



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Anemia of prematurity : time for a change in transfusion management?

Khodabux, C.M.

Citation

Khodabux, C. M. (2013, May 28). *Anemia of prematurity : time for a change in transfusion management?*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20910>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20910>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20910> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Khodabux, Chantal Muriel

Title: Anemia of prematurity : time for a change in transfusion management?

Issue Date: 2013-05-28

Samenvatting

Te vroeg geboren baby's worden vaak behandeld met rode bloedcel (RBC) transfusies vanwege bloedarmoede.¹ Deze RBCs zijn afkomstig van gezonde volwassen donoren. In de literatuur wordt een relatie gelegd tussen deze transfusies en nadelige neonatale klinische uitkomsten.²⁻⁶ Een causaal verband is echter tot nu toe niet bewezen.⁷

De invoering van nationale bloedtransfusierichtlijnen heeft er toe geleid dat het aantal toegediende RBC transfusies aan te vroeg geboren baby's significant is verminderd.⁸⁻¹⁰ De achtergrond van deze transfusierichtlijnen is echter empirisch; wetenschappelijke ondersteuning voor het gebruik van de geadviseerde transfusiedrempels en transfusievolume ontbreekt. Resultaten van studies naar het gebruik van meer restrictieve en liberale transfusiedrempels toonden dat een restrictiever transfusiebeleid leidde tot minder toegediende transfusies.¹¹⁻¹³ De klinische uitkomsten van een restrictief of meer liberaal transfusie beleid waren echter minder eenduidig. Eén studie toonde dat een restrictief transfusiebeleid leidde tot meer neurologische problemen op de korte termijn.¹¹ Alhoewel een liberaal transfusiebeleid geassocieerd was met een mogelijke betere neuro-motore ontwikkeling op de gecorrigeerde leeftijd van 18-21 maanden, bleek daarentegen dat dit beleid ook geassocieerd is met een kleiner hersenvolume en een minder goed cognitief profiel op de schoolgaande leeftijd.¹⁴⁻¹⁶ Interpretatie van deze resultaten is niet eenvoudig. De methoden om de ontwikkeling op de jonge kinderleeftijd te testen hebben een lage voorspellende waarde voor het cognitief functioneren op de schoolgaande leeftijd, waarbij geen relatie is gevonden tussen perinatale hersenschade en cognitief functioneren op 12 jarige leeftijd.¹⁷⁻¹⁸ Toekomstige studies zullen moeten laten zien wat de invloed is van RBC transfusie op cognitieve uitkomsten.

Andere onderzochte methoden in de strijd tegen bloedarmoede bij te vroeg geboren enen zijn het gebruik van recombinant humaan Erytropoëetine (EPO), vermindering van het bloedverlies door afname voor diagnostiek en later afnavoren na een vroeggeboorte. Het gebruik van recombinant humaan EPO bij te vroeg geboren baby's is niet doelmatig en effectief gebleken.¹⁹⁻²¹ Daarentegen leidden zowel minder bloedafnamen voor diagnostiek als later afnavoren wel degelijk tot minder toegediende transfusies, alhoewel RBC transfusie niet volledig kon worden voorkomen.²²⁻²³

Kortom, het gebruik van allogene RBC transfusies aan te vroeg geboren baby's is significant verminderd. Aangezien te vroeg geboren enen een steeds betere overleving hebben, is het belangrijk om zowel de korte als de lange termijn effecten van deze transfusies in kaart te brengen.

In dit proefschrift hebben we in twee Nederlandse neonatale intensive care units (NICU's) transfusie effecten en uitkomsten in kaart gebracht. Daarnaast hebben we onderzocht of RBCs uit eigen navelstrengbloed als alternatief gebruikt kunnen worden voor het standaard donor RBC product.

Neonataal transfusie beleid in Nederland

De Nederlandse bloedtransfusierichtlijn is opgesteld door het CBO Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg.²⁴ In deze richtlijn worden aanbevelingen gedaan voor de transfusiedrempel, maar geen eenduidig advies gegeven voor de transfusietarget, te bereiken door een lager of

hoger transfusievolume per kg lichaamsgewicht. Daarom hebben we in twee Nederlandse NICU's onderzoek gedaan naar de effecten van een verschillend transfusie volume (15ml/kg vs 20 ml/kg) op de neonatale uitkomsten. Beide centra hanteerden de Nederlandse transfusierichtlijn en gebruikten hetzelfde transfusieproduct. Desondanks zagen we grote verschillen. Het percentage te vroeg geboren baby's dat werd behandeld met transfusies was duidelijk hoger in het centrum dat een volume van 20 ml/kg hanteerde (77% van de baby's) in vergelijking met het andere centrum (59% van de baby's). Dit werd vooral bepaald door een groot verschil in getransfundeerde baby's geboren na 28 tot 32 weken zwangerschapsduur (74% versus 49 %). Bij de jongere prematuren geboren vóór 28 weken zwangerschapsduur werd een vergelijkbaar aantal baby's behandeld met RBC transfusies. Ondanks het gebruik van de nationale richtlijn waren er sterke aanwijzingen dat frequent transfusies werden toegediend op klinische gronden ondanks dat de aanbevolen transfusiedrempel niet was bereikt.

Het effect van een verschillend transfusievolume was niet eenduidig. Bij de jongere baby's geboren vóór 28 weken zwangerschapsduur, resulteerde het hogere volume niet in een geringer aantal transfusies. Bij de baby's geboren tussen 28-32 weken zwangerschapsduur zagen we bij transfusie met 20 ml per kg een vermindering van één transfusie episode per kind.²⁵

In 2011 werd de CBO richtlijn voor bloedtransfusie toediening herzien. De belangrijkste wijzigingen in de richtlijn zijn als volgt; de aanbeveling om laat af te navelen (30 tot max. 180 sec) indien klinisch mogelijk is opgenomen in de richtlijn; de transfusie drempel van 8 mmol/l voor de eerste 24 uur na geboorte is verlaten, en het aanbevolen transfusievolume per kg lichaamsgewicht is veranderd naar 15 mL/kg lichaamsgewicht in plaats van de eerder aanbevolen range van 10 tot 15 mL/kg lichaamsgewicht.²⁶

Deze verschillen in transfusiebeleid staan niet op zichzelf. Ook in andere landen is gebleken dat er ondanks de invoering van een nationale transfusierichtlijn belangrijke verschillen bestaan in de praktijk.²⁷⁻²⁹ Voorstellen om de compliantie van de zorgverlener te vergroten omvatten onder andere het gebruik van een elektronisch transfusieproduct bestel- en monitorsysteem en het implementeren van de klinische beoordeling van de zorgverlener binnen de richtlijn.³⁰⁻³¹ Met het oog op de aangetoonde verschillen met betrekking tot het stellen van de transfusie indicatie en het effect van het gebruikte transfusie volume op de blootstelling aan donorbloed, is het belangrijk om uit te zoeken welke aanpassing bijdraagt aan de beste compliantie.

Transfusie effecten op neonatale klinische uitkomsten

Korte en lange termijn klinische uitkomsten

In bovengenoemde neonatale cohorten hebben we gekeken naar de invloed van het aantal RBC transfusies en het toegediende transfusievolume op zowel korte als lange termijn neonatale uitkomsten. Op de korte termijn zagen we geen verschillen tussen beide groepen met betrekking tot frequentie van overlijden, hersenbloedingen, prematuren retinopathie en bronchopulmonaire

dysplasie, ondanks dat er in één centrum een significant grotere groep kinderen werd behandeld met RBC transfusies en een groter transfusievolume.²⁵

Er is weinig bekend over de relatie tussen RBC transfusie en neonatale uitkomsten op de langere termijn. Zoals eerder genoemd is de literatuur niet eenduidig.¹⁴⁻¹⁶

Wij hebben de relatie tussen transfusie volume en neuro-motore ontwikkeling geëvalueerd in twee groepen extreem te vroeg geboren baby's, geboren vóór 28 weken zwangerschapsduur. Het aantal toegediende transfusies was vergelijkbaar tussen beide groepen. We vonden geen verschil in neuro-motore ontwikkeling op de gecorrigeerde leeftijd van (mediaan) 24 maanden bij een groter of kleiner toegediend transfusievolume. Echter, onze studie had een aantal beperkingen waaronder een relatief kleine studiepopulatie, verschillen in evaluatie methoden en het observationele karakter van de studie.³² Het kan dus niet worden uitgesloten dat het totale volume van een RBC transfusie invloed heeft op de neuro-motore ontwikkeling van extreem te vroeg geboren kinderen. Goed opgezette gerandomiseerde klinische studies zijn essentieel om dit verder te kunnen onderzoeken.

Het effect van RBC transfusie op EPO

Meerdere (oudere) studies hebben laten zien dat RBC transfusies bij premature pasgeborenen de endogene EPO productie kunnen onderdrukken. Dit EPO onderdrukkend effect werd echter pas na een aantal weken postnataal gemeten, wanneer de kinderen al een groot aantal transfusies hadden gekregen.³³⁻³⁶

Het huidige neonatale transfusie beleid is aanzienlijk anders dan in deze oudere studies. Dankzij de invoering van nationale transfusierichtlijnen, met aanbevolen transfusiedrempels, is het aantal toegediende RBC transfusies significant gedaald.⁸⁻¹⁰ Dit heeft ertoe geleid dat de meeste transfusies worden toegediend in de eerste maand na geboorte.

Meerdere dierexperimentele studies hebben laten zien dat EPO neuro-protectieve eigenschappen heeft.³⁷⁻³⁸ Een restrictiever transfusiebeleid zou in theorie de endogene EPO productie minder onderdrukken en kunnen bijdragen aan betere neuro-protectie en het voorkomen van hersenschade op de langere termijn. Om deze theorie te ondersteunen zouden we meer moeten weten van EPO waarden bij te vroeg geboren baby's. Volwassenen zonder bloedarmoede hebben EPO waarden tussen de 2.6 – 18.5 mU/mL.³⁹ Kinderen (tussen 1 maand -16 jaar) hebben iets hogere EPO waarden, tussen de 9.1-27.6 mU/mL.⁴⁰⁻⁴² Van te vroeg geboren baby's geboren hebben we beperkt beschikbare gegevens.

We hebben daarom bij 46 prematuur geboren baby's EPO concentraties gemeten in plasma. We hebben alleen spijtmateriaal gebruikt, dat wil zeggen, bloed wat over was van bloedafnamen voor reguliere diagnostiek. Hierdoor waren we alleen in staat om vooral in de eerste maand na geboorte onze metingen te verrichten, omdat enerzijds veel kinderen daarna werden overgeplaatst naar ziekenhuizen elders, en anderzijds omdat in de eerste maand de meeste bloedtesten worden verricht. De kinderen kregen in deze periode geen rh-EPO toegediend. De baby's die

wel transfusies kregen toegediend hadden hogere EPO waarden dan de niet-getransfundeerde te vroeg geboren zuigelingen. Dit reflecteert de diepere bloedarmoede bij deze kinderen en mogelijk een compensatoire EPO respons op deze anemie. Anderzijds is ook bekend dat EPO een marker is voor stress. Ook klinisch zieker zijn zou dus in theorie kunnen bijdragen aan een hogere EPO productie. De waarden laten zien dat vroege transfusies in de eerste levensmaand de EPO productie niet duidelijk onderdrukken.

Navelstrengbloed voor transfusiedoeleinden

Het afnemen van navelstrengbloed

Navelstrengbloed kan afgenomen worden vóór (*in utero*) of na (*ex utero*) de geboorte van de placenta. *In utero* afname van navelstrengbloed leidt tot aanzienlijk hogere bloedvolumes, zowel na een vaginale bevalling als na een keizersnede.⁴³⁻⁴⁶ Daarnaast is het vroeg afklemmen van de navelstreng ook een belangrijke factor die bijdraagt aan een groter volume van de bloedafname.⁴⁷ Bacteriële contaminatie komt voor in 0 tot 9% van de navelstrengbloedafnames.⁴⁸⁻⁵²

Het verwerken en bewaren van navelstrengbloed voor transfusiedoeleinden

Navelstrengbloed kan met behulp van centrifugatie bewerkt worden tot een RBC concentraat.^{49,53} Ook zonder centrifugeren is scheiding van RBCs uit navelstrengbloed mogelijk. Deze techniek heet 'hollow-fibre in-line' filtratie en maakt alleen gebruik van zwaartekracht. Deze methode veroorzaakt mogelijk minder schade aan rode bloedcellen, maar is alleen doelmatig met een minimaal afgenomen volume van 60 mL navelstrengbloed, aangezien anders relatief teveel RBCs achterblijven in het filtersysteem.⁵⁴ Aangezien de afgenomen volumina na een premature geboorte kleiner zijn, lijkt deze methode vooralsnog niet geschikt voor het opwerken van prematuur navelstrengbloed.⁵²

Voor het bewaren van navelstrengbloed RBC zijn verschillende bewaarvloeistoffen getest. Het bewaren van volbloed uit de navelstreng in citraat-fosfaat-dextrose-adenine en autoloog plasma toonde goede parameters na een bewaarduur van 21-28 dagen; een gemiddelde pH van 6.6 na 21 dagen, en een gemiddelde pH van 6.51 en een hemolyse van $0.39 \pm 0.05\%$ na 28 dagen.⁵⁵⁻⁵⁶ Aangezien in Nederland geldt dat de hemolyse <0.8% moet zijn ten tijde van een transfusie, hebben deze studies laten zien dat het bewaren van volbloed navelstrengbloed voldoet aan deze strenge eis.

Het bewaren van door centrifugatie opgewerkte navelstrengbloed RBC in bewaarvloeistoffen, zoals gebruikt voor RBCs van bloeddonoren, leidde tot minder goede resultaten. Bij het bewaren van navelstrengbloed RBCs in saline-adenine-glucose-mannitol (SAG-M) of phosphate-adenine-glucose-guanosine-saline-mannitol (PAGGS-M) werd gezien dat de hemolyse aanzienlijk toenam in de tijd.^{53,57} PAGGS-M bleek een betere bewaarvloeistof dan SAG-M, met lagere hemolyse waarden.⁵⁷ Gezien de toename in hemolyse en de pH daling kunnen we concluderen dat navelstrengbloed RBCs sneller in kwaliteit achteruitgaan indien deze cellen bewerkt en bewaard

worden onder omstandigheden die zijn geoptimaliseerd voor volwassen RBCs. Aangezien PAGGS-M de beste resultaten gaf, concluderen we dat niet alleen de opwerkprocedure middels centrifugatie, maar ook het bewaarmedium kan bijdragen aan schade aan foetale RBCs tijdens het bewaren.

Er is weinig bekend over de optimale bewaarcondities van afgenomen navelstrengbloed van prematuur geboren. Voor onze klinische studie over het gebruik van prematuur navelstrengbloed voor autologe transfusie, hebben we eerst een navelstrengbloedproduct validatie studie opgezet.⁵⁸ We hebben prematuur navelstrengbloed opgeslagen als volbloed in CPDA of als, door centrifugatie gefractioneerd, RBC component in SAG-M of Additional Solution 3 (AS-3). De volbloed RBC kwaliteitparameters na 21 dagen waren beter dan van de RBC componenten. Echter, gezien de lagere en variabele hematocriet en de hoge witte bloedcel contaminatie, die na centrifugatie verlaagd werd met gemiddeld 37%, is volbloed minder aantrekkelijk voor autologe transfusie. SAG-M of AS-3 waren even goed als bewaarvloeistof. De hemolyse in onze studie was hoger in vergelijking met andere studies^{53-54, 57}, maar de pH was wel vergelijkbaar.⁵³⁻⁵⁴ Het is mogelijk dat navelstrengbloed RBC van prematuren kwetsbaarder zijn en minder bestand tegen mechanische stress tijdens centrifugering. Al met al kunnen we concluderen dat navelstrengbloed RBC van prematuur geboren geschikt is voor autologe transfusie. Met het oog op de RBC bewaarparameters, is de houdbaarheid van deze producten aanzienlijk korter (tot maximaal 21 dagen) dan van standaard volwassen RBC bewaard als 'pedi-pack'. Maar aangezien premature baby's vrij snel na geboorte transfusie behoefte hebben¹, is dit geen praktisch bezwaar.

Klinische toepasbaarheid – Autologe navelstrengbloedtransfusie

In een gerandomiseerde studie hebben we de haalbaarheid van autologe navelstrengbloed transfusies onderzocht voor de behandeling van anemie van de prematuriteit. Prematuur navelstrengbloed werd afgenomen na bevallingen bij een termijn van 25 tot 32 weken zwangerschap. In 57% van de gevallen was er voldoende (> 15 ml) navelstrengbloed geoogst voor verdere bewerking tot een autoloog RBC product. Na het opwerken, het uitvoeren van dezelfde kwaliteitstesten als voor volwassen donor RBCs en bacteriële testen van alle navelstrengbloed RBC producten, waren er goedgekeurde autologe producten beschikbaar voor 36% van de totale studie populatie. Voor 27% van de prematuren met een daadwerkelijke transfusiebehoefte was er een autoloog RBC product beschikbaar, dat gemiddeld 58% van de transfusiebehoefte van deze pasgeborenen kon dekken (range van 25-100%).⁵²

Het kweken van navelstrengbloed CD34 positieve cellen naar rode cellen

Navelstrengbloed is een belangrijke bron voor CD34 positieve hematopoïetische stamcellen en van andere voorlopercellen. Deze multipotente cellen kunnen ondermeer worden opgekweekt tot RBC geschikt voor transfusie.⁵⁹⁻⁶³ Het gebruik van gekweekte rode voorlopercellen uit navelstrengbloed is overigens momenteel een ontwikkeling die met veelbelovende resultaten

wordt geëxploreerd als een toekomstig alternatief voor het standaard transfusie product. De daadwerkelijke toepasbaarheid van deze gekweekte cellen voor transfusie is nog niet bekend. Met name het gebruik van groeimmedia die dierlijke eiwitten bevatten en dure complexe kweekprotocollen zijn debet aan het feit dat de toepasbaarheid nog niet uitgebreid is onderzocht in de kliniek.⁶³

Na het bewerken van het prematuur navelstrengbloed tot een autoloog RBC product hebben we in de afgescheiden buffy coat, die een groot deel van de witte bloedcelfractie bevat, het aantal CD34 positieve stamcellen bepaald. We vonden gemiddeld 2.5×10^6 CD34 positieve cellen per buffy coat (range 1.2×10^5 - 1.7×10^7 ; $n = 10$). Onze hypothese was dat het kweken van deze stamcel bevattende buffy coats zou kunnen leiden tot extra rode (voorloper) cellen, geschikt voor transfusie na 21 dagen kweek, wanneer de bewaarduur van het autologe RBC navelstrengbloed product verlopen zou zijn.

We hebben hiertoe een eenvoudige 1-staps kweekmethode opgezet met gebruik van recombinant-humaan Stem Cell Factor (SCF), Interleukine-3 (IL-3) en EPO, zonder het gebruik van dierlijke eiwitten. De efficiëntie van onze methode hebben we getest met zowel CD34 positieve cellen uit (prematuur en a terme) navelstrengbloed, en uit CD34 positieve celbronnen van volwassenen (gemobiliseerd perifeer bloed (PBSC) en beenmerg (BM)). Na 21 kweekdagen hadden we een celvermenigvuldiging van gemiddeld 4000 tot 4700 keer in zowel de navelstrengbloed kweken als de PBSC en BM kweken. Na 21 dagen kweken bestonden alle kweken uit rode voorlopercellen. We berekenden dat met onze gemiddelde vermenigvuldigingssnelheid, we 4.7×10^8 tot 4.4×10^{10} rode voorlopercellen kunnen genereren. Deze voorlopercellen kunnen *in vivo* verder uitrijpen tot rode cellen. In theorie is het aantal CD34 positieve stam en voorlopercellen in de buffy coat van navelstrengbloed van prematuren buffy coat met de behaalde celvermenigvuldigingsfactor, voldoende voor tenminste één extra neonatale transfusie. Verdere optimalisatie van de kweekmedia en het *in vivo* testen van het patroon van uitrijping en functionaliteit van deze rode voorlopercellen, zal ons dichterbij een gekweekt autoloog rode bloedcelproduct brengen. In combinatie met ons autologe RBC navelstrengproduct, kan dit leiden tot verder verminderen, of eventueel elimineren van de blootstelling aan allogene bloedtransfusies aan premature neonaten.

Referentie lijst

1. Fabres J, Wehrli G, Marques MB, Phillips V, Dimmitt RA, Westfall AO, Schelonka RL. Estimating blood needs for very-low-birth-weight infants. *Transfusion*. 2006 Nov;46(11):1915-20.
2. Silvers KM, Gibson AT, Russell JM, Powers HJ. Antioxidant activity, packed cell transfusions, and outcome in premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998 May;78(3):F214-9.
3. Hirano K, Morinobu T, Kim H, Hiroi M, Ban R, Ogawa S, Ogihara H, Tamai H, Ogihara T. Blood transfusion increases radical promoting non-transferrin bound iron in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2001 May;84(3):F188-93.
4. Dani C, Reali MF, Bertini G, Martelli E, Pezzati M, Rubaltelli FF. The role of blood transfusions and iron intake on retinopathy of prematurity. *Early Hum Dev*. 2001 Apr;62(1):57-63.
5. Akkoyun I, Oto S, Yilmaz G, Gurakan B, Tarcan A, Anuk D, Akgun S, Akova YA. Risk factors in the development of mild and severe retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2006 Oct;10(5):449-53.
6. Blau J, Calo JM, Dozor D, Sutton M, Alpan G, La Gamma EF. Transfusion-related acute gut injury: necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates after packed red blood cell transfusion. *J Pediatr*. 2011 Mar;158(3):403-9.
7. Collard KJ. Is there a causal relationship between the receipt of blood transfusions and the development of chronic lung disease of prematurity? *Med Hypotheses*. 2006;66(2):355-64.
8. Maier RF, Sonntag J, Walka MM, Liu G, Metze BC, Obladen M. Changing practices of red blood cell transfusions in infants with birth weights less than 1000 g. *J Pediatr*. 2000 Feb;136(2):220-4.
9. Miyashiro AM, Santos N, Guinsburg R, Kopelman BI, Peres Cde A, Taga MF, Shinzato AR, Costa Hde P. Strict red blood cell transfusion guideline reduces the need for transfusions in very-low-birthweight infants in the first 4 weeks of life: a multicentre trial. *Vox Sang*. 2005 Feb;88(2):107-13.
10. Mimica AF, dos Santos AM, da Cunha DH, Guinsburg R, Bordin JO, Chiba A, Barros MM, Kopelman BI. A very strict guideline reduces the number of erythrocyte transfusions in preterm infants. *Vox Sang*. 2008 Aug;95(2):106-11.
11. Bell EF, Strauss RG, Widness JA. Randomized trial of liberal versus restrictive guidelines for red blood [c]ell transfusion in preterm infants. *Pediatrics* 2005; 115: 1685–1691.
12. Kirpalani H, Whyte RK, Andersen C *et al*. The Premature Infants in Need of Transfusion (PINT) study: a randomized controlled trail of a restrictive (low) versus liberal (high) transfusion threshold for extreme low birth weight infants. *Journal of Pediatrics* 2006; 149: 301–307
13. Chen HL, Tseng HI, Lu CC, Yang SN, Fan HC, Yang RC Effect of blood transfusions on the outcome of very low body weight preterm infants under two different transfusion criteria. *Pediatr Neonatol*. 2009 Jun;50(3):110-6.
14. Whyte RK, Kirpalani H, Asztalos EV, Andersen C, Blajchman M, Heddle N, LaCorte M, Robertson CM, Clarke MC, Vincer MJ, Doyle LW, Roberts RS; PINTOS Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants randomly assigned to restrictive or liberal hemoglobin thresholds for blood transfusion *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):207-13
15. Nopoulos PC, Conrad AL, Bell EF, Strauss RG, Widness JA, Magnotta VA, Zimmerman MB, Georgieff MK, Lindgren SD, Richman LC. Long-term Outcome of Brain Structure in Premature Infants: Effects of Liberal vs Restricted Red Blood Cell Transfusions. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2011 Jan 3
16. McCoy TE, Conrad AL, Richman LC, Lindgren SD, Nopoulos PC, Bell EF. Neurocognitive profiles of preterm infants randomly assigned to lower or higher hematocrit thresholds for transfusion. *Child Neuropsychol*. 2011 Feb 24:1-21.
17. Hack M, Taylor HG, Drotar D, Schluchter M, Cartar L, Wilson-Costello D, Klein N, Friedman H, Mercuri-Minich N, Morrow M. Poor predictive validity of the Bayley Scales of Infant Development for cognitive function of extremely low birth weight children at school age. *Pediatrics*. 2005 Aug;116(2):333-41
18. Cooke RW, Abernethy LJ. Cranial magnetic resonance imaging and school performance in very low birth weight infants in adolescence. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999 Sep;81(2):F116-21.
19. Aher S, Ohlsson A. Late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jul 19;3:CD004868

20. Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jul 19;3:CD004865. Review.
21. Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jul 19;3:CD004863. Review.
22. Madan A, Kumar R, Adams MM, Benitz WE, Geaghan SM, Widness JA. Reduction in red blood cell transfusions using a bedside analyzer in extremely low birth weight infants. *J Perinatol*. 2005 Jan;25(1):21-5.
23. Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J. A systematic review and meta-analysis of a brief delay in clamping the umbilical cord of preterm infants. *Neonatology*. 2008;93(2):138-44.
24. Dutch Institute for health care improvement CBO Guideline Bloodtransfusion. (2004) Guideline Blood transfusion. Utrecht: van Zuiden Communication BV: 133-139
25. Khodabux CM, Hack KE, von Lindern JS, Brouwers H, Walther FJ, Brand A. A comparative cohort study on transfusion practice and outcome in two Dutch tertiary neonatal centres. *Transfus Med*. 2009 Aug;19(4):195-201.
26. von Lindern J, Brand A, Lopriore E. [Revision of the guideline 'Blood transfusion': for the newborn]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156(25):A4795. Review.
27. dos Santos AM, Guinsburg R, Procianny RS, Sadeck Ldos S, Netto AA, Rugolo LM, Luz JH, Bomfim O, Martinez FE, de Almeida MF; Brazilian Network on Neonatal Research. Variability on red blood cell transfusion practices among Brazilian neonatal intensive care units. *Transfusion*. 2010 Jan;50(1):150-9.
28. Spinella PC, Dressler A, Tucci M, Carroll CL, Rosen RS, Hume H, Sloan SR, Lacroix J; Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators Network. Survey of transfusion policies at US and Canadian children's hospitals in 2008 and 2009. *Transfusion*. 2010 Nov;50(11):2328-35.
29. Motta M, Testa M, Tripodi G, Radicioni M. Changes in neonatal transfusion practice after dissemination of neonatal recommendations. *Pediatrics*. 2010 Apr;125(4):e810-7.
30. Kasat K, Hendricks-Muñoz KD, Mally PV. Neonatal red blood cell transfusions: searching for better guidelines. *Blood Transfus*. 2011 Jan;9(1):86-94.
31. Baer VL, Henry E, Lambert DK, Stoddard RA, Wiedmeier SE, Eggert LD, Ilstrup S, Christensen RD. Implementing a program to improve compliance with neonatal intensive care unit transfusion guidelines was accompanied by a reduction in transfusion rate: a pre-post analysis within a multihospital health care system. *Transfusion*. 2011 Feb;51(2):264-9.
32. von Lindern JS, Khodabux CM, Hack KE, van Haastert IC, Koopman-Esseboom C, van Zwieten PH, Brand A, Walther FJ. Long-term outcome in relationship to neonatal transfusion volume in extremely premature infants: a comparative cohort study. *BMC Pediatr*. 2011 May 28;11:48
33. Frey B. Transfusion in premature infants impairs production and/or release of red blood cells, white blood cells and platelets. *J Paediatr. Child Health* 2002; 38: 265-267
34. Brown MS, Garcia JF, Phibbs RH et al. Decreased response of plasma immunoreactive erythropoietin to 'available' oxygen in anemia of prematurity. *J Pediatr* 1984; 105: 793-798
35. Keyes WG, Kimzey Donohue P, Spivak JL et al. Assessing the need for transfusion of premature infants and role of hematocrit, clinical signs, and erythropoietin level
36. Schwarz KB, Dear PRF, Gill AB et al. Effects of transfusion of anemia of prematurity. *Pediatric Hematology and Oncology* 2005; 22: 551-559
37. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Nov;64(2):159-71
38. Fauchère JC, Dame C, Vonthein R, Koller B, Arri S, Wolf M, Bucher HU. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics*. 2008 Aug;122(2):375-82.
39. Delanghe JR. De waarde van de epotest en epoanalyse. *Ned Tijdschr Hematol* 2007;4:178-82
40. Hellebostad M, Hågå P, Cotes PM. Serum immunoreactive erythropoietin in healthy normal children. *Br J Haematol*. 1988 Oct;70(2):247-50.
41. Jazayeri A, Tsibris JC, Hunt LT, Spellacy WN. Umbilical plasma erythropoietin correlations with blood gases and gestational age in appropriately grown infants. *Am J Perinatol*. 1996 May;13(4):227-30.

42. Fahrenstich H, Dame C, Alléra A, Kowalewski S. Biochemical monitoring of fetal distress with serum-immunoreactive erythropoietin. *J Perinat Med.* 1996;24(1):85-91.
43. Surbek DV, Visca E, Steinmann C, Tichelli A, Schatt S, Hahn S, Gratwohl A, Holzgreve W: Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):218-221.
44. Pafumi C, Farina M, Bandiera S, Cavallaro A, Pernicone G, Russo A, Iemmola A, Chiarenza M, Leonardi I, Calogero AE, Calcagno A, Cianci A: Differences in umbilical cord blood units collected during cesarean section, before or after the delivery of the placenta. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54(2):73-77.
45. Pafumi C, Milone G, Maggi I, Mancari R, Farina M, Russo A, Pernicone G, Bandiera S, Giardina P, Franceschini A, Calogero AE, Cianci A: Umbilical cord blood collection in Cesarean section: a comparison before and after placental delivery. *Arch Gynecol Obstet* 2002; 266(4):193-194.
46. Surbek DV, Schönfeld B, Tichelli A, Gratwohl A, Holzgreve W: Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomised comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone marrow transplantation* 1998; 22:311-312.
47. Solves P, Mirabet V, Larrea L, Moraga R, Planelles D, Saucedo E, Uberos FC, Planells T, Guillen M, Andres A, Monleon J, Soler MA, Franco E: Comparison between two cord blood collection strategies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82(5):439-442.
48. Bertolini F, Lazzari L, Lauri E, Corsini C, Castelli C, Gorini F, Sirchia G: Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood. *J Hematother* 1995; 4(1):29-36.
49. Eichler H, Schaible T, Richter E, Zieger W, Voller K, Leveringhaus A, Goldmann SF: Cord blood as a source of autologous RBCs for transfusion to preterm infants. *Transfusion* 2000; 40(9):1111-1117.
50. Imura K, Kawahara H, Kitayama Y, Yoneda A, Yagi M, Suehara N: Usefulness of cord-blood harvesting for autologous transfusion in surgical newborns with antenatal diagnosis of congenital anomalies. *J Pediatr Surg* 2001; 36(6):851-854
51. Brune T, Garritsen H, Hentschel R, Louwen F, Harms E, Jorch G: Efficacy, recovery and safety of RBCs from autologous placental blood: clinical experience in 52 newborns. *Transfusion* 2003; 43(9):1210-1216
52. Khodabux CM, von Lindern JS, van Hilten JA, Scherjon S, Walther FJ, Brand A: A clinical study on the feasibility of autologous cord blood transfusion for anemia of prematurity. *Transfusion* 2008; 48(8):1634-1643.
53. Garritsen HS, Brune T, Louwen F, Wullenweber J, Ahlke C, Cassens U, Witteler R, Sibrowski W: Autologous red cells derived from cord blood: collection, preparation, storage and quality controls with optimal additive storage medium (Sag-mannitol). *Transfus Med* 2003; 13: 303-310
54. Brune T, Fill S, Heim G, Rabsilber A, Wohlfarth K, Garritsen HSP: Quality and stability of red cells derived from gravity-separated placental blood with a hollow-fiber system. *Transfusion* 2007; 47(12):2271-2275.
55. Horn S, Mazor D, Zmora E, Meyerstein N: Storage induced changes in human newborn red cells. *Transfusion* 1987; 27:411-414
56. Bifano EM, Dracker RA, Lorah L, Palit A: Collection and 28-day storage of human placental blood. *Pediatric Research* 1994; 36 (1): 90-94
57. Widing L, Bechensteen AG, Mirlashari MR, Vetlesen A, Kjeldsen-Kragh J: Evaluation of nonleukoreduced red blood cell transfusion units collected at the delivery from the placenta. *Transfusion* 2007; 47 (8): 1481-1487.
58. Khodabux CM, Van Beckhoven JM, Scharenberg JG, El Barjiji F, Slot MC, Brand A. Processing cord blood from premature infants into autologous red-blood-cell products for transfusion. *Vox Sang.* 2010 Nov 23
59. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, Kobari L, Thierry D, Douay L. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2002 May;20(5):467-72.
60. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 2006 Oct;24(10):1255-6. Epub 2006 Sep 17.

61. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Jan;23(1):69-74. Epub 2004 Dec 26.
62. Baek EJ, Kim HS, Kim S, Jin H, Choi TY, Kim HO. In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion.* 2008 Oct;48(10):2235-45.
63. Migliaccio AR, Whitsett C, Migliaccio G. Erythroid cells in vitro: from developmental biology to blood transfusion products. *Curr Opin Hematol.* 2009 Jul;16(4):259-68