

CAT **Critically Appraised Topic**

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

Author: Toon Schiemsy

Supervisors: Nancy Boeckx, Koen Poesen

Date: 23-04-2015

CLINICAL BOTTOM LINE

De rol van laboratoriumanalyses in de diagnostiek van een subarachnoidale bloeding (SAB) in de acute setting is gericht op de rode bloedcel (RBC) tellingen en xanthochromiebepaling op cerebrospinaal vocht (CSV). Bij een SAB zullen RBC quasi direct in het CSV-staal verschijnen, maar het CSV-compartiment is zeer dynamisch en RBC gaan over uren tot weken lyseren. In CSV zijn normaal geen RBC aanwezig, maar door de punctie blijken frequent RBC in de laatste CSV tube terecht te komen. Wanneer het RBC aantal bij SAB versus niet-SAB patiënten vergeleken wordt, zijn er significante verschillen in het RBC aantal. Verschillende studies tonen dat bij een laag RBC aantal de kans op een SAB zeer klein is en toeneemt naarmate het RBC aantal stijgt. Verschillende studies onderzochten of het verschil in RBC aantal tussen de eerst en laatst afgenomen tube (procentueel, absoluut) SAB- en niet SAB patiënten kan onderscheiden, maar deze resultaten zijn tegenstrijdig. De gouden standaard voor RBC telling is de manuele telling in een telkamer. Deze methode heeft echter belangrijke beperkingen die geautomatiseerde methoden mogelijk minder hebben (o.a. tijds- en arbeidsintensief, grote intra- en interoperator variabiliteit). De Sysmex XE-5000 wordt in de meeste studies als aanvaardbaar alternatief voor de manuele telling beschouwd. Na RBC lysis zal hemoglobine worden afgebroken tot bilirubine en xanthochromie veroorzaken. De twee belangrijkste methoden om dit te objectiveren zijn visuele inspectie en spectrofotometrisch. Spectrofotometrie, uitgevoerd volgens de NEQAS richtlijnen, heeft een hogere sensitiviteit en specificiteit in vergelijking met andere visuele en spectrofotometrische protocollen. Als vervolg van deze CAT voeren we een studie uit waarbij RBC telling in CSV manueel en geautomatiseerd wordt uitgevoerd bij voor SAB-verdachte patiënten om meer gegevens te verkrijgen i.v.m. de interpretatie van deze parameter.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Hoofdpijn is in 1-2% van de gevallen de reden dat patiënten zich op de spoeddienst aanmelden (1). De voornaamste oorzaak is primaire hoofdpijn (migraine, spanningshoofdpijn), bij een veel kleinere populatie worden de klachten veroorzaakt door een subarachnoidale bloeding (SAB) (1).

Een SAB ontstaat meestal wanneer een saccalair aneurysma scheurt. Deze aneurysmata zijn meestal verworven, hoewel ook congenitale afwijkingen voorkomen (2). De incidentie van een SAB wordt geschat op 6-10/100.000 per jaar en treedt gemiddeld op een leeftijd van 55 jaar op (1). Risicofactoren zijn onder andere roken, hypertensie, genetische voorbeschiktheid, matig/excessieve alcoholinname, inname van sympathicomimetica, oestrogeendeficiëntie en antitrombotica (2). Als uitlokkende factor wordt een fysieke inspanning soms aangewezen (2).

Wanneer een aneurysma (bv. In de A. cerebelli posterior inferior, A. basilaris) ruptureert, zal bloed in het cerebrospinaal vocht (CSV) terechtkomen onder arteriële druk en zich daarin snel verspreiden. Hierdoor neemt de intracraniale druk toe. De bloeding zelf stopt meestal na enkele seconden, maar een nieuwe bloeding is frequent en treedt meestal op binnen de eerste dagen na de initiële bloeding. Andere problemen secundair aan de bloeding zijn hydrocefalie (obstructie van CSV flow of verminderde CSV reabsorptie door de arachnoidale granulaties) en vasospasmen (met lokaal cerebrale hypoperfusie).

Het klinisch beeld bij een SAB wordt gekenmerkt door plots ontstaan van zeer intense hoofdpijn. Andere mogelijke symptomen zijn bewustzijnsverlies, nausea en/of braken en meningeale klachten (3). Ongeveer 30 tot 50% van de patiënten met een SAB meldt bovendien een voorafgaande hoofdpijn, meestal 6-20 dagen vóór het ontstaan van de SAB (4). Een regel die de clinicus helpt om onderscheid te maken tussen patiënten met hoofdpijn die verder moeten worden onderzocht om SAB als oorzaak uit te sluiten en patiënten waar dit niet nodig is, is de Ottawa SAH rule (Zie supplement SI). Het toepassen van deze regel kende een hoge sensitiviteit (100.0%, (95% C.I.: 97.2-100.0)) maar een lagere specificiteit (15.3%, (95% C.I.: 13.8-16.9)) in een studie met 2131 patiënten met acute niet-

traumatische hoofdpijn met een maximale intensiteit binnen het uur en met normale neurologische bevindingen (5).

Snelle en correcte diagnostiek van SAB is belangrijk omdat niet-behandeling gepaard gaat met hoge morbiditeit en mortaliteit (6). Bovendien kan een nieuwe bloeding bij een uitgestelde of gemiste diagnose ernstiger kan zijn dan de initiële (7). De literatuur beschrijft case-fatality rates tussen 32% en 67% (8). In een systematische review van Broderick et al. kende SAB een case-fatality rate van 51%. Hiervan overleden ongeveer 10% van de patiënten vóór het bereiken van het ziekenhuis, 25% binnen 24 uur na het ontstaan van symptomen en 45% binnen 30 dagen. Voor deze laatste groep was dit 4% voor behandelde en 63% voor niet-behandelde patiënten (9).

Diagnostiek gebeurt initieel via een computertomografie van de hersenen (CT-scan hersenen) zonder contrast. De sensitiviteit van een CT-scan voor het detecteren van een SAB is tijdsafhankelijk (S2) (4). Binnen 6 uur na het ontstaan van de SAB, heeft een CT-scan een sensitiviteit van 100% (4). Vanaf 6 uur wordt dit 86-93% (4) en op dag 5 bedraagt deze nog 58% (4). De reden voor de snel dalende sensitiviteit is de klaring van het subarachnoïdale bloed (4). Een lagere sensitiviteit is er ook bij kleine bloedingen of een atypisch klachtenpatroon (bijvoorbeeld geïsoleerde nekpijn), alsook wanneer de beelden worden geprotocolleerd door minder ervaren radiologen (4). Vooral alerte, neurologisch normale patiënten blijken meer kans op een negatieve CT te hebben (10).

Omwille van de mogelijk ernstige gevolgen van het missen van SAB en de in tijd dalende sensitiviteit, wordt in de meeste richtlijnen aanbevolen om bij negatieve CT-scan additioneel een lumbaalpunctie uit te voeren (11). Als gevolg van de rode bloedcellen (RBC) die zich met het CSV mengen en lyseren, kleurt het lumbaal vocht rood en kan spectrofotometrisch oxyhemoglobine gemeten worden (4). Wanneer hemoglobine *in vivo* omgevormd wordt tot methemoglobine en bilirubine, kleurt het CSV geel en kan dit spectrofotometrisch worden aangetoond (xanthochromie bepaling). Algemeen wordt aangenomen dat na 12 uur steeds bilirubine gevormd is (4,12). De hoeveelheid bilirubine piekt ongeveer 48 uur na de bloeding en kan verschillende weken verhoogd blijven (4). Spectrofotometrie uitgevoerd na 12 uur is zeer sensitief voor het opsporen van SAB (>95%) (4).

Indien bovenstaande onderzoeken positief zijn bij CT negatieve patiënten, wordt een vervolgonderzoek zoals een angiografie uitgevoerd om een aneurysma aan te tonen of uit te sluiten. Indien dit negatief is, is de kans op het missen van een SAB minimaal (13).

Een andere, minder frequent toegepaste diagnostische test bij een negatieve CT, is het uitvoeren van een cerebrale katheter angiografie. Dit is een veeleisende techniek met risico op CVA (ongeveer 1%) (7) en het kan leiden tot vals positieve diagnoses met behandeling tot gevolg (ongeveer 5% van de algemene populatie vertonen incidentele niet-gerupteerde aneurysmata) (4). Andere methoden zijn magnetische resonantie angiografie of CT angiografie. Deze hebben geen risico op CVA, maar zijn even tijds- en middelenintensief en geven ook niet aan of er een bloeding geweest is (7).

De behandeling die volgt bij een positief vervolgonderzoek, is het behandelen van complicaties van SAB (nieuwe bloeding, vasospasme, cerebrale ischemie, hydrocefalie, ...). Een behandeling wordt ingesteld bij patiënten in voldoende goede conditie. De meest toegepaste behandelingen zijn endovasculaire coiling of clipping van het aneurysma (7,14).

Voor het opsporen van SAB is er geen internationale consensus voor een diagnostisch algoritme waarmee een patiënt best wordt benaderd (CT, angiografie, CSV analyses). Dit heeft o.a. te maken met het niet overal beschikbaar zijn van dezelfde diagnostische middelen. Er is wel een richtlijn voor de laboratoriumdiagnostische benadering (15).

In deze CAT voeren we enerzijds een literatuurstudie uit naar huidige richtlijnen en mogelijkheden tot het optimaal aanwenden van laboratoriumdiagnostische middelen ter diagnose of uitsluiting van SAB. Meer specifiek wordt onderzocht of een rode bloedceltelling in lumbaal vocht kan worden gebruikt voor het uitsluiten van SAB in een vroeg stadium (6-12 uur, dit is wanneer CT-scan en spectrofotometrie onvoldoende sensitief zijn). Verder wordt onderzocht hoe RBC telling in CSV kan gebeuren.

Een tweede, praktisch luik bestaat uit een studie waarbij de RBC telling in CSV gebeurt in de body fluid modus op Sysmex XE-5000 bij patiënten verdacht voor SAB met negatieve CT-scan.

QUESTION(S)

- 1) Welke analyses kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?
- 2) Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?
- 3) Hoe kan een geautomatiseerde RBC telling in CSV worden gebruikt in de SAB diagnostiek?

SEARCH TERMS

- 1) Limo, search terms ("cerebrospinal fluid" "subarachnoid haemorrhage" diagnosis), ("red blood cell" count "cerebrospinal fluid")
- 2) UpToDate Online version (2015), search terms: "subarachnoid hemorrhage"
- 3) Cochrane library, search terms: "subarachnoid hemorrhage"
- 4) Pubmed: "erythrocyte count cerebrospinal fluid"
- 5) Pubmed "erythrocyte count"
- 6) Pubmed "sysmex body fluids"
- 7) Pubmed "sysmex body fluid"

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Edlow JA. Diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2005;2(6):99–109.
2. Singer RJ, Ogilvy CS, Rordorf G. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Epidemiology, risk factors, and pathogenesis. In: Post TW, editor. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate; 2015.
3. Singer RJ, Ogilvy CS, Rordorf G. Clinical manifestations and diagnosis of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: Post TW, editor. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate; 2015.
4. Nagy K, Skagervik I, Tumani H, Petzold A, Wick M, Kühn HJ, et al. Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid haemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid haemorrhage? *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(11):2073–86.
5. Perry JJ, Stiell IG, Sivilotti ML a, Bullard MJ, Hohl CM, Sutherland J, et al. Clinical decision rules to rule out subarachnoid hemorrhage for acute headache. *JAMA [Internet]*. 2013;310:1248–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24065011>
6. Mark DG, Pines JM. The detection of nontraumatic subarachnoid hemorrhage: still a diagnostic challenge. *Am J Emerg Med*. 2006;24:859–63.
7. Beetham R. CSF spectrophotometry for bilirubin--why and how? *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(1):1–7.
8. Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1997;28:660–4.
9. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Leach A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1994;25:1342–7.
10. Czuczman AD, Thomas LE, Boulanger AB, Peak D a., Senecal EL, Brown DF, et al. Interpreting red blood cells in lumbar puncture: Distinguishing true subarachnoid hemorrhage from traumatic tap. *Acad Emerg Med*. 2013;20:247–56.
11. Edlow J a., Panagos PD, Godwin S a., Thomas TL, Decker WW. Clinical Policy: Critical Issues in the Evaluation and Management of Adult Patients Presenting to the Emergency Department With Acute Headache. *J Emerg Nurs*. 2009;35(May):43–71.

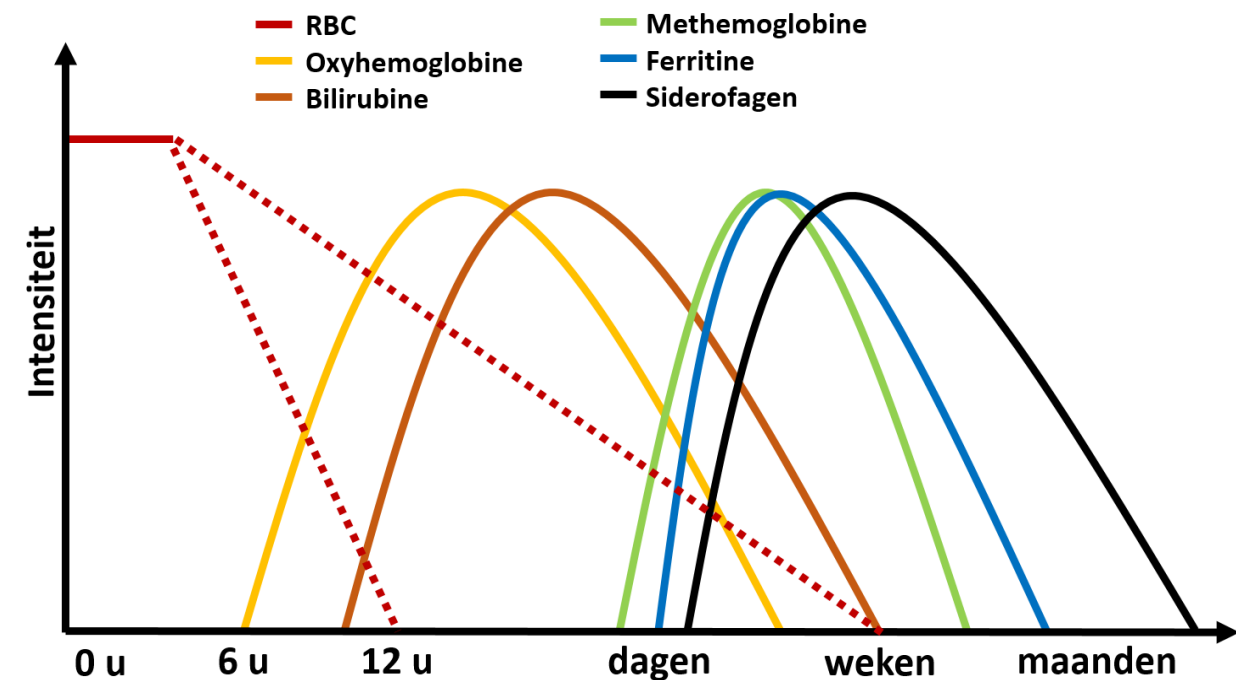
12. Perry JJ, Alyahya B, Sivilotti ML a., Bullard MJ, Emond M, Sutherland J, et al. Differentiation between traumatic tap and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: prospective cohort study. *Bmj* [Internet]. 2015;350:h568–h568. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.h568>
13. Thomas LE, Czuczman AD, Boulanger AB, Peak D a, Miller ES, Brown DFM, et al. Low risk for subsequent subarachnoid hemorrhage for emergency department patients with headache, bloody cerebrospinal fluid, and negative findings on cerebrovascular imaging. *J Neurosurg* [Internet]. 2014;121(July):24–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745707>
14. Chalouhi N, Witte S, Penn DL, Soni P, Starke RM, Jabbour P, et al. Diagnostic yield of cerebral angiography in patients with computed tomography-negative, lumbar puncture-positive subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2013;73(2):282–7.
15. Cruickshank A, Auld P, Beetham R, Burrows G, Egner W, Holbrook I, et al. Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem*. 2008;45:238–44.
16. Chu K, Hann A, Greenslade J, Williams J, Brown A. Spectrophotometry or Visual Inspection to Most Reliably Detect Xanthochromia in Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review. *Ann Emerg Med*. American College of Emergency Physicians; 2014;64(3):256–64.e5.
17. Walton J. *Subarachnoid Haemorrhage*. Edinburgh/ London: E & S Livingston; 1956.
18. Dupont S a, Wijidicks EFM, Manno EM, Rabinstein A a. Thunderclap headache and normal computed tomographic results: value of cerebrospinal fluid analysis. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:1326–31.
19. Heasley DC, Mohamed M a., Yousem DM. Clearing of red blood cells in lumbar puncture does not rule out ruptured aneurysm in patients with suspected subarachnoid hemorrhage but negative head CT findings. *Am J Neuroradiol*. 2005;26(April):820–4.
20. Gorchynski J, Oman J, Newton T. Interpretation of traumatic lumbar punctures in the setting of possible subarachnoid hemorrhage: who can be safely discharged? *Cal J Emerg Med*. 2007;8(February):3–7.
21. Chalmers AH. Cerebrospinal fluid xanthochromia testing simplified. *Clinical Chemistry*. 2001. p. 147–8.
22. Juliá-Sanchis ML, Estela-Burriel PL, Lirón-Hernandez FJ, Guerrero-Espejo A. Rapid differential diagnosis between subarachnoid hemorrhage and traumatic lumbar puncture by D-dimer assay [5]. *Clin Chem*. 2007;53(5):993.
23. Westgard J. Desirable specifications for total error, imprecision and bias derived from biologic variation. [Internet]. 2014. Available from: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
24. Lacher D a, Barletta J, Hughes JP. Biological variation of hematology tests based on the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Natl Health Stat Report* [Internet]. 2012;(54):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997685>

25. Aune MW, Becker JL, Brugnara C, Canfield W, Dorfman DM, Fiehn W, et al. Automated flow cytometric analysis of blood cells in cerebrospinal fluid: analytic performance. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:690–700.
26. Van Acker JT, Delanghe JR, Langlois MR, Taes YE, De Buyzere ML, Verstraete a. G. Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 2001;47:556–60.
27. Paris a., Nhan T, Cornet E, Perol JP, Malet M, Troussard X. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2010;32:539–47.
28. Kleine TO, Nebe CT, Löwer C, Geilenkeuser WJ, Dorn-Beineke A. Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex ® hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: Evaluation with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). *Cytom Part A.* 2012;81A:255–64.
29. Ho G, Keutgens A, Huwart A, Tassin F, Gothot A. Analyse automatisée des liquides de ponction et des liquides céphalorachidiens: évaluation du Sysmex XE-5000. *Immuno-Analyse Biol Spec.* 2011;26:256–63.
30. Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin Biochem* [Internet]. The Canadian Society of Clinical Chemists; 2009;42(7-8):684–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.01.025>
31. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, De Jonge R. Validation of the body fluid module on the new sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(10):1791–8.
32. Aune MW, Sandberg S. Automated counting of white and red blood cells in the cerebrospinal fluid. *Clin Lab Haematol.* 2000;22:203–10.

VRAAG 1 - Welke analyses kunnen in het laboratorium worden aangewend voor de diagnostiek van SAB?

De onderzoeken op CSV voor het diagnosticeren of uitsluiten van een SAB moeten beoordeeld worden binnen een specifiek tijdsvenster na het ontstaan van de SAB. Het CSV compartiment is immers zeer dynamisch: het volledige volume wordt 4 keer per dag vernieuwd (4). Bijgevolg is de samenstelling van het CSV vanaf de periode die direct volgt op de bloeding tot weken of zelfs maanden erna zeer variabel en volgt een welbepaald tijdsverloop. Na de bloeding zullen rode bloedcellen zich gaan vermengen met CSV (Figuur 1). Vanaf de periode van 2 tot 4 uur na de bloeding zal er lysis van RBC beginnen optreden (4,16). Hierbij komt oxyhemoglobine vrij hetgeen door macrofagen wordt gemetaboliseerd tot bilirubine (Figuur 1). Het kan echter tot 12 uur na de bloeding duren vooraleer er bilirubine verschijnt in het CSV (16).

Vanaf één tot enkele dagen na de SAB zijn er nog andere biomerkers die in het CSV verschijnen; o.a. methemoglobine, ferritine en siderofagen. Deze laatste merkers kunnen tot maanden na een SAB aanwezig blijven in het CSV (Figuur 1).



Figuur 1: Visuele voorstelling over het tijdsverloop en de aanwezigheid van verschillende biomerkers na een SAB. Aangepast van Nagy et al. (4).

We bespreken de verschillende parameters in het CSV in hetzelfde tijdsverloop als waarop ze verschijnen na een SAB. De meeste aandacht gaat hierbij naar deze parameters die vroegtijdig verschijnen, gezien deze het meest kunnen bijdragen aan een snelle diagnostiek en dus het klinisch beleid in grotere mate kunnen beïnvloeden.

Rode bloedcel telling

Normaal zijn er in CSV geen RBC aanwezig (4). De eerste minuten na een SAB kunnen RBC ook nog afwezig zijn, maar daarna zullen ze zich mengen met het CSV en aantoonbaar zijn (1). Na verloop van tijd zullen de RBC lyseren en uit het CSV verdwijnen. Er wordt aangenomen dat dit steeds binnen 7-14 dagen is (1).

Er zijn enkele methoden om RBC in CSV te tellen op niet gecentrifugeerd CSV.

RBC kunnen manueel geteld worden in een telkamer (bv. Fuchs-Rosenthal, Bürker). Hierbij wordt meestal een beperkte hoeveelheid CSV (bv. 0.1 of 1 µL) geteld en op basis hiervan wordt het aantal RBC/µL gerapporteerd. Een andere manier om te tellen is via hematologische of urine analyzers. Tussen deze toestellen zijn er verschillen qua imprecisie, accuraatheid en analytische range.

Een beperking van dit onderzoek is dat bij het afnemen van het CSV staal, waarbij een naald tot in het CSV compartiment gebracht wordt, enkele RBC in het opgevangen staal kunnen terechtkomen die niet afkomstig zijn van het CSV. Deze hoeveelheid contaminerende RBC is nog groter bij een zogenaamde traumatische lumbaalpunctie (TLP). Hierbij wordt een bloedvat aangeprikt en dit leidt over het algemeen tot een significante hoeveelheid RBC in het CSV waardoor een rode verkleuring van het CSV visueel waarneembaar is. Bij een LP worden meerdere tubes (meestal 4) verzameld in een welbepaalde volgorde. De laatst afgenomen tube zal het minst gecontamineerd zijn bij een TLP. Soms worden de RBC in alle tubes geteld, soms enkel in de eerst en de

laatst afgenomen tube (zie verder). Indien er geen informatie beschikbaar is over de afnamevolgorde, is het best het macroscopisch minst bloederige staal te kiezen indien er enkel 1 tube geteld zal worden (4).

Er werd een literatuurstudie uitgevoerd naar studies die RBC tellingen gebruiken in de diagnostiek van SAB.

Een review artikel van Edlow (1) vermeldt een studie waar voor 181 patiënten met een bevestigde SAB (methode niet vermeld) de tijd tussen het ontstaan van de symptomen en een LP werd geregistreerd (17). Indien de LP werd uitgevoerd binnen 12 uur na ontstaan waren er telkens RBC aanwezig in het CSV (Figuur 2). Dit bevestigt dat RBC reeds kort na de ictus aanwezig zijn in het CSV van SAB patiënten. Indien de LP 12 uur na het ontstaan van de SAB werd afgenomen, was reeds een klein percentage van de stalen negatief voor RBC. Op basis van de beschikbare gegevens weten we echter niet hoe hoog het gevonden RBC aantal was.

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)

Figuur 2: aanwezigheid van RBC en xanthochromie in het CSV bij SAB patiënten in functie van de tijd tussen ontstaan van de symptomen en de LP (1).

In verschillende studies werd het RBC aantal in de laatst afgenomen tube bij SAB positieve versus SAB negatieve patiënten vermeld. In een studie van Dupont et al. (18) werd bij 13 SAB patiënten (diagnose op basis van positieve xanthochromie (visueel beoordeeld) en aanwezigheid van een aneurysma) het aantal RBC manueel geteld in het CSV. Dit aantal bedroeg gemiddeld 84 779/ μ L (n=13, SD 43 245) met een gemiddelde tijd tussen ictus en LP van 96 u (range: 5-240 u). Bij de SAB negatieve patiënten (geen xanthochromie, geen aneurysma) bedroeg dit aantal gemiddeld 98.7/ μ L (n=93, SD 646.2). Een retrospectieve studie van Czuczman et al. (10) includeerde patiënten ouder dan 16 jaar met hoofdpijn waarbij binnen de twee weken neurovasculaire beeldvorming en een LP met meer dan 5 RBC/ μ L in de laatste tube uitgevoerd werd. In deze studie waren er 26 SAB positieve en 196 SAB negatieve patiënten. Diagnose van SAB werd gesteld op basis van “positieve beeldvorming” of “xanthochromie en aanwezigheid van een aneurysma >2mm” of “xanthochromie en meningitis”. De mediaan voor het aantal RBC in de laatste tube was 4 309 (IQR: 745-29 838) bij de SAB positieve groep versus 69 (IQR: 12-498) voor de SAB negatieve groep. In de studie van Heasley et al. (19) werd het RBC aantal en de tijdsduur tussen ictus en LP van acht CT negatieve, SAB positieve patiënten (aneurysma op CT) vermeld. De mediaan voor het aantal RBC was 4 387.5/ μ L (range: 100 – 33 700/ μ L). Er werden geen gegevens over de SAB negatieve groep vermeld. De gegevens van de individuele patiënten zijn in onderstaande tabel weergegeven (Tabel 1). Hierbij valt op dat het staal met het hoogste aantal RBC ook hetgene is dat reeds na 6 uur werd afgenomen.

Patiënt	Aantal uren ictus tot LP	Aantal RBC/ μ L
1	6	33 700
2	12	6 225
3	42	100
4	77	17 842
5	101	2 550
6	169	2 129
7	190	11 207
8	578	1 150

Tabel 1: RBC aantallen van de verschillende patiënten met oplopende tijd tussen ictus en LP (19).

Gorchynski et al. (20) hadden in hun studie 11 SAB patiënten (o.b.v. angiografie) en 288 niet-SAB patiënten. Bij hen was het RBC aantal in de laatste tube gemiddeld 307 700/ μ L (range: 990-2 234 563/ μ L) voor de SAB groep en 443/ μ L voor de niet-SAB groep (Tabel 2).

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%

Tabel 2: RBC tellingen bij SAB positieve versus SAB negatieve patiënten (20).

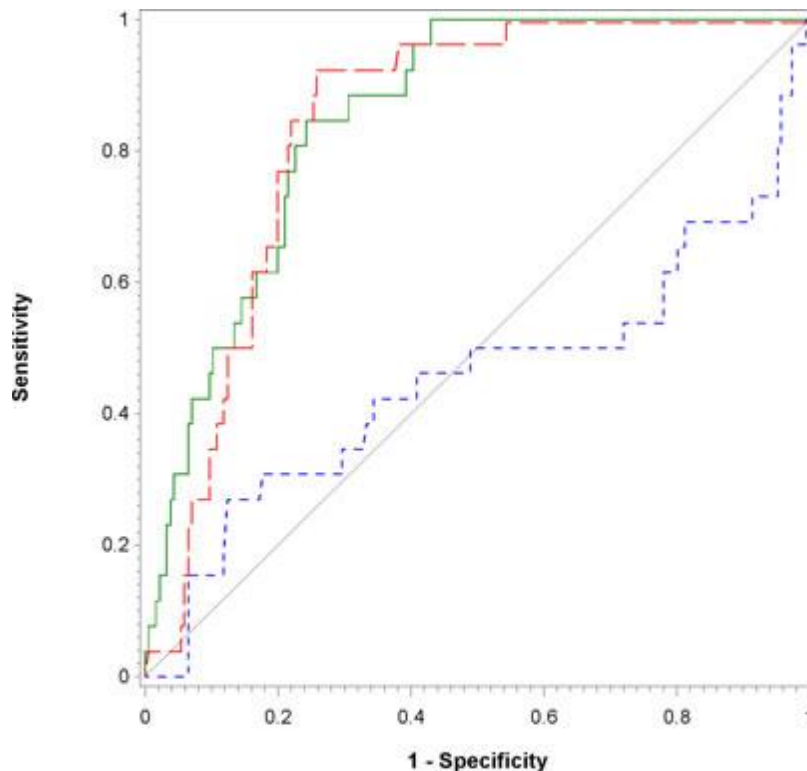
Perry et al. (12) onderzochten of onderzoek van het CSV bij patiënten met acute hoofdpijn een SAB van een TLP kan onderscheiden. Indien een eerste CT beoordeling op de spoeddienst negatief was en de tijd tussen CT en de symptomen meer dan 6 uur bedroeg, werd een LP uitgevoerd. Er waren echter afwijkingen op dit protocol mogelijk op basis van de inschatting van de behandelende arts. RBC werden geteld in de laatste tube (of indien er twijfel was werd de tube met het minst aantal RBC als laatste benoemd). De gebruikte methode om RBC te tellen werd niet gerapporteerd. Xanthochromie werd voornamelijk visueel beoordeeld (1 centrum gebruikte spectrofotometrie). Patiënten die zich meer dan 14 dagen na het ontstaan van de symptomen presenteerden, werden geëxcludeerd. Afwijkende LP bevindingen waren het vinden van >1 RBC/ μ L en/of de aanwezigheid van xanthochromie. Uiteindelijk werden 15 patiënten positief voor SAB bevonden o.b.v. CT schedel of RBC in de laatste tube én aneurysma aangetoond op cerebrale angiografie. Patiënten met normale beeldvorming en normale LP werden telefonisch opgevolgd 1 en 6 maand na het bezoek aan de spoeddienst. Bij 1739 patiënten werd een LP uitgevoerd. Bij 641 patiënten (36.9%) was er bloed aanwezig (>1 RBC / μ L) of was er xanthochromie en bij 15 hiervan werd een SAB aangetoond. Bij 1098 patiënten was de LP normaal (geen RBC, geen xanthochromie) en werd geen SAB gediagnosticeerd.

Van de 15 patiënten met SAB hadden er 7 xanthochromie (range RBC tellingen 32-299 365/ μ L). De overige 8 hadden wel een abnormaal RBC aantal (range RBC tellingen 9 750-600 000/ μ L) (Tabel 3). Ook in deze studie was een significant verschil in de mediaan van het aantal RBC tussen de patiënten met en zonder SAB (2 8741/ μ L versus 20/ μ L) aanwezig.

Aantal uren ictus tot LP	Aantal RBC/ μ L	Xanthochromie
4,5	600 000	-
6,5	199 000	Geen resultaat
14	53 500	+
16	48 388	+
19	32	+
27,5	74 789	-
30	299 365	+
48	25 600	-
72	9 750	-
72	9 309	+
96	34 700	Geen resultaat
96	28 741	-
120	15 000	-
144	10 800	+
240	2 450	+

Tabel 3: Tijd in relatie tot RBC aantal bij SAB positieve patiënten (12).

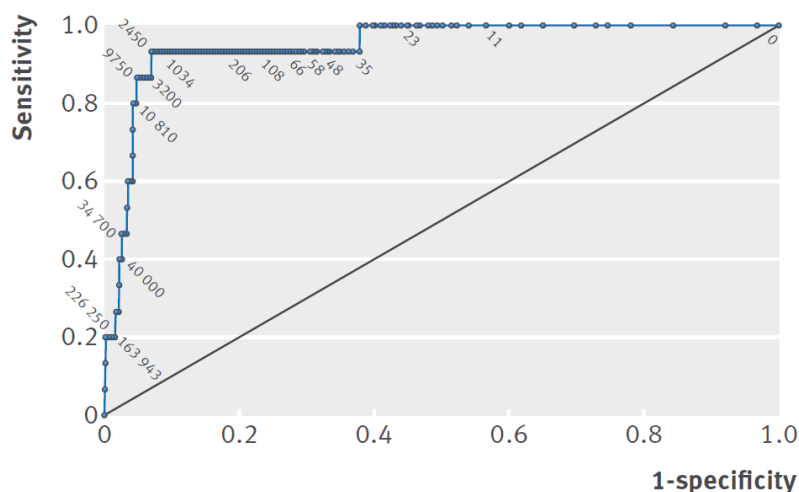
Om de waarde van de RBC telling in de SAB diagnostiek te evalueren, voerden Czuczman et al. een ROC analyse uit voor de parameter “RBC telling in de laatste tube”. Ze bekwamen daarbij een AUC van 0.85 (95% C.I. 0.79-0.91). Deze analyse is weergegeven in Figuur 3 (groene lijn).



Figuur 3: ROC curves voor SAB diagnostiek. Groene lijn: RBC telling in de laatste tube (AUC=0,85. 95% C.I. 0.79-0.91). Blauwe lijn: verschil in RBC telling tussen laatste en eerste tube (AUC=0.45. 95% C.I. 0.31-0.60). Rode lijn: procentuele verandering in de RBC telling (AUC=0.84. 95% C.I. 0.78-0.90) (10).

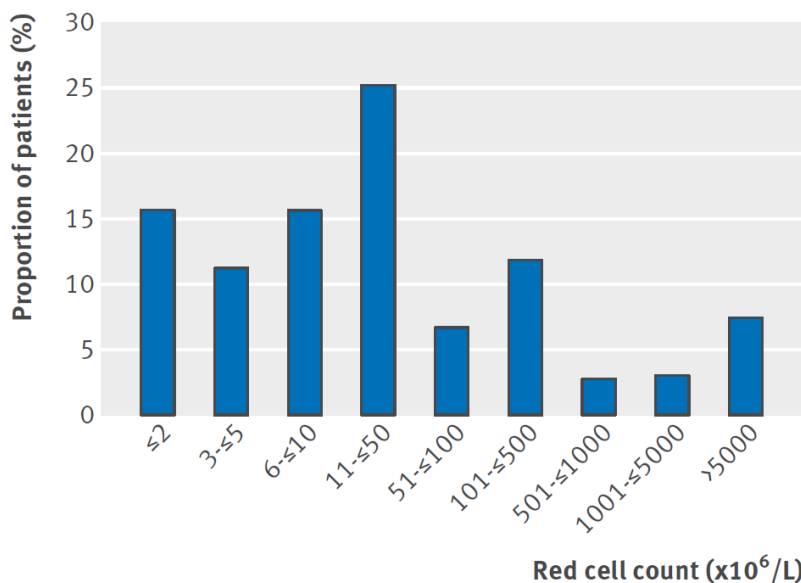
In dezelfde studie werd een subgroep analyse uitgevoerd die enkel patiënten met een negatieve CT bevatte ($n=13$) en waarbij SAB dus gedefinieerd werd als “xanthochromie en aanwezigheid van een aneurysma $>2\text{mm}$ ”. De ROC analyse voor “RBC telling in de laatste tube” bij deze subgroep toonde een AUC van 0.87 (95% C.I. 0.81-0.93). De subgroep analyse leidde tot een positieve likelihood ratio (LR+) van 0 voor RBC aantal <100 , 1.8 voor RBC aantal 100-10 000 en 5.0 voor RBC aantal $>10\ 000$.

Perry et al. (12) stelden ook een ROC curve op voor RBC telling in de laatste tube als diagnose van SAB. Deze leverde een cutoff van $2\ 450/\mu\text{L}$ op met een sensitiviteit van 93.3 (95% C.I. 66.0% - 99.7%) en een specificiteit van 92.8% (95% C.I. 90.5% - 94.6%) (Figuur 4). In deze studie was de sensitiviteit van de xanthochromie voor SAB diagnostiek 46.7% (95% C.I. 22.3%-72.6%) en de specificiteit 97.3% (95% C.I. 95.6%-98.4%). Er was er geen regel om tot minstens 12 uur na de ictus te wachten om een LP te doen. Er werd besloten om een regel op te stellen om patiënten verdacht voor SAB op te delen in een lage en hoge risicogroep. Deze was als volgt: RBC aantal $<2\ 000/\mu\text{L}$ én xanthochromie negatief: laag risico. Andere situaties: hoog risico. Op deze manier was er 100% sensitiviteit (C.I. 74.7% - 100%) en 91.2% specificiteit (88.6% - 93.3%), een positieve likelihood ratio van 11.4 (95% C.I. 8.8-14.6) en een negatieve likelihood ratio van 0.



Figuur 4: Receiver operator characteristic curve voor SAB aan de hand van RBC tellingen. Area under curve = 0.948.

Ook Gorchynski et al. (20) onderzochten de waarde van RBC telling in SAB diagnostiek. In hun studie was de groep met traumatische LP's een grote groep met een RBC aantal dat relatief laag is wanneer het vergeleken wordt met de SAB positieve patiënten: 252 van de 288 traumatische LP's (87.5%) had <500 RBC/ μ L in de laatste tube. In deze lage range waren er geen SAB positieve patiënten. Bij 8 van de 11 SAB patiënten was het RBC aantal in de laatste tube meer dan 10 000 RBC/ μ L. De SAB patiënt met het laagste RBC aantal had 990 RBC/ μ L. Een negatieve predictieve waarde van 100% werd bekomen indien minder dan 500 RBC/ μ L aanwezig waren en een positieve predictieve waarde van 100% indien er meer dan 10 000 RBC/ μ L geteld werden. Zij concludeerden dat er mogelijk een cutoff bestaat voor een absoluut RBC aantal in de laatste tube, maar dat grotere studies nodig zijn om dit veilig te bepalen. Een nadeel is dat we in de studiepopulatie, en in het bijzonder voor de patiënt met 990 RBC/ μ L, geen gegevens hebben over de tijd tussen de ictus en LP. Een gelijkaardig beeld was ook aanwezig in de studie van Perry et al. (12): de RBC distributie toonde hier ook dat de meeste patiënten een relatief laag aantal RBC had (Figuur 5). 74.3% van de patiënten had een RBC telling van ≤ 100 RBC/ μ L. 88.9% van de patiënten had ≤ 1000 RBC/ μ L. 10.6% had >1000 RBC/ μ L. Slechts 1 van de 15 SAB patiënten (6.7%) had een RBC aantal lager dan 1000/ μ L.



Figuur 5: Verdeling van de RBC aantallen in de laatste tube bij de patiëntenpopulatie verdacht voor SAB (n=641).

Uitgaande van het concept dat de RBC uit een TLP vooral in de eerste tube terecht zullen komen, en veel minder in de daarop volgende tubes, werd in de literatuur ook onderzocht of de evolutie van het RBC aantal in verschillende opeenvolgende tubes kan gebruikt worden om een SAB van een TLP te onderscheiden. In de studie van Czuczman et al. (10) werden de RBC aantallen tussen laatste en eerste tube bij de SAB positieve en SAB negatieve patiënten geëvalueerd. Deze data zijn weergegeven in S3 en S4. Er werd een ROC-analyse voor de parameter “verschil in RBC telling tussen laatste en eerste tube” uitgevoerd en deze had een AUC 0.4 (95% C.I. 0.31-0.60). De parameter “procentuele verandering in de RBC telling” had een hogere AUC van 0.84 (95% C.I. 0.78-0.90) (Figuur 3). Bij de subgroep analyse van deze studie waarin enkel CT-negatieve SAB patiënten werden opgenomen, toonde de ROC analyse voor het verschil tussen eerste en laatste meting een AUC van 0.52 (95% C.I. 0.33-0.72). De auteurs concludeerden dat de procentuele verandering in RBC aantal tussen de eerste en laatste tube geassocieerd is met SAB maar de differentiële telling tussen de eerste en laatste tube niet. Ook Heasley et al. (19) onderzochten of het mogelijk was om aan de hand van de procentuele daling van het aantal RBC tussen de eerst en laatst afgenomen tube in de populatie verdacht voor SAB met een negatieve CT, een SAB uit te sluiten. Hiervoor stelden ze dat een daling van 25% of meer eerder zou wijzen op een TLP. De studie bevatte 8 patiënten met vermoeden van SAB en aanwezigheid van een aneurysma. In deze groep werd echter bij twee patiënten (25%) een daling van meer dan 25% gezien ondanks de aanwezigheid van SAB waardoor deze auteurs concludeerden dat deze parameter niet kan worden gebruikt om SAB uit te sluiten. Gorchynski et al. (20) onderzochten diezelfde hypothese. De gemiddelde procentuele daling van het aantal RBC van de eerste tegenover de laatste tube was -82.1% (95% C.I. 79.9-84.9) in de SAB negatieve groep versus -9.1% (95% C.I. -19.3-2.1) in de SAB positieve groep. Er wordt vermeld dat geen van de SAB patiënten een daling van $>30\%$ had in RBC aantal tussen de eerste en laatste tube, maar gedetailleerde data ontbreken.

Uit bovenstaande studies kunnen we concluderen dat RBC quasi direct na de SAB in het CSV aanwezig zijn. We zien ook dat er frequent toch RBC in de laatste CSV tube worden teruggevonden bij niet-SAB patiënten. Wanneer dit RBC aantal bij de SAB-groepen versus de niet-SAB groepen vergeleken wordt, zien we echter significante

verschillen in het RBC aantal. Verschillende studies tonen dan ook dat bij een laag RBC aantal, de kans op een SAB zeer klein is, en deze kans toeneemt naarmate het RBC aantal stijgt. De relevantie om de SAB en niet-SAB groepen van elkaar te kunnen onderscheiden, bijvoorbeeld op basis van een cutoff, is omdat de niet-SAB groep een veel grotere groep is waarbij het belangrijk is dat deze patiënten niet aan onnodige vervolgonderzoeken worden onderworpen. Een andere manier om aan de hand van RBC tellingen een onderscheid te maken tussen SAB en niet-SAB patiënten, is aan de hand van de berekeningen (procentuele of absolute dalingen). Bij de besproken studies is meestal wel een verschil aanwezig tussen de SAB en niet-SAB groep wanneer de procentuele daling wordt geëvalueerd. Verschillende studies hanteren echter verschillende cutoffs, en sommige studies melden SAB patiënten die gemist werden met deze technieken. Theoretisch kan een SAB in combinatie met een TLP bovendien ook voor grote procentuele dalingen zorgen, en moet men voorzichtig zijn met interpretatie van zulke gegevens. Algemeen blijft het van cruciaal belang dat, bij de interpretatie van RBC aantallen, dit steeds in de juiste tijdscontext geplaatst wordt. Negatieve RBC tellingen zijn reeds kort na de ictus (12u) mogelijk en kunnen dan niet meer gebruikt worden om een SAB met zekerheid uit te sluiten. In dat geval kunnen andere laboratoriumonderzoeken zoals de xanthochromie worden aangewend.

Xanthochromiebepaling

Xanthochromie betekent gele verkleuring van het CSV en wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van bilirubine in CSV. Dit bilirubine wordt *in vivo* gevormd door de afbraak van vrijgekomen oxyhemoglobine na een SAB. Er wordt aangenomen dat 12 uur na de SAB steeds bilirubine gevormd zal zijn (4).

Normaal is in het CSV slechts een lage concentratie bilirubine aanwezig. Dit is bilirubine dat doorheen de bloed-hersens-barrière getransporteerd wordt en gebonden is aan albumine. Deze concentratie zal toenemen wanneer de eiwitconcentratie in het CSV hoger is of wanneer de serum bilirubine concentratie hoger is (7). Vals positieve beoordeling van xanthochromie kan in het geval van hyperbilirubinemie, beschadiging van de bloed-hersens-barrière, maligniteiten en behandeling met rifampicine (4).

Wanneer een xanthochromiebepaling wordt uitgevoerd, zijn er een aantal pre-analytische factoren die belangrijk zijn. Het is belangrijk om de tubes correct te labelen, gezien de laatste tube normaal gezien het meest geschikt is om te onderzoeken. De reden is dat de laatste tube over het algemeen het minste invloed zal ondervinden van RBC die het CSV gecontamineerd hebben tijdens de punctie en waaruit oxyhemoglobine vrijkomt na lysis. Indien de laatste tube niet de minst bloederige is, wordt best de minst bloederige tube genomen voor de analyse (15). Het staal moet worden afgeschermd van het (ultraviolet) licht om bilirubine degradatie (en dus vals negatieve resultaten) te voorkomen en het moet koel (4°C) bewaard worden (4). Buizentransport wordt best vermeden gezien de *in vitro* RBC lysis die op deze manier kan optreden en gezien het vrijgekomen oxyhemoglobine voor een bemoeilijkte interpretatie van de resultaten kan zorgen (7,15,16). Gezien de tijdswinst van buizentransportsystemen wordt het staal echter wel sneller na afname gecentrifugeerd en dit is voordelig voor de analyse van xanthochromie (7,15,16). Het staal moet na ontvangst zo snel mogelijk gecentrifugeerd worden (5 minuten, > 2000 rpm) en het supernatans wordt gebruikt voor de analyse (7,15) (kan donker bewaard worden op 4°C tot de analyse) (15).

Er zijn verscheidene manieren om de aanwezigheid van xanthochromie te objectiveren. Deze verschillende manieren hebben een verschillende sensitiviteit en specificiteit voor het diagnosticeren van SAB. De drie in deze tekst beschreven manieren om xanthochromie te bepalen zijn 1) visuele inspectie, 2) spectrofotometrie en 3) het meten van de bilirubine concentratie in het CSV. De twee eerste methoden zijn veruit het meest toegepast, maar binnen deze groepen zijn echter nog verdere nuancerings van de precieze techniek van belang omdat deze een invloed kunnen hebben op de sensitiviteit en specificiteit.

- 1) Visuele beoordeling van de kleur van het CSV. Hiervoor wordt het CSV eerst gecentrifugeerd en wordt vervolgens de kleur vergeleken met water of wordt het staal tegen een witte achtergrond beoordeeld (4). Een rode of gele verkleuring wijst respectievelijk op de aanwezigheid van oxyhemoglobine en bilirubine.

Deze methode wordt vooral toegepast in de Verenigde Staten. In het Verenigd Koninkrijk, Nederland en België wordt deze methode zeer zeldzaam toegepast (4). Dit is mede het gevolg van de NEQAS richtlijnen die de visuele beoordeling voor xanthochromie afraden omdat het niet voldoende betrouwbaar is (15). Een nadeel van deze methode is dat een kleine hoeveelheid bilirubine niet kan worden gezien omdat het onvoldoende gele verkleuring veroorzaakt om met het oog te kunnen zien. Bovendien zal in de aanwezigheid van oxyhemoglobine eventueel aanwezige gele verkleuring niet of moeilijker waarneembaar zijn. Studies hebben aangetoond dat de sensitiviteit van visuele inspectie voor de detectie van SAB laag is (4,6). De aanhangers van deze techniek schuiven de hogere specificiteit en het daarop volgende lager aantal onnodige invasieve en arbeidsintensieve vervolgonderzoeken naar voor.

- 2) Spectrofotometrische bepaling. Dit is een snelle methode die enkele minuten in beslag neemt en die slechts een klein staalvolume vereist (50-500 µL) (4). Aan de hand van absorbanties van op voorhand bepaalde golflengtes, kan de aan- of afwezigheid van bilirubine worden bepaald. De exacte meting alsook de interpretatie van de bekomen gegevens kan echter op verschillende manieren gebeuren. Men kan bijvoorbeeld enkel kijken naar de absorbantie op bepaalde golflengtes of er kan een scan worden uitgevoerd over een spectrum. Bij deze laatste manier van werken wordt meer informatie bekomen en men kan bijgevolg ook de aanwezigheid van oxyhemoglobine of methemoglobine detecteren. De meest geavanceerde onderzoeksprotocollen gebruiken bovendien nog gegevens van serum bilirubine en CSV eiwit om de specificiteit van het onderzoek te verhogen (15,16). De NEQAS richtlijnen raden dan ook aan om gelijktijdig serum bilirubine en totaal eiwit te bepalen.

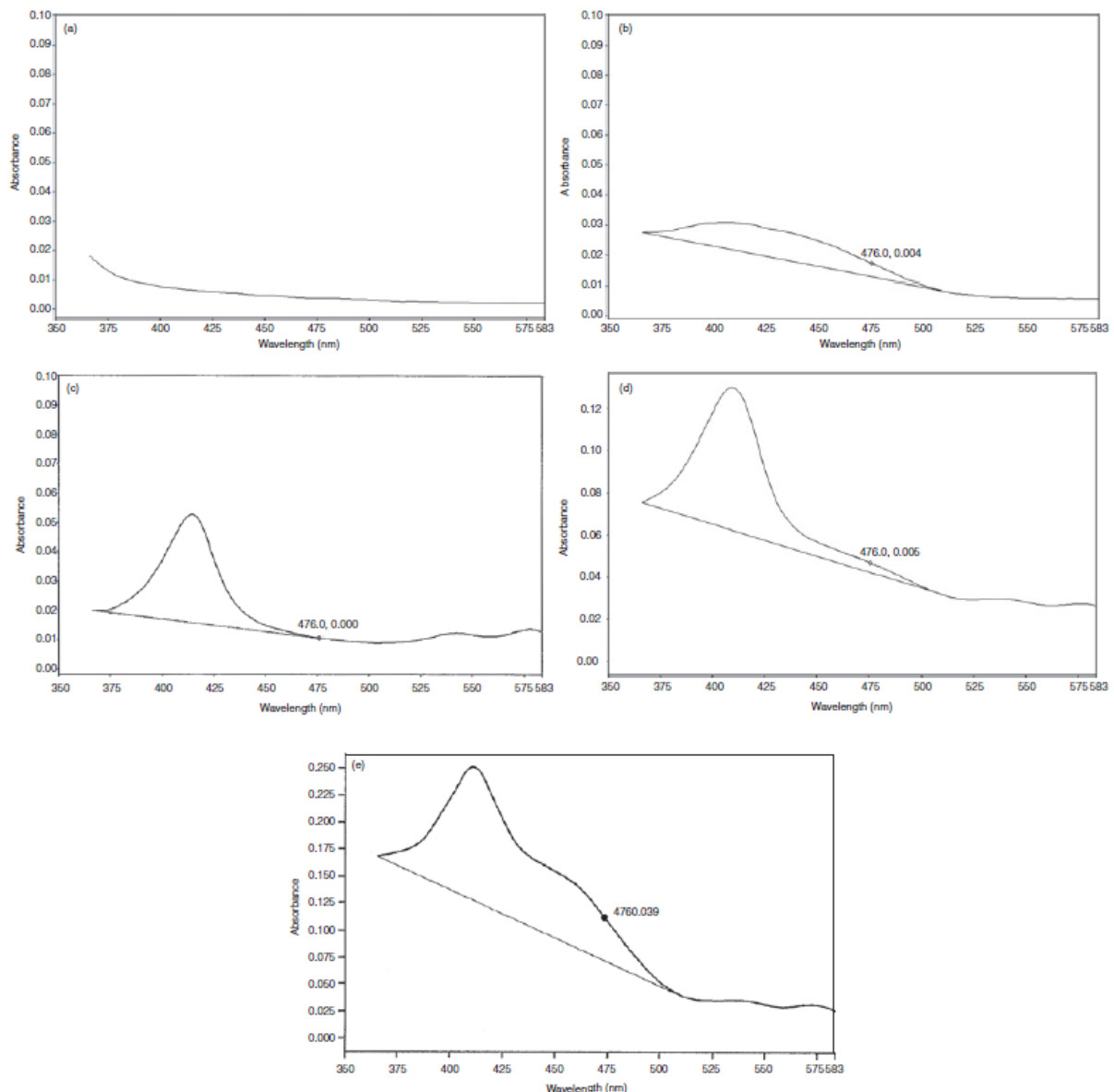
De analyse zelf gebeurt best door het opnemen van een spectrum tussen 350 en 600 nm. Dit gebeurt bij voorkeur aan de hand van microcuvetten om zo het benodigde volume te beperken tot ongeveer 300 µL (7). De standaard lengte van 1 cm voor de lichtstraal doorheen het staal wordt gehanteerd. Een initiële full-scale deflection (FSD) van 0.1 absorbance units (AU) wordt gebruikt. Als er pieken zijn groter dan 0.1 AU, wordt er geschaald.

De interpretatie van het bekomen resultaat berust op informatie die uit de bekomen grafiek kan afgeleid worden. De meest elementaire gegevens worden gehaald uit een absorbantiepiek veroorzaakt door

oxyhemoglobine (410-418 nm) en een brede absorptiezone veroorzaakt door bilirubine (450-460 nm). Zeldzaam kan een methemoglobinepiek aanwezig zijn (403-410 nm). Methemoglobine is hemoglobine waar het ijzer geoxideerd is tot Fe^{3+} . Deze oxidatie gebeurt ongeveer 10 dagen na een bloeding. Dit zal bijgevolg eerder voorkomen bij patiënten met een subduraal hematoom of een omkapselde bloeding. Het CSV zal in dit geval eerder een bruine verkleuring krijgen. Methemoglobine zal niet aanwezig zijn bij een TLP gezien de laattijdige vorming. Mogelijks kunnen aan oxyhemoglobine secundaire absorptiepieken aanwezig zijn op 540 en 580 nm. Deze worden niet mee in rekening genomen (4).

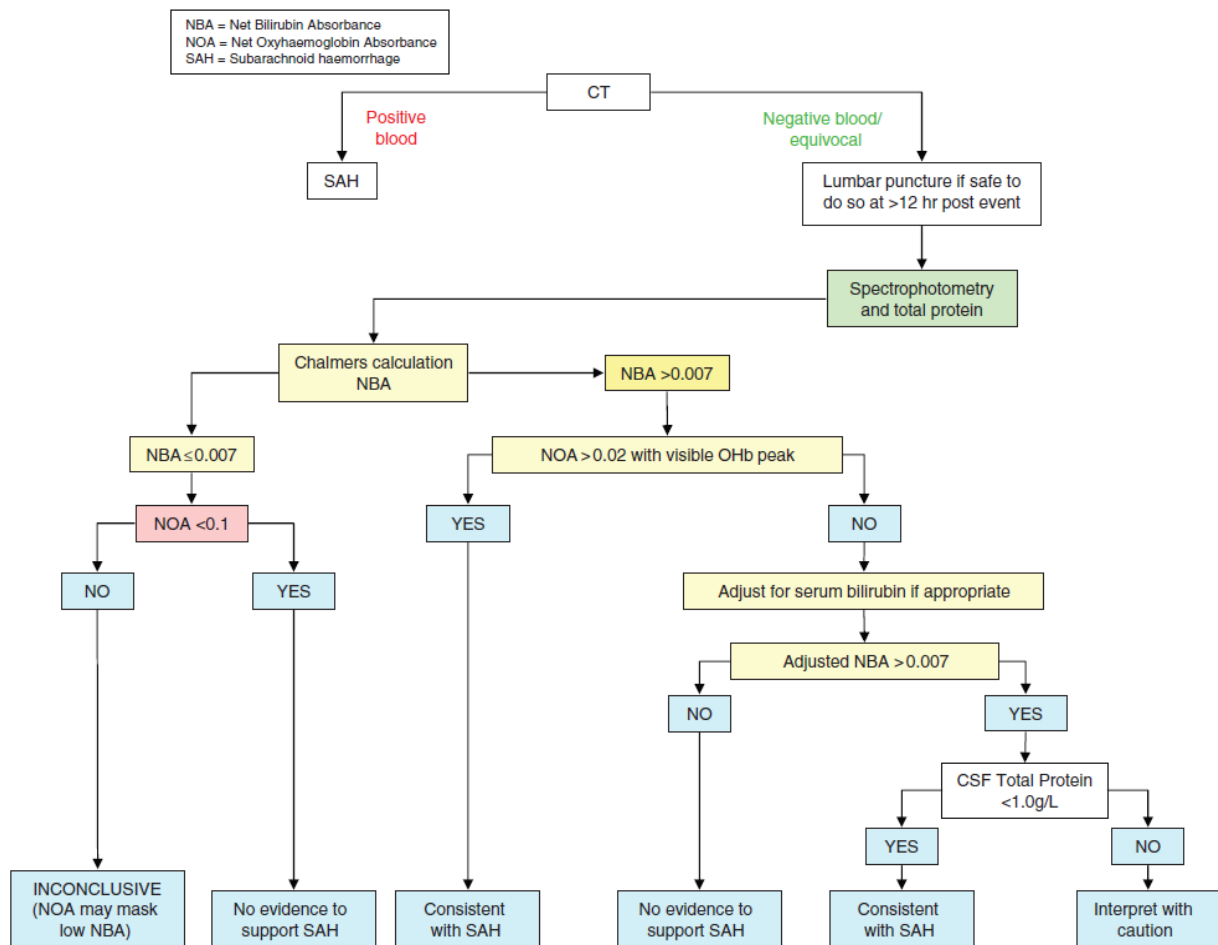
Het oxyhemoglobine verschijnt kort na de SAB (2-4 uur), wanneer RBC beginnen te lyseren. Het bilirubine kan reeds vroegtijdig aanwezig zijn, maar over het algemeen wordt aangenomen dat men best tot 12 uur na de ictus wacht indien men bilirubinevorming wil meten (4,15). Een geïsoleerde stijging in CSV bilirubine kan voortkomen uit een stijging van eiwit dat bilirubine bindt, een gelijktijdige stijging van oxyhemoglobine en bilirubine is compatibel met een SAB. Een geïsoleerde stijging van oxyhemoglobine kan veroorzaakt worden door een traumatische punctie, maar kan ook kaderen in een vroegtijdige punctie waarbij nog geen bilirubine gevormd is (7).

De NEQAS richtlijnen raden aan dat de netto bilirubine absorptie (NBA) wordt berekend volgens Chalmers (21). Hierbij wordt er een basislijn getrokken die begint tussen 350 en 400 nm en eindigt tussen 430 en 530 nm. Deze lijn mag de grafiek niet snijden. Vervolgens wordt de absorptie boven deze basislijn op 476 nm gemeten, waarbij men de NBA bekomt. Als er op 476 nm een raakpunt is met de basislijn, is de NBA 0. Ook de netto oxyhemoglobine absorptie (NOA) wordt gemeten op deze manier. Verschillende voorbeelden zijn weergegeven in Figuur 6. Een volledige beschrijving en benadering van uitzonderingen wordt uitvoerig beschreven in de NEQAS richtlijnen.



Figuur 6(a-e): Voorbeelden van spectrofotometrische opnames (15). (a) Een normaal CSV met quasi geen bilirubine. (b) NBA binnen de referentiewaarden. (c) Oxyhemoglobine met NBA 0. (d) Oxyhemoglobine met NBA binnen de referentiewaarden. (e) Oxyhemoglobine met een verhoogd NBA.

Vervolgens worden de spectrofotometrisch bekomen gegevens geïnterpreteerd. Ook hier zal als voorbeeld de interpretatie die door de NEQAS richtlijnen wordt voorgesteld, gebruikt worden (Figuur 7).



Figuur 7: Interpretatie van de NBA en NOA bekomen bij het volgen van de NEQAS richtlijnen.

Zoals in bovenstaande figuur gesuggereerd wordt, moet ook dit onderzoek worden geïnterpreteerd in zijn tijdscontext. Bij een SAB kan het bilirubine nog afwezig zijn indien de tijd tussen ictus en LP <12 uur bedraagt. Het bilirubine zal nadien meestal langere tijd aanwezig blijven (weken) (4). Om deze reden raden de NEQAS richtlijnen aan om tot minstens 12 uur na de ictus te wachten met de LP (15). Niet overal wordt deze afwachende houding toegepast. De tijd na de ictus waarna een LP gebeurt, verschilt tussen enkele geografische gebieden. In UK en Nederland worden meestal de NEQAS richtlijnen toegepast. In andere landen wordt wel spectrofotometrie gebruikt, maar wordt deze anders toegepast en geanalyseerd. In Zweden bleek dat spectrofotometrie frequent gebruikt wordt (22/24 van de bij EQUALIS aangesloten laboratoria), maar dat de specifieke implementatie heterogeen is. 10/24 doen een meting op 415 nm, 5/24 gebruikten spectrofotometrie maar specificeerden niet verder, 5/24 gebruikten de NEQAS methode, 2/24 deden een absorptiemeting op 415nm gecombineerd met een directe bilirubine meting en 2/24 deden visuele beoordeling van het CSV gecombineerd met celtelling (4).

In Noord Amerika worden LP's frequenter binnen de 12 uur na start van de symptomen uitgevoerd om zo de tijd tussen ictus en mogelijke behandeling zo laag mogelijk te houden. Bovendien wordt er daar meestal geen spectrofotometrie toegepast, maar een visuele inspectie van het CSV.

Verschillende studies houden helaas geen rekening met de tijdscontext en geven geen of geen duidelijke informatie over het tijdstip na optreden van klachten waarbij vervolgens een LP uitgevoerd werd. Op deze manier is het moeilijk om deze data te interpreteren (7).

- 3) **Diazo methoden.** Dit is geen echte xanthochromiebepaling, maar wordt wel als equivalent beschouwd. Deze methoden worden sporadisch in de literatuur beschreven maar worden niet frequent gebruikt en zijn onvoldoende gevalideerd voor hun toepassing in de diagnostiek van SAB. Omwille van deze redenen raadt de NEQAS richtlijn het gebruik van deze methoden dan ook af (15).

Over de keuze voor een techniek en interpretatie voor xanthochromiebepaling bestaat er discussie in de literatuur. De voorkeuren verschillen vooral geografisch. Enkele artikels geven een objectieve vergelijking van deze methoden en hun uiteindelijke nut in de diagnostiek van SAB.

Chu et al. (16) vergeleken systematisch sensitiviteit en specificiteit van de visuele *versus* spectrofotometrische bepaling van xanthochromie voor SAB diagnostiek bij patiënten met negatieve CT beeldvorming. Hiervoor werden 22 studies geïnccludeerd. In het artikel worden echter een aantal problemen vermeld die de vergelijking bemoeilijkten.

Een eerste probleem zijn de methodologische verschillen in deze studies: de waarde van de xanthochromie wordt o.a. geëvalueerd door te kijken of deze kan 1) voorspellen of RBC in het CSV aanwezig zijn, 2) voorspellen of er een SAB aanwezig is 3) voorspellen of aneurysmata op angiografie aanwezig zullen zijn.

Ondanks de verschillen in de geïnccludeerde studies werden sensitiviteit en specificiteit berekend. De specificiteit van de visuele methode lag hoger (96%) dan de spectrofotometrische (86%). De sensitiviteit van zowel de visuele als spectrofotometrische beoordeling was onvoldoende (< 90%). Deze cijfers moeten wel met de nodige reserve worden bekeken, gezien belangrijke beperkingen van de verschillende geïnccludeerde studies (S5). Een subgroep analyse van spectrofotometrie met interpretatie volgens de NEQAS richtlijnen toonde een sensitiviteit van 93% (95% C.I. 66-100%) en specificiteit van 99% (95 C.I. 98-100%). Dit zijn de hoogste gepoolde sensitiviteit en specificiteit die bekomen werden in verschillende subgroepen (S6). De lage prevalentie van een SAB veroorzaakt bovendien moeilijkheden bij het verkrijgen van goede sensitiviteitsschattingen.

Ten tweede zijn er verschillen in de referentiestandaard die gebruikt wordt om een SAB aan te duiden: 1) de aanwezigheid van een aneurysma op angiografie, 2) aanwezigheid van aneurysma op angiografie in combinatie met een verhoogd aantal RBC en dit eventueel in combinatie met of zonder vermindering van RBC aantallen over de verschillende tubes, 3) aneurysma op angiografie gevonden wordt én er aanwezigheid is van xanthochromie (visueel of spectrofotometrisch).

Tenslotte neemt men in de diagnose van SAB de aanwezigheid van xanthochromie mee in rekening. Dit kan de diagnostische waarde van xanthochromie overschatten.

Het besluit van deze systematische review was dat het onmogelijk is om een definitieve conclusie te maken over de diagnostische accuraatheid van spectrofotometrie versus visuele beoordeling door de grote heterogeniteit in de verschillende studies.

Bijlage S5 geeft alle geïnccludeerde studies samen met de gebruikte methode en onder andere sensitiviteit en specificiteit weer.

Chalouhi et al. (14) evalueerden in een retrospectieve studie de waarde van een positieve LP in een CT negatieve populatie voor de diagnostiek van SAB.

Een positieve LP werd gedefinieerd als aanwezigheid van xanthochromie (visueel beoordeeld tegen een witte achtergrond) of een gestegen RBC aantal dat niet voldoende (< 30%) afnam tussen de eerste en laatste tube. Er werden 35 positieve LP's gevonden. 9 hiervan hadden geen xanthochromie en al deze 9 waren binnen de 12 uur na de ictus afgenomen. Bij 16 van de 35 patiënten (45.7%) werd een of meerdere aneurysma aangetoond. Hierdoor concludeerden de auteurs dat er een hoge diagnostische waarde van angiografie is bij CT negatieve, LP positieve patiënten verdacht voor SAB en dat het uitvoeren van een cerebrale angiografie in deze populatie bijgevolg te verdedigen is.

Xanthochromie bepaling vervult een belangrijke rol om bij SAB verdachte patiënten met een negatieve CT een onderscheid te maken tussen patiënten die best verder worden onderzocht en patiënten bij wie deze onderzoeken achterwege kunnen worden gelaten. Het is een methode die zeer frequent wordt toegepast, maar waarvan uit de literatuur blijkt dat er een zeer grote heterogeniteit is in de precieze uitvoering en interpretatie. Dit alles maakt het moeilijk om eenduidige en universeel toepasbare uitspraken te doen over performantiekenmerken van dit onderzoek.

Ferritine

Ferritine is een ijzer-opslag eiwit complex dat ijzer verwijderd nadat het vrijgekomen is uit hemoglobine bij metabolisatie. De productie van dit eiwit duurt enige tijd en een CSV ferritine bepaling heeft dus een lagere sensitiviteit in de eerste uren na de bloeding. Deze analyse is niet aangeraden om te gebruiken in een vroegtijdige diagnostische setting.

Volgens Nagy et al. (4) zou het ongeveer een 3-tal dagen duren vooraleer CSV ferritine consistent gestegen is en 7-10 dagen vooraleer concentraties rond 1000 ng/mL bereikt worden. Controlestalen bevatten daarentegen ferritine in het CSV dat eerder rond 4 ng/mL ligt. Bij contaminatie door een traumatische punctie is deze waarde slechts licht verhoogd (gemiddeld 9 ng/mL). Een cutoff van 12 ng/mL wordt door enkele auteurs voorgesteld (4). Het is een parameter met een hoge sensitiviteit en specificiteit van 95%.

Het voordeel van deze parameter is dat deze nog lang positief blijft nadat CSV bilirubine al is beginnen dalen en mogelijk niet meer te detecteren is (4). Een groot nadeel is echter dat het niet kan gebruikt worden als de tijd tussen ictus en LP kort is.

Siderofagen

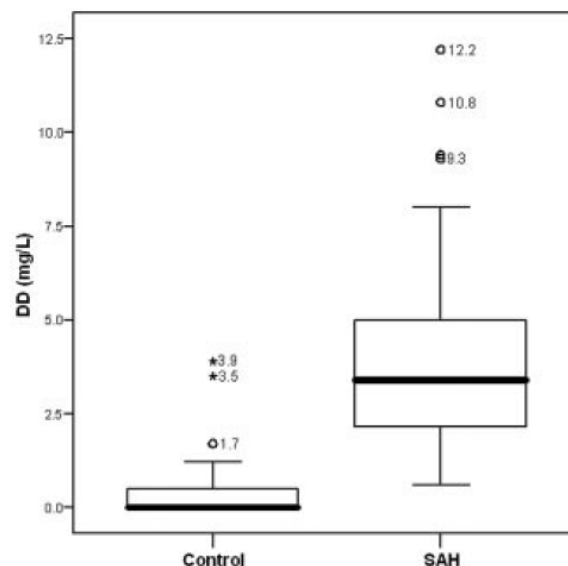
Een SAB wekt een inflammatoire respons op waarbij macrofagen worden geactiveerd en ze vervolgens RBC gaan fagocyteren. Hierbij wordt hemosiderine opgeslagen in deze macrofagen.

Ook deze test heeft een lage sensitiviteit kort na een SAB, voor de eerste 3 dagen. Later na de SAB is er een hoge sensitiviteit en specificiteit en ze kunnen zelfs gedetecteerd worden tot verschillende maanden na een insult.

D-dimeren

D-dimeren zijn afbraakproducten van fibrine en komen voor wanneer de fibrinolyse start nadat een stolsel gevormd werd. Juliá-Sanchis et al. (22) onderzochten de waarde van het meten van D-Dimeren in de diagnostiek van SAB. Een cutoff van 0.5 mg/L D-dimeren gaf een 100% sensitiviteit in de diagnostiek van SAB. In deze studie zaten in totaal 146 patiënten waarvan 35 patiënten met een SAB (op basis van een positieve CT). 11 SAB negatieve patiënten testten vals positief bij de ingestelde cutoff (specificiteit 90%). In de studie werden de stalen opgedeeld als bloederig (> 500 RBC/ μ L) of niet bloederig (Figuur 8). Alle stalen van de SAB positieve patiënten waren bloederig (35 SAB positief/62 bloederige stalen, 56%). De rest (44%) waren traumatische puncties.

Het nadeel van deze studie is dat de diagnose van SAB enkel gebeurde op basis van CT, we weten dus bijgevolg niet of deze cutoff ook zou kunnen worden gebruikt bij CT-negatieve patiënten verdacht op SAB. Bovendien werd er niets vermeld over het tijdsinterval tussen de ictus en de LP, waardoor een inschatting van het tijdsverloop van deze parameter niet mogelijk is. Tenslotte werd ook niets vermeld over het aantal RBC dat in beide groepen gevonden werd.



Figuur 8: Verdeling van D-dimeer concentratie in CSV met >500 RBC/ μ L (22).

VRAAG 2 - Op welke manieren kan een RBC telling in CSV betrouwbaar gebeuren?

De RBC telling is een potentieel zeer interessante analyse in de SAB diagnostiek. Recente studies suggereren dat de RBC telling op de laatste tube mogelijk een SAB en TLP kan onderscheiden. Een negatieve RBC telling kan een SAB mogelijk excluderen. Gezien het nauwe tijdsvenster waarin dit moet gebeuren, is het belangrijk te onderzoeken hoe RBC snel en accuraat kunnen worden geteld.

In tegenstelling tot vele laboratoriumtesten waar de precisie, gemeten als de variatiecoëfficiënt, minder dan 5% wordt verwacht te zijn (23), is dit voor bijvoorbeeld WBC tellingen in CSV in lage maar klinisch relevante hoeveelheden hoger en dikwijls 20% (24). Voor geautomatiseerde RBC tellingen zullen de aanvaardbare variatiecoëfficiënten in de klinisch relevante range in dit gebied liggen.

Een goede geautomatiseerde methode moet in staat zijn om een accurate RBC telling te leveren bij lage aantallen RBC (in de grootteorde van honderden per microliter) waardoor het mogelijk wordt om patiënten in groepen onder te verdelen (niet-pathologisch versus pathologische waarden).

Op basis van de literatuur is gebleken dat er geen universele cutoff voorhanden is om TLP en SAB van mekaar te onderscheiden. Enkele suggesties voor een cutoff liggen tussen 500 en 2 000 RBC/ μ L al dan niet in combinatie met het uitvoeren van xantochromie.

De gouden standaard is de manuele RBC telling in een telkamer (bv Bürker of Fuchs-Rosenthal telkamer). Hierbij wordt in een beperkt volume (bijvoorbeeld 0.1 of 1 μ L) het aantal RBC microscopisch geteld. In de aanwezigheid van WBC en bij oudere stalen kan het moeilijk zijn om de RBC en WBC duidelijk te onderscheiden. Bovendien kan het nodig zijn om verdunningen toe te passen bij hoge RBC aantallen waarbij mogelijk verdunningsfouten en rekenfouten worden geïntroduceerd. Andere nadelen van deze techniek zijn dat het zeer tijds- en arbeidsintensief is en goed getraind personeel vergt. Bovendien blijft er dan nog een grote intra- en interoperator variabiliteit en is er een te lage precisie (25,26).

Naast manuele telling zijn er een aantal geautomatiseerde telmethoden beschikbaar. Een eerste, frequent toegepaste meettechniek is via impedantie. RBC worden via het principe van hydrodynamische focussing één voor één voorbij een detector gebracht waar een verschil in impedantie gemeten wordt. Deze gegevens kunnen worden gebruikt om het aantal RBC en de grootte ervan te meten. Wanneer RBC in lage concentraties worden gemeten, wordt soms een zogenaamde body fluid (BF) modus gebruikt die aangepast is om correcter te meten in deze range. Dit is bijvoorbeeld zo bij de Sysmex XE-5000 hematologie analyzers in het UZ Leuven. Het omschakelen van de gewone modus naar de body fluid modus duurt 195 seconden inclusief de vereiste wasstappen. Er zal 130 μ L geaspireerd worden waarna de meting zal gebeuren. Elke analyse duurt 63 seconden. Standaard geeft dit toestel RBC tellingen aan vanaf 1000 RBC/ μ L. Als research parameter voor RBC telling zijn metingen tot minimaal 100 RBC/ μ L mogelijk. Hogere waarden zijn vervolgens steeds in stappen van 100 RBC/ μ L (27). Een tweede methode om RBC te tellen is een optische telling. De Siemens ADVIA 120 is een voorbeeld van een analyzer die deze meettechniek toepast. De RBC worden op dit toestel gemeten door gebruik te maken van een plot van een lichtscatter in kleine hoek (2-3°) en een lichtscatter in grote hoek (5-15°).

Er werd een literatuurstudie uitgevoerd om te kijken of en hoe deze manuele en automatische methoden kunnen worden toegepast. Om bruikbaar te zijn, moet een onderzoeksmethode in een lage RBC concentratierange (enkele honderden RBC/ μ L) kunnen meten en moet dit met een aanvaardbare CV kunnen (<20%). In de literatuur wordt veel nadruk gelegd op het tellen en eventueel differentiëren van WBC in CSV en diverse andere lichaamsvochten terwijl de mogelijkheid tot RBC telling slechts zelden vermeld of geëvalueerd wordt. De enkele studies die de RBC telling in CSV onderzochten, worden achtereenvolgens kort besproken.

In een studie van Kleine et al. (28) werden controlematerialen aangemaakt voor het meten van RBC en WBC in CSV stalen. De gouden standaard voor de RBC telling was een Fuchs-Rosenthal kamer en de telling werd uitgevoerd door twee ervaren personen. Op basis van deze telling bevatte de 20 verschillende controles een RBC aantal tussen de 10 en 1 386 RBC/ μ L. De within-run imprecisie CV bedroeg <9% bij 10-20 RBC/ μ L voor de manuele telling. Vervolgens werden deze stalen gemeten op 2 verschillende Sysmex analyzers (XE-5000 en XT-4000i). De RBC tellingen op de Sysmex XE-5000 (body fluid mode) had een CV van 32% bij stalen met 150 RBC/ μ L. In vergelijking met de gouden standaard, waren de RBC tellingen van de Sysmex XT-4000i gemiddeld 5.4 keer te hoog en voor de Sysmex XE-5000 gemiddeld 2.7 keer te hoog. Zij concludeerden dat de RBC telling niet kon worden gebruikt voor het detecteren van kleine hoeveelheden (bv 1 000 RBC/ μ L) RBC in CSV. Beperkingen van deze studie zijn dat er geen meetdata worden weergegeven. De body fluid mode op de XE-5000 laat toe dat RBC tellingen worden afgerond op 100 RBC/ μ L (in de research module). Wanneer er controles worden gebruikt met tussen 10 en 1386 RBC/ μ L, wordt inderdaad een grotere CV verwacht, alleen al op basis van de afronding die wordt toegepast.

Paris et al. (27) evalueerden de performantie van de body fluid modus op de Sysmex XE-5000. Zij analyseerden 174 stalen, waarvan 32 CSV en 142 andere vchten (ascites-, pleura-, synoviaal- en peritoneaal vocht). Hun referentiemethode voor de beoordeling van het aantal RBC was een semi kwantitatieve inschatting door 2 experts. Er werden voor de verschillende staalsoorten 4 groepen gemaakt: 1) geen RBC, 2) <1000/ μ L, 3)

<5000/ μ L, 4) >5000/ μ L en voor de evaluatie van de correlatie werden groep 1 en 2 samengenomen alsook groep 3 en 4. De reproduceerbaarheid werd geëvalueerd aan de hand van 4 ascitesvchten met een RBC range van 150 tot 3200 RBC/ μ L in de geselecteerde stalen. Een aanvaardbare CV (<20%) bereikten ze vanaf 600 RBC/ μ L. De CV bedroeg 32% bij 150 RBC/ μ L en 12% bij 3200 RBC/ μ L. Bij de correlatie voor RBC aantallen was er een 95% overeenkomst voor de indeling tussen de twee groepen. Deze data zijn weergegeven in Tabel 4. Zij concludeerden dat de BF analyse een acceptabel alternatief is voor de manuele RBC telling. Een beperking van deze studie is dat de absolute RBC aantallen gemeten op de XE-5000 niet worden weergegeven.

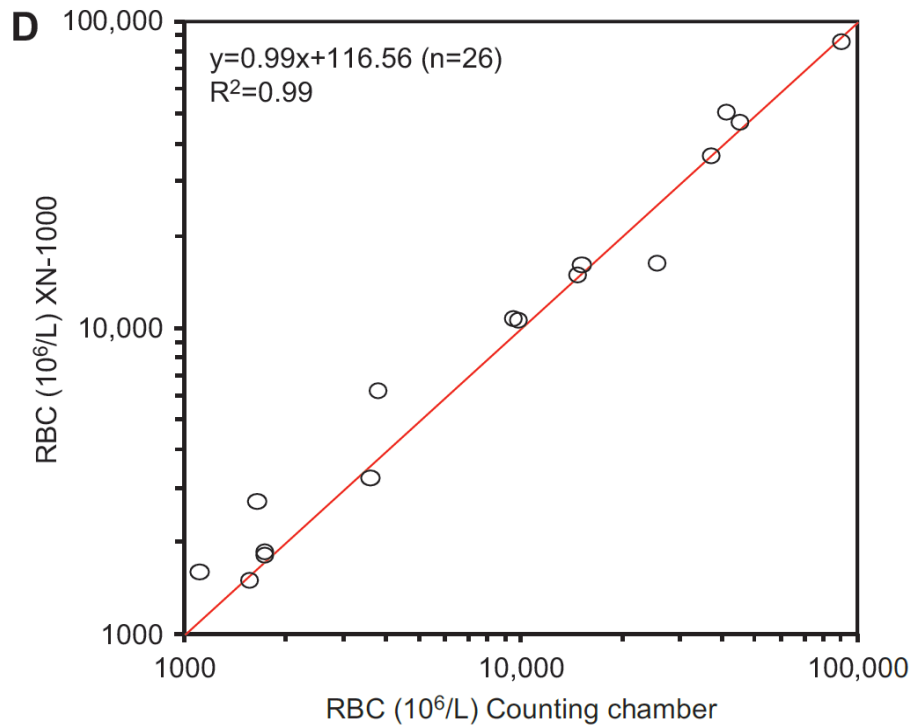
Manueel/XE-5000	< 1 x 10 ³ / μ L	> 1 x 10 ³ / μ L
< 1 x 10 ³ / μ L	88	7
> 1 x 10 ³ / μ L	1	77

Tabel 4: Overeenkomst tussen manuele en automatische (XE-5000) RBC telling. De manuele telling gebeurde enkel op een semi-kwantitatieve manier.

Ho et al. (29) vergeleken de RBC telling op 60 CSV stalen tussen een manuele (Fuchs-Rosenthal) en automatische (XE-5000, in de body fluid mode) telling. Er werd een correlatiecoëfficiënt van meer dan 0.95 gevonden (n=60). Bij de overige lichaamsvchten (n=99) werd een correlatiecoëfficiënt van 0.74 gevonden. Het gemiddelde RBC aantal dat microscopisch was geteld, was 9 869/ μ L (mediaan 157, range 0-370 000) en 13 907/ μ L (mediaan 350, range 0-377 000) voor de XE-5000. Functionele sensitiviteit (20% imprecisie) werd bereikt vanaf 400 RBC/ μ L. Er werd geen carry over gevonden. Lineariteit was aanwezig tot op 400 RBC/ μ L. Zij concludeerden dan ook dat de BF-analyse een acceptabel alternatief is voor RBC telling in CSV.

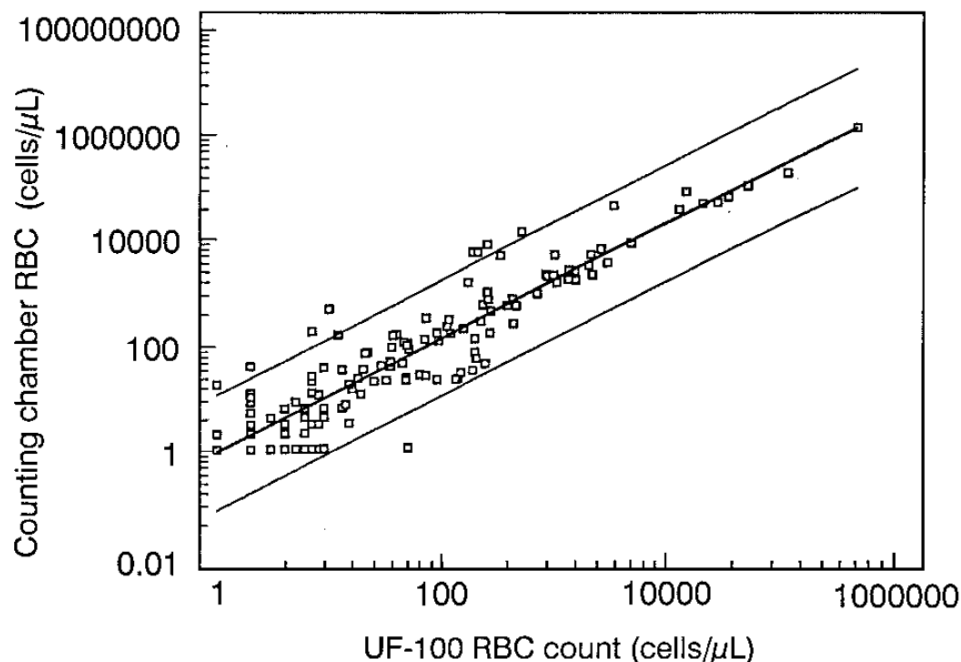
Boer et al. (30) evalueerden 185 CSV en 88 ventrikelvchten. RBC werden er niet geteld via een telkamer, maar enkel via flow cytometrie. Er werd een vergelijking tussen Sysmex UF-100 en XE-5000 uitgevoerd. De UF-100 is een analyzer die eigenlijk ontwikkeld is voor urine analyse en die voor de partikel classificatie gebruik maakt van de informatie van de conductiviteit, forward light scatter, fluorescente kleurstoffen voor DNA (phenanthridine) en membranen (carbocyanine). De auteurs voerden een precisiestudie uit op een staal met 13 500 RBC/ μ L. Dit staal werd aangemaakt door referentiemateriaal van de Sysmex XE5000 te verdunnen in 0.9% NaCl. Het staal werd vervolgens twee maal per dag gedurende 20 dagen gemeten. Een totale CV van 3.1% en between-day imprecisie van 2.8% werd bekomen. Een lineariteitsonderzoek toonde een regressiecoëfficiënt van 0.77 tussen 1000 en 1 000 000/ μ L. In hun opstelling was de laagst mogelijk rapporteerbare waarde van de XE5000 1 000 RBC/ μ L (de research parameter werd niet gebruikt), maar de auteurs concludeerden dat deze limiet voldoende laag is.

Fleming et al. (31) evalueerden de Sysmex XN-1000 voor onder andere RBC telling in de body fluid module. Er werden 73 CSV stalen getest. Hiervoor werd vergeleken met de manuele telling via een Fuchs-Rosenthal telkamer. De correlatie tussen beide methoden was zeer goed met een correlatiecoëfficiënt van 0.99 (vergelijking: $y=0.99x+116.56$, n=26), Figuur 9. Voor de correlatie werden enkel stalen met RBC aantallen vanaf 1 000/ μ L gebruikt gezien dit de laagste waarde is die de XN-1000 rapporteert (de research parameter werd niet gebruikt). Zij concludeerden dat de BF module een goede manier is om een snelle en accurate RBC telling in CSV te bekomen.



Figuur 9: Correlatie tussen manuele (Fuchs-Rosenthal) en automatische (XN-1000) RBC telling. Laagste grens is 1 000 RBC/ μ L gezien dit de laagste waarde is die gerapporteerd wordt door de XN-1000 in body fluid modus (zonder gebruik van de research parameter).

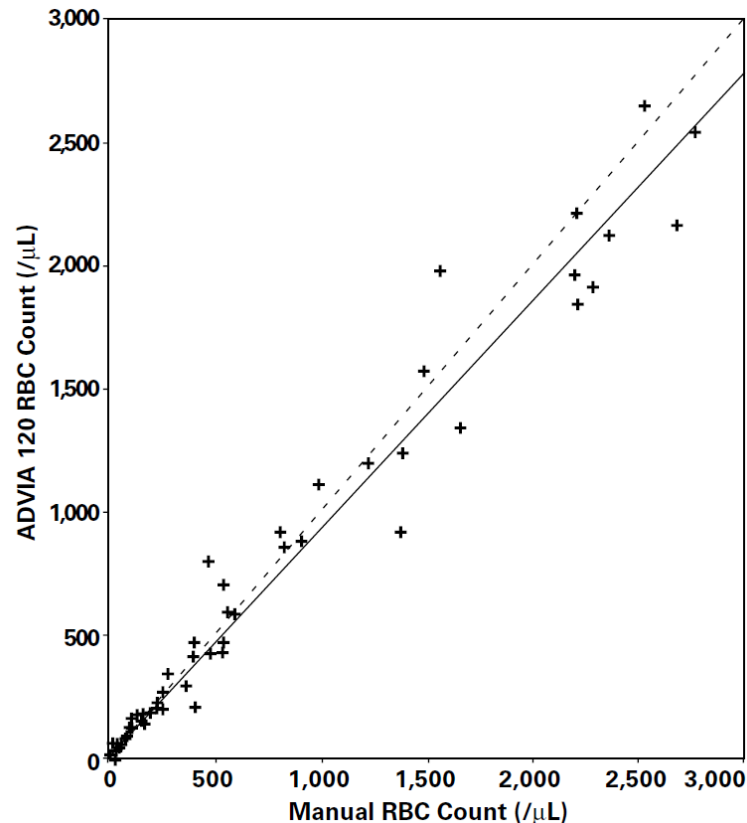
Van Acker et al (26) evalueerden de Sysmex UF-100. Het toestel vereist 800 μ L staal voor de analyse. Omwille van deze reden, werden de stalen in deze studie 4x verdund (NaCl). In hun studie vergeleken de auteurs 256 RBC tellingen bij routine CSV stalen tussen manuele (Fuchs-Rosenthal, 20 velden op 400x bekeken) en UF-100 telling. De mediaan voor de waarden op de UF-100 bedroeg 6 RBC/ μ L. De IQR waren 2-78 RBC/ μ L. Er werd een goede overeenkomst gevonden tussen de UF-100 en de microscopische telling ($r = 0.919$), $P < 0.001$ (Spearman rank analysis). Hiermee lijkt dat de UF-100 goed presteert in het lage gebied. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Figuur 10.



Figuur 10: Overeenkomst Manueel en UF-100 (26)

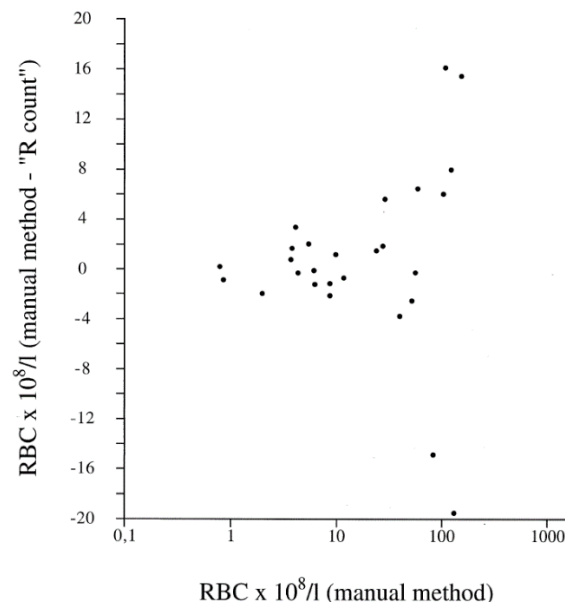
Aune et al (25) vergeleken de RBC telling in 263 CSV stalen tussen de manuele referentiemethode en Siemens ADVIA 120, met gebruik van de ADVIA 120 CSF assay. Bij deze specifieke assay wordt 300 μ L 1:1 verdund met ADVIA 120 CSF Reagent (Bayer HealthCare) en dit wordt vervolgens minimaal 4 minuten geïncubeerd. Nadien kan dit staal door het ADVIA 120 toestel geaspireerd worden. Er wordt 4 μ L staal geanalyseerd. Deze assay heeft

een meetbereik van 0 tot 2880 RBC/ μ L. De RBC worden op dit toestel met een optische methode gemeten, gebruik makend van een plot van een scatter in lage hoek (2-3°) en een scatter in hoge hoek (5-15°). De manuele RBC telling gebeurde in een telkamer en een 0.9% NaCl verdunning werd toegepast indien nodig. De correlatiecoëfficiënt voor RBC tellingen tussen 0 en 2 700/ μ L was 0.988. Deze bevindingen worden weergegeven in Figuur 11. Een within run precisie CV van 3.8% werd bekomen bij een RBC aantal van 540/ μ L. De totale imprecisie CV was 19.5% bij een RBC aantal van 22/ μ L. De lineariteit is accuraat (binnen 10%) tot 2 165 RBC/ μ L. De auteurs concludeerden dat de ADVIA 120 CSV Assay een acceptabel alternatief is voor de arbeidsintensieve manuele methode.



Figuur 11: Regressieanalyse tussen manuele en automatische (ADVIA 120) RBC telling.

Aune et al (32) vergeleken de Bayer H*2 en manuele RBC telling (Fuchs-Rosenthal) in 34 CSV stalen. De laagst mogelijke range waarmee dit toestel kan rapporteren is 100 RBC/ μ L. 34 stalen met een range van 0 tot 1 500 000 RBC/ μ L werden vergeleken (Figuur 12). Er werd ook een precisie studie gedaan op 3 levels van RBC aantallen. De laagste CV voor de automatische methode werd bekomen bij de hoogste groep (> 15 000 RBC/ μ L). In deze groep werd de hoogste CV voor de manuele telling waargenomen (13.1% (C.I. 9-25). Bij de groep met een RBC aantal tussen 0 en 1 000/ μ L bedroeg de CV 21.8% (C.I. 15-48) en voor de manuele telling slechts 3.3% (C.I. 2.5-5).



Figuur 12: Aune et al. Bayer H*2 versus manuele telling in een Fuchs-Rosenthal kamer (32).

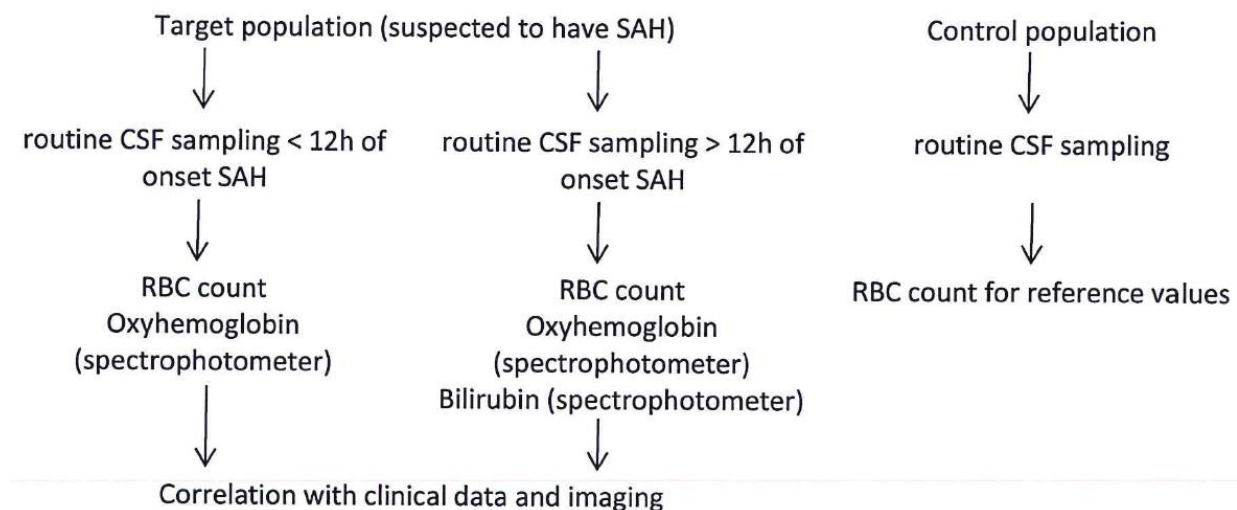
Uit het beperkt aantal studies die de RBC telling door automaten onderzochten, blijkt dat er voor de Sysmex analyzers aanvaardbare CV's worden bekomen vanaf 400 a 600 RBC/ μ L. Dit is ongeveer het gebied waar een mogelijke cutoff zich bevindt die SAB en niet SAB-stalen zal onderscheiden (500-2000 RBC/ μ L, zie vraag 1) en dit is dus interessant wanneer we de RBC telling op CSV op deze manier zouden uitvoeren. Enkel de studie van Kleine et al. (28) had tot besluit dat de Sysmex XE-5000 niet kon worden gebruikt voor RBC telling, omdat in hun evaluatie er systematisch een hoger RBC aantal gerapporteerd werd met de automatische methoden in vergelijking met de manuele telling. Deze problemen werden niet gemeld in de andere studies (n=4).

De ADVIA, die goed nauwkeurig lijkt te kunnen analyseren in de lage RBC concentratierange, heeft als belangrijk nadeel wel dat er speciale voorbereidings- en incubatiestappen vereist zijn, waardoor de kans op fouten toeneemt alsook de TAT stijgt. Bovendien is de analytische range van dit toestel eerder beperkt.

Een geautomatiseerde methode heeft als voordeel dat de TAT korter is, dat het onderzoek meer gestandaardiseerd verloopt en dat de problemen van intra en inter observer variabiliteit verdwijnen.

VRAAG 3 – Hoe kan een geautomatiseerde RBC telling in CSV worden gebruikt in de SAB diagnostiek?

In een recent opgestarte studie in het UZ Leuven zullen voor SAB verdachte patiënten waarbij een LP werd uitgevoerd, de RBC geteld worden (studie nummer UZ Leuven: S57337 – ethische commissie nummer: MLI 1276). Dit gebeurt enerzijds manueel in een telkamer en anderzijds op de Sysmex XE-5000 (body fluid mode). Ook spectrofotometrie wordt uitgevoerd. Hierbij wordt rekening gehouden met de tijd tussen ictus en LP (Figuur 13). Nadien worden de gegevens gecorreleerd met de beeldvorming en klinische data (opvolging patiënt).



Figuur 13: protocol geautomatiseerde RBC telling in CSV als predictor voor SAB

Op dit ogenblik is het aantal stalen in de verschillende groepen nog te laag om reeds echte conclusies uit te trekken. Enkele preliminaire data worden hieronder voorgesteld.

RBC tellingen bij voor SAB verdachte patiënten

Punctie	Macr.	Tijd na ictus	Spectrofotometrie	RBC/ μ L (micr.)	RBC/ μ L (XE-5000)	SAB
TRAUMATISCH	HELDER	9,5	GEEN EVIDENTIE VOOR SAB	0		N
NORMAAL	HELDER	22	GEEN EVIDENTIE VOOR SAB	0	100	N
TRAUMATISCH	HELDER	24	GEEN EVIDENTIE VOOR SAB	0	0	N
TRAUMATISCH	HELDER	6	GEEN EVIDENTIE VOOR SAB	120	200	N
N/A	HELDER	N/A	GEEN EVIDENTIE VOOR SAB	70	0	N

Tabel 5: Overzicht van voor SAB verdachte patiënten. Punctie: een punctie wordt als traumatisch beschouwd als dit zo in het dossier terug te vinden is. Macr.: het macroscopische uitzicht van het CSV, beoordeeld door een MLT in het laboratorium. Tijd na ictus: op basis van het medisch dossier. Xanthochromie: spectrofotometrische analyse van het supernatans van het gecentrifugeerde CSV. RBC tellingen: microscopisch aan de hand van een Bürker telkamer en aan de hand van de Sysmex XE-5000 in body fluid mode (research parameter voor de RBC aantallen). SAB: diagnose van SAB, op basis van het medisch dossier.

RBC tellingen bij controlestalen

AFDELING	STAAL MACROSCOPISCH	MAN. AANTAL RBC	BF. AANTAL RBC
510	roze	1380	1300
514	helder	350	700
630	helder	270	300
417	helder	0	0
452	helder	10	0
510	troebel	10	400
321	geel	250	300
442	helder	0	0
410	helder	30	0
410	helder	0	0
514	helder, licht oranje	4140	3300

Tabel 6: Controlestalen met RBC telling. Man.: manuele telling, Bf.: telling via body fluid mode op de Sysmex XE-5000.

To do/ACTIONS

- 1) 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.
- 2) Evalueren correlatie manuele telling en telling via Sysmex XE-5000 via de body fluid mode.
- 3) Bepalen van een cutoff voor RBC aantal waarbij SAB veilig kan worden uitgesloten (hoge NPV).

Box 2. The Ottawa SAH Rule

For alert patients older than 15 y with new severe nontraumatic headache reaching maximum intensity within 1 h

Not for patients with new neurologic deficits, previous aneurysms, SAH, brain tumors, or history of recurrent headaches (≥ 3 episodes over the course of ≥ 6 mo)

Investigate if ≥ 1 high-risk variables present:

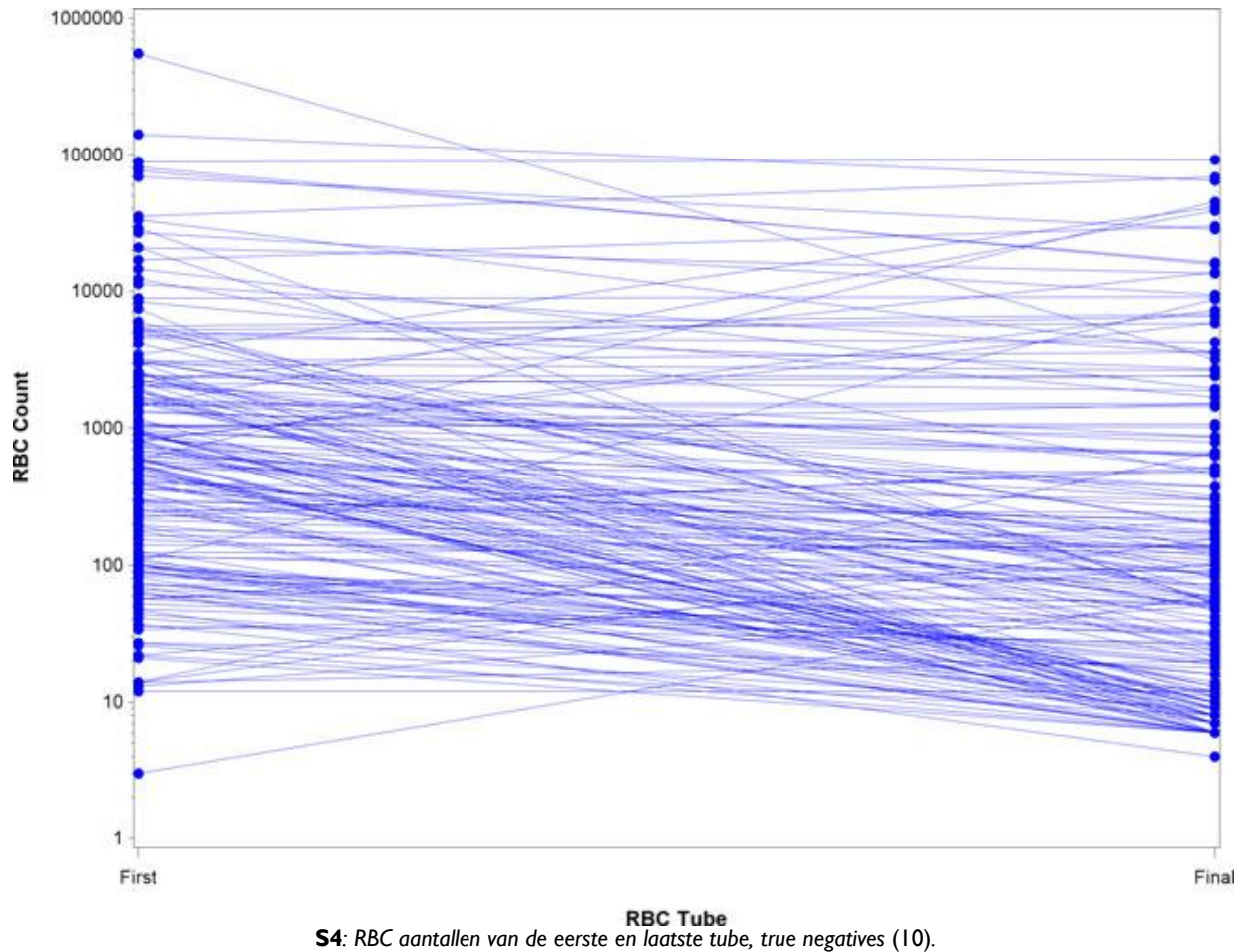
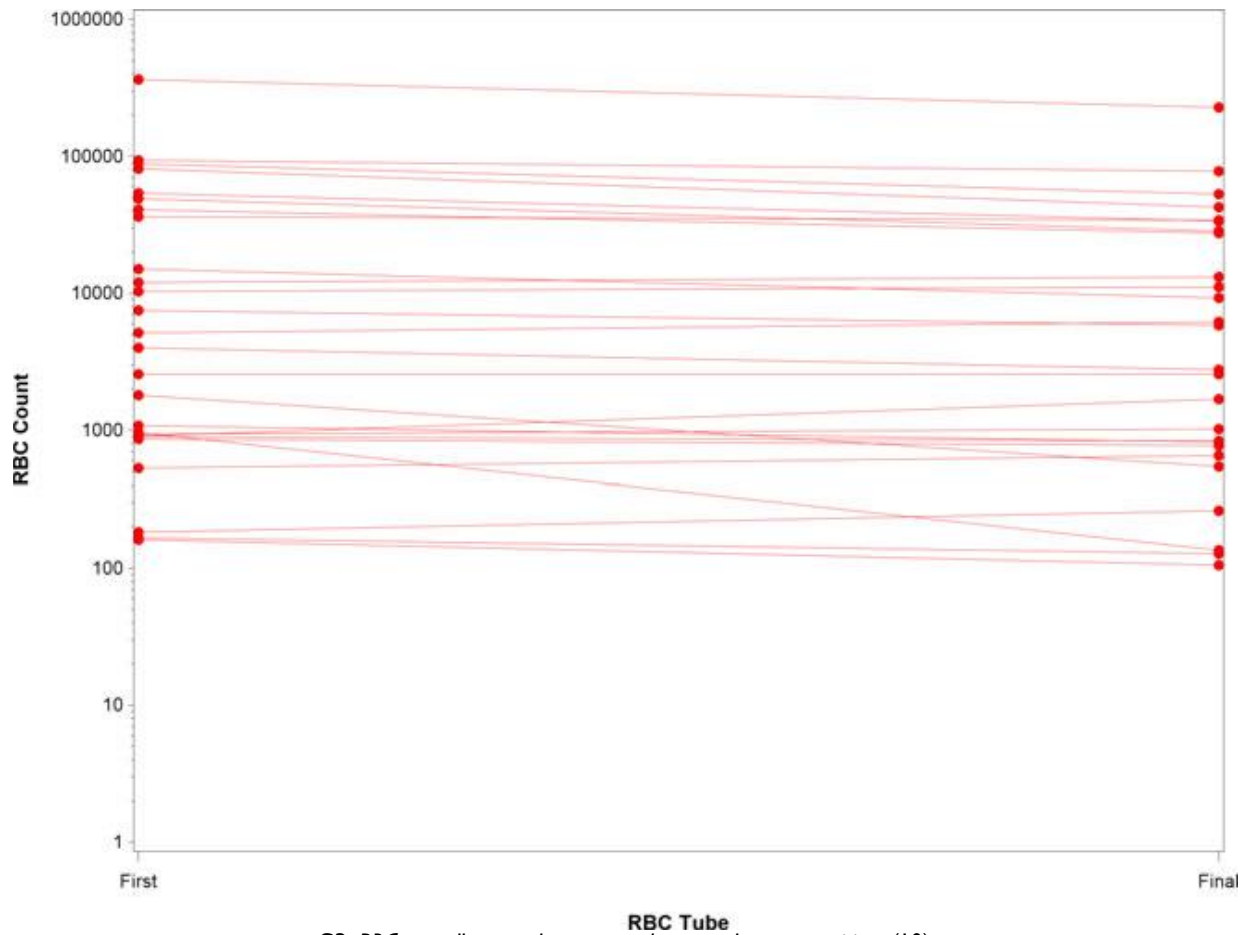
1. Age ≥ 40 y
2. Neck pain or stiffness
3. Witnessed loss of consciousness
4. Onset during exertion
5. Thunderclap headache (instantly peaking pain)
6. Limited neck flexion on examination

SAH indicates subarachnoid hemorrhage.

SI: Ottawa SAH Rule (5).

Biomarker method	Time since ictus	Sensitivity, %	Specificity, %	Reference
CT	<6 h	98–100	100	[10, 11]
CT	>6 h	86–93	100	[11, 12]
CT	>1 week	50	High, but accurate numbers are missing	[13]
Visual inspection for xanthochromia	>12 h	27–47	98	[14, 15]
Red blood cell count	Early in the progress or due to a traumatic tap	High, but accurate numbers are missing	Low, due to high false-positive rate	
Oxyhaemoglobin, spectrophotometry	Not specified	84	42	[16]
Bilirubin, spectrophotometry	Not specified	83–100	75–88	[16, 17]
Methaemoglobin, spectrophotometry	Not specified	66	79	[16]
Ferritin >15 ng/mL	Not specified	95	95	[18]
Siderophages	>24 h	High, but accurate numbers are missing	High, but accurate numbers are missing	[19]

S2: Sensitiviteit en specificiteit voor verschillende onderzoeken in het kader dan SAB diagnostiek (4).



A. Studies with patients selected according to clinical suspicion for subarachnoid hemorrhage, sorted by the diagnostic odds ratio.

Study	Design, Patient Selection	Index Test	Sample Size	% LP >12 h From Headache Onset	Criteria for Positive Aneurysmal SAH	Criteria for Negative Aneurysmal SAH if Angio Not Performed	Number Angio	Number Followed Up if No Angio	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Diagnostic Odds Ratio (95% CI)	Prevalence, %
Chao, 2007 ³⁹	R, Pt	S	193	89%	Angio (CTA, DSA) +ve	Follow-up	9	162	8	1	1	183	0.89 (0.52–1.00)	0.99 (0.97–1.00)	1,464 (84–25,584)	4.7
Alons, 2013 ⁴³	R, Pt	S	117	100%	Angio (CTA, DSA) +ve	Follow-up	Unclear	Unclear	5	1	0	111	1.00 (0.48–1.00)	0.99 (0.95–1.00)	818 (30–22,462)	4.3
Dupont, 2008 ³⁸	R, Pt	V	117	1 h–10 days d	Angio (CTA, DSA) +ve	Follow-up	18	99	13	5	1	98	0.93 (0.66–1.00)	0.95 (0.89–0.98)	255 (28–2,354)	12.0
Gunawardena, 2004 ⁴²	R, Pt	S	463	100%	Angio (MRA, CA) +ve	Follow-up	77	Not reported	7	27	0	429	1.00 (0.59–1.00)	0.94 (0.92–0.96)	234 (13–4,209)	1.5
Morgenstern, 1998 ⁴⁵	P, Pt	V	79	76%	Angio +ve	Follow-up	2	18	1	1	0	77	1.00 (0.03–1.00)	0.99 (0.93–1.00)	155 (4–5,590)	1.3
Perry, 2006 ³⁴	P, Pt	S	220	55%	Angio (CTA, MRA, CA) +ve AND (RBC>5x10 ⁹ /L OR Visual +ve)	Follow-up	13	216	1	7	1	211	0.50 (0.01–0.99)	0.97 (0.93–0.99)	30 (1.7–532)	0.9
Wood, 2005 ¹⁸	R, Pt	S	240	?	Angio +ve AND Blood staining AND Visual +ve	Follow-up	29	Not reported	2	59	0	179	1.00 (0.16–1.0)	0.75 (0.69–0.81)	15 (0.7–319)	0.9
O'Connell, 2003 ⁴⁴	R, Pt	S	24	100%	Angio +ve	N/A	24	N/A	5	3	2	14	0.71 (0.29–0.96)	0.82 (0.57–0.96)	12 (1.5–92)	29
Foot, 2001 ⁴⁶	R, Pt	S	196	?	Angio (MRA, CA) +ve	Follow-up	26	52	2	61	1	132	0.67 (0.09–0.99)	0.68 (0.61–0.75)	4.3 (0.4–29)	1.5
Page, 1994 ⁴¹	R, Pt	V	23	?	Angio +ve	Not reported	11	Not reported	0	5	1	17	0 (0.00–0.97)	0.77 (0.55–0.92)	1.1 (0.04–532)	4.4
		S	23						0	8	1	14	0 (0.00–0.98)	0.64 (0.41–0.83)	0.6 (0.02–16)	

B. Studies with patients selected according to target condition or results of index test, or had no target event, or had unclear index test results (see text).

Study	Design, Patient Selection	Index Test	Sample Size	% LP >12 h From Headache Onset	Criteria for Positive Aneurysmal SAH	Criteria for Negative Aneurysmal SAH if Angio Not Performed	Number Angio	Number Followed Up if No Angio	True Positive	False Positive	False Negative	True Negative
Arora, 2010 ²⁷	R, T	V	19	100%	Angio (CTA, MRA) +ve	N/A	19	N/A	9	— [†]	10	—
Chalouhi, 2013 ³¹	R, I	V	35	>25%	Angio (MRA, CA, DSA) +ve	N/A	35	N/A	12 [‡]	14 [‡]	4	5
Cruckshank, 2005 ²⁸	R, T / I	V	2	?	Angio +ve	N/A	2	N/A	—	—	—	2
Ditta, 2013 ³⁰	R, Pt	S	156	?	Angio (CTA, MRA) +ve	Not reported	88	Not reported	716 ^{***}	779	70	761
Horstman, 2012 ²⁸	R, I	S	30	?	Angio (CTA, MRA, CA) +ve	N/A	30	N/A	13	17	—	—
MacDonald, 1988 ²⁶	R, T	V	16	?	Angio +ve	N/A	16	N/A	7	—	8	—
Muhammed, 2010 ³⁶	R, Pt	S	36	?	Angio +ve	Follow-up	0	36	0	0	0	36
O'Neill, 2005 ³⁴	R, Pt	?	30	?	Angio +ve	Not reported	6	Not reported	2	4	0	24
van der Wee, 1995 ³²	R, Pt	S	58	100%	Angio +ve	Not reported	2	Not reported	2	—	—	—
Vermeulen, 1989 ³³	R, I	S	12	100%	Angio +ve	Follow-up	3	9	—	—	—	12
Wallace, 2013 ³⁰	R, I	V	48	?	Angio (CA) +ve	N/A	48	—	2 ^{††}	22 ^{††}	1	23
Webb, 2003 ³⁷	R, Pt	V	52	1–21 days	Angio (CA) +ve	Not reported	16	Not reported	0	0	0	52

LP, Lumbar puncture; Angio, angiography; R, retrospective; Pt, patient suspected of SAH; S, spectrophotometry; CTA, CT angiogram; DSA, digital subtraction angiography; +ve, positive; V, visual inspection; CA, catheter angiography; MRA, magnetic resonance angiogram; P, prospective; T, target condition; I, index test result.

[†]The sensitivity and specificity were based on the UKNEQAS guidelines (see text) when greater than 1 spectrophotometry method was investigated in these studies.

^{**}Angiography detected 5 aneurysms in 66 patients with nondiagnostic LPs (30 inconclusive, 22 poor, 14 not conducted as per study authors), which were considered positive for this table.

[†]— Indicates that the numbers were not reported in the study.

^{††}Thirty-five patients selected according to visual xanthochromia or diluting RBC count; 26 had xanthochromia.

[‡]Forty-eight patients selected according to angiography for visual xanthochromia or erythrocytosis; 24 had xanthochromia.

S5: Overzicht van geïncludeerde studies (16).

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.

S6: Subgroep analyses van gepoolde sensitiviteit en specificiteit (16).