

Artikelen

De invloed van warm voegen en wassen op de detectie van IgG-alloantistoffen in de PEG-IAT

R.J.M.H.E. STRAAT¹, T. JANSE¹, E.A.M. BECKERS¹, P. BERENDES², K. SINTNICOLAAS¹ en D.J. van RHENEN¹

Koude auto-agglutinenen kunnen het identificatieonderzoek van IgG-alloantistoffen sterk bemoeilijken. Om problemen met koude auto-agglutinenen te vermijden, kan in de praktijk de indirecte antiglobulinetest bij 37 °C voorverwarmd worden uitgevoerd (PEG-V), gevolgd door een wasprocedure met een gebufferde fysiologisch zoutoplossing van 37 °C. Naar aanleiding van enkele publicaties over het missen van anti-Vel in de PEG-IAT na "warm voegen en warm wassen" (PEG-VW) werd geadviseerd de BSA-IAT eerder dan de PEG-VW te gebruiken om klinisch relevante antistoffen uit te sluiten. In deze studie werd de invloed van "warm voegen" en "warm wassen" op de gevoeligheid van de PEG-IAT voor klinisch belangrijke alloantistoffen onderzocht en vergeleken met de BSA-IAT. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de vrees belangrijke alloantistoffen in de PEG-IAT met 'warm voegen' en 'warm wassen' te missen veelal onterecht is en in ieder geval minder groot behoort te zijn dan de vrees belangrijke alloantistoffen te missen in de BSA-IAT.

Trefwoorden: koude auto-antistoffen, warm wassen, PEG-IAT

Voorafgaand aan elke bloedtransfusie dient het serum/plasma van de ontvanger met behulp van suspensies van geselecteerde testerythrocyten te worden onderzocht op de aanwezigheid van irregulaire erythrocytenantistoffen. Antistoffen kunnen met testerythrocyten die een antigeen heterozygoot tot expressie brengen zwakker reageren dan met testerythrocyten met een homozygote expressie van het antigeen. Om klinisch belangrijke antistoffen te kunnen detecteren moeten de testerythrocyten homozygoot zijn voor de volgende klinisch relevante antigenen: C, c, D, E, e, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, S en s. Het K-antigeen moet tenminste heterozygoot aanwezig zijn (1). De antistofscreening moet worden uitgevoerd met een techniek

die wat betreft het aantonen van klinisch relevante antistoffen, ten minste even gevoelig is als de indirecte antiglobulinetest (IAT) met runderalbumine (1). Bij een positieve antistofscreening dient de specificiteit van de antistoffen te worden bepaald (identificatie) om, in het geval van transfusiebehoefte, de meest geschikte donoreenheden te kunnen selecteren (2, 3). Koude auto-agglutinenen kunnen, doordat vaak alle testerythrocyten met het antiserum reageren, de identificatie van onderliggende allo- en/of auto-antistoffen sterk bemoeilijken (4). De storende invloed van koude auto-agglutinenen op de IAT kan echter vermeden worden door: a) het serum, de testerythrocyten en eventuele agglutinatieversterkers, zoals bovine serumalbumine (BSA) of polyethyleenglycol (PEG), al voor samenvoegen te verwarmen tot 37 °C en b) de wasstappen met tot 37 °C verwarmde gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS) uit te voeren (5). Deze zogenaamde 'warm-voegen-en-warm-wassen'-procedure remt de binding van koude agglutinenen met een temperatuuroptimum beneden de 37 °C, waardoor men de aanwezigheid van onderliggende klinisch belangrijke alloantistoffen kan uitsluiten (5). Een keerzijde van 'warm voegen' en 'warm wassen' zou zijn, dat belangrijke alloantistoffen ook gemist zouden kunnen worden doordat deze worden weggewassen (5, 6, 7). Aangezien het wassen ook gebeurt in de standaard PEG-IAT, is de heersende gedachte dat vooral het warmte-aspect hierbij een rol zou spelen. Omdat de PEG-IAT gevoeliger is dan de BSA-IAT (8) en omdat bij koude auto-antistoffen de aanbeveling om de BSA-IAT te gebruiken in plaats van de PEG-IAT na 'warm voegen' en 'warm wassen' (PEG-VW) gebaseerd is op casuïstiek en niet op vergelijkend onderzoek, werd een studie opgezet om de technieken PEG-IAT na 'warm voegen' (PEG-V), PEG-VW en BSA-IAT te evalueren voor de detectie gevoeligheid van irregulaire antistoffen.

Deze studie was opgezet om systematisch na te gaan in hoeverre alloantistoffen door gebruik te maken van "warm voegen" en "warm voegen en warm wassen" worden gemist of verminderd reageren. Tevens werd een vergelijking gemaakt met de BSA-IAT, die in het algemeen als minder gevoelig wordt beschouwd, omdat een techniek om klinisch relevante antistoffen uit te sluiten volgens de (concept)richtlijn Bloedtransfusie tenminste even gevoelig moet zijn als de BSA-IAT (1).

Sanquin Bloedbank, Regio Zuidwest Referentielaboratorium erythrocytenserologie, Dordrecht¹. Atrium Medisch Centrum Heerlen, Hematologisch laboratorium, Heerlen².

Correspondentie: Dr. E.A.M. Beckers, Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Wyttemaweg 10, 3015 CN Rotterdam. erik.beckers@bloodrtd.nl

Materialen en methode

Opzet van de studie

Als model voor deze studie is een opzet gekozen waarin patiëntensera met een bekende antistof in alle technieken werden ingezet om zo de invloed van warm wassen en warm voegen op de PEG-IAT te bestuderen.

Sera en erythrocytensuspensies

Voor dit onderzoek werden sera van 64 verschillende patiënten geselecteerd bekend met antistoffen tegen D- (6x), C- (4x), c- (6x), E- (6x), e- (3x), K- (6x), Fy^a- (6x), Fy^b- (4x), Jk^a- (6x), Jk^b- (3x), S- (6x), M- (6x) of Vel-antigenen (2x). Door gebrek aan patiëntmateriaal is anti-s niet getest. De antistoffen werden allen aangetoond in de PEG-IAT. De patiëntensera (bewaard bij -70 °C) werden voor gebruik bij kamertemperatuur ontdooid. Van ieder serum werd een oorspronkelijke, tweevoudige verdunningsreeks in PBS gemaakt. De reactiviteit van de sera werd onderzocht m.b.v. erythrocytensuspensies homozygoot voor het antigeen waartegen de te testen antistof gericht was. Alleen in het geval van anti-K is getest met K-heterozygote testerythrocyten. Bij patiëntensera met een combinatie van antistoffen (b.v. anti-c en anti-E in één serum) is getest met testerythrocyten homozygoot voor het antigeen waartegen het te testen antigeen gericht was en negatief voor het 'storende' antigeen.

PEG-IAT

Voor het uitvoeren van de indirecte antiglobulinetest m.b.v. PEG, werden 50 µl van een 3,5% erythrocytensuspensie, 100 µl van het (verdunde) serum en 100 µl van een 20% PEG-oplossing (Gamma Biologicals Inc.) in een glazen buis gemengd. Het mengsel werd na 15 minuten incubatie in een waterbad van 37 °C driemaal handmatig gewassen met PBS op kamertemperatuur (KT). Na de laatste wasstap werd 100 µl monoclonaal M α Hu anti-IgG (Gamma Biologicals Inc.) toegevoegd aan geresuspendeerde cellen. De agglutinatiereactie werd na centrifugatie beoordeeld (4⁺, 3⁺, 2⁺, 1⁺, +^w of 0). Wanneer er geen agglutinatie zichtbaar was is de test gecontroleerd met Coombscontrolecellen.

BSA-IAT

De IAT m.b.v. BSA volgt hetzelfde protocol als bij de PEG-IAT beschreven. In plaats van PEG werd nu echter 100 µl van een 22% BSA-oplossing (Gamma Biologicals Inc.) gebruikt. De aan erythrocyten gebonden antistoffen werden aangetoond met polyspecifiek M α Hu anti-IgG met anti-C3d (Gamma Biologicals Inc.).

PEG-IAT met warm voegen (PEG-V)

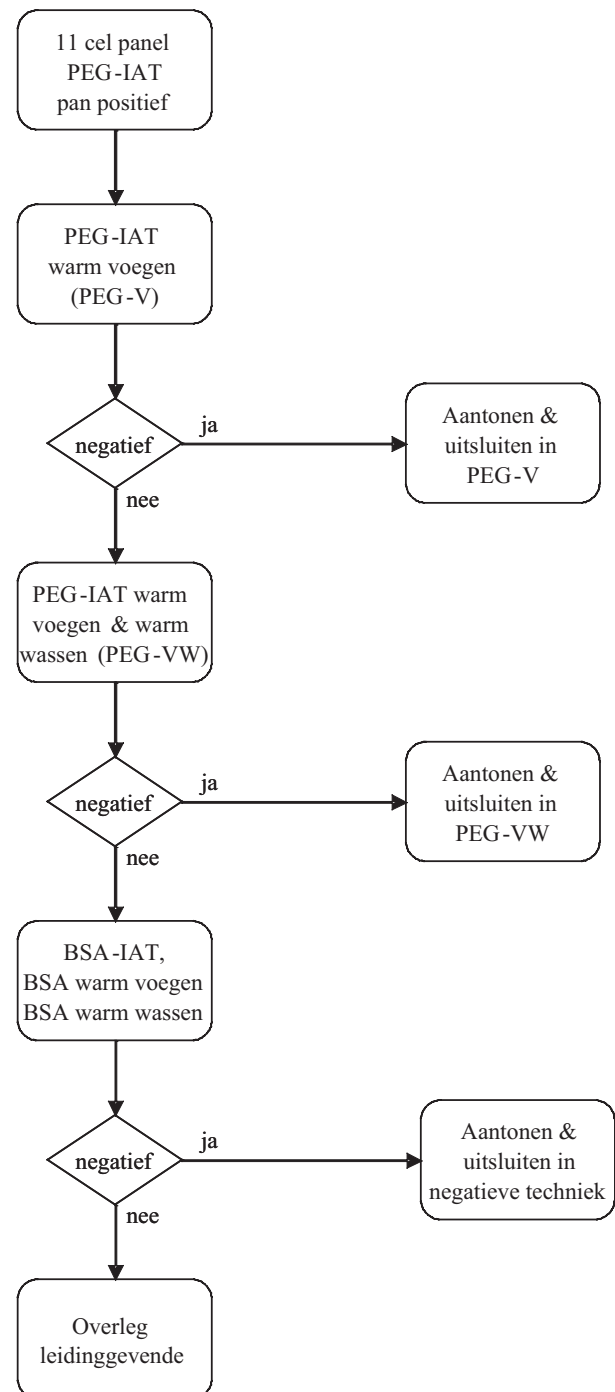
Voor het uitvoeren van de PEG-V werden de erythrocytensuspensie, de 20% PEG-oplossing en het serum tenminste 10 minuten in een waterbad van 37 °C gezet alvorens de reagentia werden samengevoegd. Verder werd het PEG-IAT-protocol gevolgd.

PEG-IAT met warm voegen en warm wassen (PEG-VW)

Voor het uitvoeren van de PEG-VW werd een vergelijkbaar protocol als de PEG-V gevolgd. Hier werd echter na incubatie 3 keer met PBS van 37 °C gewassen.

Aflezen

In het onderzoek is gebruik gemaakt van een methode om de verdunningsreeksen 'blind' af te lezen. Een stickervel met aselechte getallen van 3 of 4 cijfers



Figuur 1. Stroomdiagram werkwijze bij bewezen koude autoantistoffen.

werd via een computerprogramma gegenereerd, hiervan werd een kopie gemaakt. Tegelijkertijd werd ook een resultatenblad gegenereerd, waar dezelfde getallen op nummervolgorde staan. De stickers werden in de volgorde van het stickervel op buizen geplakt. Vervolgens werd in PBS een titratierreeks van één te bepalen monster gemaakt waaruit voor alle vier de testen 100 µl in de gestickerde buizen gepipetteerd werd. Zo is er geen onderling verschil in titratierreeks, alle monsters in een serie zijn afkomstig uit dezelfde titratierreeks. Hierna werden de buizen op nummervolgorde van de stickers gezet en de desbetreffende testen uitgevoerd. De agglutinatiereactiesterkte werd genoteerd op het resultatenblad. Hierna werden de resultaten op de kopie van het stickervel genoteerd en kon de oorspronkelijke titratierreeks terug worden gelezen.

Berekening titerscore

De titerscore die gebruikt werd in dit onderzoek, is beschreven in *Applied blood group serology* (9). Aan de reactiesterktes van de serumverduningen werd een vastgesteld aantal punten toegekend. Aan een 4⁺-reactie 12 punten, een 3⁺-reactie 10 punten, een 2⁺-reactie 8 punten, een 1⁺-reactie 5 punten, een +^w-reactie 3 punten en aan een negatieve reactie 0 punten. De som van het aantal punten per monster is de titerscore. Een monster met titer 64 en een verdunningsreeks met reactiesterktes 4⁺, 3⁺, 3⁺, 2⁺, 1⁺, 1⁺, +^w had aldus een titerscore van 53 (12+10+10+8+5+5+3).

Berekening relatieve gevoeligheid

Om inzicht te krijgen in hoe de gevoeligheid van de verschillende technieken zich onderling verhoudt is het begrip relatieve gevoeligheid geïntroduceerd. Deze is berekend door de gemiddelde titerscore van de BSA-IAT, de PEG-V en de PEG-VW te delen door de gemiddelde titerscore PEG-IAT. De relatieve gevoeligheid is weergegeven in procenten t.o.v. de PEG-IAT.

Resultaten

In tabel 1 zijn de gemiddelde titerscore, de relatieve gevoeligheid en het aantal gemiste antistoffen per antigeen per techniek weergegeven. Uit onze resultaten kwam naar voren dat van de 64 geteste monsters de BSA-IAT er 23 miste (2x anti-D, 1x anti-C, 3x anti-c, 4x anti-E, 2x anti-e, 1x anti-Fy^b, 3x anti-Jk^a, 2x anti-Jk^b, 4x anti-S, 1x anti-M), de PEG-VW er 3 miste (1x anti-S, 2x anti-M) terwijl in de PEG-V alle antistoffen aantoonde. Verder kwam naar voren dat 33 van de 41 sera die wel reageerden in de BSA-IAT lagere titerscores hebben dan dezelfde sera in andere technieken. Bij 1 monster (anti-K) is een gelijke score gevonden tussen de BSA-IAT en de PEG-VW, bij 4 monsters (anti-K, anti-Vel en 2x anti-M) is in de PEG-VW een lagere score gevonden dan bij de BSA-IAT, 2 monsters (anti-S en anti-M) waren negatief in de BSA-IAT en de PEG-VW terwijl een positief resultaat gevonden werd in de PEG en de PEG-V en 1 monster (anti-M) was negatief in de PEG-VW en positief in de andere technieken. Ook de titer is bij 35 van de 41 sera die wel in de BSA-IAT reageerden la-

ger dan in de PEG-technieken, bij 29 monsters is het verschil 2 titerstappen of meer. Bij 5 monsters (2x anti-K, 2x anti-M en 1x anti-Vel) is de titer in de BSA-IAT en de PEG-VW gelijk. Bij 2 monsters (anti-S, anti-M) was de BSA-IAT en de PEG-VW negatief terwijl een titer van 1 gevonden werd in de PEG en de PEG-V. Bij 1 monster (anti-M) is de PEG-VW negatief terwijl de BSA-IAT (titer 1) en de andere PEG-technieken positief waren (titer 4). Tussen de verschillende PEG-technieken werden geen significante verschillen in titers en titerscores opgemerkt.

Beschouwing

In Nederland is er consensus dat koude autoantistoffen klinisch irrelevant zijn. In de laboratoriumpraktijk levert de aanwezigheid van koude autoantistoffen echter problemen op wanneer de thermische amplitude van de autoantistoffen zich uitstrekt boven kamertemperatuur, waardoor de detectie van wel klinisch relevante alloantistoffen wordt gemaskeerd. Met behulp van de 'warm-voegen'- en 'warm-voegen-warm wassen'-techniek wordt de reactie van de koude antistoffen met het antigeen voorkomen. Ook treedt er dissociatie op van het reeds gevormde complex. Deze technieken staan echter ter discussie na meldingen over het missen van alloantistoffen na toepassing hiervan (6, 7). In Nederland werd daarom het gebruik van de BSA-IAT voorgesteld (5).

Uit onze resultaten blijkt dat de klinisch belangrijke antistoffen in het algemeen sterker reageren in de PEG-technieken (PEG-IAT, PEG-V en PEG-VW) dan in de BSA-IAT. Omdat de titerscore niet alleen door de reactiviteit van het antiserum, maar ook door de aviditeit van het antiserum wordt bepaald, werd ook gekeken naar het titratie-eindpunt van de antistoffen in de verschillende technieken. Een serum met een lage titerscore hoeft immers niet te leiden tot het 'missen' van antistoffen in een hoge serumverduning. Opvallend waren de 23 patiëntensera, waarvan de antistofreactiviteit met de gebruikte PEG-technieken wel werd aangetoond, maar in de BSA-IAT werd gemist (tabel 1). De onderzochte patiëntensera werden geselecteerd op PEG-IAT-activiteit, waardoor er theoretisch een eenzijdige selectie is opgetreden ten nadele van de BSA-IAT. Veel aannemelijker is echter dat de afwezige BSA-IAT-reacties nog eens aantonen hoe relatief ongevoelig deze techniek is.

Van de 3 antistoffen gemist in de PEG-VW waren 2 antistoffen (1x anti-M, 1x anti-S) ook in de BSA-IAT negatief. De anti-M die alleen in de PEG-VW gemist werd had een titer van 1 en een score van 3 in de BSA-IAT, een titer van 4 en een score van 23 in de PEG-V en een titer van 4 met een score van 20 in de PEG-IAT. De antistoffen gemist in de BSA-IAT worden vaker met hemolyse geassocieerd dan de antistoffen gemist in de PEG-VW.

Onze bevindingen ondersteunen de conclusies dat 'warm voegen' of 'warm-voegen-warm-wassen' goede methodes zijn om de detectie van alloantistoffen in aanwezigheid van koude autoantistoffen mogelijk te maken. Aan het gebruik van deze technieken wordt door ons wel een aantal voorwaarden verbonden. De aanwezigheid van koude autoantistoffen moet zijn

Tabel 1. Titerscore, relatieve gevoeligheid en gemiste antistoffen*

Antistof	n		PEG-IAT	BSA-IAT	PEG-V	PEG-VW
D	6	gem. titerscore	28	7	30	30
		range titerscore	13-51	0-18	18-54	11-62
		rel. gevoeligheid	100%	25%	107%	107%
		gemist		2	0	0
C	4	gem. titerscore	49	5	47	43
		range titerscore	6-70	0-8	6-67	6-60
		rel. gevoeligheid	100%	10%	96%	88%
		gemist		1	0	0
c	6	gem. titerscore	37	4	35	33
		range titerscore	10-59	0-8	11-63	10-56
		rel. gevoeligheid	100%	11%	95%	89%
		gemist		3	0	0
E	6	gem. titerscore	49	11	49	40
		range titerscore	13-100	0-61	10-103	8-98
		rel. gevoeligheid	100%	22%	100%	82%
		gemist		4	0	0
e	3	gem. titerscore	37	2	39	37
		range titerscore	24-59	0-5	18-59	24-51
		rel. gevoeligheid	100%	5%	105%	100%
		gemist		2	0	0
K	6	gem. titerscore	34	25	36	31
		range titerscore	20-63	5-51	23-63	13-58
		rel. gevoeligheid	100%	74%	106%	91%
		gemist		0	0	0
Fy ^a	6	gem. titerscore	45	27	46	45
		range titerscore	23-74	6-51	24-77	24-69
		rel. gevoeligheid	100%	60%	102%	100%
		gemist		0	0	0
Fy ^b	4	gem. titerscore	46	15	47	41
		range titerscore	29-74	0-47	29-78	26-70
		rel. gevoeligheid	100%	33%	102%	89%
		gemist		1	0	0
Jk ^a	6	gem. titerscore	39	10	43	40
		range titerscore	14-65	0-23	21-62	16-67
		rel. gevoeligheid	100%	26%	110%	103%
		gemist		3	0	0
Jk ^b	3	gem. titerscore	22	2	24	35
		range titerscore	11-31	0-6	13-29	13-58
		rel. gevoeligheid	100%	9%	109%	159%
		gemist		2	0	0
S	6	gem. titerscore	24	1	24	20
		range titerscore	3-49	0-3	3-47	0-41
		rel. gevoeligheid	100%	4%	100%	83%
		gemist		4	0	1
M	6	gem. titerscore	22	9	20	10
		range titerscore	3-46	0-21	3-46	0-23
		rel. gevoeligheid	100%	41%	91%	45%
		gemist		1	0	2
Vel	2	gem. titerscore	54	44	49	46
		range titerscore	24-83	25-63	24-73	16-76
		rel. gevoeligheid	100%	81%	91%	85%
		gemist		0	0	0

*PEG-IAT: polyethyleenglycol-indirecte-antiglobulinetest, BSA-IAT: boviene-serumalbumine-indirecte-antiglobulinetest; PEG-V: polyethyleenglycol-indirecte-antiglobulinetest, warm voegen, PEG-VW: polyethyleenglycol indirecte-antiglobulinetest, warm voegen en warm wassen. Titerscore: deze werd als volgt berekend: een 4⁺-reactie 12 punten, een 3⁺-reactie 10 punten, een 2⁺-reactie 8 punten, een 1⁺-reactie 5 punten, een +^W-reactie 3 punten en een negatieve reactie 0 punten. De som van het aantal punten per monster is de titerscore.

aangetoond door een positief celpanel bij 16 °C met een positieve autocontrole en eventueel een positieve directe antiglobulinetest (DAT). Indien de autocontrole negatief is, zijn autoantistoffen onaannemelijk en dient men bedacht te zijn op antistoffen gericht tegen een 'public' antigen. In een van de casuïstische mededelingen, waarin de methode ongeschikt werd genoemd, bleek het te gaan om een anti-Vel en niet om autoantistoffen (7). Daarnaast dient de warm-voegen- of warm-voegen-warm-wassen-techniek te worden gebruikt in aanwezigheid van een gevoelige reactieversterker, zoals bijvoorbeeld PEG, en niet zoals in de AABB-manual staat vermeld in de zouttechniek.

Op basis van dit onderzoek is onze werkwijze aangepast, zoals staat weergegeven in het stroomdiagram. In het kort, na het aantonen van de aanwezigheid van koude autoantistoffen die 'doorreageren' in de PEG-IAT, wordt eerst 'warm voegen' ingezet. Bij onvoldoende effect wordt daarna warm-voegen-warm-wassen toegepast. Pas in derde instantie wordt het gebruik van de BSA-IAT overwogen. Overigens zou gezien de relatieve gevoeligheid van de PEG-V ook overwogen kunnen worden deze techniek als standaard te gebruiken in plaats van de PEG-IAT.

Conclusie

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat de PEG-IAT met "warm voegen" en "warm wassen" minder gevoelig is dan de PEG-IAT en de PEG-IAT met "warm voegen", maar veel gevoeliger is dan de BSA-IAT. De vrees belangrijke alloantistoffen te missen in de PEG-IAT met "warm voegen" en "warm wassen" is veelal onterecht en hoeft in ieder geval minder groot te zijn dan de vrees belangrijke alloantistoffen te missen in de BSA-IAT.

Literatuur

1. Conceptrichtlijn Bloedtransfusie, Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg, 2002, 20-29.
2. Conceptrichtlijn Bloedtransfusie, Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg, 2002, 75-160.
3. Overbeeke MAM, Engelfriet CP. Antistoffen bij transfusie. In: Bloedgroepenonderzoek Theorie en Praktijk 2^{de} ed. Bohn Stafleu Van Loghum: Houten/Zaventhem, 1994, 63-79.

4. Overbeeke MAM, Engelfriet CP. Auto-immuun-hemolytische anemie. In: Bloedgroepenonderzoek Theorie en Praktijk 2^{de} ed. Bohn Stafleu Van Loghum: Houten/Zaventhem, 1994, 93-102.
5. Overbeeke M, Vreeswijk N. Het toepassen van de voorverwarmde IAT kan gevaarlijk zijn. NVB-Nieuwsbulletin 1996; 1: 5-7.
6. Judd WJ. Prewarmed tests: Con. Transfusion 1995; 35: 271-275.
7. Storry JR, Mallory D. Misidentification of anti-Vel due to inappropriate use of prewarming and adsorption techniques. Immunohematology 1994; 10: 83-86.
8. Man AJ de, Overbeeke MA. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. Vox Sang 1990; 58: 207-210.
9. Issitt PD, Anstee DJ. Principles of serological methods. In: Applied blood group serology 4th ed. Montgomery Scientific Publications: Durham North Carolina USA, 1998, 55-56.

Summary

Straat RJMHE, Janse T, Beckers EAM, Berendes P, Sintnicolaas K, Rhenen DJ van. The influence of prewarming and warmwashing on the detection of IgG allo-antibodies in PEG-IAT tests. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 275-279.

Cold-reactive autoantibodies may interfere with the identification of IgG alloantibodies in the PEG-IAT. The use of prewarmed testing is criticised because of the reported risk of failure of detecting clinically significant 37 °C antibodies. Instead, the use of BSA-IAT is advocated although it has a well recognised lesser sensitivity. This study was designed to evaluate the risk of non-detecting clinical significant antibodies in pre-warmed PEG-IAT tests and prewarmed-warmwashed PEG-IAT tests compared to the routinely applied BSA-IAT.

Of the total of 64 PEG-IAT reactive alloantibodies, all were reactive in the PEG-P, 61 in the PEG-PW and only 41 in the BSA-IAT. The PEG-PW failed to identify three antibodies (anti-S 1x; anti-M 2x). Two of these were also negative in the BSA-IAT and one antiserum (anti-M) was only nonreactive in PEG-PW. Mean titre-scores of PEG-IAT, PEG-P and PEG-PW for all antibodies tested were comparable. In contrast, only eight of the 41 reactive BSA-IAT samples had comparable titre-scores, whereas the other thirty-three samples had lower titre-scores as compared to the PEG techniques.

This study clearly shows that the fear of not detecting clinical important alloantibodies when using the PEG-P or PEG-PW is unjustified and should be less great than the fear of not detecting alloantibodies in the BSA-IAT.

Keywords: cold auto-antibodies, warmwashing, PEG-IAT