

## Artikelen

# Onderzoek van foetomaternale transfusie met al dan niet gemodificeerde Kleihauer-methoden: een inventarisatie bij 11 Nederlandse laboratoria

J. EGBERTS

Aan elf laboratoria is informatie gevraagd over de gebruikte methoden voor het bepalen van het volume van een foetomaternale transfusie (FMT): de Kleihauer-Betke test (KBT). Tien laboratoria participeerden tevens in een analyse van mengsels van foetaal en volwassen bloed (foetale cellen 0,05- 3,46%). Voor de KBT worden vijf verschillende methoden gebruikt, waarvan drie als commerciële kits beschikbaar zijn. Het aantal cellen dat volgens de verschillende SOP's werd bekeken, varieerde tussen de 300 en > 200.000 cellen. Verder worden voor de berekening van het volume van een FMT drie verschillende methoden gebruikt.

De resultaten van de testmonsters varieerden sterk tussen de laboratoria en tussen en binnen de methoden. Soms verschilden de resultaten meer dan 200% en voor een navelstrengbloedje varieerde het percentage niet aangekleurde (HbA-)cellen tussen de 2 en 15%. Het berekende FMT-volume wordt door geen der laboratoria gecorrigeerd voor dit percentage niet aangekleurde foetale cellen. Het FMT-volume wordt daarom vaak onderschat, waardoor mogelijk onvoldoende anti-D immunoglobuline als profylaxe gegeven wordt. Aanbevolen wordt de richtlijnen van de BCSH te volgen en een kwaliteitscontrolesysteem op te zetten.

*Trefwoorden: foetomaternale transfusie; Kleihauer-Betke test*

Een foetomaternale bloeding of transfusie (FMT) kan door meerdere oorzaken ontstaan (1, 2) en vooral na de geboorte van een RhD-pos. kind uit een RhD-neg. moeder is het van belang om na te gaan of er sprake geweest is van een FMT. Door een mogelijke allo-immunisatie van de moeder zal, zonder immunoprofylaxe een volgende zwangerschap kunnen resulteren in een foetale en neonatale hemolytische anemie.

*Laboratorium Verloskunde, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden*

Voormalig Chef de Laboratoire, Lab. Verloskunde, P3-P, LUMC, Postbus 9600, 2300 RC Leiden  
E-mail: jegberts.1@hccnet.nl

Door Kleihauer, Braun en Betke is in 1957 (3) een methode beschreven om in bloeduitstrijkjes de foetale erythrocyten te onderscheiden van de maternale rode bloedcellen. De foetale, HbF bevattende, cellen zijn duidelijk gekleurd terwijl de HbA-cellen van de volwassene zeer licht of niet gekleurd zijn en slechts als ghosts gezien worden. De eerste Kleihauer-Betke test (KBT) is door velen, o.a. in 1960 door Kleihauer en Betke (4) gemodificeerd. Een aantal van deze modificaties zijn als handelsproducten op de markt gebracht. Echter, publicaties die meerdere Kleihauer modificaties met elkaar vergelijken zijn met uitzondering van die van Bromilow en Duguid (5) uit 1997 nauwelijks voorhanden. Door de talloze modificaties, vaak zonder informatie over de nauwkeurigheid en de reproduceerbaarheid van de methode wordt er nogal negatief gedacht over de KBT.

Uit studies waarbij gekleurde preparaten of mengsels van foetale en adulte rode bloedcellen zijn rondgestuurd werd een sterke discrepantie tussen de resultaten van de verschillende klinieken waargenomen (6-8). Door Raafet en medewerkers (8) werd vervolgens aangetoond dat vervanging van de 'eigen' methode door een 'quality assurance' schema tot een aanzienlijke verbetering leidde van de reproduceerbaarheid tussen centra. Dergelijk onderzoek heeft er toe geleid dat uiteindelijk voor binnen het Verenigd Koninkrijk richtlijnen door het British Committee for Standards in Haematology (BCSH) voor de KBT zijn voorgesteld (9).

Hoe is, voor wat de bepaling van het volume van FMTs betreft, de situatie in Nederland? Voor het beantwoorden van deze vraag is aan de acht universitaire centra en aan de Isala klinieken, het Maxima Medisch Centrum en het Onze Lieve Vrouwen Gasthuis een vragenlijst voorgelegd. Tevens is aan deze 11 centra gevraagd de SOP's of werkvoorschriften op te sturen en of ze bereid waren een aantal testmonsters te beoordelen.

## Materiaal en Methoden

### *De enquête*

De gestelde vragen gingen over (a) de gevolgde Kleihauer-methode, (b) of de methode gemodificeerd was t.o.v. de gepubliceerde beschrijving, (c) of er moei-

lijkheden waren bij de interpretatie van de resultaten, (d) of er navelstrengbloed en volwassen bloed als controlebloedjes gebruikt worden (e) of er ijkbloedjes (mengsels met lage percentages foetale cellen in volwassen bloed) gebruikt worden en (f) of de reproduceerbaarheid van de methode bekend is. Tot slot is gevraagd om een kopie van de SOP of het werkvoorschrift.

#### *De bereiding van testmonsters voor de rondzending*

De rode bloedcellen in het bloed van een volwassen man en een a-terme navelstrengbloedje (beide O en RhD-pos.) zijn met de Sysmex 1000 geteld. Teneinde de matrix van het materiaal van de mengsels zo normaal mogelijk te houden is aan het volwassen bloed in oplopende hoeveelheden 1:2 met fysiologisch zout verdund navelstrengbloed toegevoegd. Na de toevoegingen waren de berekende percentages foetale cellen de volgende: 0,05, 0,15, 0,47, 1,02, 1,81 en 3,46 %.

#### *De analyse*

Aan elk centrum is van elk mengsel 200 µl gestuurd met daarbij een onverdund monster van het navelstrengbloedje. De monsters zijn daarna volgens de voor elk centrum gebruikelijke procedure verder verwerkt. Verzocht werd de resultaten van de tellingen als percentage of promillage door te geven en het mogelijke volume van de FMTs, eveneens volgens de eigen methode te berekenen. Tevens is gevraagd een schatting te maken van het percentage niet gekleurde (HbA) cellen in het navelstrengbloed.

### **Resultaten**

Voor wat het voorschrift voor de Kleihauer betreft bleek dat binnen de elf centra vijf duidelijk te onderscheiden methoden worden gebruikt. Twee centra gebruiken de Kleihauer methode uit 1960, door Bartsch gevalideerd (10) en door Los uitgebreid beschreven (11). Twee centra volgen de Nierhaus-Betke-methode (12) en twee de methode volgens Clayton (13). De Sigma-kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) wordt gebruikt door twee centra en door drie wordt de Gamma Biological-procedure gevolgd (Immucor-Gamma, Heppignies, België). Vaak zijn er binnen de SOP's of werkvoorschriften kleine modificaties van de oorspronkelijke protocollen in de publicaties (10-

13) of bijsluiters. Drie maal werd voor literatuur verwezen naar hematologieboeken. Alleen de laboratoria die de Nierhaus-Betke-methode gebruiken hebben geen probleem met het onderscheiden van foetale en volwassen rode bloedcellen in de uitstrijkjes. Door de andere centra worden wisselende problemen aangegeven. Deze zijn soms van tijdelijke aard (routine van de analist, te laat verversen van fixatie en/of elutiebuffer), maar ook regelmatig structureel (zoals: maken van een goed uitstrijkje, elutie/kleuringsom onduidelijke redenen niet goed waardoor een moeilijk onderscheid tussen de positieve foetale en zwak positieve (intermediaire) cellen van de volwassene). Desondanks geven meerdere van deze centra aan dat, volgens hun voorschrift, bij een door de zwangerschap verhoogd percentage maternaal HbF (< 10%) (14) het onderscheid tussen foetale en maternale cellen nog goed te maken is. Controlebloedjes, negatief en laag positief (<1%) worden door tien van de elf centra gebruikt. Gegevens over nauwkeurigheid en/of dupliceerbaarheid van de methode in het 'laagpercentage' traject werden slechts door vijf centra verstrekt, soms als variatiecoëfficiënten of als standaarddeviaties, of als een 95% betrouwbaarheidsinterval. Bij de zes andere centra ontbreken dergelijke gegevens. Enkele centra doen de KBT in duplo of triplo, of laten een uitstrijkje door twee analisten beoordelen. Er zijn grote verschillen tussen de centra met betrekking tot het beoordeelde aantal cellen waarop de berekening van het percentage foetale cellen wordt gebaseerd. De uiterste waarden waren 300 (1 centrum) en > 200.000 cellen (2 laboratoria). In drie centra wordt de berekening gebaseerd op 1000 cellen. In vijf andere laboratoria worden door het bekijken van 20 tot 30 gezichtsvelden rond de 10.000 cellen beoordeeld. Door drie centra werd/wordt nagegaan in hoeverre flowcytometrie (FC) de KBT kan vervangen. Een gedetailleerde weergave van afzonderlijke SOP's of werkvoorschriften wordt gegeven in een addendum, op aanvraag beschikbaar.

De resultaten van de rondgestuurde monsters zijn in tabel 1 weergegeven. Een centrum waar de Kleihauer-Betke-methode uit 1960 wordt gebruikt heeft geen telresultaten geleverd. In de tien andere centra wijken de teruggevonden percentages af van wat toegevoegd

**Tabel 1.** De gerapporteerde percentages van goed aangekleurde foetale cellen in testmonsters van foetale cellen in bloed van een volwassene en in een à-terme-navelstrengbloedje door tien centra met vijf verschillende Kleihauer-methoden

Percentage in testmonsters	Clayton	Clayton	Gamma	Gamma	Gamma	KB-Bartsch	Nierhaus-Betke	Nierhaus-Betke	Sigma	Sigma
0,05	0,05	0,09	0,12	0,10	0,06	0,02	0,10	< 1	0,08	0,00
0,15	0,17	0,14	0,26	0,25	0,13	0,12	0,53	< 1	0,08	0,20
0,47	0,19	0,37	0,28	0,60	0,29	0,23	0,78	< 1	0,45	0,60
1,02	0,88	0,91	1,12	1,40	0,39	0,39	1,30	1,67	0,87	1,24
1,81	1,55	1,71	2,46	2,00	0,66	1,90	2,30	2,33	1,53	1,84
3,46	2,43	2,66	4,16	4,25	1,99	2,82	2,82	8,33	2,21	3,68
100% NS*	96,2	91,2	88,8	96,5	98,3	86,7	96,8	86,3	89,8	85,0

\*NS = navelstrengbloed

was. In het traject tussen de 0,5 en 1,8 % worden door zeven van de tien centra meermalen te lage percentages teruggevonden. Naast de verschillen tussen de centra zijn er ook verschillen tussen en binnen dezelfde methoden. De uitslagen van 'Gamma' en 'Nierhaus-Betke' methoden kunnen bijvoorbeeld met meer dan 200% verschillen. Slechts één centrum geeft voor alle monsters vrijwel juiste waarden en twee geven te hoge uitslagen. Door geen van de centra wordt in de SOP aangegeven dat de gerapporteerde waarden (nog) gecorrigeerd moeten worden voor de percentages niet of slecht gekleurde foetale cellen (cellen met voornamelijk HbA) in het navelstrengbloed. Voor hetzelfde navelstrengbloedje varieerde tussen de centra het percentage slecht gekleurde en negatieve cellen tussen de 2 en 15%. Ook hier waren er binnen dezelfde methoden en tussen beoordelaars weer aanzienlijke verschillen.

Voor het berekenen van het volume van de FMT gaan acht centra uit van een circulerend bloedvolume van 5 liter bij de moeder ( $FMT = \% \times 50$ ). In één centrum wordt een waarde van 4 liter aangehouden en in één laboratorium wordt als volume voor FMT niet het totale volume aan foetaal bloed maar het aantal ml rode bloedcellen gegeven. Bij dit centrum wordt een grafiek gebruikt waarbij het aantal ml foetale rode bloedcellen wordt berekend vanuit het in vier banen getelde aantal cellen met een correctie voor de zwangerschapsduur afhankelijke foetale celgrootte en hematocriet (11). Hoewel hier in principe dus rekening gehouden wordt met celgrootte, wordt ook binnen deze berekening niet gecorrigeerd voor het percentage niet of slecht aangekleurde foetale cellen.

Voor elke 1 ml foetale rode bloedcellen moet aan de moeder een dosis van 20 µg of 100 IE anti-Rh(D) immunoglobuline gegeven worden (15). In tabel 2 zijn de volbloed FMTs weergegeven, berekend volgens de protocollen van de verschillende centra. Voor het centrum waar de FMTs als rode bloedcelvolume gegeven worden zijn waarden voor de volbloed FMTs gebaseerd op een maternale hematocrietwaarde van 0,40. Op basis van FMT-uitslagen (en de doseringen van 1000 en 375 IE) zou bij  $FMT > 20$  ml door vijf centra regelmatig en door twee centra incidenteel te weinig anti-Rh(D) immunoglobuline gegeven worden. Door drie centra wordt bij grote FMTs te veel immunoglobuline gegeven.

## Discussie

Binnen de internationale literatuur wordt regelmatig aangegeven dat de Kleihauer-Betke-test (KBT) onbetrouwbaar en niet te reproduceren is, zowel binnen als tussen klinieken (8, 16). Voor een aantal centra was dat de reden om over te gaan op flowcytometrie, te baseren op anti-HbF methoden. Zeker boven de 0,1% foetale cellen laat de flowcytometrie betrouwbaarder en reproduceerbare resultaten zien (16, 17). Een belangrijke beperking bij deze vorm van diagnostiek is echter dat lang niet elk ziekenhuis de beschikking heeft over de vereiste apparatuur en expertise. Zelfs binnen de elf geënquêteerde centra werd of wordt slechts door drie centra FACS analyse overwogen ter vervanging van de KBT.

De handmatige KBT, al dan niet als kit beschikbaar, is vooral nog de gebruikelijke methode. De laboratoria die aan dit onderzoek hebben meegedaan kunnen worden beschouwd als laboratoria binnen 'top centra'. De resultaten laten echter zien dat er sprake is van een ernstige discrepantie tussen de percentages in de testmonsters en de teruggevonden waarden. Behalve het verschil in telresultaat is er ook nog het verschil in het bepalen van het volume van de FMT. Dit soort verschillen in berekening van het volume van een FMT zal de variabiliteit tussen centra verder vergroten. Binnen de richtlijnen van het BCSH (9) wordt voor deze en andere foetale factoren gecorrigeerd. De gevonden percentages foetale rode bloedcellen te vermenigvuldigen met een factor 1,3 (correctie voor gemiddeld 10% niet-gekleurde foetale cellen (factor 1,1) x een correctiefactor (1,2) voor het verschil in MCV tussen foetale en volwassen rode bloedcellen). Een dergelijke correctie zal voor de meeste centra de kans op onderdosering verkleinen.

Is een nauwkeuriger schatting van het FMT-volume klinisch wel van belang? Standaard wordt voor postnatale RhD-immunoprofylaxe 200 µg of 1000 IE gegeven. Voor FMTs van minder dan een gecorrigeerde 0,4% ( $\pm 20$  ml volbloed) volstaat deze dosering. Een andere standaard dosering (375 IE) wordt alleen bij ingrepen tijdens de vroege zwangerschap gegeven. Het zou gezien de beperkte beschikbaarheid van anti-D-immunoglobuline van belang kunnen zijn om bij FMTs van minder dan 0,1% een lagere dosering te geven (de standaard lage dosering van 375 IE) maar

**Tabel 2.** Het volume van de foetomaternale transfusie (FMT), gebaseerd op de omrekeningsfactor (FMT factor 50) zoals gegeven in de verschillende SOP's of werkvoorschriften van tien centra. Standaard worden doses van 375 IE (aanvullende dosis) of 1000 IE anti-D-IgG per 20 ml (begindosis) gegeven. Een te lage dosering wordt met (-) aangegeven, overmaat met (+). Een gering tekort of teveel wordt aangegeven met (a), een tekort of te veel gelijk aan een standaarddosis met (b) en een groot tekort of veel te veel (meerdere doses van 1000 IE) met (c).

Volbloed FMT (ml)	Clayton	Clayton	Gamma	Gamma	Gamma	KB-Bartsch	Nierhaus -Betke	Nierhaus -Betke	Sigma	Sigma
2	3	4	6	5	2	1	5	<20	4	0
8	9	7	13	13	5	6	27	<20	4	10
24	10 <sup>-a</sup>	15 <sup>-a</sup>	14 <sup>-a</sup>	30 <sup>+a</sup>	12 <sup>-a</sup>	12 <sup>-a</sup>	39 <sup>+a</sup>	<20 <sup>-a</sup>	23	30 <sup>+a</sup>
51	44 <sup>-b</sup>	36 <sup>-b</sup>	56	70 <sup>+b</sup>	16 <sup>-b</sup>	19 <sup>-b</sup>	65 <sup>+a</sup>	84 <sup>+b</sup>	44 <sup>-a</sup>	62
91	78 <sup>-b</sup>	68 <sup>-c</sup>	123 <sup>+c</sup>	100	26 <sup>-c</sup>	95	115 <sup>+b</sup>	117 <sup>+b</sup>	77 <sup>-b</sup>	92
173	122 <sup>-c</sup>	105 <sup>-c</sup>	208 <sup>+c</sup>	213 <sup>+c</sup>	80 <sup>-c</sup>	141 <sup>-c</sup>	141 <sup>-b</sup>	417 <sup>+c</sup>	111 <sup>-c</sup>	184 <sup>-a</sup>

dan is een nauwkeuriger schatting wel een vereiste. FMTs van meer dan 20 ml worden bij ongeveer 1% van de bevallingen gezien (3, 18, 19). Binnen de richtlijn van de NVOG (3) wordt vermeld dat "*Niet-tegenstaande het huidige primaire preventie programma in sommige gevallen toch immunisatie kan optreden ten gevolge van..... onvoldoende dosering bij onverwacht grote FMT.*" Zoals de praktijk nu is zou een onvoldoende dosering een direct gevolg kunnen zijn van een onderschatting van het FMT. Bij een volgende zwangerschap zijn dan misschien een of meerdere intra-uteriene transfusies nodig.

Hoe nu verder? Dit oriënterend onderzoek zou uitgebreid kunnen worden tot een 'complete' analyse van de Kleihauers in Nederland. Er zou ook overwogen kunnen worden een nieuwe methode te introduceren die gebaseerd is op het gebruik van HbF-antilichamen en een analyse van de uitstrijkjes met behulp van fluorescentie microscopie. Ochenbein-Imhof et al. (20) geven aan dat de gevoeligheid van deze microscopische methode vergelijkbaar is met die van de KBT en de reproduceerbaarheid met die van de flowcytometrie.

Op korte termijn moet echter meer gedacht worden aan de voor de hand liggende optie: het gebruikmaken van de richtlijnen van het BCSH met daarbij de aanbevolen standaard-methoden: de oorspronkelijke KBT uit 1960 of de snelle Nierhaus-Betke methode (ook als commerciële kit beschikbaar: Clintech Health Care Ltd, Dublin, Ierland)). De richtlijnen van het BCSH geven verder aan dat (a) bij alle FMTs > 0,1% foetale cellen bij voorkeur ook flowcytometrisch wordt geanalyseerd en dat (b) bij een grote FMT twee dagen na het geven van anti-RhD immunoglobuline opnieuw een KBT gedaan wordt. De effectiviteit van de dosis Anti-D wordt aldus gecontroleerd en er kan vervolgens eventueel bijgegeven worden. Daarnaast is voor verbetering van de KBT een kwaliteitscontrolesysteem met rondzendingen zeer gewenst (via de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek?).

#### Dankwoord

Ik bedank alle betrokkenen. Zonder de welwillende medewerking van de laboratoriumhoofden en medewerk(st)ers van de afdelingen Klinische Chemie/Hematologie van het AMC-UVA (dr. J.H. Klinkspoor, ing. M. Heckman), AZG (Groningen dr. R.H.J. Bruijns), AZM (Maastricht, ing. C. Jöbses), Erasmus MC-Sophia (Rotterdam, dr. Y.B. de Rijke, ing. A. Weenink), Isala Klinieken Zwolle (dr. W.B. Schepers), Maxima Medisch Centrum (Veldhoven, dr. P.H.M. Kuijper), het Onze Lieve Vrouwen Gasthuis, (Amsterdam, dr. A. Leyte, ing. L.H.M. Ketelaar), UMCU (Utrecht, dr. A. Huisman), UMCN St Radboud (Nijmegen, ing. W. van der Meer) en het VU Medisch Centrum (Amsterdam, dr. A.A. Bouman, ing. M. Metgod) was dit werk niet mogelijk geweest. Tot slot bedank ik mijn 'oude' analisten, mevr. Godelieve de Groot, mevr. Carin Kleijburg en de heer Albert Naipal voor hun werk.

#### Literatuur

1. Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion* 1990; 30: 344-357.

2. Obstetrische Werkgroep Otterlo (Vandenbussche FPHA, Klumper FJCM, Brand A, Overbeeke MAM). Erythrocyten-immunisatie en zwangerschap. Maart 2003 Richtlijn 50 NVOG (<http://www.nvog.nl>).
3. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalen Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutaustriebe. *Klin Wochenschr* 1957; 35: 637-638.
4. Kleihauer E, Betke K. Praktische Anwendung des Nachweises Hb F-haltiger Zellen in fixierten Blutaustriebe. *Internist* 1960; 1: 292-295.
5. Bromilow IM, Duguid JKM. Measurement of fetomaternal haemorrhage: a comparative study of three Kleihauer techniques and two flow cytometric methods. *Clin Lab Haem* 1997; 19: 137-142.
6. Duguid JKM, Bromilow I. Value of Kleihauer testing after administration of anti-D immunoglobulin. *Brit Med J* 1994; 309: 240.
7. Duckett JRA, Constantine G. The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? *Brit J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 845-846.
8. Raafat A, Fraser N, Main R, Urbaniak SJ. A quality assurance scheme for the Kleihauer test: the Scottish experience 1988-1996. *Transfusion Med* 1997; 7: 221-226.
9. BCSH Blood Transfusion and General Haematology Working Party. Guidelines: the estimation of fetomaternal haemorrhage. *Transfusion Med* 1999; 9: 67-92
10. Bartsch FK. Fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut und Immunoprophylaxe der Rh-Immunisierung. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1972; Suppl 20: 9-25.
11. Nierhaus K, Betke K. Eine vereinfachte Modifikation der sauren Elution für die cytologische Darstellung von fetalem Hämoglobin. *Klin Wochenschr* 1968; 46: 47.
12. Clayton EM, Foster EB, Clayton EP. New stain for fetal erythrocytes in peripheral blood smears. *Obstet Gynecol* 1970; 35: 642-645.
13. Popat N, Wood WG, Weatherhall DJ, Turnbull AC. Pattern of maternal F-cell production during pregnancy. *Lancet* 1977; 310: 377-379.
14. Los FJ. Serum-AFP-screening van zwangeren op foetale neueraalbuiseffecten. *Academisch Proefschrift Groningen* 1980.
15. Pollack W, Ascari WQ, Kochesky RJ, O'Connor RR, Ho TY, Tripodi D. Studies on Rh prophylaxis. 1: Relationship between doses of anti-Rh and the size of antigenic stimulus. *Transfusion* 1971; 11: 333-339.
16. Bayliss KM, Kueck BD, Johnson St, Fueger JT, McFadden PW, Mikulski D, Gottschall JL. Detecting fetomaternal hemorrhage: a comparison of five methods. *Transfusion* 1991; 31: 303-307.
17. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal haemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion* 1998; 38: 749-756.
18. David M, Smidt J, Chen FCK, Stein U, Dudenhausen JW. Risk factors for fetal-to-maternal transfusion in RhD-negative women; results of a prospective study on 942 pregnant women.
19. UK-NEQAS. Report on the FMH Questionnaires October 2003.
20. Ochenbein-Imhof N, Ochenbein AF, Seifert B, Huch A, Huch R, Zimmermann R. Quantification of fetomaternal hemorrhage by fluorescence microscopy is equivalent to flow cytometry. *Transfusion* 2002; 42: 947-953.

#### Summary

*The determination of fetomaternal transfusion with Kleihauer methods; an orienting search among 11 Dutch laboratories. Egberts J. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 245-249*

Using a questionnaire, information was requested from eleven medical centers on the methods used for Kleihauer testing. Ten

centers participated in analyzing test samples of fetal and adult blood mixtures with 0.05-3.46% fetal cells. Five different methods are in use and three of these are available as commercial kits. The number of cells, examined according to the different protocols ranged between 300 and > 200.000. Furthermore, three different methods are used for the calculation of the fetomaternal transfusion or hemorrhage volume (FMT). The results of the test samples differ between the centers and methods. Occasionally, results differed over 200%. In cord

blood, the percentage of unstained, negative cells varied between 2 and 15 percent. The volumes of the FMT, calculated from the test samples results, were not corrected for this effect. Therefore, the FMH volume is often underestimated and this may result in inadequate anti-D immunoprophylaxis. Following the BCSH guidelines and using a quality assurance scheme may improve the quality of the Kleihauer test outcomes.

*Keywords: Fetomaternal transfusion; Kleihauer-Betke test*

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 249-254

## Enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten in gedroogde bloedspots

G.J.G. RUIJTER, N. EL BOUYAKOUBI, R. de VRIES en B.J.H.M. POORTHUIS

Enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten wordt doorgaans uitgevoerd in leukocyten of plasma. Recent zijn methoden ontwikkeld voor activiteitsmeting van lysosomale enzymen in een nieuw type monster, gedroogde bloedspots (DBS). In dit artikel beschrijven we de invoering van DBS in de lysosomale enzymdiagnostiek in ons laboratorium. Van 15 lysosomale enzymen kon de activiteit betrouwbaar in 3 mm DBS-ponsjes gemeten worden en werden referentiewaarden vastgesteld. Inter-assay-CV's varieerden van 6 tot 14% voor de verschillende enzymen. Alle enzymen hadden tenminste 85% restactiviteit na 1 maand opslag bij 20-25 °C. Lysosomale enzymen zijn derhalve opvallend stabiel in DBS, hetgeen een groot voordeel kan zijn bij verzending. Niet alle lysosomale enzymen zijn meetbaar in DBS en dit type analyse kan daarom de bepaling in leukocyten nog niet vervangen. DBS zijn echter zeer geschikt voor gerichte onderzoeksvragen waarbij een beperkt aantal lysosomale enzymen bij een patiënt getest dient te worden.

*Trefwoorden: lysosomale stapelingsziekten; gedroogde bloedspot; enzymdiagnostiek; 'Guthrie card'*

Het gebruik van gedroogde bloedspots op filtreerpapier (dry blood spot; DBS) in de routine diagnostiek is met name bekend uit neonatale screening programma's. Met deze 'Guthrie-kaarten' worden in Nederland pasgeborenen getest op aanwezigheid van drie erfelijke aandoeningen, te weten fenylketonurie (PKU), congenitale hypothyreoïdie (CHT) en adrengenitaal syndroom (AGS). In sommige andere landen zijn meer uitgebreide screeningsprogramma's geïm-

plementeerd en wordt b.v. ook getest op erfelijke stoornissen in het aminozuurmetabolisme en/of de vetzuroxidatie.

Voor alle bovenbeschreven aandoeningen wordt in de DBS gezocht naar afwijkende concentraties van metabolieten. Bepaling van enzymactiviteiten in DBS is minder gangbaar. Slechts enkele tests zijn beschreven zoals voor bepaling van glucose-6-fosfaatdehydrogenase (1) en biotinidase (2). Recent is duidelijk geworden dat DBS ook geschikt zijn als monster voor meting van een groot aantal lysosomale enzymen (3-5). Voor de diagnostiek van lysosomale stapelingsziekten is de meting van de activiteit van lysosomale enzymen noodzakelijk (6). De lysosomale stapelingsziekten vormen een heterogene groep van erfelijke aandoeningen, waarbij er als gevolg van de deficiëntie van een lysosomaal enzym een defect is in de afbraak van macromoleculen zoals glycosaminoglycanen, glycolipiden en oligosacchariden afkomstig van glycosyleerde eiwitten (6, 7).

Tot nu toe wordt enzymdiagnostiek van lysosomale stapelingsziekten uitgevoerd in leukocyten, plasma en in een enkel geval gekweekte huidfibroblasten. Vanwege de zeldzaamheid en het erfelijke karakter van lysosomale stapelingsziekten vindt enzymdiagnostiek slechts plaats in een klein aantal gespecialiseerde laboratoria verbonden aan de klinisch-genetische centra. Hierdoor is het over het algemeen noodzakelijk bloedmonsters te verzenden en om verlies van enzymactiviteit gedurende verzending te voorkomen wordt dit meestal per koerierdienst gedaan. Desondanks ondervinden wij regelmatig dat bloedmonsters bij ontvangst te oud zijn om nog leukocyten uit te kunnen isoleren. In de literatuur wordt beschreven dat lysosomale enzymen zeer stabiel zijn in DBS (3-5) en de bloedspot zou daarom een nuttig extra type monster kunnen zijn. In dit artikel beschrijven we de mogelijkheden en beperkingen van meting van lysosomale enzymen in gedroogde bloedspots en de implementatie van dit nieuwe type monster in ons laboratorium.

*Laboratorium Metabole Ziekten, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden*

Correspondentie: dr. G.J.G. Ruijter, Laboratorium Metabole Ziekten, LUMC, Gebouw 1, P3-P, Postbus 9600, 2300 RC Leiden  
E-mail g.j.g.ruijter@lumc.nl