

CAT
Critically Appraised Topic

Het belang en de bepaling van rode bloedcelvolume in stamcelproducten

Author: Sarah Gils

Supervisor: Dr. Jan Emmerechts

Search/methodology verified by: Dr. Jan Emmerechts

Date: February 23, 2016

CLINICAL BOTTOM LINE

De transplantatie van hematopoietische stamcellen (HSC) vormt een belangrijke pijler in de behandeling van vele hematologische aandoeningen en immuunstoornissen [1]. Incompatibiliteit van rode bloedcellen (RBC) tussen donor en ontvanger vormt geen barrière voor allogene hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT) en de transplantatieslaagkansen zijn niet aantoonbaar verlaagd in vergelijking met die van RBC-compatibele HSCT. De eventuele nevenwerkingen zijn echter van immuunhematologische aard en mogelijk ernstig. De maatregelen om hemolysereacties te voorkomen zijn talrijk en worden door verschillende centra naar goeddunken toegepast. Deel 1 van deze appraisal verzamelt de beschikbare evidentie en richtlijnen voor de aanpak van majeure ABO-incompatibele HSCT. Besloten wordt dat de enige gepubliceerde richtlijn deze van het Centraal BeleidsOrgaan is, die voorschrijft om bij een patiëntentiter van anti-donorantistoffen boven 1:16 het RBC-volume in het toe te dienen stamcelproduct te beperken tot 15ml. Een voorstel wordt gedaan om het beleid bij RBC-incompatibele HSCT van AZ Sint-Jan in overeenstemming met deze richtlijn te brengen. Aangezien de RBC-inhoud in een stamcelproduct het te volgen beleid mee bepaalt, is een correcte meting hiervan noodzakelijk. Deel 2 van deze appraisal evalueert daarom de performantie voor de bepaling van de RBC-inhoud in stamcelafereproducten van twee automatische celtellers: Unicel DxH 800 (Beckman Coulter) en XN-350 (Sysmex). Het RBC-aantal in afereproducten kan door beide toestellen correct worden gemeten, al geldt dit voor de XN-350 enkel voor de optische meting en niet voor de impedantiemeting. Het hematocriet (HCT) in afereproducten worden door beide toestellen licht overschat. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het zowel veilig als praktisch is om de RBC-inhoud van afereproducten door een automatische celteller te laten bepalen.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

De afdeling hematologie van het AZ Sint-Jan in Brugge is de dienst met het tweede grootste aantal HSCT in Vlaanderen. Jaarlijks vinden er ongeveer 50 autologe en 20 allogene transplantaties plaats, samen goed voor zo'n 110 stamcelcollecties. Onderdeel van dit transplantatiecentrum en verbonden met het klinisch labo van AZ Sint-Jan is het stamcellabo. Het speelt een cruciale rol in de verwerking en bewaring van het stamcelproduct en het garanderen van de veiligheid en geschiktheid van het product voor toediening aan de patiënt.

Deze CAT richt zich op de allogene HSCT, waarbij het verzekeren van weefselcompatibiliteit tussen donor en ontvanger, in tegenstelling tot bij de autologe transplantatie, een prominente plaats inneemt in het transplantatieproces. De verenigbaarheid van de ABO-bloedgroepen op de RBC van donor en acceptor is een belangrijk criterium bij de donorselectie, maar is onderschikt aan de verenigbaarheid van de leukocytegroepen (Human Leukocyt Antigen, HLA). Hierdoor en omdat een perfect HLA-gematchte donor vaak maar met moeite

gevonden wordt, is het aanvaarden van een ABO-incompatibele donor geen uitzondering. 5 van de 18 allogene transplantaties in AZ Sint-Jan in 2015 waren ABO-incompatibel.

Studies over het effect van ABO-incompatibiliteit op de transplantatie-uitkomsten (innesteling van granulocyten en plaatjes, incidentie van acute en chronische graft-versus-hostziekte (GvHD), hervalrisico, overleving) zijn niet in staat om consistent een nadelige invloed aan te tonen [2]. De mogelijke immuunhematologische gevolgen van een ABO-incompatibele transplantatie, zoals een acute of uitgestelde hemolytische reactie, pure red cell aplasia of een vertraagde RBC-innesteling, zijn echter reëel en potentieel ernstig.

Om het risico op een acute of uitgestelde hemolytische reactie in te schatten, worden de aard van de incompatibiliteit (majeur of mineur, zie verderop), het RBC-gehalte in de greffe en de antistoftiters van donor en/of ontvanger bepaald. Deze resultaten bepalen mee de voorbereiding die de ontvanger en/of de greffe vóór de transplantatie zullen ondergaan om de kans op ernstige nevenwerkingen te beperken.

Het volledige transplantatieproces is aan strenge kwaliteitsnormen onderworpen en accreditatieorganen brengen uniformiteit over de verschillende transplantatiecentra. Het stamceltransplantatiecentrum van Brugge volgt hierin de standaarden van het Marrow Donor Program Belgium (MDPB) en FACT-JACIE en is door deze laatste instantie geaccrediteerd. Deze standaarden leggen het transplantatiecentrum op een beleid te hebben ten aanzien van ABO-incompatibele HSCT, maar geven geen aanbevelingen met betrekking tot de inhoud ervan [3,4]. Het eerste deel van deze kritische appraisal verzamelt daarom de beschikbare richtlijnen en evidentie voor de aanpak van ABO-incompatibele HSCT. De nadruk zal hierbij liggen op de majeure incompatibiliteiten.

Het tweede deel van deze appraisal beschrijft de evaluatie van de performantie van twee automatische celtellers om hematologische basisparameters in HSC-producten te bepalen. Aanleiding hiertoe was de observatie van Terumo, leverancier van de aferesetoestellen (Spectra Optia) gebruikt in AZ Sint-Jan, van opmerkelijk lagere HCT-waarden van de stamcelproducten verwerkt in het Brugse transplantatiecentrum in vergelijking met die verwerkt in andere centra. Dit kan betekenen dat het HCT in afereseproducten in het AZ Sint-Jan systematisch wordt onderschat. Het is immers mogelijk dat er een belangrijke variabiliteit bestaat tussen de HCT-metingen van verschillende transplantatiecentra. Elk centrum meet het HCT in de stamcelproducten immers zelf met een eigen verkozen methode. In Brugge wordt het HCT bepaald door de Unicel DxH800 celteller (Beckman Coulter, Brea, FL), een in de routine gebruikte hematologieanalyzer, die echter net als andere celtellers niet ontworpen is voor de analyse van stamcelafereseproducten.

QUESTION(S)

- 1) Wat zijn de bestaande richtlijnen en evidentie voor de aanpak van majeure RBC-incompatibele stamceltransplantaties?
- 2) Kunnen automatische celtellers hematologische basisparameters betrouwbaar bepalen?

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transpl* 2010;45:219-234.
2. Rowley SD, Donato ML, Bhattacharyya P. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2011;46:1167-1185.
3. Marrow Donor Program Belgium. Standards Donor v1 [homepage on the Internet]. 2002 [updated 2015 Sept 1; cited 2016 Feb 23] Available from: [http://www.mdpb.be/ref/\(25550\)-Home/Info-voor-professionelen/Info-voor-professionelen-Documenten/Standards.html](http://www.mdpb.be/ref/(25550)-Home/Info-voor-professionelen/Info-voor-professionelen-Documenten/Standards.html)

4. FACT-JACIE. International Standards for Cellular Therapy, Product Collection, Processing, and Administration [homepage on the internet]. 1996 [updated 2015 June 1; cited 2016 Feb 23] Available from: <http://www.jacie.org/standards/6th-edition-2015>
5. Scholl S, Klink A, Mügge L, Schilling K, Hoffken K, Sayer H. Safety and impact of donor-type red blood cell transfusion before allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation with major ABO mismatch. *Transfusion* 2005;45:1676-1683.
6. Rowley SD. Hematopoietic stem cell transplantation between red cell incompatible donor–recipient pairs. *Bone Marrow Transpl* 2001;28:315-321.
7. Franchini M, de Gironcoli M, Gandini G, Vassanelli A, Rocca P, Benedetti F, Aprili G. Transmission of an anti-RhD alloantibody from donor to recipient after ABO-incompatible BMT. *Bone Marrow Transpl* 1998;21:1071-1073.
8. Leo A, Mytilineos J, Voso MT, Weber-Nordt R, Liebisch P, Lensing C, Schraven B. Passenger lymphocyte syndrome with severe hemolytic anemia due to an anti-Jka after allogeneic PBPC transplantation. *Transfusion* 2000;40:632-636.
9. López A, de la Rubia J, Arriaga F, Jiménez C, Sanz GF, Carpio N, Marty ML. Severe hemolytic anemia due to multiple red cell alloantibodies after an ABO-incompatible allogeneic bone marrow transplant. *Transfusion* 1998;38:247-251.
10. Franchini M, Gandini G, Aprili G. Non-ABO red blood cell alloantibodies following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2004;33:1169-1172.
11. Lapierre V, Kuentz M, Tiberghien P. Allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation: guidelines for red blood cell immuno-hematological assessment and transfusion practice. *Bone Marrow Transpl* 2000;25:507-512.
12. CBO. Richtlijn bloedtransfusie [homepage on the Internet]. 1982 [updated 2011 Aug 1; cited 2016 Feb 23]. Available from: <https://nvc.nl/sites/default/files/CBO%20Richtlijn%20Bloedtransfusie.pdf>
13. Pamphilon D. Stem-cell harvesting and manipulation. *Vox Sang* 2004;87(Suppl 1):S20–S25.
14. Larghero J, Rea D, Esperou H, Biscay N, Maurer MN, Lacassagne MN et al. ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. *Transfusion* 2006;46:398-402.
15. Brauninger S, Bialleck H, Thorausch K, Felt T, Seifried E, Bonig H. Allogeneic donor peripheral blood “stem cell” apheresis: prospective comparison of two apheresis systems. *Transfusion* 2012;52:1137-1145.
16. Stroncek DF, Clay ME, Smith J, Herr G, Ilstrup S, Kunkel LA, McCullough J. Composition of peripheral blood progenitor cell components collected from healthy donors. *Transfusion* 1997;37:411-417.
17. Janatpour KA, Kalmin ND, Jensen HM, Holland PV. Clinical outcomes of ABO-incompatible RBC transfusions. *Am J Clin Pathol* 2008;129:276-281.
18. Patrick K, Lau W, Gassas A, McDougall E, Doyle J, Ali M et al. Major ABO incompatible BMT in children: determining what residual volume of donor red cells can safely be infused following red cell depletion. *Bone Marrow Transpl* 2015;50:536-539.
19. Gajewski JL, Johnson VV, Sandler SG, Sayegh A, Klumpp TR. A review of transfusion practice before, during, and after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood*, 2008;112:3036-3047.
20. Rouard H. Bone marrow processing for hematopoietic stem cell transplantation: recommendations of the SFGM-TC. *Hématologie* 2015;21(supplément 3):42-46.
21. ISCT Laboratory Practices Committee. Processing and infusion issues of ABO incompatible hematopoietic progenitor cell-apheresis products [report of conference call on the internet]. 2004 Mar 25 [cited 2016 Feb 23] Available from: <http://www.celltherapysociety.org/resource/resmgr/files/PDF/Resources/Audioconference-LPC-032504.pdf>
22. Braakman E. Uitvoeren van kwaliteitscontroles, plasma- en/of RBC reductie van een HPC product. (Standard Operating Procedures) 2011 [cited 2016 Feb 23].
23. Griffin DL. RBC depletion [Presentation]. Retrieved from http://www.celltherapysociety.org/resource/resmgr/files/PDF/Meetings/Regional/Session_4b-RBC_Depletion.pdf
24. Witt V, Beiglböck E, Fritsch G. Bone marrow processing with the AMICUS(TM) separator system. *J Clin Apheresis* 26:195-199, 2011.
25. Daniel-Johnson J, Schwartz J. How do I approach ABO-incompatible hematopoietic progenitor cell transplantation? *Transfusion* 2011;51:1143-1149.

26. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1194-1201.
27. Daniele N, Scerpa MC, Rossi C, Lanti A, Adorno G, Isacchi G, Zinno F. The processing of stem cell concentrates from the bone marrow in ABO-incompatible transplants: how and when. *Blood Transfus* 2014;12:150-158
28. Booth GS, Gehrie EA, Bolan CD, Savani BN. Clinical guide to ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Tr* 2013;19:1152-1158.
29. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Williams B, Gray M, Storb R, Thomas ED. ABO-incompatible marrow transplants. *Transplantation* 1978;26:233-238.
30. Kim SR, Choung HK, Kim DW, Sung KW, Kang ES. Evaluation of a new cell separator for collection of peripheral blood CD34+ progenitor cells in pediatric patients. *Transfusion* 2011;51:306-312.
31. Sorg N, Poppe C, Bunos M, Wingenfeld E, Hümmer C, Krämer A et al. Red blood cell depletion from bone marrow and peripheral blood buffy coat: a comparison of two new and three established technologies. *Transfusion* 2015;55:1275-1282.
32. Tsang KS, Li CK, Wong AP, Leung Y, Lau TT, Li K et al. Processing of major ABO-incompatible bone marrow for transplantation by using dextran sedimentation. *Transfusion* 1999;39:1212-1219.
33. Veljkovic D, Nonkovic OS, Radonjic Z, Kuzmanovic M, Zecevic Z. Bone marrow processing for transplantation using Cobe Spectra cell separator. *Transfus Apher Sci* 2013;48:359-363.
34. Guttridge MG, Bailey C, Sidders C, Nichols J, Bromham J, Watt SM. Human bone marrow processing using a new continuous-flow cell separation device. *Transfusion*. Advance online publication.
35. AVECILLA ST, Marionneaux SM, Leiva TD, Tonon J, Chan VT, MOUNG C et al. Comparison of manual hematocrit determinations versus automated methods for hematopoietic progenitor cell apheresis products. *Transfusion*. Advance online publication.
36. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29:21-41.
37. Coulter operation principles. Parameter measurement, derivation, and calculation [Manual]. [cited 2016 Feb 23].

Deel I: Beleid bij RBC-incompatibele HSCT

RBC-incompatibiliteit

Dezelfde immunohematologische wetten die gelden voor bloedtransfusies, gelden ook voor HSCT: een majeure RBC-incompatibiliteit bestaat wanneer de ontvanger antistoffen heeft of kan aanmaken, gericht tegen de overeenkomstige antigenen op de RBC van de donor. Majeure incompatibiliteit treedt binnen de ABO-bloedgroepen dus op tussen een donor met bloedgroep A, B, of AB en ontvanger met groep O, tussen een groep A-donor en groep B-ontvanger, tussen een groep B-donor en groep A-ontvanger en tussen een donor met groep AB en ontvanger met groep A of B (Tabel 1). Door binding van de antistoffen van de ontvanger aan de donor-RBC kan acute hemolyse het onmiddellijke gevolg zijn van de infusie van een incompatibel HSC-product. Mogelijke niet-acute gevolgen van een majeure incompatibiliteit zijn een vertraagde innesteling van de RBC en pure red cell aplasia: anemie met het quasi afwezig zijn van reticulocyten in perifere bloed en rijpe erythroblasten in beenmerg, die maanden tot soms jaren na de transplantatie aanhoudt, al dan niet met normale innesteling van granulocyten en bloedplaatjes. Aan de basis hiervan ligt het persisteren van isoagglutininen, gericht tegen donor-RBC (Tabel 2). Deze kunnen tot lang na de HSCT geproduceerd worden door residuele B-lymfocyten van de ontvanger die de pre-transplantconditionering en de innesteling van de donorgreffe hebben overleefd. De gevolgen voor de patiënt zijn een langdurige transfusieafhankelijkheid en de hiermee verbonden immunohematologische problematiek, het risico op transfusiegerelateerde infecties en op het ontwikkelen van secundaire hemochromatose [5].

Tabel 1 Majeure (M) en mineure (m) ABO-incompatibiliteit

Bloedgroep		Ontvanger			
		A	B	AB	O
Donor	A		M en m	m	M
	B	M en m		m	M
	AB	M	M		M
	O	m	m	m	

Tabel 2 Immunohematologische gevolgen van ABO-incompatibele transplantatie (naar Rowley 2011)

Incompatibility	Consequence	Cause
ABO major	Acute hemolysis	Infusion of incompatible red cells
	Delayed granulocyte and platelet engraftments	Loss of HPC from processing to remove red cells. Expression of ABO antigens on granulocytes and platelets
ABO minor	Delayed red cell engraftment	Host anti-donor isoagglutinins
	Pure red cell aplasia	Persistence of anti-donor isoagglutinins
ABO minor	Acute hemolysis	Donor plasma with high isoagglutinin titers
	Delayed hemolytic reaction	Passenger lymphocytes producing anti-host isoagglutinins

Abbreviation: HPC = hematopoietic progenitor cell.

Omgekeerd, is er sprake van een mineure ABO-incompatibiliteit als de stamcelgreffe antistoffen (of antistofproducerende lymfocyten) bevat die RBC-antigenen van de ontvanger herkennen. Het treedt op tussen een donor met groep O en ontvanger met groep A, B of AB, tussen een groep A-donor en groep B- of AB-ontvanger en tussen een groep B-donor en een groep A- of AB-ontvanger (Tabel 1). Een acute hemolytische reactie zal slechts zeldzaam optreden na een mineur incompatibele HSC-transplantatie, hoewel de kans op deze

nevenwerking toeneemt met de isoagglutinetiter en het volume van het HSC-product [2]. Een uitgestelde hemolysereactie daarentegen, compliceert naar schatting 10 tot 15% van de mineure incompatibele transplantaties en kent soms een ernstig tot zelfs dodelijk verloop [6]. Deze reactie treedt gewoonlijk tussen 7 en 14 dagen na een mineur incompatibele transplantatie op en wordt veroorzaakt door de isoagglutininen van de zogenaamde 'passenger B-lymphocytes': donorlymfocyten die in de allogreffe aanwezig waren en in de circulatie van de ontvanger hun antistoffen produceren.

Bidirectionele incompatibiliteit ten slotte, is een combinatie van majeure en mineure incompatibiliteit (bv. groep A-donor en groep B-ontvanger) en gaat gepaard met een verhoogd risico op de hierboven genoemde gevolgen [2].

Non-ABO-incompatibiliteit

RBC-incompatibiliteit bij allogene HSC-transplantatie vormt het vaakst een probleem wanneer deze optreedt tussen de ABO-bloedgroepen. Drie verklaringen hiervoor zijn dat de ABO-groepen vaker dan andere bloedgroepen verschillend zijn tussen verschillende personen, dat vrijwel iedereen natuurlijk circulerende antistoffen heeft tegen de ABO-bloedgroep(en) die hij of zij mist en dat anti-A en -B sterke hemolytische reacties kunnen uitlokken. Niettemin reikt de kwestie van RBC-incompatibiliteit verder dan alleen het ABO-groepensysteem en kunnen ook Rhesus- en andere antigensystemen betrokken zijn in acute en uitgestelde hemolysereacties [6,7,8,9]. Tabel 3 somt de antigensystemen op die het vaakst allo-immune reacties uitlokken. Hoewel de productie van non-ABO-alloantistoffen na HSCT eerder weinig frequent is, variërend tussen 1% en 8,7%, kan de uitgelokte hemolyse, die nog zeldzamer is, zeer ernstig verlopen [10]. Het opsporen van irreguliere antistoffen in de pretransplantfase bij donor en ontvanger helpt het risico op immunohematologische complicaties in te schatten. Verschillende auteurs suggereren daarenboven om de aanwezigheid van de belangrijkste niet-ABO-antigenen, met name Rhesus D en CcEe, Kidd, Kell, MNSs, Duffy en Lewis in de pretransplantatiefase te testen bij donor en ontvanger. Wegens de hoge immunogeniciteit van het Rhesus D-antigen, wordt aangeraden om majeure en mineure incompatibiliteit van deze bloedgroep op dezelfde manier aan te pakken als een ABO-incompatibiliteit [10,11,12].

Tabel 3 Niet-ABO-antigensystemen betrokken bij allo-immune hemolyse na HSCT (naar Franchini 2004)

<i>RBC antigen system</i>	<i>Antibodies</i>	<i>Mechanism of hemolysis</i>
Rh system	Anti-D, -C, -c, -E	Delayed hemolytic anemia, ^{13,21,32} which may be severe after major Rh-mismatched grafts. ¹⁵ Passenger lymphocyte syndrome ⁷ and chronic hemolysis (in the case of persistence of mixed chimerism) ⁸ have also been described
Kell system	Anti-Kell	Delayed hemolytic anemia ^{25,28}
Kidd system	Anti-JK ^a , -JK ^b	Severe acute hemolytic anemia with intravascular hemolysis (passenger lymphocyte syndrome), ^{6,29} delayed hemolytic anemia ²⁵
MNSs system	Anti-M, -N, -S, -s	Delayed hemolytic anemia ^{6,25}
Lewis system	Anti-Lewis ^a , -Lewis ^b	Passenger lymphocyte syndrome ²⁶

Drie types van stamcelgreffes

HSC kunnen worden geïsoleerd uit drie weefseltypen: beenmerg, navelstrengbloed en perifere bloed. Beenmerg wordt tijdens veelvuldige puncties beetje bij beetje geaspireerd uit de crista iliaca van de donor die voor deze ingreep onder narcose werd gebracht. Klonters en mergbrokkjes worden vóór de toediening aan de patiënt uit het verzamelde merg gefilterd.

Perifere bloedstamcellen (PBSC) worden door aferese afgezonderd uit perifere donorbloed. Dit wordt daarvoor via infuusleidingen naar het aferesetoestel geleid, dat door middel van continue flowcentrifugatie cellen en plasma van elkaar scheidt. De stamcel-bevattende fractie wordt geogst op de interface tussen RBC en plasma en verzameld in een collectiekamer in het toestel. Het resterende bloed wordt terug geïnfundeerd bij de patiënt.

Om de opbrengst te vergroten, krijgt de donor gedurende enkele dagen voor de afname injecties met granulocyt colony stimulating factor (G-CSF) toegediend. Dit bevordert de beenmergproliferatie en dwingt de stamcellen uit het beenmerg, in de bloedcirculatie. Het afereseproduct kan meestal zonder verdere bewerking worden toegediend aan de patiënt. De stamcelgreffes die in AZ Sint-Jan afgenomen, verwerkt en toegediend worden, zijn nagenoeg allemaal uit perifere bloed geïsoleerd. Zeldzaam betreft het stamcellen uit beenmergaspiraties.

Navelstrengstamcellen ten slotte worden zo snel mogelijk na de geboorte van de baby gecollecteerd door het aanprikken van de venen van placenta en navelstreng. Het verzamelde navelstrengbloed wordt hetzij onmiddellijk, hetzij na filtratie en centrifugatie ingevroren om op een later tijdstip te worden bewerkt en toegediend [13].

De beschikbare HSC-bronnen verschillen sterk van elkaar in RBC-gehalte. Zo weerspiegelen navelstrengbloed en beenmerg, wat het RBC- en plasmagehalte betreft, vrij goed de samenstelling van perifere bloed. Een beenmerggrefte van circa 1000 ml bevat gewoonlijk ongeveer 200 à 430 ml aan RBC [14]. Een proportioneel even groot volume aan RBC kan aanwezig zijn in een eenheid navelstrengbloed van typisch ongeveer 100 ml [2]. PBSC-product met een totaal volume van ongeveer 300 ml, bevat gewoonlijk minder dan 10 ml RBC. Of anders gesteld heeft een PBSC-product meestal een HCT kleiner dan 5% [eigen data, 15, 16].

Maximale RBC-gehalte

Het toegediende volume aan incompatibele RBC lijkt de kans op symptomatische transfusiereacties te voorspellen [17]. In een retrospectieve studie over ABO-incompatibele transfusie die patiënten indeelt volgens toegediend volume bloedcellen (meer of minder dan 50 ml), vertoonden 16 van 36 patiënten (44%) die meer dan 50 ml kregen tekens van een hemolytische reactie, 10 (28%) ontwikkelden acuut nierfalen en 6 overleden (17%). Van de 12 patiënten die minder dan 50 ml RBC kregen toegediend, ontwikkelden er 3 (25%) tekens van hemolyse, maar geen patiënten overleden of ontwikkelden acute nierinsufficiëntie [17]. Helaas bestaat er geen kritische waarde onder dewelke het RBC-volume te laag is om een acute transfusiereactie uit te kunnen lokken. Onderstaande alinea's en Tabel 4 vatten samen welke cut-offs voor RBC-gehalte worden gehanteerd als vrijgavecriterium van HSC-producten bestemd voor majeur incompatibele HSCT.

Tabel 4 Aanvaarde maximale RBC-gehalten in HSC-producten bestemd voor majeur incompatibele SCT

Auteur	Soort publicatie	Aanvaard RBC-gehalte
CBO, 2011 [12]	Richtlijnen	< 15ml (volwassene) < 10ml (kinderen)
Patrick, 2015 [18]	Retrospectieve studie	≤ 3ml/kg (kinderen)
Rowley, 2001 [6]	Review	< 20ml
Gajewski, 2008 [19]	Review	< 2% HCT (instelling aferesetoestel)
SFGM-TC, 2015 [20]	Enquêteresultaten	≤ 0,2ml/kg
ISCT, 2004 [21]	Verslag teleconference	≤ 20ml, ≤ 30ml, ≤ 0,15ml/kg, ≤ 0,30ml/kg (volwassene) ≤ 0,25ml/kg, ≤ 1ml/kg, op advies van clinicus (kinderen)
Braakman, 2011 [22]	SOP	< 100*10 ⁹ RBC per infusie
Griffin [23]	Diavoorstelling	≤ 20ml, ≤ 0,30 ml/kg (kinderen)

De richtlijn voor transfusie van het Nederlandse Centraal BeleidsOrgaan (CBO) beveelt aan om het RBC-gehalte in een transplantaat onder 15 ml te houden voor volwassenen. Voor kinderen raden zij een volume van minder dan 10 ml aan [12]. Voor zover we weten is deze publicatie van de CBO de enige richtlijn die een concrete afkapwaarde voorstelt.

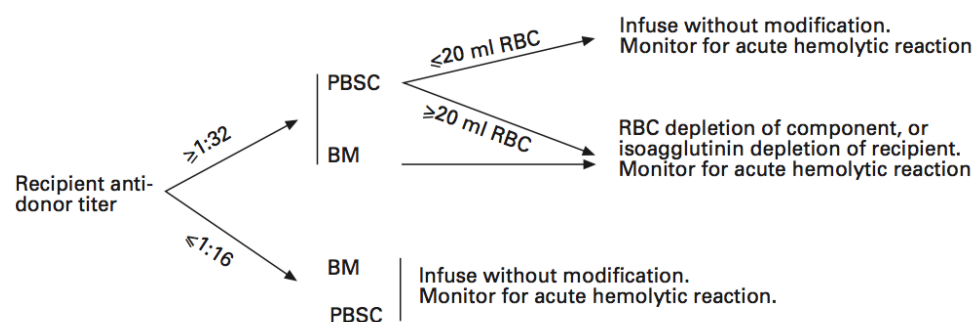
Gebaseerd op hun ervaring echter, publiceerden verschillende auteurs maximumwaarden voor het RBC-gehalte in een incompatibele stamcelgreffe. In een review over RBC-incompatibele HSCT aanvaardt Rowley een maximaal RBC-volume in de greffe van minder dan 20 ml [6].

Patrick et al. onderzochten retrospectief de relatie tussen het volume geïnfundeerde RBC/kg lichaamsgewicht en het optreden van hemolysereacties na een majeure incompatibele HSCT in 78 kinderen (≤ 18 jaar). Zij stelden vast dat significante nevenwerkingen enkel optraden bij transfusie van > 3 ml RBC/kg en gebruiken deze waarde als vrijgavecriterium [18]. Een recente publicatie met aanbevelingen van de Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) verzamelt de antwoorden van 23 Franstalige, celverwerkende centra op hun enquête over de verwerking van beenmerg voor allogene incompatibele HSCT. Negen centra hanteren een RBC-volume van $< 0,2$ ml/kg lichaamsgewicht en zes centra $< 0,4$ ml/kg als aanvaardbare contaminatie van het product. Eén centrum aanvaardt $< 1\%$ HCT en een ander centrum $< 3\%$. Van zes centra was geen antwoord beschikbaar [20]. Een verslag van een conference call van de International Society for Cellular Therapy (ISCT) Laboratory Practices Committee vat de reacties van de meer dan 60 deelnemende instanties samen rond verwerking en infusie van ABO-incompatibele PBSC-producten. Als maximaal RBC-gehalte werden 20 ml en 30 ml RBC/patiënt en 0,15 ml/kg, 0,25 ml/kg en 0,30 ml/kg lichaamsgewicht geopperd voor een volwassen ontvanger. In de pediatrische setting worden 0,25 ml/kg (echter zonder te streven naar minder dan 5 ml RBC/patiënt, om verlies van stamcellen te vermijden) en 1 ml/kg gesuggereerd en het door de clinicus geadviseerde maximale RBC-volume [21]. Een kinderziekenhuis in Pittsburgh legt de grens op 20 ml RBC/patiënt of 0,30 ml/kg lichaamsgewicht [23]. Het stamcellabo van het Erasmus MC, Rotterdam aanvaardt tot 100×10^9 RBC per infusie [22]. In een review over transfusie voor, tijdens en na HSCT schrijft Gajewski dat tijdens een HSC-afereze voor een majeure ABO-incompatibele transplantatie het aferesetoestel zo moet worden ingesteld dat het met een HCT onder 2% collecteert [19].

Maximale antistoftiter van de ontvanger

Behalve het RBC-gehalte in de greffe, lijkt ook de antistoftiter in het plasma van de stamcelontvanger indicatief voor de kans op het ontwikkelen van acute transfusiereacties na majeure RBC-incompatibele HSCT [6]. Een veilig lage waarde voor deze antistoftiters kan echter niet worden bepaald. In een door Rowley gepubliceerd algoritme (Figuur 1), wordt een majeure incompatibel stamcelproduct zonder verdere bewerkingen toegediend indien bij de stamcelontvanger een anti-donorisoagglutininetiter wordt vastgesteld van minder dan 1:32 (bv. 1:16, 1:8, enz.). Bij een titer van 1:32 of groter, is het RBC-gehalte in de greffe van belang: bedraagt deze 20 ml of meer, past men isoagglutininedepletie van de stamcelontvanger toe of RBC-depletie van de greffe (zie hieronder) [6]. De CBO-richtlijn gebruikt de review van Rowley als referentie voor hun geadviseerde afkapwaarde van $< 1:32$ [12].

Figuur 1 Een algoritme voor de aanpak van RBC-incompatibele transplantatie (Rowley 2001)



PBSC: perifere bloedstamcellen, BM: beenmergstamcellen

Eén centrum geeft in een teleconferentie van de ISCT aan een cut-off van <1:16 te gebruiken. Witt rapporteert een antistoftiter van <1:64 als cut-off (Tabel 5) [24]. Andere auteurs rapporteren dat hun beleid bij majeure RBC-incompatibiliteit niet afhangt van antistoftiters, aangezien de bepaling ervan eerder subjectief en weinig reproduceerbaar is [25,26].

Tabel 5 Aanvaarde maximale antistoftiter van de ontvanger bij majeure incompatibele SCT

Auteur	Soort publicatie	Aanvaarde antistoftiter (ontvanger)
CBO, 2014 [12]	Richtlijnen	IgM en/of IgG anti-B of anti-B < 1:32
Rowley, 2001 [6]	Review	<1:32
Witt, 2011 [24]	Retrospectieve studie	<1:64
ISCT, 2004 [21]	Verslag teleconferentie	<1:16

Preventie van immuunhematologische complicaties van majeure RBC-incompatibele HSC-transplantatie

Er zijn verschillende strategieën om de immuunhematologische complicaties van majeure RBC-incompatibele HSC-transplantaties tegen te gaan. Een eerste manier om acute hemolyse te vermijden is het verwijderen van RBC uit de greffe voor transplantatie of kortweg RBC-depletie. De beschikbare methoden doen allen beroep op de hogere sedimentatiesnelheid van RBC ten opzichte van witte bloedcellen (WBC), bloedplaatjes (PLT) en plasma. Ze bevorderen de celscheiding onder meer door het sedimentatieversnellend hydroxy-ethylzetmeel of dextraan toe te voegen, door een Ficoll-Paque-scheidingsgel te gebruiken en/of door centrifugatie [27]. Helaas gaat RBC-depletie vaak gepaard met een verlies van het aantal stamcellen in de greffe, iets wat deze strategie minder aantrekkelijk maakt voor producten met een beperkte stamcelinhoud, zoals navelstrengbloed [28]. Ook PBSC-producten komen zelden in aanmerking voor RBC-depletie, omdat ze onbewerkt gewoonlijk al een laag RBC-gehalte hebben (< 10ml).

Een tweede wijze om hemolyse bij majeure incompatibiliteit te vermijden is het verlagen van de isoagglutinetiters in de circulatie van de stamcelontvanger [29]. Om dit te verwezenlijken kan enerzijds het patiëntenplasma zo volledig mogelijk worden vervangen door het plasma van een plasmadonor met bloedgroep AB. Deze plasma-uitwisseling vereist echter vele kostbare AB-plasma-eenheden, waarbij elke eenheid ook een immuunhematologisch en infectieus risico voor de ontvanger inhoudt. Anderzijds kunnen antilichamen ook uit het plasma worden gefilterd, meer bepaald door immunoabsorptie. Dit kan buiten het lichaam plaatsvinden, met behulp van een adsorptiekolom. Het bloed wordt daarbij na een venapunctie bij de patiënt via infuusleidingen door de kolom geleid die bekleed is met A- en B-antigenen en de antistoffen uit het plasma weerhoudt. Maar ook *in vivo* methoden zijn beschreven: onder meer door de gecontroleerde infusie van incompatibele donor-RBC of van secretortype- donorplasma: plasma van een donor die de eigen bloedgroepantigenen in lichaamsvloeistoffen secreteert. Deze bloedgroepantigenen, respectievelijk RBC-gebonden of vrij circulerend, binden de overeenkomstige agglutinenen in het lichaam van de patiënt en worden op natuurlijke wijze uit de circulatie geëlimineerd [28].

Een derde manier om immuunhematologische complicaties na een majeure incompatibele HSCT te vermijden, is het gefractioneerd toedienen van de stamcelgreffes. Indien het RBC-gehalte van de volledige stamcelgreffe de aanvaardbare maximumwaarde overschrijdt, wordt de greffe in twee of meer delen gesplitst, die met een tijdsinterval van tenminste 4 uur worden toegediend. Deze strategie omzeilt de procedure voor RBC-depletie en het mogelijke verlies van CD34+ cellen en laat toe om de patiënt tussen twee infusies te monitoren voor transfusiereacties. Hoewel weinig onderbouwd in de wetenschappelijke literatuur, is deze methode wijdverspreid: Patrick et al. splitsen in hun studie de beenmerggreffes met te hoge RBC-inhoud in verschillende aliquots en dienen ze met intervallen van 4 tot 8 uur toe [18]. Daniel-Johnson schrijft dat in sommige centra bij

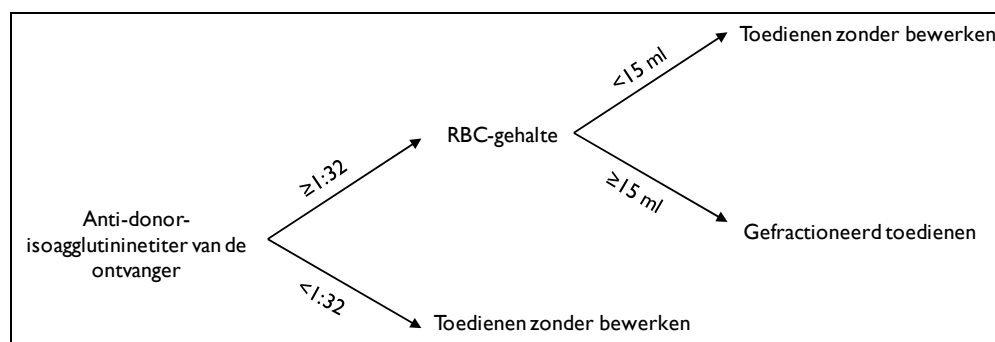
overschrijden van het maximale RBC-gehalte het HSC-product wordt verdeeld in weinige aliquots die met 6 tot 8 uur tussentijd worden geïnfundeed [25]. Griffin verkiest het splitsen van een PBSC-product boven RBC-depletie wegens het relatief lage RBC-volume [23]. In het Erasmus MC wordt een product dat tussen 100 en 200×10^9 RBC bevat in twee porties toegediend [22]. Ook ISCT maakt in zijn teleconferentierapport melding van enkele centra die RBC-depletie en gerelateerde nadelen vermijden door multipale producten op verschillende tijdstippen toe te dienen: 's nachts en de daaropvolgende ochtend (6 tot 8 uur interval) of 's ochtends en de daaropvolgend avond (> 8 uur interval) [21].

Besluit deel I

De 'Best Practice' bij een majeure RBC-incompatibele HSCT is nog niet gedefinieerd. Een zoektocht in de literatuur leert ons dat de Nederlandse CBO als enige een richtlijn publiceerde over de aanpak van majeure ABO-incompatibele HSCT. Deze beveelt aan om bij een isoagglutinetiter van meer dan 1:16 in de circulatie van de ontvanger te streven naar <15 ml RBC in de greffe indien de ontvanger een volwassene is en naar <10 ml RBC indien de ontvanger een kind is. Bovendien raadt ze aan om de infusiesnelheid aan de antistoftiter van de patiënt aan te passen. Welke acties te ondernemen zijn bij RBC-volumes hoger dan deze 15 ml, beschrijft ze niet (12). Franchini beveelt aan om voor Rhesus D-incompatibele HSCT hetzelfde beleid te volgen als voor ABO-incompatibele HSCT (10).

Op basis van bovenstaande bevindingen kan volgende aanpak van majeure ABO- en/of Rhesus D-incompatibele HSCT voor toepassing in AZ Sint-Jan worden voorgesteld: ten eerste zal het aferesetoestel geprogrammeerd worden om een product te collecteren met een HCT van $<2\%$. Het werkelijke RBC-gehalte van het HSC-product zal worden geverifieerd. Indien de antidonortiter van de ontvanger 1:32 bedraagt of meer, zal bij een RBC-gehalte in het HSC-product van 15 ml of meer het product gesplitst worden en in fracties toegediend. Indien het volume aan RBC in de greffe minder dan 15 ml bedraagt of indien de antidonortiter minder dan 1:32 bedraagt, kan het product zonder verdere aanpassing worden toegediend (Figuur 2). De infusiesnelheid zal worden aangepast aan de antistoftiter en de patiënt zal tijdens en na toediening van het product worden gemonitord.

Figuur 2 Voorstel voor algoritme voor de aanpak van majeure RBC-incompatibele transplantatie in AZ Sint-Jan



Deel 2: Bepaling van basishematologieparameters in PBSC: Evaluatie van twee celtellers

Inleiding

Aangezien het RBC-volume in afereseproducten het te volgen beleid bij majeure ABO-incompatibiliteit bepaalt, is een correcte meting noodzakelijk. Publicaties die de evaluatie van aferesetoestellen of technieken voor RBC-

depletie beschrijven, maken voor de bepaling van het RBC-gehalte in HSC-producten praktisch uitsluitend gebruik van automatische celltellers: gewoonlijk modellen van de firma's Sysmex [14,15,30,31] of Beckman Coulter [16,32-34]. De resultaten voor zowel HCT als voor RBC-aantal worden in deze studies gerapporteerd. In het verslag van een teleconferentie van de ISCT geven ook enkele transplantatiecentra aan klinische beslissingen te nemen op basis van de resultaten van hun hematologieautomaten [21]. Nochtans zijn deze toestellen ontworpen en op punt gesteld voor de analyse van volbloed en moet men zich afvragen of ze ook geschikt zijn voor de analyse van HSC-producten. Deze HSC-producten hebben tenslotte een heel andere celsamenstelling met zeer hoge WBC-aantallen en zeer lage RBC-aantallen, in het bijzonder wanneer het stamcelproducten uit de aferese van perifeer bloed (PBSC) betreft. Deze appraisal evalueert daarom de performantie van twee celltellers voor het bepalen van hematologische basisparameters in PBSC.

Methoden

Toestellen

De geëvalueerde analyzers waren enerzijds Unicel DxH 800 (Beckman Coulter, Hialeah, FL), een volautomatische cellteller voor grote staalaantallen die in de routine gebruikt wordt in AZ Sint-Jan (Figuur 3) en anderzijds XN-350 (Sysmex, Kobe, Japan), een automatisch cellteller, waaraan individuele stalen manueel kunnen worden aangeboden (Figuur 4). De parameters van interesse waren RBC, HCT, mean corpuscular volume (MCV), WBC en PLT. Ook de WBC-differentiatie werd onderzocht.



Figuur 3 DxH 800 (Beckman Coulter)



Figuur 4 XN-350 (Sysmex)

Beide toestellen maken gebruik van hydrodynamische focussing en impedantiemeting voor de cellellingen (RBC, WBC, PLT). XN-350 is daarnaast in staat om RBC en PLT optisch te meten. HCT is op de DxH 800 een berekende parameter, met een eenvoudige formule afgeleid van de met impedantie gemeten waarden voor RBC en MCV. Op de XN-350 wordt het HCT gemeten: het is de som van alle pulshoogtes gegenereerd door de individuele RBC bij impedantiemeting, vermenigvuldigd met een correctiefactor k. Uit het HCT en RBC-aantal wordt op de XN-350 het MCV berekend (Figuur 5).

Figuur 5 Gemeten en berekende parameters op beide celltellers

	Gemeten parameters		Berekende parameters
DxH 800	(RBC*MCV)/10	=	HCT
XN-350	(HCT*10)/RBC	=	MCV

Als gouden standaard voor de bepaling van WBC- en RBC-aantallen in aferesestalen werd flowcytometrie gebruikt op de BD FACSCanto (Becton Dickinson, Erembodegem, België). Het betrof een single platform testmethode, die gebruik maakt van counting beads voor de bepaling van de absolute aantallen CD45+ cellen (of WBC) en de absolute aantallen CD235a+ cellen (of RBC). De gouden standaard voor HCT-bepaling was de centrifugatie van bloedcapillairen (Tabel 6). Hierbij werd per staal een gekalibreerde capillair voor 3/4 gevuld met PBSC-product en aan één uiteinde afgestopt met een kleiachtige substantie, kit. De capillair werd horizontaal en met de kit aan de buitenzijde in een Hettich-hematocrietrotor geplaatst en gedurende 5 minuten aan 15000 rpm (of 21382 RCF) gecentrifugeerd in een Universal 320 R-centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Duitsland). Het HCT werd rechtstreeks afgelezen met behulp van de schaalverdeling op het deksel van de rotor. De gouden standaard voor WBC-differentiatie was manuele microscopie na May-Grünwald-Giemsakleuring.

Tabel 6 De meetplatformen en de bepaalde parameters

	RBC (*10 ⁶ /μL)	MCV (fL)	HCT (%)	WBC (*10 ³ /μL)	PLT (*10 ³ /μL)	WBC-differentiatie
Coulter DxH800	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sysmex XN350 impedantie	✓	✓	✓	✓	✓	
Sysmex XN350 optisch	✓				✓	✓
FACSCanto II	✓ (Ref.)			✓ (Ref.)		
Capillaire centrifugatie			✓ (Ref.)			
Manuele microscopie						✓ (Ref.)

Ref.: referentiemethode

Stalen

Alle PBSC gecollecteerd in AZ Sint-Jan tussen begin september en begin december 2015 werden geanalyseerd met de methoden vermeld in Tabel 6. Ook PBSC die gecollecteerd werden in het buitenland, maar bestemd waren voor allogene HSCT in het AZ Sint-Jan, werden getest.

Statistiek

Gemiddelde en range werden bepaald voor RBC, MCV, HCT, WBC, PLT en neutrofielenpercentages op de verschillende toestellen. Intrarun-variabiliteit werd voor diezelfde parameters getest op de twee automaten door tien opeenvolgende analyses uit te voeren op hetzelfde staal. Lineariteit werd getest voor RBC, HCT, WBC en PLT op beide analyzers aan de hand van een verdunningsreeks (1:1 tot 1:128) van één PBSC-staal. De beschrijvende statistiek en berekening van variatiecoëfficiënten (CV) werd uitgevoerd in Microsoft Excel 2010. Correlatiestudies tussen elke analyzer en de referentiemethode en tussen de analyzers onderling met berekening van de correlatiecoëfficiënten en uitvoeren van Passing-Bablokregressieanalyse, alsook de berekening van de determinatiecoëfficiënt (R^2) voor de lineariteitsanalyse werden uitgevoerd in MedCalcsoftware.

Resultaten

Stalen

43 PBSC-producten, afkomstig van 24 verschillende donoren werden geanalyseerd. Dertig hiervan, afkomstig van 14 verschillende patiënten, waren bestemd voor autologe transplantatie en werden allen gecollecteerd in AZ Sint-Jan. De 13 overige PBSC-producten, afkomstig van 10 verschillende donoren, waren bestemd voor allogene stamceltransplantatie. Acht van deze dertien allogene producten werden gecollecteerd in AZ Sint-Jan. De 5 overige allogene producten werden in het buitenland gecollecteerd.

In Tabel 7 staan de resultaten voor beschrijvende statistiek, correlatie en Passing-Bablokregressieanalyse samengevat.

Tabel 7 Resultaten van beschrijvende statistiek, correlatie en Passing-Bablokanalyse

Parameter	Methode	Gemiddelde (range)	R	Intercept (95% CI)	Helling (95% CI)
RBC (*10⁶/μL)	DxH800	0,11 (0,00-0,79)			
	XN350-imp	0,19 (0,06-0,95)			
	XN350-opt	0,10 (0,03-0,78)			
	Ref meth	0,12 (0,04-0,58)			
	DxH800 vs XN350-imp		0,94	0,06 (0,04-0,08)*	1,13 (0,94-1,56)
	DxH800 vs XN350-opt		0,98	0,02 (0,01-0,02)*	0,75 (0,60-0,88)*
	XN350-imp vs XN350-opt		0,93	-0,01 (-0,04-0,03)	0,47 (0,25-0,78)*
	Ref meth vs DxH800		0,95	-0,04 (-0,06--0,03)*	1,15 (1,00-1,38)
	Ref meth vs XN350-imp		0,92	0,01 (-0,02-0,05)	1,33 (1,00-1,80)
Ref meth vs XN350-opt		0,94	0,00 (-0,02-0,01)	0,75 (0,63-1,00)	
MCV (fL)	DxH800	161,0 (104,1-197,4)			
	XN350	90,1 (60,0-127,3)			
	DxH800 vs XN350		-0,50	79,4 (13,0-118,4)*	0,05 (-0,17-0,48)*
Hematocriet (%)	DxH800	1,5 (0,0-8,2)			
	XN350	1,7 (0,5-10,0)			
	Ref meth	0,9 (0,0-8,1)			
	DxH800 vs XN350		0,88	0,12 (-0,10-0,59)	0,98 (0,56-1,20)
	Ref meth vs DxH800		0,88	0,78 (0,00-1,10)	1,50 (0,86-3,40)
	Ref meth vs XN350		0,96	1,00 (0,90-1,20)*	1,13 (1,00-2,80)
WBC (*10³/μL)	DxH800	214,5 (115,3-320,2)			
	XN350	203,7 (112,2-307,1)			
	Ref meth	228,2 (129,3-387,0)			
	DxH800 vs XN350		0,94	-2,3 (-25,9-19,8)	0,95 (0,85-1,07)
	Ref meth vs DxH800		0,88	21,4 (-10,7-53,3)	0,83 (0,69-0,97)*
	Ref meth vs XN350		0,90	8,5 (-14,0-36,3)	0,86 (0,73-0,96)*
Neutrofielen (%)	DxH800	45,1 (0,6-97,3)			
	XN350	21,3 (1,8-51,3)			
	Ref meth	21,7 (1,1-61,0)			
	DxH800 vs XN350		0,69	7,6 (3,9-11,3)*	0,33 (0,22-0,45)*
	Ref meth vs DxH800		0,68	-9,4 (-31,1-0,3)	2,50 (1,87-3,40)*
	Ref meth vs XN350		0,86	2,7 (-0,3-4,7)	0,83 (0,69-1,00)
PLT (*10³/μL)	DxH800	1102 (495-2012)			
	XN350-imp	1098 (440-2248)			
	XN350-opt	1245 (530-2367)			
	DxH800 vs XN350-imp		0,96	-47 (-136-25)	1,03 (0,96-1,12)
	DxH800 vs XN350-opt		0,98	-69 (-143--1)*	1,21 (1,14-1,29)*
	XN350-imp vs XN350-opt		0,96	-15 (-85-20)	1,19 (1,16-1,25)*

R: correlatiecoëfficiënt, CI: confidentie-interval, imp: impedantiemeting, opt: optische meting, Ref meth: referentiemethode, *: significante bias.

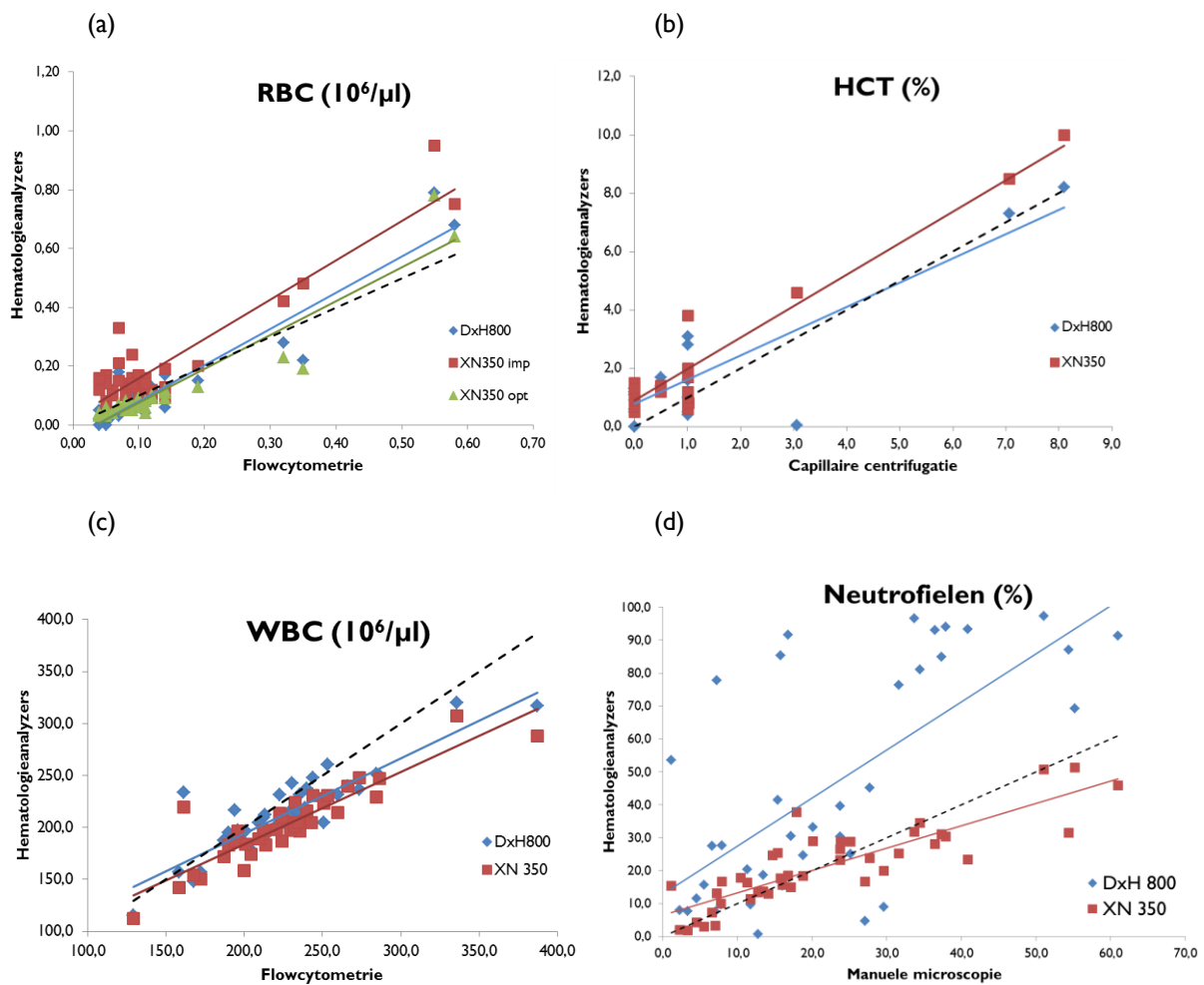
Correlatiestudie

De impedantiemeting van RBC op DxH 800 en de optische meting op XN-350 correleerden goed met de resultaten van de referentiemethode. De impedantiemeting op XN-350, daarentegen toonde vals verhoogde waarden voor RBC (Figuur 6a).

De resultaten voor MCV correleerden maar zwak tussen de twee celtellers met extreem hoge, niet-fysiologische waarden voor DxH 800. Dit bewoog ons ertoe de waarden voor MCV in het PBSC-product te vergelijken met het MCV in een perifeer bloedstaal van de donor, afgenomen op de dag van de stamcelcollectie. De waarden voor MCV in perifeer bloed hadden een gemiddelde en range van 92,1 (85,6-103,7)fl. Deze range is veel nauwer dan de ranges voor MCV in PBSC van beide analyzers en is zelfs volledig onder de range voor MCV in PBSC van

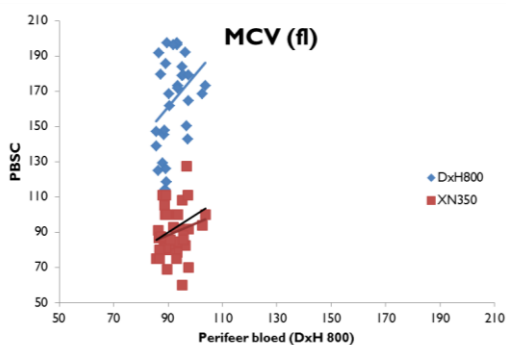
DxH 800 gesitueerd. De waarden in perifeer bloed correleerden zeer zwak met de MCV's in PBSC met correlatiecoëfficiënten van 0,34 voor DxH 800 en 0,21 voor XN-350 (Figuur 7).

De HCT-waarden waren vergelijkbaar tussen DxH 800 en XN-350. De resultaten neigden echter iets hoger te zijn dan de resultaten van de referentiemethode (Figuur 6b).



Figuur 6 Correlaties tussen de twee hematologie-analyzers enerzijds en de referentiemethode anderzijds voor RBC (a), HCT (b), WBC (c) en neutrofielen (d). Imp: impedantie, opt: optisch.

Figuur 7 Correlatie tussen MCV in PSBC en MCV in perifeer bloed van de donor



Er bestond een goede correlatie voor de WBC-waarden tussen de twee celtellers. De resultaten van beide automaten vertoonden echter een proportionele bias ten opzichte van de flowcytometriresultaten, waarbij ze het WBC-aantal onderschatten (Figuur 6c).

Wat de neutrofielenpercentages betreft, werd de beste correlatie gevonden tussen de manuele microscopie en XN 350. De neutrofielentelling op DxH 800 vertoonde een belangrijke proportionele bias ten opzichte van de referentiemethode (Figuur 6d).

Zowel tussen de impedantiemetingen van beide celtellers als tussen de impedantiemeting en optische meting op XN-350 bestonden goede correlaties voor de PLT-aantallen.

Intra-runprecisie

De intra-runprecisie van beide celtellers wordt weergegeven voor de geëvalueerde parameters in Tabel 8. Enkel staal A was van een voldoende groot volume om 10 analyses op elke automaat toe te laten. Dit betrof echter een PBSC-product afgenomen in een extern transplantatiecentrum. Deze hebben gemiddeld een hoger HCT dan de PBSC afgenomen in AZ Sint-Jan (Tabel 9 en figuur 9). Aangezien dit hoger HCT mogelijk de CV beïnvloedt, werd de intra-runprecisieanalyse herhaald op intern geïncubeerde PBSC. Helaas zijn deze stalen steeds van een beperkt volume en werden twee verschillende stalen met nagenoeg gelijke HCT-waarden geselecteerd voor analyse op de twee celtellers (Tabel 8, Staal B en C).

Staal A n = 10	DxH 800		XN-350	
	CV (%)	Gemiddelde	CV (%)	Gemiddelde
RBC	1,99	0,24	1,92	0,49
MCV	0,80	140,0	1,20	85,4
HCT	2,40	3,4	2,84	4,2
WBC	1,93	227,9	0,71	227,8
Neutro%	14,68	79,7	6,38	36,8
PLT	10,16	766	1,14	981

Staal B n = 9	DxH 800	
	CV (%)	Gemiddelde
RBC	3,66	0,09
MCV	1,49	191,6
HCT	4,84	1,7
WBC	2,34	148,1
Neutro%	ND	ND
PLT	3,83	1239

Staal C n = 9	XN-350	
	CV (%)	Gemiddelde
RBC	3,14	0,25
MCV	2,28	66,1
HCT	3,21	1,6
WBC	1,26	209,1
Neutro%	13,81	6,5
PLT	1,35	1468

Tabel 8 Variatiecoëfficiënt (CV%) en gemiddelde van de intra-runprecisieanalyses. Staal A werd geïncubeeerd in een extern centrum, staal B en C in AZ Sint-Jan

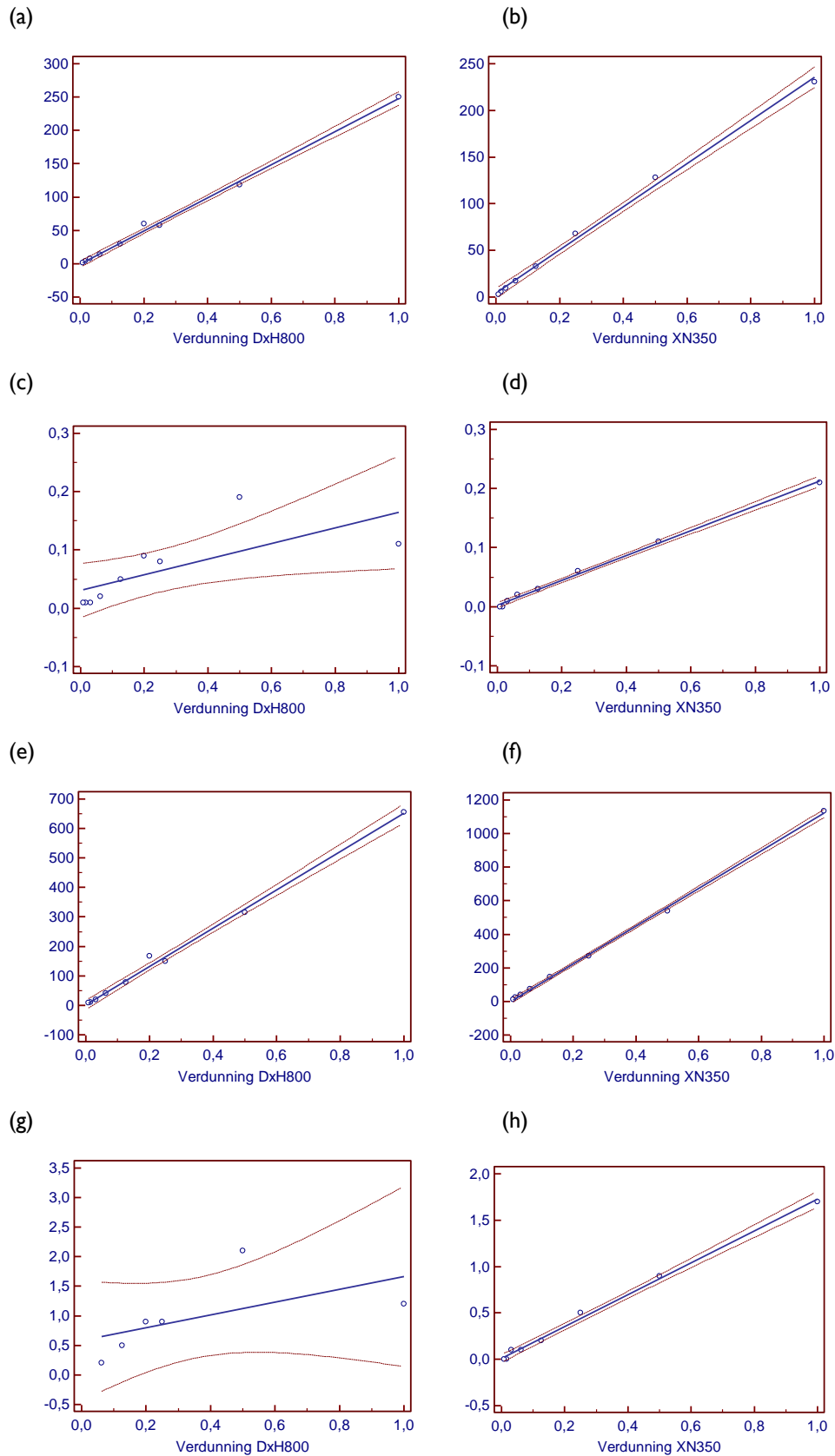
Alle celtellingen (WBC, RBC, PLT) werden op beide analyzers met een CV kleiner dan 4% bepaald, behalve PLT op DxH 800 (Staal A) met een CV van 10%. De CV voor HCT bleef altijd onder 5%. Het MCV op DxH 800 had een hoge precisie, maar zoals reeds aangehaald een povere juistheid (Figuur 7). De WBC-differentiatie van XN-350 lijkt superieur aan die van DxH 800 met een hogere precisie en juistheid (Tabel 8 en figuur 6d).

Lineariteit

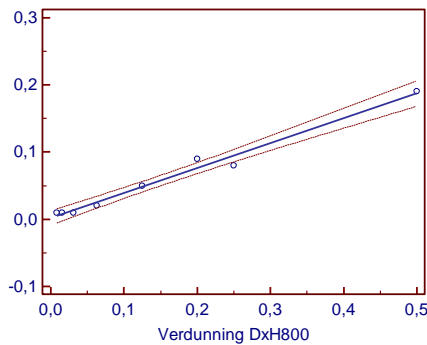
De lineariteit voor WBC en PLT was goed voor beide celtellers met uitsluitend determinatiecoëfficiënten (R^2) van 0,9953 en hoger (Figuur 8a-b en 10e-f). Hetzelfde gold voor RBC en HCT op XN-350 (Figuur 8d en 8h). De R^2 voor RBC en HCT op DxH 800, daarentegen bedroegen respectievelijk 0,5034 en 0,3351 en vertoonden

telkens 1 afwijkend meetpunt: namelijk het punt overeenstemmend met het onverdunde staal (Figuur 8c en 8g). Door dit meetpunt weg te laten uit de data voor regressieanalyse, werden een R^2 van 0,9822 en 0,9886 verkregen voor respectievelijk RBC en HCT van de DxH 800. Ook de grafieken wijzigden in dezelfde mate (Figuur 8c bis en 8g bis).

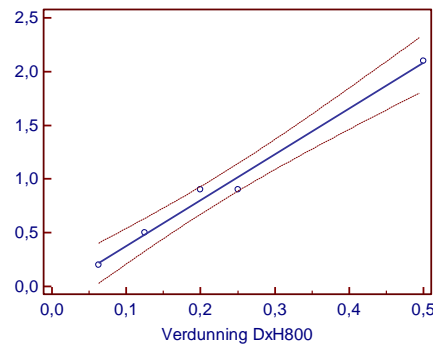
Figuur 8 Lineariteit van hematologische basisparameters in PBSC



(c bis)



(g bis)



Discussie

De correlatiestudie leert ons dat de HCT-waarden in afereseproducten van de verschillende analyzers goed met elkaar overeenkomen. Nochtans is het HCT van DxH 800 een berekende waarde, afgeleid van het (correct bepaalde) RBC-aantal en het sterk naar boven afwijkende MCV. Met de formules uit Figuur 5 in het achterhoofd leiden we af dat de impedantiemeting van de HCT op XN-350 met eenzelfde factor moet afwijken als het MCV van DxH 800. Waar deze factor in de metingen sluipt, is zelfs voor geen van beide firma's duidelijk, maar vermoedelijk gaat het om interferentie door WBC. Deze gelijkaardige overschatting van het MCV op DxH en HCT op XN350 wordt weerspiegeld in de neiging tot iets hogere waarden voor HCT op beide toestellen ten opzichte van de referentiewaarde (Figuur 5bis).

Figuur 5bis Gemeten en berekende parameters op beide celtellers

	Gemeten parameters		Berekende parameters
DxH 800	(RBC*MCV)/10	=	HCT
XN-350	(HCT*10)/RBC	=	MCV

Groen: correleert goed met de referentiemethode, rood: overschatte waarde, geel: licht overschatte waarde

Avecilla et al. die voor 97 PBSC-stalen de HCT-meting van vier verschillende hematologieanalyzers vergeleken met die van capillaire centrifugatie, stelden ook lagere HCT-waarden vast met de centrifugemethode dan met de vier analyzers. Gemiddelde HCT-waarden bedroegen 0,99% voor capillaire centrifugatie op een C-MH30 (Unico) en 4,14%, 3,13%, 3,58% en 5,44% voor respectievelijk Advia 2120i (Siemens), XE-2100 (Sysmex), CELL-DYN Sapphire (Abbott), AcT Diff (Beckman Coulter). Zij besluiten daarom dat de bepaling van HCT in PBSC veilig en snel kan gebeuren op een automaat. Indien de voorgeschreven maximale RBC-inhoud van het PBSC-product overschreden is, kan de manuele centrifugatietechniek worden toegepast om de correcte waarde te bepalen en overbodige manipulaties of afkeuring van het product te voorkomen [35]. Voor de HSC-producten met hoge HCT-waarde op DxH 800 (zoals die gecollecteerd in externe centra) kan het in de toekomst nuttig zijn om het correcte HCT te bepalen met capillaire centrifugatie.

Een mogelijke oorzaak voor het overschatte MCV in PBSC-producten is een langdurige hypernatremie. Deze conditie zou aanleiding kunnen geven tot een valse macrocytose tijdens de analyse op de celteller. Bij voldoende lange bewaring in hypertoon milieu, wordt de RBC-inhoud immers eveneens hypertoon. De hypertone RBC worden in de hematologieautomaat verdund in hypotone vloeistof, waardoor ze tijdens de analyse een verhoogd

MCV hebben [36]. De gemiddelde natriumconcentratie van de vijf PBSC-stalen waarvoor dit bepaald werd, was inderdaad verhoogd tot 153,6 mmol/l met referentiewaarden tussen 136 en 145 mmol/l in perifeer bloed. Het is echter niet duidelijk of de RBC voldoende lang in het hypertone PBSC-product bewaard werden om de verandering in toniciteit te kunnen ondergaan.

Een alternatieve verklaring voor een foutief verhoogd resultaat voor MCV in PBSC, zoals gemeten op de DxH 800 is de sterk verhoogde WBC-concentratie. Bij de impedantiemeting is de gerapporteerde RBC-concentratie gelijk aan de som van WBC en RBC: deze worden immers samen in hetzelfde kanaal geteld aangezien het aantal WBC gewoonlijk verwaarloosbaar is ten opzichte van het aantal RBC. Hetzelfde geldt voor het celvolume: het gerapporteerde MCV is het gemiddelde van de RBC- én WBC-volumes. De overschatting van het MCV loopt hierbij echter hooguit op tot 15-20fl [36]. De MCV's gemeten in de PBSC-stalen konden echter meer dan 100fl hoger zijn dan in perifeer bloed. Bovendien loopt in sommige pathologische perifeer bloedstalen de WBC-concentratie ook op tot veel meer dan $200 \cdot 10^3/\mu\text{l}$. Celltellers als DxH 800 hebben daarom een corrigerende maatregel ingebouwd die vanaf het bereiken van een leukocytose van $140 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ wordt toegepast (37). Het gecorrigeerde RBC-aantal is daarbij gelijk aan het verschil tussen het gemeten RBC- aantal en het WBC-aantal. Deze laatste corrigerende maatregel kan de observatie van de gebrekkige lineariteit voor RBC en HCT van de DxH 800 duiden: in figuren 10c en 10g vallen de twee uiterste meetpunten, corresponderend met het onverdunde staal (verdunding 1,0) uit de toon, doordat het de enige meetpunten zijn waarop de correctiefactor werd toegepast. In figuur 8a is immers te zien dat het onverdunde staal een WBC-concentratie van circa $250 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ heeft, zodat de RBC-concentratie wordt gecorrigeerd. De eerstvolgende verdunding (verdunding 0,5) heeft een WBC-concentratie van circa $120 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ en lokt dus geen correctie uit. Zoals blijkt uit de correlatiestudies, lijkt deze correctiemaatregel echter terecht te worden toegepast voor het RBC-aantal op de DxH. XN-350 maakt geen gebruik van dergelijke corrigerende maatregel, wat de mindere resultaten voor de impedantiemeting van het RBC-aantal op dit toestel kan verklaren (Figuur 6a). Ook de waarden voor MCV worden gecorrigeerd op DxH voor een leukocytose boven $140 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ (37). Deze correctiefactor is ons echter niet bekend, maar lijkt er niet in te slagen om een correcte waarde voor MCV in PBSC-producten te genereren. Ten slotte is uit deze studie gebleken dat de differentiatie van WBC in PBSC uitgevoerd door DxH800 niet betrouwbaar is. Aangezien het gehalte aan mononucleaire cellen (lymfocyten en monocyten) indicatief is voor de kwaliteit en efficiëntie van de stamcelcollectie, is een correcte bepaling noodzakelijk. Deze zal in de toekomst met manuele microscopie worden uitgevoerd.

In 2015 werden 44 allogene HSC-producten verwerkt in AZ Sint-Jan: 23 afgenomen in een extern transplantatiecentrum en 21 afgenomen in AZ Sint-Jan. De 21 greffes afgenomen in het AZ Sint-Jan hadden een RBC-volume van gemiddeld 4,5ml. Nagenoeg alle 21 hadden ze een RBC-volume onder 10ml, behalve één met een RBC-gehalte van 17,5ml. In theorie kwam in 2015 slechts één (<5%) van de intern gecollecteerde HSC-producten in aanmerking voor gefractioneerde toediening wegens een te hoog RBC-gehalte.

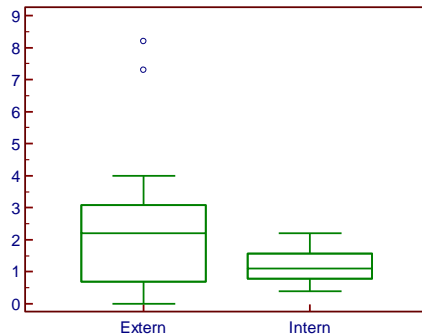
Het HCT in deze producten, telkens bepaald op de DxH 800, bedroeg steeds < 5%, behalve in twee extern gecollecteerde producten van dezelfde donor, met HCT-waarden van 7,3% en 8,2%. Het gemiddelde HCT lag echter duidelijk lager voor de intern gecollecteerde producten dan voor de externe producten (Tabel 9 en figuur 9). De observatie van Terumo, producent van de aferesetoestellen, dat de HCT-waarden van de PBSC-producten van het AZ Sint-Jan lager liggen dan die van andere transplantatiecentra, lijkt niet te worden verklaard door een foutief lage HCT-bepaling, maar wel door een effectief lager RBC-gehalte in de PBSC-producten. De aferesetoestellen in Brugge collecteren met andere woorden 'blekere' PBSC-producten dan die van andere centra. Een duidelijke oorzaak hiervan werd nog niet gevonden.

Tabel 9 HCT in allogene HSC-greffes verwerkt in 2015 in AZ Sint-Jan

	Extern (n = 23)	Intern (n = 21)	Totaal (n = 44)
HCT (%)	2,4 (0,0-8,2)	1,2 (0,4-2,2)	1,9 (0,0-8,2)

Gemiddelde (range)

Figuur 9 HCT (%) van PBSC gecollecteerd in (intern) en buiten (extern) AZ Sint-Jan



Besluit deel 2

De vergelijking van twee automatische celtellers voor de analyse van PBSC onthulde goed correlerende HCT-waarden, ondanks grote verschillen in de resultaten voor MCV en RBC. Beide toestellen produceerden licht overschatte resultaten voor HCT in vergelijking met de referentiemethode. Aangezien zelfs bij overschatting van het HCT, de maximaal toegelaten RBC-inhoud in PBSC gecollecteerd in AZ Sint-Jan zelden wordt overschreden, kunnen de stalen verder met de routinecelteller DxH 800 worden geanalyseerd.

De PBSC-producten gecollecteerd in AZ Sint-Jan hebben een lager HCT dan de producten gecollecteerd in andere centra, hoewel de gebruikte aferesetoestellen van hetzelfde type zijn.

De differentiatie van WBC is niet betrouwbaar uitgevoerd met de DxH 800 en dient in de toekomst manueel te worden uitgevoerd.

To do/ACTIONS

- 1) Het nieuwe algoritme voor de aanpak van majeur ABO- en/of Rhesus D-incompatibele HSCT voorstellen aan de stafleden en implementeren.
- 2) Manuele differentiatie van WBC in PBSC-producten implementeren.