

Diagnostiek van subarachnoïdale bloeding (RBC telling door Sysmex XE-5000)

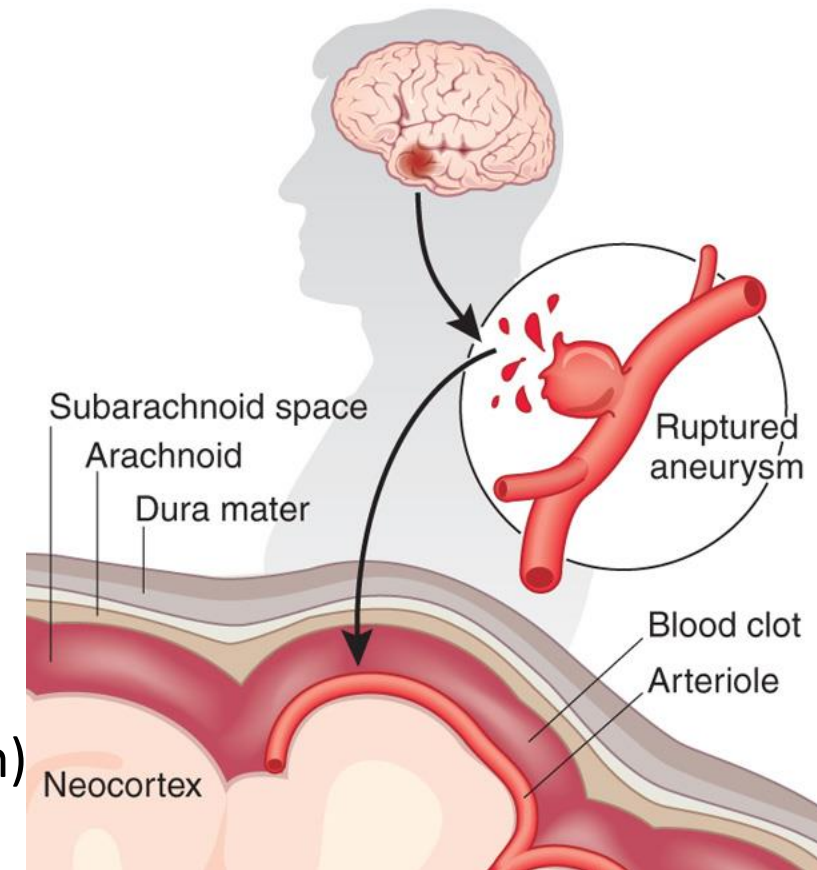
Toon Schiemsy
23 april 2015

Overzicht

- Inleiding
 - Subarachnoïdale bloeding (SAB)
- Question(s)
 - Welke analyses kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?
 - Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?
 - Praktisch: RBC telling in CSV op de Sysmex XE-5000 in SAB diagnostiek
- To Do's

Subarachnoïdale bloeding

- SAB?
 - = het scheuren van een sacculair aneurysma
 - bloed komt in cerebrospinaal vocht (CSV) terecht
 - Symptomen:
 - Typisch: plotse, zeer intense hoofdpijn (“ergste hoofdpijn ooit meegemaakt”).
 - Andere: bewustzijnsverlies, misselijkheid & braken,...
- Hoofdpijn: 1-2% aanmeldingsklacht op spoed
 - Meestal primaire hoofdpijn (migraine, spanningshoofdpijn)
 - Zeldzaam: subarachnoïdale bloeding (SAB)
 - Incidentie: 6-10/100 000 per jaar

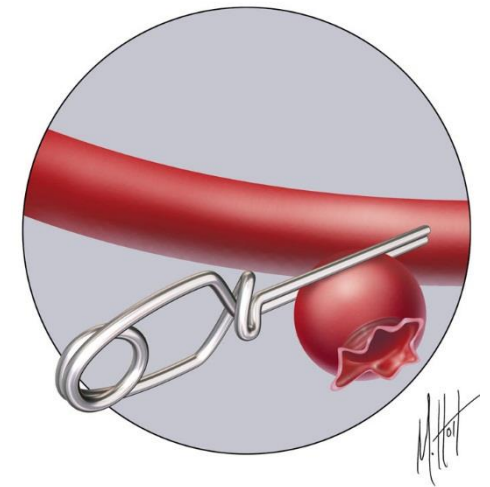
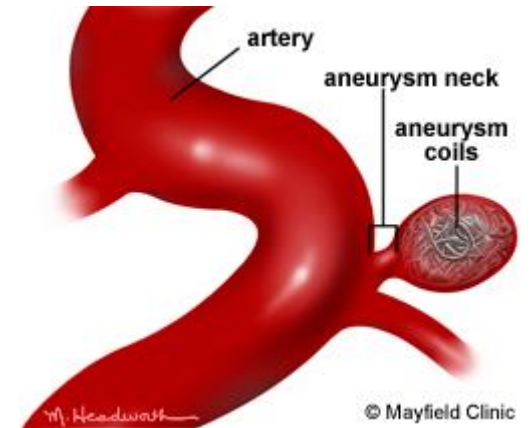


Subarachnoïdale bloeding

- Snelle diagnose = belangrijk!
 - Niet-behandelde SAB: hoge morbiditeit en mortaliteit
 - Nieuwe bloeding is belangrijkste te voorkomen doodsoorzaak
- Diagnostiek
 - CT zonder contrast! **MAAR**: sensitiviteit sterk tijdsafhankelijk (klaring bloed)
 - <6u na ictus: +/- 100% sensitiviteit
 - >6u: 86-93% sensitiviteit
 - >5 dagen: 58% sensitiviteit
 - Daarom: als CT negatief: **lumbaal punctie**

Subarachnoïdale bloeding

- Vervolgonderzoek bij positieve testen op CSV
 - Aantonen van een aneurysma (MRA, CTA,...)
 - tijds- en middelenintensief
 - geven niet aan of een aneurysma gebloed heeft
 - Bij 5% van de populatie aneurysmata aanwezig (niet geruptureerd)
 - Correcte positionering onderzoek belangrijk



Broderick et al. Stroke (1994)
Hop et al. Stroke (1997)

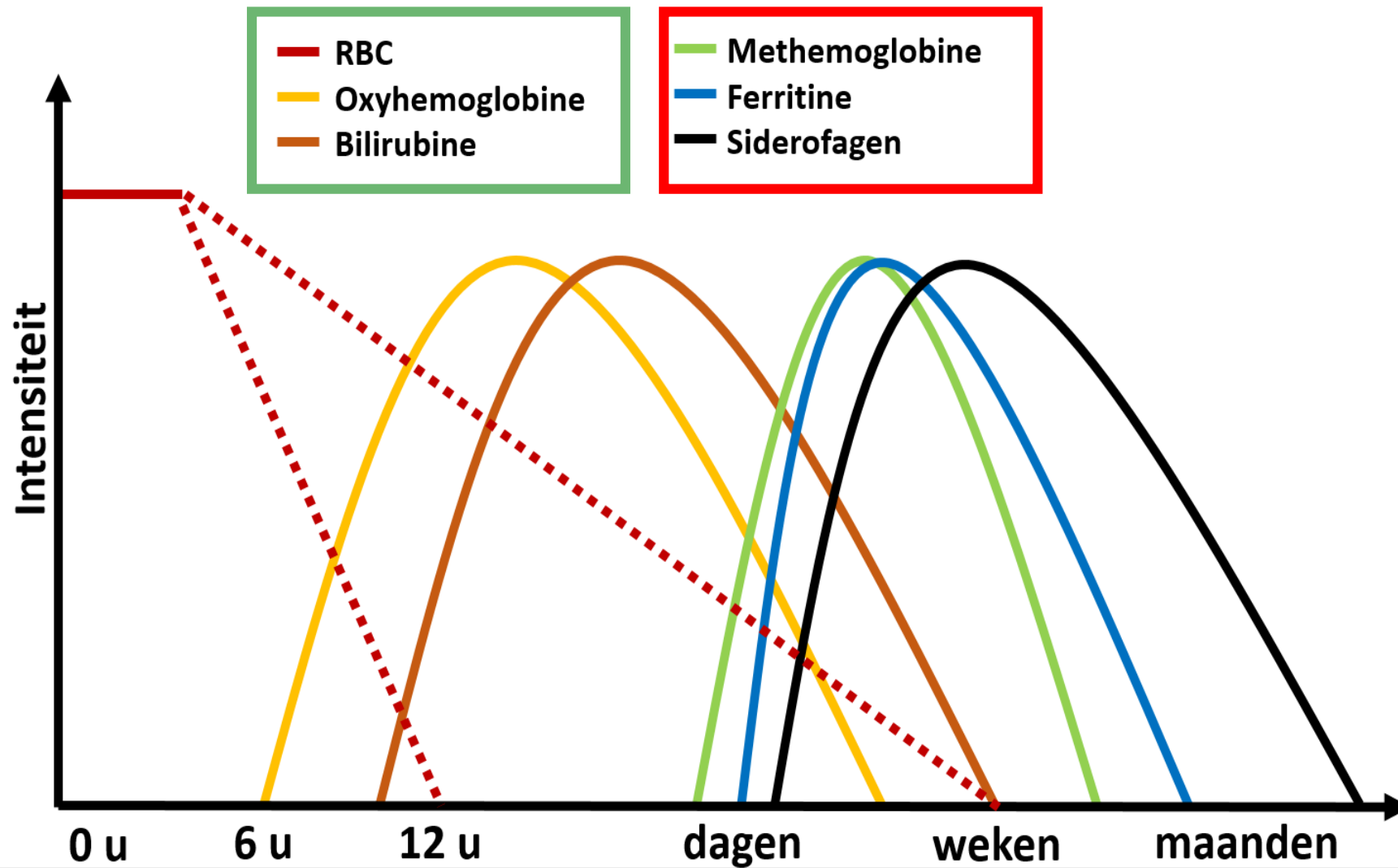
- **QUESTION(S)**

- *Welke analyses kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?*
- *Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?*
- *Praktisch: RBC telling in CSV op de Sysmex XE-5000 in SAB diagnostiek*

- **QUESTION(s)**

- *Welke analyses kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?*
- *Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?*
- *Praktisch: RBC telling in CSV op de Sysmex XE-5000 in SAB diagnostiek*

Laboratoriumdiagnostiek van SAB



Laboratoriumdiagnostiek van SAB

- 2 belangrijkste laboratoriumonderzoeken op CSV met een rol in de diagnostiek kort na ontstaan van symptomen
 - Rode bloedcel telling
 - Xanthochromiebepaling
- Andere onderzoeken
 - Ferritine
 - Siderofagen
 - D-Dimeren

Rode bloedcel telling

- Rol van RBC in CSV
 - **Normaal geen RBC aanwezig**

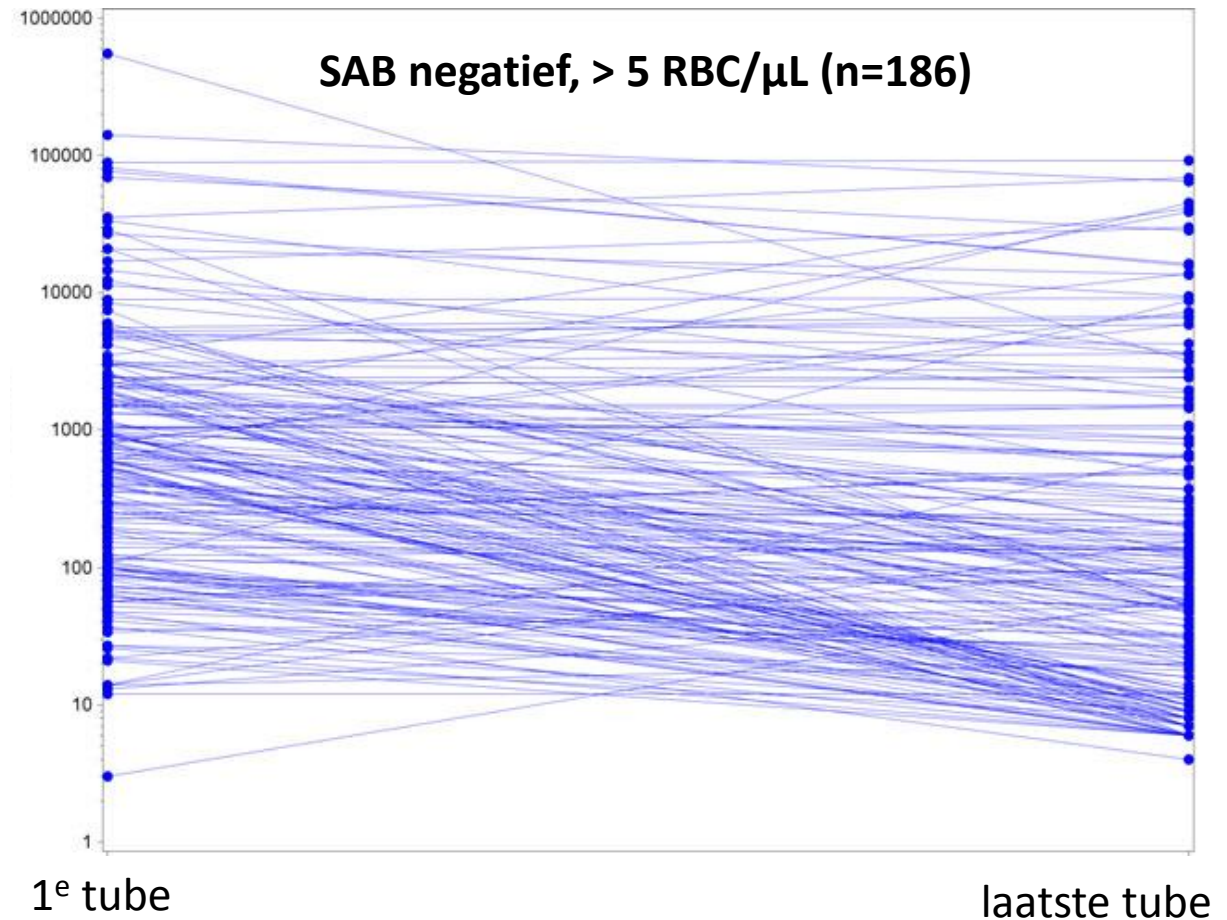
CSF Findings in Patient With SAH by Time From Ictus^a

<i>Time (in hours) from ictus</i>	<i>No. of patients</i>	<i>Blood present</i>	<i>Xanthochromia present (not present/ not recorded)</i>
0–2	4	4	0
2–4	17	17	1 (15 absent; 1 NR)
4–6	28	28	16 (9 absent; 3 NR)
6–12	40	40	26 (4 absent; 10 NR)
12–24	35	32	31 (0 absent; 4 NR)
24–78	57	51	53 (0 absent; 4 NR)

- Na SAB: snelle verspreiding RBC in CSV
- RBC worden gelyseerd

Rode bloedcel telling

- SAB negatieve groep: frequent ook RBC in CSV
 - **Traumatische punctie:**
= Aanprikken bloedvat
(RBC in eerste tube > laatste tube)



Rode bloedcel telling

SAB +	SAB -
84 779/ μ L (<i>g</i> , n=13)	98,7/ μ L (<i>g</i> , n=93)
4 309/ μ L (<i>m</i> , n=26)	69/ μ L (<i>m</i> , n=196)
307 700/ μ L (<i>g</i> , n=11)	443/ μ L (<i>g</i> , n=288)
28 741/ μ L (<i>m</i> , n=15)	20/ μ L (<i>m</i> , n=626)

RBC telling (manueel) in de laatste tube, verschil SAB positieve *versus* SAB negatieve patiënten
(g: gemiddelde, m: mediaan)

Dupont et al. Mayo Clin Proc (2008)

Perry et al. BMJ (2015)

Heasley et al. Am J Neuroradiol (2005)

Gorchynski et al. Cal J Emerg Med (2007)

Rode bloedcel telling

In rekening nemen factor tijdscontext

- Hoe veel RBC zijn aanwezig bij SAB <12 u na de ictus?
 - 6 225 – 600 000/ μ L

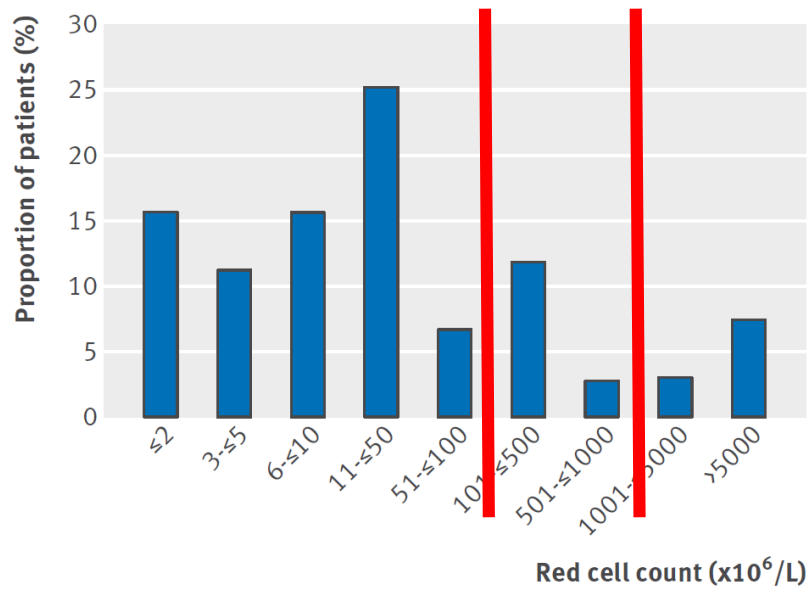
**Meer studies/voldoende SAB
positieve patiënten nodig**

Dupont et al. Mayo Clin Proc (2008)
Perry et al. BMJ (2015)
Heasley et al. Am J Neuroradiol (2005)
Gorchynski et al. Cal J Emerg Med (2007)

Rode bloedcel telling

Gebruik in diagnostiek (uitsluiten SAB)

- Cutoff voor RBC telling (SAB verdacht, ≥ 1 RBC in CSV)



74% ≤ 100 RBC/ μ L (476/641)

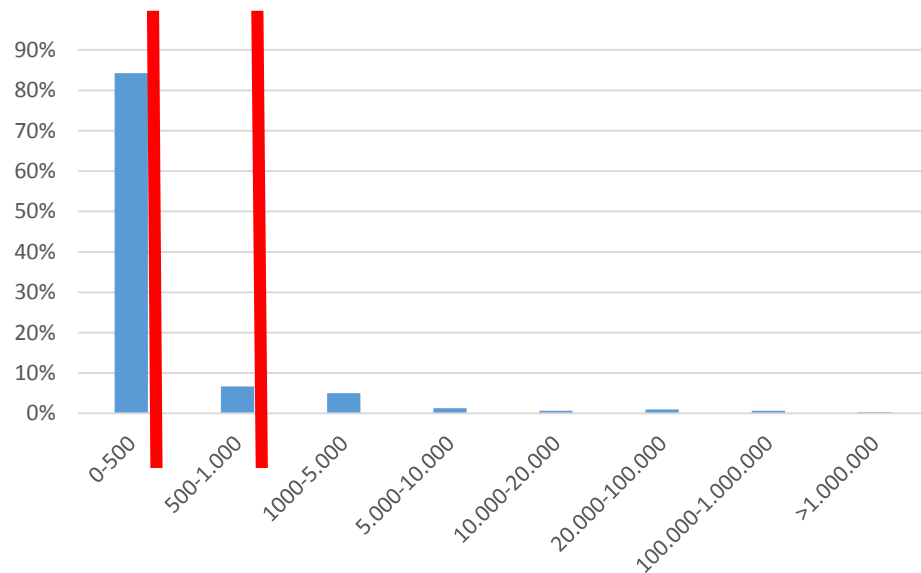
89% ≤ 1000 RBC/ μ L (570/641)

i.c.m. xanthochromie geen SAB gemist
onder 2000/ μ L

Rode bloedcel telling

Gebruik in diagnostiek (uitsluiten SAB)

- Cutoff voor RBC telling (SAB verdacht)



84% $\leq$ 500 RBC/ μ L (252/299)

91% $\leq$ 1000 RBC/ μ L (271/299)

1 SAB patiënt met 990/ μ L

11 SAB patiënten > 1000 RBC/ μ L

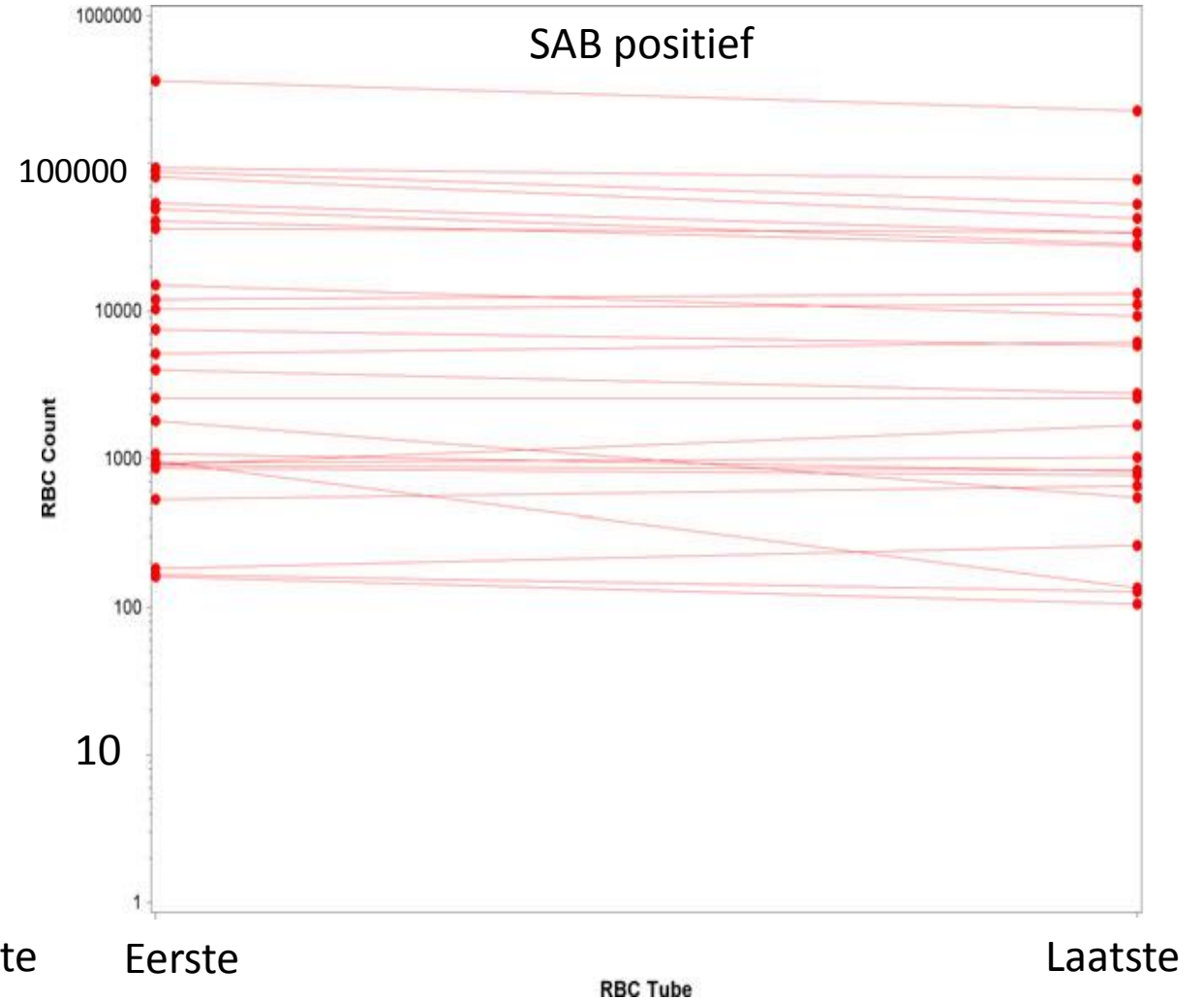
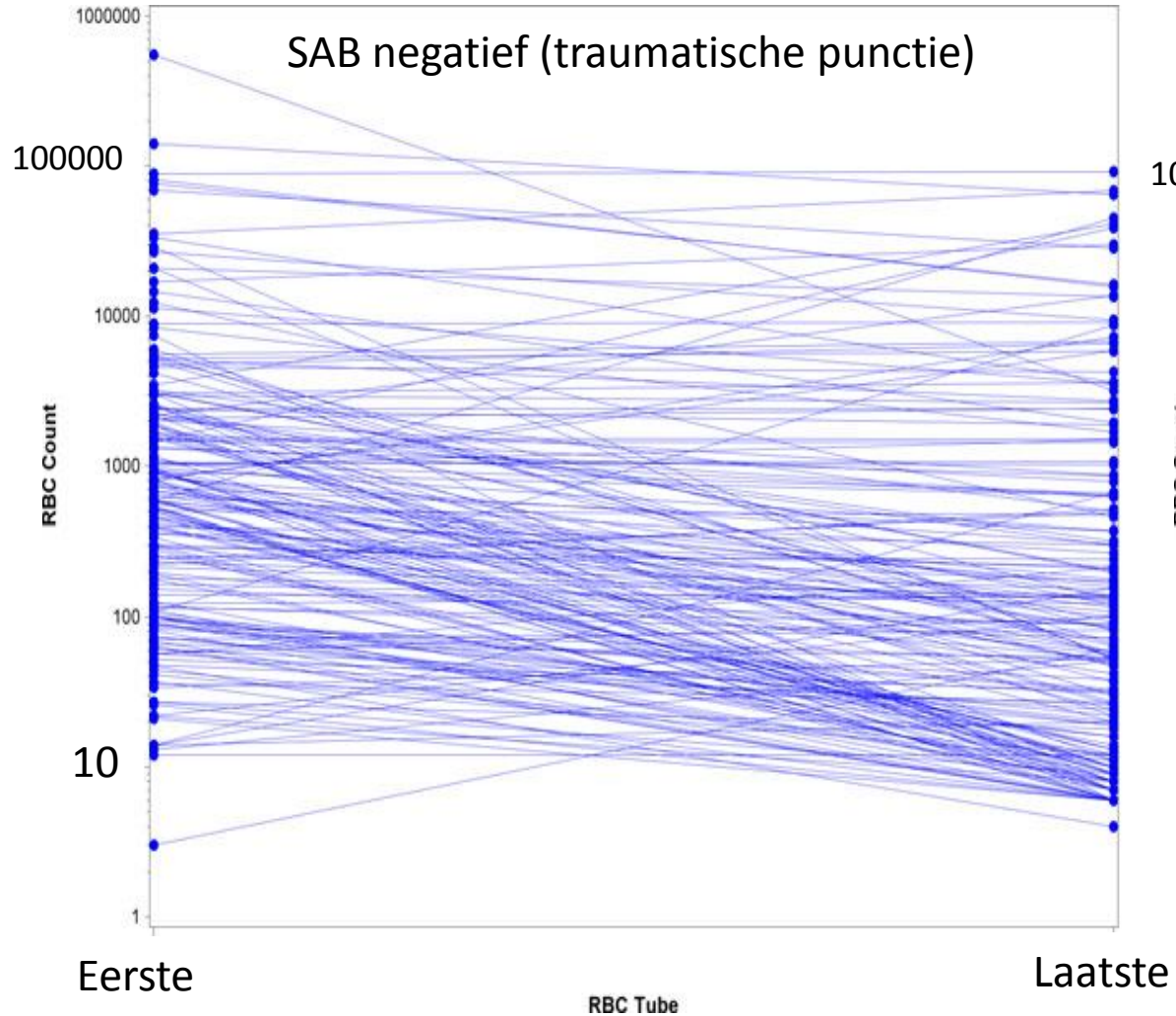
(tijd na ictus onbekend, xanthochromie onbekend)

Rode bloedcel telling

Gebruik in diagnostiek (uitsluiten SAB)

RBC/ μ L	SAB (n=11)	Traumatische LP (n=288)	Negatieve Predictieve Waarde	Positieve Predictieve Waarde	Sensitiviteit	Specificiteit
0-500	0	252	100%	0%	100% (89.0-100%)	87.5% (86.3-87.5%)
500-1.000	1 (990)	19	95%	5%	90.9% (79.2-99.5%)	94.1% (92.9-94.4%)
1000-5.000	1 (1434)	14	93.3%	6.7%	81.8% (72.8-96.3%)	87.5% (86.3-87.5%)
5.000-10.000	1 (5894)	3	75%	25%	72.7% (57.3-72.7%)	100% (99.0-100%)
10.000-20.000	2 (11.665)(12.657)	0	0%	100%	54.5% (40.2-54.5%)	100% (99.1-100%)
20.000-100.000	3 (21.345) (62.301) (63.124)	0	0%	100%	27.3% (18.8-27.3%)	100% (99.3-100%)
100.000-1.000.000	2 (100.322) (870.412)	0	0%	100%	9.1% (1.5-9.1%)	100% (99.7-100%)
>1.000.000	1 (2.223.563)	0	0%	100%	0%	100%

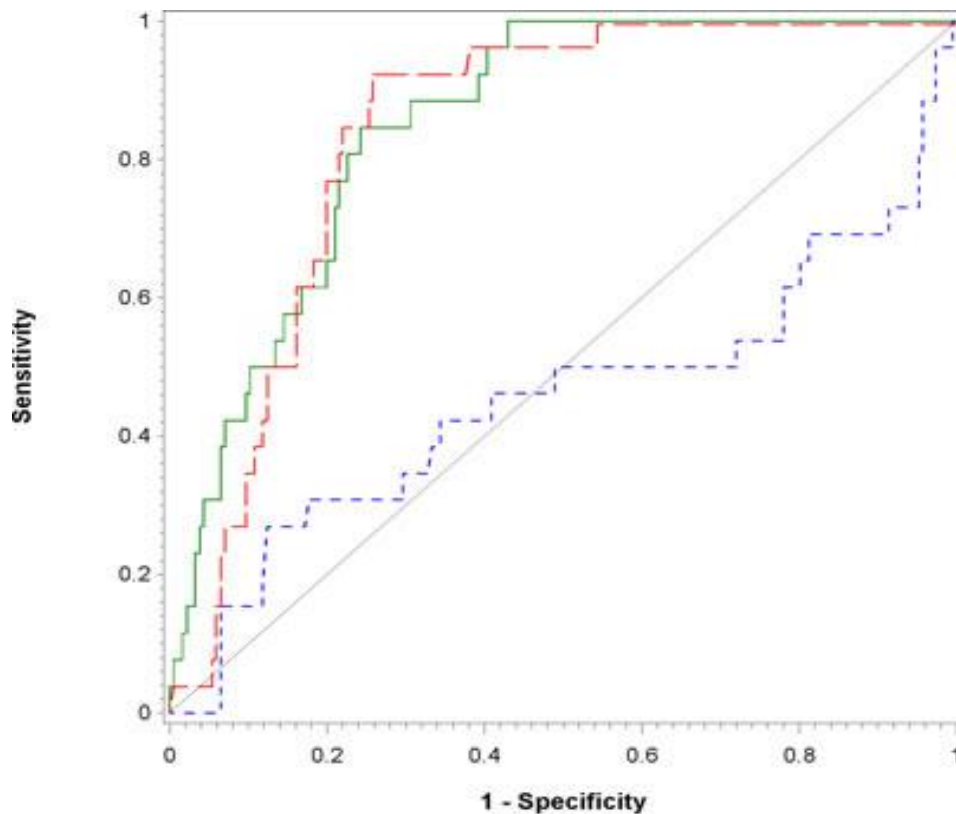
Rode bloedcel telling



Rode bloedcel telling

Gebruik in diagnostiek

- Absolute/Procentuele verschillen in RBC aantal eerste en laatste tube



ROC analyse

Groene lijn: absolute RBC aantal (AUC 0.85)

Rode lijn: procentueel verschil (AUC 0.84)

Blauwe lijn: absoluut verschil (AUC 0.45)

Rode bloedcel telling

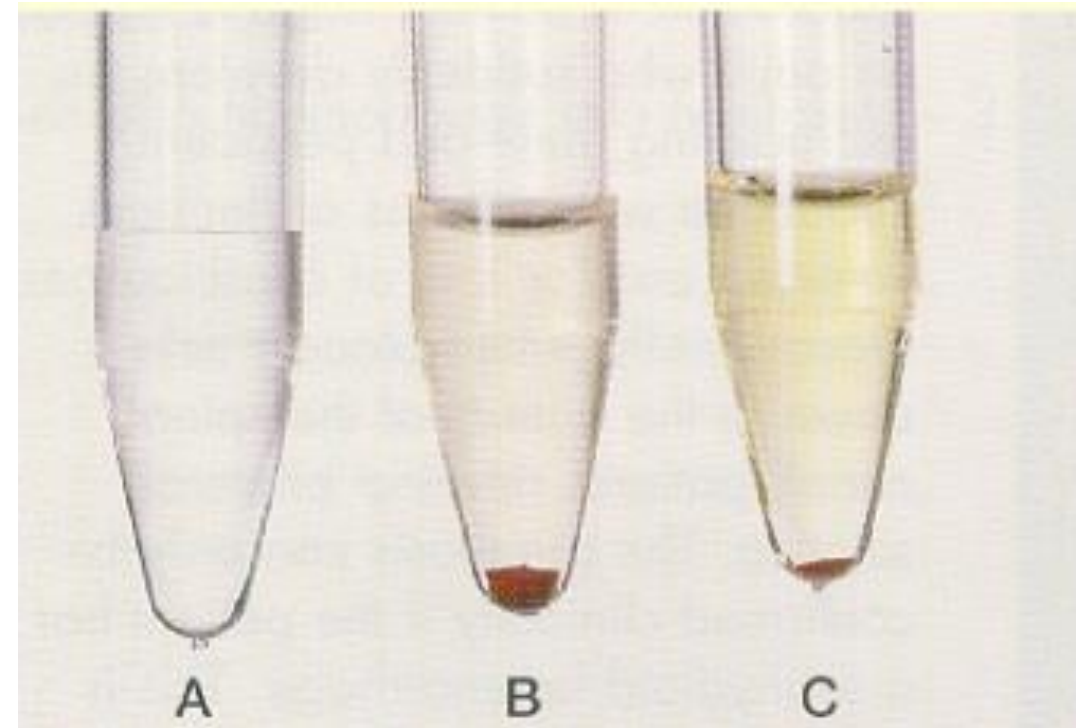
- Procentuele verschillen in RBC aantal eerste en laatste tube
 - Heasley et al.
 - >25% daling tussen tube 1 en 4 = traumatische LP
 - 2 van de 8 SAB patiënten had een daling van >25%!
- Bemerkingen
 - Meetfouten?
 - SAB + traumatische punctie?

Xanthochromie bepaling

= “gele verkleuring” van het CSV

→ aanwezigheid van bilirubine als afbraakproduct van hemoglobine

- Visuele beoordeling
- Spectrofotometrische bepaling

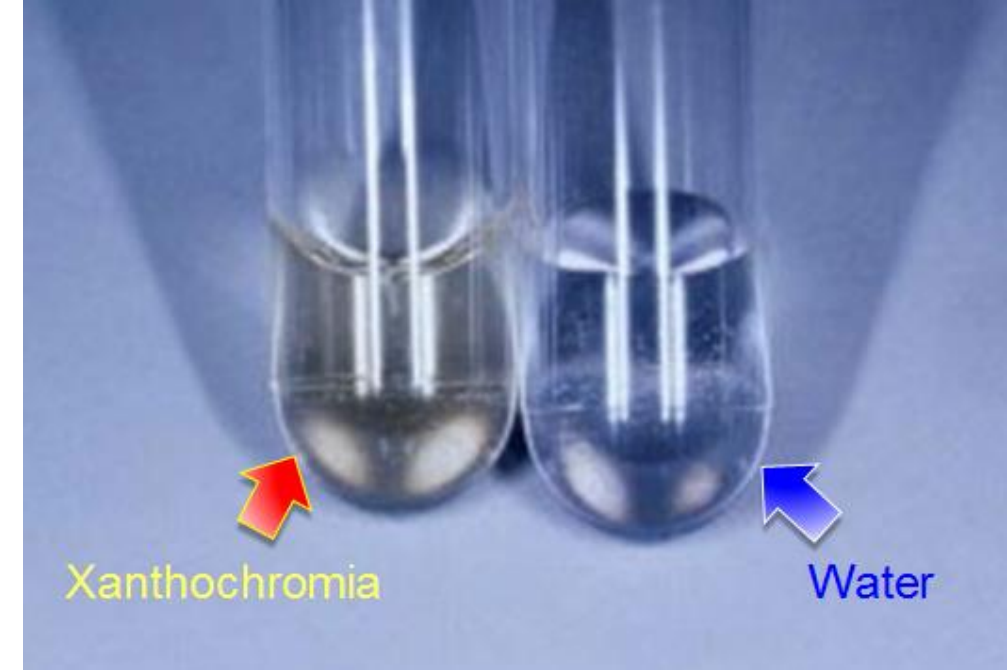


Xanthochromiebepaling

- Normaal zeer lage concentratie bilirubine in CSV
 - ↑ bij afbraak van hemoglobine na een SAB
 - ↑ als:
 - Hoge eiwitconcentratie in CSV
 - Hoge serum bilirubine concentratie
- Tijdsaspect: vanaf 12 uur na bloeding aanwezig tot dagen/weken
- Pre-analytische factoren
 - Minst bloederige (laatste) tube, afschermen van licht, kort na afname centrifugeren, best geen buizentransport

Xanthochromie bepaling

- **Visuele** beoordeling van de kleur
 - Tegenover water of witte achtergrond
 - Vooral toegepast in VS
 - Voordelen:
 - Snel en eenvoudig
 - Geen spectrofotometer nodig
 - Nadelen:
 - Kleine hoeveelheden bilirubine niet zichtbaar
 - Rode verkleuring door hemoglobine kan gele kleur maskeren
 - (afgeraden door NEQAS)



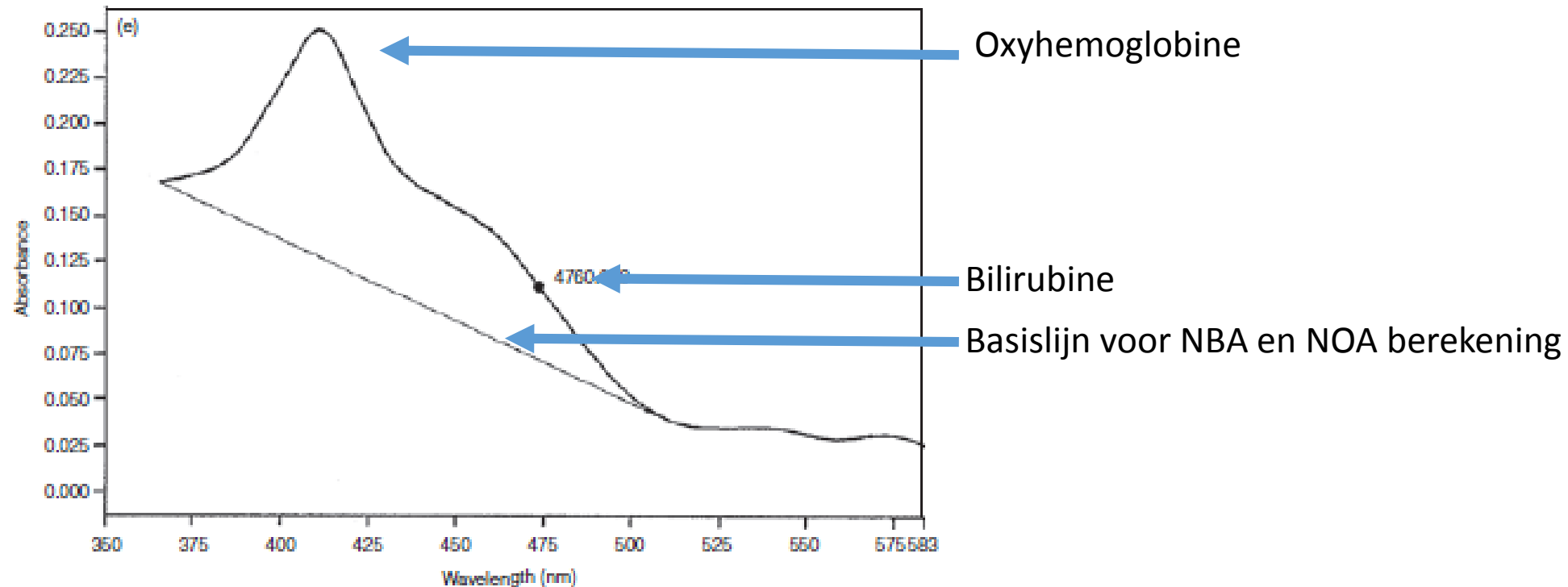
Xanthochromie bepaling

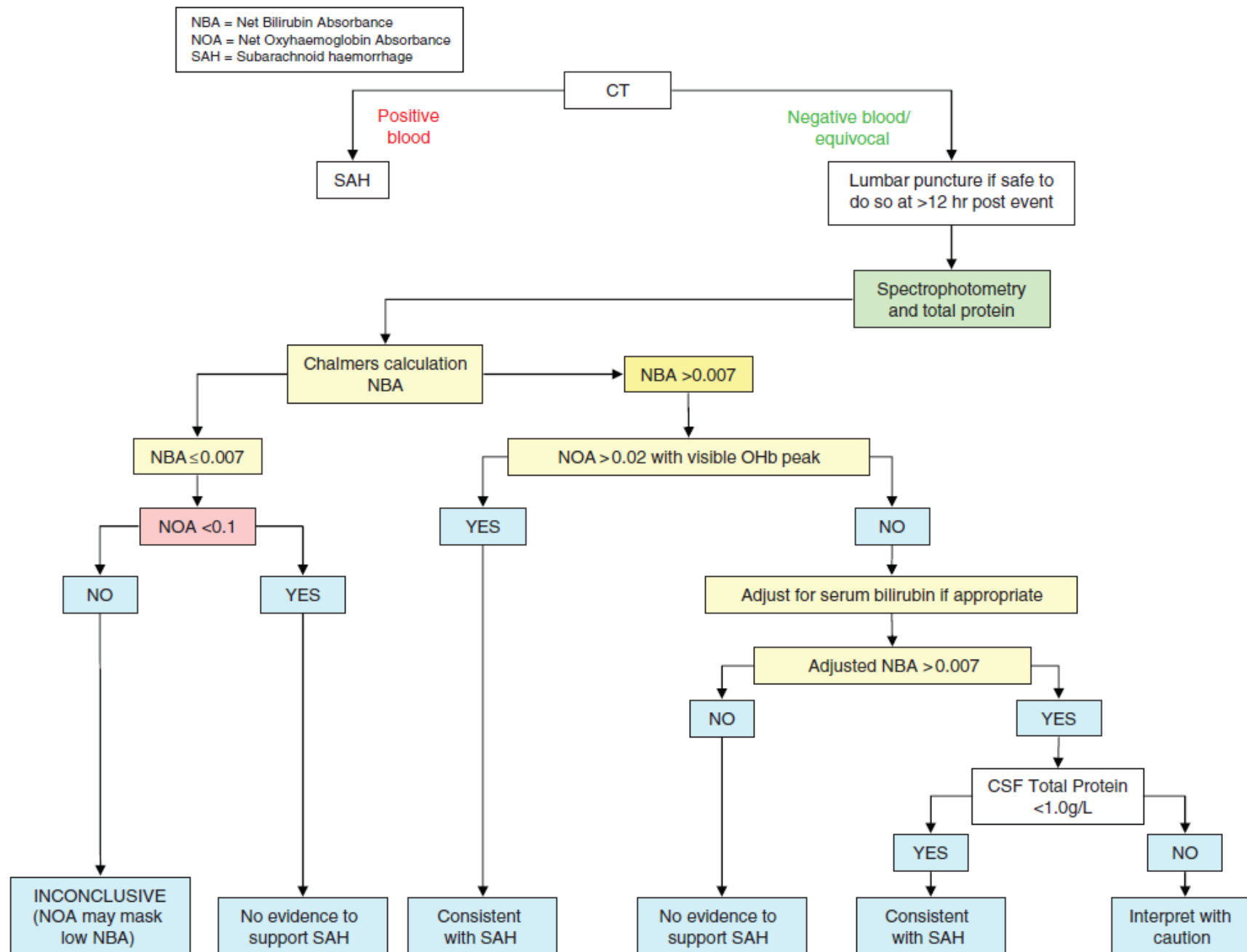
- **Spectrofotometrisch**

	Golflengtegebied (nm)	Aantoonbaar vanaf
Oxyhemoglobine	410-418	2-4 u na SAB (RBC lysis)
Methemoglobine	403-410	10 d (vnl. hematomen/omkapselde bloedingen)
Bilirubine	450-460	12 u (afbraak hemoglobine)

- Vooral in Europa
- Diversiteit in interpretatie gegevens (NEQAS)
 - gebruik van serum bilirubine en CSV eiwit concentratie
 - berekening van netto oxyhemoglobine (NOA) en netto bilirubine absorbantie (NBA)
 - >12 u tussen ictus en LP

Xantochromie bepaling (NEQAS)





Xanthochromie: visueel vs. spectrofotometrie

Study	Design, Patient Selection	Index Test	Sample Size	% LP >12 h From Headache Onset	Criteria for Positive Aneurysmal SAH
Chao, 2007 ³⁹	R, Pt	S	193	89%	Angio (CTA, DSA) +ve
Alons, 2013 ⁴³	R, Pt	S ^{II}	117	100%	Angio (CTA, DSA) +ve
Dupont, 2008 ³⁸	R, Pt	V	117	1 h–10 days d	Angio (CA) +ve
Gunawardena, 2004 ⁴²	R, Pt	S	463	100%	Angio (MRA, CA) +ve
Morgenstern, 1998 ⁴⁵	P, Pt	V	79	76%	Angio +ve
Perry, 2006 ¹⁴	P, Pt	S	79	55%	Angio (CTA, MRA, CA) +ve AND (RBC > 5x10 ⁶ /L OR Visual +ve)
		S ^{II}	220		
Wood, 2005 ¹⁵	R, Pt	S	240	?	Angio +ve AND Blood staining AND Visual +ve
O'Connell, 2003 ⁴⁴	R, Pt	S ^{II}	24	100%	Angio +ve
Foot, 2001 ⁴⁶	R, Pt	S	196	?	Angio (MRA, CA) +ve
Page, 1994 ⁴¹	R, Pt	V	23	?	Angio +ve
		S	23		

- Tijdscontext niet altijd geweten
- Ook xanthochromie ≤ 12 u na ictus uitgevoerd
- Verschil in definitie 'positieve SAB'
- **Sensitiviteit**: onvoldoende voor visueel en spectrofotometrie (<90%)
- **Specificiteit**: hoger voor visueel (96%) dan spectrofotometrie (86%)

Xanthochromie: visueel vs. spectrofotometrie

Table 2. Subgroup analyses.

Subgroups	Number of Studies	Pooled Sensitivity (95% CI), I ² , %	Pooled Specificity (95% CI), I ² , %
Visual inspection: added studies with case selection based on confirmed SAH	6	0.60 (0.45–0.73), 62.0	Not applicable
Visual inspection: LP <12 h [*]	5	0.67 (0.48–0.82), 64.6	Not applicable
Visual inspection: LP >12 h [†]	1	0.47 (0.24–0.71), 71	Not applicable
Spectrophotometry: LP <12 h [*]	6	0.83 (0.59–0.96), 18.3	0.80 (0.77–0.83), 94.8
Spectrophotometry: LP >12 h [†]	3	0.89 (0.67–0.99), 54.7	0.95 (0.93–0.96), 80.4
Spectrophotometry: UKNEQAS guidelines [‡]	2	0.93 (0.66–1.00), 0	0.99 (0.98–1.00), 0
Visual inspection: compared with spectrophotometry in same CSF sample	3	0.50 (0.07–0.93), 27.9	0.96 (0.93–0.98), 83.9
Spectrophotometry: compared with visual inspection in same CSF sample	3	0.75 (0.19–0.99), 55.5	0.80 (0.75–0.84), 62.5

CSF, Cerebrospinal fluid.

*LP performed within 12 hours from headache onset or timing not reported.

†All LPs performed after 12 hours from headache onset.

‡UKNEQAS guidelines, which takes serum bilirubin and CSF protein into account.

- **QUESTION(s)**

- *Welke diagnostische middelen kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?*
- *Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?*
- *Praktisch: RBC telling in CSV op de Sysmex XE-5000 in SAB diagnostiek*

RBC telling in CSV

- Plaats
 - SAB verdachte, CT negatieve patiënten waarbij xanthochromie mogelijk nog negatief is (<12u na de ictus)
 - Negatief predictieve waarde van lage RBC telling?
- Literatuur
 - Cutoff voor RBC aantal die mogelijk kan gebruikt worden om SAB en niet-SAB te onderscheiden: 500-2000/ μ L?

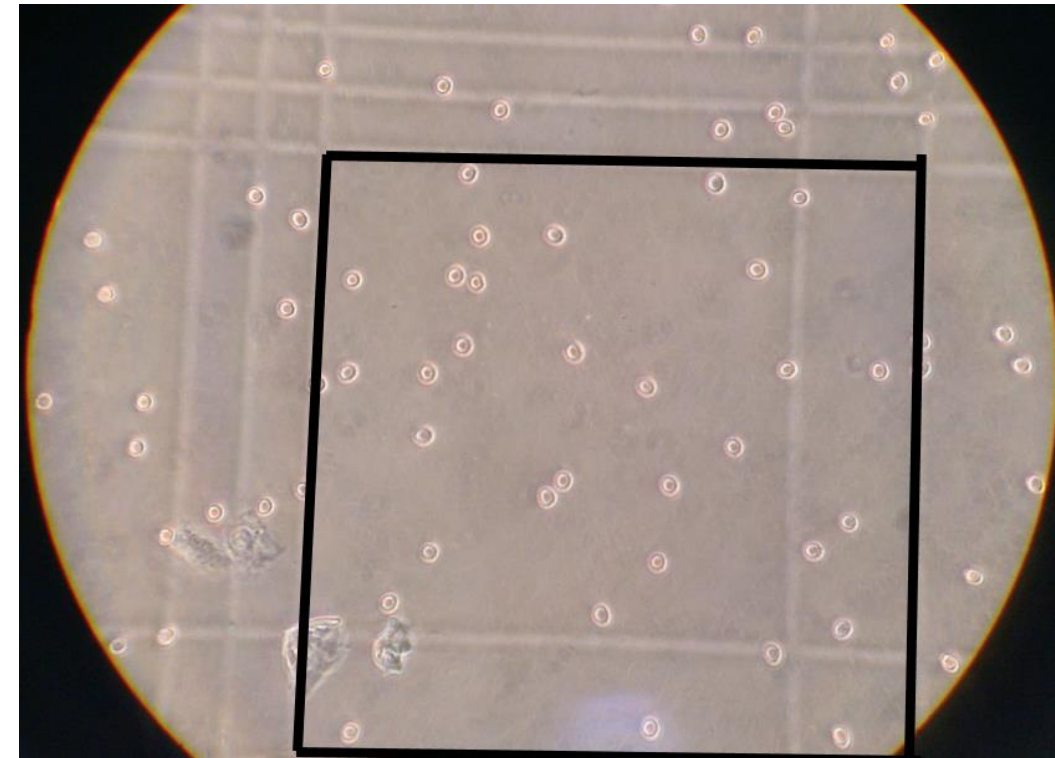
RBC telling in CSV

- Hoe kunnen deze methoden worden toegepast in SAB diagnostiek?
 - Meten vanaf grootteorde van enkele honderden RBC/ μ L
 - CV < 20% (cf. CV WBC telling in lage range)

Literatuur: weinig studies die de RBC telling evalueren!

RBC telling in CSV

- Gouden standaard: Manuele methode
 - Telkamer (Bürker, Fuchs-Rosenthal)
 - 0,1-1 μL CSV tellen
 - Hoge aantallen: verdunnen
 - Nadelen
 - zeer tijds- en arbeidsintensief
 - vergt goed getraind personeel
 - grote intra- en interoperator variabiliteit



RBC telling in CSV

- Geautomatiseerd
 - Impedantiemethode
 - vb. Sysmex XE-5000/XN-1000 – body fluid modus
 - Research parameter in body fluid mode rapporteert vanaf 100 RBC/ μ L
 - Optische telling
 - Vb. Siemens ADVIA 120



RBC telling in CSV - Sysmex XE-5000

Precisie

Auteur	Variatiecoëfficiënt
Kleine et al.	32% bij 150 RBC/ μ L
Paris et al.	32% bij 150 RBC/ μ L 20% bij 600 RBC/ μ L 12% bij 3200 RBC/ μ L
Ho et al.	20% bij 400 RBC/ μ L
Boer et al.	3.1% bij 13500 RBC/ μ L

Besluit: aanvaardbare CV's (<20%) worden bekomen rond 400-600 RBC/ μ L

Dit is het gebied waar een cutoff voor SAB versus niet SAB zich bevindt (500-2000 RBC/ μ L)

RBC telling in CSV - Sysmex XE-5000/XN-1000

Correlatie

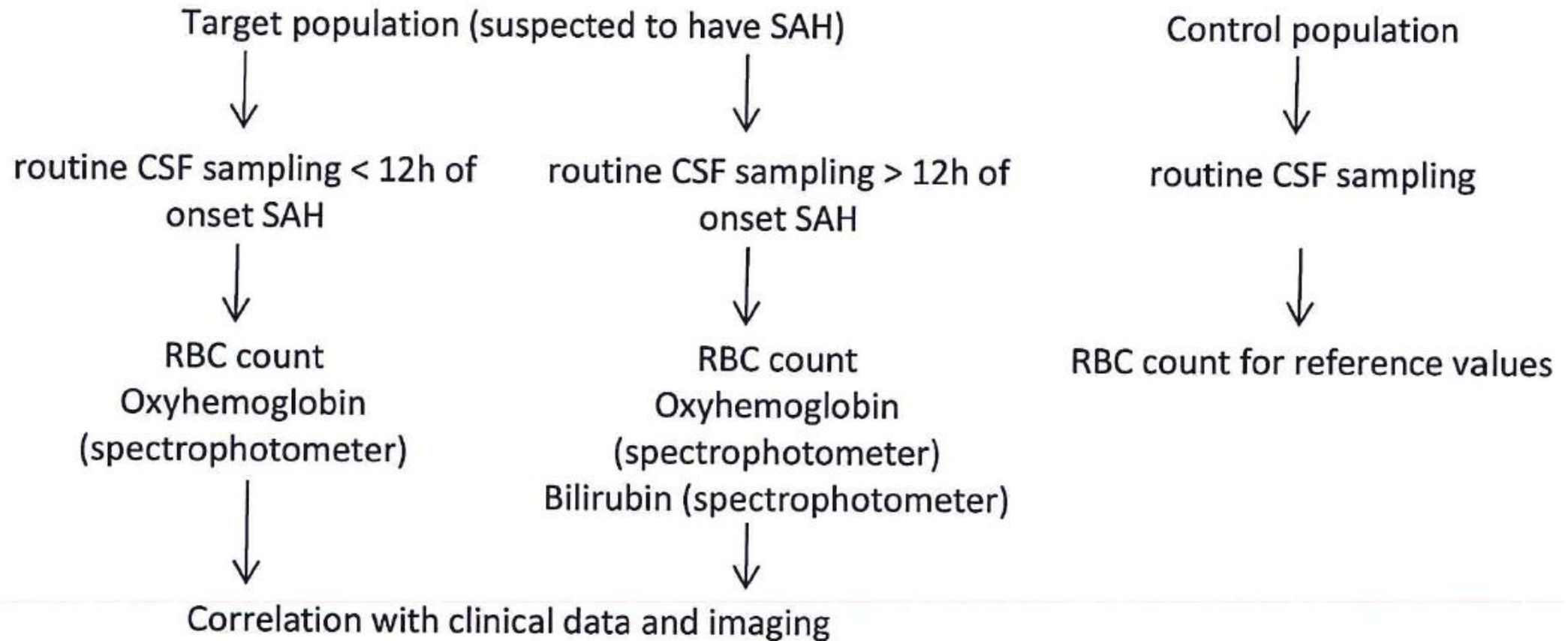
Auteur	Correlatie met manuele telling
Paris et al.	95%, semi kwantitatief manueel
Ho et al.	$R^2 = 0,95$ (n=60, enkel CSV)
Fleming et al.	$R^2 = 0,99$ (n=26, enkel CSV met >1000 RBC/ μ L manueel)

Besluit: aanvaardbare correlatie, echter op kleine aantallen gebaseerd. Meer onderzoek is nodig

- **QUESTION(s)**

- *Welke diagnostische middelen kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?*
- *Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?*
- Praktisch: RBC telling in CSV op de Sysmex XE-5000 in SAB diagnostiek

Studie nummer UZ Leuven: S57337 – ethische commissie nummer: ML11276



To Do / Actions

- Inclusie patiënten volgens studieprotocol (vermoeden SAB) waarbij RBC telling wordt uitgevoerd aan de hand van een manuele telling, telling op de Sysmex XE-5000 (body fluid mode) en waarbij een xanthochromie uitgevoerd wordt.
- Bepalen van een cutoff voor RBC aantal waarbij SAB veilig kan worden uitgesloten (hoge NPV).

Besluit

- Weinig literatuur over RBC aantallen in de vroege periode na een SAB
 - Maar potentieel belangrijke rol in SAB diagnostiek (exclusie)
- Weinig literatuur over RBC tellingen in CSV op hematologie automaten
 - Verder te evalueren

Bedankt voor de aandacht!

Vragen?