

## Examens

### Hematologie 1995

#### Vraag 1

Geef bij de volgende uitslagen commentaar wat betreft uw initieel handelen en het al dan niet acuut doorbellen van de uitslagen naar de aanvragend arts. Geef een korte toelichting op uw besluit.

- Meisje van 5 jaar, door de huisarts naar uw laboratorium gestuurd. Trombocyten  $11 \times 10^9/l$  met een overigens normaal hemoglobine en normaal aantal leucocyten.
- Man van 71 jaar, onder behandeling bij de internist. M-component (paraproteïne) van 26 g/l, hemoglobine 7,6 mmol/l, normaal aantal trombocyten en leucocyten.
- Vrouw van 36 jaar, patiënte van een huisarts. Bloedingstijd van 7,5 min, normaal aantal trombocyten.
- Jongen van 15 jaar, verwezen door de huisarts. Leucocyten  $43 \times 10^9/l$ , hemoglobine 6,9 mmol/l, trombocyten  $119 \times 10^9/l$ .
- Vrouw van 51 jaar, ingestuurd door de huisarts. Hemoglobine 6,1 mmol/l, normaal aantal trombocyten en leucocyten, hemolytisch serum met verhoogde waarden voor LD en bilirubine.

#### Antwoorden vraag 1

- Als een door EDTA-geïnduceerde pseudotrombocytopenie is uitgesloten, moet deze uitslag acuut worden doorgebeld. Dergelijk lage trombocytengetallen kunnen spontane bloedingen veroorzaken met klinisch ernstige gevolgen. Zelfs de functie van de nog aanwezige trombocyten kan gestoord zijn door eventueel aanwezige trombocyten-antistoffen.
- Doorbellen is niet direct noodzakelijk. Van een dergelijke paraproteïnemie zijn op korte termijn geen grote problemen te verwachten. Een eventuele uitzondering vormt het IgM paraproteïne dat aanleiding kan geven tot het hyperviscositeitsyndroom.
- Deze uitslag hoeft niet acuut doorgebeld te worden. De bloedingstijd is een matig sensitieve en matig specifieke test. Eventueel aspirinegebruik kan dergelijke uitslagen al veroorzaken. Het is overigens wijs beleid, de bloedingstijd alleen op strikte indicatie uit te voeren.
- Uitslag moet acuut worden doorgebeld. Dergelijke leucocytenuitslagen kunnen zeer wel passen bij een acute leukemie. Acute leukemieën kunnen op korte termijn ernstige klinische gevolgen hebben.
- Uitslag acuut doorbellen. Er lijkt sprake te zijn van hemolyse, mogelijk intravasaal (hemolytisch serum). Dit kan ernstige klinische gevolgen hebben.

#### Vraag 2

Op de afdeling interne geneeskunde is een 28 jarige vrouw opgenomen wegens een longembolie. In de anamnese geen uitlokkende momenten; wel heeft haar moeder op 50- jarige leeftijd mogelijk een trombosebeen gehad. De behandelend arts veronderstelt dat er sprake kan zijn van een hereditaire trombofilie. Er wordt gestart met heparine i.v. en orale antistolling.

- Welke stollingsonderzoeken acht u het meest geschikt en op welke tijdstippen, om de dosering van heparine cq. coumarine te controleren? S.v.p. korte toelichting.
- Sommige firma's adviseren een D-dimeertest als screening voor longembolie of diep veneuze trombose (DVT). Wat zijn D-dimeren en wat is de betekenis van een verhoogde waarde?
- In uw ziekenhuis wordt al enige jaren dezelfde latex test toegepast voor de D-dimeer bepaling. De internisten hebben in de literatuur gelezen, dat sommige D-dimeertesten kunnen worden gebruikt voor screening op DVT en vragen u, waarom de D-dimeertest in uw ziekenhuis vrijwel nooit verhoogd is. Welke reactie geeft u?
- Welke laboratoriumbepaling(en) adviseert u om een eventuele hereditaire vorm van trombofilie aan te tonen?

#### Antwoorden vraag 2

- Heparine versterkt de werking van antitrombine-III. Testen die gevoelig zijn voor stollingsfactoren, die door AT-III worden geremd zijn geschikt voor controle van heparine-therapie. De meest gebruikte test is de aPTT. De aPTT wordt circa 6 uur na starten of wijzigen van de dosering gecontroleerd; bij stabiele instelling is eenmaal per dag voldoende.

Tabel 1. Referentiewaarden

| Bepaling                   | Referentiewaarden en eenheden |
|----------------------------|-------------------------------|
| Hemoglobine, volwassen man | 8,7 - 11,2 mmol/l             |
| Hemoglobine, man 15 jaar   | 8,3 - 10,6 mmol/l             |
| Hemoglobine, vrouw         | 7,5 - 10,0 mmol/l             |
| Leucocyten                 | $4,0 - 10,0 \times 10^9/l$    |
| Trombocyten                | $150 - 400 \times 10^9/l$     |
| Bloedingstijd              | < 4 min                       |
| Lymfocyten, CD4+           | $0,50 - 1,35 \times 10^9/l$   |
| Lymfocyten, CD8+           | $0,40 - 0,90 \times 10^9/l$   |
| CD4/CD8 ratio              | 0,7 - 3,0                     |

Coumarines remmen de aanmaak van de vitamine-K afhankelijke stollingsfactoren II, VII, IX en X (competitieve remming van de activiteit van  $\gamma$ -carboxylase). De protrombintijd (PT of PTT) is gevoelig voor deze factoren en wordt gebruikt voor de controle van orale antistolling. De PT wordt voor het eerst gemeten op de derde dag van de behandeling met coumarine, de frequentie daarna hangt af van de dosering (bij poliklinische patiënten met een stabiele instelling tot enkele weken, bij ziekenhuis-patiënten dagelijks of om de dag). Een speciale vorm van de PT is de Thrombotest; deze test wordt nog door veel trombosediensten gebruikt: het is een meting in bloed met een reagens, dat factor V en fibrinogeen bevat en daardoor ongevoelig is voor variaties in deze factoren.

In elk laboratorium dient bekend te zijn, in welke mate heparine de PT verlengt; dit is afhankelijk van het gebruikte reagens.

- b. D-dimeren zijn afbraakprodukten van fibrine, dat via crosslinks gepolymeriseerd is. Een verhoogde waarde wordt gevonden bij geactiveerde fibrinolyse zoals bijv. wordt gezien bij diffuse intravasale stolling (DIS), diep veneuze trombose (DVT) en longembolie (PE). Een negatieve D-dimeer gevonden met een gevoelige test, sluit DVT en PE vrijwel zeker uit.
- c. De gevoeligheid van de D-dimeertest hangt af van de gebruikte techniek. De in de literatuur gepubliceerde studies zijn vrijwel altijd uitgevoerd met een gevoelige Elisa test (detectiegrens beneden 0,1-0,2 mg/l). De meeste latex testen, zeker de al wat oudere testen, halen deze gevoeligheid niet en zijn daarom niet geschikt om DVT/PE uit te sluiten.  
De gevoelige Elisa testen zijn veelal te bewerkelijk om cito te kunnen uitvoeren, terwijl de klinische situatie een cito test eigenlijk vereist. Gevoelige latex testen beginnen thans op de markt te komen. Bij invoering van zo'n gevoelige test zal in het ziekenhuis overleg nodig zijn over de interpretatie van de test.
- d. Onderzoek naar oorzaken van hereditaire trombofilie: APC resistentie, indien afwijkend gevolgd door DNA onderzoek naar de F V Leiden mutatie; antitrombine III activiteit; proteïne C activiteit en proteïne S antigeen. Het is raadzaam, voor begin van de behandeling met anticoagulantia plasma af te nemen voor deze bepalingen, omdat die gestoord worden door heparine (APC resistentie) of orale anticoagulantia (proteïne C en S).

### Vraag 3

Geef aan of onderstaande uitspraken juist of onjuist zijn. Vindt u de uitspraken te ongenueanceerd of polyinterpretabel, licht uw antwoord dan kort toe.

- a. Koolmonoxyde-hemoglobine (COHb) stoort de hemoglobinebepaling indien deze wordt verricht m.b.v. methemoglobinecyanide reagens. Juist / onjuist
- b. In het beginstadium van mononucleosis infectiosa kunnen in de differentiatie al atypische lymfocy-

ten zichtbaar zijn, terwijl de test op heterofiele antistoffen (b.v. Monosticon) negatief is. Juist / onjuist

- c. Schizocyten worden soms gezien t.g.v. mechanische beschadiging door bijvoorbeeld hartklep-prothesen. Juist / onjuist
- d. Bij een pasgeborene is onderzoek naar auto-antistoffen (geproduceerd door de baby zelf) als oorzaak voor hemolyse zinloos. Juist / onjuist
- e. Donath-Landsteiner-antistoffen zijn klinisch niet van belang. Juist/onjuist
- f. Normale uitslagen van de PT, APTT en bloedings-tijd sluiten de ziekte van Von Willebrand uit. Juist/onjuist
- g. Bij de suikerwatertest wordt het complement-regulerend vermogen van de erythrocyten getest. Juist / onjuist
- h. Chronisch lymfatische leukemie berust meestal op een monoclonale proliferatie van B-lymfocyten. Juist / onjuist
- i. Na een miltexcisie worden vaak lichaampjes van Döhle in de erythrocyten gezien. Juist / onjuist
- j. De synthese van stollingsfactoren II, V, VII, en X is vitamine-K afhankelijk. Juist / onjuist
- k. Voor de diagnose Polycytemia Vera is naast de bepaling van het totaal erythrocytenvolume ook een arteriële bloedgasanalyse aan te bevelen. Juist / onjuist
- l. Bij een  $\beta$ -thalassemie wordt vaak een hogere RDW (Red-cell Distribution Width) gevonden dan bij een microcytaire ijzerebreksanemie. Juist / onjuist
- m. De zink protoporfyrine (ZPP) concentratie in erythrocyten neemt toe bij ijzer-gebreksanemie. Juist / onjuist
- n. Hemofilie B komt vaker voor dan hemofilie A. Juist / onjuist
- o. Bij een myelodysplastisch syndroom (MDS) wordt vaak een hypercellulair beenmerg gevonden. Juist / onjuist.

### Antwoorden vraag 3

- a. juist: COHb wordt langzamer in HiCN omgezet dan andere hemoglobine-derivaten.
- b. juist: heterofiele antistoffen kunnen soms pas 1 à 2 weken later worden aangetoond.
- c. juist: schizocyten = fragmentocyten.
- d. juist: het immuunsysteem van een pasgeborene is nog niet in staat om auto-antistoffen te maken.
- e. onjuist: bifasische antistoffen kunnen ernstige hemolyse veroorzaken.
- f. onjuist: de APTT en bloedings-tijd kunnen wisselend al dan niet gestoord zijn, zelfs in de loop van de tijd bij een patiënt. De PT is steeds normaal.
- g. juist: afwezigheid van enkele eiwitreceptoren die verankerd zijn via een fosfatidyl-inositol verbinding maakt de erythrocyt gevoeliger voor lysis door geactiveerd complement.
- h. juist: in slechts ongeveer 5% van alle CLL gevallen zijn het T-lymfocyten.
- i. onjuist: Howell-Jolly lichaampjes worden meestal gezien als gevolg van de verminderde klaring door het RES van de milt.

- j. onjuist: de aanmaak van factor V is niet afhankelijk van vitamine-K, die van factor IX juist wel.
- k. juist: een bloedgasanalyse is zeer wenselijk om het onderscheid te kunnen maken tussen Polycytemia Vera en secundaire polycytemie. Arterieel bloed is noodzakelijk.
- l. onjuist: er wordt juist een lagere RDW gezien.
- m. juist.
- n. onjuist: hemofilie A komt ongeveer 20 maal zo vaak voor.
- o. juist: in het perifere bloed zijn vaak 2 of 3 cellijnen verminderd aanwezig, terwijl het beenmerg hypercellulair is.

#### Vraag 4

De resultaten van uw SKZL/VHL enquête hemocytometrie laten zien, dat de trombocyten-tellingen in uw laboratorium systematisch 14% lager liggen dan die van de overige deelnemers binnen uw apparaatgroep. De trombocyten-tellingen in het door uw apparaat-leverancier geleverde controlemateriaal laten echter niet zo'n duidelijk systematisch verschil zien met de opgegeven waarde.

- a. Welke oorza(a)k(en) kunt u noemen voor de verschillen tussen de SKZL/VHL monsters en het controlemateriaal?
- b. Waarom zal herkalibratie van uw automaat voor de trombocyten-telling lastiger zijn dan voor de hemoglobine-concentratie?

Er wordt voorgesteld, een oude methode te gebruiken om de trombocyten-telling van de automaat te corrigeren, door bloed af te nemen bij 20 patiënten, de trombocyten te tellen in de telkamer en vervolgens de automaat te kalibreren op de daarmee verkregen getallen.

- c. Bent u het eens met deze benadering of besluit u tot een andere wijze van kalibreren? Verklaar uw antwoord.

#### Antwoorden vraag 4

- a. De SKZL/VHL stuurt humaan bloed rond, dat op de dag na bloedafname moet worden geanalyseerd. De eigenschappen van deze monsters zijn goed vergelijkbaar met vers bloed, zoals dat van uw patiënten. Controlemateriaal is meestal niet van humane oorsprong en bovendien zijn de trombocyten daarin meestal gefixeerd of anderszins gestabiliseerd, waardoor ze tijdens telling in een automaat andere eigenschappen kunnen vertonen dan verse humane trombocyten.  
Het "consensus"-gemiddelde bij de SKZL is berekend uit een grote groep waarnemingen, terwijl de door de fabrikant opgegeven waarde meestal berust op een door een klein aantal laboratoria uitgevoerde metingen (vaak zelfs niet eens aangegeven hoeveel metingen).
- b. Voor de hemoglobine-bepaling bestaat een internationale referentie-methode en er zijn kalibratiestandaarden verkrijgbaar. Voor trombocyten bestaat wel een aanbevolen methode, maar deze is in weinig laboratoria voorhanden. Bovendien bestaat er geen echte standaard, daarom zal altijd gewerkt

moeten worden met niet-gekalibreerde materialen (vers bloed).

- c. Welke methode u kiest is een kwestie van smaak en de faciliteiten, waarover u kunt beschikken. De examencommissie is van mening, dat het geen aanbeveling verdient, zonder meer te corrigeren met 14%, omdat een controle principieel niet als kalibrator beschouwd mag worden. Als er in uw laboratorium nog veel ervaring is met de telkamer-methode is dit een acceptabele oplossing. U zou ook kunnen overwegen, een collega, die in de SKZL/VHL enquête beter scoort, te vragen om een aantal verse bloedmonsters met trombocyten-uitslagen en daarmee uw automaat te kalibreren.

#### Vraag 5

Bij een 32-jarige man is tijdens een keuring vastgesteld, dat hij antistoffen heeft tegen het HIV-1 virus (Elisa screening, bevestigd met specifieke immunoblot). Om zijn cellulaire immuniteit te onderzoeken, vraagt de internist bepaling van de T-cel subsets aan. Hierbij vindt u de volgende uitslagen: CD4+ lymfocyten  $0,32 \times 10^9/l$ , CD8+ lymfocyten  $1,20 \times 10^9/l$  en CD4/CD8 ratio 0,27.

- a. Zijn de sterk verlaagde CD4+ lymfocyten een bewijs voor AIDS? Verklaar uw antwoord.
- b. Becommentarieer de waarde van de CD4/CD8 ratio in zijn algemeenheid.
- c. In bloed komen lymfocyten voor, die CD8 tot expressie brengen op hun membraan, maar die niet tot de T-cellen behoren: de NK-cellen (natural killer). Welke maatregelen neemt u om te voorkomen, dat deze groep cellen meegemeten wordt tijdens de bepaling van genoemde T-lymfocyten subsets?

#### Antwoorden vraag 5

- a. Nee, de diagnose AIDS wordt nooit gesteld op het aantal CD4+ lymfocyten alleen. Het verlaagde aantal wijst wel op een cellulaire immuundeficiëntie, maar dit is niet specifiek voor AIDS of een HIV-infectie.
- b. De cellulaire immuunfunctie wordt vooral bepaald door de celconcentratie van CD4+ lymfocyten. Omdat de CD4/CD8 ratio mede beïnvloed wordt door het aantal CD8+ lymfocyten, kan de ratio CD4/CD8 op zichzelf nooit goed worden geïnterpreteerd.
- c. Door bij de CD8 telling ook gebruik te maken van monoclonale antistoffen die T-lymfocyt specifiek zijn (bijv. CD3), in een dubbelkleuring of drieduidige kleuring in de flowcytometer. Op deze manier kunnen cellen worden geteld, die zowel CD3+ als CD8+ zijn. Omdat NK-cellen geen CD3 bezitten, worden ze niet meegeteld.

#### Vraag 6

Een mannelijke patiënt van 73 jaar met bloedgroep A, rhesus D negatief wordt geopereerd en tijdens de operatie worden 3 eenheden erythrocyten concentraat toegediend. Direct na de transfusie wordt melding gemaakt van verdenking op een transfusiereactie.

- a. Welke testen laat u uitvoeren en welke verdere maatregelen neemt u cq. laat u in het laboratorium nemen in het kader van deze melding?

Er wordt duidelijke hemolyse aangetoond en aanvullend onderzoek levert op dat er inderdaad sprake moet zijn geweest van een transfusiëreactie.

- b. Geef aan, op welke criteria u tot een dergelijke uitspraak komt.

Enige weken later worden voor deze patiënt opnieuw 3 eenheden bloed besteld, met de bedoeling deze diezelfde dag nog te transfunderen.

- c. Welk laboratorium-onderzoek laat u minimaal verrichten ter voorbereiding van deze nieuwe bloedtransfusie?

Van uw analiste krijgt u bericht, dat zij met een van de 3 eenheden bloed een positieve kruisproef heeft gevonden.

- d. Wat besluit u:

1. de 2 eenheden met een negatieve kruisproef alvast uit te geven en een andere eenheid te kruisen.
2. de 2 eenheden met een negatieve kruisproef alvast uit te geven en onderwijl vervolgonderzoek te laten uitvoeren.
3. geen van de eenheden uit te geven, in afwachting van de resultaten van vervolgonderzoek.

Licht uw keuze toe.

Indien u besloten heeft tot d1: de kruisproef met de vierde eenheid donorbloed is negatief.

e1. Levert u het bloed af; waarom wel/waarom niet?

Indien u besloten heeft tot d2 of d3: bij het vervolgonderzoek, waarbij u onder andere een 10-cels panel gebruikt, worden geen positieve reacties gevonden.

e2. Welke oorzaken kunt u aangeven ter verklaring van de positieve kruisproef met een van de 3 eenheden donorbloed?

#### Antwoorden vraag 6

- a. De verdachte eenheid bloed dient terug te komen naar het laboratorium, waar allereerst een visuele inspectie gebeurt (hemolyse in de eenheid, verkleurd). U laat de eenheid vervolgens kweken (zowel bij 4°C als bij 37°C), laat de kruisproef herhalen (of voor het eerst uitvoeren indien u de Type & Screen strategie volgt), de bloedgroep en rhesus D factor van patiënt en donor controleren, een screening op irregulaire antistoffen uitvoeren in het bloed van de patiënt van voor en na de transfusie, alsmede een directe antiglobulinetest (Coombs) in het bloed van de patiënt na transfusie.

Verder laat u onderzoeken of er hemolyse is: hapto-globine, LD, eventueel vrij hemoglobine en bilirubine. Als de behandelend arts er zelf niet aan denkt, adviseert u hem, de diurese van de patiënt in de gaten te houden.

Tenslotte zorgt u ervoor, dat de patiënt niet opnieuw getransfundeerd wordt zolang het onderzoek naar de transfusiëreactie voortduurt.

- b. Een hemolytische transfusiëreactie direct aansluitend aan de transfusie kan de volgende oorzaken hebben:

1. ABO incompatibele transfusie: dit blijkt uit controle van de bloedgroepen van donor en patiënt.

2. acute hemolyse ten gevolge van sterk hemolyserende irregulaire antistoffen: deze antistoffen vindt u dan in de kruisproef, de antistofscreening en de directe Coombs test na transfusie (positief met mixed field patroon).

3. slechte kwaliteit van het donorbloed. Het kan bacterieel besmet zijn: dit blijkt later uit de kweek; of het is zodanig behandeld (bevroren geweest of te heet geworden), dat erythrocyten al voor transfusie waren gehemolyseerd: dit blijkt bij de visuele inspectie.

- c. Screening irregulaire antistoffen en kruisproeven. Als na de transfusiëreactie al irregulaire antistoffen waren gevonden, dient u het screeningspanel aan te passen, zodanig dat u alle overige relevante antistoffen kunt aantonen dan wel uitsluiten. Vanzelfsprekend wordt het donorbloed getypeerd op de antigenen, waartegen de irregulaire antistoffen gericht zijn. Bij elke patiënt, die irregulaire antistoffen heeft (gehad) zijn kruisproeven, in de antiglobuline-fase, altijd noodzakelijk.

- d. in zijn algemeenheid is het een kunstfout, bloed uit te geven zolang u de oorzaak van de positieve kruisproef niet kent. De antistoffen kunnen een dosage-effect vertonen, waardoor de kruisproef vals-negatief kan zijn; desondanks kan er toch hemolyse optreden met zulke eenheden. Als de situatie het toelaat, is optie 3 het beste. Optie 1 is altijd af te raden, tenzij u tevoren de aanwezigheid van irregulaire antistoffen adequaat heeft uitgesloten.

e1. Het is niet verstandig, te transfunderen terwijl een antistofprobleem (de ene positieve kruisproef) niet is opgelost.

e2. er zijn verschillende mogelijkheden:

1. de donor heeft een positieve directe antiglobuline test

2. patiënt heeft bloedgroep A<sub>2</sub> met anti-A<sub>1</sub> antistoffen en de donor van de ene eenheid is A<sub>1</sub>.

3. er zijn antistoffen tegen gecombineerde antigenen in het spel, bijv. anti-A<sub>1</sub>-Le<sup>b</sup>. Alle cellen van commerciële panels hebben bloedgroep 0.

4. patiënt heeft antistoffen tegen zeldzame antigenen, zoals Wr<sup>a</sup>, Kp<sup>a</sup>, HTLA etc, die niet op uw celpanel voorkomen. Ook antistoffen tegen zeer zeldzame "private" antigenen behoren tot de mogelijkheden.

Correspondentie: Dr. J.J.M.L. Hoffmann, Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina Ziekenhuis, Postbus 1350, 5602 ZA Eindhoven