

## Hematologie 2009

### Vraag 1

a) Beschrijf vier verschillende hoofdoorzaken voor het ontstaan van een normocytair anemie.

U wordt gebeld door de arts-assistent interne geneeskunde met de vraag of u even zou willen meedenken. Het gaat om een 18-jarige mevrouw A die enige tijd geleden door de huisarts werd verwezen naar de polikliniek hematologie op basis van vermoeidheidsklachten. Er speelt een onbegrepen anemie.

#### Laboratoriumonderzoek bij huidige controle

Hb	5,3	mmol/l
Erythrocyten	3,21	10 <sup>12</sup> /l
Reticulocyten	190	10 <sup>9</sup> /l
MCV	95,3	fl
Trombocyten	221	10 <sup>9</sup> /l
Leukocyten	3,9	10 <sup>9</sup> /l
Differentiatie analyzer:		
segmenten	2,1	10 <sup>9</sup> /l
lymfocyten	1,5	10 <sup>9</sup> /l
monocyten	0,2	10 <sup>9</sup> /l
eosinofielen	0,1	10 <sup>9</sup> /l
basofielen	0,0	10 <sup>9</sup> /l
Totaal bilirubine	30	µmol/l
Directe bilirubine	6	µmol/l
LD	690	U/l
Haptoglobine	<0,1	g/l
Directe antiglobulinetest	neg	
CRP	46	mg/l

b) Welke verzamelgroep van anemie vindt u na interpretatie van de uitslagen in deze casus het meest waarschijnlijk en waarom? Noem drie vervolgonderzoeken die een onderscheidende bijdrage kunnen leveren bij de analyse van onderliggende differentiaaldiagnose.

Bij de verzendbepalingen treft u voor een 37-jarige man een aanvraag voor DNA-onderzoek naar alfa-thalassemie aan. Terugkijkend in het ziekenhuisinformatiesysteem ziet u de volgende labuitslagen:

Hb	7,9	mmol/l
Erythrocyten	4,3	10 <sup>12</sup> /l
MCV	87	fl
Trombocyten	229	10 <sup>9</sup> /l
Leukocyten	9,3	10 <sup>9</sup> /l
Reticulocyten	176	10 <sup>9</sup> /l
Rode bloedbeeld		
Anisocytose	+	
Microcyten	+	
Hyperchrom	+++	
Microsferocyten	++	
Totaal bilirubine	63	µmol/l
Directe bilirubine	8	µmol/l
LD	542	U/l
Haptoglobine	<0,1	g/l

U besluit te overleggen met de aanvragend arts-assistent. Zij denkt op basis van de afkomst van deze man aan een hemoglobinopathie. Om het logistiek allemaal wat handiger en sneller voor haar poliklinische patiënt te laten verlopen, zou ze graag direct onderzoek naar Hb-varianten, alfa- en beta-thalassemie willen inzetten.

c) Wat voor diagnostische aanpak zou u haar adviseren op basis van de reeds bekende laboratoriumuitslagen en waarom?

d) Noem twee cellulaire afwijkingen die kunnen worden waargenomen bij de microscopische beoordeling van leukocyten. Geef bij elke minimaal twee oorzaken. Doe hetzelfde voor erythrocyten.

De kinderarts belt u met vragen over onderzoek naar een G6PD-deficiëntie bij de kinderen waarvan de moeder bekend is als draagster. De kinderarts heeft de volgende uitslagen gekregen:

#### Dochter (24-06-2005):

Glucose-6P-dehydrogenase	4,0	IE/g Hb (ref: 3,8-5,9; leeftijd >3 mnd)
Glutathionreductase	5,5	IE/g Hb (ref: 3,2-6,5; leeftijd >3 mnd)

#### Zoon (04-07-2009):

Glucose-6P-dehydrogenase	6,7	IE/g Hb (ref: 5,0-7,8; leeftijd <3 mnd)
Glutathionreductase	10,1	IE/g Hb (ref: 3,6-7,4; leeftijd <3 mnd)

e) De kinderarts vraagt u of ze de moeder op basis van deze uitslagen gerust kan stellen. Wat is uw antwoord?

### Antwoorden Vraag 1

a) Acuut bloedverlies

Anemie van de chronische ziekte  
(deze kan echter ook microcytair zijn)

Aplastische anemie

Beginnende ijzergebreek-anemie

Chronische nierfunctiestoornis

(met tekort aan erythropoëtin als gevolg)

Hemolytische anemie

Verdringing erythropoëse bij infiltratie in beenmerg

b) Niet-immuun gemedieerde hemolytische anemie: er is sprake van een normocytair anemie met positieve hemolyseparameters (verhoging van ongeconjugeerd bilirubine en LDH, verlaging van haptoglobine) met daarbij een negatieve directe antiglobulinetest. Daarbij is er een stijging van het reticulocytenaantal (dus wel effectieve aanmaak).

DD in deze casus en bijbehorend vervolgonderzoek zijn als volgt.

Hereditaire oorzaken. Afwijkingen van de erythrocytemembraan/cytoskelet (bv. sferocytose, elliptocytose, stomatocytose): begin met microscopische beoordeling van het rode bloedbeeld, gevolgd door spectrine, band3 en zure glycerol-lysis test (AGLT) analyse.

Deficiëntie van metabole enzymen, bijvoorbeeld G6PD, glutathionreductase of pyruvaatkinase: onderzoek activiteit van betreffende erythrocytaire enzymen; variant-hemoglobine: start met onderzoek van Hb-fractions (bv. met HPLC).

Verworven oorzaken: infecties (bv. malaria, Clostridia): bijbehorende microbiologische diagnostiek inzetten; paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH): immunofenotypisch onderzoek naar aanwezigheid van GPI-verankerde membraaneiwitten, zoals bijvoorbeeld CD59 en CD14; toxisch (bv. lood of gebruik van bepaalde medicatie): lood bepalen en EPD nazoeken of navraag bij arts; immuungemedieerd: er wordt een negatieve DAGT gerapporteerd. Echter bij actieve hemolyse toch een eluaat inzetten.

- c) De combinatie van een normaal MCV en een normaal aantal erythrocyten maakt een beta-thalassemie minder waarschijnlijk als oorzaak voor deze hemolytische anemie (met reticulocytose). Een deletie met als gevolg het verlies van één van de vier genen voor alfa-globine zou wel kunnen. Echter, dit veroorzaakt geen hemolytische anemie. De aanwezigheid van een instabiele Hb-variant zou aanleiding kunnen zijn voor deze vorm van hemolyse. Opvallend zijn echter de bevindingen in het rode bloedbeeld. Op basis daarvan ligt het meer voor de hand om in de richting van immuungemedieerde afbraak of membraan/cytoskeletafwijkingen (sferocytose) te denken. Onderzoek inzetten naar de aanwezigheid van autoantistoffen en een DAGT (IgA, IgG, IgM en complement) inclusief eluaat. Daarnaast kan onderzoek worden ingezet naar hereditaire sferocytose (spectrinegehalte, band-3-expressie, zure glycerol-lysis test). Middels HPLC-analyse van de Hb-fractions kan oriënterend onderzoek worden verricht naar de aanwezigheid van een Hb-variant.
- d) Enkele voorbeelden voor leukocyten zijn als volgt. Hypersegmentatie: megaloblastaire anemie (vitamine-B12- of foliumzuurtekort), MDS, alcoholisme, sepsis, nierziekte, myeloproliferatieve aandoeningen. Hyposegmentatie: ernstige infectie, MDS. Hypogranulatie: MDS, myeloïde leukemie, myeloproliferatieve aandoeningen. (Pseudo-)Pelger-Huët-vormen: erfelijk (autosomaal dominant, heterozygoot of homozygoot), MDS, medicatie, ernstige infectie, myeloïde leukemie. Toxische korreling: infectie/ontsteking, groeifactoren, zwangerschap, verbranding. Lichaampjes van Döhle: ernstige infectie, ontsteking, MDS, groeifactoren, ernstige verbranding, zwangerschap. Linksverschuiving: reactie bij ontsteking/infectie, CML, behandeling met GM-CSF. Blasten: diverse hematologische neoplasieën; reactief (bv. bij leuko-erythroblastose).

Enkele voorbeelden voor erythrocyten:

Macroplanie/macrocytose: leverziekten, alcoholisme, MDS, hypothyreoïdie, reticulocytose, megaloblastaire anemie, leverziekten, alcoholmisbruik.

Microplanie/microcytose: ijzergebrek, thalassemie, soms ACD, refractaire anemie met ringsideroblasten. Stomatocytose: leverziekten, alcoholisme, hereditaire stomatocytose.

Elliptocytose: hereditaire elliptocytose, megaloblastaire anemie, myelodysplastisch syndroom.

Schietplaatcellen/target cellen: ijzerdeficiëntie, leverziekten, hemoglobinopathie, thalassemie, hemoglobinopathieën, leverziekten, postsplenectomie, ijzergebrek.

Traandrupcellen: myelofibrose en andere myeloproliferatieve ziekten, cytostaticabehandeling.

Microsferocytose: hereditaire sferocytose, auto-immuun hemolytische anemie.

Fragmentocytose: DIC, microangiopathie (HUS/TTP), brandwonden, hartklepprothese, ernstige verbrandingen.

- e) Bij dochter: van belang is dat het gen voor G6PD X-chromosomaal overerft. Met twee X-chromosomen is bij de dochter een heterozygotie op basis van deze normale activiteit niet geheel uit te sluiten. G6PD-deficiëntievarianten in klasse IV van de WHO-classificatie uiten zich als milde tot geen deficiëntie. Om die reden kan met name bij het stellen van de correcte diagnose bij vrouwelijke patiënten, waarbij per cel steeds een X-chromosoom inactief is, DNA-diagnostiek van toegevoegde waarde zijn. Ook een chroominhibitietest kan aanvullende informatie verschaffen (chromaatspectrum van de activiteit van glutathionreductase in gereduceerde vorm; in G6PD-deficiënte cellen, ook bij draagsters, wordt glutathionreductase niet volledig gereduceerd gehouden, waardoor inactivatie door chromaatspectrum onvolledig is). Bij zoon: met slechts één X-chromosoom zou de normale activiteit van G6PD de aanwezigheid van een mutatie met verminderde activiteit als gevolg minder waarschijnlijk maken. Echter, de glutathionreductaseactiviteit in de erythrocyten is verhoogd. Hoge enzymwaarden (geldt voor zowel G6PD als glutathionreductase) kunnen worden gevonden bij de aanwezigheid van een jonge celpopulatie van erythrocyten. Indien de verhoging van glutathionreductase wordt veroorzaakt door een toename van het aantal jonge erythrocyten zou de G6PD-activiteit daardoor normaal kunnen zijn, terwijl er in werkelijkheid toch sprake is van een verlaagde activiteit. Dus gezien verhoging van het referentie-enzym glutathionreductase is een G6PD-deficiëntie nog niet geheel uit te sluiten.

## Vraag 2

Een 34-jarige vrouw meldt zich op de SEH met petechiën en een actieve bloeding. Het Hb is 5,0 mmol/l en trombocyten zijn  $<10 \cdot 10^9/l$ . De differentiatie van het bloed laat geen afwijkingen zien. De SEH arts vraagt met spoed een trombocytenconcentraat aan om de bloeding te stoppen. De bloedgroep van de vrouw

is A-neg U heeft alleen een A-pos-eenheid trombocyten (meerdere donoren, samengevoegd in plasma) op voorraad. Het laten komen van andere trombocyten duurt >1 uur.

a1) Wat adviseert u de arts?

In een andere situatie betreft het een neonaat met een forse sepsis. De trombocyten bij geboorte waren normaal, maar tijdens de infectie dalen ze tot onder  $10 \cdot 10^9/l$ . De kinderarts vraagt per acut trombocyten aan omdat zij vreest voor een bloeding. U heeft nog een  $0^{neg}$  eenheid trombocyten (meerdere donoren, samengevoegd in plasma) in de bewaarkast liggen. De (voorlopige) bloedgroep van de baby is A-neg en er is geen tijd om aferesetrombocyten in een pedipack te laten komen.

a2) Voor welke bijwerking waarschuwt u de kinderarts?

Een patiënte van 76 jaar met een al enkele maanden bestaande anemie (Hb= 5,1 mmol/l) en trombocytopenie ( $120 \cdot 10^9/l$ ) wordt door de huisarts doorverwezen naar de internist-hematoloog van uw ziekenhuis. In de status worden bij het lichamelijk onderzoek en de anamnese geen bijzonderheden, zoals gastro-intestinale bloedingen, splenomegalie, infecties, alcohol, toxiciteit of een oncologische voorgeschiedenis vermeld. Het biochemisch onderzoek naar de oorzaken van de cytopenieën (ijzergebreek, vitaminedeficiëntie) laat geen afwijkingen zien, met uitzondering van een licht verhoogd LD. De leukocyten zijn  $5,2 \cdot 10^9/l$  en er worden enkele blasten in het bloed gezien. Daarop wordt besloten een beenmergpunctie uit te voeren. U krijgt van de analisten het bijgaande rapport ter beoordeling.

Beenmergrapportage bij vraag 2b

Rapportdatum : 13-03-2009  
Naam : xxx

*Vraagstelling*

Betreft : Nieuwe diagnose  
Verdenking op : Anemie en trombocytopenie e.c.i.  
Materiaal : Cristapunctie en perifere bloed

*Uitslag Perifeer bloed*

Kwantitatief:  
Segmenten : 49%  
Lymfocyten : 34%  
Monocyten : 8%  
Eosinofielen : 1%  
Basofielen : 2%  
Blasten : 5%  
Promyelocyten : 1%

Kwalitatief:  
Erytropoëse : Anisocytose en microcytair  
Myelopoëse : Lichaampjes van Döhle, hypogranulatie, slechte korreling van eosinofielen  
Trombopoëse : Ontkorreling trombocyten

*Uitslag Beenmergmorfologie*

Kwaliteit preparaat: goed  
Celrijkdom : hyperplastisch  
IJzerreserve : normaal

Megakaryopoëse : voldoende  
Kwalitatief : dysplasie > 10% met micromegakaryocyten en megakaryocyten, vele losliggende kogelronde kernen.

Myelopoëse : 59% (ref: 41-64)  
Kwalitatief : dysplasie > 10% met hypogranulatie en uitrijpingsdissociatie van kern en cytoplasma.

Erytropoëse : 23% (ref: 17-37)  
M:E-ratio : 2,6 (ref: 1,2 - 3,6)

Lymfopoëse : 5% (ref: 7-26)

Blasten : 13% (ref: <3)  
Kwalitatief : geen Auerse staven aantoonbaar

*Eindconclusie:*

b) Ervan uitgaande dat de beoordeling juist is, hoe formuleert u de eindconclusie (volgens WHO 2001/2008)? Kan de uitslag van de cytogenetica, die veelal 2 weken later komt, de diagnose nog veranderen bij deze patiënt?

De bovengenoemde 76-jarige patiënte ontwikkelt in de loop van enkele maanden follow-up een steeds verder dalend aantal trombocyten. Hierdoor is ze in verband met gastro-intestinale bloedingen al 2x opgenomen. U spreekt met de internist-hematoloog af dat ze trombocyten krijgt indien deze dalen onder  $10 \cdot 10^9/l$  of wanneer er weer bloedingen optreden. Enkele weken en 12 trombocytentransfusies later wordt de opbrengst van de 13<sup>e</sup> en 14<sup>e</sup> transfusie plotseling minder. Om de oorzaak te achterhalen besluit u een 1-uurs en een 24-uurs 'corrected count increment' (CCI) uit te rekenen. Deze zijn 2 en 1, respectievelijk (zie tabel 1 voor referentiewaarden).

c) Noem tenminste drie oorzaken voor een verlaagde CCI in het algemeen. Welke oorzaak is bij deze patiënt de meest waarschijnlijke en welk laboratoriumonderzoek beveelt u aan zodat de opbrengst mogelijk kan worden verhoogd?

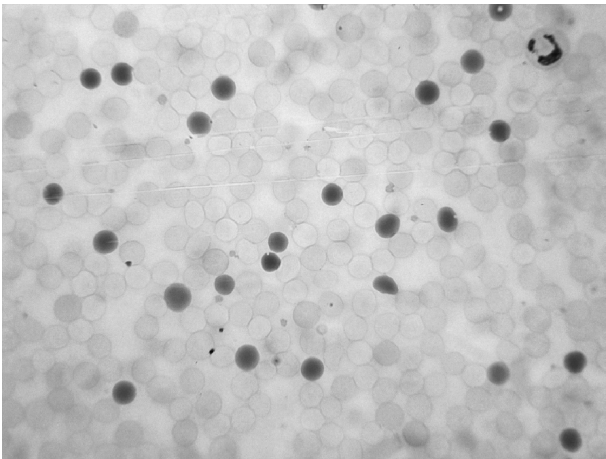
Een 30-jarige vrouw bevalt na 39 weken thuis. Bij geboorte ziet de baby bleek en is slap waarna het naar de SEH wordt verwezen.

De laboratoriumuitslagen van de baby zijn:

Leukocyten	18,6	$10^9/l$
Hb	3,5	mmol/l
MCV	111	fl
Trombocyten	145	$10^9/l$
NRBC	84,5	$10^9/l$
Reticulocyten	297	$10^9/l$

Directe antiglobulinetest : Negatief  
Bloedgroep kind : 0-pos  
Bloedgroep moeder : 0-neg  
Irr. antistofscreening moeder : Neg

Kleihauer-test : 80 %  
(Zie figuur 1; de foto geeft het microscopische beeld van de Kleihauer-test weer.)



Figuur 1 bij vraag 2d.

- d) Verklaar de labuitslagen in relatie tot het klinisch beeld.
- e) Beschrijf kort het principe van twee verschillende methoden waarmee de Kleihauer-test kan worden uitgevoerd en noem een ziektebeeld waardoor de testuitslag chronisch verhoogd kan zijn.

### Antwoorden vraag 2

- a1) In het 0-pos-trombocytenconcentraat kunnen Rh(D)-pos erythrocyten aanwezig zijn die de vorming van anti-D-antistoffen kunnen uitlokken. Het voorkomen hiervan is van belang voor mogelijke zwangerschap(pen). Daardoor moet, indien de trombocyten worden gegeven, tevens een ampul anti-D worden toegediend.
- a2) Bij deze neonaat met bloedgroep A speelt het 0-plasma als bewaarvloeistof een rol. Hierin kunnen anti-A-antistoffen in een dusdanige titer aanwezig zijn dat zij hemolyse kunnen veroorzaken. Normaliter worden daarom voor pediatrische toepassing aferesetrombocyten van één donor gesplitst en in plasma bewaard met een anti-A- en anti-B-titer lager dan 1:64.
- b) Vanwege de cytopenie (m.n. anemie), de dysplasie in 2 cellijnen en de aanwezigheid van 13% blasten in het beenmerg kan de diagnose refractaire anemie met excess blasten (RAEB-2) worden gesteld. Ondanks het % blasten <20% kan cytogenetica de diagnose in acute myeloïde leukemie veranderen indien er genetische afwijkingen aanwezig zijn zoals gedefinieerd in de WHO, hoofdstuk 'AML with recurrent genetic abnormalities'.
- c) Volgens de CBO-consensus wordt een lage 1-uurs-CCI gezien bij sepsis, ernstige graft-versus-host-ziekte, gebruik van amfotericine-B, diffuse intravasale stolling, veno-occlusieve ziekte, splenomegalie en manifeste bloedingen of trombocytenantistoffen. Bij deze patiënt is de laatste optie de meest waarschijnlijke. HLA-typering en mogelijk de bepaling van HLA-antistoffen (in enkele gevallen HPA-antistoffen) kan leiden tot betere donorselectie.
- d) De labuitslagen wijzen op een massale foeto-maternale transfusie. De aanwezigheid van 80 promille HbF-cellen ( $= 80/1000 \times 5000\text{ml} = 400$

ml foetaal bloed) in de circulatie van de moeder betekent dat deze bloeding chronisch moet zijn geweest. Dit wordt bevestigd door de duidelijke erytroblasten- en reticulocytenrespons van de foetus. Blijkbaar heeft de moeder geen resus(D)-antistoffen gevormd en blijven de circulerende foetale erythrocyten hierdoor circuleren.

- e) De klassieke methode van de Kleihauer-test: onder invloed van een zure buffer elueert HbA (uit cellen van de moeder) terwijl HbF (in cellen van de baby) hertegen bestand zijn. Na aankleuring (bv. met hematoxyline en eosine B) wordt het uitstrijkje microscopisch beoordeeld. Het aantal roze gekleurde foetale cellen wordt uitgedrukt in promille tegen de lege lichtgekleurde maternale cellen. De flowcytometrische methode van de Kleihauer-test: met behulp van HbF-antilichamen (en evt. andere erymarkers) worden de erythrocyten aangekleurd. Chronisch verhoogde testuitslagen worden gevonden bij personen met HbF-bevattende cellen in de circulatie, zoals bij HPFH of thalassemie major. Flowcytometrie heeft hier minder last van dan de Kleihauer-test.

### Vraag 3

Een 65-jarige man wordt behandeld i.v.m. recidief, gemetastaseerd rectumcarcinoom. Anamnestic is patiënt bekend met een (milde) hemorragische diathese. Hiervoor wordt screenend stollingsonderzoek aangevraagd:

APTT	72 sec
APTT (1:1)	36 sec
PT	14 sec

De arts-assistent geeft zijn afdelingssecretaresse de opdracht een aanvraag voor verder hemostaseonderzoek in te zetten. Zij vraagt het gehele palet aan: fibrinogeen, factoren II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, BT/PFA, D-dimeer, trombofiliepakket, vonwillebrand-onderzoek, HIT. U accepteert deze aanvraag niet en belt de arts-assistent.

- a) Welke bepalingen uit bovenstaande aanvraag acht u zinvol?
- b) Waarom worden bij bepaling van factordeficiënties veelal verschillende verdunningen ingezet?
- c) Wat is het effect van DDAVP-toediening? Welke laboratoriumtesten acht u zinvol om het effect van DDAVP te monitoren?
- d) Bij deze patiënt wordt een longembolie gediagnosticeerd. Verklaar hoe deze patiënt, ondanks zijn schijnbare bescherming hertegen, mogelijk toch een trombose kan doormaken.

De behandeling van longembolieën bestaat uit therapeutische dosering laagmoleculairgewichtsheparine (LMWH). Hoewel monitoring hiervoor meestal niet nodig is kan dit in voorkomende gevallen aangewezen zijn.

- e) Welke bepaling is aangewezen voor het monitoren van LMWH? Wat is het principe van deze bepaling?

### Antwoorden vraag 3

- a) Bij een geïsoleerd verlengde APTT met een genormaliseerde mengproef zijn deficiënties van de factoren I, II, V, VII, X uitgesloten. Factor-XIII-deficiëntie kan een bloedingsneiging geven maar kan worden gemist in de stollingscreening. Factor-VIII-, IX-, XI-, XII-deficiënties, alsmede deficiënties in het HMWK/prekallikreïnesysteem kunnen deze laboratoriumresultaten geven. Echter, deficiënties in factor XII en upstream in de APTT geven geen bloedingsneiging. Gezien de hemorragische diathese blijven VIII, IX en XI over. VWD kan een laag fVIII tot gevolg hebben, waardoor een lange APTT, zodat dit ook in de d.d. thuishoort. PFA/BT kan met betrekking tot deze mogelijke VWD gebruikt worden als een snelle screening met een goede tot redelijke gevoeligheid. D-dimeer, trombofilieonderzoek en HIT zijn uit den boze.
- b) Bij patiënten met een recente hemorragische diathese en een blanco voorgeschiedenis is een verworven (immunologische) factordeficiëntie het meest waarschijnlijk. Bij een deficiëntie zullen verschillende verdunningen na correctie eenzelfde uitslag geven, bij een verworven remmer zullen hogere verdunningen een hogere activiteit opleveren door uitverdunden van de remmer. Hierdoor kan het onderscheid worden gemaakt met gevolgen voor evt. therapie.
- c) DDAVP stimuleert endotheelcellen tot uitstoot van VWF uit de 'Weibel-Palade bodies'. Door de koppeling aan fVIII, zal een tijdelijke verhoging van beide factoren plaatsvinden. De top is meetbaar na ongeveer 30 minuten. Na 6 uur worden weer basale waarden bereikt. Ter monitoring van het effect dient voor en na (bv. t = 30 min, 2 en 6 uur) DDAVP-toediening laboratoriumonderzoek te worden ingezet: VWF en fVIII, evt. ook APTT en plaatjesfunctie (PFA/BT: slechts voor en éénmaal na).
- d) Overwegend is een deficiëntie in een (relevante) stollingsfactor beschermend tegen trombose. Echter, een maligniteit is een belangrijke risicofactor voor trombose, en kan bij een deficiëntie met milde kliniek de overhand krijgen. Deze afgeleide casus past goed bij een fXI-deficiëntie (NTVG 2009; 153: B42).
- e) Voor de monitoring van LMWH dient de anti-Xa-activiteitsmeting te worden gedaan. De APTT, zoals die voor ongefractioneerd heparine kan worden gebruikt, is hiervoor te ongevoelig. Het testprincipe bestaat uit een samenvoeging van een patiënt-plasmamonster, een getitreerde hoeveelheid factor Xa en substraat (in geval van chromogene bepaling) of normaal plasma (in geval van stollingsbepaling). De restactiviteit van fXa om substraat om te zetten of een stolsel te vormen is omgekeerd evenredig met de concentratie LMWH en wordt op een LMWH-ijklijn in plasma afgelezen. De ijklijn dient per LMWH bepaald te worden.

### Vraag 4

In de bloedtransfusieketen zijn er tal van maatregelen genomen om transfusiereacties of andere bijwerkingen van transfusies te voorkomen. Hier worden vier voorbeelden gegeven.

Kell-negatief transfunderen bij jonge vrouwen, Parvo-B19-vrije producten, bestralen van bloedproducten en leukocyten-gedepleteerde bloedproducten

- a) Noem bij elk van deze vier maatregelen de soort transfusiereactie of bijwerking die men probeert te voorkomen.

Uw laboratorium hanteert het type- en screenbeleid. Dat wil zeggen dat de ABO-bloedgroepcompatibiliteit tussen donor en een recent monster van de patiënt wordt getest door een korte kruisproef in zout of met de computer en dat bovendien de antistofscreening geldig en negatief moet zijn.

Tijdens uw achterwachtendienst wordt u, op afzonderlijke dagen, door de dienstdoende analist geconsulteerd over de volgende drie patiënten. Voor alle patiënten geldt dat de arts een erythrocytentransfusie met redelijke spoed, dus uiterlijk binnen twee uur, wil geven. De analist stelt u de volgende twee vragen; geef uw antwoord met een korte verklaring.

- I. Moet, naar aanleiding van de positieve directe antiglobulinetest (DAT), een elutie worden gedaan voordat het bloed wordt uitgegeven?
- II. Moet, naast de type- en -screenprocedure, ook een lange kruisproef (in IAT, indirecte antiglobuline test) worden ingezet? En zo ja, met welk materiaal?

*Patiënt 1:* een baby van drie dagen oud, die met spoed (uiterlijk binnen 2 uur) een erythrocytentransfusie nodig heeft. De moeder was bekend met anti-E en heeft de afgelopen maanden geen transfusie gehad. Haar bloedgroep is AB-positief, resusfenotype CcDee. Vier dagen geleden is het onderzoek opnieuw ingezet. De irregulaire-antistofscreening was nog positief. Met behulp van het panel werd een anti-E gevonden, overige antistoffen werden uitgesloten. De DAT van de moeder was negatief.

De DAT van de baby is nu positief 1+ (uittypering IgG 1+, IgA-, IgM- en c3d-negatief).

Aanvullende gegevens:

Hb	6,2 mmol/l
Reticulocyten	4 %
LD	licht verhoogd
Bilirubine	licht verhoogd

- b) Beantwoord bovengenoemde vragen I en II.

*Patiënt 2:* deze patiënt van 75 jaar heeft een MDS. Hij is bekend met een allo-anti-E en heeft 4 dagen geleden 1 eenheid erythrocyten gehad.

Nu presenteert hij zich op de SEH met een Hb van 4,2. Men wil hem snel transfunderen. De screening en een uitgebreid panel worden weer ingezet en er komt weer een anti-E uit, maar dit keer met een positieve autocontrole. Er wordt besloten een DAT uit te voeren; deze is 2+ (IgG).

- c) Beantwoord bovengenoemde vragen I en II.

*Patiënt 3:* Een oudere dame werd drie dagen geleden geopereerd aan haar heup. Ze was bekend met een anti-

D gevormd tijdens zwangerschappen, verder heeft ze een blanco voorgeschiedenis. Tijdens de ingreep werd geen bloed toegediend. Haar transfusieanamnese was blanco. Nu, drie dagen later, wordt met spoed/voorrang een eenheid EC besteld vanwege een nabloeding. Ze kreeg postoperatief diverse medicatie waaronder paracetamol, LMWH en antibiotica.

De anti-D wordt zonder problemen geïdentificeerd, maar de autocontrole is positief. Om die reden wordt een DAT ingezet, die is 2+ (IgG).

d) Beantwoord bovengenoemde vragen I en II.

#### Antwoorden vraag 4

a1) Dit transfusiebeleid dient ter voorkoming van de vorming van Kell-antistoffen bij deze categorie patiënten. Kell-antistoffen kunnen tijdens een zwangerschap hemolytische ziekte van de foetus en de pasgeborene (HZFP) veroorzaken.

a2) De parvovirus-B19-infectie is ook bekend als de 'vijfde ziekte'. Bij zwangere vrouwen, die zelf geen beschermende antistoffen hebben, kan virustransmissie naar de foetus optreden. Dit leidt tot een toename van de prenatale sterfte van 10%. Bij patiënten met iatrogene cellulaire immunodeficiëntie of hemoglobinopathie, erythrocytenafwijkingen en AIHA kan het een aplastische crisis veroorzaken.

a3) Bestraalde lymfocyten kunnen niet prolifereren. Onbestraalde donorlymfocyten die prolifereren tegen de 'host' (patiënt) kunnen 'transfusion associated GVHD' veroorzaken. Ondanks het gebruik van bloedproducten met weinig leukocyten komt dit nog steeds voor bij immuungecompromiteerde patiënten.

a4) Verschillende soorten reacties tracht men te voorkomen door leukocyten uit de bloedproducten te filteren: vorming van HLA-klasse-I-antistoffen, febrile reactie bij aanwezigheid van HLA-antistoffen, virusoverdracht (bijv. CMV, HTLV en EBV), graft-versus-hostziekte. In trombocytenconcentraten kunnen de cytokinen die vrijkomen uit achtergebleven leuko's een ernstige koortsreactie geven.

b1) Elueren voordat het bloed uitgaat is niet noodzakelijk. Het kind kan van zichzelf geen antistoffen maken en heeft geen transfusie gehad. De moeder heeft geen antistoffen bijgemaakt en geen transfusie gehad. Hemolyseparameters geven geen extra informatie. Elueren zou weer de anti-E opleveren.

b2) Bij deze casus moet wel een lange kruisproef worden ingezet. Gebruik hiervoor het materiaal van de moeder. De baby heeft een irreguliere antistof gekregen van de moeder.

c1) Elueren is nu zeker zinvol, De patiënt heeft recent bloed gehad. De DAT wordt meest waarschijnlijk niet verklaard met de anti-E, want daar wordt bij een transfusie rekening mee gehouden. Er is natuurlijk wel een kleine kans dat dit toch fout is gegaan. Naast de anti-E-antistoffen kan ook een nieuw gevormde alloantistof aanwezig zijn. Deze kan kort na een transfusie beter in het eluaat worden aangetoond dan in de IAT van het serum.

c2) Bij deze casus moet wel een lange kruisproef worden ingezet, omdat de patiënt bekend is met een antistof en omdat de DAT positief was.

d1) Elueren is niet noodzakelijk, voor de uitgifte van de eerste erythrocyteenheid. De patiënt heeft recent geen transfusie gehad. De oorzaak van de positieve DAT ligt zeer waarschijnlijk bij de medicatie. Als er duidelijk sprake is van hemolyse dan zou elueren wel nodig zijn, om een AIHA uit te sluiten.

d2) Een lange kruisproef is noodzakelijk vanwege een reeds gevormde antistof en vanwege de positieve DAT.

#### Vraag 5

Patiënt A, geboren in 1934, wordt begin november 2008 opgenomen op de afdeling Interne Geneeskunde ter evaluatie van progressieve nierfunctiestoornissen, anemie en trombopenie.

Er is geen sprake van lymfadenopathie en hepatosplenomegalie.

De voorgeschiedenis vermeldt bij een sportkeuring in 1970 een verhoogde BSE e.c.i., in 1994 een transurethrale resectie van de prostaat; in maart 2008 een colonoscopie met excisie van een colonpoliepje, passend bij een tubulair adenoom met laaggradige dysplasie (geen maligniteit).

#### Laboratoriumuitslagen

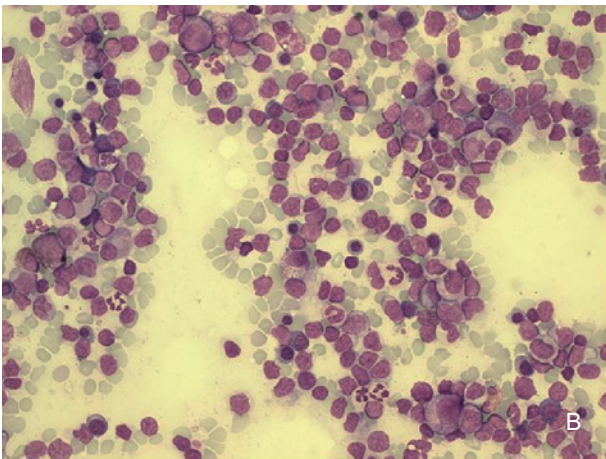
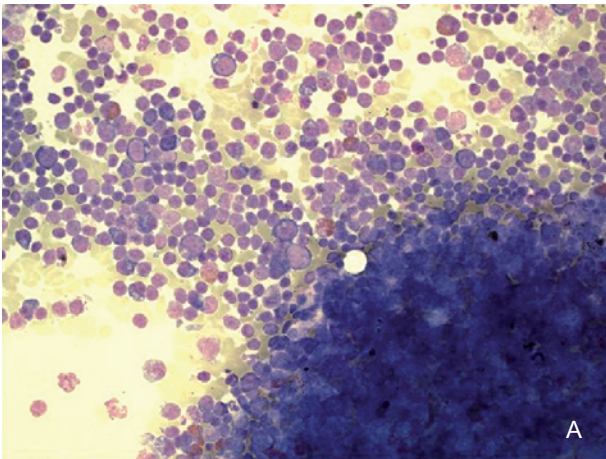
BSE	> 120	mm/uur
Hb	4,5	mmol/l
Trombocyten	105	10 <sup>9</sup> /l
Leukocyten	5,1	10 <sup>9</sup> /l
Differentiatie		
Segmenten	3,0	10 <sup>9</sup> /l
Lymfocyten	1,8	10 <sup>9</sup> /l *
Monocyten	0,2	10 <sup>9</sup> /l
Eosinofielen	0,0	10 <sup>9</sup> /l
Basofielen	0,0	10 <sup>9</sup> /l
Natrium	140	mmol/l
Kalium	4,7	mmol/l
Calcium	2,41	mmol/l
Creatinine	279	µmol/l
eGFR	21	ml/min
LD	201	U/l
Totaal Eiwit	124	g/l

\*Er worden geen afwijkende lymfocyten gezien

Enkele dagen later wordt een beenmergbiopsie verricht. Figuren 2A en B geven een MGG-beeld weer. Er is sprake een infiltratie met lymfoïde cellen, soms met plasmocytoïde uitrijping; daarnaast zien we nog een lichte toename van plasmacellen. Er wordt geacht aan een non-hodgkinlymfoom (NHL).

Het NHL kent vele subtypen, o.a.:

- CLL/lymfocytair lymfoom ('small lymphocytic lymphoma')
- B-PLL
- T-PLL
- HCL
- Mantelcellymfoom
- Lymfoplasmacytair lymfoom /immunocytoom



Figuur 2 bij vraag 5a.

a) Welke van deze NHL-entiteiten zou volgens u bij deze patiënt aanwezig kunnen zijn? Beargumenteer uw antwoord.

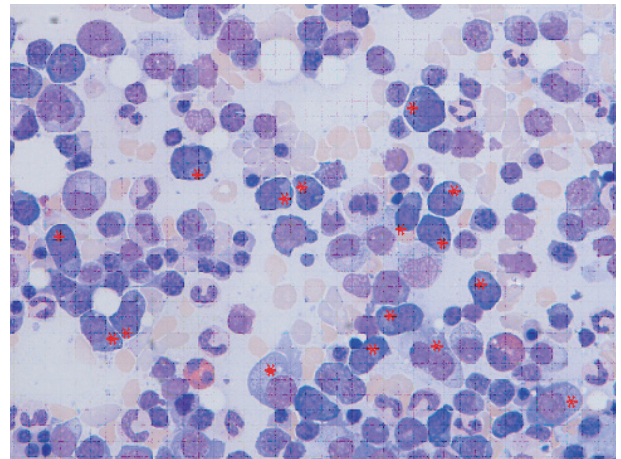
Figuur 3; de figuur geeft enkele flowcytometrie-beelden van patiënt A weer:

- $\kappa/\lambda$
- CD19/CD20
- CD19/CD5
- CD103/CD25
- CD56/CD138
- IgA/IgD

Bij het aantonen van intracellulaire antigenen blijkt het merendeel van de cellen IgA+/ $\kappa$ +; daarnaast is er nog een kleine hoeveelheid plasmacellen die ook IgA+/ $\kappa$ + zijn.

- b1) Zijn deze beelden passend bij uw antwoord in vraag a)?
- b2) Welk type eiwit veroorzaakt het hoge totaaleiwitgehalte?  
Indien IgM de oorzaak zou zijn van het hoge totaaleiwitgehalte, aan welk klinisch syndroom denkt u dan? Kunt u twee bij dit syndroom passende symptomen noemen? Waardoor worden deze symptomen veroorzaakt?

Patiënt B, een volwassen man; er wordt gedacht aan



Figuur 4 bij vraag 5d.

een hematologische maligniteit, zie figuur 4. De foto geeft het MGG-beeld van het beenmerg van patiënt B weer. Bij de differentiële telling van het beenmerg worden 21% cellen gevonden welke in foto 4 met een \* zijn gemarkeerd.

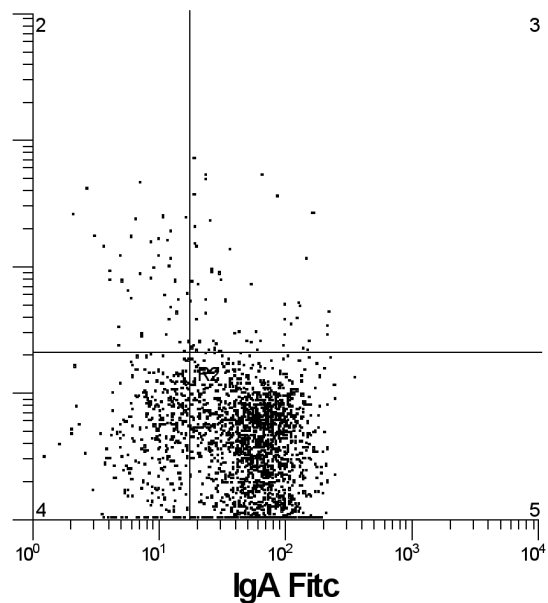
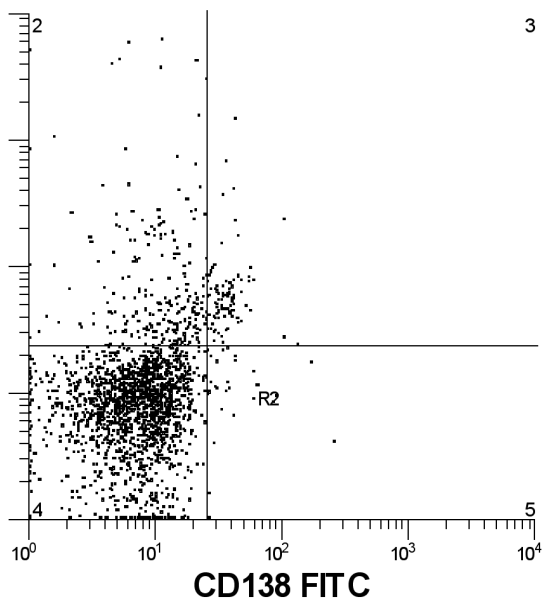
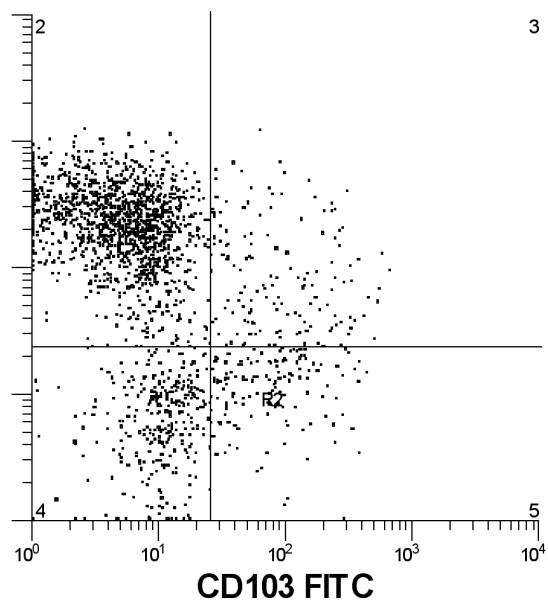
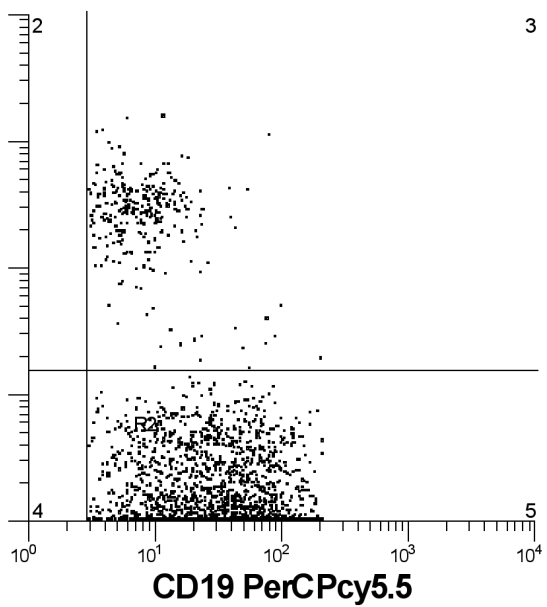
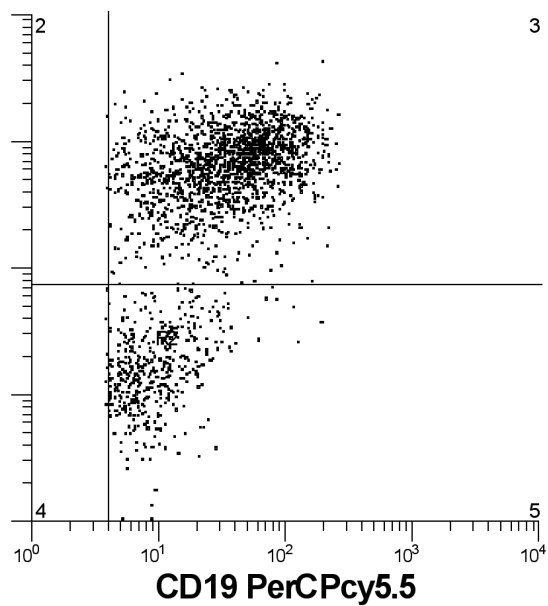
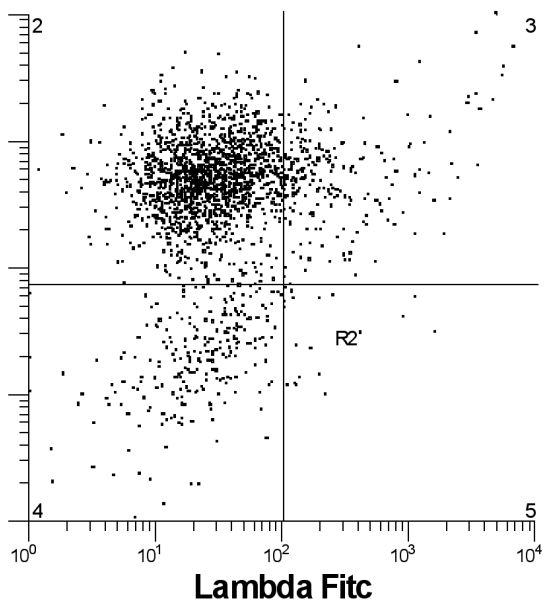
d) Aan welke maligniteit wordt hierbij gedacht? Welke parameters spelen naast celaantal een rol bij het stellen van deze diagnose? Betrek hierbij de voor deze hematologische maligniteit opgestelde internationale richtlijnen.

De 'free light chain'-bepaling in het serum van patiënt C geeft een  $\kappa/\lambda$ -ratio van 408 (referentiewaarde 0,26-1,65).

e) In welke specifieke gevallen geeft deze bepaling een duidelijke bijdrage aan de diagnostiek?

### Antwoorden vraag 5

- a) DD lymphoproliferatieve aandoeningen met pro- en contra-argumenten.  
 CLL/lymfocytair lymfoom ('small lymphocytic lymphoma'): CLL lijkt uitgesloten vanwege het normale aantal lymfocyten in het perifere bloed.  
 PLL: lijkt uitgesloten vanwege het normale aantal lymfocyten in het perifere bloed.  
 HCL: lijkt niet waarschijnlijk, gezien de morfologie en vanwege het feit dat in het perifere bloed geen afwijkingen zijn gezien.  
 Mantelcellymfoom: lijkt niet waarschijnlijk, vanwege afwezigheid lymfadenopathie en hepatosplenomegalie, en vanwege het feit dat in het perifere bloed geen afwijkingen zijn gezien.  
 Lymfoplasmacytair lymfoom: waarschijnlijk het meest passend: een beenmerg vol met voornamelijk lymfoïde, mogelijk ook wat lymfoplasmacytoïde cellen, alsmede een kleine hoeveelheid plasmacellen; het normale perifere bloed is hier ook meer bij passend.
- b1) Uit de flowcytometrie beelden kan het volgende worden geconcludeerd.  
 De cellen zijn positief voor CD19 en CD 20, hetgeen betekent dat de cellen van B-celorigine zijn, dus T-celafwijkingen vallen af.



Figuur 3 bij vraag 5b.



De cellen zijn negatief voor CD5, hetgeen betekent dat B-CLL/lymfocytair lymfoom en een mantelcellenlymfoom niet waarschijnlijk zijn.

De cellen zijn negatief voor CD103, dus een HCL is ook niet waarschijnlijk.

De cellen zijn zwak positief voor IgA; daarentegen vertonen B-PLL-cellen een sterke expressie van membraanimmunoglobulinen.

Er zijn nauwelijks CD138-positieve cellen aanwezig, hetgeen aangeeft dat we niet te maken hebben met plasmacellen.

Bij het aantonen van intracellulair antigeen blijkt het merendeel van de cellen IgA+/ $\kappa$ +; daarnaast is er nog een kleine hoeveelheid plasmacellen die ook IgA+/ $\kappa$ + zijn.

Bovenstaande conclusies geven aan dat ook het flowcytometriebeeld past bij de diagnose lymfoplasmacytair lymfoom/immunocytoom.

- b2) IgA/ $\kappa$ .
- c) Ziekte van Waldenström, waarbij een hyperviscositeitssyndroom kan ontstaan. Symptomen hiervan zijn visusklachten, bloedingen, cerebrale problemen, hartfalen, nierinsufficiëntie, auto-immuunziekten.
- d) De gemarkeerde cellen zijn plasmacellen, zodat gedacht zou kunnen worden aan diagnose multipel myeloom (ziekte van Kahler). In het kader van internationale richtlijnen dienen meerdere parameters in beschouwing te worden genomen, hieronder aangeven.

#### *International Myeloma Working Group, symptomatisch MM*

M-proteïne in serum of urine.

Klonale plasmacellen in het beenmerg.

Orgaan of beenmergdisfunctie samenhangend met activiteit van het MM. Hiervoor zijn diverse criteria opgesteld: o.a. serumcalcium  $> 2,75$  mmol/l, Hb-daling  $\geq 1,5$  mmol/l of botlaesies.

#### *Diagnostische criteria volgens Durie en Salmon*

Major criteria

1. Plasmacytotoom (weefselbiopt).
2.  $> 30\%$  plasmacellen in het beenmerg.
3. Monoklonaal paraproteïne  $> 35$  g/l indien IgG ( $> 20$  g/l bij IgA) of  $> 1$  gram/24 uur lichte ketens in de urine bij afwezigheid van amyloïdose.

Minor criteria

- a.  $>10\%$  plasmacellen maar  $< 30\%$  in het beenmerg.
- b. Monoklonaal paraproteïne lager dan hierboven.
- c. Lytische bothaarden.
- d. Normaal IgG  $< 6$  g/l, of IgM  $< 0,5$  g/l, of IgA  $< 0,2$  g/l.

De diagnose multipel myeloom wordt gesteld bij symptomatische patiënten met progressieve ziekte als de juiste combinatie van major en minor criteria aanwezig is.

- e) Wanneer er sprake is van een niet-secretair myeloom, of van een vrije lichteketenmyeloom of van amyloïdose (referentie: J.G. Boonstra en A.W. van Toorenbergen, Ned Tijdschr Hematol 2008; 5: 260-5).

#### **Vraag 6**

- a) Uw hoofdanalist geeft bij een hematologisch laboratoriumresultaat het volgende commentaar: "Als gevolg van een ernstige lipemie is de erythrocytelling (net als de hiervan afgeleide hematocrietwaarde) onbetrouwbaar. Om die reden wordt bij dit onderzoek alleen de hemoglobinewaarde gerapporteerd". *Juist/Onjuist?*
- b) Bij verdenking myeloproliferatieve ziekte sluit de aanwezigheid van een JAK2-mutatie (V617F) secundaire oorzaken uit. *Juist/Onjuist?*
- c) De aanwezigheid van Auerse staven in blasten sluit een acute lymfatische leukemie uit. *Juist/Onjuist?*
- d) Indien in het HPLC-spectrum van een volwassene het %HbS kleiner is dan 35% moet een onderliggende  $\beta$ -thalassemie worden overwogen. *Juist/Onjuist?*
- e) Een afwezige respons op ristocetine in een aggregatietest is bewijzend voor een ziekte van von Willebrand. *Juist/Onjuist?*
- f) Een HIT test die zowel heparine/PF4-antilichamen van het type IgG, IgA als IgM detecteert heeft een hogere specificiteit voor het aantonen van HIT dan een test die alleen IgG aantoot. *Juist/Onjuist?*
- g) Bij de diagnose idiopathische trombocytopenische purpura (ITP) is, nadat de aanwezigheid van trombocytenuitjes is uitgesloten, onderzoek naar de aanwezigheid van antistoffen tegen ADAMTS-13 de volgende diagnostische stap. *Juist/Onjuist?*
- h) Uw dienstdoende analist belt u over het volgende. Voor een patiënt met een aantal trombocyten van  $152 \cdot 10^9/l$  wordt een trombocytentransfusie aangevraagd. Volgens de analist is een dergelijke aanvraag niet gerechtvaardigd. *Juist/Onjuist?*
- i) Met behulp van papaïne-behandelde testerythrocyten kun je resus- en Kell-antistoffen wel aantonen, maar mag je ze niet uitsluiten. *Juist/Onjuist?*
- j) Bij alle klinisch belangrijke antistoffen verwacht je een forse acute hemolytische transfusiereactie, indien een patiënt met een van deze antistoffen niet-compatibel bloed krijgt. *Juist/onjuist?*

#### **Antwoorden vraag 6**

- a) Onjuist; een fotospectrometrische Hb-bepaling wordt gestoord door absorptie van licht door de chylomicronen en andere vetdeeltjes. De RBC-telling, bijv door impedantiemeting, wordt hierdoor (normaliter) niet gestoord.
- b) Juist; bij een verdenking op een myeloproliferatieve ziekte is de aanwezigheid van JAK-2-mutatie (vrijwel) bewijzend voor een klonale ziekte als oorzaak voor de gevonden afwijkingen. De kans op een dubbele oorzaak is erg klein. Dit neemt niet weg dat bij patiënt met een myeloproliferatieve ziekte regelmatig geen JAK-2-mutatie wordt gevonden.
- c) Juist; Auerse staafjes komen alleen bij myeloïde maligniteiten (MDS, AML) voor.
- d) Onjuist; dit kan worden veroorzaakt door een onderliggende  $\alpha$ -thalassemie. Voor diagnostiek van een combinatie HbS/ beta-thalassemie is juist een hoger HbS en/of HbA2-gehalte ( $>3,5\%$ ) meer richtinggevend.

- e) Onjuist; hoewel een ziekte van von Willebrand het meest waarschijnlijke is, kan een afwezige respons op ristocetine ook wijzen op een deficiëntie van de VWF-receptor GPIb op bloedplaatjes (ziekte van Bernard-Soulier). Overigens kan een toegenomen respons ook wijzen op VWD, maar dat is niet het antwoord op de vraag.
- f) Onjuist; veel patiënten die heparine krijgen toegediend produceren heparine/PF4-antilichamen. Alleen de IgG-klasse is potentieel pathogeen. Door ook IgA en IgM te meten ontstaat juist een lagere specificiteit voor de klinische HIT. Daarbij moet gesteld worden dat ook de meeste patiënten met IgG-antilichamen geen klinische HIT ontwikkelen.
- g) Onjuist; ITP is een diagnose die per exclusionem wordt gesteld, waarbij bepalingen, zoals een Hb, leukocytendifferentiatie, fragmentocyten en virusserologie in een vroeg stadium zullen worden uitgevoerd. ADAMTS13 speelt een rol bij TTP. Dit is een ander ziektebeeld dan ITP en het staat niet hoog in de DD van een patiënt met verdenking op ITP. Bovendien wordt de ADAMTS13-bepaling zelf meer gebruikt dan de bepaling van de antistoffen tegen ADAMTS13.
- h) Onjuist; bij een congenitale of een medicijn-geïnduceerde trombocytopenie in combinatie met een actieve (ernstige) bloeding of een acute chirurgische ingreep kan een transfusie-aanvraag voor trombocyten gerechtvaardigd zijn. Ook dient men zich te bedenken dat bij een acute zeer ernstig bloedende patiënt, waarbij nog geen verdunning is opgetreden door infusies of transfusies, het aantal trombocyten snel kan dalen. In sommige gevallen kan de vraag worden gesteld of de plaatjesremmende medicatie kan worden gestopt en de ingreep worden uitgesteld totdat het aantal functionele trombocyten weer op peil is.
- i) Juist; met de juiste toelichting kan 'Onjuist' ook goed worden gerekend. Over het algemeen is het risico aanwezig dat de expressie is afgenomen en daarom een fout-negatief resultaat ontstaat. Echter er is geen consensus op dit gebied, dus er zijn laboratoria die de papainemethode zodanig hebben gevalideerd dat ze hem ook kunnen gebruiken om antistoffen uit te sluiten.
- j) Onjuist; sommige klinisch belangrijke antistoffen geven geen ernstige acute transfusiële reactie, maar een milde (uitgestelde) transfusiële reactie. Dit hangt o.a. af van de titer en het complementbindend/activerend vermogen van de antistoffen.

**Tabel 1.** Referentiewaarden

Test	Volwassenen	Neonaat	Eenheid
BSE	<40		mm/uur
CRP	<5		mg/l
Leukocyten	4,0-10,0	5,5 - 15,0	10 <sup>9</sup> /l
Hb	8,5-11 (m) 7,5-10 (v)	9,0 - 14,0	mmol/l
Erytrocyten	4,5-5,5 (m) 4,0-5,0 (v)		10 <sup>12</sup> /l
MCV	80 - 100	95 - 121	fl
Trombocyten	150-400	150 - 450	10 <sup>9</sup> /l
NRBC	< 0,10	< 1,3	10 <sup>9</sup> /l
Reticulocyten	30-100	37 - 104	10 <sup>9</sup> /l
Differentiatie	Relatief	Absoluut	
Segmenten	30-80 %	2,0-7,5	10 <sup>9</sup> /l
Lymfocyten	20-40 %	0,8-3,2	10 <sup>9</sup> /l
Monocyten	2-10 %	0,3-0,9	10 <sup>9</sup> /l
Eosinofielen	0-6 %	<0,40	10 <sup>9</sup> /l
Basofielen	0-2 %	<0,20	10 <sup>9</sup> /l
Directe antiglobulinetest	Negatief		
Irr. antistofscening	Negatief		
Kleihauer-test	<2 %		
CCI na 1 uur	>7,5		
CCI na 24 uur	>2,5		
APTT	30-38		sec
APTT (1:1)	30-38		sec
PT	11-14.5		sec
Natrium	135-145		mmol/l
Kalium	3,6-5,0		mmol/l
Calcium	2,20-2,60		mmol/l
Creatinine	70-110		µmol/l
eGFR	44-94		ml/min
LD	200-480		U/l
Totale bilirubine	< 17		µmol/l
Directe (geconj.) bilirubine	< 5		µmol/l
Totaal eiwit	60-80		g/l
Haptoglobine	0,37-2,21		g/l
'Free light chain' κ/λ-ratio	0,26-1,65		