

OPTIMALISATIE VAN DIAGNOSE HEREDITAIRE SFEROCYTOSE

ASO: Dr. Alexandra Vodolazkaia
Promotor: Prof. Davy Kieffer

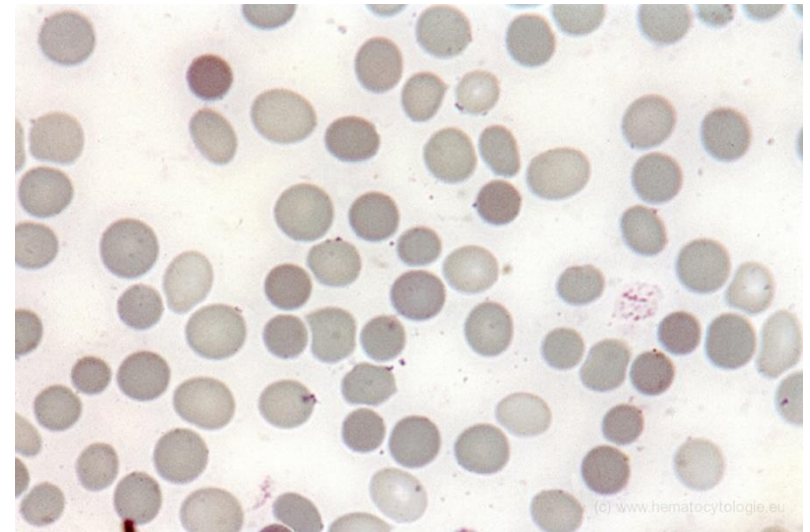
Inhoud

- Inleiding
- Klinisch/diagnostisch scenario
- Welke testen worden aangeraden voor de optimalisatie van de diagnose Hereditaire sferocytose (HS) in routine laboratorium:
 - Vraag 1: Kunnen hematologische parameters (Reticulocyten Indices) worden gebruikt bij het screenen van patiënten met HS?
 - Vraag 2: Is de Cryohemolyse test een geschikt alternatief voor Osmotische fragiliteit test?
- Conclusie en To Do

Hereditaire sferocytose (HS)

- Meest voorkomende hereditaire hemolytische anemie in Noord-Europa (1 op 2000)
- Autosomaal dominant in 75%-80%
- Deficiëntie of afwezigheid van één of meerdere membraanproteinen

Perifeer bloed: sferocyten



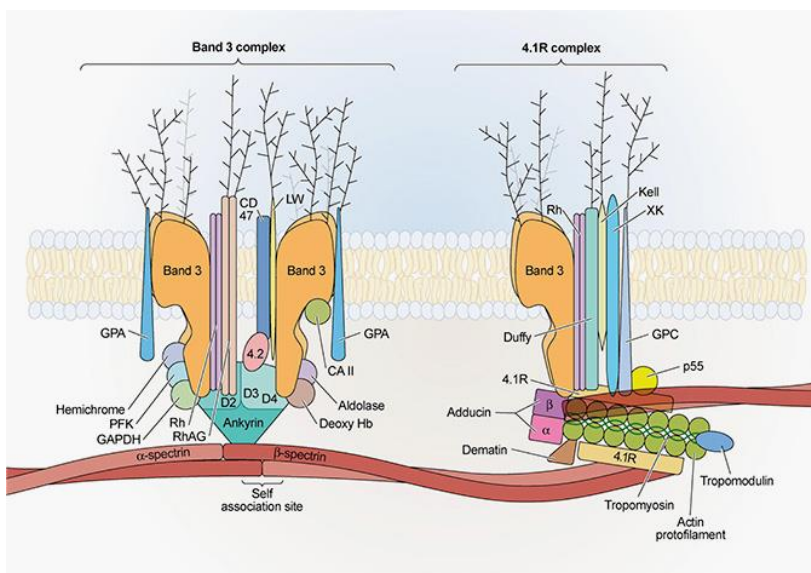
Schematische weergave van de rode celmembraan eiwitten, betrokken bij HS

Genmutaties, meestal van het ankyrine of het band 3 proteïne, minder vaak van de spectrins of 4,2 proteïne

afwijkingen (kwalitatief en/ of kwantitatief) in de cytoskelet eiwitten van de rode bloedcel

Membrane molecules associated with erythrocyte cytoskeleton (Bolton-Maggs et al., 2004)

Protein	Band on gel	Mr (kD)	Gene	Chromosomal location	Number of exons
α Spectrin	1	240	<i>SPTA1</i>	1q22-q23	52
β Spectrin	2	220	<i>SPTB</i>	14q23-q24.1	32
Ankyrin	2.1	210	<i>ANK1</i>	8p11.2	42
Band 3 (AE1)	3	90–100	<i>AE1</i> (<i>SLC4A1</i>)	17q21-q22	20
Protein 4.1	4.1	80	<i>EPB41</i>	1p36.2-p34	≥ 22
Protein 4.2	4.2	72	<i>EPB42</i>	15q15-q21	13
Glycophorin C	GPC	32	<i>GYPC</i>	2q14-q21	4



Salomao et al., PNAS, 2008

Het klinisch beeld

- Typische hereditaire sferocytose (60 tot 70% van alle gevallen) treedt op vanaf de vroegste kinderjaren en gaat gepaard met icterus, anemie en splenomegalie
- De ernstige vorm (5% van de patiënten) kan levensbedreigend zijn
- In de milde vorm (20-30% van de patiënten) kan het beenmerg het verlies aan rode bloedcellen nog compenseren met slechts een matige anemie tot gevolg. De aandoening blijft onopgemerkt tot een bijkomende factor zoals een virale infectie (vooral veroorzaakt door Parvovirus B19), zwangerschap, belangrijke fysieke inspanning of bloeding dit evenwicht verstoort

De ernst van het klinisch beeld

Wisselend: van
dragerschap tot
ernstige
hemolytische
anemie met
decompensatie

Classification	Trait	Mild	Moderate	Severe
Haemoglobin (g/dl)	Normal	11–15	8–12	6–8
Reticulocyte count %	Normal (<3%)	3–6	>6	>10
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<17	17–34	>34	>51
Splenectomy	Not required	Usually not necessary during childhood and adolescence	Necessary during school age before puberty	Necessary – delay until 6 years if possible

De diagnose van HS

Gebaseerd op een combinatie van:

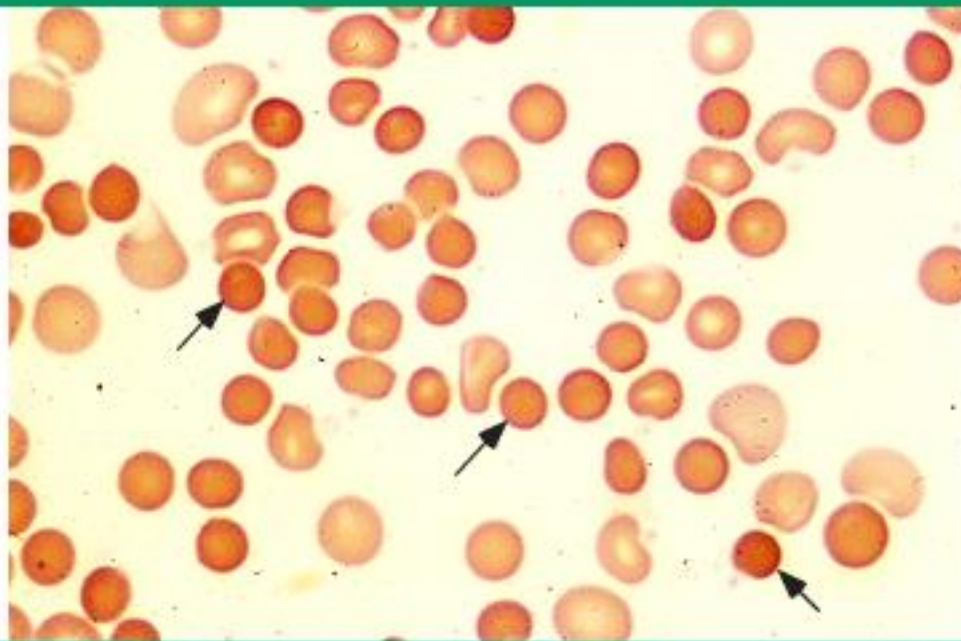
- ❑ Familiale voorgeschiedenis
- ❑ Klinische anamnese
- ❑ Lichamelijk onderzoek (splenomegalie, geelzucht)
- ❑ Laboratorium testen

Diagnostische parameters

Parameter	Features
Clinical features	Splenomegaly almost always
Laboratory red cell indices	(↓Hb, ↓MCV, ↑MCHC, ↑% hyperdense cells, ↑RDW, ↑reticulocyte count)
Evidence of haemolysis	Raised bilirubin; reticulocytosis
Direct antiglobulin test	Negative
Blood film	Abnormal morphology – spherocytes

MCV, mean cell volume; MCHC, mean cell Hb concentration; RDW, red cell distribution width (Bolton-Maggs et al., 2004)

Spherocytes



Peripheral blood smear shows multiple spherocytes, which are small, dark, dense hyperchromic red cells without central pallor (arrows). These findings are compatible with hereditary spherocytosis or autoimmune hemolytic anemia.

Courtesy of Carola von Kapff, SH (ASCP).

UpToDate®

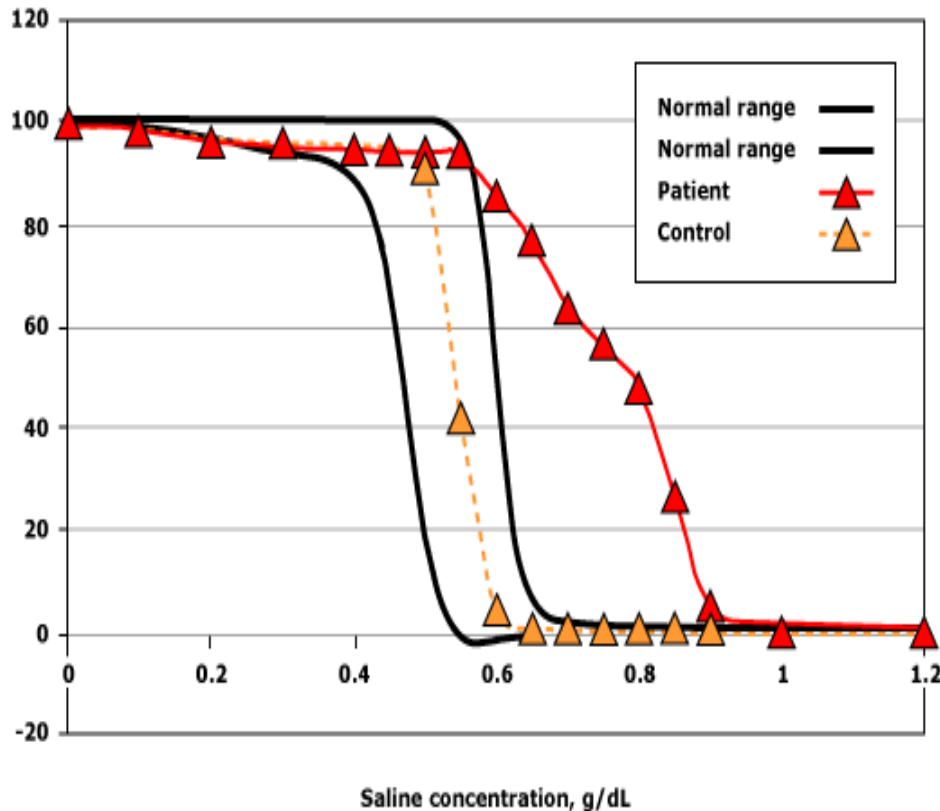
Laboratorium testen HS

Osmotische fragiliteit (OF)/Osmotische resistentie

- Traditionele test
- Principe: de gedaalde oppervlakte/volume verhouding van de rode bloedcellen leidt tot verminderd weerstand aan hypotone oplossingen
- Volume van min 2 ml bloed nodig (pediatrie)

Laboratorium testen HS

Osmotische fragiliteit (OF)/Osmotische resistentie



- Incubatie van RBC in oplossingen met een dalende concentratie aan NaCl
- Het percentage van hemolyse wordt bepaald door optische densiteitsmeting
- Uitvoering op vers bloed en na 24u incubatie op 37°C

Osmotische fragiliteit (OF)/Osmotische resistentie

Diagnostische performantie

- Lage sensitiviteit van 68% (King et al., 2013)
- Pre-incubatie gedurende 24 uur bij 37 °C verhoogd sensitiviteit 68% tot 81% (King et al., 2013)
- Lage sensitiviteit voor gecompenseerde HS (respectievelijk 53% en 64% voor vers en na 24 uur incubatie)(Bianchi et al., King et al., 2013)
- Normaal OF resultaat sluit de diagnose van HS niet uit (King et al., 2015).

Osmotische fragiliteit (OF)/Osmotische resistentie

Diagnostische performantie

- ❑ OF test is niet specifiek voor HS
- ❑ Geen onderscheid tussen HS en AIHA met sferocytose of andere oorzaken van sferocytose
(Bolton-Maggs et al., 2000)
- ❑ Interpretatie van OF testresultaten: ikv de familiegeschiedenis en het onderzoek van de perifere bloedsmeer

Vraagstelling

- In UZ Leuven wordt de traditionele OF-test uitgevoerd
 - OF-test is arbeidsintensief, tijdrovend, vereist een hoog volume bloed van minstens 2 ml
 - Lage gevoeligheid en specificiteit (Bianchi et al., 2012, King et al., 2015; Farias et al., 2016)
 - Aandacht aan andere screeningstesten met grotere gevoeligheid en specificiteit voor de diagnose HS:
-
- Vraag 1: Kunnen routine hematologische parameters (bijv. Reticulocyten Indices) worden gebruikt bij het screenen van patiënten met HS (eerste lijn screening)?
 - Vraag 2: Is de cryohemolyse test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Vraag 1: Kunnen routine hematologische parameters (bijv. Reticulocyten Indices) worden gebruikt voor het screenen van de patiënten met HS (eerste lijn screening)?

- De verminderde membraanoppervlakte-tot-volumeverhouding en verhoogde hemoglobine concentratie specifiek aanwezig zijn in het reticulocyten in HS, maar niet bij auto-immuun hemolytische anemie

(Da Costa et al., 2001; Lazarova et al. , 2014)

- Reticulocyten parameters kunnen de diagnostische tool zijn voor HS

(Da Costa et al., 2001; Lazarova et al., 2014).

Vraag 1: Kunnen routine hematologische parameters (bijv. Reticulocyten Indices) worden gebruikt voor het screenen van de patiënten met HS (eerste lijn screening)?
Screening algoritme van Lazarova et al., 2014

- Een evaluatie van geautomatiseerde reticulocyten parameters, beschikbaar op het Beckman Coulter UniCel DxH800 instrument met betrekking tot hun bruikbaarheid bij HS-screening:
 - Mean reticulocyte volume (MRV)
 - Immature reticulocyte fraction (IRF)
 - Mean spheroid cell volume (MSCV)
 - Delta (mean cell volume (MCV)-MSCV)

- Lazarova et al., rapporteerde de diagnostische prestatie van geautomatiseerde reticulocyten hematologische parameters (berekening op de basen op 374 cryohemolyse negatieve stalen en 48 HS positieve stalen)

Screening algoritme van Lazarova et al., Beckman Coulter UniCel DxH800

Diagnostische performantie

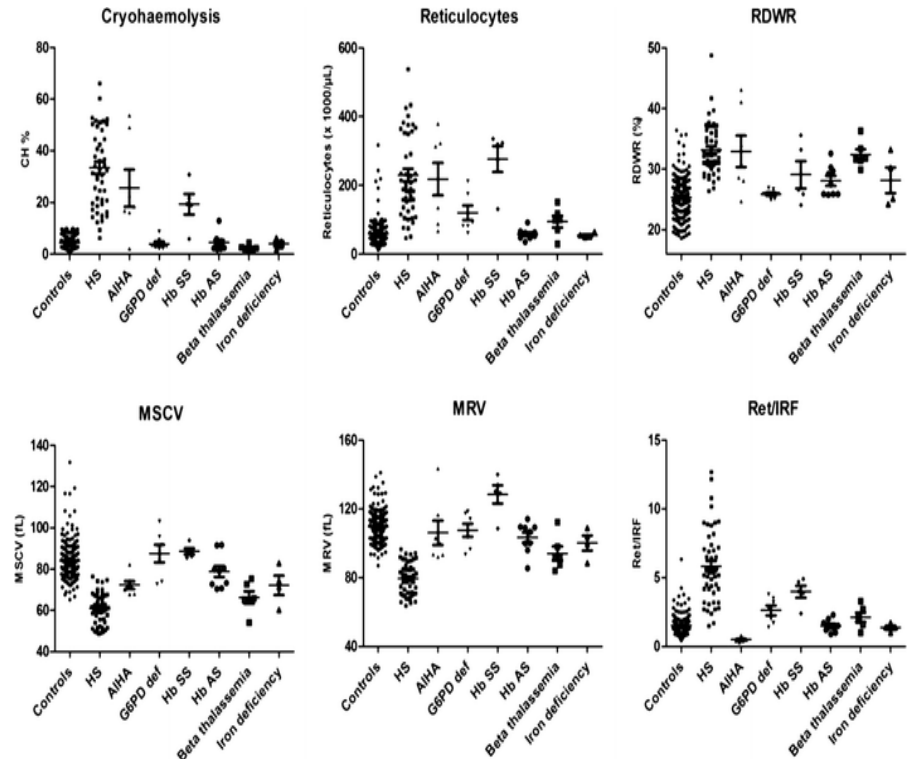
Parameter	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	+LR
MSCV cut-off ≤ 76.5	1	0.73	0.32	1	3.6
MSCV cut-off ≤ 70.2	0.92	0.9	0.54	0.99	9
Delta (MCV-MSCV) ≥ 10.4	1	0.74	0.34	1	3.8
Delta (MCV-MSCV) ≥ 18.1	0.92	0.94	0.66	0.99	14.9
Ret/IRF ≥ 1.53	1	0.54	0.22	1	2.2
Ret/IRF ≥ 2.58	0.92	0.89	0.50	0.99	8
MRV ≤ 96.72	1	0.88	0.53	1	8.7
MRV ≤ 92	0.92	0.94	0.67	0.99	15.5
RDWR ≥ 26.4	1	0.57	0.23	1	2.3
RDWR ≥ 28.53	0.92	0.79	0.36	0.99	4.3

- Parameters (i.e. MRV, IRF and mean sphered cell volume (MSCV)) available on the Beckman Coulter UniCel DxH800
- MSCV: unique parameter Beckman Coulter
- Ret/IRF ratio (Sysmex) vergelijkbare sensitiviteit en specificiteit met delta (MCV-MSCV)

Screening algoritme van Lazarova et al., HS vs AIHA

- De parameters IRF, MRV en MSCV onderscheiden HS van AIHA in tegenstelling tot de cryohemolyse test:

- Ret / IRF ratio ($p < 0,0001$)
- MRV ($p < 0,0001$)
- MSCV ($p = 0,0008$)



Screening algoritme : MSCV <70.2 fL or delta (MCV-MSCV) >10.4 fL en/of MRV <96.7 fL, CH test uitvoeren, en if the latter is >10 %, bevestigende test SDS-PAGE

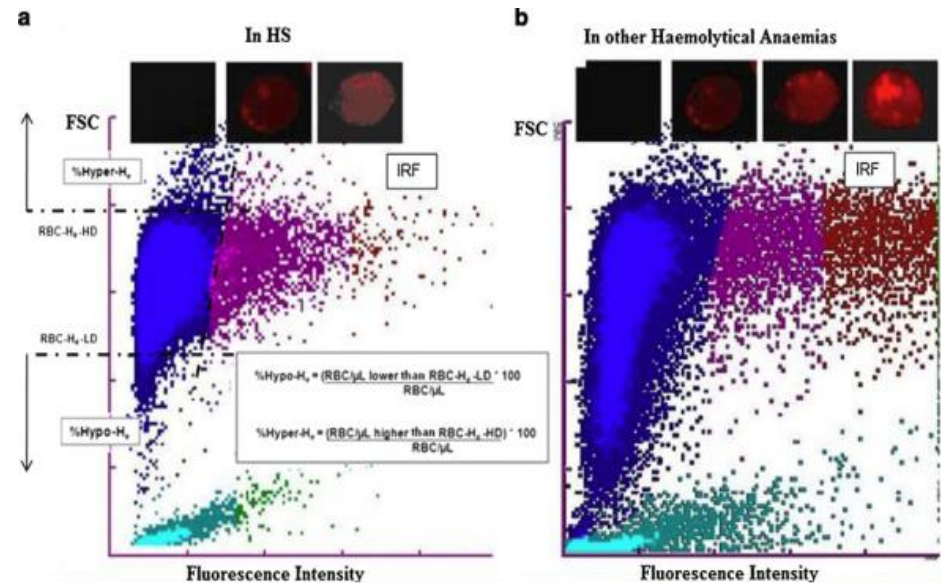
Screening algoritme van Mullier et al., XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan)

- Gebaseerd op de fysiopathologie van HS: het verlies van het oppervlak is al in reticulocyten aanwezig
- Geautomatiseerde reticulocyten parameters van groot belang kunnen zijn voor screening HS
- Reticulocyten en reticulocyten indices:
 - Percentage microcyten (MicroR)
 - Percentage Immature reticulocyten (IRF)
 - Ret/IRF index
 - Percentage hypochrome cellen (% Hypo-He)

Screening algoritme van Mullier et al., XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan)

- Ret/IRF index HS: Reticulocytose met verminderde IRF
- Hypochrome erythrocyten en hyperchrome erythrocyten: gebaseerd op gemiddelde hemoglobine gehalte van alle gemeten rode bloedcellen (RBC-He) geanalyseerd in het reticulocyten kanaal:
 - % Hypo-He: RBC met een gemiddelde hemoglobinegehalte van minder dan 17 pg
 - % Hyper-He: RBC met een hemoglobine gehalte hoger dan 49 pg

Reticulocyten kanaal op Sysmex XE5000



Screening algoritme van Mullier et al., XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japan)

□Area under the curve
(AUC)=0.997

□Sensitivity=100%

□Specificity=99.3%

□Positive predictive
value=75%

□Negative predictive
value=100%

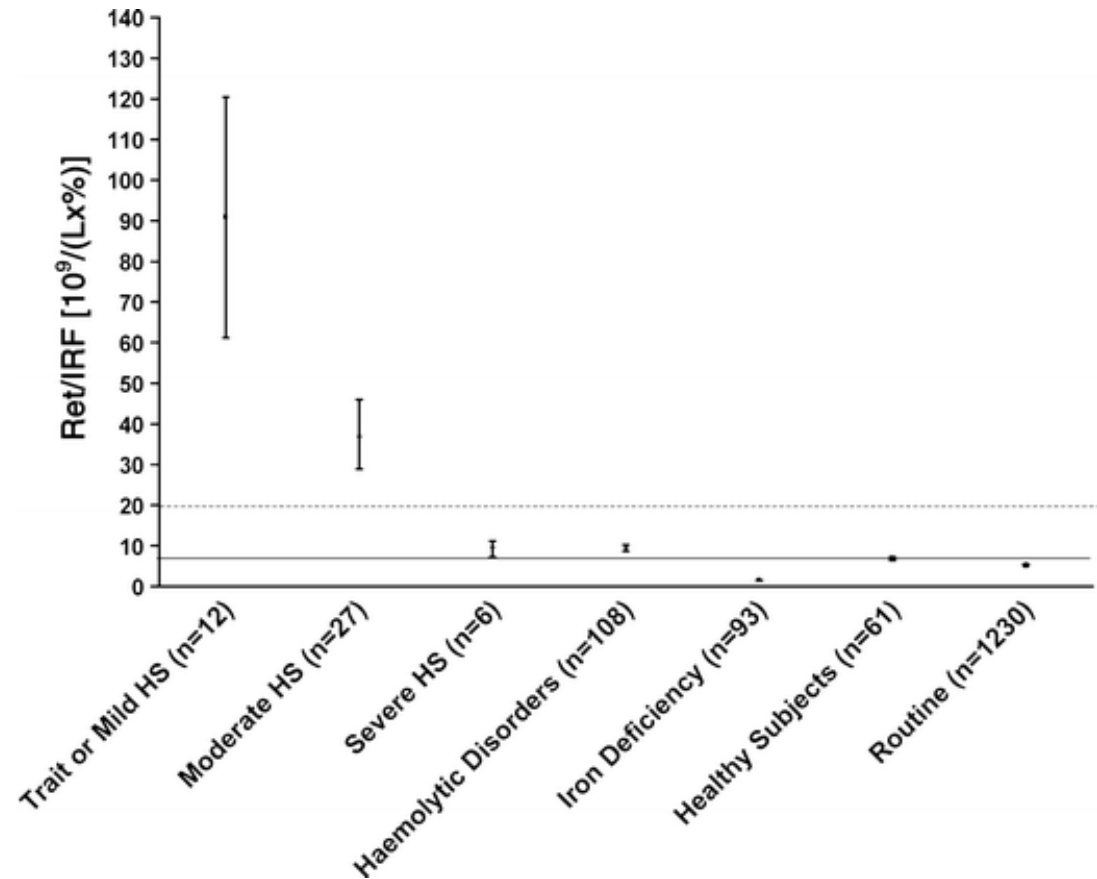
Rule		Parameters		
Rule 1	Precondition	Ret $\geq 80,000/\mu\text{l}$ and Ret/IRF > 7.7		
Rule 2	Severity	Trait or mild HS Hb > 12 g/dl	Moderate HS $8 \text{ g/dl} \leq \text{Hb} \leq 12 \text{ g/dl}$	Severe HS Hb < 8 g/dl
		Ret/IRF ≥ 19	MicroR $\geq 3.5\%$ and MicroR/Hypo-He ≥ 2.5	MicroR $\geq 3.5\%$ and MicroR/Hypo-He ≥ 2

Screening algoritme van Mullier et al., Diagnostische performantie

Parameter	AUC (95% CI)	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
MCHC (g/dl)	0.735 (0.711–0.758)	34.7	73.3	72.6	5.1	99.3
MicroR (%)	0.744 (0.721–0.766)	7.8	56.7	84.8	7.0	99.0
RDW-CV (%)	0.684 (0.659–0.708)	18.1	55.2	80.6	5.6	98.9
MCHC and RDW-CV	0.678 (0.653–0.702)	Positive	37.9	97.6	24.4	98.7
Hyper-He (%)	0.750 (0.726–0.772)	0.5	55.2	82.1	6.0	98.9
MCHC and Hyper-He	0.714 (0.690–0.738)	Positive	44.8	98.1	32.5	98.8
RDW-CV and Hyper-He	0.642 (0.617–0.667)	Positive	34.5	94.0	10.6	98.6
MicroR/Hypo-He ratio	0.743 (0.720–0.764)	4.0	76.7	65.6	4.3	99.3
Ret (10 ⁹ /L)	0.938 (0.925–0.950)	103.5	93.3	83.6	10.3	99.8
Ret/IRF ratio	0.976 (0.967–0.983)	9.7	96.7	89.6	15.9	99.9
HS diagnostic tool	0.997 (0.992–0.999)	Positive	100.0	99.3	75.0	100.0

Screening algoritme van Mullier et al., HS vs AIHA

Ret/IRF
onderscheid
HS van AIHA
in mild/moderate
HS



Validatie van Screening algoritme van Mullier door Persijn et al., (2012)

Diagnostische performantie

❑ Validatie: Lagere diagnostische performantie

❑ Doel:
ongediagnosticeerde
zonder splenectomie te
identificeren (afname Ret
na splenectomie)

❑ Aangepaste algoritme
met betere diagnostische
performantie:

➤ $Ret \geq 100$ (ipv ≥ 80)

➤ $MicroR \geq 2.6\%$

(ipv $\geq 3.5\%$)

Reference	Parameter	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Mullier et al., 2011	HS diagnostic tool	0.997	100.0	99.3	75.0	100.0
Persijn et al., 2012	Validation of HS diagnostic tool		76	98	26.8	99.8
Persijn et al., 2012	HS diagnostic tool Adapted		84/ 100*	99/ 99*	43.8/ 42.6*	99.8/ 100*

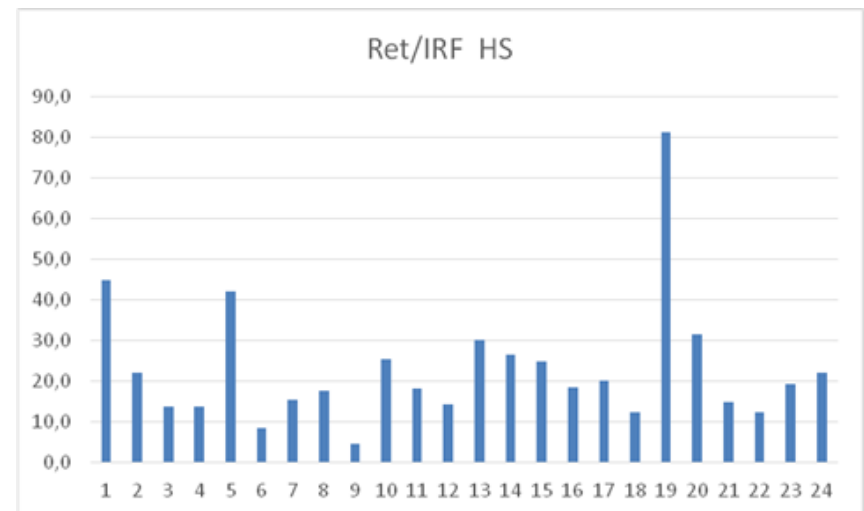
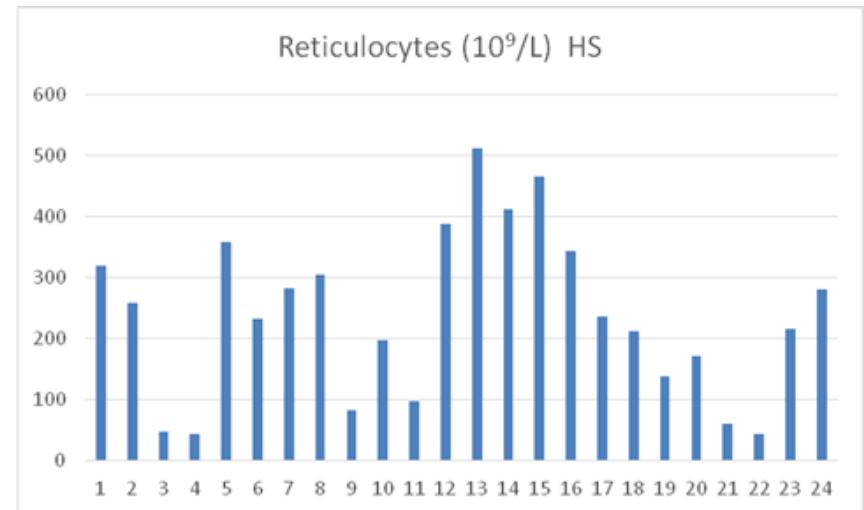
* non-splenectomised

Retrospectieve studie gebaseerd op UZ Leuven LAG Data

- Sysmex - XE-5000 hematologische analysatoren
- Doel: Screening tool voor HS (Mullier et al., 2011)
- Single-institutionele retrospectieve studie uitgevoerd op stalen getest voor HS met behulp van de OF-test tussen 2012 en 2016
- De patiënten geïdentificeerd door de elektronische databank UZ-Leuven
- 24 stalen van patiënten met HS (bevestigd door klinische data en laboratoriumtests)

Retrospectieve studie gebaseerd op UZ Leuven LAG Data

- Rule1: HS in 19 van 24 stalen
- HS gemist in 5 stalen: N3; N4; N9; N21 en N22
- Gemiste: patiënten met milde HS
- Ret / IRF-indexen waren minder dan 19 in alle 5 monsters
- Discrepantie met Mullier data (Ret / IRF ratio hoger dan 19)



Retrospectieve studie gebaseerd op UZ Leuven LAG Data

Rule2:

- De gegevens : MicroR en Hypo-He voor stalen getest voor HS tussen 2012 en 2016 waren niet beschikbaar
- Research parameters (Sysmex) werden niet gerapporteerd en niet opgenomen in de LIS-databank
- LIS aangepast in samenwerking met LIS-team. De gegevens zoals MicroR en Hypo-He worden nu prospectief verzameld
- De analyse zal in de nabije toekomst worden uitgevoerd

Vraag 1: Kunnen routine hematologische parameters (Reticulocyten Indices) worden gebruikt bij het screenen van patiënten met HS (eerste lijn screening)?

Conclusie

- Geautomatiseerde reticulocyten parameters kunnen gebruikt worden als de screening tool voor de HS (diagnostische oriëntatie)
- Beperkingen: geautomatiseerde reticulocyten parameters gemeten met verschillende methoden in de verschillende hematologieanalysatoren, zodat data moeilijk te vergelijken
- Combinatie met andere methoden blijft noodzakelijk om de betrouwbare screening voor HS te waarborgen

Combinatie met andere methoden

Diagnostische richtlijnen voor HS-diagnose: (Bolton-Maggs et al., 2012; Lazarova et al., 2014)

□ Cryohemolyse test (CH) of EMA-test als screeningsmethoden

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Reference
OF	68 81 (24h)		Bianchi et al., 2012
CH	79-100	90-96	Streichman and Gescheidt, 1998 Crisp et al., 2011
EMA	>95	>85	King et al., 2000 Crisp et al., 2011 Bianchi et al., 2012 Gulbis et al., 2013

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

- Bij CH test worden de rode bloedcellen aan thermische en osmotische stress onderworpen door sterk hypertone sucroseoplossing en blootgesteld aan een plotse temperatuursverandering (incubatie 37°C en 0-4°C)
- Sferocyten zijn veel gevoeliger voor temperatuurveranderingen (overgang van 37°C naar 0°C)
- Deze test hangt niet af van de oppervlakte/volume verhouding maar van de eigenschappen van de rode bloedcelmembraan en blijkt gevoeliger en specifiekere dan de osmotische fragiliteitstest

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Praktische implementatie

- Bezoek aan het referentielaboratorium georganiseerd (Erasmus ziekenhuis)
- De cryohemolyse-test wordt uitgevoerd zoals gerapporteerd door Lazarova et al., 2014
- Referentiewaarden waren overgenomen uit literatuur
(Iglauer et al., 1999; Lazarova et al., 2014)
 - Cryohemolyse resultaat $<10\%$ werd als negatief gerapporteerd
 - Tussen 10 en 15% als verdacht
 - $> 15\%$ als positief

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Praktische implementatie: Stabiliteit van stalen

Bewaring tot 72 uur
op 4-8°C nodig

	4°C						
	0hr	24hr	48hr	72hr	%CV	SD	agreement 72 hr vs 0 hr
	24/01/2017	25/01/2017	26/01/2017	27/01/2017			
healthy volunteer 1	1,44	1,68	1,28	1,42	11%	0,17	99%
healthy volunteer 2	1,50	1,76	1,18	1,80	18%	0,29	120%
healthy volunteer 3	1,33	1,69	1,31	1,73	15%	0,23	130%
healthy volunteer 4	1,73	1,72	1,50	1,66	7%	0,11	96%
healthy volunteer 5	1,44	1,74	1,47	1,30	12%	0,19	90%

	RT						
	d0	24hr	48hr	72hr	%CV	SD	agreement 72 hr vs 0 hr
	24/01/2017	25/01/2017	26/01/2017	27/01/2017			
healthy volunteer 1	1,44	1,76	2,97	2,65	33%	0,72	184%
healthy volunteer 2	1,50	2,26	2,65	2,40	22%	0,50	160%
healthy volunteer 3	1,33	2,27	2,47	3,11	32%	0,73	233%
healthy volunteer 4	1,73	2,15	2,50	2,19	15%	0,32	127%
healthy volunteer 5	1,44	1,98	2,11	2,76	26%	0,54	191%

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Praktische implementatie: intra-run variation

Intra –run
variation was
14%

	Within-run opwerking berekend	Within-run toestel berekend	Within-run opwerking sucrose Abs	Within-run opwerking totale hemolyse Abs	Within-run toestel sucrose Abs	Within-run toestel totale hemolyse Abs
#1	2%	2%	0,063	1,499	0,056	1,436
#2	3%	2%	0,074	1,414	0,056	1,436
#3	2%	2%	0,058	1,669	0,056	1,436
#4	2%	2%	0,059	1,804	0,056	1,436
#5	2%	2%	0,064	1,429	0,056	1,436
#6	2%	2%	0,069	1,545	0,056	1,436
#7	2%	2%	0,062	1,489	0,056	1,436
#8	2%	2%	0,060	1,578	0,056	1,436
#9	2%	2%	0,064	1,531	0,056	1,436
#10	2%	2%	0,056	1,435	0,056	1,436
%CV	14%	0%	9%	8%	0%	0%

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Praktische implementatie: CH vs OF

- 15 gezonde vrijwilligers en 13 patiënten
- Een vals negatief resultaat van de CH-test (7,18%) in het staal van patiënt met HS tijdens de testfase
- Mogelijke verklaring: door onvoldoende temperatuurbewaking tijdens de incubatiestappen
- Protocol geoptimaliseerd: de strikte temperatuurbewaking tijdens de incubatie bij 37°C en bij 0-4°C

	CH (%)	OF	Comments
*healthy volunteer 1	1,44	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 2	1,5	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 3	1,33	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 4	1,73	normale osmotische resistentie	
* healthy volunteer 5	1,44	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 6	1,63	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 7	2,01	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 8	1,99	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 9	1,851	normale osmotische resistentie	
* healthy volunteer 10	2,104	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 11	4,2	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer12	3,95	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 13	17,59	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 14	15,98	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 15	6,3	normale osmotische resistentie	
*67598789	7,18	verlaagde osmotische resistentie incubatie niet uitgevoerd	HS
*64717408	1,77	normale osmotische resistentie	
*60227532	7,07	normale osmotische fragiliteit	
*71878987	2,72	normale osmotische fragiliteit	
62316347	4,24	verhoogde osmotische fragiliteit	Thalassemie
61044264	1,8	normale osmotische resistentie	
60215522	6,48	normale osmotische resistentie	
85585974	4,4	normale osmotische resistentie	
60744587	35	verlaagde osmotische resistentie incubatie niet uitgevoerd	AIHA
83574426	3,6	normale osmotische resistentie	
84836584	2,3	normale osmotische resistentie	
83570283	7,2	normale osmotische resistentie	
63721500	2,4	verhoogde osmotische resistentie	Thalassemie

*uitgevoerd tijdens de test fase

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Praktische implementatie: CH vs OF

□ Gezonde vrijwilligers 13 en 14: CH-test positieve HS (volgens de referentiewaarden, overgenomen uit literatuur)

□ OF-test was normaal in beide gevallen

□ Aangezien alle andere aanvullende onderzoeken negatief zijn voor HS, onderzoeken wij momenteel de reden voor deze waarschijnlijk valse positieve resultaten

□ Referentiewaarden moeten worden beoordeeld door elk laboratorium. Afhankelijk van de verificatie door het laboratorium van UZ Leuven, zou normale referentiewaarden voor CH-test mogelijk moeten worden aangepast

□ De belangrijkste beperking: onvoldoende monsters van patiënten met HS

□ Lopend prospectieve dataverzameling met als doel de CH-test en de resultaten van OF-test te vergelijken in stalen van patiënten met HS

	CH (%)	OF	Comments
*healthy volunteer 1	1,44	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 2	1,5	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 3	1,33	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 4	1,73	normale osmotische resistentie	
* healthy volunteer 5	1,44	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 6	1,63	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 7	2,01	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 8	1,99	normale osmotische resistentie	
*healthy volunteer 9	1,851	normale osmotische resistentie	
* healthy volunteer 10	2,104	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 11	4,2	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer12	3,95	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 13	17,59	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 14	15,98	normale osmotische resistentie	
healthy volunteer 15	6,3	normale osmotische resistentie	
*67598789	7,18	verlaagde osmotische resistentie incubatie niet uitgevoerd	HS
*64717408	1,77	normale osmotische resistentie	
*60227532	7,07	normale osmotische fragiliteit	
*71878987	2,72	normale osmotische fragiliteit	
62316347	4,24	verhoogde osmotische fragiliteit	Thalassemie
61044264	1,8	normale osmotische resistentie	
60215522	6,48	normale osmotische resistentie	
85585974	4,4	normale osmotische resistentie	
60744587	35	verlaagde osmotische resistentie incubatie niet uitgevoerd	AIHA
83574426	3,6	normale osmotische resistentie	
84836584	2,3	normale osmotische resistentie	
83570283	7,2	normale osmotische resistentie	
63721500	2,4	verhoogde osmotische resistentie	Thalassemie

*uitgevoerd tijdens de test fase

Vraag 2: Is de CH test een geschikt alternatief voor OF-test bij tweede lijn screening voor HS?

Vergelijking CH test resultaten: UZLeuven vs Erasmus Hospital

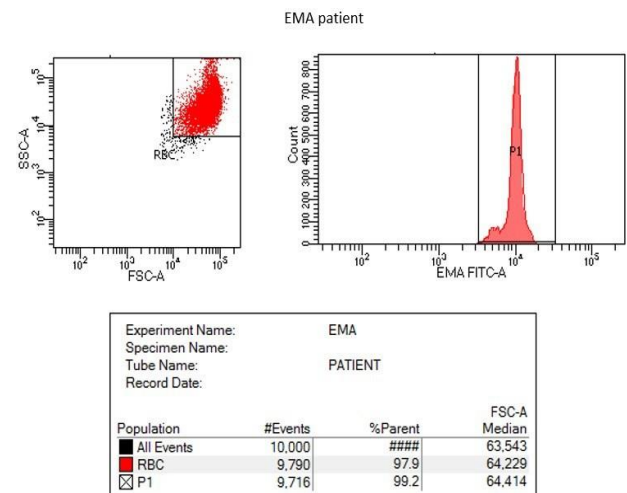
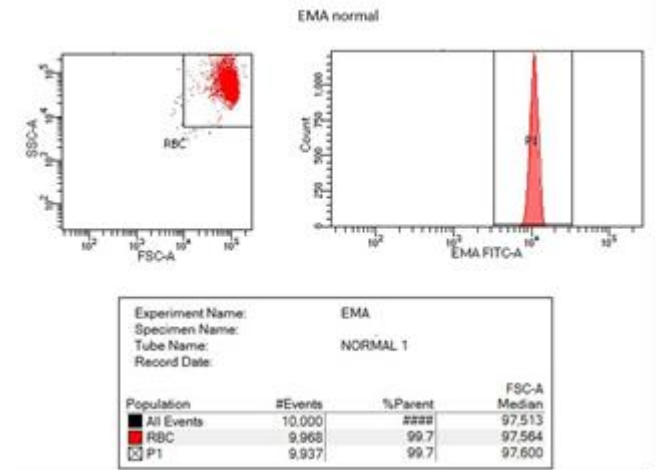
- Aangezien een vals negatief resultaat van CH-test werd waargenomen in één staal van patient met HS
- Geen discordante resultaten gevonden tussen beide laboratoria (positief versus negatief)
- Het CV tussen de laboratoria was echter tussen 9,3% en 80,7% (vooral door 1 staal)
- Het onacceptabele hoge CV kan gedeeltelijk worden verklaard door de methode van de CH-test die verschillende stappen vereist met handmatige voorbereiding en noodzakelijke strenge temperatuur monitoring tijdens de incubatie

	CH% Leuven	CH% Brussel	Concordance of the CH Results: Yes/No
healthy volunteer 11	4,2	3,6	Yes
healthy volunteer 12	3,95	2,4	Yes
healthy volunteer 13	17,59	14,2	Suspicious Leuven vs Positive Brussel
healthy volunteer 14	15,98	14	Positive Leuven vs Suspicious Brussel
healthy volunteer 15	6,3	4,4	Yes
VKA648	4,73	6,1	Yes
VKA069 HS	16,4	60	Yes
60744587 AIHA	35,2	29,6	Yes

Second-line screening

EMA (eosine-5-maleimide) binding test

- ❑ De flowcytometrische test
- ❑ Een fluorescente probe, die zich op covalente wijze bindt aan –NH2 en –SH groepen toegankelijk op de membraan van de rode bloedcellen
- ❑ Het grootste deel van de uitgezonden fluorescentie (80%) te wijten is aan de binding van de probe met een groep op de band-3 proteïne
- ❑ De resultaten worden uitgedrukt in een verminderde fluorescentie tov controle RBC
- ❑ Bepaling van referentiewaarden (grijze zone tussen 16% en 21%) (Mackiewicz et al., 2012)



A-B. An EMA (eosin-5'-maleimide) binding test is performed and this shows reduced binding consistent with hereditary spherocytosis

<https://teamhaem.com/blog/page/4/>

Second-line screening

EMA (eosine-5-maleimide) binding test

- Klein volume (100µl): geschikt voor pediatris (King et al., 2000)
- Geen invloed van transfusies: de methode onderscheidt verschillende rode celpopulaties (King et al., 2008; Bianchi et al., 2012)
- Stabiliteit tot maximaal 6 dagen bij 4° C (Guitton et al., 2008; Bianchi et al., 2012)
- De klinische prestatie van de EMA-test voor het detecteren van HS is goed in de meeste studies: gevoeligheid >95% en specificiteit >85%

Conclusie

- Geen van de testen kan alle gevallen van HS detecteren
- Screening algoritme, gebaseerd op de geautomatiseerde reticulocyten parameters biedt de mogelijkheid van eerste lijn screening voor het HS
- De CH-test heeft een superieure diagnostische performantie in vergelijking met OF-test, maar vereist strikte temperatuurcontrole tijdens de incubatie stappen
- Verificatie van de referentiewaarden voor CH-test is vereist

Stappenplan voor *Labodiagnostiek van HS*

(gebaseerd op Gulbis et al., 2013; Mullier et al., 2011; Persijn et al., 2012; Lazarova et al., 2014)

I Screening (General laboratory)

Screening (+ family history and typical clinical features)

- *First line*
 - RBC morphology on blood smear
 - Hematology parameters /Screening algorithm, based on the automated reticulocyte parameters
 - Biochemical hemolysis parameters

- *Second line (reduced area-to-volume ratio, increased osmotic fragility)*
 - Hypertonic cryohemolysis, osmotic fragility test
 - Eosine-5-maleimide binding

II Diagnosis (Reference centers)

- SDS-PAGE
- Ektacytometry with osmotic resistance measurement
- Molecular analysis

To do

- MicroR en Hypo-He data verzamelen en toepassen van Rule 2 van de screening algoritme van Mullier
- Prospectieve vergelijking CH-resultaten vs OF-test bij patiënten met vermoedelijke HS
- Verificatie referentiewaarden voor CH test



Bedankt