

Hemolytische ziekte van de pasgeborene door anti-RhD ondanks PSIE



UMC Utrecht

Casuïstiek Poster C01

Karen M.K. De Vooght, Willem de Vries, Gerdien Walbeek
(Centraal Diagnostisch Laboratorium en Afdeling Neonatologie, UMC Utrecht)

Achtergrond

- Het Bevolkingsonderzoek Prenatale Screening Infectie ziekten en Erythrocytenimmunisatie (PSIE) heeft o.a. als doel ernstige gevolgen van hemolytische ziekte van de foetus en/of pasgeborene (HZFP) te voorkomen.
- Bloed van zwangere vrouwen wordt gescreend op het RhD-antigeen, Rhc-antigeen en irregulaire erythrocyten-antistoffen.
- Vrouwen die RhD negatief en zwanger zijn van een RhD positief kind krijgen in de 30e week van hun zwangerschap en na bevallen een ampul anti-D toegediend.
- Hierdoor komt het vrijwel niet meer voor dat een vrouw tijdens een zwangerschap zelf een anti-D ontwikkeld en daardoor HZFP veroorzaakt bij haar kind.

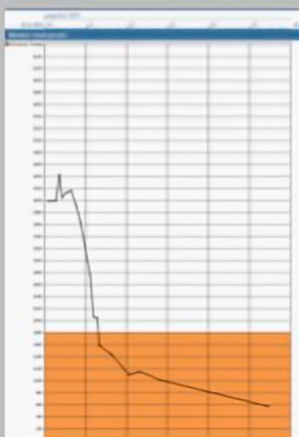
Methode

- Serologische testen werden uitgevoerd in een LISS kolomtechniek (Biorad). Titerbepalingen werden uitgevoerd in de buisjestechniek (AABB Technical Manual).

Tabel 1 Uitslagen laboratoriumonderzoek bij presentatie

	Uitslag	Ref. waarden
Hb	9,1 mmol/L	5,9 – 8,4 mmol/L
Bilirubine	399 µmol/L	< 200 µmol/L
DAT IgG	4 +	Neg
DAT c3d	Neg	Neg
Bloedgroep	A RhD pos	

Tabel 2 Bilirubine verloop bij het kind



Beschrijving

- Een zwangere 29-jarige vrouw bevalt in een tweedelijns ziekenhuis, vanwege matige uitdrijving, van een dochter.
- Twee dagen later wordt het kind, vanwege een snel stijgend bilirubine en de noodzaak tot wisseltransfusie, naar ons ziekenhuis overgeplaatst (zie tabel 1 voor uitslagen).
- Moeder is bloedgroep A RhD negatief. De irregulaire antistofscreening bij moeder is positief en een anti-RhD wordt aangetoond. De aanwezigheid van andere klinisch relevante irregulaire antistoffen kan uitgesloten worden.
- Dit onderzoek is eerder ook uitgevoerd in het verwijzende ziekenhuis, en daar is geconcludeerd dat het reactiepatroon veroorzaakt wordt door een ampul anti-D. Omdat de oorzaak van de HZFP daarmee niet duidelijk is, is aldaar ook onderzoek ingezet naar afwijkingen in membraan- eiwitten en glycolytische enzymen.
- Vanwege het hoge bilirubine krijgt het kind een wisseltransfusie (bloedgroep O RhD negatief, AB-plasma) waarna de bilirubine concentratie in het bloed zakt. De wisseltransfusie wordt een dag later herhaald (zie tabel 2 voor bilirubine verloop).
- In het laboratorium is een titerbepaling bij moeder en elutie onderzoek bij het kind uitgevoerd. De titer anti-D blijkt > 1:1000. Deze is te hoog voor een ampul anti-D en geconcludeerd mag worden dat de moeder zelf een anti- RhD heeft gevormd.
- Het referentielaboratorium van Sanquin voert na deze rapportage een check uit op de gegevens en herhaalt onderzoek. Het herhaalde 27^e week onderzoek laat geen positieve screening zien, ook niet met enzym behandelde testcellen. De titer anti-D is van moeder is 1:2000 en de ADCC is >80%.
- Waarschijnlijk heeft de vrouw ergens tussen de 27^e en 30^e week anti-RhD gevormd (geen boostering, geen bekende eerdere zwangerschap) of is er, ondanks dat de zwangerschap goed is verlopen en er geen sprake is geweest van trauma, een foetomaternal transfusie van RhD positief bloed opgetreden die groter was dan de 30^e week ampul kan neutraliseren.

Conclusie

Het volgen van het PSIE programma sluit een allo anti-RhD als veroorzaker van HZFP niet uit.

Zwangere met anti-Fy3 antistoffen en een spoed sectio



UMC Utrecht

Casuïstiek Poster C02

Karen M.K. De Vooght, Gerdien Walbeek
(Centraal Diagnostisch Laboratorium, UMC Utrecht)

Achtergrond

- Bij een patiënt met relatief zeldzame anti-Fy3 antistoffen en een spoed indicatie voor erythrocytentransfusie is het aantal beschikbare compatibele erythrocytenconcentraten zeer beperkt.
- Als er dan sprake is van een moeder en pasgeboren prematuur kind, kan de situatie nog nijpender worden.

Methode

- Serologische testen werden uitgevoerd in een LISS kolomtechniek (Biorad) en bovine albumine techniek (AABB Technical Manual).

Conclusie

Bij een zwanger patiënt met een irregulaire antistof tegen een hoog frequent antigeen (hier, anti-Fy3) kan een vroegtijdige ongeplande bevalling of sectio leiden tot een complexe en intensieve procedure om tijdig compatibele erythrocyteneenheden voor zowel moeder als kind op voorraad te hebben.

Beschrijving

- Een 27-jarige vrouw wordt vanuit een tweedelijns ziekenhuis naar ons ziekenhuis overgeplaatst i.v.m. een spoedsectio bij een zwangerschapsduur van 29 weken.
- De vrouw heeft homozygote sikkelcelziekte (HbS 85%) en is bekend met anti-Fy3 en anti-Wra antistoffen. Ze heeft bloedgroep 0 RhD positief. ADCC uitslag was nog niet bekend (bleek later <10% te zijn).
- Vanwege het bloedingsrisico wil de verloskundige compatibele erythrocyteneenheden op voorraad hebben. Tegelijkertijd wil ook de neonatale intensive care compatibele eenheden voor het kind op voorraad hebben (zie tabel 1 voor transfusie-adviezen).
- De vraag is groter dan het aanbod en er is sprake van een logistieke uitdaging (zie tabel 2 voor beperkingen).
- Wat volgt is een intensief en complex samenspel tussen behandelaren, klinisch chemici en UTG-arts om tijdig de juiste eenheden voor beiden beschikbaar te hebben (zie tabel 3).

Tabel 1 Transfusie-adviezen moeder en kind

	Antistoffen	Advies
Moeder	Anti-Fy3 Anti-Wra	Kruis Fya, Fyb en Wra negatieve eenheden, tevens preventief C en K negatief en Parvo B19 getest
Kind (<32 weken)		Kruis Fya, Fyb en Wra negatieve eenheden, Parvo B19 getest én bestraald.

Tabel 2 Beperkingen bij het op voorraad houden/leveren van eenheden

De eenheden voor het kind zijn na bestralen maar 24 uur houdbaar. Te vroeg op voorraad leggen van deze eenheden betekent dat dit relatieve zeldzame product verloren kan gaan voor zowel moeder als kind.
Producten die voor moeder uitgeleverd worden aan het laboratorium, kunnen door Sanquin niet meer teruggenomen worden t.b.v. splitsen en bestralen voor het kind.

Tabel 3 Verloop

Patiënt wordt overgeplaatst. 2 getypteerde eenheden voor moeder komen mee vanuit ziekenhuis aldaar. De arts geeft aan minimaal 5 erythrocyten eenheden voor moeder te willen hebben en 1 voor het kind (fusua protocol). Dagdaart UTG arts geeft aan dat er nog 2 getypteerde eenheden voor moeder kunnen worden uitgeleverd aan ons. De volgende dag zal een 3 ^e eenheid voor moeder worden geleverd. Dat betekent dat er voor moeder pas een dag later 5 eenheden beschikbaar zijn. Omdat er ook voor het kind (dat nog geboren moet worden) eenheden ter beschikking moeten komen, vragen wij de UTG arts om na te gaan of in ieder geval één bestraalde Parvo geteste 0 RhD negatieve eenheid beschikbaar is om te splitsen. Dat betekent echter wel dat er voor moeder nog maar 4 eenheden beschikbaar zijn.
De UTG arts onderzoekt vervolgens of er meer donoren opgeroepen kunnen worden. Vanwege het ingaan van het weekend is dat echter complex. Het lukt om dezelfde vrijdagmiddag nog een donor op te roepen.
In het weekend hebben we uiteindelijk 6 compatibele eenheden beschikbaar voor moeder. Bij Sanquin ligt 1 eenheid voor het kind (in nog onbestraald). We hebben m.a.w. kruisaginstemmen wat de mogelijkheid om afvast te kruisen op ons eigen laboratorium. De kruisproeven in LISS zijn positief, echter negatief in de antigebruikelijke fase van de bovine albumine techniek. De UTG arts geeft aan dat die eenheid voor het kind binnen 1 uur gesplitst en bestraald ter beschikking kan zijn in ons ziekenhuis.
Afgesproken wordt dat de verloskundige contact met ons opneemt als ze de sectio starten. De NICU zal echter het bloed bij kind gaan toedienen. Voordat de zak uit Amsterdam komt, dient er overleg zijn tussen NICU, ons en UTG arts wat te doen met de eenheid voor het kind (splitsen in 4 porties, of 1 ped pack maken voor acute toedieningen en 3/4 bewaren voor eventuele wisseltransfusie).
Op zondagavond worden we gebeld door de verloskundige dat de sectio gestart wordt. De NICU wil dan 2x 70 ml preventief in huis hebben voor de prematuur baby. Dat lijkt ons wat ruim gezien gewicht van het kind (grote kans op verloop van het bestraalde product én minder beschikbaar voor een wisseltransfusie), dus op ons advies wordt er 1x 70 ml geleverd. Vier uur later echter krijgen we te horen dat de sectio wordt uitgesteld (moeder voelt weer meer beweging en ze hadden hun handen vol aan een nabloed bij een andere patiënt). In de nieuwe werkwEEK worden er door de UTG arts extra donoren opgeroepen.
Vijf dagen na de initiële opname wordt na een sectio een zoon geboren, met een goede start. Vanaf negen dagen na de initiële opname krijgt moeder in totaal 5 erythrocyteneenheden over een week, vanwege anemie. Haar zoon heeft geen tekenen van een hemolytische ziekte van de pasgeborene (Fyo-Fyb+) en ondanks prematuriteit uiteindelijk geen transfusie nodig.

Neonaat met bifasische hyperbilirubinemie

Casuïstiek Poster C03

Wim H.M. Vroemen¹; Yvonne M.C. Henskens¹; Erik A.M. Beckers²; Irene M.L.W. Körver-Keularts¹

¹ Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht Universitair Medisch Centrum+, Maastricht, Nederland

² Interne Geneeskunde - Hematologie, Maastricht Universitair Medisch Centrum+, Maastricht, Nederland

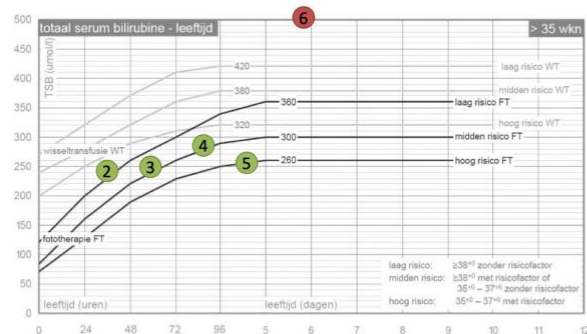
Achtergrond

Ongeveer 1% van alle neonaten maakt een icterus neonatorum door die interventie middels fototherapie (FT) of wisseltherapie (WT) vereist. Neonaten met hyperbilirubinemie boven de wisseltransfusiegrenzen lopen een hoog risico op mortaliteit (onomkeerbare neurologische schade) of morbiditeit. Adequate behandeling van een gezondheid bedreigende hyperbilirubinemie is daarom van cruciaal belang.

Beschrijving

Mevrouw A. (G3P2, 0pos) bevalt bij 38+6 weken van een zoon (3865 gram, Bpos). De neonaat heeft een goede start met een APGAR score van 8 en 8 na respectievelijk 1 en 5 minuten. Op dag 2 was de plasma bilirubineconcentratie 249 µmol/L bij een fototherapie (FT) interventiegrens van 230 µmol/L waardoor FT werd gestart. Na 24 uur kon FT bij neonaat E. worden gestaakt (bilirubineconcentratie 250 µmol/L, FT interventiegrens 293 µmol/L). De dagen daaropvolgend bleef de bilirubineconcentratie stabiel rond de 250 tot 280 µmol/L, zie figuur 1.

Bilirubine concentraties van neonaat E. op dag 2 t/m 6



Figuur 1. Hyperbilirubinemie interventiegrenzen (neonaten geboren >35 weken) voor fototherapie (FT) en wisseltransfusie (WT) naar risicoklasse en leeftijd, inclusief serum bilirubine datapunten van neonaat E. weergegeven in het groen en rood.

Risicofactoren: bloedgroepantagonisme (Rhesus, ABO en andere), G6PD-deficiëntie, asfyxie (APGAR score <5 na 5 min of navelstreng pH <7.0), lethargie (sufheid, slecht drinken), temperatuurstabiliteit (koorts >38.5°C of ondertemperatuur <36.0°C), klinische verdenking op sepsis, serum albumine <30 g/L.

Op dag 5 werd naast de bilirubineconcentratie uitgebreid lab geprikt zonder significante bevindingen. De hemoglobine (Hb) concentratie was 11.1 mmol/L (ref. waarden 9.0-11.0 mmol/L), CRP <1 mg/L (ref. waarden <10 mg/L) en in de leukocytendifferentiatie werd een lichte linksverschuiving gedetecteerd met tevens atypische lymfocyt, suspect reactief.

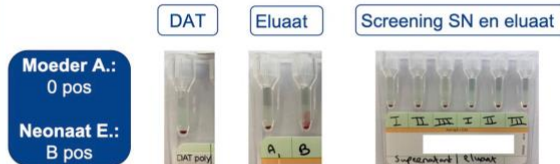
Op dag 6 werd bij neonaat E. een forse icterie vastgesteld bij een Hb van 9.5 mmol/L (daling 1.6 mmol/L binnen 24 uur) met bilirubineconcentratie 577 µmol/L (zie figuur 1) waardoor direct intensieve FT werd gestart. Ook werd een wisseltransfusie aangevraagd en serologisch laboratoriumdiagnostiek verricht. De directe antiglobulinetest was negatief maar het eluaat reageerde positief met B-erythrocyten wat duidde op een ABO-antagonisme, zie figuur 2. Moeder A. had zowel een hoge anti-B IgG (1:1024) als IgM titer (1:2048), zie figuur 3. De hoge titer is waarschijnlijk het gevolg van primaire immunisatie in een eerdere zwangerschap.

Referentie

Figuur 1 is afkomstig van de Richtlijn preventie, diagnostiek en behandeling van hyperbilirubinemie bij de pasgeborene, geboren na een zwangerschapsduur van meer dan 35 weken (KNV).



ABO antagonisme



Figuur 2. Resultaat van de directe antiglobulinetest (negatief), het eluaat (positief met B-erythrocyten) en screening van het supernatant (SN) en het eluaat (negatief).

Anti-B IgM en IgG titer bij moeder A.



Figuur 3. Anti-B IgM (1:2048) en IgG (1:1024) titer bij moeder A.

Ondanks een bewezen ABO-antagonisme werd er ook laboratoriumdiagnostiek ingezet naar erythrocytaire membraan- en enzymdefecten gezien de herkomst van de familie (Midden-Oosten). Neonaat E. bleek volledig glucose-6-fosfaat-dehydrogenase (G6PD) deficiënt te zijn (0.1 IU/gram Hb, ref. waarden 5.0-7.8 IU/gram Hb). Deze deficiëntie verklaarde de tweede (en plotselinge) bilirubine stijging.

Na behandeling van neonaat E. met zowel een WT (dag 6), intensieve FT (dag 6 t/m 9) gevolgd door reguliere FT (dag 9 t/m 15) werd de bilirubineconcentratie na 7 uren gecorrigeerd van 577 naar 311 µmol/L en daalde gestaag naar 72 µmol/L op dag 15, zie figuur 4.

Bilirubine verloop na wisseltransfusie en (intensieve) fototherapie



Figuur 4. Bilirubine concentraties (µmol/L) in de tijd voor en na wisseltransfusie en (intensieve) fototherapie.

Conclusie

Neonaat met een bifasische hyperbilirubinemie door ABO-antagonisme en G6PD-deficiëntie waarvoor behandeld met fototherapie en wisseltransfusie. Ondanks de hyperbilirubinemie ontwikkelde neonaat E. geen kernicterus.

Leerpunt casus: Bij persistente (of bifasische) hyperbilirubinemie ondanks aangetoond ABO-antagonisme is verder zoeken naar additionele oorzaken geïndiceerd.

Contact

Dr. Wim Vroemen, klinisch chemicus i.o.
Centraal Diagnostisch Laboratorium, Maastricht UMC+
E-mail: wim.vroemen@mumc.nl

Inleiding

De antigenen van het Rh bloedgroep systeem worden op de erythrocyten membraan in complex met het Rhag eiwit tot expressie gebracht. Afwezigheid van het Rhag eiwit zal ook afwezigheid van de Rh antigenen veroorzaken, resulterend in het zeer zeldzame Rh-null fenotype (regulator type). Bij dit Rh-null fenotype ontbreken alle Rh antigenen. Bij dit fenotype zijn er geen mutaties in de *RH* genen maar wel mutaties in het *RHAG* gen

Casus

In de 27^{ste} week van de zwangerschap wordt bij RhD negatieve vrouwen onderzoek verricht naar de foetale RhD genotypering van het nog ongeboort kind ten behoeve van de toediening van anti-D immuunprophylaxe. Bij een vrouw in haar eerste zwangerschap werd bij de RhD genotypering een positief signaal gevonden in een concentratie die niet past bij een kleine hoeveelheid foetaal DNA maar zeer waarschijnlijk afkomstig is van amplificatie van het DNA van moeder. Echter, moeder leek serologisch RhD negatief.



Fig 1. De Rh fenotypering van de patiënt met behulp van Biorad kolom methode laat de afwezigheid van de C, c, E en e antigenen.

Naast afwezigheid van het RhD antigeen werd ook de afwezigheid bevestigd van de andere Rh antigenen (CcEe) en het volledige RHAG eiwit op de erythrocyten van de patiënt.

Genotypering

Vervolgonderzoek met behulp van sequentieanalyse van het maternale *RHD* gen toonde geen mutaties. Vervolgens werd een sequentie analyse van het *RHAG* gen uitgevoerd bij deze patient. Er werd een homozygote mutatie in exon 1 aangetoond. Dit allel is reeds beschreven (c.157+1G>A, RHAG*1N.03). Deze mutatie zorgt ervoor dat het niet mogelijk is om het RHAG eiwit tot expressie te brengen.

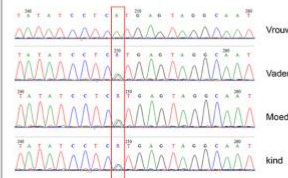


Fig 2. Resultaten van de Sanger sequentie. Bij de vrouw is de mutatie homozygoot aanwezig terwijl die bij haar beide ouders en haar kind heterozygoot aanwezig zijn.

NM_000324.2:c.157+1G>A

Genetisch onderzoek bij de ouders liet zien dat zij beide heterozygoot waren voor de RHAG variant.

Resultaten

De microscopische differentiatie liet een beeld van stomatocytten zien.

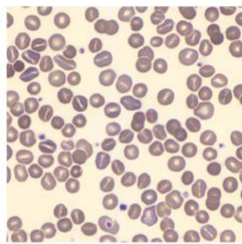


Fig 3. Lichtmicroscopie opname van het de vrouw na May-Grünwald-Giemsa kleuring. Een groot deel van de erythrocyten heeft de vorm van stomatocytten.

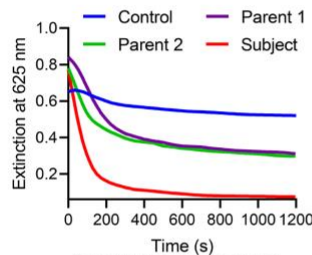


Fig 4. Resultaten van het rheologische analyse. De ouders (groen en paars) vertonen een vergelijkbare licht verlaagde osmotische resistentie terwijl de vrouw een duidelijk verlaagde resistentie laat zien.

Met behulp van rheologische analyse werd aangetoond dat de erythrocyten van de patiënt licht minder vervormbaar en osmotisch iets minder resistent waren. Bovendien was de expressie van membraaneiwitten op de buitenkant van de erythrocyten licht verminderd. De waarden voor erythrocyten van de ouders vielen op de ondergrens van het gezonde referentiegebied. Het ontbreken van klinische verschijnselen en de maar licht afwijkende uitslagen wijzen op een goede compensatie voor het ontbreken van het Rh/RHAG complex.

Vervolg en Conclusie

Inmiddels is de vrouw nogmaals zwanger geweest en opnieuw bevallen van een RhD positief kind. Bij het 12^e en 27^e week onderzoek waren geen antistoffen aantoonbaar. Tijdens beide zwangerschappen heeft de patiënt ante- en postnatale anti-D profylaxe ontvangen. De vrouw heeft aangegeven bloeddonor te willen worden. Haar eenheden zullen worden ingevroren in de ingevroren voorraad van Sanquin (SBFB).

Wij beschrijven hier de allereerste casus in Nederland met het zeer zeldzame Rh null fenotype.

Een patiënt met het Rh_{mod} fenotype veroorzaakt door twee nieuwe mutaties **Casuïstiek Poster C05**

Peter C. Ligthart¹, Matthieu C.J. Bosman², Marianne E. George¹, Jessica Vessies¹, Ignace H.J.T. de Hingh³, Marjan Cruijssen⁴, Barbera Veldhuisen¹, Claudia C. Folman¹

1 Expertisecentrum, Sanquin Diagnostiek Amsterdam, 2 Afdeling Klinische Chemie, Catharina Ziekenhuis Eindhoven, 3 Afdeling Oncologische-Chirurgie, Catharina Ziekenhuis Eindhoven, 4 Afdeling Hematologie, Catharina Ziekenhuis Eindhoven

Inleiding

Verzwakking van Rh antigenen kan ontstaan door mutaties in *RH* genen of door mutaties in het *RHAG* gen. Het *RHAG* eiwit is noodzakelijk voor een goede expressie van Rh. Afwezigheid van *RHAG* leidt tot het zogenaamde regulator Rh null fenotype. Een verminderde *RHAG* expressie leidt tot het Rh_{mod} fenotype waarbij alle Rh antigenen verzwakt tot expressie komen. Mutaties in de *RH* genen zelf leidt meestal tot een verzwakking van slechts één of enkele RH antigenen. Er zijn verschillende *RHAG* mutaties beschreven die een zwakke expressie van Rh veroorzaken. Deze zijn dan homozygoot of compound heterozygoot aanwezig. Van enkele mutaties is vastgesteld dat ze zelfs in heterozygote vorm verzwakking geven.

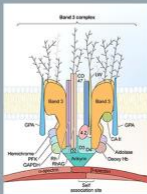


Fig 1. Schematische weergave van het RhD 3 complex met daarin onder andere het Rhag eiwit en de Rh eiwitten. Overgenomen uit: Manzoni Salomao et al. *PLoS* 2008;105:23.8028-8031

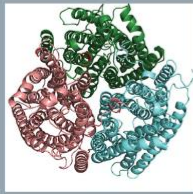


Fig 2. Hypothetische kristal structuur van het Rhag (groen) en twee Rh eiwitten (RHCE roze, RHD blauw). Overgenomen uit: *Translational Medicine*, Volume: 29, Issue: 2, Pages: 121-127. First published: 06 March 2018. DOI: 10.1111/tme.12519

Casus

Bij een vrouwelijke patiënt was verwijdering van een Pseudomyxoma Peritonei noodzakelijk.

Het pre-transfusie onderzoek toonde bloedgroep O, RhD 0,5/w+, Rhc 0,5/w+ en afwezigheid van het C, E en e antigeen.

Het antistofonderzoek toonde antistoffen tegen Kp^a zonder andere antistoffen.

Vervolgonderzoek bij het expertisecentrum van Sanquin bevestigde de zwakke typeringsresultaten. Bij de RhD antiegebepaling werden met verschillende testreagentia zwak positieve reacties gevonden en geen aanwijzingen voor epitooptverlies. Met de absorptie/elutie techniek werd wel een zwakke expressie van het E antigeen aangetoond. Met een monoclonaal anti-RHAG is een zwakke expressie van het RHAG antigeen aangetoond.

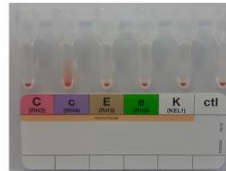


Fig 3. Resultaten van de Rh fenotypering bij de patiënt. Het c antigeen is zwak aantoonbaar. Het C, E en e antigeen zijn niet aantoonbaar.

RH genotypering

RH genotypering met de MLPA toonde 2 normale *RHD* allelen en *RHcE* allelen. Dit voorspelt een ccDEE (R2R2) fenotype. Sanger sequence van de 10 RH exonen toonde geen mutaties. Echter, in exon 2 van de 10 exonen van het *RHAG* gen, werden twee heterozygote mutaties gevonden (c.172C>T en c.242G>A) resulterend in de aminozuurveranderingen p.His58Tyr en p.Gly81Asp. Deze mutaties zijn niet eerder beschreven. Alle gevonden fragmenten bevatten slechts één van deze twee mutaties wat betekent dat de mutaties gelegen zijn op verschillende allelen.

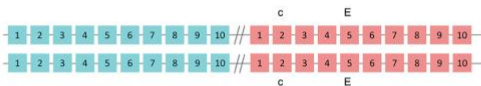
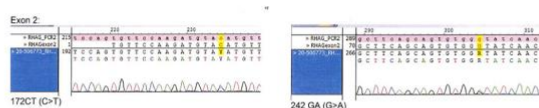


Fig 4. Overzicht van de RH allelen bij de patiënt op basis van de MLPA. Twee normale RHD allele (blauw) en twee normale RHcE allele (roze).



Op basis van het genetisch en serologisch onderzoek is de patiënt positief voor D, c en E en negatief voor C en e. De selectie van preventief Rh fenotype compatibel bloed in het kader van de aanwezigheid van een klinisch belangrijke anti-Kp(a) betekent in dit geval dat het geselecteerde bloed naast Kp(a) en preventief K negatief eveneens negatief dient te zijn voor C en e.

Familieonderzoek is gepland, om een eventueel effect van heterozygote aanwezigheid van de mutaties vast te stellen.

Conclusie

Wij beschrijven hier de eerste Nederlandse patiënt met het Rh_{mod} fenotype. De verminderde expressie wordt bij deze patiënt veroorzaakt door twee nog niet eerder beschreven mutaties in het *RHAG* gen

Een patiënt met allo antistoffen tegen het hoogfrequente antigeen JM H

Melanie Cuijpers¹, Jessica Vessies¹, Henriët Hendriks², Monique Albersen², Peter Ligthart¹, Barbera Veldhuisen¹, Claudia Folman¹

1 Expertisecentrum, Sanquin Diagnostiek Amsterdam,
2 OLVG Lab BV, Amsterdam

Casuïstiek Poster C06

Inleiding

Het JM H (John Milton Hagen) antigeen is een hoog frequent antigeen gelegen op het semaphorin 7A eiwit.

Anti-JM H wordt meestal gevonden bij personen met een transiente onderdrukking van het antigeen. Bij deze personen is de DAT zwak positief en is het JM H antigeen serologisch niet aantoonbaar. Bij deze personen zijn er geen mutaties in het SEMA7A gen aantoonbaar, en is er eigenlijk sprake van een auto anti-JM H.

Er bestaan ook JM H varianten, bij deze personen is er een mutatie in het SEMA7A gen aantoonbaar en zijn de antistoffen van de patiënt gericht tegen een ontbrekend epitooop van JM H antigeen. Antistoffen anti JM H vallen in de categorie HTLA antistoffen en zijn niet klinisch belangrijk.

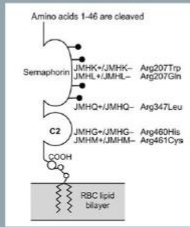


Fig. 1. Schematische weergave van het Semaphorin 7A eiwit met daarop aangegeven de verschillende hoog frequente antigenen. Overgenomen uit: Rost et al., Antigen facts book, 3rd edition

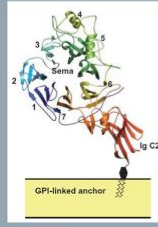


Fig. 2. Waarachtelijke kristalstructuur van het Semaphorin 7A eiwit, waarin te zien is dat het uit verschillende domeinen is opgebouwd. Overgenomen uit: Daniels, Human Blood Groups, 2nd edition

Casus

Bij een preoperatief onderzoek voor het plaatsen van een knieprothese werden bij de antistofscreening bij alle drie de screeningscellen een positief resultaat gevonden in de LISS kolom techniek.

Bij het vervolgonderzoek met het plasma bleek er een anti E aantoonbaar, daarnaast waren alle testerythrocyten een zwak reactief (zwak+ tot 1+), zowel in de PEG IAT als in de LISS kolom techniek. Het plasma van de patiënt was niet reactief met de eigen erythrocyten en ook de directe antiglobuline test was negatief. Het plasma was niet reactief met papaine behandelde erythrocyten in de kolom techniek, zowel in neutrale kolommen als in kolommen met anti IgG.

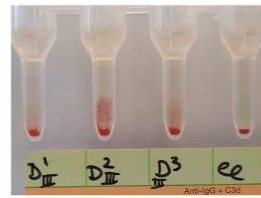


Fig. 3. Drie screeningscellen en autocontrole in de Biorad LISS kolomtechniek.

Vanwege de zwak positieve reacties is er onderzoek verricht of de aangetoonde antistoffen een HTLA-karakter hebben. Hierbij bleek dat er sprake was van een doorlopende titer. Er was geen versterking te zien met sucrose behandelde testerythrocyten wat de mogelijkheid van anti Ch/Rg uitsluit.

Serologisch vervolg onderzoek

Onderzoek met verschillende enzymen en solibele eiwitten wees in de richting van antistoffen gericht tegen een antigeen op het eiwit dat de antigenen van het JM H-systeem draagt.

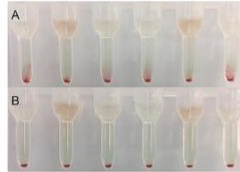


Fig. 4. A. Uitlut paneel zonder toevoeging van solibele eiwitten. B. Uitlut paneel met toevoeging van solibele eiwitten.

Twee verschillende anti JM H sera waren reactief met de erythrocyten van de patiënt, wat een transiente verlaagde expressie van het JM H antigeen bij de patiënt onwaarschijnlijk maakt. Deze sera zijn gericht tegen het gehele JM H antigeen.

Reagens	Patiënt	Positieve controle	Negatieve controle
Anti-JM H	+	+/(+)	-
Anti-JM H	2+	+/(+)	-
AB serum	-		

Tabel 1. Serologische JM H typering van de patiënt. Er is duidelijk geen sprake van verzwakking van het JM H antigeen bij de patiënt.

Genetisch vervolg onderzoek

Genotypering van deze patiënt laat een homozygote mutatie zien in exon 14 van het SEMA7A gen, (1865G>A). Deze mutatie is eerder aangetoond door Vrignaud et al (abstract ISBT 2019 Basel) in het allel JM H*01.-07. Anti JM H antistoffen gevormd bij JM H varianten zijn vrijwel nooit klinisch belangrijk echter een enkele transfusie reactie is beschreven.

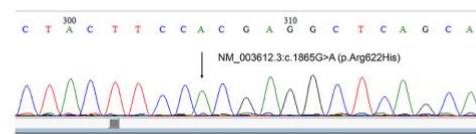


Fig. 5. SEMA7A exon 14 Variant c.1865G>A (p.Arg622His) homozygoot aanwezig

Conclusie

Wij beschrijven hier de eerst patiënt in Nederland met deze betreffende JM H variant en allo anti JM H antistoffen.

Zeven patiënten met een antistof tegen hetzelfde nieuwe hoogfrequente antigeen RIF

José van der Mark¹, Peter Ligthart¹, Ilona Comijs¹, Barbera Veldhuisen^{1,2},
Leendert Porcelijn¹, Nicole Thornton³, Ellen van der Schoot^{1,2}, Claudia Folman¹,
Masja de Haas^{1,2}

Casuïstiek Poster C07

1 Sanquin Immunohematologie diagnostiek, 2 Sanquin Immunohematologie research,
3 International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL) NHS, Bristol

Inleiding

Bloedgroepantigenen die met een hoge frequentie in de bevolkingspopulatie voorkomen worden aangegeven als HFA, Hoog Frequente Antigenen. De frequentie van het allel dat codeert voor zo'n HFA is in sommige gevallen hoger dan 99%. Slechts enkele individuen in de populatie zijn dan negatief voor het betreffende HFA bloedgroepantigeen. De frequentie van een HFA kan per bevolkingspopulatie variëren. Antistoffen tegen een HFA kunnen voor grote problemen zorgen. Het vinden van een donor die juist dat ene HFA mist is erg moeilijk.

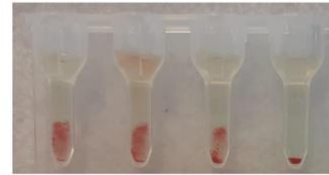
Gelukkig is dergelijk zeldzaam bloed vaak beschikbaar via de SBFB (Sanquin Bloodbank of Frozen Blood) Nog moeilijker is het wanneer de antistoffen gericht zijn tegen een HFA die nog niet genetisch bekend is.

	ABO	PEG IAT	LISS kolom	Brom	Pap-LISS	AET	MAIEA	Enzym	ADCC
1	O	2+	2+	(+)	1+	2+	neg	R	<10%
2	O	2+	2+	1+	2+	2+	nt	R	<10%
3	A	3+	2+	2+	2+	3+	neg	R	<10%
4	B	2+	2+	1+	2+	2+	neg	R	<10%
5	B	2+	2+	(+)	1+	2+	neg	R	<10%
6	B	2+	2+	(+)	2+	2+	nt	R	nt
7	B	2+	2+	1+	2+	2+	nt	R	<10%

Tabel 1. Overzicht van de verschillende patiënten en de reactiviteit van de antistoffen in verschillende technieken. Brom = buisjes techniek met bromine behandelde testerythrocyten. Pap-LISS = LISS kolom techniek met papaine behandelde testerythrocyten. AET = PEG IAT, MAIEA, Enzym

Casus

In 1995 werd bij een patiënte tijdens een antistofonderzoek een antistof tegen een hoogfrequent antigeen aangetoond. Ondanks een uitgebreid serologisch en genetisch onderzoek bij Sanquin en het IBGRL kon de specificiteit van de antistoffen niet vastgesteld worden.



Verscheidene jaren later werden vergelijkbare resultaten gevonden bij patiënten ingestuurd in verband met zwangerschap onderzoek. Ook nu kon de specificiteit niet worden vastgesteld. Het serum van deze patiënten was reactief met alle testerythrocyten behalve met de erythrocyten van de patiënte zelf. Bovendien waren al deze patiënten serologisch compatibel met elkaar. Daardoor ontstond de gedachte dat de antistoffen van deze vrouwen tegen hetzelfde antigeen gericht zouden zijn.

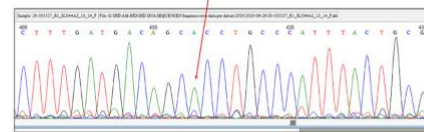
Het viel ook op dat al deze vrouwen van Marokkaanse afkomst zijn en door transfusie of zwangerschap antistoffen hebben gevormd. Er is geen informatie over een mogelijk HZFP of transfusiereactie. Na het ontdekken heeft geen incompatibele transfusie plaats gevonden. Het klinisch belang van de antistoffen is daardoor onbekend. Inmiddels hebben een aantal van deze vrouwen bloed afgestaan voor de ingevroren voorraad van Sanquin (SBFB).

Genotypering

In 2019 publiceerde een Franse groep onderzoekers (Vrignaud et al) een groep patiënten met een nieuwe antistof tegen een hoogfrequent antigeen gelegen op een eiwit waarvan nog niet bekend was dat het op erythrocyten tot expressie kwam. Het eiwit wordt gecodeerd door het *CLT2* (*SLC44A2*) gen, dat ook codeert voor het HNA3 antigeen op granulocyten. De antistof van deze patiënt is ook reactief met granulocyten. Bij deze patiënten was er sprake van een homozygote mutatie in het *CLT2* gen (exon 14, 1192C>A).

Bij alle zeven patiënten in onze serie bleek de door de Franse groep beschreven mutatie (1192C>A) ook homozygoot aanwezig te zijn. Daarnaast was het serum van één van deze patiënten ook reactief met granulocyten in de granulocyten immunofluorescentie test.

Al deze patiënten zijn negatief voor het hoogfrequente antigeen RIF en de gevormde antistoffen hebben de specificiteit anti RIF hebben.



De ISBT working party on red blood cell nomenclature heeft het antigeen en systeem erkend en een nummer gegeven als nieuw antigeen en bloedgroep systeem. Het systeem heeft de naam *CLT2* (systeem nr 39) en het betreffende antigeen de naam RIF (nr 039002).

Conclusie

Wij beschrijven hier de ontdekking van een nieuw HFA antigeen vernoemd naar het Rifgebergte in Marokko, het geboorteland van alle patiënten waarbij de antistoffen zijn aangetoond en de mutatie homozygoot aanwezig is.



Achtergrond

Bij complexe en/of onverwachte serologische bevindingen kan het nodig zijn genetisch onderzoek te verrichten naar bloedgroepvarianten om vast te stellen of er sprake is van allo- of autoantistoffen en/of om het risico op immunisatie tegen ontbrekende bloedgroepepitopen in te schatten en een passend transfusieadvies te geven. Met enige regelmaat wordt hierbij varianten ontdekt die nog niet eerder zijn beschreven.

Casus :

Bij een regulier 12^e weeks PSIE onderzoek wordt een positieve antistofscreening in de Biorad-LISS kolomtechniek gevonden.

	C	E	c	e
Buisjes methode 1	1+	4+	4+	1+
Buisjes methode 2	1+	4+	4+	4+
Biorad kolom	1+	4+	4+	4+

Tabel 1 : Rh fenotypering patiënte

Type	Nr	Versad datum	Lot nummer	Big	D	C	E	c	e	f	Ok	K	k	h	s	S	B	z	b	J	Jk	M	N	S	s	Le	La	P1	Destige antigenen	SST	
11 oets	2	28-12-2020	45241.46 y	O	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W+
11 oets	6	28-12-2020	45241.46 y	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2+
6 Plus	16	09-02-2021	45670.17 x	O	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
profkase	4	25-01-2021	45860.27 g	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 kolom	2	21-12-2020	8550.10 z	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 oets (stalen)	12	14-01-2021	8-452195	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
auto controle	1	01-01-2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fig 1 : Identificatiepanel irregulaire antistoffen

Serologische bevindingen :

Bij een zwangere dame worden antistoffen tegen het Rhe antigeen aangetoond. De erythrocyten van de vrouw zelf waren niet reactief met de antistoffen. De zwakke reacties bij het bepalen van het C antigeen kunnen wijzen op verminderde expressie. De wisselende reacties (1+ en 4+) bij het e antigeen in combinatie met antistoffen anti-e wijzen meer op een variant e-antigeen. Om dit vast te stellen is genetisch vervolgonderzoek ingezet.

RHCE genotypering :

Met de MLPA en de Sanger Sequence methode is in exon 4 van het *RHCE* gen een mutatie gevonden. Op genpositie 497 was een adenine vervangen door een guanine nucleotide (497A>G). Als gevolg hiervan wordt op positie 166 van het Ce-eiwit, histidine vervisseld met arginine (p.His166Arg). De verminderde expressie van de C en e antigenen zoals gevonden bij de fenotypering is hierdoor te verklaren. Het C-antigeen is verzwakt en mogelijk ook variant; het e-antigeen is variant.

Een vergelijkbare mutatie is eerder beschreven waarbij ook op positie 166 van het RhCE-eiwit een aminozuur substitutie plaatsvindt van histidine naar leucine (p.His166Leu). Bij desbetreffende fenotype is alleen een verzwakking waargenomen van het C-antigeen; hierbij was er co-expressie van een normaal ce-alleel wat resulteerde in een normaal e-antigeen.

Bij de vrouw uit deze casus is sprake van co-expressie met een normaal E-antigeen coderend alleel. Het ontstane e-antigeen is een product van het gemuteerde alleel.

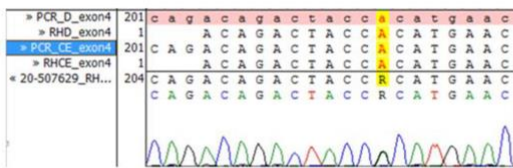


Fig 2 : Sanger Sequence Exon 4 RHCE gen van de patiënt met daar op nt 497. Normala zal daar een A aanwezig (groene piek) zijn maar bij de patiënt is er een A en een G (groene en zwarte piek over elkaar).

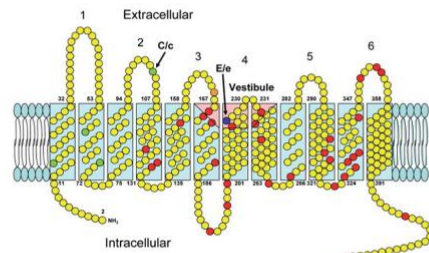


Fig 3 : Morfologie van het RhCe eiwit waarbij ieder bolletje een aminozuur is. Ondanks dat de nieuwe mutatie niet dicht bij het de mutatie voor C (groene bolletjes) en e (blauwe bolletje) zit, is te zien dat in de gevouwen vorm van het eiwit het veranderde aminozuur (oranje bolletje op positie 166) zich dichtbij de locatie van het e antigeen bevindt en dat loop 3 wel degelijk van invloed kan zijn op de expressie van het C antigeen op loop 2.

Conclusie

Er is bij een zwangere een nieuwe variant e-antigeen gevonden in combinatie met allo antistoffen anti-e. Het C-antigeen is mogelijk ook variant. Voor deze patiënte geldt daarom dat zij voor zowel het C- als e-antigeen als negatief beschouwd moet worden. De partner is homozygoot voor het e-antigeen; om deze reden zullen de antistoffen voor de duur van de zwangerschap vervolgd worden voor een titer en ADCC test om het risico op hemolytische ziekte bij de foetus of pasgeborene in te schatten.

Auto- of alloantistoffen? Een decennium tussen detectie en classificatie van AnWj-antistoffen en het klinisch belang voor transfusie.

Niegel B.N. Gijsbertha¹, Peter C. Ligthart¹, Arjen Albersen², Claudia C. Folman¹

1 Expertisecentrum Immunohematologie, Sanquin Diagnostiek

2 LUMC, Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

Achtergrond

Het AnWj-antigeen is een hoog frequent antigeen waarvan de genetische basis alsmede het bijbehorende bloedgroepsysteem niet bekend is. Bij patiënten met antistoffen tegen AnWj is vrijwel altijd sprake van onderdrukking van het eigen AnWj antigeen waardoor serologisch het onderscheid tussen allo- en autoantistoffen niet altijd eenduidig is. In geval van een transfusie bij dergelijke antistoffen wordt doorgaans gekozen voor AnWj negatieve eenheden, of eenheden waarvan de erythrocyten het AnWj antigeen verzwakt tot expressie brengen zoals in het geval van het In(Lu)-fenotype.

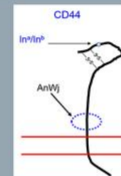


Fig 1: Schematische weergave CD44 met de vermoedelijke locatie van het AnWj-antigeen

Casus :

Casuïstiek Poster C09

Bij een regulier 12^e weeks PSIE onderzoek wordt een positieve antistofscreening in de Biorad-LISS kolomtechniek gevonden.



Fig 2: Panreactief LISS-panel

Serologische bevindingen :

In de identificatie panel met behulp van de Biorad LISS kolomtechniek, alsmede de PEG-IAT reageren alle testcellen positief, met uitzondering van de de eigen erythrocyten.

Met behulp van met enzym, AET en DTT behandelde testerythrocyten zijn specifieke bloedgroepen verwijderd en is aan de hand van het reactiepatroon gekeken naar mogelijke bloedgroepen waartegen de antistoffen gericht zouden kunnen zijn.

Identificatie en antigeentypering :

Na het inzetten van een panel van cellen negatief voor Hoog Frequente Antigenen bleken de antistoffen gericht te zijn tegen het AnWj-antigeen. Op de erythrocyten van de patiënte zelf was het AnWj-antigeen niet aantoonbaar.

Kenmerkend voor AnWj-antistoffen is de onderdrukking van het AnWj-antigeen op de erythrocyten van de patiënt; waardoor deze niet aanwezig lijkt te zijn is. Het eluaat was bij deze patiënte dan ook negatief. Echter is niet uitgesloten dat hier geen sprake zou zijn van auto antistoffen anti-AnWj.

Btg	D	C	E	c	a	f	Ow	K	k	a	b	a	b	a	b	a	b	M	N	S	s	a	b	P1	Overige antigenen	SST
B	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	AnWj-publ.	-
O	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Ira-publ.	1+
O	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	U variant-publ.	1+
O	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Chromer null JFC-publ.	1+
B	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Ge-2,Ge-3,Ge4+publ.	1+
O	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Ena-publ.	1+
O	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Wrb-publ.	1+

Fig 3: Identificatiepanel met erythrocyten negatief voor Hoog Frequente Antigenen

Transfusie beleid

Transfusie advies :

Het streven is om in tegenstelling tot het beleid bij auto antistoffen in het algemeen om bij (auto-) AnWj antistoffen eenheden te selecteren met een zo laag mogelijke expressie van het AnWj-antigeen. Dit in verband met milde tot ernstige transfusie reacties bij AnWj-incompatibele transfusies.

In verband met de zeer beperkte beschikbaarheid van AnWj-negatieve donoren kan ook gekozen worden om eenheden toe te dienen met het In(Lu) fenotype, welke een verlaagde expressie van het AnWj-antigeen hebben.



Auto- of allo antistoffen?

10 jaar later.....

Meer dan een decennium later kwam de patiënte opnieuw in het ziekenhuis. In het serum bleken geen antistoffen meer aantoonbaar en het AnWj-antigeen werd met twee verschillende antisera positief bevonden. Hierdoor konden de in het verleden aangetoonde antistoffen gecategoriseerd worden als auto antistoffen, gecombineerd met onderdrukking van het eigen AnWj antigeen destijds.

Alle "goede" dingen bestaan in drieën: een zwangere met een anti-Co(a), anti-C en anti-K

Irene MLW Körver-Keularts¹, Audrey B.C. Coumans², Audrey M.C. Peters¹, A.S. Streng¹, J.J.B.C. van Beers¹, J.A. van Balveren³, E. Rombout-Sestrienkova^{4,5}, Astrid M.P. Demandt⁵, Yvonne M.C. Henskens¹, Erik A.M. Beckers⁵.

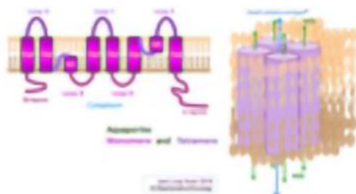
1. Transfusielaboratorium CDL, MUMC+, Maastricht, 2. Gynaecologie, MUMC+, Maastricht 3. Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch, 4. Sanquin, Amsterdam, 5. Interne Geneeskunde, MUMC+, Maastricht. Email: Irene.keularts@mumc.nl

Achtergrond

- 34-jarige zwangere vrouw, G1P0, met bloedgroep Apos (DccEe, Kneg) is bekend met anti-K en anti-C
- Bij een zwangerschapsduur van 19+4 wkn wordt ook een anti-Co(a) gevonden door Sanquin.
- Voorgeschiedenis vermeldt een verkeerstrauma waarvoor uitgebreide operaties (en waarschijnlijk transfusies in VS).
- Mevrouw is zelf Co(a) negatief; vader en kind blijken K-negatief maar C (vader is CC) en Co(a) positief te zijn.

Colton bloedgroepen systeem

- Colton antigeen gelokaliseerd op aquaporine-1 (AQP1), een waterkanaal-vormend eiwit; betreft multipass membraan glycoproteïne;
- 80% van water reabsorptie in nier en bepaalt ook vasculaire permeabiliteit in de long.
- Co(a) positief is 99.5% (HFA) met Co(a+b-) 90%; Co(a-b+) 0.5%; Co(a+b+) 9.5%; Co(a-b-) < 0.01
- Co komt tot expressie op navelstrengerythrocyten.
- Colton antilichamen (anti-Co(a)) leiden tot:
 - *Transfusiereactie: geen tot milde/vertraagde transfusiereactie (ook wel snel en hemolytisch)¹*
 - *HDFN is mild tot ernstig (zeldzaam)²*



Colton (Co(a)) op aquaporine

Behandel- en opvolgbeleid tijdens zwangerschap

- Transfusiebeleid rond de partus voor moeder en kind is Co(a)-, C- en K-negatief bloed.
- Autologe donatie of donatie van een familielid zijn niet haalbaar.
- Bij 26 wkn wordt gestart met ijzersuppletie (geen EPO) bij Hb 7.1 mM, ferritine 25 ug/l, vitamine B12/folaat ruim normaal.
- De anti-C en anti-Co(a) worden tijdens de zwangerschap intensief gemonitord met ADCC's en titerbepalingen (tabel 1).
- De Vmax in de A. cerebri media blijft de gehele periode < 1.5 MoM; een ernstige foetale anemie is uitgesloten.

Walking donor

- In afstemming met Sanquin is vanaf 4 weken voor de partus een "walking donor" oproepbaar die Co(a) negatief is – rond de partus liggen 2 Co(a) negatieve ECs klaar.
- Bij fluxus kunnen additionele eenheden besteld worden: 2-3 eenheden zijn beschikbaar uit Sanquin Bank of Frozen Blood (SBFB); ontdooi en transporttijd 4-6 uur).

Klinisch beloop

- Eind november (38 wkn) wordt met een primaire sectio een gezonde zoon geboren.
- Mevrouw verliest nauwelijks bloed (prepartum Hb 8.1 mM; postpartum 7.6 mM).
- Baby heeft een goede start (Apgar scores 9 en 10) en geboortegewicht van 3265 gram (p50) met Hb van 9.7 en navelstreng bilirubine 52 umol/l (navelstreng).
- Zijn DAT is 3+ (IgG 4+) met eluaat anti-C; *Co(a) antistoffen zijn niet aantoonbaar in het eluaat.*
- Transfusiebeleid kind: Co(a)-, C- en K-negatieve producten maar indien beschikbaar, volstaan C- en K-negatieve pediatrische eenheden.
- Neonaat maakt postnataal een ernstige hemolyse met hyperbilirubinemie (max 250 umol/l) door op basis van anti-C waarvoor succesvolle behandeling met fototherapie zonder bloedtransfusies.

Conclusie

- Een zwangere met een anti-C,-K en -Co(a) bevalt van een gezonde, C- en Co(a) positieve zoon. Hyperbilirubinemie wordt succesvol behandeld met fototherapie.
- Bloedproducten waren beschikbaar middels een "walking donor" en SBFB.
- Uiteindelijk is moeder noch zoon transfusiebehoefstig en beiden gaan na 2 weken met ontslag.
- Het kind wordt conform landelijk protocol opgevolgd w.b. Hb en reticulocyten t/m leeftijd van 3 maanden.

Tabel 1. Verloop van ADCC titering basis van anti-C en anti-Co(a)

Wk	Anti-C titer	Anti-Co(a) titer
19+4	1:1000	1:1000
20+0	1:1000	1:1000
21+0	1:1000	1:1000
22+0	1:1000	1:1000
23+0	1:1000	1:1000
24+0	1:1000	1:1000
25+0	1:1000	1:1000
26+0	1:1000	1:1000
27+0	1:1000	1:1000
28+0	1:1000	1:1000
29+0	1:1000	1:1000
30+0	1:1000	1:1000
31+0	1:1000	1:1000
32+0	1:1000	1:1000
33+0	1:1000	1:1000
34+0	1:1000	1:1000
35+0	1:1000	1:1000
36+0	1:1000	1:1000
37+0	1:1000	1:1000
38+0	1:1000	1:1000

Introduction

Coronavirus Disease 19 (COVID-19), caused by infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), can be associated with changes in platelet count. Thrombocytopenia has been reported in up to 40% of COVID-19 infections and is an important marker for morbidity and mortality. Hence, monitoring of platelet counts is important for diagnosis and treatment of COVID-19 patients. Thrombocytopenia can be a result of the COVID-19 infection itself (septicaemia), diffuse intravascular coagulation (DIC), medication or COVID-19 associated immune thrombocytopenic purpura (ITP). A rare and often missed alternative explanation of thrombocytopenia is pseudothrombocytopenia.

Case Report

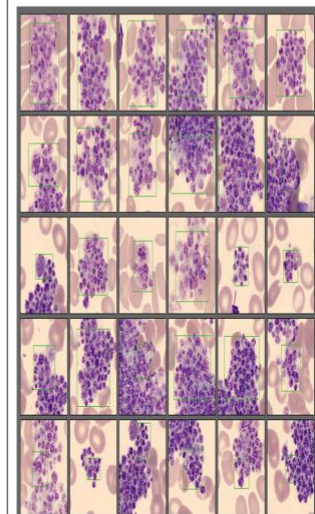
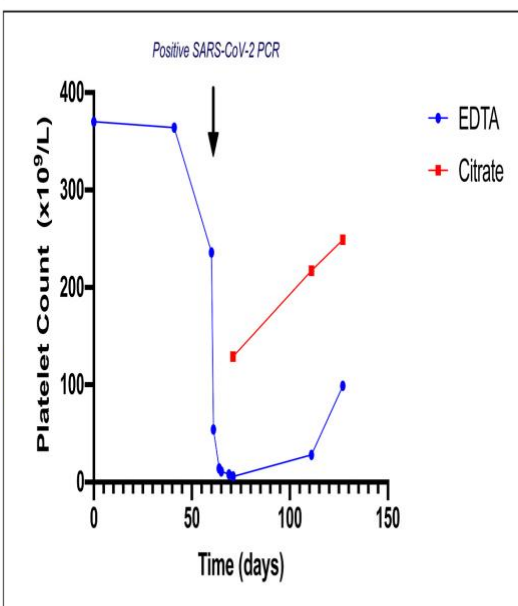
We present the case of a 54-year-old woman with a history of sarcoidosis, treated with prednisolone and methotrexate. She previously had a stable normocytic anaemia and normal platelet counts.

Ten days after onset of respiratory symptoms, she was diagnosed with bilateral COVID-19 pneumonia with positive SARS-CoV-2 PCR. Treatment included dexamethasone, ceftriaxone, ciprofloxacin and prophylactic high-molecular weight heparin. Blood count on day of diagnosis showed haemoglobin 9.9 g/dL, normal leukocyte $7.0 \times 10^9/L$ and platelet $236 \times 10^9/L$ counts.

She developed a progressive thrombocytopenia to a nadir platelet count of $6 \times 10^9/L$ on day 10 after diagnosis. We excluded TMA, DIC and HIT. HIV-serology was negative. Methotrexate was discontinued postulating a possible causal relationship. There were no signs of bleeding or thrombosis.

Results

Evolution of platelet counts in EDTA and citrate confirming diagnosis of pseudothrombocytopenia and showing spontaneous recovery together with SARS-CoV-2 seroconversion and clinical recovery.



Platelet agglutination in EDTA shown with CellaVision (DM96) microscope, original magnification $\times 100$, confirming the diagnosis of pseudothrombocytopenia.

Summary and Conclusion

Consider pseudothrombocytopenia in your differential diagnosis of COVID-19 related thrombocytopenia.

Thrombocytopenia is a known prognostic marker in COVID-19.

Pseudothrombocytopenia is self-limiting and has no therapeutic consequences. Early recognition prevents mistreatment.

Discussion

Pseudothrombocytopenia is an in vitro phenomenon of platelet agglutination caused by an anticoagulant, usually ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) used for routine blood sample collections, resulting in a falsely lowered automated platelet count. It has previously been reported to be associated with auto-immune diseases and infections.

Cryptic epitopes of the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa may become exposed by EDTA and form immune complexes with SARS-CoV-2 IgM antibodies. To test this, we incubated patient serum with EDTA-blood of a universal donor, but this did not induce platelet agglutination. Taken together, this may suggest that the generation of cryptic epitopes is patient-specific.

Een RhD positieve zwangere met anti D en een nieuwe RhD variant.

Niegel Gijsbertha¹, Jessica Vessies¹, Minke de Weert², Nel Som², Barbera Veldhuisen¹, Peter Ligthart¹, Claudia Folman¹

¹ Expertisecentrum Immunohematologie, Sanquin Diagnostiek
² Bloedtransfusiedienst, Amsterdam UMC, Locatie VUmc

Achtergrond

Bij complexe en/of onverwachte serologische bevindingen kan het nodig zijn genetisch onderzoek te verrichten naar bloedgroepvarianten om vast te stellen of er sprake is van allo- of autoantistoffen en/of om het risico op immunisatie tegen ontbrekende bloedgroep-epitopen in te schatten en een passend transfusieadvies te geven. Met enige regelmaat wordt hierbij varianten ontdekt die nog niet eerder zijn beschreven.

Casus Posters C12

Casus : Bij een zwangere wordt in de 30^{ste} week een antistofscreening verricht en worden in de Biorad-LISS kolomtechniek positieve reacties gevonden.

Serologische bevindingen :

Bij een zwangere dame waarbij in de 12^e week van de eerste zwangerschap geen antistoffen aantoonbaar waren en die RhD en Rhc positief bepaald is, wordt in de 30^e week van de zwangerschap vanwege een mogelijke premature bevalling de antistofscreening verricht en zwak positief gevonden. Bij de erop volgende antistof identificatie werd een zwakke anti-D aangetoond die voornamelijk reageert met papaine behandelde testerytrocyten in de kolom techniek.

epitooop	anti-D	II	III	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	R ₂ H ²	DNB	DAR	zwak D	patiënt	
6/7d	FLO53	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	4

epitooop	anti-D	II	III	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	R ₂ H ²	DNB	DAR	zwak D	patiënt	
1	LHM 70	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
2	SC2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
3	LHM 7655	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
5	HIRO-6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
6/7	LOS1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
6/7	D507	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
8	HMA-36	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-(+)	(+)	4
9	HIRO-6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
	RDB	-	-	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
	LOS2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2	2+	3
anti-D	H2G1168 (28W11)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	4

Fig 2 : Epitopenonderzoek RhD-antigeen

De antistoffen anti D waren niet reactief met de erythrocyten van de vrouw en met erythrocyten met het DIII fenotype, ook niet na papaine behandeling van de erythrocyten. Dit geeft aan dat de door de patient gevormde anti D antistoffen allo antistoffen zijn en gericht zijn tegen een epitooop dat bij de patient en bij de variant DIIIa ontbreekt.

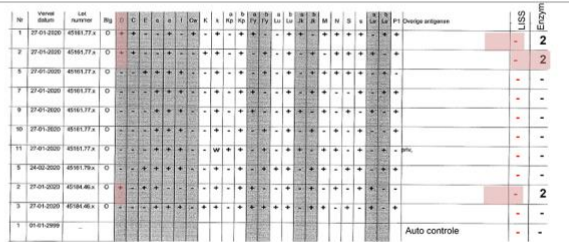


Fig 1 : Identificatiepanel anti-D

RhD epitopenonderzoek :

Om vast te stellen of de zwangere dame een variant RhD antigeen heeft zijn zes commerciële anti-D reagentia gericht tegen verschillende RhD epitopen (2, 6/7 en 9) getest. Alle reagentia gaven een sterk positieve reactie (4+). Ook van een RhD epitopen kit waren alle 12 reagentia sterk positief (4+). Deze resultaten zijn o.a. passend bij een RhD variant DIII.

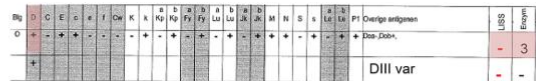


Fig 3 : Reactiviteit patiëntserum met een testerytrocyt met de RhD variant DIIIa

RHD genotypering :

Genotypering met behulp van de MLPA toonde slechts één *RHD* allel met daarin mutaties aan passend bij een *RHD* variant DIII. Met behulp van Sanger sequencing werd een variant *RHD* allel aangetoond dat alle mutaties bevat van een DIIIa allel en nog 2 extra mutaties in exon 9. De puntmutatie op positie 1170 (T>C) binnen exon 9 is een stille mutatie en leidt niet tot aminozuurverandering. Daarentegen veroorzaakt de puntmutatie op positie 1193 (A>T) wel een aminozuursubstitutie (Glu398Val). Deze combinatie van mutaties is een nog nooit beschreven combinatie en er is dus sprake van een nieuwe variant RhD III, type 10.

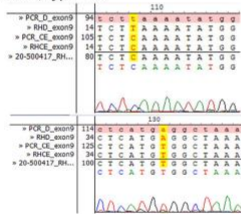


Fig 4 : Sanger Sequence Exon 9

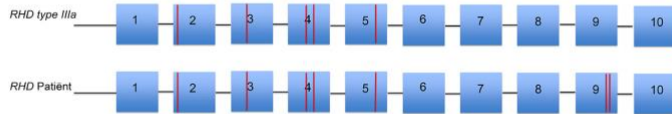


Fig 5 : *RHD* allel van de patient vergeleken met het *RHD* allel van een DIIIa variant. In exon 9 zijn twee extra mutaties aantoonbaar.

Implicaties voor de zwangerschap

De antistoffen anti-D zijn zwak reactief en zullen daarom zeer waarschijnlijk geen HZFP veroorzaken. Wel is geadviseerd om zowel ante-als postnatale anti-D toe te dienen om een verdere literstijging te voorkomen. In geval van een bloedtransfusie rondom de partus moet mevrouw beschouwd worden als RhD negatief en RhD negatief bloed krijgen.

Conclusie

Wij beschrijven hier een nieuw *RHD* variant allel die verwant is aan de variant DIII, waarbij de patiënt allo antistoffen anti D heeft gevormd die gericht zijn tegen een epitooop dat ontbreekt bij deze RhD variant.