


Kennisplatform ZO 31 maart 2022

Laboratoriumaspecten diagnostiek bij koude auto antistoffen

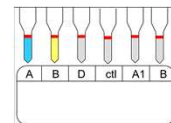
Claudia Folman c.folman@sanquin.nl



1

Laboratoriumbevinding bij koude (auto)antistoffen

- **Bloedgroep** : niet vast te stellen
- **Screening**: alle testcellen zijn reactief



- **DAT**
 - Alles positief inclusief controle
 - Alleen positief met complement
 - Negatief
 - anders

	Rh				MNS				P	Lutheran		Kell		Lewis		Duffy		Kidd		PEG		
	D	C	E	c	e	c ^W	M	N		S	s	F ₁	Lu ^a	Lu ^b	K	k	Le ^a	Le ^b	Fy ^a		Fy ^b	Jk ^a
1	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	1*
2	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	1*
3	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
4	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	1*
5	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
6	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
8	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
9	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
10	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1*
11	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	1*
12	Autocontrolle																				(*)	

2

Inhoud



Transfusievraag, welke testen?



Klinisch belang, hoe vaststellen?



Bijzondere koude autoantistoffen

3



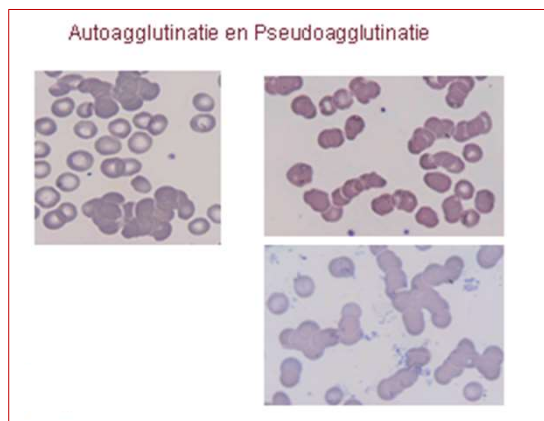
Transfusievraag

4

Serologisch onderzoek, het begint vaak bij de buis



Erythrocyten; is de agglutinatie auto- of pseudo-agglutinatie??



Autoagglutinatie: autoantistoffen

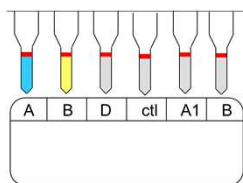
- Verdwijnt **niet** na toevoeging PBS op glaasje

Pseudoagglutinatie: geldrolvorming door afwijking in eiwitspectrum

- Verdwijnt **wel** door toevoeging PBS
- Ery's wassen met PBS 4°C voor gebruik

5

Vaststellen van de bloedgroep (ABO of anders)



Uitslag is niet te beoordelen

- controle positief
- Antigeen en antistof-bepaling komen niet overeen

Maak gebruik van karakteristiek van koude antistoffen, slechter reactief bij hogere temperatuur

Optie 1: Was erythrocyten 2x bij 37C (wassen met PBS 4C werkt meestal niet)

Optie 2: Was erythrocyten 3x bij 45C

Optie 3: Behandel erythrocyten met DTT om IgM antistoffen kapot te maken

Waar moet je op letten?

Na wassen controleer **DAT**, deze moet negatief zijn

Met DTT behandeling worden ook sommige **bloedgroepen verwijderd**, Kell, LW, Knops hiervoor kun je dus **geen antigeentypering** doen

Warm wassen ook voor interpretatie DAT; let op hoe hoger de temperatuur hoe meer IgG je zult verwijderen


6

Serumonderzoek

- Alle cellen uit panel (zwak) positief vaak inclusief autocontrole
- Bij aanwezigheid anti (I)H bij bloedgroep A autocontrole soms negatief want minder (I)H dan bloedgroep testerytrocyten

Makropanel 16 8000000000
 Makropanel 16P 8000000007
 Cellbind ID16 8000000012
 Column panel 16 8000000014
 C E 03H 03E 03I 03J 03K 03L 03M 03N 03O 03P 03Q 03R 03S 03T 03U 03V 03W 03X 03Y 03Z

Phosphorsel 130 1000 120 40 10000000 The Netherlands
 Phone 01 20 512 2000 Fax 01 20 512 2070



Reage	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Reage	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Reage	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Let op: Een dergelijk patroon kun je ook zien bij

- Antistoffen tegen hoog frequent antigeen
- Combinatie van verschillende (allo)antistoffen
- Medicatie anti-CD38: (daratumumab/isatuximab)
- Antistoffen tegen bewaarvloeistof

7

Vaststellen of er koude autoantistoffen zijn

- Onderzoek bij 16°C eventueel bepaling specificiteit

O volw I (screening)	O navel ii	A/B/AB	resultaat
sterk pos	neg	sterk pos	Anti-I
sterk pos	sterk pos	zwak of neg	Anti-H
sterk pos	neg	zwak of neg	Anti-IH
zwak of neg	sterk pos	zwak of neg	Anti-i
sterk pos	sterk pos	sterk pos	aspecifiek

8

8

Indien koude antistoffen aangetoond: werkvolgorde alloantistof onderzoek



1. Buis in koelkast laten staan zodat zoveel mogelijk koude antistoffen uit het serum binden aan de erythrocyten (autoadsorptie)
2. PEG IAT / LISS IAT Bij anti-(I)H bij bloedgroep A: A testery's mogelijk
3. PEG IAT warm voegen /warm wassen of LISS IAT warm voegen
4. DTT behandeling dan LISS IAT 1:1 verdunning, controle meenemen

9

Alles uitgesloten: transfusie-advies?



- ABO /RhD vaststellen in twee onafhankelijke samples
- Preventief matchen en kruisen?
 - Geen (aanwijzingen) voor hemolyse
 - beschouwen als klinisch onbelangrijke (allo)antistoffen.
 - Selectie eenheden op basis van kruisproef in techniek waarin is uitgesloten
 - Hemolyse of andere redenen om aan te nemen dat antistoffen klinisch belangrijk zijn
 - Preventief matchen conform AIHA in richtlijn, Rh fenotype en K compatibel
 - Kruisproef in techniek waarin is uitgesloten
 - Afhankelijk van kliniek en/of temperatuursamplitude antistoffen overweeg toedienen via voorverwarming
 - Cave: pre-OK wees alert op hypothermie

10



Klinisch belang: hoe testen?

11

Klinisch belang zegt iets over oorzaak en geeft richting voor behandeling



- Vraag vanuit kliniek: patiënt met hemolyse en verdenking AIHA
 - Kunnen IgM autoantistoffen de oorzaak zijn?
- Bevindingen in het laboratorium
 - 'toevals'bevinding koude autoantistoffen: informatief voor behandelaar

12

Uitslag DAT bij aanwezigheid koude autoantistoffen

DAT pos met complement

- Onderzoek naar koude antistoffen;
 - Reactief bij 4C/16C/18C/20C positief

Zijn de IgM antistoffen de veroorzakers van de afbraak?

DAT pos met complement en met IgG

- Zowel warmte als koude antistoffen aantoonbaar
 - IgG verantwoordelijk voor afbraak

Leveren IgM antistoffen ook bijdrage aan afbraak?

DAT negatief

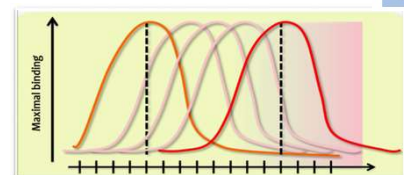
- Koude antistoffen aantoonbaar

Kunnen deze IgM antistoffen wel afbraak veroorzaken?

13

1. Kenmerken koude (auto) antistoffen

- Sterker reactief bij lagere dan bij hogere temperatuur
- Klinisch belangrijke antistoffen binden bij lagere temperatuur in perifere circulatie en activeren complement. Dissociatie IgM zodra in "warmere" lichaamsomgeving. Complement blijft gebonden
- IgM, soms IgG (DL antistoffen), complement-bindend



14

1. Kenmerken koude autoantistof



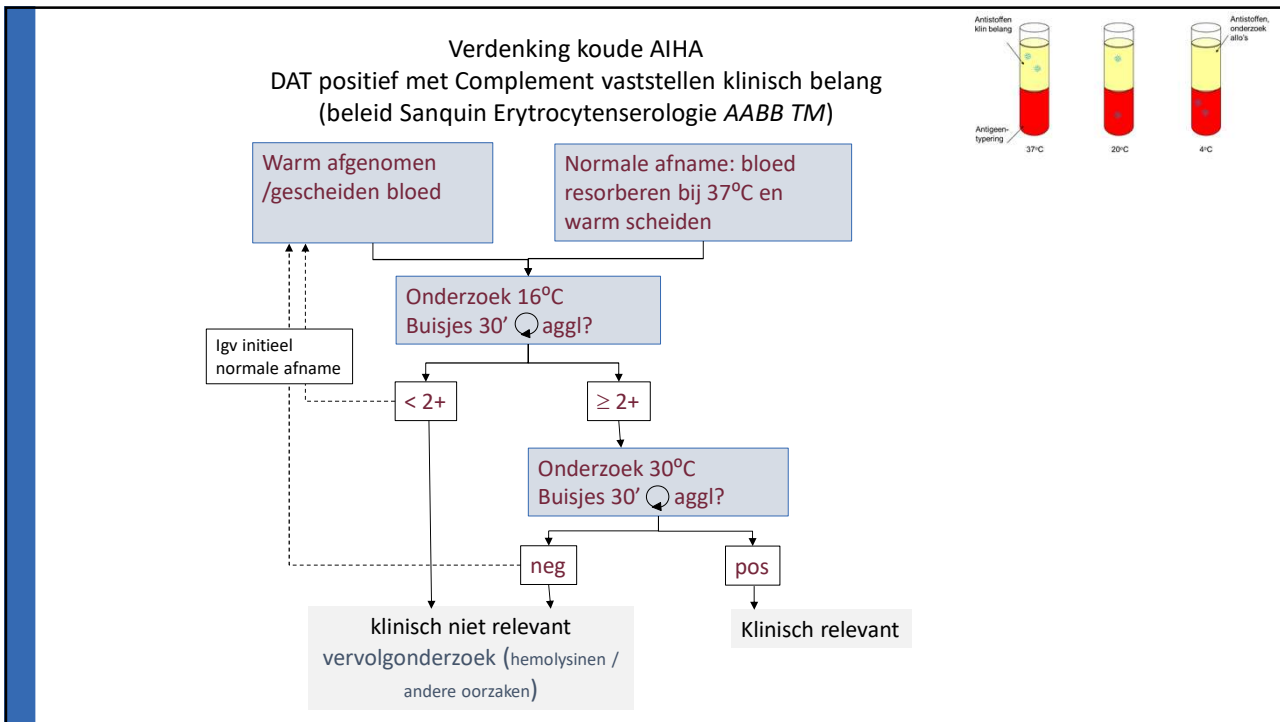
Temperatuur bereik	Klinisch Belang	Specificiteit	Bijzonderheden	Problemen in lab
<15°C	Geen	I, IH, H	Vrijwel bij iedereen	Nee
15°C - 25°C	Geen	I (bij <i>Mycoplasma infect</i> , maar ook bv CMV) i (EBV)	Correlatie met infectie soms ↑temp ampl >30°C (transient)	Mogelijk
>30°C	CAD AIHA	Ii, H, Pr Bifasische hemo-lysinen (=Donath Landsteiner) antistoffen): anti-P	- Idiopathisch/primair - Secundair aan infect /maligniteit /AIZ DL: associatie met viraal infect vnl bij kinderen, ook een associatie met Syphilis	Ja Meestal niet

15

Koude autoantistoffen Laboratoriumonderzoek Sanquin IHD Expertiselaab



16



17

In vitro testen en vaststellen klinisch belang

Richtlijn/ protocollen:

Engelse richtlijn (2016); AABB technical manual 18th ed. 2014.

Verschillende methodes, cut off waarden voor

Clinical significance of a cold antibody is determined entirely by its ability to combine with red cells at, or near, body temp. rather than by its titre

Determination of the titre is not worthwhile as a routine

Mollinson's Blood Transfusion in clinical medicine CH7 2005

CAS may be diagnosed if the following are present: 1. clinical evidence of hemolysis 2. presence of cold agglutination with reactivity up to at least 30°C.

Garraty, Immune Hemolytic Anemias 2004

natuuramplitude lijkt betere

18

Evidence voor dit beleid?

TABLE I. Cold agglutinin titres and thermal ranges

Patient	Haemolytic anaemia	4°C		30°C		37°C	
		Saline	Albumin	Saline	Albumin	Saline	Albumin
1 M.W.	yes	2560	5120	1	640	0	320
2 A.D.	yes	5120	10240	1	640	0	160
3 F.Br.	yes	2560	5120	40	320	0	80
4 D.W.	yes	2560	5120	20	320	0	20
5 M.C.	yes	1280	1280	10	160	1	1
6 R.D.	yes	10240	10240	1	40	0	1
7 E.F.	yes	640	1280	1	20	0	1
8 H.L.	yes	640	5120	10	160	0	10
9 J.Sc.	yes	640	2560	1	40	0	1
10 E.C.	yes	2560	5120	1	10	0	1
11 S.F.	yes	1280	1280	1	10	0	1
12 E.T.	yes	8192	4096	128	128	8	16
13 P.Bc.	yes	1024	256	0	1	0	0
14 C.D.	yes	1024	2048	0	2	0	0
15 M.J.	yes	640	2560	0	10	0	1
16 V.W.	yes	640	1280	0	40	0	1
17 G.M.	yes	1280	5120	0	20	0	1
18 M.P.	yes	1024	256	0	4	0	2
19 W.W.	yes	640	640	0	1	0	0
20 L.U.	yes	640	640	0	1	0	0
21 E.Sc.	yes	2048	1024	0	8	0	1
22 F.M.	yes	320	320	0	10	0	0
23 E.Sc.	yes	320	320	0	1	0	0
24 J.W.	yes	256	1024	1	4	0	1
25 D.S.	yes	256	512	1	2	0	0
26 E.D.	yes	256	512	0	4	0	0
27 E.Sh.	yes	128	1024	1	1	0	0
28 M.E.	yes	8	128	0	1	0	1
29 M.B.	no	320	320	0	0	0	0
30 G.H.	no	320	640	0	0	0	0
31 J.S.	no	1280	2560	0	0	0	0
32 C.W.	no	320	20	0	0	0	0

British Journal of Haematology, 1977; 35, 587.

The Correlation of Cold Agglutinin Titrations in Saline and Albumin with Haemolytic Anaemia

GEORGE GARRATTY, LAWRENCE D. PETZ AND J. K. HOOPS

The Variability of Hemolysis in the Cold Agglutinin Syndrome

By Wendell F. Rosse and Judith P. Adams
Advances in Blood, Vol. 56, No. 3 (September), 1980

Clinical immunology of chronic cold agglutinin disease

Ulvestad E, Berentzen S, Ba K, Shammus FV. Clinical immunology of chronic cold agglutinin disease. *Eur J Haematol* 1999; 62: 259-266. © Munksgaard 1999

Elling Ulvestad¹, Sighjorn Berentzen², Kristine Ba², Foad V. Shammus²

Defining a reference range for cold agglutinin titers

Tj 2014;54,1294

Brenda J. Bendix,¹ Craig D. Tauscher,¹ Sandra C. Bryant,² James R. Stubbs,¹ and Eapen K. Jacob¹

19

Titer 4°C en/of temperatuursamplitude? cut-off waarden

- Vrijwel iedereen heeft antistoffen reactief bij 4°C; welke titer goede voorspeller?
 - Verschillend per studie
 - Geen eenduidige correlatie (lage titer wel ziekte en vice versa)
 - Gerapporteerde studies hanteren verschillende methodes
 - warm afgenomen/niet warm afgenomen
 - techniek verschillen: glaasjes, buisjes, microtiterplaten etc
 - met zonder BSA, incubatietijd
- Temperatuursamplitude, lijkt hogere specificiteit te hebben
 - Vanaf 30°C relevant
 - Echter ook hier variatie afnamemethode, incubatietijden, met/zonder albumine

Conclusie: geen uniforme evidence-based serologie

20

In-vitro testen voor vaststellen klinisch belang Wat doen we in NL?



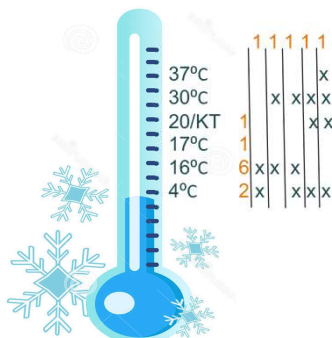
- Dr Marit Jalink: Enquête uitgezet via VHL
- 15 respondenten die aangeven onderzoek te verrichten naar koude auto antistoffen



21

Resultaten enquête

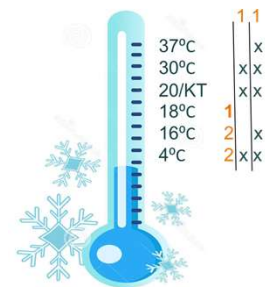
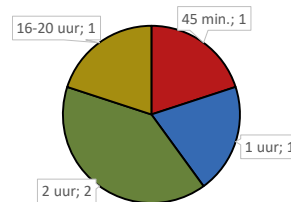
- Bij welke temperatuur onderzoek naar koude antistoffen?



22

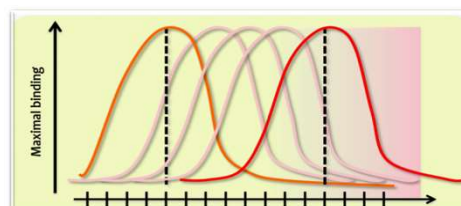
Bepaalt U een titer en zo ja hoe?

- 7 vd 15 respondenten verricht titerbepalingen
- Materiaal
 - 4x plasma, 2x serum, 1x kan beiden
 - Warm afnemen/scheiden? 2x ja, 1x nee, 4x resorberen (na afname in 37C stoof)
- Techniek
 - Verdunning in PBS/Saline (dus geen BSA)
 - 7x buisje zonder IAT, 1x BioRad kolom
 - Incubatietijd:
 - 16-20 uur; 1
 - 45 min.; 1
 - 1 uur; 1
 - 2 uur; 2
 - Temperatuur:
 - 37°C
 - 30°C
 - 20°KT
 - 18°C
 - 16°C
 - 4°C



23

Bepaalt U een temperatuursamplitude?



- 8 van de 15 verricht (soms) een temperatuuramplitude
 - Temp verschilt: 30 en/of 37C

		Titer	
		ja	nee
Temp Amplitude	Ja	4	3
	Nee	3	5

24

Resultaten Enquête Conclusie



Ook in NL geen 'best practice'. Divers beleid in laboratoriumdiagnostiek naar vaststellen klinisch belang koude autoantistoffen.

Vraag 1:

DRAIHA studie

Wat is de correlatie van serologische bevindingen met de kliniek?
Kunnen we serologische voorspellers identificeren

Vraag 2:

Kunnen we een algoritme voor de serologische work-up voor karakteriseren koude autoantistoffen vaststellen?

25



Bijzondere koude autoantistoffen

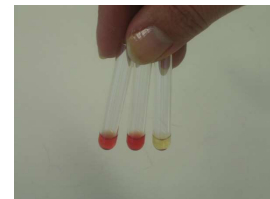
26

Bifasische hemolysinen



Bifasische hemolysinen= Donath-Landsteiner antistoffen

- **Intravasculaire** hemolyse
- **IgG** antistoffen meestal anti-P
- Komt vrijwel alleen voor bij jonge kinderen
- Antistoffen **binden bij lage temperatuur** in capillaire vaten en **complementactivatie in circulatie** bij 37C
- Klinisch beeld kenmerkend
- Antistofonderzoek: **negatief in IAT** (soms zwak positief in kolom test)
- DAT meestal alleen positief met **anti-C3d**



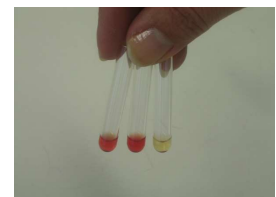
Opsporen met *in vitro* testen waarbij hemolyse uitgelezen wordt in plaats van agglutinatie

27

Monofasische hemolysinen



- **IgM** antistoffen
- Antistofonderzoek in **IAT kan positief** zijn
- DAT meestal alleen positief met **anti-C3d**
- Onderscheid tussen warmte hemolysinen en koude hemolysinen
- **Klinisch uitkomst variabel**
Geen hemolyse – verkorte overlevingsduur ery - (ernstige) intravasale hemolyse.
Hangt samen met mate van complementactivatie *in vivo*



Opsporen met *in vitro* testen waarbij hemolyse uitgelezen wordt in plaats van agglutinatie

28



Take Home message

29

Take home

Transfusievraag:

- Bewijs dat je onverwachte reacties veroorzaakt worden door koude antistoffen voordat je gebruik maakt van aangepaste technieken
- Denk aan correcte controles

Transfusie

- Afhankelijk van hemolyse evt. Rh fenotype K compatibel
- Via verwarmingselement toedienen?
- Cave operaties met hypothermie

Klinisch belang

- Informatie uit laboratorium van belang voor kliniek en vice versa
- Informeer behandelaar actief bij onverwachte bevindingen
- Indien reactief bij 30°C: hemolyse mogelijk.
- Onderzoek naar optimale algoritme om beter klinisch belang te kunnen voorspellen is ongoing

30



Do
31-03-2022



**Een warme groet;
Dank voor uw aandacht**

31

**Disclosure belangen spreker
onderwijsbijeenkomst Transfusiegeneeskunde ZO van 31 maart 2022**

Naam: Claudia Folman

Geen (potentiële) belangenverstrengeling

Geen

- Voor bijeenkomst mogelijk relevante relaties¹
- Sponsoring of onderzoeksgeld²
- Honorarium of andere (financiële) vergoeding³
- Aandeelhouder⁴
- Andere relatie, namelijk ...⁵

Bedrijfsnamen
NVT

32