

Uitleg bijzonder laboratoriumonderzoek Immuun-gemedieerde anemie, zoals Auto Immuun Hemolytische Anemie en Hemolytische Ziekte van de Foetus en Pasgeborene

auteur: Masja de Haas, Immunohematologische Diagnostiek, Sanquin Bloedvoorziening

Directe antiglobuline test (DAT) of directe coombs (DiCo of DC):

De directe antiglobulinetest (DAT) is gericht op het aantonen van antistoffen en/of complementfactoren die *in vivo* zijn gebonden aan de erythrocyten van de patiënt.



Directe antiglobuline test:

Informatie over aanwezigheid van gebonden IgG of complement dat *in vivo* aan de erythrocyten van de patiënt gebonden is.

Bij HZFP verwacht je dat moederlijke antistoffen aan de kinderlijke erythrocyten gebonden zijn

Aanwezigheid en specificiteit van IgG antistoffen wordt bevestigd door analyse van eluaat

Korte beschrijving methode:

In de DAT worden de te onderzoeken erythrocyten geïncubeerd met antistoffen gericht tegen humane globulinen (antihumaanglobuline, AHG) bijvoorbeeld gericht tegen IgG, IgA, IgM en/of complementfactoren. Polyvalent (of polyspecifiek AHG) bevat meestal anti-IgG en anti-complement. Indien er IgG-antistoffen en/of complement *in vivo* op de erythrocyt gebonden zijn, zal agglutinatie optreden.

Er dient monospecifiek anti-IgG en een anti-complement reagens gebruikt te worden om te onderscheiden wat aan de patiëntenerythrocyten gebonden is. Niet in alle laboratoria wordt getest op aan patiëntenerythrocyten gebonden IgA. Indien de DAT positief is, is het belangrijk om na te vragen wat er getest is.

De laboratoriumtesten die tegenwoordig gebruikt worden zijn heel gevoelig. Een DAT positief zijn, zonder dat deze uitslag relevant is voor de patiënt. Bij verdenking AIHA, en om de specificiteit van de uitslag van de DAT te verhogen dient een eluaat getest te worden.

Interpretatie DAT bij verdenking AIHA:

Positief met anti-IgG (en mogelijk zwak positief voor anti-complement): past bij warmte autoantistoffen.

Positief met anti-IgA (en vaak ook met anti-IgG): past bij warmte autoantistoffen.

Positief met uitsluitend anti-complement: past bij koude autoantistoffen, maar ook bij warmte antistoffen van IgM klasse.

Interpretatie DAT bij verdenking HZFP:

Bij een vermoeden op hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene (HZFP) wordt met de DAT onderzocht of de patiënten-erythrocyten *in vivo* beladen zijn met antistoffen van IgG klasse. Antistoffen van IgG klasse worden tijdens de zwangerschap actief over de placenta van moeder naar kind getransporteerd.

Een DAT positief voor IgG toont aan dat IgG antistoffen van de moeder aan de erythrocyten van het kind gebonden zijn. Dit IgG kan gericht zijn tegen:

-het rhesus D antigeen van het kind (let op: kan dit aan de moeder toegediend anti-D profylaxe betreffen?)

-een ander bloedgroepantigeen (bijv rhesus c, rhesus E of K)

-de ABO bloedgroep

Valkuilen bij deze test

Bij HZFP veroorzaakt door een ABO antagonisme is de DAT vaak negatief. Er dient dan een eluaat gemaakt te worden.

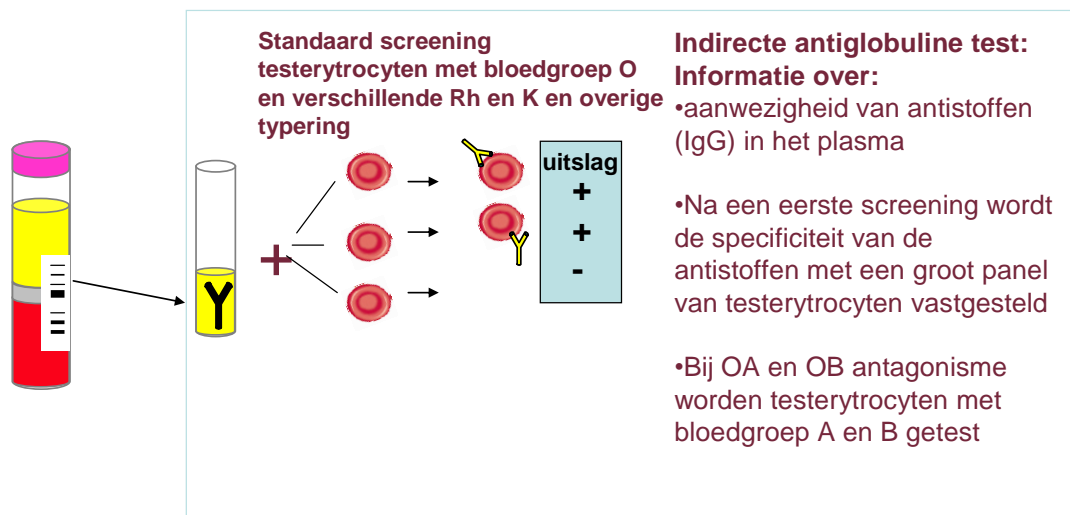
Indirecte antiglobuline test

De indirecte antiglobuline test wordt gebruikt om te analyseren of er in het bloedplasma van de patiënt antistoffen aanwezig zijn. In deze test wordt bij voorkeur serum, maar vaak ook bloedplasma, van de patiënt samengebracht met test-erythrocyten met bekende antigene opmaak. Na het wegwassen van ongebonden antistoffen wordt antihumaan globuline reagens toegevoegd. Indien er antistoffen zijn gebonden aan de testerythrocyten zal agglutinatie optreden. De gevoeligheid van de IAT wordt beïnvloed door onder andere de temperatuur en

door het gebruik van verschillende reactiemedia en specifieke toevoegingen om de binding van antistoffen te optimaliseren.

De indirecte antiglobulinetest kan zowel in buisjes als in kolommen uitgevoerd worden. De kolomtechniek is voor de DAT gevoeliger dan de buisjestechniek maar minder specifiek.

Indirecte antiglobuline test



Interpretatie IAT bij AIHA

Warmte autoantistoffen van IgG klasse zijn meestal positief in deze test, maar kunnen ook een negatieve testuitslag geven. Om warmte autoantistoffen van IgG klasse op te sporen, wordt de test uitgevoerd met enzym-behandelde testerythrocyten, waardoor de gevoeligheid van de test voor het opsporen van IgG warmteautoantistoffen toeneemt.

Koude autoantistoffen zijn doorgaans van IgM klasse en reageren optimaal als deze test bij een lage temperatuur, bij voorkeur bij 16 °C, wordt uitgevoerd.

Valkuilen bij uitvoering van deze test

Bij verdenking AIHA is voor een goede uitvoering van deze test belangrijk dat er stolbloed wordt afgenomen, dat na afname warm gehouden wordt en ook op het laboratorium warm gescheiden wordt in serum en cellen. Op deze wijze blijven de antistoffen in het serum aanwezig en binden zij niet tijdens afkoelen van het bloed aan de patiëntenerythrocyten.

Interpretatie IAT bij HZFP

De specificiteit van antistoffen die HZFP veroorzaken wordt bepaald met plasma of serum van de moeder.

In het bloedplasma (serum) van het kind zijn soms nauwelijks circulerende moederlijke antistoffen aantoonbaar. Echter, indien er sprake is van ernstige hemolyse, die bijvoorbeeld al intra-uteriene transfusies noodzakelijk maakte, is het informatief om de titer van de antistoffen in het bloed van het kind vast te stellen. Een titer wordt vastgesteld door het plasma steeds 1 op 1 te verdunnen met een zoutoplossing. Een titer voor antistoffen van IgG klasse wordt vastgesteld in de indirecte antiglobuline test zonder andere hulpmiddelen. Bij een titer ≥ 4 is nog gedurende lange tijd een daling van het Hb te verwachten. (zie ook link naar Sanquin)

Eluaat:

Door de patiëntenerythrocyten met een zuur reagens te behandelen laten *in vivo* gebonden antistoffen los. Het dan verkregen antistofmengsel kan getest worden op aanwezigheid van antistoffen van IgG, IgA en IgM klasse in de indirecte antiglobuline test. Deze test verhoogt de diagnostische accuratesse voor het vaststellen van AIHA.

Bij verdenking HZFP kan van het verkregen antistofmengsel de specificiteit bepaald worden. Door concentratie van de antistoffen in een eluaat is anti-A of anti-B bij een ABO antagonisme met een eluaat wel aantoonbaar. Echter, indien het eluaat negatief is moet bij verdenking HZFP als gevolg van ABO antagonisme een vries-eluaat gemaakt worden.

Bifasische hemolysinen: Donath Landsteiner test.

Koude antistoffen die paroxismale koude AIHA veroorzaken, de zogenaamde bifasische hemolysinen, kunnen alleen goed aangetoond worden in de Donath Landsteiner test. Met deze test wordt nagebootst wat *in vivo* gebeurt, dus:

- a. serum van de patiënt wordt samengebracht met testerytrocyten bij lage temperatuur
- b. de met patiëntenantistoffen beladen testerytrocyten worden opgewarmd (in aanwezigheid van vers complement), met als gevolg complement activatie en hemolyse. De test is positief als hemolyse wordt waargenomen.

Deze test wordt niet in alle ziekenhuislaboratoria uitgevoerd (link naar Sanquin).

Valkuilen bij uitvoering van de test:

1. Voor een goede uitvoering van deze test is het belangrijk dat er stolbloed wordt afgenomen, dat na afname warm gehouden wordt en ook op het laboratorium warm gescheiden wordt in serum en cellen. Op deze wijze blijven de bifasische hemolysinen in het serum aanwezig en binden zij niet tijdens afkoelen van het afgenomen bloed aan de patiëntenerytrocyten.
2. Ook dient voldoende vers complement toegevoegd te worden; bij heftige hemolyse kan de complementspiegel bij de patiënt zo laag worden dat er geen hemolyse meer optreedt.

Complementspiegel

Indien er complement-gemedieerde hemolyse speelt, zoals bij bifasische hemolysinen, is het soms geïndiceerd om een complementspiegel te meten. Uitputting van de complementbron kan verklaren dat de hemolyse afneemt.