo/drug-induced) met therapeutische consequenties. Een DAGT-negatieve immuungemedieerde hemolyse is zeldzaam en leidt tot een diagnostische puzzel om de oorzaak van de hemolyse te vinden, waardoor niet zelden de juiste therapie wordt vertraagd. Wij presenteren een casus van een antistof-onafhankelijke (DAGT-negatieve) immuun hemolyse.

Casus: Een 59 jaar oude, voorheen gezonde man werd verwezen voor second opinion vanwege een DAGT-negatieve hemolyse. 4 weken eerder was de diagnose immuun hemolyse, maar DAGT-negatief, gesteld met een initiële goede respons op corticosteroiden. Bij verwijzing werd de vraag gesteld: "zijn er occulte antistoffen aanwezig?". Een volledige immunohematologische onderzoek werd uitgevoerd. De DAGT bleek negatief met monospecifieke reagentia (IgG, IgA, IgM, C3d); antistoffen gericht tegen erythrocytenantigenen (irregulier, warmte of koude) konden niet worden aangetoond in het serum en eluaat. Evenmin waren monofasische of bifasische hemolysinen aantoonbaar. Een bloed uitsmijking was negatief voor fragmentocyten en 1+ voor sferocyten. Bij het eerste poli-bezoek was er sprake van een goede reactie op de prednison therapie: Hb was 7.3 mmol/l; Echter de hemolytische parameters waren nog positief: reticulocyten 32 promille verhoogd LDH van 795 U/l; verhoogd bilirubine 82 umol/l, waarvan 75 umol ongeconjugerd. Een eiwitspectrum was zonder bijzonderheden. Immunofenotypering van het perifere bloed liet een kleine populatie abnormale lymfocyten zien. De prednison behandeling werd geleidelijk afgebouwd. Binnen 4 weken was er sprake van opnieuw ernstige hemolyse: Hb= 5,4; reticulocyten 142 promille; LDH 2550; bili 180 en onmeetbaar haptoglobine. Herhaling van de immunofenotypering toonde een grotere populatie abnormale lymfocyten: CD2+CD3-CD5-CD7+CD16+CD56- populatie, passend bij leukemische NK kloon (large granular lymphocytes, NK variant). Hierop werd ciclosporine gestart. Echter, na 1 week moest de patiënt worden opgenomen vanwege aanhoudende hemolyse; daling van het Hb naar 3,5 mmol/l en stijging van het bilirubine naar 420 umol/l. Patiënt kreeg een bloedtransfusie en immuunsuppressieve behandeling met prednison en cyclofosfamide, waarna een snel herstel van alle bloedwaarden volgde met een complete remissie. 9 maanden na opname verkeert patiënt in een uitstekende conditie. De prednison is gestaakt en patiënt gebruikt nog een lage dosis cyclofosfamide. Tekenen van ziekte activiteit ontbreken.

Conclusie: Deze patiënt bleek een antistof onafhankelijke immuungemedieerde hemolyse te hebben, veroorzaakt door abnormale NK cellen. NK gemedieerde cytotoxiciteit waardoor hemolyse werd aangetoond door Gilsanz et al in een aantal experimenten waarbij wel de autologe erythrocyten, maar niet de allogene erythrocyten gedurende actieve ziekte werden gehemolyseerd. Cytotoxiciteit verdween na eradicaatie van de leukemische NK kloon. Het moleculair mechanisme waardoor NK cellen autologe erythrocyten vernietigen is niet bekend. Onze hypothese is dat in de NK kloon een disbalans tussen inhiberende en activerende signalen is ontstaan met verlies van de eigenenschap voor tolerantie tegen 'self'.

Referentie: Gilsanz et al. *Transfusion* 1996;36:463-466.

61 Familiaire uremie wordt veroorzaakt door verhoogde UT-B1 (Kidd) expressie

Lonneke Haer-Wigman¹, Rob van Zwieten¹, Claudia Folman¹, Arthur Verhoeven², Jaap Groothoff³, Minke de Ru⁴, Lia Knegt⁵, Maaïke Jansweijer⁶, Arend Bokenkamp⁷, Gabor Linthorst⁸

¹ Sanquin Bloedvoorziening en Landsteiner Laboratorium, AMC, Universiteit of Amsterdam, Amsterdam

² Afdeling Medische Biochemie, AMC Amsterdam

³ Afdeling Kindernefrologie, Emma kinderziekenhuis / AMC Amsterdam

⁴ Afdeling Metabole Ziekten, Emma kinderziekenhuis / AMC Amsterdam

⁵ Afdeling Klinische Genetica, AMC Amsterdam

⁶ Afdeling Kindergenetica, Emma kinderziekenhuis / AMC Amsterdam

⁷ Afdeling Kindernefrologie, VU Medisch Centrum, Amsterdam.

⁸ Afdeling Inwendige geneeskunde, AMC Amsterdam.

Introductie: De secretie van ureum in de nieren is van vitaal belang voor de regulatie van de hoeveelheid lichaamsvocht en voor de afvoer van stikstof. Naast passieve filtratie vindt er ook actief ureumtransport plaats door twee ureumtransporters, UT-A2 en UT-B1. UT-A2 komt alleen in de nier tot expressie, UT-B1 komt ook voor op rode bloedcellen (RBC) en is daar bekend als de Kidd bloedgroep (Jk). Bij een familie met familiale uremie werd het UT-B1 eiwit op RBC geanalyseerd, vanwege aanwijzingen voor een duplicatie van het UT-B1 gen.

Casus beschrijving: De index-case is een nu 35-jarige vrouw, die vanaf haar geboorte bekend is met hoge plasma ureumconcentraties (40-50 mmol/L), een laag ureum in de urine (ureum klaring 3-5 ml/min, normaal 100 ml/min), maar met een normale kreatinine-klaring (80 ml/min). Haar broer en zoon zijn ook aangedaan. Een CGH array toonde een duplicatie van 18q12.3-q21.1 aan, waarin het *SLC14A1* gen is gelegen, dat codeert voor de UT-B1 ureumtransporter.

Methoden: Met MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MRC-Holland) werd een zygotie-analyse van het *SLC14A1* gen uitgevoerd. De expressie van UT-B1 op RBC werd onderzocht via FACS-analyse met anti-Jk^a en anti-Jk^b antistoffen (Immucor). Daarnaast werd het effect op ureumtransport onderzocht door turbidimetrische bepaling van zwelling en lysis van RBC in een 4M Ureumoplossing.

Resultaten: MLPA van het *SLC14A1* gen op de indexpatiënt toonde driemaal het Jk^a allel en geen Jk^b allel aan. FACS-analyse van de RBC toonde een verhoogde expressie van Jk^a (MFI: 2725) aan ten opzichte van Jk^{a+b}- controles (MFI: 1912). De RBC van de indexpatiënt, afgenomen op 2 verschillende dagen, toonden beide keren een 2 tot 3 keer grotere snelheid van afname van turbiditeit dan parallel gemeten RBC van een gezonde dagcontrole.

Discussie: Bij de indexpatiënt met een familiale uremie werd een duplicatie van het UT-B1/Kidd-bloedgroep gen geconstateerd. Deze duplicatie leidt tot verhoogde expressie van de UT-B1 transporter op de RBC en in de nier (data niet getoond). De verhoogde expressie gaat samen met een verhoogd ureumtransport, aangetoond door het effect van ureum op RBC zwelling en lysis. Het referentiegebied voor gezonde cellen in deze test moet nog worden bepaald om de werkelijke mate en significantie van de bevinding bij de patiënt vast te stellen. Een verhoogde



expressie van het UT-B1 gen in de familiale uremie zou dus een verhoogde resorptie van ureum in de nier kunnen verklaren. Deze bevinding kan leiden tot nieuwe inzichten in de regulatie van ureumtransport.

62 Casuïstiek

Een zeldzame oorzaak van heparine geïnduceerde trombocytopenie gecompliceerd door longembolieën en hemorrhagische bijnierschorsinsufficiëntie

M.J.R. Quanjel, E. Beeldman, C.R.G.M. Daemen-Gubbels, H. Chon, J.J.J. de Sonnaville

Tergooziekenhuizen Hilversum, interne geneeskunde, van Riebeeckweg 212, 1213 XZ Hilversum, e-mail:mquanjel@tergooziekenhuizen.nl

Introductie: Heparine geïnduceerde trombocytopenie en thrombose (HITT) is een bekende aandoening met ernstige trombo-embolische complicaties met een mortaliteit tot 25%, meestal ten gevolge van veneuze trombo-embolie, myocardiële infarct of mesenteriale infarct. HITT ontstaat door trombocytactiverende antilichamen die complexen herkennen van trombocyt factor 4 wat resulteert in activatie van de stollingscascade die leidt tot trombine generatie en inductie van vasculair endotheliale trombogene effecten. De normale oorzaak van HITT is behandeling met heparine of laag molecuulair heparine. We beschrijven een patiënt met een heparine geïnduceerde trombocytopenie bij Fondaparinux profylaxe na een electieve knieoperatie, gecompliceerd door veneuze trombo-embolie en bilaterale hemorrhagische bijnierinfarct.

Case report: een 67-jarige mevrouw presenteerde zich met rugpijn, koorts en braken elf dagen na een electieve en ongecompliceerde knie operatie. Ze werd volgens protocol profylactisch met Fondaparinux behandeld om trombo-embolische complicatie te voorkomen. Bij lichamelijk onderzoek werd een dyspnoeïsche vrouw gezien met een temperatuur van 38,9 C, RR 130/85 mmHg. Behoudens een gezwollen knie en lichte drukpijn in regio epigastrium was het lichamelijk onderzoek niet afwijkend. Een CT angio (na een niet afwijkende thoraxfoto) toonde bilaterale longembolieën en beiderzijds vergrote bijniereën met vetinfiltratie rondom.

Laboratoriumonderzoek toonde een progressieve trombocytopenie (nadir $19 \times 10^9/L$), een hyponatriëmie (nadir 127 mmol/L) en de solid fase heparine-PF4 enzym immuno assay voor HITT was positief ($E=1,5$) welke werd bevestigd met de heparin induced platelet activation (HIPAA). De behandeling met Fondaparinux werd gestaakt en vervangen door Danaparoid. De aanwezigheid van braken, malaise en subfebriele temperatuur samen met de vergroting van de bijniereën en de hyponatriëmie leken het meest te passen bij een relatieve bijnierschorsinsufficiëntie, welke bevestigd werd met een positieve Synactentest. Na initiëring van hydrocortison knapte patiënte goed op. De CT scan toonde geen aanwijzingen voor maligniteit. Antistoffen tegen bijnierschors waren niet aantoonbaar.

Conclusie: Bij deze, voorheen gezonde, vrouw was er sprake van een zeldzame oorzaak van een HITT, namelijk Fondaparinux, met ernstige trombo-embolische complicaties. Een bilateraal hemorrhagisch bijnierinfarct met een (zeer waarschijnlijk) passagere, acute bijnierschorsinsufficiëntie is nog nooit eerder beschreven na een HITT.

63 Wetenschappelijk onderzoek

HLA, HPA-5a en HPA-15a alloantistoffen in een patiënt met AML die een myelo-ablatieve stamceltransplantatie ondergaat: uitdagingen voor transfusie support en gevolgen voor trombocyt herstel

EAM Beckers, S. Korvers, E.Rombout-Sestrienkova, L.Porcelijn
Maastricht Universiteits Medisch Centrum, afd. Interne geneeskunde - hematologie

Maastricht Universiteits Medisch Centrum, afd. Pathologie
Sanquin Bloed Bank, Klinisch Consultatieve Dienst Nijmegen
Sanquin Diagnostiek, Laboratorium voor leukocyten en trombocyt diagnostiek Amsterdam

Inleiding: Gedurende hoge dosis chemotherapie, zoals wordt toegepast bij remissie-inductie behandeling voor acute leukemie en na myeloablatieve conditionering voor allogene stamcel transplantatie (SCT), zijn de meeste patiënten afhankelijk van profylactische trombocyt support. HLA en/of HPA alloantistoffen kunnen interfereren met trombocyt opbrengst en klinische respons. Wij presenteren een patiënte, waarin adequate trombocyt support en opbrengst werd bemoeilijkt door de aanwezigheid van zowel HLA alloantistoffen en alloantistoffen tegen HPA-5a en HPA-15a.

Casus: Een 32 jaar oude vrouwelijke Marokkaanse patiënte werd opgenomen met acute myeloïde leukemie met monocytair kenmerken. Cytogenetica toonde een intermediair risico profiel. Zij kreeg protocolaire inductie-remissie behandeling: idarubicine ($12 \text{mg}/\text{m}^2$ dag 1 tot 3) en cytarabine ($200 \text{mg}/\text{m}^2$, dag 1 tot 7). Vanaf het begin bleek zij refractair voor samengestelde trombocytconcentraten. HLA klasse I antistoffen werden aangetoond. Vervolgens werden HLA-identieke trombocytconcentraten toegediend, eveneens met onvoldoende opbrengst. Nadere analyse toonde HPA-5a en zwakke HPA-15a alloantistoffen. Bij Sanquin Bloed Bank bleken slechts 2 donors HLA-compatibel en HPA5a-negatief (HPA5bb) te zijn. Met de bereidwillige hulp van deze 2 donors werd adequate trombocyt support bereikt: CCI 10-12. Allo-HPA15a bleek niet van klinisch belang te zijn. Complete remissie werd bereikt na de eerste inductie chemokuur. Vanwege de complexe trombocyt support en de beschikbaarheid van een HLA-identieke verwante donor, werd gekozen voor een allogene stamceltransplantatie na myeloablatieve conditionering (busulfan en ciclofosfamide) als vervolgbehandeling. Hoewel 2 zussen en 1 broer HLA-identiek waren, bleken alledrie HPA5a positief. HPA incompatibiliteit kon niet worden voorkomen. In eerste instantie was er sprake van een ongecompliceerd posttransplantatie beloop. Het trombocyt aantal steeg vanaf dag +20 van 134 tot 173 op dag +27. Op dag +34 was er een daling van de het aantal trombocyt tot 62 opgetreden; met een verdere daling tot 43 op dag +55. Hierna trad er weer herstel op tot boven de 100 op dag +76. De daling van het trombocyt aantal ging gepaard met een hoge titer anti-HPA5a in het serum en eluaat, terwijl patiënte op dat moment genotypisch HPA5a positief was en HPA5b negatief.

Bloed chimerisme toonde meer dan 97% donor leukocyten. Hb en leuko's bleven normaal gedurende de trombocyt daling. Een CMV infec-

tion kon worden uitgesloten en toxisch-medicamenteuze effecten van cyclosporine waren niet aannemelijk door het ontbreken van fragmentocyten. Beenmergdiagnostiek toonde actieve uitrijping van alledrie voorlopercellen met een uitgesproken megakaryocytopoïesis, wijzend op perifere destructie van trombocyten. Vervolgmetingen lieten een daling zien van het anti-HPA5a titer bij normalisatie van het trombocytenaantal; ook suggestief voor het optreden van een tijdelijke trombopenie tengevolge van anti-HPA5a reactivatie.

Conclusies: HPA-5a alloantistoffen veroorzaakten een bifasisch verloop van het trombocyten herstel. Onze hypothese is dat pre-existente actieve gastheer plasma cellen adequaat werden vernietigd door de inductie chemotherapie en conditionering, maar dat rustende gastheer memory B-cellen werden geboosterd door de HPA-5a positieve trombocyten afkomstig van de donor stamcellen.

64 Toegepast onderzoek HPA antistof detectie met behulp van de PAKLx Luminex beads techniek

L. Porcelijn, T. Kochx, E. Huiskes, M. de Haas
Sanquin Diagnostiek

Introductie: alloantistoffen gericht tegen humane plaatjes antigenen (HPA) zijn van klinisch belang bij foetale/neonatale alloimmun trombocytopenie (FNAIT), refractoriteit en post transfusie purpura (PTP). Van de verschillende methoden voor het aantonen van HPA antistoffen is de monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) assay de meest sensitieve en specifieke techniek. Helaas duurt het verrichten van de MAIPA ongeveer zes uur en zijn een trombocyten identificatie panel en verschillende trombocyt-specifieke MoAb nodig. GTI Diagnostics heeft een Luminex beads HPA antistof screening methode (PAKLx) ontwikkeld. Wij hebben de uitslagen van deze methode vergeleken met die van de MAIPA.

Materiaal en Methoden: negen goed gedefinieerde sera met antistoffen tegen respectievelijk HPA-1a (2x), -3a (2x), -5a (2x), -5b (2x) en -1a+5b zijn getest in titratie. 100 sera van (zwangere) vrouwen met verdenking FNAIT en 70 sera van patiënten met refractoriteit voor trombocyten transfusies zijn in de MAIPA techniek en in de PAKLx techniek getest.

De MAIPA is uitgevoerd volgens de methode van Kiefel et al. (Blood, 1987). De PAKLx van de firma GTI diagnostics is een Luminex beads methode, met beads voor HPA-1a, 1b, 3a, 3b, 4a, 4b (GPIIb/IIIa), 2a, 2b (GPIb/IX), 5a, 5b (GPIa/IIa), HLA klasse I en GPIV. 10 µL patiënten serum wordt met 40 µL gepoolde beads 60 min. geïncubeerd, waarna wordt gewassen en PE gelabeld anti humaan IgG conjugaat wordt toegevoegd. De antistof belading van de beads wordt gemeten in een Luminex Flow instrument.

Resultaten: De negen specifieke HPA antistoffen werden in beide technieken aangetoond. De reactiesterkte was in de PAKLx voor 4/9 minder groot en in 4/9 sera werden in de PAKLx zwakke reacties gezien met alle GPIb/IX en/of GPIIb/IIIa beads, zonder HPA specificiteit.

126 van de in totaal 170 geteste sera toonden gelijke resultaten in de MAIPA en PAKLx, 72 negatief en 54 positief (26 HPA, 4 GPIIb/IIIa en 50 HLA antistoffen). 35/170 sera toonden alleen zwakke aspecifieke reac-

ties in de PAKLx (voornamelijk met alle beads voor GPIb/IX), maar waren negatief in de MAIPA. In twee sera werden in een eerste assay met de PAKLx HPA antistoffen aangetoond, deze waren echter bij herhaling niet meer aantoonbaar. 7/170 sera toonden alleen positieve reacties in de MAIPA (4 HPA specifiek en 3 HLA).

Conclusie: de diagnostische accuratesse van de MAIPA is groter dan die van de PAKLx methode, omdat de MAIPA een betere specificiteit heeft en vaker HPA antistoffen aantoonbaar dan de PAKLx methode.

65 Toegepast onderzoek De directe MAIPA voor het aantonen van autoantistoffen tegen trombocyten

L. Porcelijn¹, G. Oldert¹, E. Huiskes¹, J.J. Zwaginga², M. de Haas¹

¹ Sanquin Diagnostiek, Amsterdam

² LUMC, Leiden

Introductie: Het aantonen van trombocyt-gebonden antistoffen in de immunofluorescentie (PIFT) techniek is weinig specifiek. Autoantistoffen tegen trombocyten zijn voornamelijk gericht tegen de glycoproteïne (GP) complexen IIb/IIIa, Ib/IX en V. Eerdere literatuur geeft aan dat de directe monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (directe MAIPA: DM) veel specifiek is dan de PIFT voor trombocyt gebonden autoantistoffen. Eerdere evaluatie van de sensitiviteit en specificiteit van de DM voor diagnostiek naar trombocyten autoantistoffen toonde een te geringe sensitiviteit. Door het verrichten van de DM naast de PIFT voor klinisch geïncubeerde patiënten met immuun trombocytopenie (ITP) liet zien dat het vaststellen van een cut-off waarde van de DM voor autoantistof detectie mogelijk is, waardoor de sensitiviteit toeneemt en de test waardevol is in de routine diagnostiek.

Materiaal en Methoden: Dit onderzoek is verricht in het kader van de HOVON 64 studie (behandeling van ITP patiënten met Rituximab). De MAIPA techniek (Kiefel et al. Blood, 1987) is een glycoproteïne specifieke sandwich ELISA. Met behulp van deze techniek is GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPV, GPIa/IIa en GPIV gebonden antistof onderzoek (DM) verricht met 435 trombocyten suspensies van gezonde donoren en met trombocyten suspensie uit 679 bloedmonsters van 107 ITP patiënten. De resultaten verkregen met de DM zijn vergeleken met de Directe PIFT en elu-aat (DPE) uitslagen.

Resultaten: de cut-off waarde, berekend met behulp van de DM uitslagen voor de gezonde donoren kon worden gesteld op $E=0,13$ (gem + 3std). Autoantistoffen konden met deze cut-off in de DM en/of de DPE worden aangetoond in 93 van 107 (87%) patiënten. De DM was positief ($E>0,13$) voor 83 van de 107 (78%) patiënten, waarvan 15 alleen in de DM. De positieve reacties waren gericht tegen GPIIb/IIIa en/of GPIb/IX en/of GPV. Voor 10/107 (9%) patiënten waren alleen de reacties in de DPE positief. Voor $\geq 1+$ reactieve antistoffen in de DPE was er een significante correlatie ($p<0,001$) tussen de reactie sterkte in de DM en de reactie sterkte in de DPE. Opvallend was dat 27 zeer zwak positieve reacties en 62 zwak positieve reacties in de DPE niet significant verschillend waren met negatieve uitslagen in de DM ($p=0,981$) en mogelijk duiden op aspecifieke antistofbinding, niet berustend op trombo-



cytreactieve autoantistoffen.

Conclusie: de directe MAIPA is van toegevoegde waarde in het diagnostisch onderzoek bij patiënten met verdenking op ITP.

66 Casuïstiek

Het EDTA-fenomeen bij moeder en kind; een zeldzame verklaring voor passagère pseudotrombocytopenie bij de pasgeborene

J.J. Korterink, B. Boersma, M. Schoorl, L. Porcelijn, P. Bartels
Medisch centrum Alkmaar, Sanquin

Ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) veroorzaakt het ontstaan van zogenaamde cryptantigenen (neoepitopen) gelegen op glycoproteïne IIb/IIIa op trombocyten. Sommige individuen hebben, om onbekende redenen, antistoffen tegen deze cryptantigenen. Hierdoor vindt in EDTA ontsteld bloed van deze personen trombocytenuitstrooming plaats en ontstaat er een pseudotrombocytopenie. Dit mechanisme treedt in de praktijk het meeste op bij het EDTA anticoagulans, maar het kan ook voorkomen in citraat en heparine^{1,2}. Bij volwassenen is de prevalentie van dit zogenaamde "EDTA-fenomeen" als verklaring voor trombocytopenie ongeveer 0.11%³. Bij kinderen is dit niet bekend en zijn er in de literatuur slechts enkele gevallen beschreven. Nog minder is bekend over in hoeverre het EDTA-fenomeen tijdens de zwangerschap overgedragen wordt van moeder naar kind.

Wij zagen een jonge zuigeling van 8 dagen oud in verband met een perinatale infectie. Laboratorium onderzoek toonde bij herhaling een trombocytopenie ($67 \times 10^9/L$) zonder tekenen van een toegenomen

bloedingsneiging. Er werd uitgebreide diagnostiek ingezet naar maternale- en allo-immuuntrombocytopenie zonder resultaat

Nadat er een verschil in trombocytengehalte in EDTA en citraat bloed werd gemeten, werd er gedacht aan een pseudotrombocytopenie. Het citraatbloed toonde op dat moment een normaal trombocytengehalte van $298 \times 10^9/L$, terwijl in EDTA een trombocytengehalte van $71 \times 10^9/L$ werd gevonden. Uiteindelijk bleek er sprake te zijn van een passagère EDTA-fenomeen bij het kind terwijl haar moeder een langer bestaande vorm van hetzelfde fenomeen had.

Serologisch onderzoek toonde bij de moeder IgG antistoffen tegen trombocyten geïsoleerd uit EDTA ontsteld bloed. Deze antistoffen waren niet reactief met trombocyten uit citraat bloed. Helaas was er geen kinderlijk bloed meer beschikbaar uit de trombocytopenie periode. Na herstel van het trombocytenuitstroomingsaantal ($400 \times 10^9/L$) werden bij het kind geen antistoffen tegen 'EDTA trombocyten' aangetoond.

Conclusie: naar alle waarschijnlijkheid was de passagère pseudotrombocytopenie van het kind te wijten aan transplacentaire passage van maternale IgG antistoffen tegen EDTA-afhankelijke cryptantigenen. Deze casus illustreert dat men ook bij jonge zuigelingen rekening moet houden met het EDTA-fenomeen als verklaring voor trombocytopenie.

Referenties:

1. Shreiner DP, Bell WR, et al. Pseudothrombocytopenia: Manifestation of a new type of platelet agglutinin. *Blood* 1973; vol. 42, no 4
2. Bizarro N, et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* 1995; 50:103-109
3. Froom P, Barak M. Prevalence and course of pseudothrombocytopenia in outpatient. *Clin chem. Lab med* 2011; 49(1):111-114

Het NVB-Symposium Transfusiegeneeskunde 2011 en het avondprogramma worden mede mogelijk gemaakt door hoofdsponsor Fresenius Kabi, en door:

Bodégro
CaridianBCT Europe NV
DiaMed Benelux
Eurocept BV
Fenwal Blood Technologies
Greiner Bio-One BV
Haemonetics BV
Hemocue Diagnostics
Immucor Gamma Benelux
Maco Pharma Nederland BV

Minigrip Nederland
Novartis Pharma B.V.
Ortho-clinical Diagnostics NV
Roche Diagnostics
Sanquin Cellular Therapy Services
Sanquin Reagentia
Sarstedt BV
Sysmex Nederland BV
Terumo Europe NV
VidimSoft

Sanquin Bloedbank is op 26 mei aanwezig met de Mobiele Afname
Locatie achter de Wintertuin.

De afsluitende borrel wordt u aangeboden door Abbott BV