

LABQUIZ

Hemolyse: rol van directe antiglobulinetest en eluaat

Henrike M. Hamer, Erik A. Beckers en Yvonne M. Henskens

Twee vrouwen met anemie, hoe komt dit? De directe antiglobulinetest, in combinatie met een eluaat, kan de oorzaak achterhalen, maar is geen screeningstest voor hemolyse.

CASUS 1

Patiënt A, een 85-jarige vrouw, komt bij de internist vanwege vermoeidheid, misselijkheid en dyspneu sinds een week. Een jaar geleden is zij gediagnosticeerd met chronische lymfatische leukemie (CLL). Bij lichamelijk onderzoek wordt een niet-acuut zieke, adequate, bleke vrouw gezien. De bloeddruk is 140/60 mmHg, de polsfrequentie 80 slagen/min, de saturatie 98% en de temperatuur 37,3°C. Er zijn geen lymfomen voelbaar in de hals, oksels en liezen. Over het hart en de longen worden geen afwijkingen geconstateerd. Het abdomen is adipeus, soepel en niet-pijnlijk, met een niet-afwijkende peristaltiek. Laboratoriumonderzoek toont een normocytair anemie (tabel 1).

VRAAG CASUS 1 Wat is uw waarschijnlijkheidsdiagnose?

- a Auto-immuunhemolytische anemie.
- b Medicatiegerelateerde hemolyse.
- c Vitamine B₁₂-deficiëntie.
- d IJzergebrek.

TABEL 1 Laboratoriumuitslagen van patiënt A en B

bepaling	patiënt A	patiënt B	referentiewaarde
Hb	3,9	1,4	7,3-9,7 mmol/l
MCV	95	114	80-100 fl
trombocyten	150	71	130-350 x 10 ⁹ /l
reticulocyten	338	9	20-90 x 10 ⁹ /l
leukocyten	32,6	13,1	2,5-11,0 x 10 ⁹ /l
irregulaire antistoffen	positief	negatief	
DAT	positief (4+)	negatief	
uittypering DAT		n.v.t.	
IgG	4+		
C3d	3+		
IgM	1+		
eluaat DAT	positief	n.v.t.	
haptoglobine	< 0,10	< 0,10	0,25-1,90 g/l
bilirubine	35,2	72,2	< 20 µmol/l
LD	450	1294	97-247 U/l
creatinine	86	86	50-100 µmol/l
homocysteïne	–	69,3	< 16,6 µmol/l
methylmalonzuur	–	285	50-340 nmol/l

DAT = directe antiglobulinetest.

CASUS 2

Patiënt B, een 47-jarige vrouw, wordt door de huisarts ingestuurd naar de SEH. Ze vertelt dat ze sinds 10 dagen moe is en daarbij zwak op de benen is, waardoor ze enkele dagen geleden niet meer overeind kon komen. De laatste tijd heeft ze ook weinig eetlust. Ze rookt en bij stress drinkt ze alcohol; ze gebruikt geen drugs. Bij lichamelijk onderzoek is patiënte bleek en onverzorgd. Laboratoriumonderzoek toont een macrocytaire anemie (zie tabel 1).

VRAAG CASUS 2 Wat is uw waarschijnlijkheidsdiagnose?

- a Vitamine B₁₂-deficiëntie.
- b Foliumzuurdeficiëntie.
- c Myelodysplastisch syndroom.
- d Acute leukemie.

> ANTWOORDEN EN UITLEG ELDERS IN DIT NUMMER

ANTWOORDEN OP DE LABQUIZ

Hemolyse: rol van directe antiglobulinetest en eluaat

Henrike M. Hamer, Erik A. Beckers en Yvonne M. Henskens

ANTWOORD CASUS 1: OPTIE 1A IS JUIST

Het laboratoriumonderzoek bij patiënt A toonde een Hb-waarde van 3,9 mmol/l, met een verhoogd aantal reticulocyten ($338 \times 10^9/l$). Er is sprake van hemolytische anemie gezien de onmeetbare haptoglobine-waarde ($< 0,10 \text{ g/l}$), de verhoogde LD-waarde (450 U/l) en de verhoogde bilirubine-waarde ($35,2 \mu\text{mol/l}$). Het aantal trombocyten was niet-afwijkend ($150 \times 10^9/l$) en het aantal leukocyten was verhoogd ($32,6 \times 10^9/l$). Bij de microscopische beoordeling werden kaptogestreken cellen waargenomen en viel het grumulée-patroon van de lymfocyten op, wat past bij de CLL.

Vanwege de symptomatische anemie werd een aanvraag gedaan voor erythrocytenconcentraten voor transfusie. Hiervoor werd op het laboratorium, naast de bloedgroepbepaling, een screening op irregulaire antistoffen tegen erythrocyten uitgevoerd. Deze screening was positief.

Ook de uitslag van de directe antiglobulinetest (directe Coombs-test, DAT) was sterk positief (4+). Na uitsplitsing van de DAT bleek dat de erythrocyten waren beladen met IgG en complement en in mindere mate ook met IgM. Vanwege de belading met IgG-autoantistoffen werd een eluaat gemaakt om de specificiteit van de DAT te verhogen. Na elutie van de antistoffen op de erythrocyten bleek het om warmte-autoantistoffen zonder specificiteit te gaan. Vanwege de IgM- en complementbelading op de erythrocyten werd ook nog gedacht aan aanwezigheid van koude autoantistoffen, maar dit werd in aanvullend onderzoek uitgesloten.

Patiënte werd opgenomen met de diagnose 'auto-immuunhemolytische anemie met aspecifieke warmte-autoantistoffen', wat gerelateerd was aan haar onderliggend lijden, CLL. Ze werd behandeld met prednison 1 mg/kg en vanwege de symptomen kreeg ze een erythrocytentransfusie, met goed resultaat. Vanwege het recidiefrisico werd besloten een lage dosering prednison als onderhoudstherapie te continueren.

ANTWOORD CASUS 2: OPTIE 2B IS JUIST

Het laboratoriumonderzoek bij patiënt B toonde een anemie en trombopenie. Tevens waren de hemolytische parameters positief: verlaagde haptoglobine-waarde ($< 0,10 \text{ g/l}$), verhoogde bilirubine-waarde ($72 \mu\text{mol/l}$) en een verhoogde LD-waarde (1294 U/l). Vanwege deze aangetoonde hemolyse werd de DAT aangevraagd. De DAT was negatief, wat een immuungemedieerde hemolyse minder waarschijnlijk maakt. De inflammatieparameters waren niet verhoogd en een röntgenfoto van de thorax liet geen afwijkingen zien. De ferritine-waarde was 1428 $\mu\text{g/l}$ (referentiewaarde: 15-200), wat een ijzergebrek uitsluit. De foliumzuurconcentratie was 4,7 nmol/l (referentiewaarde: 8,0-60,8) en de vitamine B₁₂-concentratie was $> 1000 \text{ pmol/l}$ (referentiewaarde: 145-569).

Om een functioneel tekort aan te tonen werden de waarden van homocysteïne en methylmalonzuur gemeten. De homocysteïneconcentratie was verhoogd (69,3 $\mu\text{mol/l}$), terwijl de methylmalonzuurconcentratie niet-afwijkend was (285 nmol/l). Hieruit blijkt een functioneel tekort aan foliumzuur aangezien de homocysteïne-waarde stijgt bij gebrek aan foliumzuur, vitamine B₁₂ of beide, terwijl de methylmalonzuur-waarde alleen stijgt bij een tekort aan vitamine B₁₂.

Patiënte werd opgenomen na een episode van zelfverwaarlozing en malnutritie. Na aanvang van foliumzuur-suppletie stegen het reticulocytenaantal, de Hb-waarde en het trombocytenaantal. De anemie werd daarom geduid als deficiëntie na een periode van malnutritie; mogelijk speelde alcoholabus – er waren leverfunctietestafwijkingen en echografie was suggestief voor levercirrose – ook een rol bij het ontwikkelen van deze anemie.

> VOOR VERDIEPING EN ACHTERGRONDEN, ZIE WWW.NTVG.NL, ZOEKEN OP D1290

Maastricht UMC+, Maastricht.

Centraal Diagnostisch Laboratorium: dr. H.M. Hamer, klinisch chemicus in opleiding; dr. Y.M. Henskens, klinisch chemicus.

Afd. Interne Geneeskunde, divisie Hematologie: dr. E.A. Beckers, hematoloog.

Contactpersoon: dr. H.M. Hamer (h.hamer@vumc.nl).

VERDIEPING LABQUIZ

Hemolyse: rol van directe antiglobulinetest en eluaat

Henrike M. Hamer, Erik A. Beckers en Yvonne M. Henskens

ACHTERGROND

ALGEMENE ANALYSE VAN ANEMIE

De NHG-standaard 'Anemie' geeft richtlijnen voor de diagnostiek en het beleid bij patiënten bij wie een te lage Hb-waarde is vastgesteld.¹ Bij de aanvullende diagnostiek is de morfologische indeling in micro-, normo- en macrocytaire anemie vervallen aangezien sommige oorzaken in meer dan één morfologische groep kunnen worden ingedeeld. Daarnaast begint vrijwel elke anemie, door welke oorzaak dan ook, normocytair.

Deze indeling is in de NHG-standaard vervangen door een pathofysiologische indeling op basis van een verminderde of gestoorde aanmaak en een verhoogde afbraak (hemolytische anemie). Anemie door acuut bloedverlies blijft in deze standaard buiten beschouwing.

ANEMIE DOOR VERMINDERDE OF GESTOORDE AANMAAK

Anemie op basis van een verminderde of gestoorde aanmaak kan veroorzaakt worden door ijzergebrek, vitamine B₁₂- of foliumzuurdeficiëntie, erytropoëtinetekort bij nierfunctieverlies, een chronische ziekte of infectieziekte, hemoglobinopathieën en beenmergaandoeningen, zoals beenmergstamcelziekten (myelodysplasie, acute leukemie) of beenmergverdringing (CLL, lymfoom, tumormetastasen).

IJzergebrek is veruit de meest voorkomende oorzaak van anemie door verminderde of gestoorde aanmaak (incidentie: 4,3 per 1000 patiënten/jaar), met name bij vrouwen. In Nederland wordt dit veelal veroorzaakt door hevig menstrueel bloedverlies of door een verhoogde ijzerbehoefte tijdens de zwangerschap. Op oudere leeftijd is naast ijzergebrek ook vaak een chronische ziekte of chronisch bloedverlies in het maag-darmkanaal de oorzaak van een ijzergebreksanemie. IJzergebrek wordt gekenmerkt door een lage ferritinewaarde en een – meestal – laag MCV.

Vitamine B₁₂- of foliumzuurdeficiëntie komt minder vaak voor (incidentie: 1,8 per 1000 patiënten/jaar) en wordt vooral gezien bij ouderen, bij patiënten die een auto-immunreactie vertonen tegen pariëtale cellen van de maagwand of tegen intrinsic factor (atrofische gastritis), bij patiënten met een ziekte die leidt tot malabsorptie en bij mensen met een verhoogd risico op een onevenwichtig voedingspatroon. Hierdoor ontstaat een verstoorde DNA-synthese, die zich manifesteert in een gestoorde bloed-aanmaak en een megaloblastaire anemie, wat gepaard kan gaan met hemolyse, zoals beschreven in de casus 2.²

Vitamine B₁₂- of foliumzuurdeficiëntie gaat meestal gepaard met een verhoogd MCV. Bij een gecombineerde deficiëntie van vitamine B₁₂ of foliumzuur en ijzer kan een niet-afwijkend MCV gemeten worden. Aanvullend kan dan gekeken worden naar de 'red cell distribution width' (RDW); deze zal bij een gecombineerde deficiëntie verhoogd zijn.

Bij anemie door een chronische ziekte wordt verondersteld dat er sprake is van anemie vanwege een gestoorde inbouw van ijzer in hemoglobine en een verkorte levensduur van de erythrocyten. Anemie van de chronische ziekte gaat vaak gepaard met een verhoogde hepcidine-waarde.³ De belangrijkste aandoeningen die dit type anemie kunnen veroorzaken zijn chronische inflammatoire aandoeningen zoals reumatoïde artritis, chronische infectieziekten, maligniteiten en acute – al dan niet ernstige – ziekte, bijvoorbeeld na pneumonie.

Omdat ferritine een acute-fase-eiwit is, kan de ferritineconcentratie bij dit type anemie binnen de referentiewaarde vallen of zelfs verhoogd zijn, zelfs als er sprake is van ijzergebrek. Analyse van de transferrine- en ijzerwaarde kan dan bijdragen aan het diagnosticeren van een ijzergebrek. Bij ijzergebrek is de ijzerconcentratie verlaagd en de transferrineconcentratie verhoogd.³

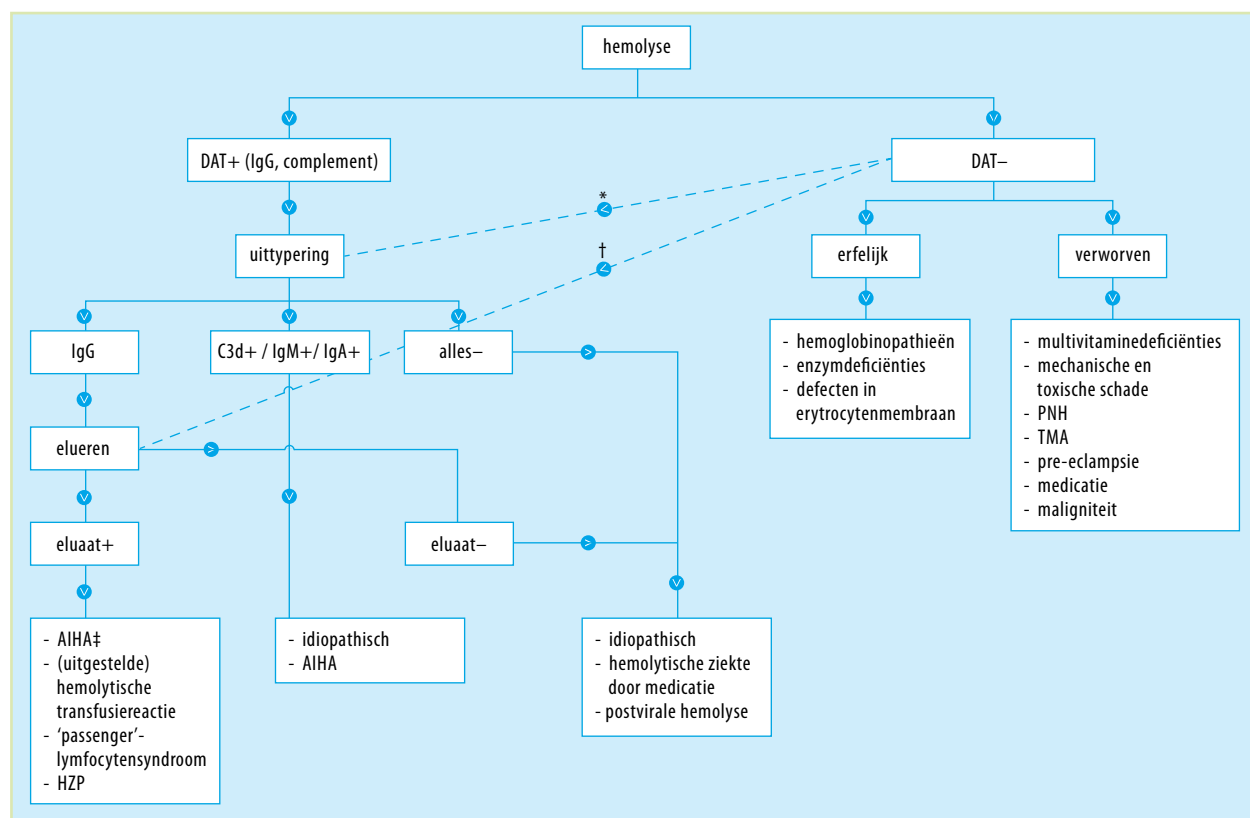
Een andere oorzaak van anemie door een verminderde of gestoorde aanmaak vormen de hemoglobinopathieën. Ook al is de primaire oorzaak van dit soort anemieën een stoornis in de aanmaak, secundair kan dit afbraak (hemolyse) tot gevolg hebben. De incidentie van hemoglobinopathie is in de laatste 30 jaar in Nederland toegenomen door immigratie. Dragerschap van een hemoglobinopathie bij autochtone Nederlanders is zeldzaam, maar kan worden verwacht bij een persisterende microcytaire hypochrome anemie die niet reageert op ijzersuppletie.

Maastricht UMC+, Maastricht.

Centraal Diagnostisch Laboratorium: dr. H.M. Hamer, klinisch chemicus in opleiding; dr. Y.M. Henskens, klinisch chemicus.

Afd. Interne Geneeskunde, divisie Hematologie: dr. E.A. Beckers, hematoloog.

Contactpersoon: dr. H.M. Hamer (h.hamer@vumc.nl).



FIGUUR 1 Beslisboom voor analyse van aangetoonde hemolyse.

DAT = directe antiglobulinetest; AIHA = auto-immuunhemolytische anemie; HZP = hemolytische ziekte van de pasgeborene; PNH = paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie; TMA = trombotische microangiopathieën.

* Negatieve DAT-uitslag sluit anti-IgA-gemedieerde AIHA niet uit.

† Negatieve DAT-uitslag sluit AIHA niet uit; bij sterke aanwijzingen voor AIHA en negatieve DAT-uitslag toch elueren.

‡ Ondersteunende kenmerken voor AIHA: geldrolvorming, erythroblasten en sferocyten.

ANEMIE DOOR VERHOOGDE AFBRAAK

Wanneer anemie optreedt vanwege een verhoogde afbraak van erythrocyten, is er sprake van hemolytische anemie. Hemolyse ontstaat door versnelde afbraak van erythrocyten. Door de compensatoire beenmergrespons gaat hemolyse gepaard met een verhoogde erythropoëse. Bij massale hemolyse kan er schade ontstaan aan organen door vrij hemoglobine, onder andere acute nierinsufficiëntie. Laboratoriumuitslagen die passen bij hemolyse zijn een lage of onmeetbare haptoglobinewaarde, verhoogde waarde van (onconjugeerde) bilirubine, verhoogde lactaatdehydrogenase(LD)-waarde, verhoogde plasma-waarde van vrij hemoglobine, verhoogde ASAT-waarde (in afwezigheid van verhoogde ALAT-waarde), en toegenomen aantallen voorloperstadia van erythrocyten (reticulocyten). Het reticulocytenaantal is indicatief voor de mate van erythropoëse. Omdat het reticulocytenaantal

afhankelijk is van het erythrocytenaantal, dient hiervoor gecorrigeerd te worden. Donkergekleurde urine kan wijzen op hemoglobinurie als teken van intravasculaire hemolyse, en is vaak aanleiding om vervolgdagnostiek voor hemolyse in te zetten.

Hemolyse kan een immunologische oorzaak hebben. Immungemedieerde afbraak van erythrocyten kan passen bij verschillende ziektebeelden zoals auto-immuunhemolytische anemie (AIHA), directe of uitgestelde hemolytische transfusiereactie, 'passenger'-lymfocytenyndroom, hemolytische ziekte van de pasgeborene, en medicatiegerelateerde of postvirale hemolyse (figuur 1). Niet-immungemedieerde hemolyse kan onderverdeeld worden in aangeboren en verworven vormen van hemolyse. Aangeboren aandoeningen die kunnen leiden tot hemolyse zijn hemoglobinopathieën,⁴ enzymdeficiënties (G6PD, pyruvaatkinase),⁵ en defecten in de erythrocyten-

TABEL 2 Oorzaken van anemie en gericht laboratoriumonderzoek dat aangevraagd dient te worden volgens de NHG-standaard 'Anemie'

oorzaak	laboratoriumonderzoek	uitslag
verminderde of gestoorde aanmaak		
ijzergebrek	MCV	MCV $\leq$ N
	ferritine	ferritine $< 100 \mu\text{g/l}$
vitamine B ₁₂ - en/of foliumzuurdeficiëntie	ijzer	ijzer $< \text{N}$
	transferrine	transferrine $> \text{N}$
	MCV	MCV $\geq \text{N}$
	vitamine B ₁₂	vitamine B12 $< \text{N}$ en/of
	foliumzuur	foliumzuur $< \text{N}$
chronische ziekte of infectieziekte	reticulocyten	reticulocyten $< \text{N}$
	LD	LD $> \text{N}$
	(methylmalonzuur/homocysteïne)	
	MCV	BSE $\geq \text{N}$
	BSE	MCV $\leq \text{N}$
hemoglobinoopathieën	ijzer	ijzer $< \text{N}$
	transferrine	transferrine $\leq \text{N}$
	eGFR	eGFR $< 45 \text{ ml/min per } 1,73 \text{ m}^2 \rightarrow$ anemie
	trombocyten	mogelijk renaal bepaald
	leukocyten	
beenmergstamcelziekten, beenmergverdringing	Hb-elektroforese of -chromatografie, eventueel in combinatie met DNA-onderzoek	afwijkende HbP-diagnostiek volgens rapportage laboratorium
	erythrocyten	
	reticulocyten	reticulocyten $< \text{N}$
	leukocyten	leukocyten en/of trombocyten afwijkend
trombocyten		
verhoogde afbraak		
hemolyse	reticulocyten	MCV $\geq \text{N}$
	LD	reticulocyten $> \text{N}$
	haptoglobine en DAT*	LD $> \text{N}$

eGFR = geschatte glomerulaire filtratiesnelheid; HbP = hemoglobinoopathie; N = niet-afwijkend; DAT = directe antiglobulinetest.

* Deze bepalingen worden niet in de NHG-standaard genoemd.

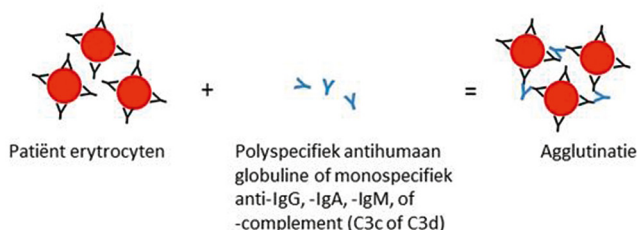
membraan (hereditaire sferocytose of elliptocytose).⁶ De vorm van de erythrocyten (sikkelcellen, ovalocyten, sferocyten), het MCV en aanvullende speciële (moleculaire) diagnostiek kunnen hierin verdere richting geven.⁴⁻⁶ Verworven niet-immuungemedieerde hemolyse kan veroorzaakt worden door multivitaminedeficiënties,⁷ mechanische en toxische schade, paroxysmale nachtelijke hematurie,⁸ trombotische microangiopathieën (zoals trombotische trombocytopenische purpura, (atypisch) hemolytisch-uremisch syndroom, maligne hypertensie of diffuse intravasale stolling), pre-eclampsie, medicatie of een maligniteit. Kenmerkend voor het merendeel van deze verworven vormen van hemolyse is, naast een negatieve DAT-uitslag, de aanwezigheid van fragmentocyten en een verhoogde erythropoëse.

AANVULLENDE DIAGNOSTIEK BIJ ANEMIE

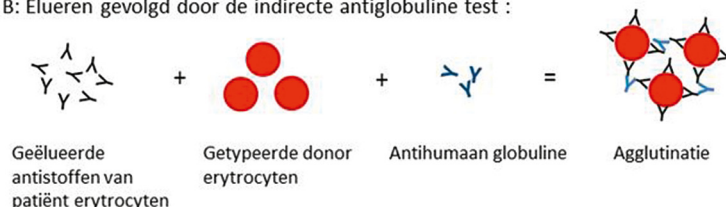
De NHG-standaard adviseert om bij anemie als aanvullend onderzoek altijd het MCV en de ferritinewaarde te bepalen. Daarnaast dienen, op basis van gegevens uit de anamnese en voorgeschiedenis, direct aanvullende bepalingen toegevoegd te worden, zoals weergegeven in tabel 2. Als uit deze laboratoriumuitslagen geen ijzergebrek blijkt en ook de gerichte bepalingen geen of onvoldoende verklaring geven voor de anemie, kunnen de overige bepalingen uit tabel 2 aangevraagd worden om tot een verklaring van de anemie te komen, met uitzondering van hemoglobinoopathiediagnostiek, die alléén op indicatie aangevraagd dient te worden.

Meestal heeft de huisarts ook de mogelijkheid om bij het regionale laboratorium zogeheten 'reflexdiagnostiek bij

A: Directe antiglobuline test :



B: Elueren gevolgd door de indirecte antiglobuline test :



FIGUUR 2 (a) In de directe antiglobulinetest (DAT) worden patiënterythrocyten geïncubeerd met antistoffen gericht tegen humane globulinen (IgG, IgA, IgM), complementfactoren of beide. (b) Bij een positieve DAT-uitslag voor IgG kunnen de antistoffen van de erythrocyten worden geëluereerd. Met de indirecte antiglobulinetest kan de specificiteit van deze geëluereerde antistoffen worden onderzocht. (Bron: Overbeeke et al.)

anemie' aan te vragen via het probleemgeoriënteerde aanvraagformulier. Hierbij kruist de huisarts niet de gewenste specifieke bepalingen aan, maar bijvoorbeeld 'anemiediagnostiek'. Het laboratorium zal dan vervolgens reflexmatig meerdere bepalingen tegelijk uitvoeren of automatisch doortesten. Niet elk laboratorium hanteert echter hetzelfde pakket aan testen met dezelfde timing. Daarom dient de huisarts zich bij het regionale laboratorium op de hoogte te stellen van de inhoud van de reflexdiagnostiek bij anemie ter plaatse.

AANVULLENDE DIAGNOSTIEK BIJ HEMOLYTISCHE ANEMIE

Volgens de NHG-standaard 'Anemie' is er mogelijk sprake van hemolytische anemie bij een niet-afwijkend of verhoogd MCV, een verhoogd aantal reticulocyten en een verhoogde LD-waarde.¹ Vervolgens dient aanvullend onderzoek te worden gedaan naar de oorzaak hiervan. Hemolyse kan extra- of intravasculair zijn. Bij extravasculaire hemolyse worden erythrocyten op indirecte wijze afgebroken. Erythrocyten die beladen zijn met antistoffen, complement of beide (met name IgG, IgA of C3b) worden dan gefagocyteerd door macrofagen in de milt of lever. Het aantonen van sferocyten in de perifere bloeduitstrijk wijst op een dergelijke extravasculaire hemolyse. Intravasculaire hemolyse kan enerzijds het gevolg zijn van complementgemedieerde afbraak van erythrocyten door antistoffen, met name IgM. Anderzijds kan intravasculaire hemolyse optreden door mechanische schade vanwege bijvoorbeeld kunstkleppen, aortakleppenstenoze of

trombotische microangiopathieën. Dit leidt tot vrij hemoglobine in het plasma, dat vervolgens bindt aan haptoglobine. Dit haptoglobine-hemoglobinecomplex wordt gemetaboliseerd door het reticulo-endotheliale stelsel. Als de bindingscapaciteit van haptoglobine verzadigd is, komt vrij hemoglobine terecht in urine en plasma. Extravasculaire hemolyse leidt in veel mindere mate tot vrij hemoglobine in plasma.

Omdat de oorzaken van hemolyse divers zijn dient in de eerste plaats ex-vivohemolyse uitgesloten te worden, bijvoorbeeld ten gevolge van een moeizame bloedafname of bij gebruik van afname via een infuus.⁹ Bij ex-vivohemolyse gaan de erythrocyten tijdens de bloedafname kapot, waardoor de inhoud in het serum of plasma vrijkomt. Dit veroorzaakt, ook al bij lichte hemolyse, onder andere een verhoogde waarde van LD, ASAT en kalium.

Daarnaast kunnen door ex-vivohemolyse interferenties ontstaan die de analytische fase beïnvloeden. De mate van beïnvloeding op verschillende analyses is afhankelijk van het laboratorium en de gebruikte methode. De concentratie van haptoglobine en bilirubine kunnen gebruikt worden voor het onderscheiden van een ex-vivo- en in-vivohemolyse. In tegenstelling tot ex-vivohemolyse zal bij in-vivohemolyse de haptoglobinewaarde onmeetbaar laag en de bilirubinewaarde verhoogd zijn.

Alleen wanneer in-vivohemolyse aannemelijk is, dient in eerste instantie de DAT te worden uitgevoerd om een eerste onderscheid te maken in de oorzaak van de hemolyse. De DAT onderscheidt immunologische oorzaken

van niet-immunologische oorzaken van hemolyse (zie figuur 1), maar is geen screeningstest voor het aantonen van hemolyse. Het uitvoeren van de DAT zonder aanwijzingen voor in-vivohemolyse wordt ten zeerste afgeraden vanwege het groot aantal fout-positieve uitslagen. De DAT is dus wel een sensitieve, maar een weinig specifieke test. Dit bespreken we verderop in dit artikel ook.

DIRECTE EN INDIRECTE ANTIGLOBULINETEST

DAT

Om te onderzoeken of de hemolyse het gevolg is van versnelde afbraak veroorzaakt door antistoffen gericht tegen antigenen op de eigen erythrocyten (bloedgroepen), kan de DAT aangevraagd worden.¹⁰ Hiermee kunnen antistoffen en complementfactoren aangetoond worden die in vivo zijn gebonden aan de erythrocyten van de patiënt (figuur 2a).

In de DAT worden de erythrocyten geïncubeerd met antistoffen gericht tegen humane globulinen (IgG, IgA, IgM), complementfactoren of beide. Als eerste stap wordt polyspecifiek antiglobulineserum gebruikt; dit bevat meestal alleen anti-IgG en anti-complement. Als IgG-antistoffen, complement of beide in vivo op de erythrocyt gebonden zijn, zal agglutinatie optreden. Is de reactie met polyspecifiek antiglobulineserum positief, dan wordt bepaald wat de oorzaak is van de positieve DAT-uitslag. Hiertoe wordt de DAT nogmaals uitgevoerd met monospecifieke antistoffen tegen de verschillende immunoglobulinesubklassen (IgG, IgA, IgM) en complement (C3c en C3d). Hiermee kan onderscheid gemaakt worden tussen welke antistoffen aan de patiënterythrocyten gebonden zijn.¹¹

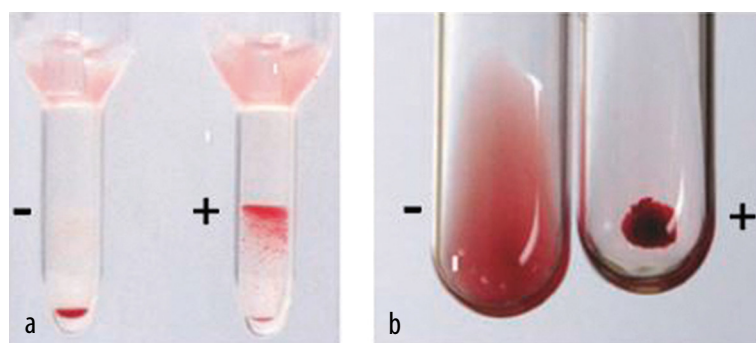
Er zijn verschillende methoden waarmee een DAT uitgevoerd kan worden.¹¹ De meest gebruikte zijn de kaartjes en de buisjesmethode. De kaartjes bevatten 6 kolommen met de verschillende anti-humane globulinen in een dextranmatrix. De erythrocytensuspensie wordt in het

bovenste deel van de kolom gepipetteerd. Tijdens de centrifugeerstep worden agglutinatien door de gel tegengehouden, terwijl bij negatieve reacties de erythrocyten door de gel naar de bodem sedimenteren. Wanneer gebruikgemaakt wordt van de buisjes methode, wordt macroscopisch afgelezen of er agglutinatie is opgetreden (figuur 3).

INDIRECTE ANTIGLOBULINETEST

Als de DAT positief is voor IgG, worden de antistoffen van de erythrocyten verwijderd (geëluëerd) om de aanwezigheid van antistoffen in het eluaat te bevestigen. Door de patiënterythrocyten met een zuur reagens te incuberen laten de gebonden antistoffen los. Het dan verkregen antistofmengsel (eluaat) kan getest worden op aanwezigheid van antistoffen met de indirecte antiglobulinetest. In tegenstelling tot de DAT – waarbij antistoffen, complementfactoren of beide aangetoond worden die in vivo zijn gebonden aan de erythrocyten – worden bij een indirecte antiglobulinetest vrije, ongebonden, antistoffen aangetoond (figuur 2b).¹¹ Bij de indirecte antiglobulinetest wordt gebruikgemaakt van een panel getypeerde donorerythrocyten. Deze donorerythrocyten worden vervolgens geïncubeerd met de antistoffen die van de patiënterythrocyten zijn geëluëerd. De aanwezige antistoffen kunnen vervolgens binden aan de getypeerde donorerythrocyten, waardoor de specificiteit bepaald kan worden. De indirecte antiglobulinetest wordt ook toegepast bij de screening op irregulaire anti-erythrocytenantistoffen voor bloedtransfusie.

Er kan ook geëluëerd worden om de specificiteit van de uitslag van de DAT te verhogen. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat de DAT negatief is, terwijl na elueren toch antistoffen gedetecteerd worden. Dit komt doordat het elueren zorgt voor concentratie van de antistoffen, waardoor er gevoeliger gemeten kan worden.



FIGUUR 3 Negatieve en positieve uitslag van de directe antiglobulinetest (DAT), uitgevoerd in (a) kaartjes of (b) buisjes.

DAT BIJ DIFFERENTIËLE DIAGNOSTIEK VAN HEMOLYSE

Een positieve DAT-uitslag geeft aan dat er waarschijnlijk een immunologische oorzaak is voor de hemolyse. AIHA is een zeldzame ernstige aandoening gekenmerkt door een versnelde afbraak van erythrocyten veroorzaakt door autoantistoffen gericht tegen erythrocyten (IgG, IgM of – zelden – IgA), met of zonder complementactivatie. Bij 50% van de patiënten gaat AIHA samen met een onderliggende ziekte, bijvoorbeeld lymfomen, CLL of auto-immuunziekten (systemische lupus erythematoses, reumatoïde artritis). Het optreden van AIHA kan een voorbode zijn voor een pas later gediagnosticeerde ziekte. Vooral bij kinderen komt AIHA voor na infectieziekten (postvirale hemolyse).

Immuungemedieerde hemolyse kan ook optreden na een bloedtransfusie. Bij een directe of uitgestelde hemolytische transfusiereactie zijn alloantistoffen gevormd tegen erythrocytenantigenen van donorerythrocyten, waardoor de donorerythrocyten worden afgebroken. Met het eluaat kan de specificiteit van deze antistof bepaald worden. Bij hemolyse veroorzaakt door het passenger-lymfocyten-syndroom treedt de hemolyse op na transplantatie van een gevasculariseerd orgaan. Hierbij worden antistoffen geproduceerd door circulerende donor-B-lymfocyten uit het donororgaan. Hemolyse bij de pasgeborene wordt veroorzaakt door IgG-antistoffen van de moeder tegen erythrocyten van het kind.¹²

Ten slotte kan ook een aantal geneesmiddelen op verschillende manieren een positieve DAT-uitslag geven, soms met hemolyse tot gevolg. Kenmerkend hierbij is dat het eluaat dan negatief is.¹¹

KAN DAT DIFFERENTIËREN TUSSEN OORZAKEN VAN HEMOLYSE?

Bij immuungemedieerde vormen van hemolyse kan met de verdere uittypering (IgG, IgM, IgA, complement) van de DAT en gericht vervolgonderzoek onderzocht worden welk type antistoffen betrokken zijn bij de hemolyse. Hiermee is een positieve uitslag van de DAT niet alleen van belang om een immunologische oorzaak aan te tonen, maar geeft deze ook richting voor de therapie.

De eigenschappen van de autoantistoffen (isotype en optimale temperatuur) zijn van groot belang, omdat zij de wijze en efficiëntie van de erythrocytenafbraak bepalen. Antistoffen kunnen worden verdeeld in warmte- en koude antistoffen, wat aangeeft of de optimale reactietemperatuur boven of onder de 30°C ligt. Warmte-autoantistoffen hebben een optimale bindingstemperatuur $\geq 30^\circ\text{C}$ en zijn meestal van het type IgG. Koude antistoffen zijn meestal van het type IgM en hebben een bindingsoptimum $< 30^\circ\text{C}$, waardoor deze antistoffen minder klinisch relevant zijn. Bifasische antistoffen zijn uiterst zeldzaam; deze hebben een bindingsoptimum $< 30^\circ\text{C}$ en kunnen bij een temperatuur $> 37^\circ\text{C}$ tot complementacti-

vatie leiden. Dit zijn vaak antistoffen van het type IgG. Het isotype (IgG, IgM, IgA) bepaalt de mate van complementactivatie. Het IgG-molecuul komt alleen voor als monomeer en kent vier subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 en IgG4). Het is de enige antistof die de placenta kan passeren en mogelijk hemolytische ziekte van de pasgeborene kan veroorzaken. IgG1 en IgG3 kunnen goed complement binden, IgG2 slechts incidenteel. Erythrocyten beladen met IgG1 of IgG3 worden vervolgens effectiever vernietigd dan erythrocyten beladen met IgG2 of IgG4. Het IgM-molecuul is een pentameer en een efficiënte activator van het complementsysteem. Complementactivatie door autoantistoffen (IgM, IgG1/3) leidt tot complementdepositie op de erythrocyten. Dit wordt met C3d aangetoond in de DAT. De eigenschappen van de autoantistoffen kunnen bijdragen aan de inschatting van de ernst van de hemolyse en bepalen mede de therapiekeuze.¹¹

CORRELEERT DAT-UITSLAG MET ERNST VAN DE ZIEKTE?

De rapportage van de sterkte van de DAT-uitslag is semikwantitatief. In sommige laboratoria wordt als uitslag alleen ‘negatief’ of ‘positief’ gerapporteerd (zie figuur 3). Andere laboratoria vermelden ook de reactiesterkte (negatief, 1+, 2+, 3+, 4+). Er is echter een slechte correlatie tussen de sterkte van de DAT-uitslag en de ernst van de hemolyse. Dit heeft verschillende oorzaken.

Ten eerste kunnen IgM-antistoffen tijdens de DAT-procedure worden weggewassen. Hierdoor is een DAT die alleen positief is voor complement, zonder dat er andere antistoffen gevonden worden, meestal een teken voor de aanwezigheid van IgM. Daarnaast kan de antistoftiter hoog zijn terwijl hemolyse uitblijft. Meestal behoren de antistoffen dan tot de IgG2- of IgG4-subklasse. De eigenschappen van de autoantistof die de hemolyse veroorzaakt, zijn dus van groter belang.¹¹

IS DAT GESCHIKT VOOR DE MONITORING VAN HEMOLYSE?

De DAT, en eventueel het eluaat als de DAT-uitslag positief is voor IgG, wordt met name gebruikt voor het diagnosticeren van de oorzaak van de hemolyse. De behandeling van de onderliggende ziekte is dan ook afhankelijk van de uitkomsten van dit onderzoek. Maar de DAT wordt vervolgens niet gebruikt om het beloop te vervolgen.

KOSTEN

De kosten voor de bepalingen gerelateerd aan de diagnostiek van hemolyse en de DAT staan in tabel 3. Deze prijzen zijn conform de huidige tarieven van de Nederlandse Zorgautoriteit.

VALKUILEN

De aanwezigheid van autoantistoffen betekent niet automatisch dat er ook sprake is van hemolytische anemie. Er

TABEL 3 Kosten van analyses naar oorzaken van anemie en hemolyse

bepaling	kosten in €*
ferritine	6,58
ijzer	1,91
transferrine	4,23
vitamine B ₁₂	6,32
foliumzuur	5,74
creatinine	1,53
differentiële telling	1,68
LD	1,43
reticulocyten	2,33
hemoglobine/MCV	1,51
bilirubine	1,53
DAT (polyspecifiek)	19,34
indirecte antiglobulinetest (eluaat of antistofscreening)	7,34

DAT = directe antiglobulinetest.

* Prijzen conform tarieven van de Nederlandse Zorgautoriteit.

zijn autoantistoffen die geen invloed hebben op de overlevingsduur van de erythrocyt. Ongeveer 1 per 1000-14.000 gezonde bloeddonoren heeft een positieve DAT-uitslag; in een ziekenhuispopulatie wordt zelfs geschat dat 1-15% van de patiënten een positieve DAT-uitslag heeft.^{13,14} De meerderheid van de positieve DAT-resultaten is dus niet klinisch relevant. Daarom dient de DAT niet gebruikt worden als screeningstest voor hemolyse. Alleen bij aangetoonde hemolyse dient een DAT aangevraagd te worden.

Om de specificiteit van de uitslag van de DAT te verhoogen kan het eluaat getest worden. De eigenschappen van de autoantistoffen en de specificiteit van het eluaat kunnen dan verdere aanwijzingen geven voor de oorzaak van de immuungemedieerde hemolyse.

Voor een bloedtransfusie moet er een geldige antistofscreening zijn. In het 'kruisbloed' wordt met de indirecte antiglobulinetest een antistofscreening uitgevoerd. Als er sprake is van een positieve DAT-uitslag, zal dit vaak ook aan het licht komen tijdens dit onderzoek, afhankelijk van de gebruikelijke procedures op het betreffende laboratorium. Maar wanneer er geen afwijkingen gevonden worden bij het bepalen van de bloedgroep of de screening, sluit dit immuungemedieerde hemolyse niet uit. Een DAT is hiervoor specifiek en gevoeliger. Daarnaast kan met de DAT ook aangetoond worden om welk type antistof het gaat.

Een negatieve DAT-uitslag sluit echter een immuungemedieerde hemolyse niet volledig uit. Een enkele patiënt heeft symptomen van auto-immuunhemolyse, maar een negatieve DAT-uitslag.¹⁵ Bij een sterk vermoeden van immuungemedieerde hemolyse is het daarom aan te bevelen om toch een uittypering en een eluaat aan te vragen (zie stippellijnen in figuur 1). Het elueren concentreert antistoffen, waardoor er gevoeliger gemeten zal worden. Dit kan onder andere toegepast worden bij aanwijzingen voor ABO-incompatibiliteit bij pasgeborenen bij wie de DAT vaak in eerste instantie negatief kan zijn. Ten slotte moet men erop bedacht zijn dat IgA-autoantistoffen aanwezig kunnen zijn die niet worden opgepikt in de eerste stap met een polyspecifiek antiglobulineserum. IgA-autoantistoffen gericht tegen erythrocyten zijn echter zeldzaam.

Belangenconflict en financiële ondersteuning: geen gemeld.

Aanvaard op 4 oktober 2017

Citeer als: Ned Tijdschr Geneeskd. 2018;162:D1290

 **KIJK OOK OP WWW.NTVG.NL/D1290**

LITERATUUR

- NHG-werkgroep Anemie. NHG-Standaard Anemie (Eerste herziening). Huisarts Wet. 2014;57:528-36.
- Ventura P, Panini R, Tremosini S, Salvio G. A role for homocysteine increase in haemolysis of megaloblastic anaemias due to vitamin B(12) and folate deficiency: results from an in vitro experience. Biochim Biophys Acta. 2004;1739:33-42.
- Busti F, Campostrini N, Martinelli N, Girelli D. Iron deficiency in the elderly population, revisited in the hepcidin era. Front Pharmacol. 2014;5:83.
- Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. Clin Chim Acta. 2015;439:50-7.
- Miwa S, Fujii H. Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutant enzymes. Am J Hematol. 1996;51:122-32.
- Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. Blood Rev. 2013;27:167-78.
- Walker SP, Wein P, Ihle BU. Severe folate deficiency masquerading as the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets. Obstet Gynecol. 1997;90:655-7.
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2014;124:2804-11.
- Heiligers-Duckers C, Peters NA, van Dijk JJ, Hoeijmakers JM, Janssen MJ. Low vacuum and discard tubes reduce hemolysis in samples drawn from intravenous catheters. Clin Biochem. 2013;46:1142-4.
- Coombs RR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br J Exp Pathol. 1945;26:255-66.

- 11 Overbeeke MAMV, Vreeswijk NJ, Ligthart PC, Meulenbroek AJ. Erythrocytenserologie. Amsterdam: Sanquin; 2011.
- 12 Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*. 2008;48:941-52.
- 13 Bedi RK, Mittal K, Sood T, Kumar R, Praveen AS. DAT positivity in blood donors: a perplexing scenario. *Transfus Apheresis Sci*. 2014;50:239-41.
- 14 Petz LD. Review: evaluation of patients with immune hemolysis. *Immunohematology*. 2004;20:167-76.
- 15 Alwar V, Shanthala DA, Sitalakshmi S, Karuna RK. Clinical patterns and hematological spectrum in autoimmune hemolytic anemia. *J Lab Physicians*. 2010;2:17-20.