

Veilige, geautomatiseerde antistofscreening met het WA-Diana DiaMed-ID-systeem

A. CASTEL, A. KÖNIG en N. de KRAA

In verband met de noodzaak tot automatisering werd het volautomatische WA-Diana DiaMed-ID-systeem onderzocht als veilig en betrouwbaar alternatief voor de indirecte antiglobulinetest in polyethyleenglycol (PEG-IAGT) voor de screening op irregulaire erythrocytenantistoffen. Hiertoe werden 3771 patiëntenmonsters 'at random' onderzocht in beide technieken. In de PEG-IAGT werden 268 (7,1%) monsters positief bevonden en op de WA-Diana 254 (6,7%). In totaal werden met beide technieken bij 222 (5,9%) patiënten 291 irregulaire antistoffen aangetoond, waarvan 174 klinisch belangrijk en 117 klinisch onbelangrijk. Het meest frequent werden anti-E (57x), anti-K (36x), anti-D (30x) en anti-c (19x) gevonden. Van de 174 klinisch belangrijke antistoffen werden er 172 in beide technieken aangetoond. Eenmaal werd anti-C gemist in de PEG-IAGT en eenmaal werd anti-Jk^a gemist in de WA-Diana. Met de PEG-IAGT werden 95 (2,5%) keer klinisch onbelangrijke antistoffen aangetoond en met de WA-Diana 81 (2,1%) keer. De resultaten worden met name vergeleken met de uitkomsten van de studie van De Man in 1992. Invoering van de WA-Diana is door de medewerkers van het (transfusie)laboratorium op grond van deze studie geaccepteerd als een veilige en betrouwbare techniek voor antistofscreening met alle voordelen van een geautomatiseerd systeem.

Trefwoorden: WA-Diana; DiaMed-ID-systeem; indirecte antiglobulinetest; screening op irregulaire antistoffen

Voor de screening op irregulaire antistoffen tegen bloedgroepantigenen werd in ons laboratorium tot voor kort gebruik gemaakt van de beproefde polyethyleenglycol-indirecte-antiglobulinetest (PEG-IAGT), uitgevoerd in buisjes (1-3). Hoewel de PEG-IAGT algemeen wordt beschouwd als een zeer gevoelige techniek om erythrocytenantistoffen aan te tonen, zijn er ook nadelen. Zo kan bijvoorbeeld de wijze waarop (zwakke) agglutinaties worden losgeschud leiden tot individuele verschillen in het aflezen van resultaten. Wanneer zwakke agglutinaties worden losgeschud, wordt een vals-negatief resultaat gerapporteerd. Echter, de onmogelijkheid om de bestaande PEG-IAGT

te automatiseren vormt het belangrijkste praktische nadeel. In ons transfusielaboratorium ontstond, door de jaarlijks sterk stijgende productie, de duidelijke behoefte tot automatisering van de antistofscreening. Kolomtechnieken vormen een voldoende sensitief en specifiek alternatief (4) en kunnen volledig worden geautomatiseerd. In ons laboratorium werd de keuze gemaakt voor de WA-Diana volautomaat, waarbij gebruik wordt gemaakt van het DiaMed-systeem. Eerder onderzocht De Man de bruikbaarheid van het DiaMed-systeem, waarbij echter nog geen gebruik werd gemaakt van een volautomaat, en concludeerde dat het systeem uitermate geschikt is voor het routinematig aantonen en identificeren van klinisch belangrijke antistoffen (5).

Om de prestaties van het DiaMed-systeem op de WA-Diana te kunnen beoordelen werden gedurende een periode van half mei 2003 tot en met januari 2004 bijna 3800 patiëntenmonsters gescreend op irregulaire antistoffen, waarbij de aard van de antistoffen werd vastgesteld. De resultaten werden vergeleken met de uitkomsten van identiek onderzoek in de PEG-IAGT techniek, dat tegelijkertijd werd uitgevoerd. Doel van het onderzoek was om enerzijds de WA-Diana te valideren en anderzijds om de medewerkers van het transfusielaboratorium het vertrouwen te geven bij het verlaten van de PEG-IAGT als routinetechniek op een gelijkwaardig, maar dan volautomatisch, alternatief over te kunnen stappen.

Methoden

Kolomtest

De kolomtesten werden uitgevoerd op de WA-Diana van de firma DiaMed SA (Murten, Zwitserland). De WA-Diana is een volautomaat, die gebruik maakt van het DiaMed-gelsysteem. Dit systeem bevat kaartjes, waarin een zestal kolommetjes zijn aangebracht, elk gevuld met Sephadexgel (Sephadex 100 superfine). De kolomkaarten waarmee een IAGT kan worden uitgevoerd bevatten een gel, waaraan tevens polyspecifiek antiglobulineserum is toegevoegd. Testerythrocyten in 0,8% DiaMed-LISS (Low Ionic Strength Solution, ter versterking van de antigeen-antistofbinding) en patiëntenmonsters (serum of plasma) worden in de reactiekamer boven de gel gepipetteerd en geïncubeerd gedurende minimaal 15 en maximaal 45 minuten. Na de incubatiestap worden de kolomkaarten op gestandaardiseerde wijze gecentrifugeerd. Indien de bovenstaande erythrocyten tijdens de incubatie zijn gesensibiliseerd, kunnen zij tijdens de centrifu-

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag

Correspondentie: Dr. A. Castel, klinisch chemicus, Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Bronovolaan 5, 2597 AX Den Haag. E-mail: acastel@bronovo.nl

gatiestap agglutineren onder invloed van het in de gel aanwezige antiglobulineserum. De geagglutineerde erythrocyten kunnen dan niet verder in de ruimte tussen de bolletjes Sephadex van de gel doordringen en is er sprake van een sterk positieve reactie (4+). De ruimte tussen de Sephadexbolletjes volstaat wel om vrije erythrocyten door te laten. Indien er in het geheel geen agglutinaties optreedt zullen tijdens het centrifugeren de erythrocyten daarom volledig door de Sephadexkolom zakken en is er sprake van een negatieve reactie. Indien er sprake is van een zwakke of partiële agglutinaties dringen de geagglutineerde erythrocyten gedeeltelijk in de gel door en is er sprake van een zwakker positief resultaat (3+, 2+ en 1+). Het is duidelijk, dat de centrifugatiestap in dit proces kritisch is, zowel met betrekking tot de duur als de snelheid van centrifugatie. De WA-Diana biedt plaats aan 48 monsters en in het incubatieblok is plaats voor 24 kolomkaarten. De verwerkingssnelheid is 40 kaarten per uur. Het instrument is in staat de bij patiënten afgenomen monsters als zodanig te verwerken en maakt erythrocytensuspensies en pipetteert plasma. Incubatie, centrifugatie, resultaataflezing en interpretatie gebeuren geheel automatisch. Het instrument is beschikt over heldere, toegankelijke software, die zeer snel eigen gemaakt kan worden.

Het resultaat van elke bepaling in de WA-Diana wordt digitaal gefotografeerd en is als zodanig beschikbaar op het beeldscherm of als afdruk op papier.

PEG-IAGT

De IAGT in PEG werd uitgevoerd door in buisjes 50 µl 3%-suspensie van erythrocyten te mengen met 100 µl patiëntenplasma of -serum, 200 µl 20% PEG-4000

Tabel 1. Resultaten van de screening op irregulaire erythrocytenantistoffen in 3771 patiëntenmonsters met de PEG-IAGT en de LISS-kolomtechniek op de WA-Diana

Antistof	PEG-IAGT	WA-Diana
<i>Klinisch belangrijk</i>		
Anti -D	30	30
-C	5	6
-c	19	19
-E	57	57
-e	7	7
-K	36	36
-Fy ^a	6	6
-Fy ^b	2	2
-Jk ^a	3	2
-Jk ^b	5	5
-S	3	3
Totaal	173	173
<i>Klinisch onbelangrijk</i>		
Anti -M	7	5
-Le ^a	5	3
-Wr ^a	2	-
-Lu ^a	1	-
-P1	2	1
-H	2	-
Auto-antistoffen	18	14
Koude antistoffen	37	25
Aspecifieke antistoffen	21	33
Totaal	95	81

toe te voegen, te mengen en te incuberen bij 37 °C. Plasmamonsters werden 15 min geïncubeerd, serummonsters maximaal 30 min. Na wassen en centrifugeren werden 2 druppels monospecifiek antihumaan IgG toegevoegd en werd na centrifugatie het pellet boven een lamp beoordeeld op agglutinaties (neg, 1+, 2+, 3+ of 4+). Indien er sprake was van een positieve screening werd het monster opnieuw ingezet en de reactie ook afgelezen bij kamertemperatuur (zoutfase) en na het gedurende 10 min plaatsen van de buis bij 4 °C (zoutfase bij 4 °C), voordat PEG en anti-IgG werden toegevoegd.

Werkwijze

Van half mei 2003 tot en met januari 2004 werden 3771 patiëntenmonsters gescreend op de aanwezigheid van irregulaire erythrocytenantistoffen met zowel de PEG-IAGT als de DiaMed-ID-kolomtechniek op de WA-Diana. Hierbij werd in beide technieken gebruik gemaakt van een 3-celscreeningpanel 123 van Sanquin, divisie diagnostiek, voorheen CLB. Voor de PEG-IAGT werd de gebruiksklare 3%-celsuspensie als zodanig gebruikt. Voor de kolomtechniek werden de cellen gecentrifugeerd, gewassen met fysiologisch zout en vervolgens gesuspenseerd in LISS ('low ionic strength solution') van DiaMed tot een 0,8%-suspensie. Positieve monsters werden nader geanalyseerd met behulp van celpanels in zowel de PEG-IAGT als de kolomtechniek.

Resultaten

De resultaten van de screening op en identificatie van irregulaire antistoffen zijn weergegeven in tabel 1. Van de 3771 monsters waarin een dubbele screening

Tabel 2. Positiviteit van de gevonden antistoffen in de PEG-IAGT en de LISS-kolomtechniek op de WA-Diana

Antistof	Pos in PEG Neg in kolom	Pos in kolom Neg in PEG	Pos in beide technieken
<i>Klinisch belangrijk</i>			
Anti -D	-	-	30
-C	-	1	5
-c	-	-	19
-E	-	-	57
-e	-	-	7
-K	-	-	36
-Fy ^a	-	-	6
-Fy ^b	-	-	2
-Jk ^a	1	-	2
-Jk ^b	-	-	5
-S	-	-	3
Totaal	1	1	172
<i>Klinisch onbelangrijk</i>			
Anti -M	2	-	5
-Le ^a	2	-	3
-Wr ^a	2	-	-
-Lu ^a	1	-	-
-P1	1	-	1
-H	2	-	-
Auto-antistoffen	5	1	13
Koude antistoffen	16	4	21
Aspecifieke antistoffen	5	17	16
Totaal	36	22	59

werd uitgevoerd werden in de PEG-IAGT 268 (7,1%) monsters positief gevonden en op de WA-Diana 254 (6,7%). In totaal werden bij 222 (5,9%) patiënten 291 irregulaire antistoffen aangetoond, waarvan 174 klinisch belangrijk en 117 klinisch onbelangrijk (tabel 2). Zowel in de PEG-IAGT als met de WA-Diana werden 173 (4,6%) klinisch belangrijke antistoffen aangetoond. Het meest frequent werden antistoffen gevonden met de specificiteit anti-E (57x), anti-K (36x), anti-D (30x) en anti-c (19x). De gegevens voor anti-E, -K en -c stemmen overeen met de eerder door Van Dijk in de Nederlandse populatie gevonden gegevens (6). In het geval van anti-D betrof het meestal vrouwen die tijdens of na de zwangerschap profylactisch anti-D toegediend hadden gekregen. In de 174 gevallen waarin een klinisch belangrijke antistof werd aangetoond, werd 172 (98,9%) maal in beide technieken dezelfde antistof gevonden. Echter, in de PEG-IAGT werd eenmaal anti-Jk^a aangetoond, die werd gemist op de WA-Diana. Op de WA-Diana werd eenmaal anti-C aangetoond, die werd gemist in de PEG-IAGT. Met de PEG-IAGT werden 95 (2,5%) keer klinisch onbelangrijke antistoffen aangetoond, waarbij het meestal ging om koude antistoffen (37x), specifieke antistoffen (21x) en auto-antistoffen (18x). In 19 gevallen was er sprake van een specifieke antistof. Met de WA-Diana werden 81 (2,1%) keer klinisch onbelangrijke antistoffen aangetoond, 33x betrof het specifieke antistoffen, 25x koude antistoffen en 14x auto-antistoffen. In 9 gevallen kon een specifieke antistof worden geïdentificeerd.

Discussie

Het bloedtransfusielaboratorium is in het overgrote deel van de Nederlandse ziekenhuizen ondergebracht in het klinisch-chemisch en hematologisch laboratorium en vormt daarvan een uiterst belangrijk onderdeel. De onlangs uitgebrachte CBO-richtlijn Bloedtransfusie (8) is hierbij een belangrijke basis voor de wijze waarop het compatibiliteitsonderzoek op verantwoorde wijze kan worden uitgevoerd in de transfusielaboratoria. De screening op irregulaire antistoffen tegen bloedgroepantigenen en het typeren van deze antistoffen vormen een essentieel onderdeel van het compatibiliteitsonderzoek. Het is daarom van groot belang dat de in het laboratorium werkzame analisten enerzijds ervaren zijn in de uitvoering van de screening op irregulaire antistoffen en anderzijds ook vertrouwen hebben in de gebruikte techniek. Dat laatste geldt des te meer bij de overstap op een nieuwe methode. Door het voortdurend stijgende aanbod van te onderzoeken monsters ontstond in ons laboratorium de noodzaak om van de vertrouwde PEG-IAGT in buisjes over te stappen op een volledig geautomatiseerde techniek. Hierbij viel de keuze op de WA-Diana, waarbij gebruik wordt gemaakt van de LISS-kolomtechniek. Uit de literatuur (4, 5, 7) is gebleken dat kolomtechnieken voldoende sensitief en specifiek zijn en deze technieken worden op dit moment ook steeds vaker toegepast. In de Nederlandse situatie vormen de bevindingen van De Man, zoals deze zijn gepubliceerd in 1992 (5), een belangrijke

bron van informatie bij het besluit om over te stappen op de LISS-kolomtechniek van DiaMed. Het is daarom interessant om de bevindingen in ons huidige onderzoek te plaatsen naast de resultaten uit het onderzoek van De Man in Nijmegen. Hierbij is het van belang op te merken dat er enkele belangrijke verschillen bestaan tussen beide onderzoeken. De Man voerde de screening op irregulaire antistoffen uit met behulp van een 2-celpanel in plaats van een 3-celpanel en hij maakte gebruik van het manuele DiaMed-systeem in plaats van de WA-Diana-volauto-maat. In beide studies werd gebruik gemaakt van 'at random' patiëntenmonsters die aan het laboratorium werden aangeboden. In het Nijmeegse onderzoek werden in 237 (5,0%) van 4700 sera 161 klinisch belangrijke antistoffen aangetoond en 126 klinisch onbelangrijke antistoffen. Wij vinden 174 klinisch belangrijke en 117 klinisch onbelangrijke antistoffen in 222 (5,9%) van 3771 patiëntenmonsters. Met betrekking tot de aard van de gevonden antistoffen worden in beide onderzoeken vooral rhesus-antistoffen en anti-K gevonden, hoewel er wel onderlinge verschillen zijn: anti-c (10,9%/6,2%), anti-E (32,8%/21,1%), anti-K (20,7%/28,0%). Met betrekking tot de nog steeds bestaande discussie omtrent het al of niet invoeren van een beleid van cEK-compatibel transfunderen van vrouwen en meisjes tot en met de leeftijd van 44 jaar (8,9) kan in elk geval worden geconstateerd dat cEK-antistoffen ook in onze studie met 64,4% het leeuwendeel vormen van de aangetoonde klinisch belangrijke antistoffen. In onze huidige studie vinden we met betrekking tot de klinisch belangrijke antistoffen slechts een minimaal verschil tussen de PEG-IAGT en de LISS-kolomtechniek op de WA-Diana. Eenmaal werd een anti-C gemist in de PEG-IAGT en eenmaal een anti-Jk^a op de WA-Diana (tabel 2). Dit is een beduidend beter resultaat dan in het onderzoek in Nijmegen waarbij 23/161 antistoffen niet konden worden aangetoond in de kolomtest en 18/161 niet in de PEG-IAGT. De Man rapporteerde als meest opvallende verschil tussen beide technieken het feit dat 4 van de 8 gevonden Jk-antistoffen niet in de kolomtechniek konden worden aangetoond. Dit is in lijn met zowel eerdere bevindingen (7) als onze huidige resultaten.

Klinisch onbelangrijke antistoffen vormen bij de diagnostiek rond de bloedtransfusie een aparte entiteit. Enerzijds zijn deze antistoffen per definitie klinisch onbelangrijk bij het toedienen van een transfusie, anderzijds kunnen zij in het transfusielaboratorium grote problemen veroorzaken bij de identificatie en het uitsluiten van klinisch wel belangrijke antistoffen. De resultaten met betrekking tot de aangetoonde klinisch onbelangrijke antistoffen laten een interessant beeld zien (tabel 2): In de PEG-IAGT werden 19 antistoffen gevonden, waarvan een specificiteit kon worden vastgesteld. In de kolomtechniek op de WA-Diana werd slechts in 9 gevallen een specificiteit vastgesteld. In deze categorie antistoffen werd geen enkel geval aangetroffen waarbij er alleen in de kolomtechniek sprake was van positieve reacties. Auto-antistoffen werden min of meer gelijk aange-

toond in beide technieken. Koude antistoffen werden, zoals verwacht, vaker aangetoond in de PEG-IAGT, maar ook in de kolomtechniek werden klinisch onbelangrijke koude antistoffen nog in een groot aantal gevallen gevonden. Het is opvallend, dat op de WA-Diana in 40,7% (33/81) van de gevallen, waarin sprake was van een klinisch onbelangrijke antistof, specifieke antistoffen werden aangetoond. In de PEG-IAGT bedroeg dit percentage slechts 22,1% (21/95). Met betrekking tot anti-M kan de vraag worden gesteld, of deze antistoffen wel of niet als klinisch onbelangrijk mogen worden beschouwd. Anti-M-antistoffen die niet reactief zijn bij 37 °C leiden zelden tot een transfusiële reactie en een negatieve kruisproef in de indirecte antiglobulinetest volstaat (8). In het geval van anti-M-antistoffen die wel reactief zijn bij 37 °C dient M-negatief bloed te worden toegediend. In ons onderzoek werden 7 keer anti-M antistoffen aangetoond. De vijf maal dat anti-M zowel in de PEG-IAGT als in de kolomtechniek werd aangetoond, bleken de antistoffen duidelijk reactief bij 4 °C en in wisselende mate reactief bij 37 °C. In de beide gevallen dat anti-M wel aantoonbaar was in de PEG-IAGT, maar niet in de kolomtechniek betrof het anti-M-antistoffen die niet reactief waren bij 37 °C.

Per saldo is er dus slechts een gering verschil in frequentie van het aantonen van klinisch onbelangrijke antistoffen in de PEG-IAGT (2,5%) en de kolomtechniek (2,1%), hoewel er belangrijke verschillen bestaan in de aard van de aangetoonde antistoffen.

Conclusie

De LISS-kolomtechniek op het WA-Diana-DiaMed-ID-systeem is een betrouwbare volautomatische techniek voor het screenen van patiëntenmonsters op de aanwezigheid van irregulaire bloedgroepantistoffen. De gevoeligheid voor het aantonen van klinisch belangrijke antistoffen is even goed als die van de PEG-IAGT. Met de kolomtechniek worden aanzienlijk minder identificeerbare klinisch onbelangrijke antistoffen aangetoond. Ook worden er minder koude antistoffen aangetoond dan in de PEG-IAGT. Omdat er echter sprake is van het beduidend vaker aantonen van specifieke antistoffen is de frequentie waarmee klinisch onbelangrijke antistoffen worden aangetoond (2,1%) per saldo nauwelijks lager dan bij gebruikmaking van de PEG-IAGT (2,5%). De WA-Diana is door de medewerkers van het (transfusie)laboratorium ervaren als een uitstekend alternatief voor de PEG-IAGT, met alle voordelen van een volledig geautomatiseerd systeem.

Literatuur

1. Wenz B, Apuzzo J. Polyethylene glycol improves the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1989; 29: 218-220.
2. Slater JL, Griswold DJ, Wojtyniak LS, Reisling MJ. Evaluation of the polyethylene glycol-indirect antiglobulin test for routine compatibility testing. *Transfusion* 1989; 29: 686-688.
3. Man AJM de, Overbeeke MAM. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. *Vox Sang* 1990; 58: 207-210.
4. Poole GD, Evans RG, Voak D, Scott ML, Chapman JF, Phillips PK. Evaluation of six systems for the detection of red cell antibodies. MDA evaluation report. Department of Health, London, 1996.
5. Man AJM de. Antistofscreening met het DiaMed-ID systeem. *Tijdschr NVKC* 1992; 17: 151-155.
6. Dijk BA van. Irregulair bloedgroepantagonisme: een geregeld probleem [proefschrift]. Rijksuniversiteit Leiden 1991.
7. Fokkema D, Mark J van der, Akker D van den, Folman C, Porcelijn L, Overbeeke M. Volledig geautomatiseerde bloedgroepentyping en antistofscreening voor de prenatale diagnostiek. *NVB bulletin* 2002; 4: 23-31.
8. Richtlijn Bloedtransfusie. Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg CBO, Utrecht. Alphen aan de Rijn: Van Zuiden Communications BV, 2004.
9. Castel A, Dijk BA van, Boom FMLG van, Brand A, Engelfriet CP, Overbeeke MAM, et al. Preventie van immunisatie door c, E en K: achtergronden en gefaseerde implementatie. *Ned Tijdschr Klin Chemie* 1996; 21: 213-217.

Summary

Safe and fully automated detection of blood group antibodies using the WA-Diana DiaMed-ID system. Castel A, König A and Kraa N de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 322-325

Due to the need for further automation in our transfusion laboratory we investigated the use of the full-automatic WA-Diana DiaMed-ID system as a safe and reliable alternative for the indirect antiglobulin test in polyethylene glycol (PEG-IAGT). 3771 patient samples were randomly screened for irregular antibodies using both techniques. Using the PEG-IAGT, 268 (7,1%) were found to be positive and using the WA-Diana, 254 (6,7%) were found to be positive. Overall 291 irregular antibodies were found using both techniques in 222 (5,9%) patient samples. 174 antibodies were clinically important and 117 antibodies were clinically unimportant. The antibodies found most frequently were anti-E (57x), anti-K (36x), anti-D (30x) and anti-c (19x). 172 out of a total of 174 clinically important antibodies were detected in both techniques. In one case anti-C was missed in the PEG-IAGT and in another case anti-Jk^a was missed in the WA-Diana. Using the PEG-IAGT, 95 (2,5%) clinically unimportant antibodies were found as compared to 81 antibodies (2,1%) in the WA-Diana. The results are compared with the results of the study of De Man in 1992. The technicians of the transfusion laboratory have accepted the implementation of the fully automated WA-Diana system as a safe and reliable technique for the detection of irregular blood group antibodies. *Key words: WA-Diana; DiaMed ID system; indirect antiglobulin test; antibody screening; irregular blood group antibodies*