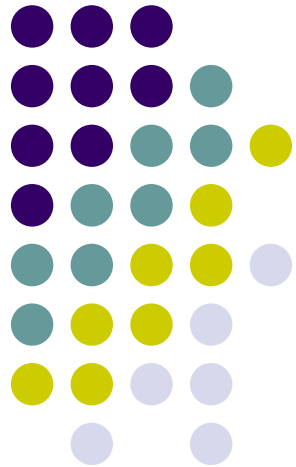
CAT: Laboratoriumdiagnose van sferocytose

Apr. Annelies Fraeyman

27/02/2007



Supervisor: Dr. Sc. W. Goossens
Search/methodology verified by: Dr. J. Frans

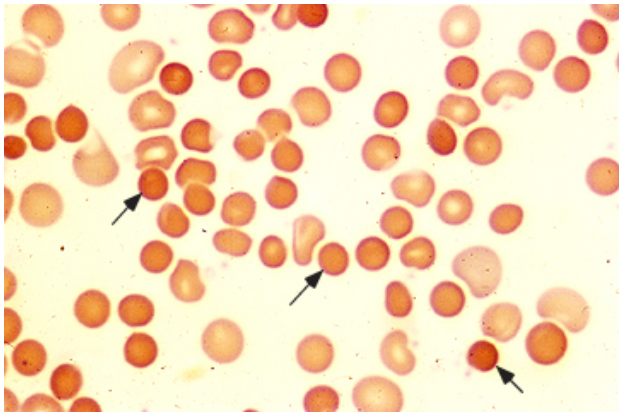
Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

Inhoud

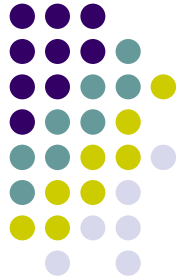
- Inleiding
  - Sferocytose: congenitaal vs. verworven
  - Klinisch beeld
  - Klinische classificatie
  - Biochemische basis
  - Behandeling

Sferocytose



- Sferocyten = sferisch of bijna sferisch gevormde rode bloedcellen
  - Membraanverlies zonder equivalent cytosolverlies tgv **erfelijke** of **verworven** afwijking van het RBC cytoskelet en membraan
  - Kleinere diameter dan normale discoïde RBC
  - **Micro**sferocyt: verminderd volume (↔ diameter)
  - **Macro**sferocyt: kan voorkomen bij hereditaire stomatocytose (overgehydrateerde variant) tgv osmotische zwelling = **Atypische** sferocytose

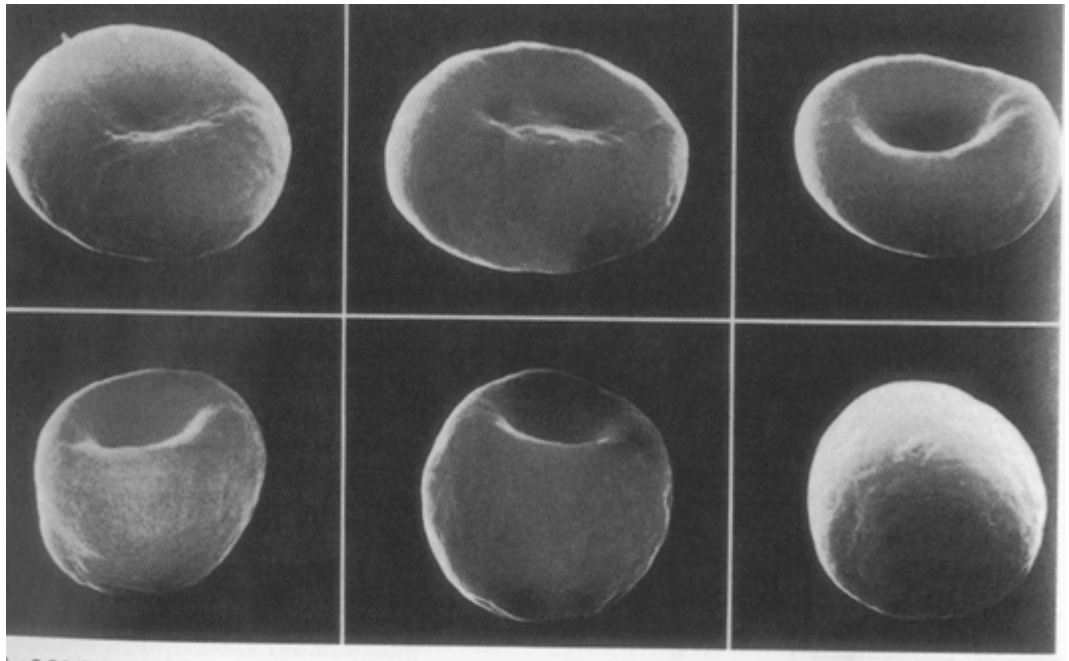
1.Verworven sferocytose



- Meest frequent AIHA
- Verschillende onderliggende mechanismen
  - Schade RBC: hitte, clostridium toxines, slangengif
  - Verlies membraan: coating membraan met allo-As, auto-As, GM geïnduceerde As
  - Hypofosfatemie (leverziekte, acute diabetische ketoacidose, …), waarschijnlijk tgv ATP depletie
  - Veroudering bloed

2. Congenitale sferocytose

- Voor het eerst beschreven in 1871
- 1e registratie splenectomie ~ 1871
- Frequenste oorzaak van overerfbare chronische hemolyse in
  - Noord-Europa (1-1,5/5000)
  - Noord-Amerika (US: 1/2000-5000)



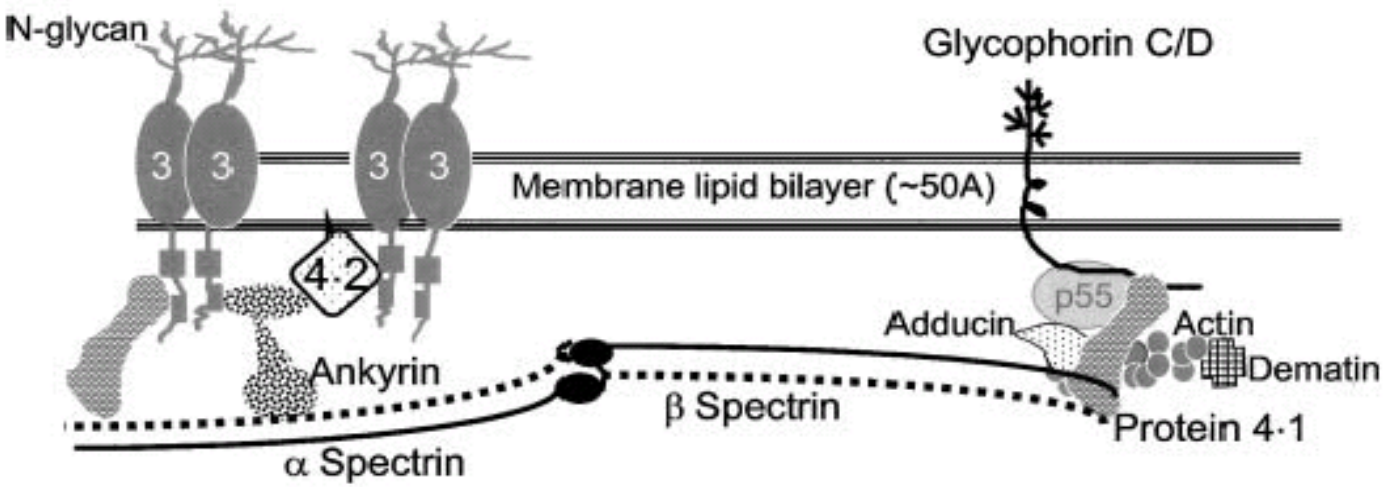
ig. 3.21 Scanning electron micrography of spherocytes and forms intermediate between discocytes and spherocytes.
rom Bessis [51].

2. Congenitale sferocytose

- Overerving:
  - Autosomaal dominant: 75%
    (ankyrine deficiëntie en secundair hieraan spectrine deficiëntie)
  - Overige 25%: recessief
    (beide α spectrine allelen gemuteerd of proteïne 4.2 deficiëntie)
    of *de novo* die dan AD overerven

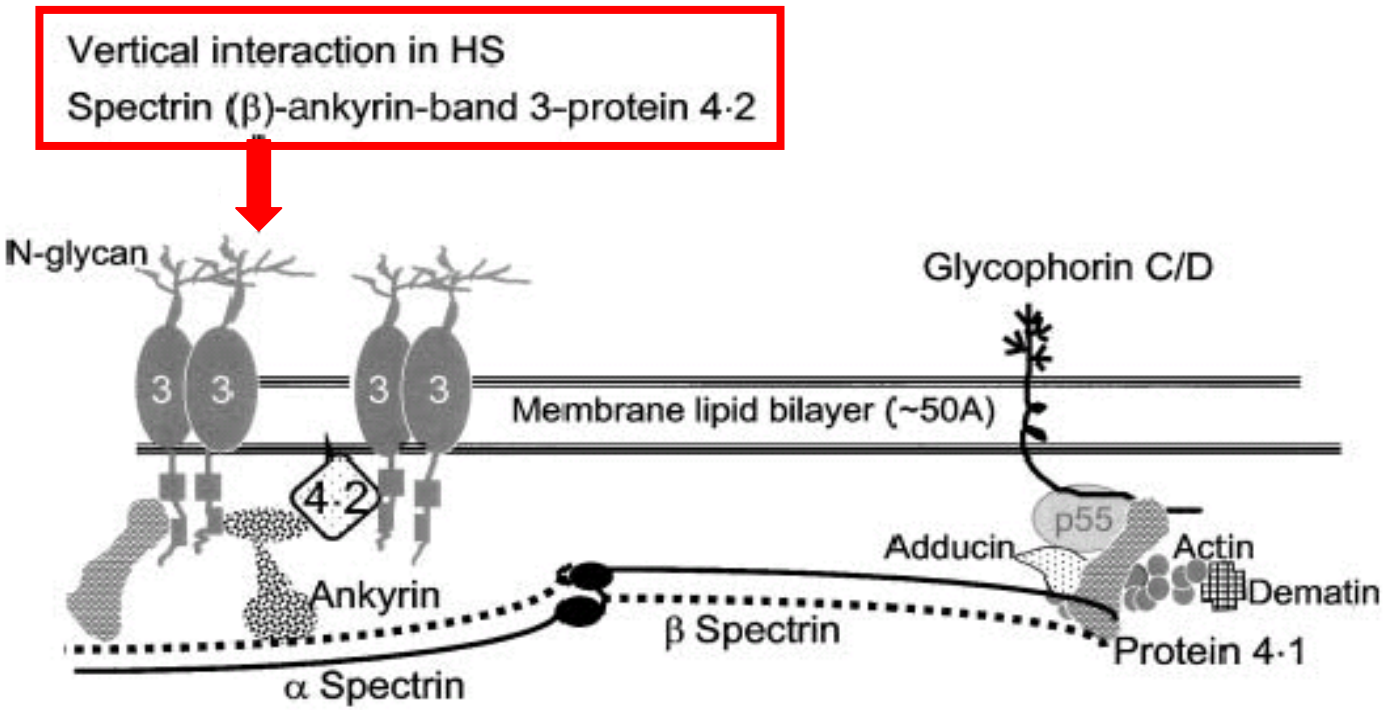
3.Biochemische basis HS

- Deficiëntie / dysfunctie van een component van het cytoskelet van de RBC
  - α/β Spectrine
  - Ankyrine
  - Proteïne 3 (anion transport proteïne)
  - Proteïne 4.2 (pallidine)



3.Biochemische basis HS

- Meestal ankyrine (60%) en/of spectrinedeficiëntie
- 2nd spectrine deficiëntie, tgv andere mutatie, meestal ankyrine: vasthechting spectrine aan cytoskelet verstoord → **verzwakte verticale associatie cytoskelet - celmembraan**

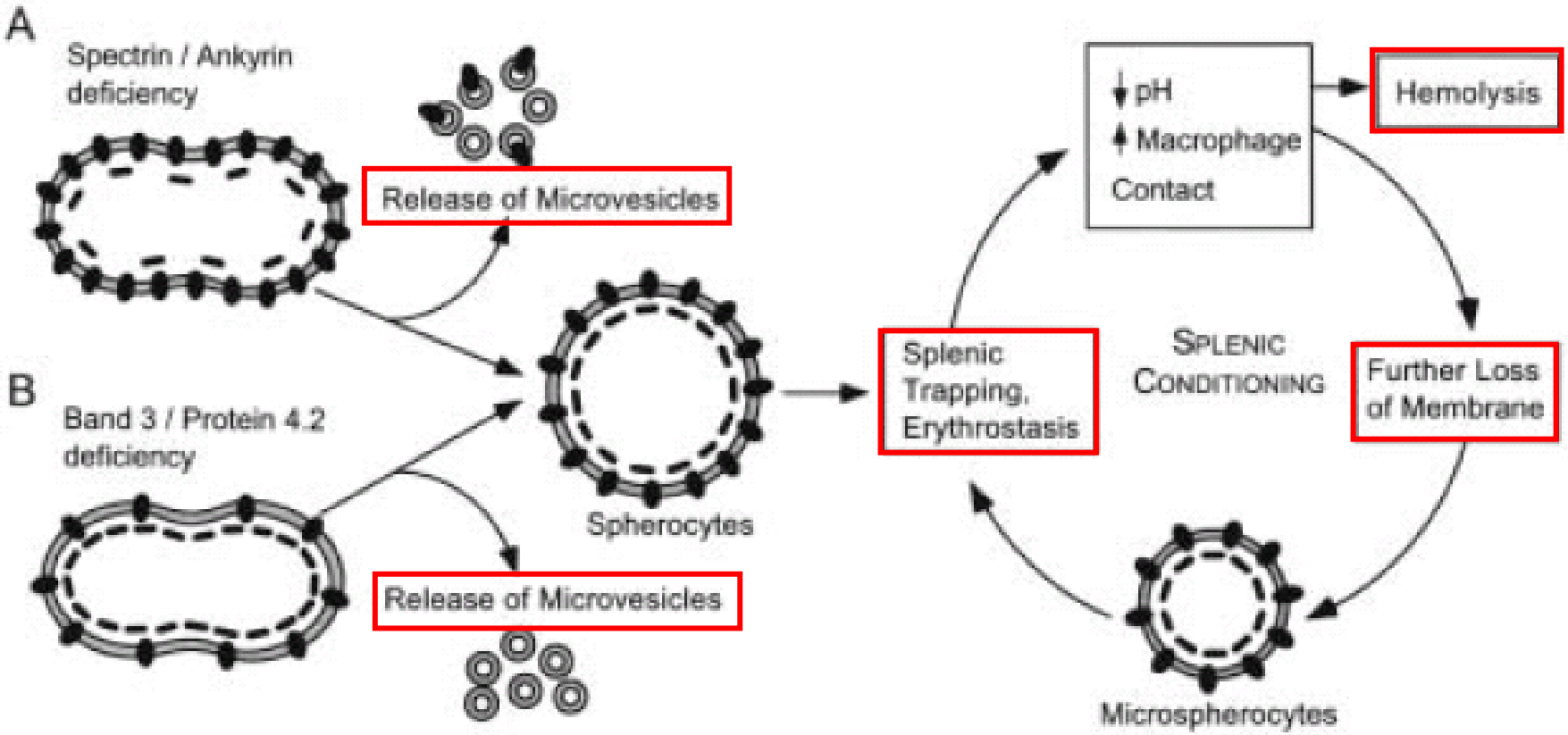


3.Biochemische basis HS

- Deficiëntie / dysfunctie van een component van het cytoskelet van de RBC leidt tot
  - abnormale morfologie: **sferocytvorming**
    (verlies membraanoppervlak zonder volumeverlies
    → gedaalde vervormbaarheid)

    (reticulocyten zijn nog niet sferisch van vorm)
  - **kortere levensduur**
    - hemolyse tgv membraaninstabiliteit &
      herhaaldelijke passage door de milt (bevordert verlies van membraanlipiden)
      → verder verlies van membraanoppervlak & vervormbaarheid)

3.Biochemische basis HS



4. Klinisch beeld

- Meestal kinderen
- Ernst varieert: van symptoomloos dragerschap tot ernstige chronische hemolyse
  - Variabele graad van anemie, geelzucht, splenomegalie
- Benigne aandoening, maar wel complicaties
  - ↑ bilirubine turnover → ↑ incidentie cholelithiasis, cholecystitis
  - aplastische of hemolytische crisissen, vooral na infectie (Parvovirus B19) en stress

5. Klinische classificatie HS

- Mild – matig – ernstig
- Correleert met spectrine-inhoud v/d RBC membraan
  - spectrine-inhoud ~ stabiliteit ~ verlies membraan

Classification	Trait	Mild	Moderate	Severe
Haemoglobin (g/dl)	Normal	11–15	8–12	6–8
Reticulocyte count %	Normal (<3%)	3–6	>6	>10
Bilirubin (µmol/l)	<17	17–34	>34	>51
Spectrin* per erythrocyte (% of normal)	100	80–100	50–80	40–60
Splenectomy	Not required	Usually not necessary during childhood and adolescence	Necessary during school age before puberty	Necessary – delay until 6 years if possible

*Data on spectrin content are provided for interest; it is not necessary to measure this.

6. Behandeling

- Acute symptomen
  - (wissel)transfusies
  - EPO om transfusienood ↓

- Chronische symptomen
  - Foliumzuur
    - bij kinderen en tijdens zwangerschap (ongeacht ernst HS)
    - bij ernstige en matige HS

6. Behandeling

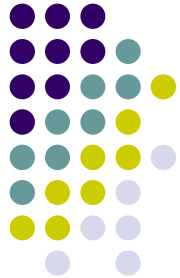
- Splenectomie (na leeftijd van 6 jaar)
  - ↔ hemolytische anemie, verlengt levensduur v/d RBC
  - overbodig indien het BM de anemie kan compenseren door ↑ RBC productie
- Cholecystectomie
  - ↔ symptomatische galstenen

Classification	Trait	Mild	Moderate	Severe
Haemoglobin (g/dl)	Normal	11–15	8–12	6–8
Reticulocyte count %	Normal (<3%)	3–6	>6	>10
Bilirubin (µmol/l)	<17	17–34	>34	>51
Spectrin* per erythrocyte (% of normal)	100	80–100	50–80	40–60
Splenectomy	Not required	Usually not necessary during childhood and adolescence	Necessary during school age before puberty	Necessary – delay until 6 years if possible

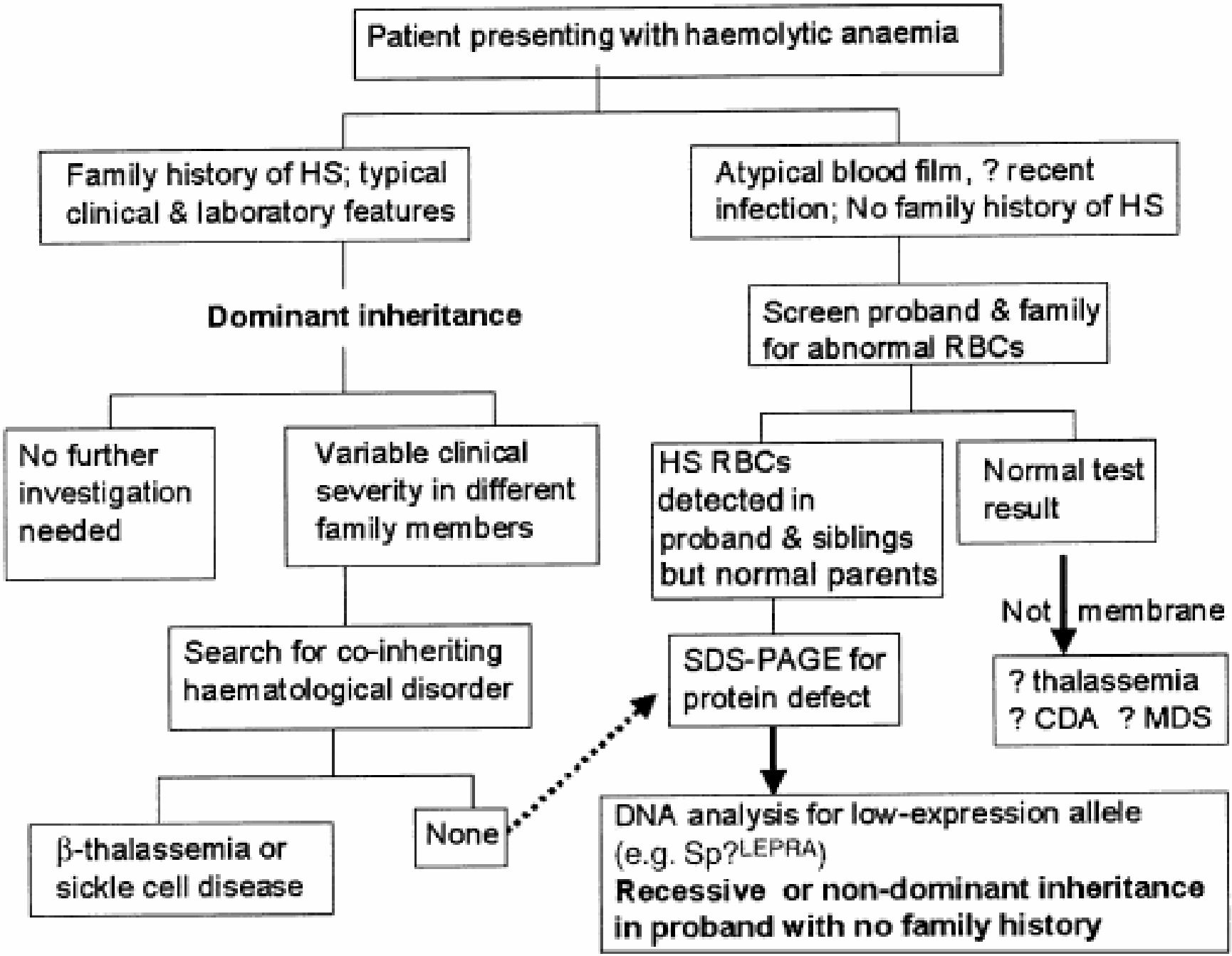
Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

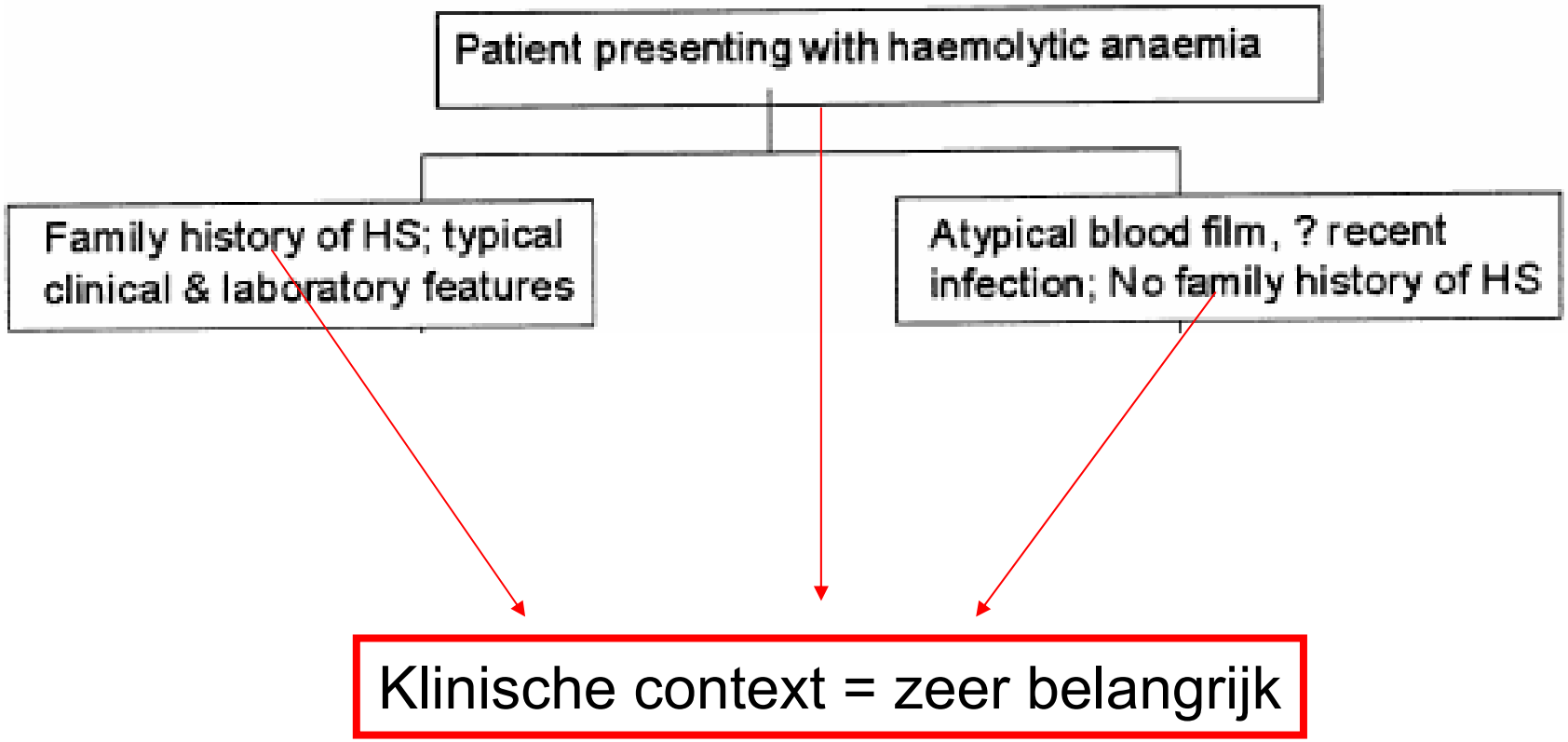
Guidelines
Bolton-Maggs PH et al., 2004

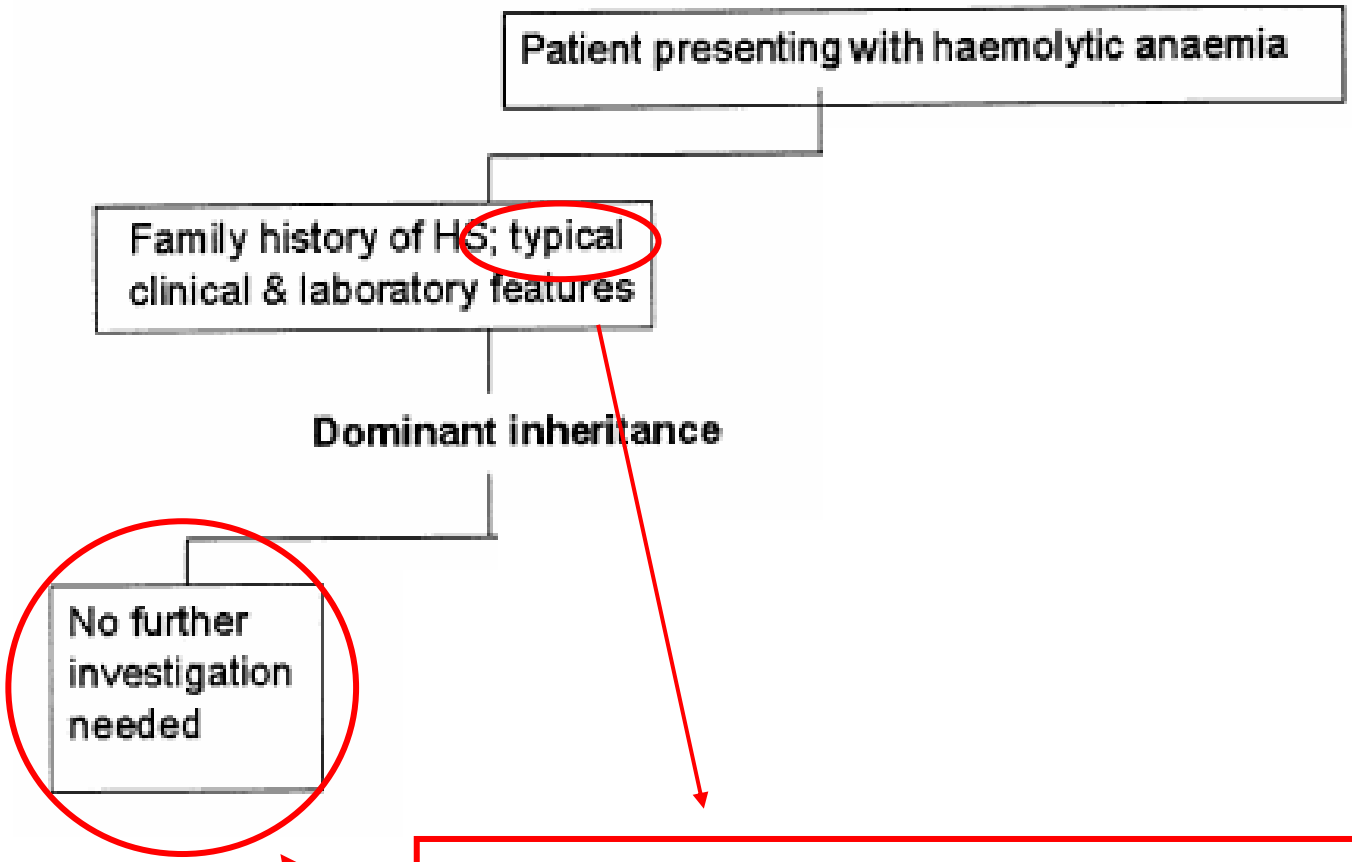


- De test moet een onderscheid kunnen maken tussen een
  - membraan geassocieerde en
  - niet-membraan geassocieerde RBC aandoening

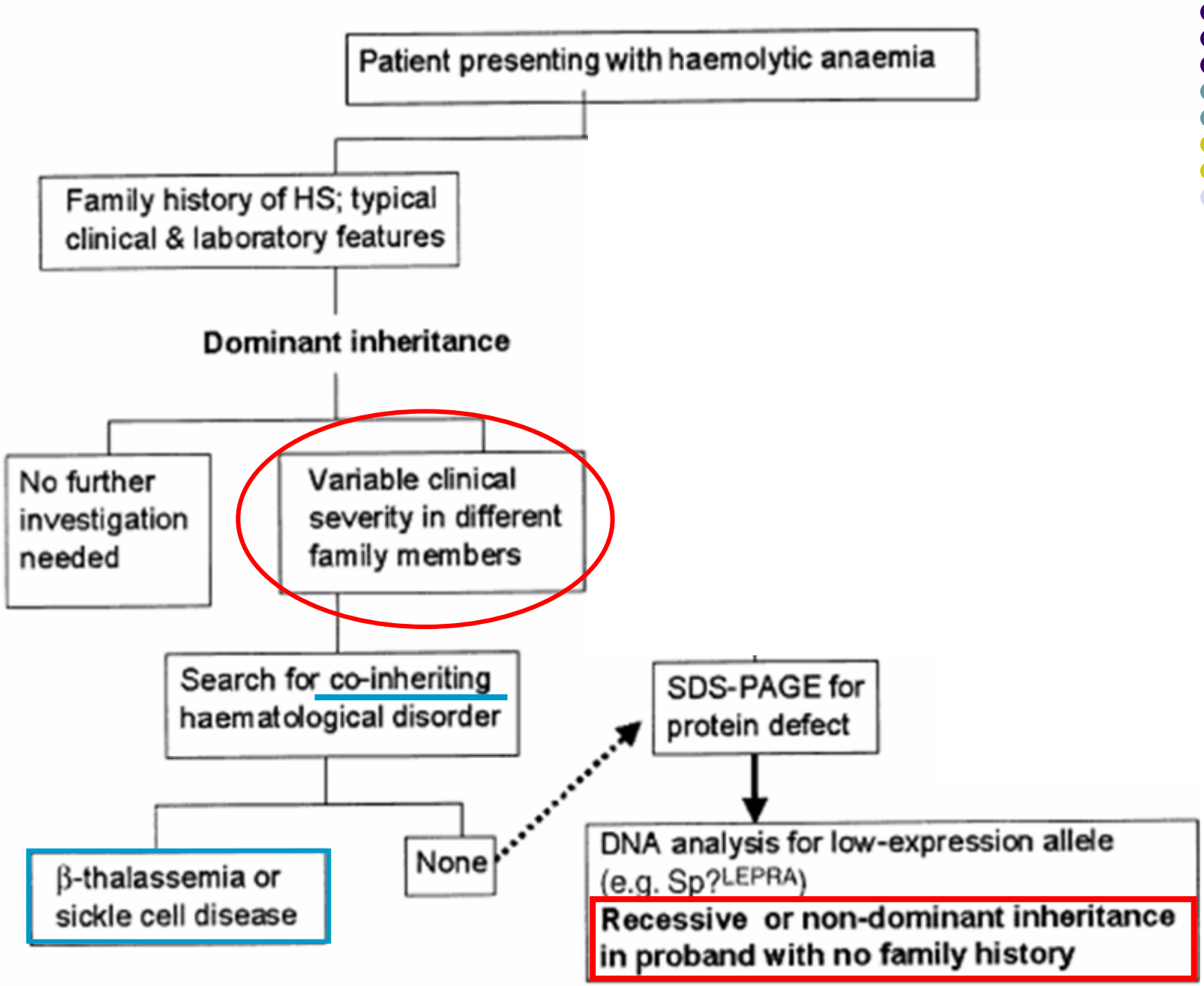

Patient presenting with haemolytic anaemia
Family history of HS; typical clinical & laboratory features
Atypical blood film, ? recent infection; No family history of HS
Dominant inheritance
Screen proband & family for abnormal RBCs
No further investigation needed
Variable clinical severity in different family members
HS RBCs detected in proband & siblings but normal parents
Normal test result
Not membrane
Search for co-inheriting haematological disorder
SDS-PAGE for protein defect
? thalassemia ? CDA ? MDS
β-thalassemia or sickle cell disease
None
DNA analysis for low-expression allele (e.g. Sp?LEPRA)
Recessive or non-dominant inheritance in proband with no family history

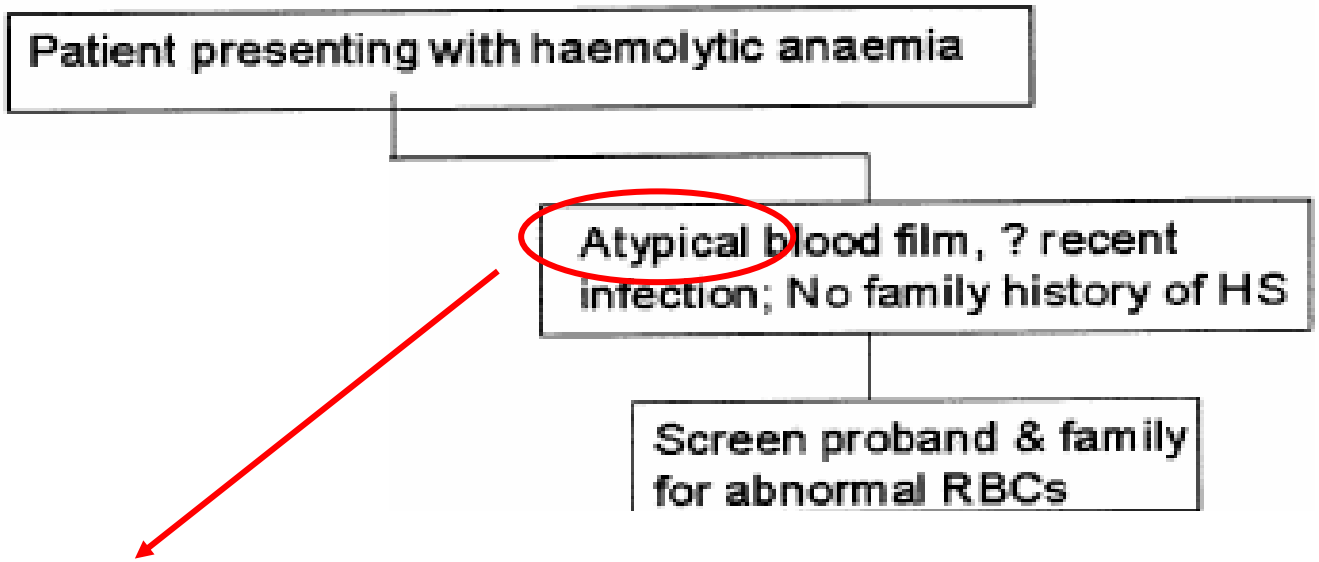
Guidelines
Bolton-Maggs PH et al., 2004





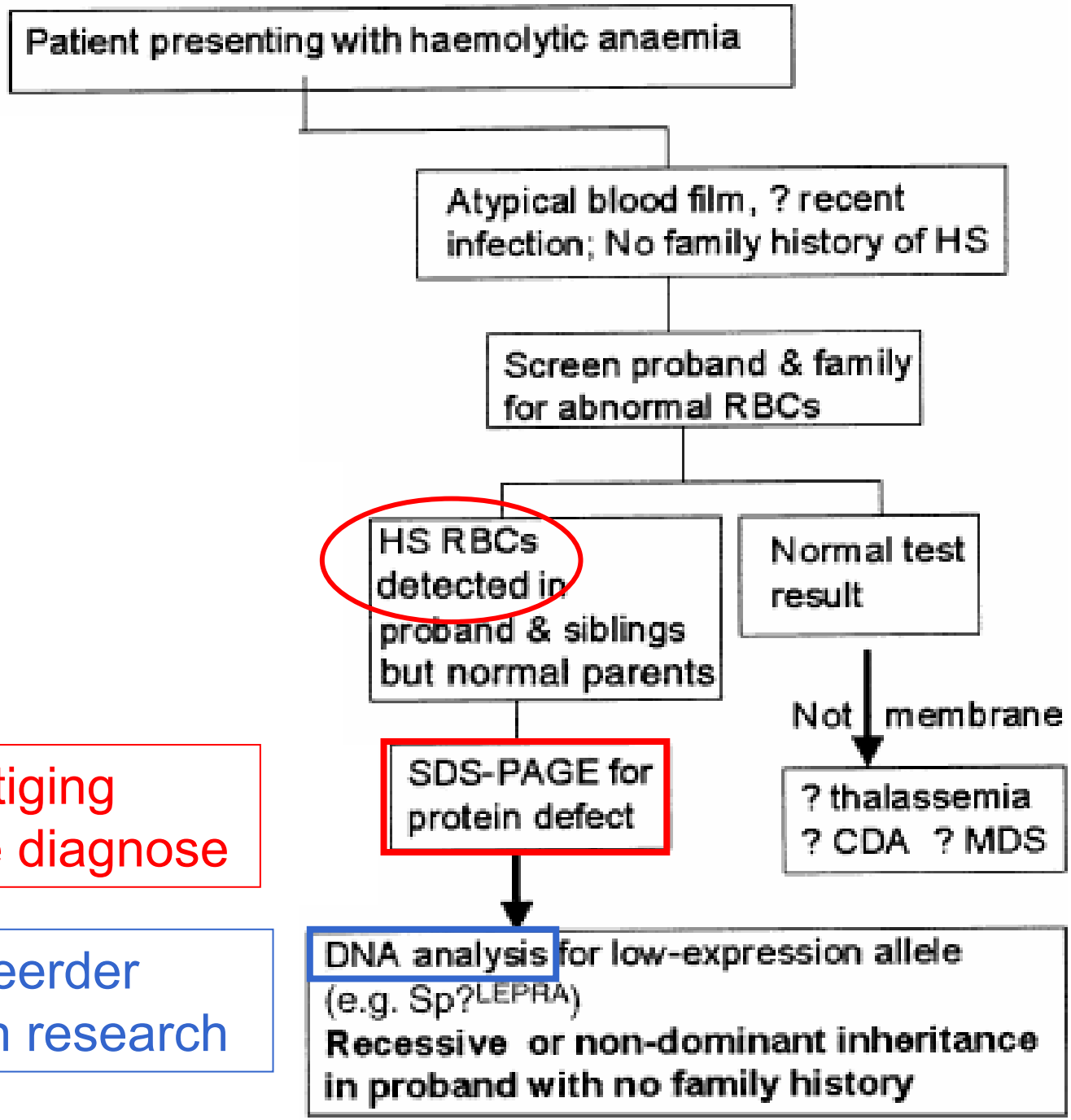
- Familiale voorgeschiedenis (75%)
- Splenomegalie, geelzucht
- Sferocyten op de bloedfilm
- Gestegen MCHC en reticulocytose
- Negatieve directe Coombs


Patient presenting with haemolytic anaemia
Family history of HS; typical clinical & laboratory features
Dominant inheritance
No further investigation needed
Variable clinical severity in different family members
Search for co-inheriting haematological disorder
β-thalassemia or sickle cell disease
None
SDS-PAGE for protein defect
DNA analysis for low-expression allele (e.g. Sp?LEPRA)
Recessive or non-dominant inheritance in proband with no family history



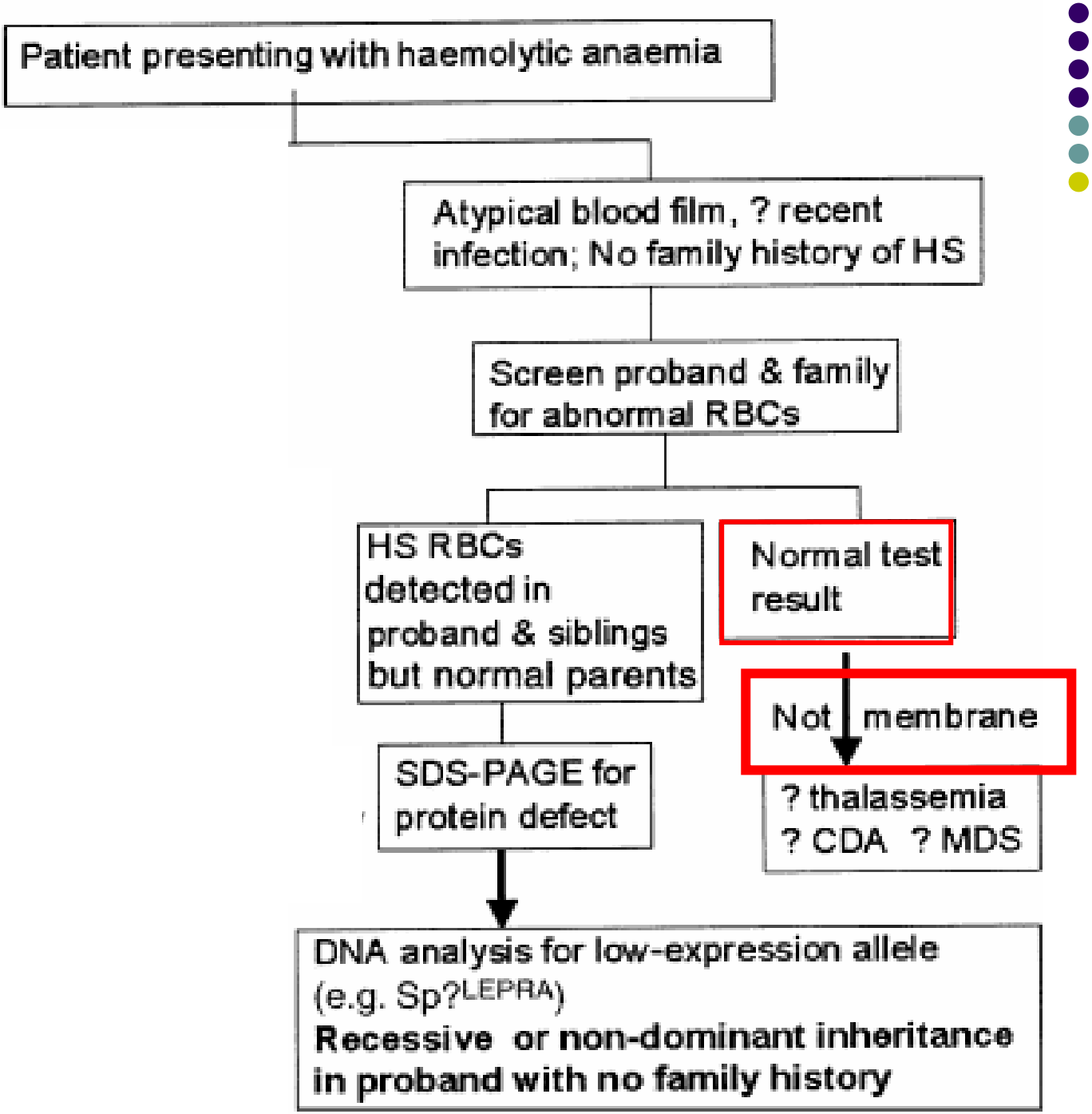
Twijfelachtige diagnose

- Screening
  - EMA bindingstest (sens 93% - spec 99%)
  - Cryohemolyse test (sens 96% - spec 95%)
  - Osmotische fragiliteittest = *slechts een ondersteunende test*



Bevestiging van de diagnose

Hoort eerder thuis in research


Patient presenting with haemolytic anaemia
Atypical blood film, ? recent infection; No family history of HS
Screen proband & family for abnormal RBCs
HS RBCs detected in proband & siblings but normal parents
Normal test result
Not membrane
SDS-PAGE for protein defect
? thalassemia
? CDA ? MDS
DNA analysis for low-expression allele
(e.g. Sp?LEPRA)
Recessive or non-dominant inheritance in proband with no family history

Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis (75%)

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Diagnose

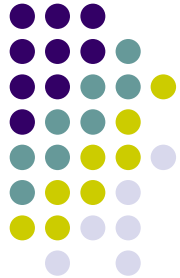
- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

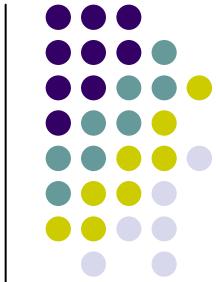
- Terugbetaling?

Welke patiënten moeten gescreend worden op HS?



- Meestal kinderen, maar kan op elke leeftijd
- Familiale voorgeschiedenis (75%)
  (geelzucht en/of splenectomie, cholecystectomie)
- Variabele graad van chronische anemie
  (sferocyten in PB)
- Geelzucht, hyperbilirubinemie
- Splenomegalie (mild tot matig)
- *Milde HS: normaal Hb en bilirubine!*

Diagnose in de huidige praktijk



- Klinische context: familiale voorgeschiedenis, typische symptomen

- Labo
  - DAT (negatief)
  - Microscopie (sferocyten)
  - Osmotische fragiliteit (verhoogd)

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

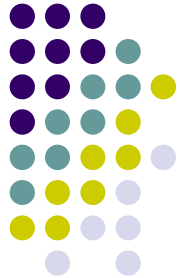
RBC indices, reticulocytentelling

- Hb: 9 - 12 g/dl
- MCV
  - gedaald, normaal of gestegen (reticulocyten)
  - neemt (relatief gezien) toe na spelenectomie
- MCHC: ↑ tot 37 g/dL
- RDW ↑
- Reticulocytose: 5 - 20‰

} ~ ernst aandoening

Parameters	Remarks
Combined MCHC and RDW (or HDW)	Significantly higher in HS
Combined % hyperdense* cells and RDW	Excellent diagnostic efficacy and indication of HS severity
% Microcytes†	The best indicator of HS severity
Combined MCHC and % hyperdense cells	A discriminating feature of the HS phenotype

De waarde van MCHC en RDW



- *Conway et al, 2002*
  - Toegenomen RDW en toegenomen MCHC hebben een hoog voorspellende waarde voor HS

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Hemolyse parameters

- Parameters
  - gestegen (ongeconjugeerd) bilirubine
  - Reticulocytosis
  - Toegenomen LDH
  - Toegenomen urinair en fecaal urobilinogeen
  - Gedaald haptoglobine
  - Gedaald hemoglobine
- Diagnostische performantie?
  - Niet specifiek

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

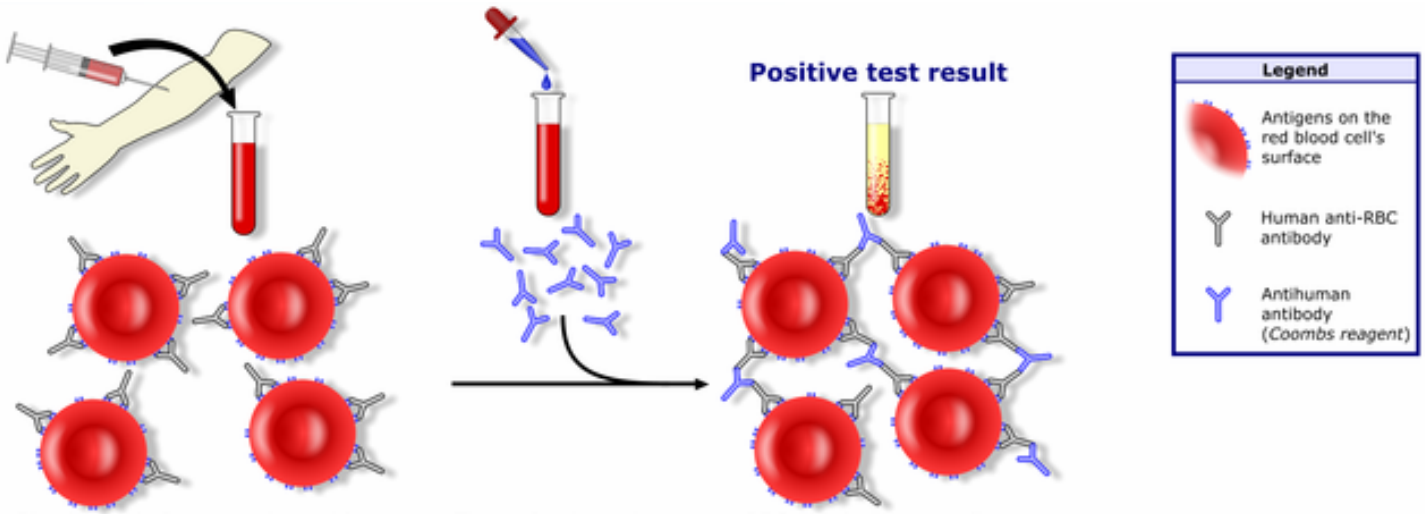
- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Directe antiglobulinetest (DAT)

- Aantonen Ab en/of complementfactoren gebonden aan RBC dmv incubatie met anti-humaan globuline → agglutinatie?
- Negatief, ook bij HS



Directe antiglobulinetest (DAT)

- Waarde van de test?
  - **Differentiëel diagnose**
    Indien familiale voorgeschiedenis afwezig
    → uitsluiten auto-immuun hemolytische anemie
  - Cave: te lage Ab titer (VN)

- Diagnostisch aspect?
  - familiale voorgeschiedenis, negatieve DAT en sferocyten op bloedfilm → HS

Diagnose

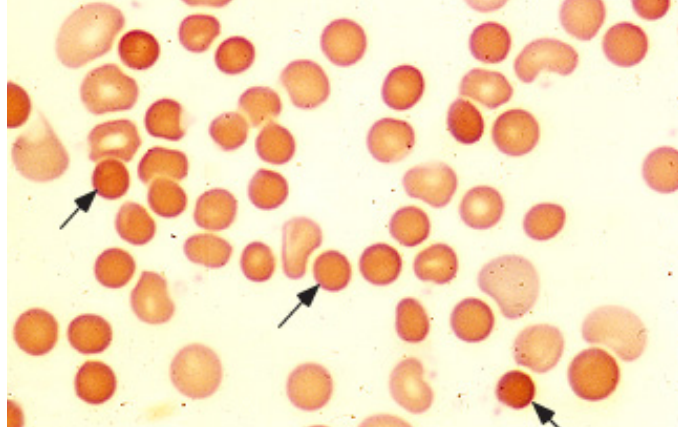
- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Microscopisch onderzoek HS



- **PB**
  - **Sferocyten** = denser gekleurde RBC (hyperchroom), kleiner dan normale RBC, zonder centrale opheldering
  - Graad sferocytose ~ celleeftijd

    (jonge cellen morfologisch normaal)
  - Aantal sferocyten ~ ernst v/h membraandefect

  - **Reticulocytose** ↑

    (evt. ook forse macrocytose bij ernstige gevallen)

Microscopisch onderzoek HS

- **PB aandachtspunten**
  - Geen carrier exclusie bij normaal bloedbeeld!
  - Ongeveer 1/3 neonaten vertoont sferocyten
  - Belang van goed uitsrijkpreparaat, juiste zone

- **BM onderzoek = overbodig**

Microscopisch onderzoek HS

- Diagnostische performantie
  - Niet specifiek, niet sensitief
  - Minst objectieve test
  - Milde HS (1-3 sferocyten/veld): lage NPV → confirmatietest nodig
  - Matige HS (20-30 sferocyten/veld), ernstige HS (> 30/veld): hoge PPV
- Rol in differentiëel diagnose: HS ↔ verworven sferocytose
  - Sferocyten zijn uniform qua grootte en densiteit bij HS
  - Sferocyten = enige morfologische afwijking bij HS
- Diagnostisch aspect?
  - familiale voorgeschiedenis, negatieve DAT en sferocyten op bloedfilm → HS

Diagnose

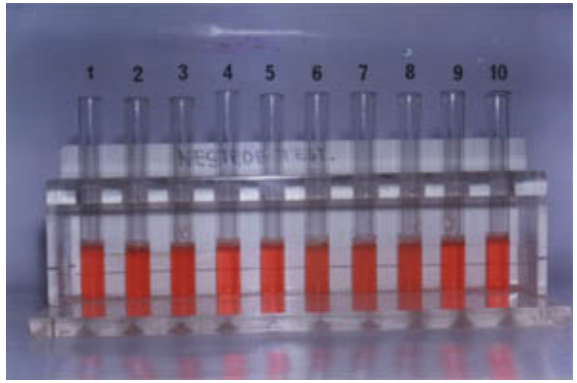
- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Osmotische fragiliteittest

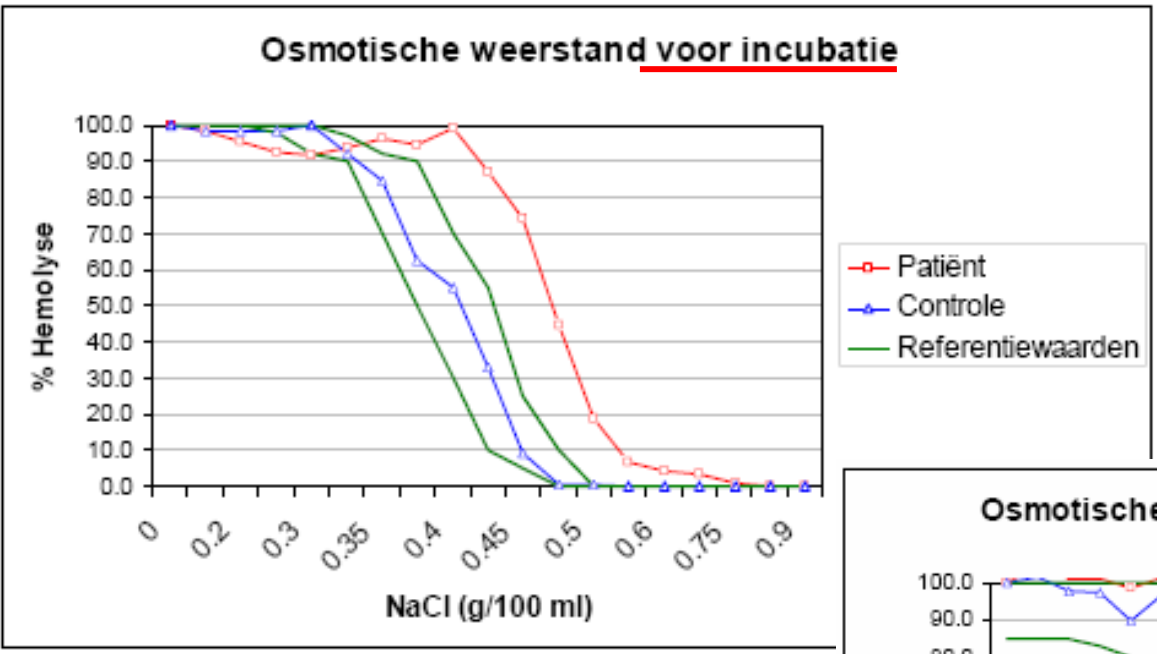


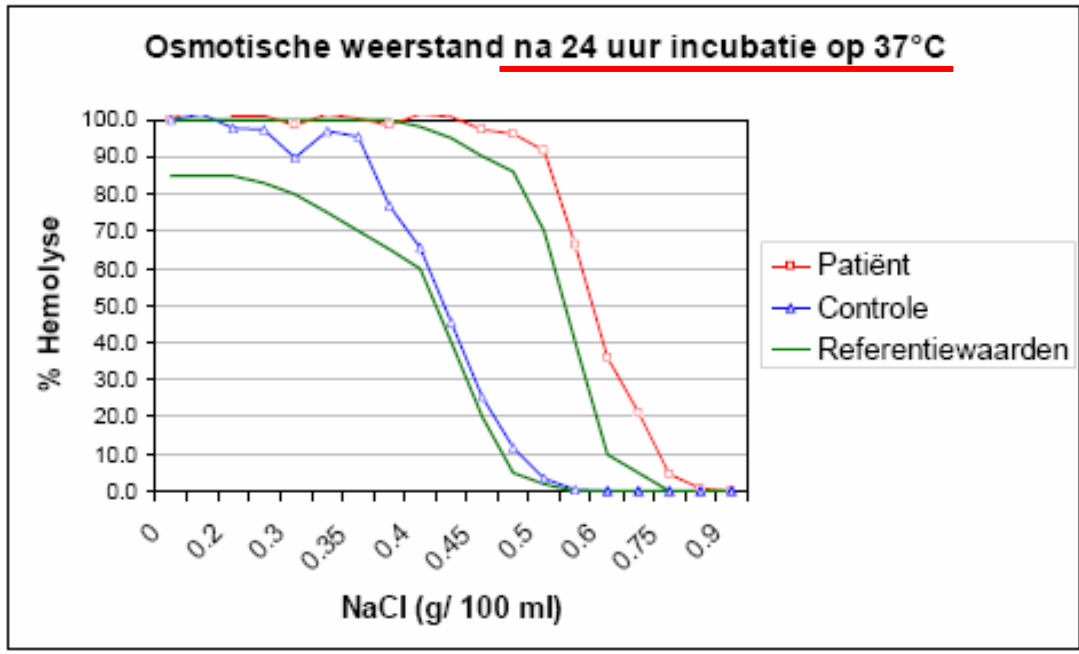
- Meet indirect de aanwezigheid van **sferocyten**: meting **membraanoppervlak-volume ratio RBC**
  - Gedaald o.a. bij sferocyten
- Vermogen om water op te nemen vooraleer lysis optreedt is kleiner bij sferocyten dan bij normale RBC

- Principe
  - bloed + overmaat gebufferde hypotone zoutoplossing aan verschillende concentraties (2g/L → 9g/L NaCl)
    → colorimetrische bepaling v/d fractie gelyseerde cellen bij elke zoutconcentratie (meting vrijgezet Hb)

Osmotische fragiliteit (OF)

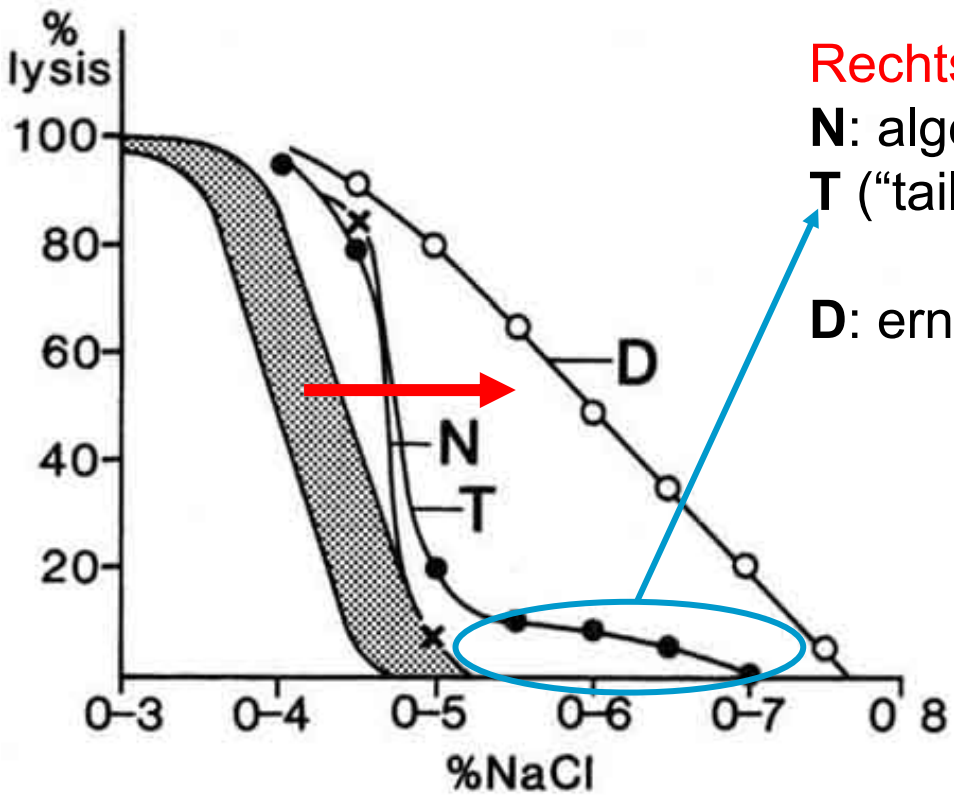
- **Vers** bloed of **na 24u incubatie** op 37°C





Osmotische fragiliteit (OF)

- Verschillende typen curves bij HS



Rechts-shift indien gestegen OF

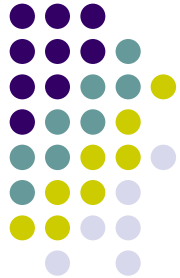
N: algemene toename OF

T (“tail”): 2e populatie zeer fragiele cellen (HS zonder splenectomie)

D: ernstige HS

→ geen onderscheid tussen de 2 celpopulaties

Osmotische fragiliteit (OF)



- Rapportering
  - Grafisch
  - NaCl-concentratie waarbij 50% hemolyse optreedt (MCF)
  - % lyse bij 5,5 g/L NaCl = “beste discriminerende waarde tussen gezonde personen en HS patiënten”
  - Grafisch na transformatie v/d assen (rechte)

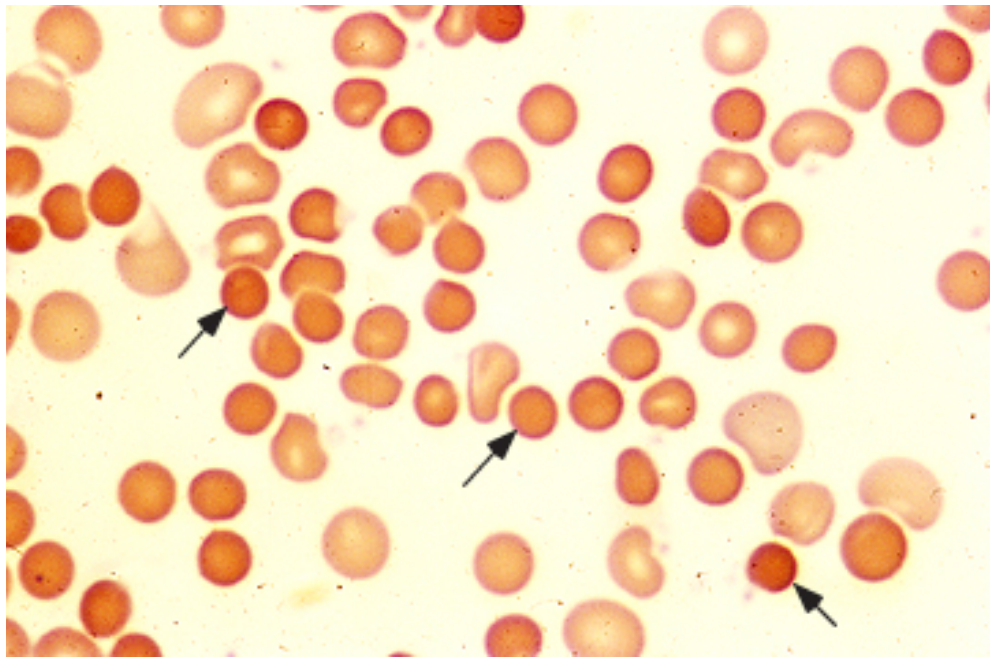
- Beperkingen
  - Omslachtig, arbeidsintensief, tijdrovend, minstens 2 ml bloed nodig ↔ neonati, screening
  - Leeftijdsafhankelijke OF → moeilijk te interpreteren bij neonati (andere normale range), 24h incubatie nodig

Osmotische fragiliteit: diagnostische performantie

- Na 24h incubatie
  - sensitiviteit ↑, specificiteit ↓
  - 20% van de milde HS nog gemist
- Niet specifiek voor HS (vals positieven)
  - Geen onderscheid HS ↔ AIHA met sferocytose of andere oorzaken van sferocytose
  - Ook pos bij andere congenitale membraanafwijkingen, (immuun gemedieerde) hemolyse, sommige zwangere vrouwen in het 3e trimester
- Vals negatieve resultaten
  - 10-20% van de HS patiënten
  - obstructieve geelzucht, recovery fase na aplastische crisis, celdehydratatie, bloedtransfusie, …

Osmotische fragiliteit

- Diagnostisch aspect?
  - Geen toegevoegde waarde indien duidelijk sferocyten aanwezig op de bloedfilm



Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Autohemolyse

- Spontane hemolyse die optreedt na 48h incubatie met eigen serum bij 37°C met én zonder toevoeging van glucose
- Initiële screening naar hemolytische anemie
  - Info over metabole capaciteit RBC
  - Onderscheid tussen membraan- en metabole (enzym) afwijkingen (in combinatie met morfologie, overerving, klinische symptomen)

Autohemolyse

- Diagnostische performantie
  - Niet specifiek
  - Positieve resultaten bij AIHA, HPFH, 1/3 van de zwangere vrouwen, soms bij chronisch nierfalen , …
- Waarde van de test/beperkingen?
  - Beperkte diagnostische waarde voor congenitale hemolytische anemie
  - arbeidsintensief, > 10ml bloed nodig, steriliteit vereist
- Alleen nog nuttig voor selectieve gevallen van congenitale hemolytische anemie met onduidelijke OF resultaten, normale enzyme waarden of minimale hemolyse

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Zure Glycerol lysis test (AGLT)

- Principe
  - Fotometrische bepaling v/d tijd nodig voor 50% hemolyse na 24h incubatie i/e gebufferde hypotone zout-glycerololoplossing

- Variant: **Pink test**
  - RBC 30-45 minuten gesuspendeerd i/e glycerol bevattende Tris-buffer → centrifugatie

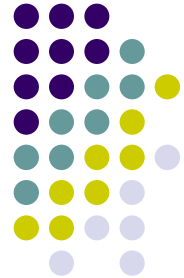
    → optische densiteit v/h supernatans (“pink”) meten

Zure Glycerol lysis test (AGLT)

- Diagnostische performantie
  - Sensitiviteit 98%, specificiteit 91%
  - Kortere AGLT: HS, verworven sferocytose (AIHA, hemolytische ziekte v/d pasgeborene), 1/3 zwangere vrouwen 3e trimester, MDS, HPFH,…
  - De oorzaak v/d meeste VP resultaten is gemakkelijk opspoorbaar

Likelihood ratio's (LR)	Number needed to diagnose (NND)
LR+ve = 10.88 LR-ve = 0.022	NND = 0.1123

Zure Glycerol lysis test (AGLT)



- Meerwaarde?
  - Nuttig als sferocyten niet duidelijk zijn op PB uitstrijkje
  - Kleiner volume bloed nodig (neonati)
  - Technisch eenvoudig
  - Goede scheiding tussen sferocyten en normale RBC
  - Niet beïnvloed door splenectomie
  - Geen leeftijdsafhankelijk effect

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

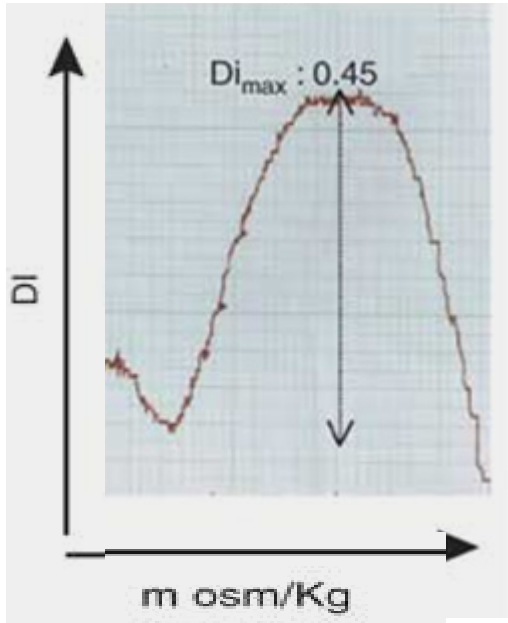
- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

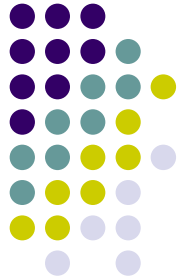
- Terugbetaling?

Osmotische gradiënt ektacytometrie

- Principe: viscometer brengt schuifspanning aan op RBC → laser meet verandering in lichtverstrooiing tgv van vormverandering RBC
  - meting membraanoppervlak/volume ratio
  - én meting celhydradatie
  - én meting intrinsieke membraaneffecten op vervormbaarheid



Osmotische gradiënt ektacytometrie



- Diagnostische performantie
  - Hoog voorspellende waarde
  - HS profiel ≠ profiel van andere RBC afwijkingen
- Meerwaarde?
  - Accurater dan osmotische fragiliteit om HS te onderscheiden van normale RBC
  - HS RBC: “karakteristiek patroon dat zowel microscopie als OF kan vervangen”
- Beperkingen
  - Appartuur niet overal beschikbaar
  - Eerder in research, vergt expertise

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Hypertone cryohemolyse test

- Principe

  Sferocyten in hypertoon milieu zijn gevoeliger aan temperatuurswijziging (37°C → 0°C) dan normale RBC

  - RBC suspenderen in hypertone oplossing
  - Verwarmen op 37°C gedurende 10 min
  - Afkoelen tot 4°C gedurende 10 min
    → massieve hemolyse: meting vrij Hb

  - De mate van hemolyse is afhankelijk v/d toniciteit en v/d temperatuur v/h medium

Hypertone cryohemolyse test

- Diagnostische performantie
  - Sensitiviteit 95%, specificiteit 96%
    (HS: cut-off = 15% hemolyse)
  - Hoger voorspellende waarde dan OF
    (geen positief resultaat bij immuun of niet-membraan geassocieerde aandoeningen)
  - VP: CDAII, Melanesische elliptocytose, SAO

Likelihood ratio's (LR)	Number needed to diagnose (NND)
LR+ve = 23.75 LR-ve = 0.05	NND = 1.098

Hypertone cryohemolyse test

- Meerwaarde?
  - lage kostprijs
  - snelle resultaten, minder tijdrovend en omslachtig (↔ OF)
  - 200-500 µL bloed nodig (neonati, pediatrie) (↔ OF)
  - Geen leeftijdsafhankelijk effect (↔ OF)
  - Meting factoren gerelateerd aan primair moleculair membraan defect >>> RBC membraanoppervlak-volume ratio (↔ OF)
  - Groot onderscheid i/d graad van hemolyse tussen sferocyten en normale cellen
  - Detectie (asymptomatische) carriers mogelijk (↔ OF)

Osmotische fragiliteit vs Cryohemolysis test

TABLE I. Ability of OF Parameters and Cryohemolysis Test to Identify the Disease in 24 HS Cases (15 Probands + 9 Relatives)

Method	Positive results: Relatives (9)	Positive results: Probands (15)	False negative
Fresh blood			
% NaCl causing 50% lysis	2	7	15
Osmotic lysis at 0.55% NaCl	4	12	8
Incubated blood			
% NaCl causing 50% lysis	4	14	6
Osmotic lysis at 0.55% NaCl	7	15	2
Cryohemolysis	9	15	0

Osmotische fragiliteit

Diagnose

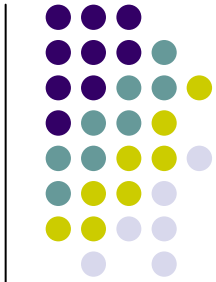
- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding



- Flow cytometrische test obv interactie EMA (=fluorescente probe, $C_{24}H_9Br_4NO_7$) en proteïne 3
  - HS pt met gekend defect in **spectrine, proteïne 3 of proteïne 4.2** vertonen allen een verlaagde fluorescentie (tov normale personen, andere anemiën)
  - Recent ontdekt: EMA bindt zowel aan
    - proteïne 3 (75-95% fluorescentie) als aan
    - Rh proteïnen
    - RhAG (Rhesus associated glycoprotein)
    - CD47

Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding

- Diagnostische performantie
  - Sensitiviteit 93% - specificiteit 99%
  - VP: CDAII, SAO, cryohydrocytose, soms congenitale elliptocytose

Likelihood ratio's (LR)	Number needed to diagnose (NND)
LR+ve = 91.8 LR-ve = 0.073	NND = 1.089

- Waarde in differentieel diagnose?
  - HS ↔ AIHA
  - obv de graad van fluorescentie afname:
HPP < HS < HE ≤ normale co
  - obv de kliniek: zeldzame RBC afwijkingen

Kedar et al., 2003

Test RBC
- 10 pt met HS
- 2 pt met HE
- 33 pt met andere hemolytische stoornissen

Controle groep
- 120 gezonde personen
- 36 navelstrengbloed

HS en HE: lagere MCF

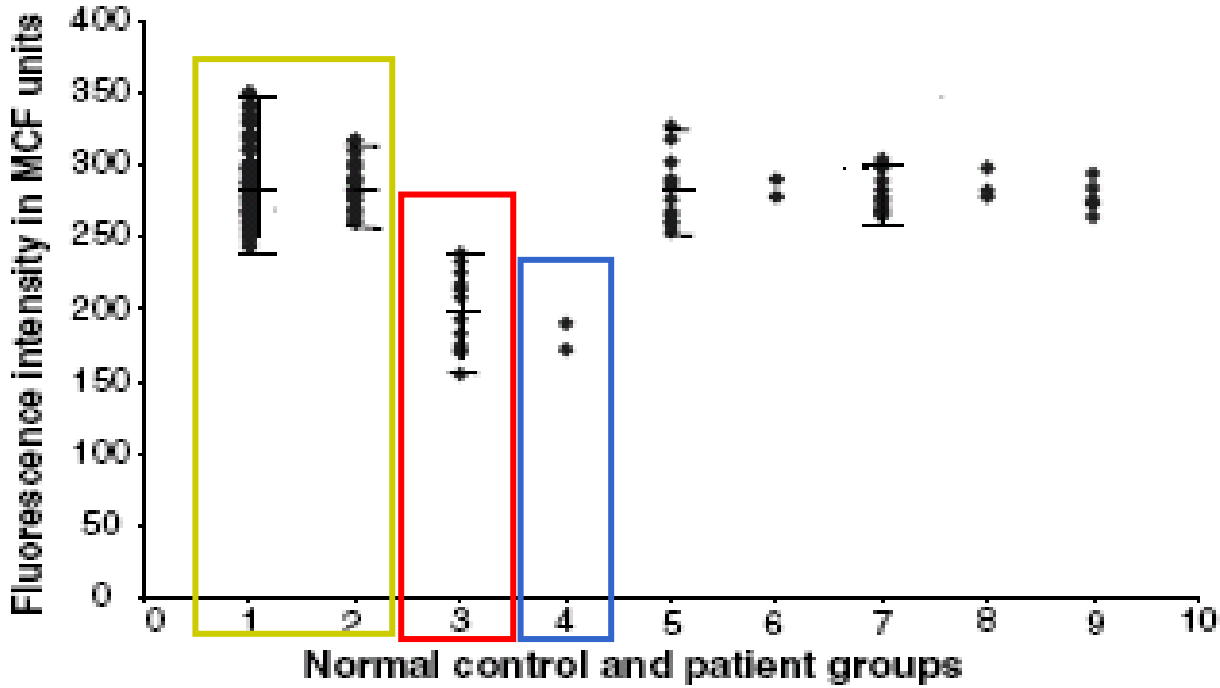
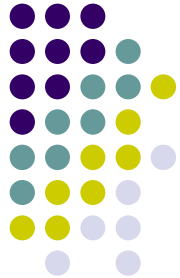


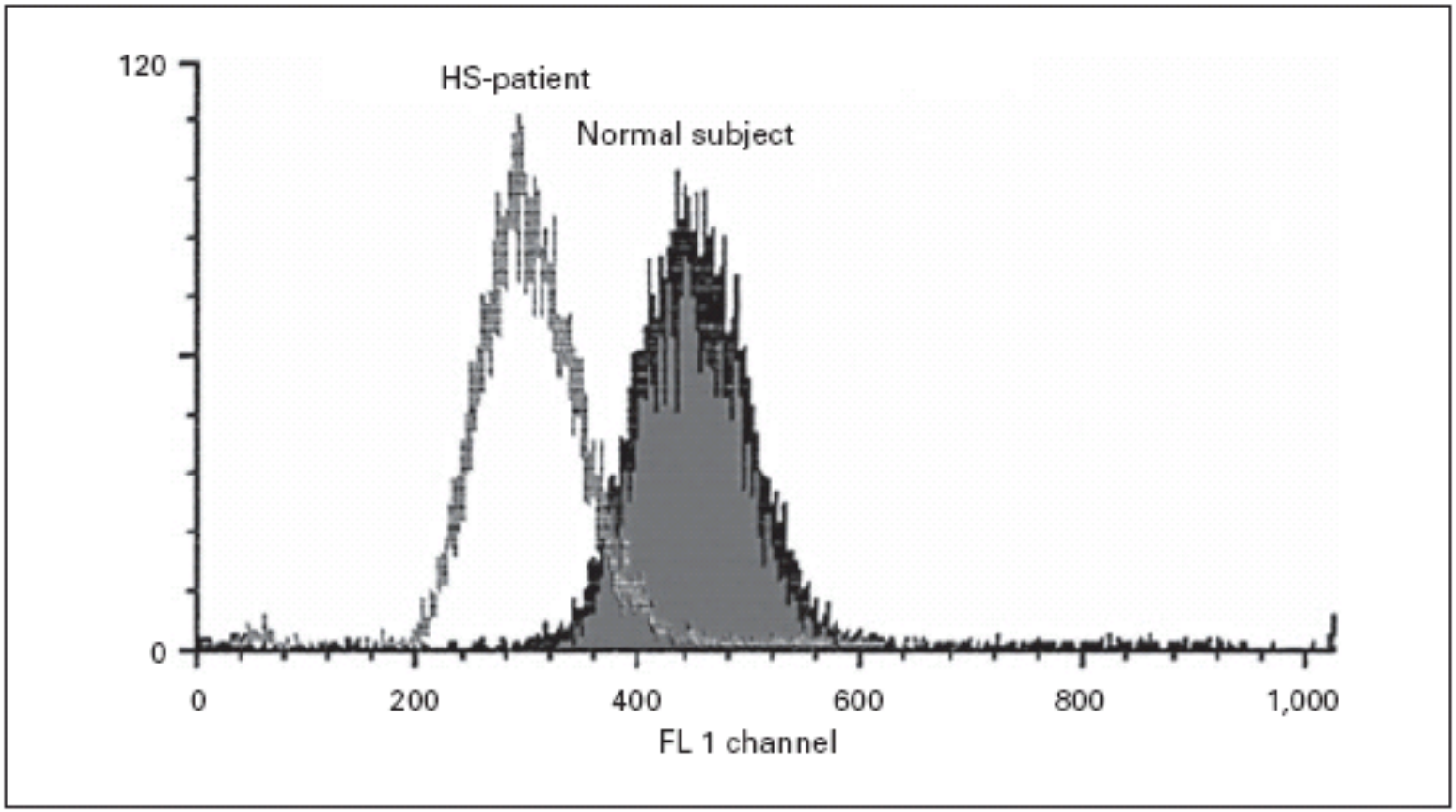
Figure 2. Histogram showing distribution of mean channel fluorescence for normal control and patient groups along with mean ± SD. 1, hematologically normal adults; 2, cord blood samples; 3, hereditary spherocytosis; 4, hereditary elliptocytosis; 5, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency; 6, pyruvate kinase (PK) deficiency; 7, β-thalassemia trait; 8, sickle cell disease; 9, autoimmune hemolytic anemia.

Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding



- Meerwaarde?
  - Snel (enkele uren), slechts 5-10 µl bloed
  - Meer sensitief voor detectie gemengde populatie RBC
  - Zowel proteïne 3, als spectrine en proteïne 4.2 deficiëntie detecteerbaar *(↔ geïsoleerde ankyrine deficiëntie: normale resultaten)*
  - meerderheid HS patiënten: ↓ MCF (mean channel fluorescence)
    → osmotische fragiliteittest overbodig

Fluorescentie histogrammen van EMA-gelabelde RBC v/e normale persoon en een patiënt met HS.



Fluorescentie gemeten als MCF (mean channel fluorescence) bij 535 nm.

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

- Terugbetaling?

SDS-PAGE

- Biochemische analyse v/d RBC membraan
  - Scheiding v/d proteïnen obv moleculair gewicht oiv een elektrisch veld
  - Kwantitatieve defecten
  - Kwalitatieve defecten
    - abnormale fragmenten
    - associatiedefecten van spectrine in tetrameren

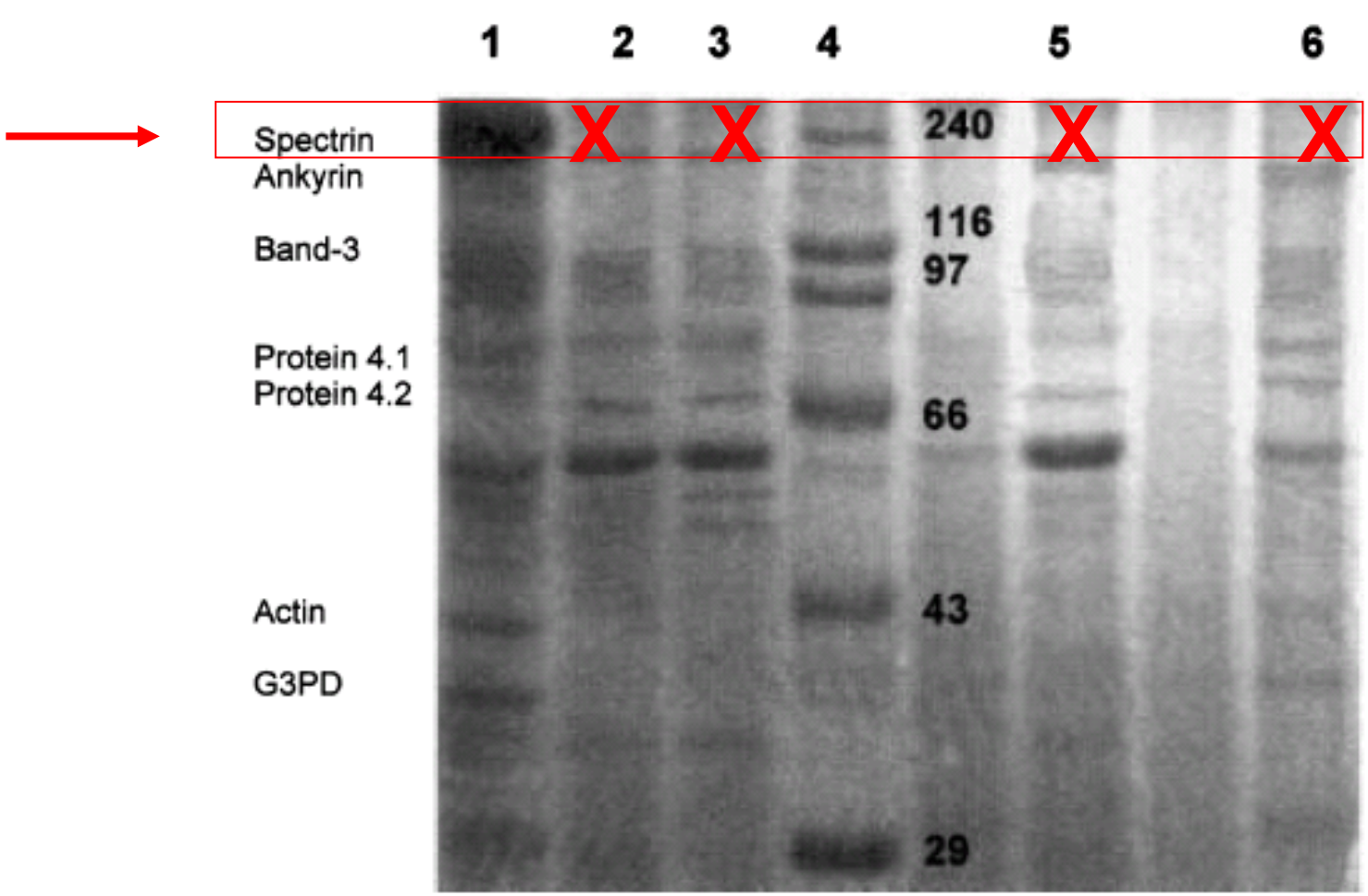


Figure 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of red blood cell (RBC) membrane proteins showing spectrin deficiency in four cases. Lane 1, normal control; lane 2, case 1; lane 3, case 2; lane 4, SDS-PAGE high molecular weight marker (Sigma, St. Louis, MO, USA); lane 5, case 3; lane 6, case 4.

SDS-PAGE

- Diagnostische performantie
  - Niet gevoelig genoeg voor milde HS
- Waarde van de test?
  - Confirmatietest
  - Nuttig bij +/- 1% v/d gevallen waarbij de diagnose onduidelijk is
- Beperkingen
  - Duur
  - Vergt expertise, omslachtig

Diagnose

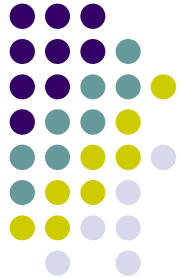
- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding
- SDS-PAGE
- Moleculaire diagnostiek

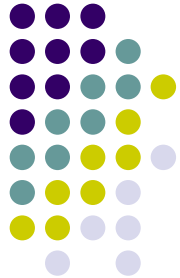
- Terugbetaling?

Moleculaire diagnostiek



- HS is geassocieerd met genetische afwijkingen in 1 of meerdere van 5 belangrijke proteïnen van het cytoskelet, meestal ankyrine (60%)
- Mutaties in 5 genen die coderen voor membraanproteïnen (alfa en beta spectrine, pallidine, ankyrine of proteïne 3)
  - Ankyrine of 2nd spectrine deficiëntie → ANK1 gen
  - Spectrine deficiëntie → SPTB en SPTA gen
  - Proteïne 3 deficiëntie → AE1 gen
  - Proteïne 4.2 deficiëntie → ELB42 gen

Moleculaire diagnostiek



- Waarde van de test?
  - Vaak sporadische en private mutaties dwz specifiek binnen een familie → niet geschikt voor screening
  - Meestal niet nodig voor behandeling
  - Slechts nuttig in zz gevallen
  - Eerder research doeleinden

Diagnose

- Klinische anamnese
- Familiale voorgeschiedenis

- RBC indices, reticulocytentelling
- Hemolyse parameters
- DAT (directe Coombs)
- Microscopie: RBC morfologie

- Osmotische fragiliteittest
- Autohemolyse test
- Zure glycerol lysis test
- Osmotische gradiënt ektacytometrie
- Hypertonische cryohemolyse test
- Flow cytometrie: Eosine-5-maleimide (EMA) binding

- Terugbetaling?

Terugbetaling?

TEST	TERUGBETALING ?
•**Rode bloedcel telling**	○Ja
•**Reticulocytentelling**	○Ja
•**DAT**	○Ja
•**Hemolyse parameters (bilirubine, haptoglobine, LDH)**	○Ja
•**Microscopische evaluatie van rode bloedcel morfologie (sferocyten)**	○Staat niet in de nomenclatuur als dusdanig.
•**Osmotische fragiliteit**	○Ja
•**Autohemolyse test**	○Staat niet in de nomenclatuur, wordt aangerekend aan de patiënt (met glucose 55 euro en zonder glucose 55 euro = 110 euro).
•**(Zure) glycerol lyse test**	○Nee
•**Osmotische gradiënt ektacytometrie**	○Nee
•**Hypertonische cryohemolyse test**	○Nee
•**Flow cytometrie, EMA-bindingstest**	○Nee
•**SDS-PAGE voor HS**	○Nee
•**Moleculaire diagnostiek voor HS**	○Nee

Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	Alle leeftijdscategoriën: 0-79 jaar
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	

Retrospectieve studie GHB januari 2006 tem januari 2007

eenheid	omschrijving eenheid	aantal aanvragen osmotische fragiliteittest
302	Rd kindergeneeskunde	14
321	intensieve neonatale zorgen	3
305	dagziekenhuis kindergeneeskunde	2
341	kinderziekenhuis	2
441	verloskunde	1
343	kinderziekenhuis	2
	totaal pediatrie + neonatologie	**24**
612	Rd oncologie	5
616	dagcentrum digestieve onco & hemato	1
445	hepatologie	1
409	Rd interne geneeskunde	2
595	spoed	3
433	cardiologie	1
516	MIG A	1
	totaal "andere disciplines"	**14**
20	extra-muros	5
TOTAAL aantal aanvragen jan 2006 tem jan 2007		**43**

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd (niet noodzakelijk verhoogd)	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	

Retrospectieve studie GHB

OSMOTISCHE FRAGILITEIT (OF)		
OF aangevraagd	43	
OF verhoogd (vers + na 24h)	12	alle leeftijdscategoriën: 0 -77 jaar
OF verhoogd (vers)	7	vooral owv test niet uitvoerbaar op zaterdag
OF verhoogd ? (twijfelgevallen)	3	2 x zelfde patiënt van 2 jaar oud; 1 patiënt van 39 jaar
OF negatief (vers + na 24h)	13	
OF negatief (vers)	3	allen neonati: quid na 24h?
OF negatief (na 24h)	5	allen neonati alleen uitgevoerd na 24h indien te weinig staal
MICROSCOPIE		
sferocyten aanwezig in PB	67	
MICROSCOPIE + OSMOTISCHE FRAGILITEITTEST		
microscopie aangevraagd indien OF uitgevoerd	29	
OF aangevraagd indien sferocyten in PB	6	
OF verhoogd + sferocyten aanwezig in PB	4	2 Negatieve OF = neonaat (OF alleen op vers bloed) met zz sferocyten en 45 jarige man met zz sferocyten

Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

Conclusie

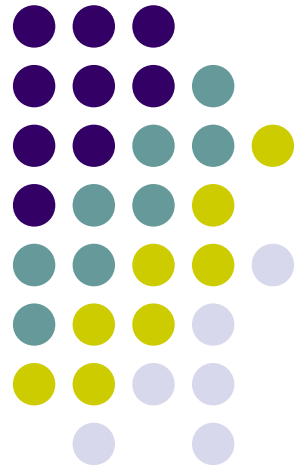
- Typische familiale voorgeschiedenis, typische klinische tekens en typische labresultaten
  → geen supplementaire laboratoriumtesten vereist
- Indien twijfelachtige diagnose → screeningstest
  - flow cytometrische EMA-bindingstest (sensitiviteit 93%, specificiteit 99%) of cryohemolyse test (sensitiviteit 96%, specificiteit 95%)
- Osmotische fragiliteittest
  - meerdere beperkingen
  - geen toegevoegde waarde indien duidelijk sferocyten aanwezig op de bloedfilm, slechts ondersteuning v/d diagnose

Inhoud

- Inleiding
- Guidelines
- Diagnose
- Retrospectieve studie GHB
- Conclusie
- To do/Acties

To do/Acties

- Afschaffen osmotische fragiliteittest overwegen → vervangen door
  - flow cytometrische test (al voldoende bruikbaar in de kliniek?)
  - of cryohemolyse test
- staalafnamecondities eventueel opvragen bij perifere labo's die hun stalen doorsturen naar GHB
- De autohemolyse test behouden?
  - zeer geringe aanvraagfrequentie
  - beperkte diagnostische waarde voor congenitale hemolytische anemie
  - arbeidsintensieve methode
  - hoge kostprijs
  - grote vereiste staalvolume

Bedankt voor uw aandacht

Zijn er vragen?