

CAT

Critically Appraised Topic

RBC-genotypering bij warme auto-immuun hemolytische anemie

Author: Thomas Pilate

Supervisor: Dr. Elena Lazarova

Search/methodology verified by: Dr. Elena Lazarova

Date: 20/03/2018

CLINICAL BOTTOM LINE

Wanneer er bloedeenheden moeten toegediend worden aan patiënten met warme autoimmuun hemolytische anemie (WAIHA) zal dit vaak heel wat stress veroorzaken in bloedbanklabo's. De aanwezigheid van warme auto-antistoffen (WAA) op de rode bloedcellen (RBC) van deze patiënten zal immers interfereren met de meeste routine pretransfusie testen. Zo zal in de meeste gevallen het plasma van de patiënt bij kruisproeven reageren met alle donor-RBC en zal bij 'type and screen' het plasma van de patiënt reageren met alle panel-RBC. Daarnaast bestaat het probleem dat bij een belangrijk deel van de WAIHA-patiënten tevens klinisch belangrijke allo-antistoffen circuleren. Daarom zijn additionele pretransfusie testen nodig. De huidig gebruikte testen om deze allo-antistoffen aan te tonen, zijn niet betrouwbaar (zoals de dilutiemethode) of zijn erg tijdrovend en technisch ingewikkeld (zoals autologe en allogene adsorptie). Een interessant alternatief voor het uitvoeren van deze pretransfusie testen is om bij deze patiënten alle relevante RBC-antigenen te bepalen via serologische of moleculaire methoden. Op deze manier kunnen gematchte bloedeenheden toegediend worden waarop de patiënten geen klinisch relevante antistoffen kunnen aanmaken en kunnen de pretransfusie testen worden overgeslagen. Vaak is de serologische bepaling van RBC-antigenen technisch niet volledig mogelijk bij patiënten met WAA op de RBC. Daarom wordt meer en meer gekeken naar de mogelijke rol van RBC-genotypering die geen interferentie ondervindt van de WAA. Hoewel er in de literatuur slechts beperkte evidentie bestaat voor de rol van RBC-genotypering werd tussen 2013 en 2017 bij 72% van de patiënten met WAA in UZ Leuven deze analyse uitgevoerd. Liefst 69% van deze patiënten had nadien nood aan genotypisch gematchte bloedeenheden. Dit wijst erop dat RBC-genotypering een zeer nuttige rol kan spelen in het transfusiebeleid bij WAIHA-patiënten.

Autoimmuun hemolytische anemie (AIHA) ontstaat door een verhoogde afbraak van rode bloedcellen (RBC) door de aanwezigheid van anti-RBC auto-antistoffen en/of complement. AIHA is een zeldzame aandoening met een incidentie van 1 tot 3 nieuwe gevallen per 100000 personen per jaar [1, 2, 3].

AIHA kan onderverdeeld worden in verschillende categorieën afhankelijk van de optimale temperatuur waarbij de auto-antistoffen actief zijn.

- Warme AIHA (WAIHA)
- Koude AIHA (KAIHA):
 - Koude agglutinine syndroom (KAS)
 - Paroxismale koude hemoglobinurie (PKH)
- Mixed AIHA (MAIHA)
- Drug induced immuun hemolytische anemie (DIIHA)

Bij WAIHA reageren de antistoffen optimaal bij 37°C. Bij KAIHA tonen de antistoffen enkel affiniteit voor de RBC bij <37°C. Bij MAIHA hebben patiënten zowel koude als warme auto-antistoffen (WAA).

WAIHA ontstaat vaak idiopathisch, maar kan daarnaast ook verschillende onderliggende oorzaken hebben. In dit geval wordt gesproken over secundaire WAIHA. Volgende onderliggende aandoeningen worden frequent gezien bij patiënten met WAIHA [2]:

- Lymfomen (11% van CLL patiënten)
- Virale infecties (typisch bij kinderen)
- Systeemziekten
- Immuundeficiënties

WAIHA maakt 80 tot 90% uit van alle AIHA's en wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van WAA die meestal tot de IgG1 of IgG3 subklasse behoren [4]. Patiënten met WAIHA presenteren zich meestal met symptomen van anemie (vermoeidheid, algemene malaise) en zeldzaam met tekens van icterus. De onset van deze aandoening is meestal eerder traag over verscheidene maanden, maar sommige patiënten hebben een acuut begin van de ziekte met ernstige anemie en icterus over slechts enkele dagen [5].

De diagnose van WAIHA berust op een positieve directe antiglobulinetest (DAT). Hierbij wordt een polyspecifiek antiglobuline reagens met antistoffen tegen IgG en complement gebruikt om de RBC van een patiënt te screenen. Bij aanwezigheid van agglutinatie worden monospecifieke antisera gericht tegen IgG en C3d gebruikt. Wanneer er IgG auto-antistoffen blijken aanwezig te zijn op de RBC, kan dit wijzen op WAIHA. Vervolgens worden in de elutie de RBC met een zuur reagens behandeld waardoor de antistoffen loskomen van de RBC in het eluaat. Tenslotte gebeurt een identificatie van deze antistoffen door het eluaat te incuberen met RBC in testpanels. Auto-antistoffen die niet gebonden zijn aan RBC en dus vrij circuleren in het plasma kunnen ook opgespoord worden door de indirecte antiglobulinetest (IAT) waarbij plasma van de patiënt wordt geïncubeerd met RBC in testpanels [5].

De DAT is positief bij 1 tot 15% van de gehospitaliseerde patiënten en bij 1/7000 tot 1/14000 van gezonde donoren. De positief en negatief predictieve waarde (PPV en NPV) van de DAT voor WAIHA zijn respectievelijk 83% en 99%. Als er echter geen tekens van hemolyse zijn, is de PPV slechts 1.4% [14]. Daarom moet het resultaat van een DAT steeds gecorreleerd worden met het klinisch beeld en biochemie (hemolyseparameters zoals haptoglobine, LDH en indirect bilirubine) voor een correcte interpretatie.

De meerderheid van de antistoffen die gedetecteerd worden in het eluaat van patiënten met WAIHA binden aan antigenen die aanwezig zijn op bijna alle humane RBC; zogenaamde publieke antigenen. Vaak is er reactiviteit tussen de antistoffen in het eluaat en tegen antigenen van het Rhesus-complex die bij quasi iedereen aanwezig zijn. Slechts zelden worden auto-antistoffen teruggevonden die wel een smalle specificiteit hebben tegen bepaalde antigenen van het Rhesus-complex (bv. anti-e). Daarnaast kunnen er auto-antistoffen teruggevonden worden tegen glycoforine antigenen of andere publieke antigenen (bv. anti-Wr^b en anti-LW) [6].

Wanneer een patiënt met WAIHA een bloedtransfusie dient te krijgen, zijn er vaak grote technische problemen betreffende de routinetesten in het laboratorium die voorafgaan aan een bloedtransfusie. De WAA in het serum van de patiënt zullen meestal reageren met alle bloedeenheden waardoor er geen kruisproef compatibel bloed kan worden voorzien. Ook wanneer een bloedbanklaboratorium werkt via 'type and screen' waarbij er niet gekruist wordt met de bloedeenheden, maar wel gescreend naar allo-antistoffen in het plasma van de patiënt, zullen de auto-antistoffen reageren met alle RBC in de testpanels. Er zijn dus extra maatregelen nodig om de aanwezigheid van mogelijk klinisch belangrijke allo-antistoffen uit te sluiten. Uit

studies blijkt immers dat deze allo-antistoffen bij een belangrijk deel van de WAIHA-patiënten aanwezig zijn [7, 11].

Het doel van deze appraisal is om in de literatuur het aanbevolen transfusiebeleid bij patiënten met WAIHA na te gaan en welke rol genotypering hierin kan spelen. Daarnaast wordt ook een query gemaakt van alle stalen in UZ Leuven waarop een DAT werd aangevraagd tussen 2013 en 2017. A.d.h.v. deze data zal worden onderzocht of bij patiënten met aanwezigheid van WAA er systematisch in UZ Leuven een genotypering gebeurt van de RBC-antigenen.

QUESTION(S)

- 1) *Hoe kunnen klinisch belangrijke allo-antistoffen worden aangetoond bij patiënten met WAIHA?*
- 2) *Wat is de evidentie voor het uitvoeren van RBC-genotypering bij patiënten met WAIHA?*
- 3) *Wordt in UZ Leuven RBC-genotypering systematisch uitgevoerd bij patiënten met WAIHA?*

APPRAISAL

1. Transfusie bij WAIHA

De eerstelijnsbehandeling van WAIHA is het gebruik van corticosteroïden die meestal een snelle verbetering van de hemolyse teweegbrengen met stabilisatie van het hemoglobinegehalte 24 tot 72 uur na start van de therapie. RBC-transfusie is echter nog geregeld noodzakelijk bij patiënten met WAIHA wanneer zij zich presenteren met klinische tekens van anemische hypoxie wat typisch voorvalt bij patiënten met een hemoglobine <5 g/dL.

In het verleden was één van de grootste misvattingen dat het net contraproductief is om RBC-transfusies toe te dienen bij patiënten met WAIHA, zelfs bij een zeer ernstige anemie. De reden hiertoe is de angst om door RBC-transfusie de hemolyse net te verergeren aangezien de RBC-autoantistoffen bij de patiënt in bijna alle gevallen ook reageren met de getransfundeerde RBC en er dus geen compatibel bloed kan worden toegediend. Uit studies blijkt echter dat enerzijds de overleving van getransfundeerde RBC bij patiënten met WAIHA gelijkaardig is aan de overleving van de eigen RBC van de patiënt waardoor transfusie een (weliswaar tijdelijke) significante ondersteuning biedt met toename van de zuurstofbindingscapaciteit [8]. Anderzijds geven studies aan dat er geen verhoogd risico is op het optreden van significante

transfusiereacties na RBC-transfusies bij patiënten met WAIHA zolang de aanwezigheid van onderliggende allo-antistoffen kan worden uitgesloten. Zo werden in een retrospectieve studie uit 2015 van Yürek et al. 36 patiënten met WAIHA geïncludeerd die allen nood hadden aan urgente RBC-transfusies omwille van anemische hypoxie. 32 van deze patiënten kregen RBC-transfusies, ook al kon er in het laboratorium geen compatibel bloed gevonden worden door aanwezigheid van de auto-antistoffen. Bij geen enkele patiënt werd een significante hemolytische transfusiereactie gezien. Hoewel de hemoglobineconcentratie bij veel patiënten maar beperkt steeg, was er bij elke patiënt een duidelijk voordelig effect van de transfusie. Sommige van de patiënten kregen multipale transfusies zonder verwickelingen. De vier overige patiënten die geen of geen tijdige RBC-transfusie kregen, stierven allemaal. In de dossiers van deze patiënten was te lezen dat men dacht de onderliggende WAIHA te verergeren door het toedienen van incompatibele RBC [9]. Ook Conley et al. hebben vijf patiënten beschreven met WAIHA bij wie geen transfusie werd toegediend ondanks een levensbedreigende anemie [10, 11].

Park et al. onderzochten in een studie uit 2014 de dagelijkse veranderingen in hemoglobine, totaal bilirubine en LDH over een periode van zeven dagen bij 161 AIHA-patiënten die éénmalig werden getransfundeerd met één tot vijf RBC-eenheden. Na uitsluiten van allo-antistoffen via allogene adsorptie (zie verder) werden telkens de 'least incompatible' RBC-eenheden toegediend. Om deze te bepalen werd het plasma van de patiënt gekruist met minstens 10 ABO-compatibele RBC-eenheden. De eenheden waarbij de minste agglutinaties optrad, werden toegediend. De veranderingen in hemoglobine, totaal bilirubine en LDH werden vergeleken met post-transfusiepatiënten met enerzijds enkel allo-antistoffen in het plasma (n=100) en anderzijds zonder aantoonbare RBC-antistoffen (n=100). De studie toonde aan dat er tussen de drie groepen geen significante verschillen waren wat betreft veranderingen in hemoglobine, totaal bilirubine en LDH [12].

Deze studies benadrukken dus dat de onmogelijkheid tot toedienen van compatibele bloedeenheden bij patiënten met WAIHA geen contra-indicatie mag zijn voor transfusies indien er een levensbedreigende anemie bestaat.

2. Pretransfusie testen bij WAIHA

2.1 Allo-antistoffen

Het toedienen van incompatibele bloedeenheden bij patiënten met WAIHA is uiteraard niet zonder gevaar. Uit studies blijkt dat een belangrijk deel van de patiënten met WAIHA tevens allo-antistoffen in het plasma heeft. De prevalentie varieert sterk van studie tot studie zoals blijkt in Tabel 1 [15] : tussen 7.5 en 54%. Vaak gaat het in deze studies echter om patiënten met serologisch gelijktijdige aanwezigheid van allo- en auto-autoantistoffen en niet zozeer om patiënten met klinisch bevestigde WAIHA.

De frequentste allo-antistof specificiteit die wordt gezien bij deze patiënten, is gericht tegen Rhesus (50%) en Kell (20%) met als koploper anti-E antistoffen.

Author	N	Prevalence (%)	Alloantibody
Yurek et al ²⁷	36	19.4*	Anti-c, anti-E, anti-Jk ^a
Park et al ¹⁷	161	54	–
Das et al ²⁸	14	7.5	Anti-C
Yu et al ²⁹	61	29.5	–
Barros et al ³⁰	36	11.1	Anti-E, Anti-C
Das et al ³¹	23	30.4	Anti-C, Anti-E
Shirey et al ²³	20	40	Anti-D, anti-E, anti-C, anti-C*, anti-K, anti- Jk ^a , anti-Jk ^b
Branch et al ²⁰	647**	32	–
Leger et al ²¹	263	40	Anti-D, anti-E, anti-C, anti-c, anti-K, anti-Jk ^a , anti-Jk ^b , anti-Fy ^a
Issit et al ³²	138	43	–
Laine et al ³³	109	38	–

Tabel 1: Prevalentie van RBC allo-antistoffen bij patiënten met WAIHA [15]

2.2 Huidige technieken voor het opsporen van allo-antistoffen

Vroeger werd in veel bloedbanklaboratoria nog weleens het principe toegepast van ‘least incompatible unit’ voor het uitkiezen van RBC-eenheden bij WAIHA-patiënten. Dit kwam erop neer om het plasma van de patiënt te kruisen met een tiental RBC-eenheden en de eenheid uit te kiezen waarbij er het minste agglutinatie optrad. Men ging ervan uit dat de RBC in deze eenheid het minste kans hadden om antigenen te dragen waartegen de patiënt allo-antistoffen had. Deze methode is intussen verlaten [13].

Alle auteurs zijn het erover eens dat er technieken moeten worden toegepast waarmee allo-antistoffen kunnen worden opgespoord bij patiënten met WAIHA. Volgende methodes worden reeds toegepast:

- Dilutietechniek: deze techniek is relatief snel en gemakkelijk, maar wordt enkel nog in noodsituaties gebruikt. Ze is slechts toepasbaar wanneer een zwakke auto-antistof en sterker reagerende allo-antistof samen aanwezig zijn en de verschillen in reactiviteit met bepaalde cellen binnen het panel duidelijk zijn. De dilutietechniek bestaat er dan in het staal in die mate te verdunnen dat nog enkel de allo-antistoffen aantoonbaar zijn. Deze techniek is echter niet betrouwbaar. Zo toonden Leger et al. aan bij 117 patiënten met WAIHA dat de dilutietechniek 27% van potentieel klinisch belangrijke allo-antistoffen miste [14]. Andere procedures zijn dus noodzakelijk.
- Autologe adsorptie: bij adsorptietechnieken worden de circulerende auto-antistoffen uit het plasma verwijderd door het plasma van de patiënt te incuberen met RBC. Bij auto-adsorptie gaat het om de eigen RBC van de patiënt. Door de RBC voor te behandelen met ZZAP (een mix van 0.1 M dithiothreitol (DTT) met 0.1% cysteine-activated papaine) treedt er dissociatie op van het IgG van de eigen RBC en zullen door proteolyse van de RBC de circulerende auto-antistoffen sneller binden aan de RBC. Na de adsorptie wordt het adsorbaat geïncubeerd met de RBC van de testpanels om eventueel aanwezige allo-antistoffen te identificeren. Dit adsorbaat kan ook gebruikt worden om de kruisproef uit te voeren. Autologe adsorptie wordt beschouwd als de gouden standaard voor het opsporen van onderliggende allo-antistoffen, maar er zijn meerdere beperkingen. Zo duurt de adsorptie zelf relatief lang, kan het RBC-volume van patiënten met een diepe anemie onvoldoende zijn om de procedure uit te voeren en is deze methode niet bruikbaar bij patiënten die in de voorbije drie maanden een bloedtransfusie hebben gekregen, omdat de getransfundeerde RBC eventueel klinisch belangrijke allo-antistoffen kunnen adsorberen [15].
- Allogene adsorptie: dit is een tweede adsorptietechniek waarbij het plasma van de patiënt ditmaal geïncubeerd wordt met drie RBC-stalen met gekend, maar verschillend fenotype. Na de adsorpties worden de drie verschillende adsorbaten wederom geïncubeerd met de RBC in het testpanel. Doordat de drie gebruikte RBC-stalen elk een verschillend fenotype hebben, kunnen uiteindelijk de belangrijkste allo-antistoffen worden aangetoond of uitgesloten. Het grootste probleem met deze methode is dat ze

erg arbeidsintensief is, lang duurt (meerdere uren), enkel in referentiecentra wordt toegepast en dat antistoffen tegen high-frequency antigenen niet kunnen worden uitgesloten aangezien deze zullen worden geadsorbeerd door de drie RBC-stalen [13]. Om die reden krijgt auto-adsorptie de voorkeur op allogene adsorptie bij voldoende staalvolume (wat problematisch is bij een diepe anemie) en indien er geen recente transfusie voorafging [16].

2.3 RBC-fenotypering

Uitgebreide RBC-fenotypering houdt in dat de RBC van patiënten met WAIHA getypeerd worden voor, naast ABO-D, de klinisch relevante antigenen (i.e. C, E, c, e, K, Jka, Jkb, Fya, Fyb, S en s). Dit zijn antigenen waartegen de patiënten, na immunisatie, klinisch relevante antistoffen kunnen ontwikkelen. Op deze manier kunnen voor deze patiënten steeds fenotypisch gematchte RBC-concentraten worden gegeven zonder risico op ontwikkelen van antistoffen. De gouden standaard voor fenotypering is de serologische methode via hemagglutinatie.

Shirey et al. waren in 2002 de eersten om a.d.h.v. RBC-fenotypering een nieuw algoritme te beschrijven voor het transfusiebeleid bij patiënten met WAA [17]. In hun studie waren 20 patiënten met WAIHA geïncludeerd van wie er bij 12 een volledig fenotype serologisch kon worden bepaald. Van deze 12 patiënten hadden er acht reeds bestaande allo-antistoffen (meestal anti-E). Aan de 12 patiënten werden in totaal 149 profylactisch antigeen-gematchte bloedeenheden toegediend. Geen enkele patiënt ontwikkelde nieuwe allo-antistoffen na deze transfusies en er werden geen tekens van hemolytische transfusiereactie weerhouden. Bij de overige acht patiënten (d.i. 40%) echter kon het fenotype serologisch slechts partieel bepaald worden. Dit toont aan dat serologische fenotypering technisch moeilijk is en soms zelfs onmogelijk in de aanwezigheid van WAA. Wanneer monoklonale IgM antisera gebruikt worden, treedt er directe agglutinatie op zonder nood aan antihumaan globuline (AHG). Hierbij is er in principe geen interferentie door WAA. Tegen sommige antigenen (bv. Fy^a) zijn echter enkel IgG antisera commercieel beschikbaar waarbij het gebruik van AHG dus nog nodig is. Hier zal wel interferentie optreden door de IgG WAA. Er zijn technieken beschreven om de IgG autoantistoffen te verwijderen van het oppervlak van de RBC om deze interferentie tegen te gaan zoals het gebruik van chloroquine difosfaat of een EDTA-glycine-HCL oplossing (bv. EGA) [18]. Zelfs met deze technieken zal er toch een belangrijk deel van de WAIHA-patiënten zijn bij wie er geen volledige fenotypering mogelijk is, typisch wanneer de DAT sterk positief is (4+)

[20]. Ook andere auteurs rapporteerden dat deze fenotypering slechts mogelijk is bij een deel van de WAIHA-patiënten [2, 19].

Een ander groot probleem is dat bij recente transfusies (binnen de drie voorbije maanden) serologische fenotypering meestal niet bruikbaar is door interferentie van de donor-RBC.

Om deze redenen gaan er de laatste jaren meer en meer stemmen op om over te schakelen op RBC-genotypering in deze patiëntpopulatie.

2.4 RBC-genotypering

2.4.1 Evidentie voor RBC-genotypering

Sinds de ontdekking van het ABO-bloedgroepsysteem in het begin van de 20^{ste} eeuw werden reeds meer dan 300 nieuwe bloedgroepantigenen ontdekt die behoren tot 35 verschillende bloedgroepsystemen. Intussen is de moleculaire basis van bijna al de genen verantwoordelijk voor de verschillen in deze bloedgroepantigenen gekend. Vaak worden deze kleine verschillen veroorzaakt door single-nucleotide polymorfismen (SNP's), de verandering van één nucleotide in de DNA-sequentie van een gen. Identificatie van deze SNP's heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende moleculaire platforms voor genotypering van RBC-antigenen [20].

Bij RBC-genotypering is er geen interferentie door de aanwezigheid van auto-antistoffen of door de aanwezigheid van donor-RBC na recente transfusie. Daarom lijkt RBC-genotypering een zeer interessant alternatief voor WAIHA-patiënten bij wie RBC-fenotypering niet volledig mogelijk is. Een ander voordeel van RBC-genotypering is dat er een kleiner staalvolume nodig is wat zeker in de pediatrische patiëntpopulatie niet onbelangrijk is.

De mogelijkheid om RBC-genotypering uit te voeren bij patiënten met WAIHA werd reeds in enkele artikels naar voren gebracht [21, 22]. In de studie van El Kenz et al. [21] werd bij zeven patiënten met WAIHA RBC-genotypering uitgevoerd waarna bij elke patiënt gematchte bloedproducten werden toegediend zonder noodzaak aan autologe of allogene adsorptieprocedures. Na elke transfusie werd de hemoglobinstijging als bevredigend beschouwd en traden geen hemolytische of andere transfusiereacties op. Ook werden bij deze patiënten geen nieuwe allo-antistoffen ontwikkeld na de transfusies. Dit werd getest a.d.h.v. allogene adsorpties.

Ook al zijn er in de literatuur dus al enkele protocols beschreven over het gebruik van gematchte bloedeenheden bij patiënten met WAIHA op basis van RBC-fenotypering [17] en -genotypering [21], ging het hier telkens om zeer kleine patiëntpopulaties en is er helaas een groot tekort aan evidence-based protocols. Ook richtlijnen in de literatuur over het transfusiebeleid bij WAIHA en de rol die fenotypering en genotypering van RBC-antigenen hierin kunnen spelen, zijn erg schaars.

In 'de bijbel' over immuun hemolytische anemie, Acquired Immune Hemolytic Anemias van Petz en Garratty [23], wordt het gebruik van RBC-fenotypering of -genotypering warm aanbevolen:

"For all patients with WAIHA who require transfusion, we strongly recommend determining the extended RBC phenotype or genotype of the patient prior to initial transfusion. If time does not allow, it is nevertheless advisable to obtain a blood specimen from the patient for subsequent typing."

In de Nederlandse richtlijnen voor bloedtransfusie uit 2011 [24] geeft men over de selectie van RBC-eenheden voor patiënten met AIHA de volgende aanbeveling (evidence niveau 3):

"Ter voorkoming van allo-antistofvorming dient indien mogelijk rhesusfenotype- en K-compatibel bloed geselecteerd te worden voor patiënten met AIHA."

Daarnaast haalt men aan dat matchen voor Kidd-, Duffy- en Ss-antigenen eveneens is aangewezen en indien dit niet mogelijk is serologisch vast te stellen met monoklonale reagentia er de mogelijkheid bestaat om op DNA-niveau te typeren.

In richtlijnen over AIHA in the British Journal of Hematology uit 2016 [25] wordt volgende aanbeveling gegeven voor bloedtransfusie bij patiënten met AIHA:

"If anaemia is life threatening in the time required for full compatibility testing, transfuse with ABO, Rh and K matched red cells."

Men spreekt in deze richtlijnen niet over een eventuele rol voor RBC-fenotypering of -genotypering.

BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) is een internationale onderzoeksgroep met als doel het transfusiebeleid te optimaliseren. Zij hebben een enquête opgesteld met 31 vragen rond het beleid bij patiënten bij wie WAA werden aangetoond in de DAT [14]. Deze enquête werd ingevuld door 54 laboratoria, dit was een responsratio van 33%. Het ging om Amerikaanse

(34), Canadese (3), Europese (14), Braziliaanse (1), Nieuw-Zeelandse (1) en Australische (1) bloedbanken.

75% van de deelnemers gaf aan autoadsorptie uit te voeren bij patiënten met WAA indien een dringende bloedtransfusie vereist was. 76% van de deelnemers ging over tot alloadsorptie indien er in de afgelopen drie maanden reeds een bloedtransfusie had plaatsgevonden.

Met betrekking tot genotypering van de RBC-antigenen gaf 20% aan deze nooit of zelden uit te voeren bij patiënten met WAA. 12% deed dit enkel op vraag van de clinicus. De overige 68% voerde genotypering uit bij identificatie van WAA bij volgende indicaties:

- Ongeacht de vraag naar RBC-eenheden (20%).
- Enkel wanneer RBC-eenheden gevraagd werden (4%).
- Wanneer er een recente voorgeschiedenis was van bloedtransfusie waardoor RBC-fenotypering niet mogelijk was (18%).
- Wanneer fenotypering technisch niet haalbaar bleek (14%).
- Wanneer de detectie van onderliggende alloantistoffen technisch te complex werd (10%).
- Om de selectie van RBC bij alloadsorptie te vereenvoudigen (2%).

75% van de deelnemers gaf aan fenotypisch of genotypisch gematchte bloedeenheden toe te dienen wanneer WAA aanwezig waren en er geen onderliggende alloantistoffen gedetecteerd werden.

Hieruit kan besloten worden dat een belangrijk deel van de bloedbanken in deze studie dus reeds overgaan tot het uitvoeren van RBC-genotypering en het toedienen van genotypisch gematchte bloedeenheden ondanks het gebrek aan richtlijnen hieromtrent.

Het is belangrijk om steeds in gedachten te houden dat genotypering, onafhankelijk van de gebruikte test, enkel bloedgroepen kan voorspellen. Er zijn beperkingen aan de huidig gebruikte moleculaire technieken aangezien deze enkel gekende SNP's targeten. In zeldzame gevallen zal de bepaling van een genotype niet correleren met de antigeen expressie, omdat niet alle relevante SNP's gekend zijn in alle etnische groepen. Hierdoor kunnen verschillen ontstaan met RBC-fenotypering [26]. Enkele van deze mutaties die voornamelijk voorkomen bij het zwarte ras worden reeds opgespoord met de huidige RBC-genotypering in HILA (zie verder):

- Het FYX allel codeert voor een Fy^b allel dat slechts zwak tot expressie komt en daarom niet altijd wordt gedetecteerd door anti-Fy^b bij RBC-fenotypering.

- Het Fy(a-b-) fenotype bij Afrikanen is het resultaat van een stil allel dat geassocieerd is met een mutatie in de GATA box die de transcriptie verhindert van het Fy^b op RBC, maar niet in andere weefsels [27].
- SNP's op de GYPa en GYPB genen op chromosoom 4 zijn verantwoordelijk voor de S/s en M/N allelische varianten. Personen met een GYPB gen deletie zijn negatief voor het S, s evenals het U antigeen. Het U antigeen is een publiek antigeen dat bij quasi 100% van het Kaukasische ras voorkomt. Daarnaast is er nog het S-s-U+var fenotype dat gekarakteriseerd wordt door een zwakke expressie van het U antigeen en afwezigheid van de S en s allelen op het RBC-oppervlak. Dit fenotype wordt eveneens enkel gezien bij personen van het zwarte ras die mutaties vertonen in exon 5 (GYPB(NY) variant) of intron 5 (GYPB(P2) variant) van het GYPB gen. Deze genotypes zijn belangrijk om op te sporen aangezien deze personen na immunisatie klinisch belangrijke anti-U antistoffen kunnen aanmaken [28].

Enkele studies hebben het gebruik van RBC-fenotypering en -genotypering met elkaar vergeleken. In een Franse studie uit 2011 fenotyperden en genotyperden Kappler-Gratias et al. 356 RBC-eenheden afkomstig van RBC-donoren [29]. Per RBC-eenheid werden 25 antigenen bepaald, in totaal ging het om 8876 antigenen. 8872 hiervan (99.95%) toonden perfecte concordantie tussen fenotypering en genotypering. Bij twee van de vier discordanties bleek na herhaling van fenotypering en genotypering de moleculaire bepaling te kloppen en dus de oorspronkelijke fenotypering foutief te zijn (1x Lu^{a-} i.p.v. Lu^{a+} en 1x Do^{b+} i.p.v. Do^{b-}). Bij de overige twee discordanties (1x discordantie in het KEL2 gen coderend voor k en 1x discordantie in het RH4 gen coderend voor c) moest bij publicatie van het artikel nog sequencing worden uitgevoerd van de genen om uitsluitsel te brengen. Desalniettemin toonden RBC-fenotypering en -genotypering een uitstekende concordantie.

In patiëntpopulaties die frequent bloedtransfusies dienen te krijgen, is echter aangetoond dat RBC-genotypering superieur is aan RBC-fenotypering. In een studie van Casas et al. uit 2015 werden de RBC van 494 sikkelcelanemie patiënten gegenotypeerd [30]. Deze resultaten werden vergeleken met het historisch bepaalde fenotype van deze patiënten. Van de 6360 antigeen vergelijkingen waren er 71 discrepanties (d.i. 1.1%). Bij 66 van deze 71 stalen werd de fenotypering herhaald. Bij 64 van de 66 stalen (97%) bleek het historisch fenotype niet te kloppen. Er was één patiënt bij wie het genotype niet volledig correct bleek na verder onderzoek. Genotypisch was het resultaat Jk^{b+} en fenotypisch JK^{b-}. Na sequencing bleek het om een silent allel te gaan dat genotypisch niet kon worden opgespoord. De laatste discordantie was er één in het N-allel, maar deze was nog niet uitgeklaard bij publicatie van het artikel. De

reden dat RBC-genotypering beter scoort in deze populatie met chronische transfusienood is door interferentie van donor-RBC bij RBC-fenotypering.

Er zijn enkele bemerkingen die we kunnen vormen bij het gebruik van antigeen compatibele bloedeenheden. Men moet er rekening mee houden dat RBC-eenheden met bepaalde fenotypes niet direct voorradig zullen zijn in kleinere perifere ziekenhuizen. Ook in de centrale bloedbankdepots zullen niet altijd RBC-eenheden beschikbaar met zijn met zeer zeldzame fenotypes. Voor deze patiënten zullen dus alsnog adsorpties moeten worden uitgevoerd. Daarnaast zal een belangrijk deel van de patiënten met WAIHA na diagnose geen RBC-transfusies meer nodig hebben door een succesvolle therapie en is RBC-fenotypering of -genotypering dus in principe overbodig. Zo blijkt uit gegevens van het Los Angeles Red Cross Reference Laboratory dat slechts bij 22% van de patiënten (90 van 480) met WAIHA in 2002 meer dan éénmaal adsorpties moesten worden uitgevoerd. 78% van de patiënten had dus schijnbaar geen nood aan herhaalde transfusies. De kosteneffectiviteit van deze aanpak moet dus nog vastgesteld worden [31, 32]. Ook is er geen evidentie of het voordeliger is om meteen RBC-genotypering uit te voeren of enkel wanneer RBC-fenotypering technisch niet haalbaar blijkt.

2.4.2 RBC-genotypering in Vlaanderen

RBC-genotypering op stalen uit UZ Leuven gebeurt in het HILA-laboratorium in Mechelen a.d.h.v. de PCR-SSP (single specific primer) methode met de RBC-FluoGene vERify kit (Inno-Train). De wells van de PCR-platen in deze kit zijn gecoat met gelyofiliseerde allel-specifieke primers. Elke well bevat tevens een primer voor amplificatie van het human groeihormoon die geldt als interne controle. Na toevoegen van het DNA van de patiënt en FluoMix (bevat het Taq polymerase, dNTP's en buffer) wordt de PCR-plaat in de thermocycler geplaatst voor ongeveer 1 uur en 17 minuten. Het RBC-allel zal enkel geamplificeerd worden als de specifieke target sequentie overeenkomt met de sequentie van de primer. Elke primer beschikt over een fluorochroom met telkens een specifieke kleur. Aan de hand van het verschil tussen de post- en de pre-PCR fluorescentie intensiteit (gemeten in FluoVista) wordt ten opzichte van een cut-off waarde automatisch een resultaat berekend (aanwezig of afwezig) voor elk allel. Bij wijze van controlemechanisme wordt elk allel op deze manier minstens tweemaal bepaald.

In deze kit worden volgende RBC-allelen gedetecteerd met bijgevoegd het overeenstemmende RBC-antigen:

- Rhesussysteem: Rh2 (C), Rh3 (E), Rh4 (c), Rh5 (e), Rh8 (Cw)

- Kell: KEL1 (K), KEL2 (k)
- Kidd: JK1 (Jka), JK2 (Jkb)
- Duffy: FY1 (Fya), FY2 (Fyb), FYnull, FYX
- MNS: MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), U+var(P2), U+var(NY)
- Dombrock: DO1 (Doa), DO2 (Dob)

Er bestaat reeds terugbetaling voor RBC-genotypering in de context van WAIHA. In artikel 33bis van de nomenclatuur van geneeskundige verstrekkingen beschrijft verstrekking 587775-587786 het bepalen van andere erythrocyten antigenen dan ABO en Rh door middel van een moleculair biologische methode waarbij minimaal 14 antigenen worden bepaald. Voor deze verstrekking geldt volgende diagnoseregels: ze mag alleen aangerekend worden aan de ZIV in geval van chronische transfusienood bij patiënten met auto-antistoffen, met congenitale hemolytische aandoeningen, met aplastische anemie of met allo-antistoffen na transfusie. Voor WAIHA-patiënten met transfusienood wordt deze analyse dus terugbetaald door het RIZIV. Deze verstrekking krijgt een B-waarde van 4500. Bij moleculaire analyses wordt 100% van de B-waarde terugbetaald wat in dit geval neerkomt op ongeveer 189 euro per analyse.

3. Data UZ Leuven

Er werd een query gemaakt met de resultaten van alle DAT-analyses in het bloedbanklaboratorium van UZ Leuven tussen 2013 en 2017. Deze query omvatte naam, leeftijd en geslacht van de patiënt, het resultaat van de DAT en van het eventuele eluaat, het resultaat van de IAT, of er RBC-genotypering was uitgevoerd en of er RBC-transfusies plaatsvonden voor en na zowel de DAT als de eventuele RBC-genotypering.

Tussen 2013 en 2017 werden in totaal 5477 DAT-analyses uitgevoerd in het bloedbanklaboratorium van UZ Leuven bij kinderen en volwassenen (4805 bij volwassenen en 672 bij kinderen). Neonaten bij wie standaard een DAT wordt aangevraagd meteen na de geboorte, werden in deze data niet meegerekend.

271 van de 4805 stalen (5.6%) waren IgG auto-antistoffen aanwezig op de RBC en was het eluaat positief met auto-antistoffen. Deze stalen behoorden toe aan 188 verschillende patiënten (167 volwassenen, 21 kinderen) die dus WAA bleken te dragen op hun RBC. Bij vijf patiënten ging het om antistoffen met een smalle specificiteit (2x anti-e, anti-c, anti-D en anti-E). Bij de overige

183 patiënten ging het om antistoffen met brede specificiteit die reageerden met alle panel-RBC.

45 van deze 188 patiënten (24%) hadden eveneens allo-antistoffen in hun plasma. 16 van deze patiënten hadden zelfs twee of meer allo-antistoffen. Tabel 2 geeft een overzicht van de allo-antistoffen die werden teruggevonden:

Antistof	Aantal
Anti-D	5
Anti-C	6
Anti-c	3
Anti-E	12
Anti-e	1
Anti-K	11
Anti-S	8
Anti-s	1
Anti-Jka	8
Anti-Jkb	2
Anti-Fya	4
Anti-Fyb	1
Anti-M	1
Anti-Lea	2
Anti-Kpa	3
Anti-Cw	2
Anti-P1	2
Anti-Wra	2
Anti-Bga	1

Tabel 2: RBC allo-antistoffen bij patiënten met WAIHA in UZ Leuven

Deze resultaten liggen dus in dezelfde lijn als de gegevens uit de literatuur verzameld in Tabel 1. Ook in onze data werden anti-E antistoffen het vaakst teruggevonden.

Bij 136 van de 188 patiënten met WAA (72%) werd RBC-genotypering uitgevoerd. Als we enkel naar de kinderen kijken, was dit (slechts) 57% (12 van de 21 patiënten). Tabel 3 geeft de hoeveelheid uitgevoerde genotyperingen weer bij deze patiënten per jaar. Opvallend is dat in 2017 bij een beduidend lager percentage van de patiënten met WAA RBC-genotypering werd uitgevoerd dan de voorgaande jaren. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat er geen data van 2018 in de query zitten en dus bij sommige van deze patiënten in 2018 toch nog een genotypering uitgevoerd is of zal worden.

Jaar	Genotypering uitgevoerd (%)	Genotypering niet uitgevoerd	Totaal
2013	35 (76%)	11	46
2014	23 (72%)	9	32
2015	26 (81%)	6	32
2016	33 (75%)	11	44
2017	19 (56%)	15	34

Tabel 3: Uitgevoerde RBC-genotypering per jaar in UZ Leuven

Bij 94 van deze 136 patiënten met een moleculaire bepaling (69%) werden nadien RBC-eenheden toegediend. Tabel 4 geeft aan hoeveel RBC-eenheden deze patiënten kregen voor en na de RBC-genotypering. Bij deze patiënten konden dus antigeen-gematchte bloedeenheden worden toegediend.

Tijdstip	Mediane hoeveelheid RBC-eenheden	Gemiddelde hoeveelheid RBC-eenheden	Minimale hoeveelheid RBC-eenheden	Maximale hoeveelheid RBC-eenheden
Voor moleculaire bepaling	8	16.5	1	75
Na moleculaire bepaling	6.5	17.0	1	191

Tabel 4: Overzicht aantal toegediende RBC-eenheden bij patiënten met RBC-genotypering

Bij 52 patiënten van de 188 patiënten (28%) werd geen moleculaire bepaling uitgevoerd. Van deze patiënten kregen er 23 (44%) toch nog een RBC-transfusie na de positieve DAT. Tabel 5 geeft aan hoeveel RBC-eenheden deze patiënten kregen voor en na hun positieve DAT.

Tijdstip	Mediane hoeveelheid RBC-eenheden	Gemiddelde hoeveelheid RBC-eenheden	Minimale hoeveelheid RBC-eenheden	Maximale hoeveelheid RBC-eenheden
Voor DAT	4.5	12.5	1	58
Na DAT	4	8.7	1	46

Tabel 5: Overzicht aantal toegediende RBC-eenheden bij patiënten zonder RBC-genotypering

De conclusie van dit dataonderzoek is dat bij het grootste deel van de patiëntpopulatie in UZ Leuven met WAA wel degelijk reeds RBC-genotypering werd uitgevoerd. Ook bleek dat bij een meerderheid van deze patiënten (69%) na de moleculaire bepaling het toedienen van RBC-eenheden vereist was. Bij deze patiënten konden dus genotypisch gematchte RBC-eenheden worden toegediend zonder nood aan pretransfusie testen. Dit wijst erop dat RBC-genotypering een zeer nuttige rol kan spelen in het transfusiebeleid bij WAIHA-patiënten.

Een volgende stap in dit onderzoek is kijken wat het effect is van deze transfusies met betrekking tot volgende zaken:

- Onderzoeken of er een verwachte stijging optreedt van het hemoglobine na toedienen van de genotypisch gematchte bloedeenheden.
- Onderzoeken of er hemolytische transfusiereacties optreden na het toedienen van deze bloedeenheden.
- Onderzoeken of er nieuwe (klinisch belangrijke) allo-antistoffen worden gevormd na toedienen van deze bloedeenheden.

4. Conclusie

WAA interfereren met quasi alle routine pretransfusie testen waardoor bijkomende analyses vereist zijn om allo-antistoffen uit te sluiten bij WAIHA patiënten. Deze adsorptiestudies zijn technisch echter moeilijk, worden enkel in referentiecentra uitgevoerd en duren lang. Daarom lijkt het toedienen van antigeen gematchte bloedeenheden een bijzonder interessant alternatief bij WAIHA patiënten. Omdat WAA frequent ook zullen interfereren met RBC-fenotypering lijkt RBC-genotypering in deze patiëntpopulatie een betere optie. Al is de evidentie in de literatuur voor deze strategie bij WAIHA zeer schaars, toch lijkt het gebruik van RBC-genotypering al goed ingeburgerd in veel centra waaronder ook UZ Leuven. Verder onderzoek is echter nog nodig om aan te tonen dat deze aanpak ook effectiever en veiliger is dan serologische methodes.

REFERENTIES

1. Barros MM, Blajchman MA, Bordin JO. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment. *Transfus Med Rev.* 2010;24(3):195–210.
2. Petz LD, Garratty G. *Acquired Immune Hemolytic Anemia.* New York: Churchill Livingstone; 1980.
3. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br Med J (Clin Red Ed).* 1981;282(6281):2023–2027.
4. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, et al. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood.* 2014;124(19):2930–2936.
5. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev.* 2008 Jan;22(1):17-31. Epub 2007 Sep 27.
6. Issitt PD, Pavone BG, Goldfinger D, et al. Anti-Wrb and other autoantibodies responsible for positive direct antiglobulin test in 150 individuals. *Br J Haematol* 1976;34:5-18.
7. Branch DR, Petz LD. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion* 1999;39:6-10.
8. Salama A, Berghöfer H, Mueller-Eckhardt C. Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet.* 1992 Dec 19-26;340(8834-8835):1515-7.
9. Yürek S, Mayer B, Almahallawi M, et al. Precautions surrounding blood transfusion in autoimmune haemolytic anaemias are overestimated. *Blood Transfus.* 2015 Oct; 13(4): 616–621.
10. Conley CL, Lippman SM, Ness P. Autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia. A medical emergency. *JAMA.* 1980 Oct 10;244(15):1688-90.
11. Conley CL, Lippman SM, Ness PM, et al. Autoimmune hemolytic anemia with reticulocytopenia and erythroid marrow. *N Engl J Med.* 1982 Feb 4;306(5):281-6.
12. Park SH, Choe WH, Kwon SW. Red Blood Cell Transfusion in Patients With Autoantibodies: Is It Effective and Safe Without Increasing Hemolysis Risk? *Ann Lab Med.* 2015 Jul;35(4):436-44.
13. Petz LD. "Least incompatible" units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals. *Transfusion.* 2003 Nov;43(11):1503-7.
14. Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion.* 1999;39(1):11–16.
15. Barros MM, Langhi Jr DM, Bordin JO. Autoimmune hemolytic anemia: transfusion challenges and solutions. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine,* March 2017, Dove Medical Press; DOI: 10.2147/ijctm.s81870.
16. Ziman A, Cohn C, Carey PM, et al. Warm-reactive (immunoglobulin G) autoantibodies and laboratory testing best practices: review of the literature and survey of current practice. *Transfusion.* 2017 Feb;57(2):463-477.
17. Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion.* 2002 Nov;42(11):1435-41.
18. Branch DR, Petz LD. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion.* 1999 Jan;39(1):6-10.
19. Petz LD. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2004 Mar;124(6):712-6.

-
20. Fasano RM, Sullivan HC, Bray RA, et al. Genotyping Applications for Transplantation and Transfusion Management: The Emory Experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Mar;141(3):329-340.
21. El Kenz H, Efira A, Le PQ, et al. Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: how could the blood group genotyping help? *Transl Res*. 2014 Jan;163(1):36-42. doi: 10.1016/j.trsl.2013.09.007.
22. Belsito A, Costa D, Napoli C. Blood group genotyping for patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transl Res*. 2014 Aug;164(2):177-8. doi: 10.1016/j.trsl.2014.03.009. Epub 2014 Mar 31.
23. Petz LD, Garratty G. *Acquired Immune Hemolytic Anemia*. New York: Churchill Livingstone; 2004.
24. CBO. Richtlijnen Bloedtransfusie, 2011.
<https://nvc.nl/sites/nvc.nl/files/CBO%20Richtlijn%20Bloedtransfusie.pdf>
25. Hill, Q. A., Stamps, R., Massey, E., et al and the British Society for Haematology (2017). The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, 176: 395–411. doi:10.1111/bjh.14478
26. Kutner JM, Mota M, Conti FM, et al. Blood genotyping for improved outcomes in chronic transfusion patients: current and future perspectives. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine*.
27. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion*. 2007;47(Suppl 1):28S–31S.
28. Faria MA, Martins ML, Schmidt LC, et al. Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012; 34(3): 212–216.
29. Kappler-Gratias S, Peyrard T, Beolet M, et al. Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis applied to 356 reagent red blood cell samples. *Transfusion*. 2011 Jan;51(1):36-42.
30. Casas J, Friedman DF, Jackson T, et al. Changing practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 2015 Jun;55(6 Pt 2):1388-93.
31. Buetens OW, Ness PM. Red blood cell transfusion in autoimmune hemolytic anemia. *Curr Opin Hematol*. 2003 Nov;10(6):429-33.
32. Garratty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*. 2002 Nov;42(11):1390-2.