Resultaten enquête HbF

ien Kemna klinisch chemicus aandachtsgebied hematologie
T/ZGT/SXB Unilabs

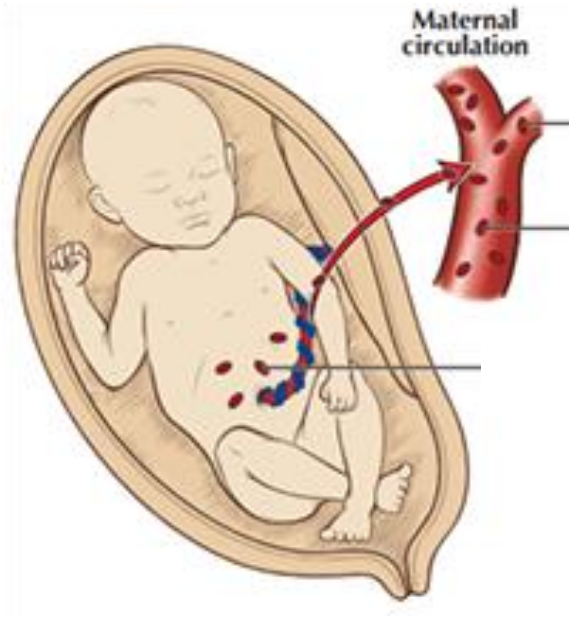
Aanleiding voor de HbF enquête

- Gebruik en uitvoering van HbF bepaling lijkt in de praktijk zeer divers.
- Enquête opgesteld om meer inzicht te krijgen in wanneer en hoe deze diagnostiek wordt uitgevoerd door de verschillende laboratoria.
- We hopen zo een beter beeld te krijgen en mogelijk tot aanbevelingen te komen met betrekking tot de HbF bepaling bij vraagstelling FMT.

27 laboratoria hebben gereageerd, waarvoor dank!

HbF bepaling

- Doel: Aantonen foetomaternale transfusie
- Het bepalen van de hoeveelheid FMT kan belangrijk zijn voor:
  - Bepaling van aantal ml anti-D (1000 IE anti-D Ig 20 ml D positief volbloed (= 10 ml EC concentraat)
  - Indicatie van de invloed op de foetale conditie



!AUTORISATIEFASE!

ERYTROCYTENIMMUNISATIE EN ZWANGERSCHAP

Tabel 1: Indicaties voor toediening van anti-D-profylaxe aan RhD-negatieve zwangeren (indicatie vervalt bij vastgestelde RhD-negatieve foetus en/of als er reeds RhD-antistoffen gevormd zijn).

Stomp buiktrauma in de graviditeit	Bereken de dosis anti-D[3] en geef alvast 1000 IU
Risico op grote FMT rondom geboorte positief kind: • Abruptio placentae	Bereken de dosis anti-D[3] en geef alvast 1000 IU
Neonatale anemie ten gevolge van foetomaternale transfusie[3]	Bereken de dosis anti-D[3] en geef alvast 1000 IU

(3) Neem vóór anti-D-toediening bloed af voor bepaling van de FMT. In deze gevallen wordt aanbevolen de mate van FMT te objectiveren (zie ook onder 'bepalen van FMT'). Bij meerlingen of wanneer het objectiveren van de FMT niet mogelijk is, dient een dubbele dosis anti-D te worden gegeven. Het bepalen van FMT wordt besproken in hoofdstuk 3.

Postpartum toediening van anti-D-profylaxe dient binnen 48 uur plaats te vinden, waarbij in ieder geval één ampul gegeven moet worden. Diagnostiek naar de hoeveelheid FMT en dientengevolge eventuele verhoging van de dosering anti-D-profylaxe dient binnen 72 uur post partum afgerond te worden [2, 12, 15, 31]. Toediening na 48 uur is waarschijnlijk minder effectief, maar nog tot 13 dagen bewezen zinvol en wordt tot een maand na expositie aanbevolen [12, 46, 47].
Als er tijdens de zwangerschap RhD-antistoffen zijn gevonden, dan hoeft er geen ampul meer gegeven worden.

Cito indicatie HbF?

- Rol van cito HbF bij stomp buiktrauma zwangere
- Uitkomst na trauma hangt onder andere af van:

zwaarte/type trauma

ligging van placenta

zwangerschapstermijn

- Voor controle foetale conditie kan HbF ondersteunend zijn, maar (bijna) nooit leidend. Daarvoor is transabdominale echo, controle placenta, vruchtwater en CTG belangrijker.

Veel ziekenhuisprotocollen nog cito kleihauer, de indicatie daarvoor is eigenlijk (bijna) altijd anti-D toediening. En moet <48 uur (min. 1 spuit) en <72 uur voor evt ophoging.

Poll gedaan door gyneacoloog Meander onder ca 30 gyneacologen

3 vragen over foetomaternale transfusie

Selecteer één of meer

1A bepalinf middels Kleihauer Betke — 26

1B bepaling middels flowcytometrie — 7

2A altijd met spoed bepaald ook buiten kantoortijden — 10

2B alleen bepaald binnen kantoortijden — 9

2C binnen kantoortijden, maar ook op zaterdag en zondag — 14

3A bij indicatie buiktrauma — 30

3B alleen bij ernstig buiktrauma — 5

3C bij IUVD eci — 30

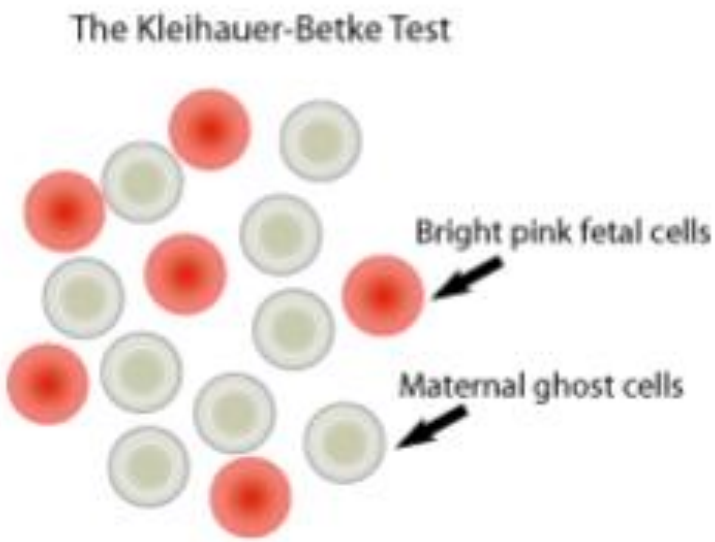
3D anders, namelijk — 1

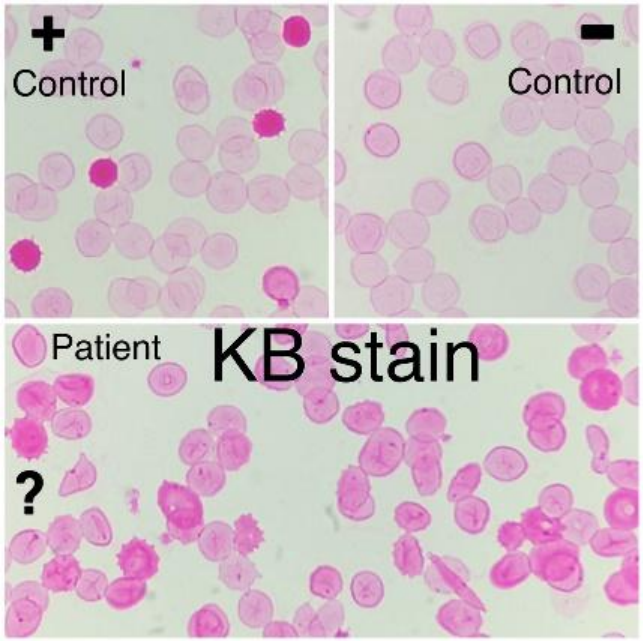
Discussie ging vooral over wel/niet bij D+ bepalen en wel/niet bij mild trauma.
De gemene deler was dat je het altijd moest bepalen en ook bij mild trauma.

Twee methodes KB en flow

Kleihauer Betke (KB):

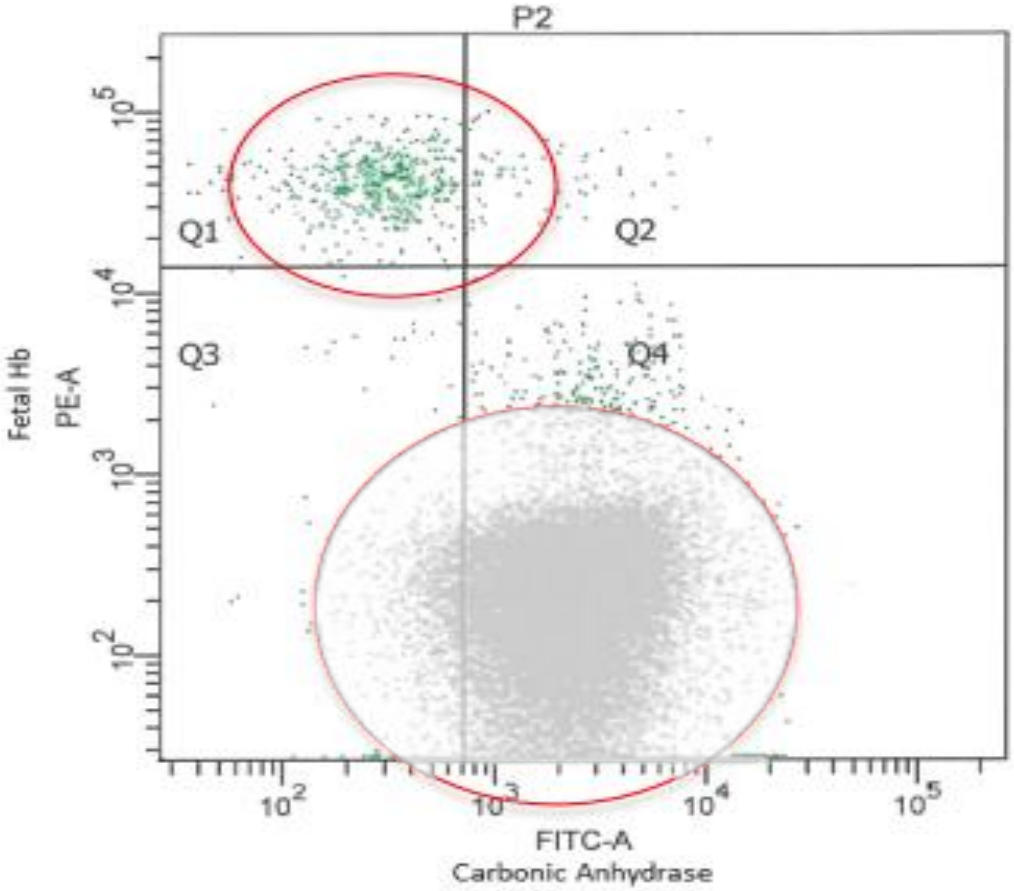
- Uitstrijkje van bloed van de moeder
- Glaasje wordt gewassen in zuur en dan gekleurd
- HbF wordt niet weggewassen, maar HbA wel
- Foetale cellen zijn helder roze, volwassen cellen niet.





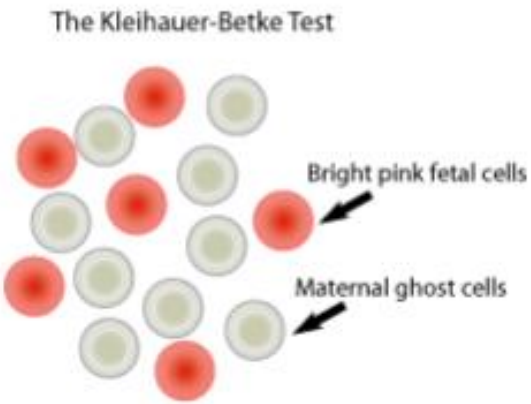
Flowcytometrische foetale cell count (FCC)

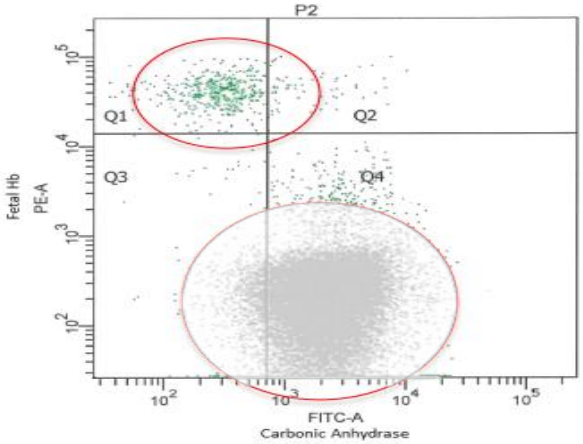
Gestandaardiseerd, betrouwbare kwantificatie, >100.000 cellen.
Maar blijft een specialistische test



Kleihauer en/of flowcytometrie

- Literatuur laat wisselende resultaten zien, maar over het algemeen is de FCC meer betrouwbaar.
- Kleihauer is goed alternatief voor de meer betrouwbare FCC, met name in de 24/7 setting.





!AUTORISATIEFASE!

ERYTROCYTENIMMUNISATIE EN ZWANGERSCHAP

Bepalen van een foetomaternale transfusie (FMT)

Het bepalen van de hoeveelheid FMT kan om twee redenen geïndiceerd zijn:

1. Om vast te stellen of de foetale conditie risico loopt;
2. Om de hoeveelheid circulerende RhD-positieve erytrocyten te bepalen en om de dosering toe te dienen anti-D-profylaxe ter voorkoming van immunisatie vast te stellen.

Opgetreden FMT kan bepaald worden middels een Kleihauer Betketest (KBT) of met behulp van flowcytometrie. Onderzoek laat zien dat de flowcytometrie betere testeigenschappen heeft en in steeds meer laboratoria beschikbaar is (Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek, werkgroep benigne hematologie)[41-44].

Met beide methoden wordt een uitslag in percentage foetale cellen verkregen. Dit moet gerapporteerd worden door het testlaboratorium in milliliter (mL) foetaal bloed. Indien dit niet gerapporteerd wordt, neem dan contact op met de lokale klinisch chemicus. Bij FMT >20 mL dient men de anti-D profylaxe-dosis te berekenen (1000 IU per 20 mL RhD-positief bloed) [3, 45]. Zie ook tabel 1 voor situaties waarin mogelijke FMT kan optreden.

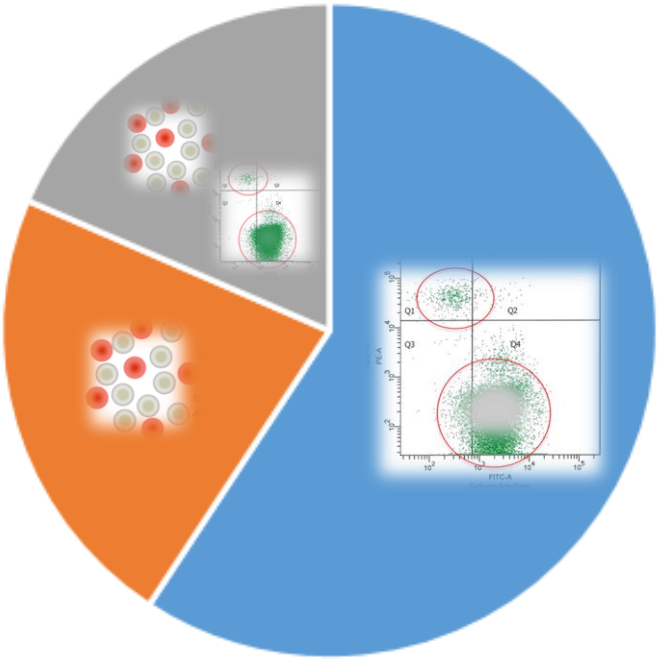
Resultaten 2023

N=27

Flow 16

Kleihauer 6

Beide 5



Uitgangspunt van vrijwel alle laboratoria: Binnen kantoortijden, maar 24/7 beschikbaar indien cito indicatie en na overleg

Laboratoria welke beide doen

- Eerst Kleihauer, indien dubieus/pos bevestigen met flow
- Altijd flow naar extern, indien spoed zelf Kleihauer
- Kantoortijden flow, indien cito Kleihauer

Kleihauer vervolgvragen (n=10) *

Methode:

- 4/10 Nierhaus Betke
- 2/10 Sigma Kit
- 1/10 Sure-Tech Fetal Hb
- 3/10 onbekend

erythrocyten

- 3/10 telt 1000 eryhtrocyten
- 1/10 telt 10000 erythrocyten
- 2/10 telt 30 gezichtsvelden (40x obj)
- 2/10 telt op basis van leucocyten
- 2/10 onbekend

analisten

- 4/10 1 analist
- 3/10 2 analist
- 1/10 1 gespecialiseerde of 2 basis
- 2/10 onbekend

Externe rondzending

- 3/10: lokale rondzending
- 3/10: geen externe rondzending
- 2/10: SKML FMT
- 2/10: onbekend

* Lab welke verstuurd eruit gehaald

Flowcytometrie n=17*

Allen IQ products

- 11 Fetal Cell Count, onderscheid foetaal maternaal dmv carboanhydrase

- 6 QuickQuant van IQ products, onderscheid tussen foetal en maternaal dmv fluorecentie of geen onderscheid

* Laboratoria welke het zelf uitvoeren 21 vd 27 laboratoria biedt de flowcytometrische test aan, 17/21 doen de test zelf

Minimaal # cellen

N	Minimaal # cellen
2	10.000
7	100.000
2	200.000
1	250.000
1	300.000
2	500.000

Zowel QuickQant en FCC

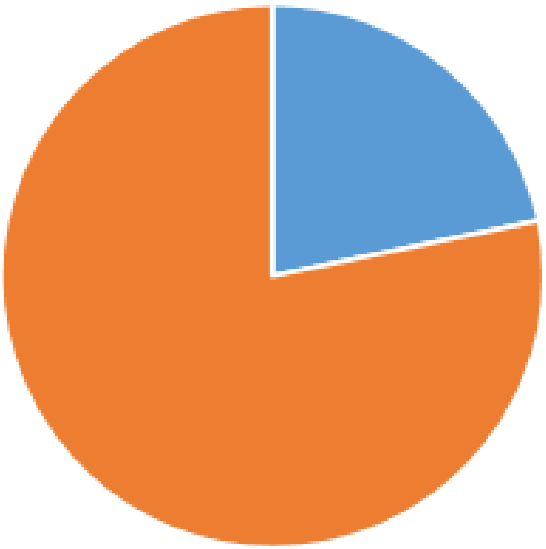
Measure at least 100,000 events.

Detection limit – The detection limit of the assay is based on the measurement of artificial mixtures and determined to be 0.014% when 100.000 cells are evaluated. Accuracy is improved when the number of events is increased.

Volume berekening bij positieve uitslag?

Volume wordt niet berekend n=5

Ja, verschillende formules n=18



Ca 12 verschillende formules?

Aantal ml foetaal bloed

= ‰HbF x 5 (n=4)

= 2 x 18 x 1,22 x %HbF (n=2) (ook formule uit SKML rondzending)

= Bloedvolume moeder (ml) x (ht moeder/ht kind) x ‰HbF

= (# HbF/10.000)* 0.5

= (aantal fRBC)/(aantal maternale RBC*1800*1.22)

= (5000 mL * 0.35 * %HbF) / 0.5

= 1,3 * ‰HbF* bloedvolume moeder (L)

= ‰HbF x 5000

= % HbF x 72 x G (kg)/100

= % HbF x G (kg)

= Mollison, 1972

= methode Quick Quant

Advies/commentaar bij uitslag?

- Nee, alleen bij een ruime meerderheid het aantal ml bloed.
- Eenmaal pop-up bij aanvraag of er sprake is van verhoogd HbF. En enkele een opmerking over contact aanvrager over # spuiten

Aanvullende diagnostiek

- Met uitzondering van 1 laboratorium wordt er geen aanvullend onderzoek uitgevoerd.
- Eén lab voert AFP in vruchtwater uit

- Aanwijzingen uit literatuur dat AFP en hapto in bloed bij moeder kan FMT ondersteunen bij sterke verdenking FMT icm vals negatieve uitslag door ABO incompatibiliteit

Establishing the Cause of Anemia in a Premature Newborn Infant G. den Besten, et al. Laboratory Medicine 49:3:e74-e77

Conclusies

- Flowcytometrische bepaling van HbF breed beschikbaar binnen kantoortijden. Rapportage standaard binnen 24-48 uur, maar ook cito beschikbaar in overleg met ddKC.

- Versturende laboratoria in overleg met uitvoerende lab

- Inrichting HbF bepaling gericht op een pos/neg uitslag:
  - Cito, in kader van foetale toestand en directe klinische besluitvorming
  - Binnen 48 uur, in kader van anti-D toediening.

- Exacte kwantificatie voor evt. ophoging van anti-D dosering mag na 72 uur.

Aanbevelingen

- Aanbeveling om altijd ml foetaal bloed te rapporteren, dit komt ook in leidraad

- Aanbeveling: landelijke een eenduidige formule voor de omrekening van percentage FMT naar volume en dit samen met de NVOG op te pakken.

Bedankt voor jullie aandacht!

Mollison, 1972

This is calculated using the following formula (Mollison 1972), which assumes that:

- The maternal red cell volume is 1800mL
- Fetal cells are 22% larger than maternal cells
- Only 92% of fetal cells stain darkly

The fetal bleed should be calculated as follows:

$$\frac{\text{NUMBER OF FETAL CELLS PER HIGH POWER FIELD}}{\text{NUMBER OF MATERNAL CELLS PER HIGH POWER FIELD}} \times 1800 \times \frac{122}{100} \times \frac{100}{92}$$

OR CAN BE SIMPLIFIED TO:

$$\frac{\text{NUMBER OF FETAL CELLS PER HIGH POWER FIELD}}{\text{NUMBER OF MATERNAL CELLS PER HIGH POWER FIELD}} \times 2400$$

For example, if the number of fetal cells is 9 and maternal cells 2000, then the fetal bleed will be calculated to be:

$$\frac{9}{2000} \times 2400 = 10.8 \text{ mL PACKED FETAL RED CELLS}$$