

## **CAT** **Critically Appraised Topic**

### **Titel: Evaluatie van een screeningsalgoritme en validatie van de Hb NEXT™ Thalassemiemodus voor hemoglobinopathieën**

Author: Magalie Van Vlierberghe  
Supervisor: dr. Simon Degandt  
Date: 13/05/2025

#### **Clinical bottom line**

In deze *Critically Appraised Topic* werd een nieuwe screeningsstrategie voor de detectie van hemoglobinopathieën ontwikkeld en geëvalueerd binnen het laboratorium van AZ Sint-Lucas.

In het eerste luik werd een screeningsstrategie opgezet om relevante patiënten te identificeren voor verdere analyse met Hb NEXT™ in Thalassemiemodus. Vier complementaire screeningsroutes werden gecombineerd: RBC index formule, RWO vlag van Sysmex, HbA1c vlag van Hb NEXT™ en de aanvraag door een behandelend arts. Voor de selectie van de RBC index formule werd met een literatuurstudie gezocht naar een bestaande screeningstool die maximale detectie mogelijk maakt. Er werd gekozen voor de formule van Urrechaga E. (2008) [1]  $\%MicroRBC / \%HypoHe$  met cut-off 3,7 en de formule van Urrechaga E. et al. (2011) [2]  $\%MicroRBC - \%HypoHe - RDWcv$  met cut-off van -7,6.

De voorgestelde screeningsstrategie werd beoordeeld op effectiviteit in patiëntselectie. De evaluatie beoogde daarnaast te bepalen in welke mate de nieuwe strategie zijn doel bereikt en of implementatie in de routinepraktijk haalbaar is. Er werd besloten enkel de RWO vlag van de Sysmex-analyser en de HbA1c vlag van het Hb NEXT™ toestel te includeren. Omwille van beperkte meerwaarde werden andere screeningsroutes niet weerhouden. De overblijvende screeningsstrategie blijkt haalbaar en efficiënt voor implementatie in de routinepraktijk.

Het tweede luik betrof de analytische validatie van de Thalassemiemodus op het Hb NEXT™ toestel. De interne uitwerking van hemoglobinopathieën op deze modus biedt het laboratorium meer inzicht in de detectie en interpretatie van hemoglobinevarianten, met het oog op gerichte klinische samenwerking. Het toestel werd beoordeeld op juistheid, precisie en nauwkeurigheid in het opsporen en kwantificeren van hemoglobinopathieën. Belangrijk is dat het Hb NEXT™ toestel enkel een indicatie van een hemoglobinopathie kan geven; bevestiging via aanvullende diagnostische testen blijft noodzakelijk.

## Clinical/Diagnostic scenario

Hemoglobine is het belangrijkste eiwit voor zuurstoftransport in het menselijk lichaam en de voornaamste component van rode bloedcellen. Er worden drie hoofdtypen onderscheiden: hemoglobine A (twee  $\alpha$ - en twee  $\beta$ -globineketens), hemoglobine F (twee  $\alpha$ - en twee  $\gamma$ -globineketens) en hemoglobine A<sub>2</sub> (twee  $\alpha$ - en twee  $\delta$ -globineketens) [3]. Bij de gezonde volwassen populatie komen deze drie hoofdtypen in volgende verhoudingen voor: HbA 95-98%, HbA<sub>2</sub> 2-3.5%, HbF <2% [4].

Hemoglobinopathieën kunnen zich manifesteren door de synthese van een structureel abnormaal hemoglobine en/of een verstoorde balans van  $\alpha$ - en  $\beta$ -globineproductie [3]. De klinische presentatie varieert en kan op kinderleeftijd, in de adolescentie of op volwassen leeftijd starten. Symptomen omvatten, afhankelijk van het type hemoglobinopathie, anemie (vermoeidheid, dyspneu, tachycardie, hypotensie, cyanose), hemolyse (hematurie, bilirubinegalstenen, icterus) en sikkelcel complicaties, die ernstige morbiditeit en mortaliteit kunnen meedragen. Klinische manifestaties worden voornamelijk gezien bij homozygote of compound heterozygote patiënten, maar kunnen ook optreden bij bepaalde heterozygote dragers [4]. Een tijdige en accurate detectie is dus essentieel voor een goede behandeling en patiëntenzorg.

Over een periode van 10 jaar, tussen 2015 en 2025, werden in AZ Sint-Lucas 122 diagnoses van hemoglobinopathieën gesteld via high-performance liquid chromatography (HPLC) of elektroforesetechnieken. Een overzicht van deze diagnoses wordt weergegeven in bijlage I en toont een duidelijke dominantie in  $\beta$ -thalassemie en heterozygote hemoglobinopathie, type HbA/S. Tot op heden worden stalen van patiënten die in aanmerking komen voor een hemoglobinopathiescreening opgestuurd naar een extern laboratorium. Daar worden de stalen geanalyseerd via HPLC (vóór 05/2024 via hemoglobine-elektroforese) en de geïnterpreteerde resultaten worden aan de klinisch biologen van AZ Sint-Lucas bezorgd. De staalselectie gebeurt op basis van aanvragen van een behandelende arts. Het Hb NEXT™-toestel dat ondertussen ruim een jaar wordt gebruikt in AZ Sint-Lucas kan met behulp van *reversed-phase* kationenuitwisselings-HPLC bediend worden in twee analysemodi: 1) Variantmodus om HbA<sub>1c</sub> te meten en 2) Thalassemiemodus voor de screening van hemoglobinopathieën. De variantmodus wordt reeds langer in de routine gebruikt voor de opvolging van patiënten met diabetes. Deze modus meet kwantitatief HbA<sub>1c</sub> en detecteert hemoglobinevarianten (HbE, HbD, HbC, HbS). Wanneer het Hb NEXT™-afvlaggingssysteem een hemoglobinevariant detecteerde, wordt dit gemeld aan een klinisch bioloog. Wanneer de patiënt niet bekend is met een hemoglobinopathie, wordt het staal in overleg met de behandelende arts doorgestuurd voor verdere analyse.

In deze CAT werd de bovenstaande workflow voor hemoglobinopathieën herzien en werd een nieuwe strategie uitgebouwd. Met de nieuwe screeningsstrategie tracht men maximaal patiënten te identificeren die in aanmerking komen voor een screening en vervolgens de staalanalyse zo veel mogelijk intern te verwerken en interpreteren. In dit kader werd een literatuurstudie uitgevoerd naar geschikte screeningstools en werd het beschikbare 'Hb NEXT™'-toestel van Menarini Diagnostics gevalideerd in de Thalassemiemodus. De aangepaste screeningsstrategie werd geëvalueerd op effectiviteit in patiëntdetectie en op nauwkeurigheid van identificatie en kwantificatie van hemoglobinevarianten. Deze CAT focust op hemoglobinopathieën die met de gebruikelijke hemoglobineanalysestechnieken kunnen geïdentificeerd worden.

## Question(s)

- *Vraag 1: Uitbouw van een routinematige screeningsstrategie voor hemoglobinopathieën.*
- *Vraag 2: Validatie van de Thalassemiemodus van Hb NEXT™ en evaluatie van het toestel binnen de context van de nieuw uitgerolde screeningsstrategie.*

## Search terms

- MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Diagnosis of hemoglobinopathy”, “Diagnosis of thalassemias” “HPLC hemoglobin A2”, “stability hemoglobin A2”, “recommendations hemoglobinopathy screening”, “RBC indices screening hemoglobinopathy”, “preanalytical stability hemoglobin variants”
- PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<https://sumsearch.org/>), The National Institute for Clinical Excellence (<https://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<https://www.cochranelibrary.com/>)
- International organizations: e.g. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), American Diabetes Association (ADA)
- UpToDate Online

## Appraisal

### I. Hemoglobinopathie

#### I.1 Etiologie

Hemoglobinopathieën zijn een groep erfelijk recessieve aandoeningen met ongeveer 7% dragerschap wereldwijd [5], [6]. Ze vormen de meest voorkomende genetische aandoeningen en zijn de eerste genetische ziekten die op moleculair niveau werden gekarakteriseerd [7]. Hemoglobine bestaat uit vier globineketens die twee aan twee identiek zijn. Hemoglobinopathieën ontstaan vanuit mutaties of deleties in een van de sequenties van de globinegenen, of in andere geconserveerde sequenties die een invloed hebben op gentranscriptie, translatie initiatie of terminatie, mRNA stabiliteit, ... [3]. Dit leidt tot een abnormale productie of structuur van het hemoglobine molecule [5]. Deze afwijking kan zich homozygoot, heterozygoot of compound heterozygoot manifesteren. Bij homozygote hemoglobinopathieën zijn er twee identieke mutaties of afwijkingen in hetzelfde gen, één van elke ouder. Dit gaat vaak gepaard met ernstige symptomen die zich meestal reeds in de kindertijd voordoen. Compound heterozygote hemoglobinopathieën kennen twee verschillende mutaties in hetzelfde gen, één van elke ouder. In sikkelcel- $\beta$ -thalassemie (HbS $\beta$ -thalassemie) bijvoorbeeld geeft één ouder een mutatie voor hemoglobine S door en de andere een mutatie voor  $\beta$ -thalassemie. Symptomen kunnen mild tot ernstig zijn, afhankelijk van de specifieke mutaties. Tot slot wordt er bij heterozygote hemoglobinopathieën één normaal gen en één gemuteerd gen overgeërfd. Heterozygoten zijn vaak dragers en hebben geen ernstige klinische ziekte [4].

Wanneer er een abnormaal hemoglobine wordt gesynthetiseerd door een wijziging in de globineketen, spreekt men van een hemoglobinevariant [3]. Van een thalassemie is sprake bij een gereduceerde of afwezige synthese van een globineketen met een verstoorde balans van  $\alpha$ - en  $\beta$ -globineketens tot gevolg [3]. Thalassemieën en abnormale hemoglobinevarianten interageren ook onderling zodat ze een brede waaier aan aandoeningen veroorzaken met verschillende klinische ernst [8].

#### I.2 Thalassemie

Thalassemieën vormen een groep recessieve overerfbare bloedziekten. Door hun recessief karakter zijn de klinisch relevante fenotypes deze die afkomstig zijn van homozygotie of compound heterozygotie voor verschillende globinegeneffecten [9]. Afhankelijk van de getroffen globineketen onderscheidt men  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\delta\beta$ - of  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassemie. De twee klinisch meest relevante vormen zijn  $\alpha$ - en  $\beta$ -thalassemie, die de productie van respectievelijk de  $\alpha$ - en  $\beta$ -polypeptideketens van volwassen Hb A verstoren [10]. Door de verstoorde synthese ontstaat er een abnormale  $\alpha$ -/ $\beta$ -globineketenratio waarbij de ongepaarde ketens precipiteren. Dit leidt tot afbraak van RBC precursoren in het beenmerg (ineffectieve erythropoïese) en afbraak van RBC in de circulatie (hemolyse). De kliniek varieert van asymptomatisch dragerschap tot ernstige anemie met extramedullaire hematopoïese die op zijn beurt aanleiding geeft tot skeletwijzigingen, verstoorde groei en ijzeroverlading [11].

### 1.2.1 $\alpha$ -Thalassemie

**$\alpha$ -Thalassemie** ontstaat door deleties of mutaties in een of meerdere genen die coderen voor  $\alpha$ -globine. Waar er normaal vier kopieën zijn van het  $\alpha$ -globinegen, verschilt de ernst van de kliniek afhankelijk van het aantal genen dat afwezig of inactief is [12].

#### Symptomatisch

- Hydrops foetalis (Hb Barts,  $--/--$ ): vorming van  $\gamma$ -keten tetrameer zonder functionele  $\alpha$ -globineketens leidend tot hydrops foetalis met uiteindelijk mors in utero [3], [11].
- Hemoglobine H ziekte ( $--/\alpha$ ):  $\beta$ -ketens vormen samen het onstabiel tetrameer HbH leidend tot matig ernstige microcytaire hypochrome anemie met splenomegalie. Het genotype van HbH ziekte kan deletioneel ( $--/\alpha$ ) of niet-deletioneel ( $--/\alpha\alpha^t$ , t staat voor een mutante  $\alpha$ -keten) zijn. Deze entiteit valt onder thalassemie intermedia [3], [11].

#### Asymptomatisch (dragerschap)

- $\alpha$ -Thalassemie minor ( $\alpha\alpha/--$  heterozygoot of  $\alpha/\alpha-$  homozygoot): verlies van twee  $\alpha$ -ketengenen leidend tot een milde hypochrome, microcytaire anemie [11].
- $\alpha$ -Thalassemie minima ( $\alpha\alpha/\alpha-$ ): verlies van één enkel  $\alpha$ -ketengenen leidend tot asymptomatisch dragerschap zonder afwijkende laboratoriumresultaten [11].

### 1.2.2 $\beta$ -Thalassemie

**$\beta$ -Thalassemie** is het gevolg van een puntmutatie (of deletie) in het  $\beta$ -globinegen waarvan ondertussen meer dan 200 gekend zijn [13]. De ernst van  $\beta$ -thalassemie wordt bepaald door het aantal  $\beta$ -ketens dat aangetast is en of de variant(en) de  $\beta$ -globineketen productie reduceert ( $\beta^+$ ) of volledig afwezig maakt ( $\beta^0$ ). Individuen met  $\beta^0$  zijn homozygoot of compound heterozygoot voor  $\beta$ -globinegenvarianten [4].

Waar men vroeger voornamelijk sprak van  $\beta$ -thalassemie major, intermedia en minor (classificatie, gebaseerd op het genotype) is er nu een shift naar het gebruik van een fenotypische classificatie van thalassemieën voor klinische management doeleinden: niet-transfusie-afhankelijke thalassemie (non-transfusion-dependent thalassemia, NTDT) en transfusie-afhankelijke thalassemie (transfusion-dependent thalassemia, TDT) [10]. Er moet echter worden opgemerkt dat TDT en NTDT dynamische categorieën zijn, gebaseerd op klinische parameters, variaties en ontwikkelingen in het klinische management, evenals andere invloeden op de ziekte, die een patiënt gedurende zijn leven van de ene groep naar de andere kunnen verplaatsen. De TDT- en NTDT-classificatie is dus eerder een 'huidige' klinische status van patiënten, ermee rekening houdend dat de twee onderling uitwisselbaar zijn [14].

#### Transfusie-afhankelijke thalassemie (TDT)

Binnen deze classificatie is er levenslang regelmatig transfusie nodig om te overleven [10].

- $\beta$ -Thalassemie major ( $\beta^0/\beta^0$  of  $\beta^0/\beta^+$ ) kan het resultaat zijn van het overerven van twee gemuteerde  $\beta$ -globinegenen (homozygoot) of van twee verschillende mutaties, waarbij elk de  $\beta$ -globinesynthese beïnvloedt (compound heterozygoot). Bij homozygote  $\beta$ -thalassemie leidt het overschot aan ongepaarde  $\alpha$ -globineketens tot precipitatie in erythroblasten en in mature rode bloedcellen leidend tot erythropoëtische inefficiëntie en hemolyse. De verhoogde productie van  $\gamma$ -ketens helpt om de overmaat aan  $\alpha$ -ketens te neutraliseren en zo de kliniek te verbeteren. Dit verklaart de typisch simultaan verhoogde HbA<sub>2</sub>-waarden bij hemoglobine-analyse. De klinische manifestaties van  $\beta$ -thalassemie major zijn variabel en ontstaan voornamelijk door drie onderliggende mechanismen: ineffektieve erythropoïese, chronische hemolytische anemie en ijzerstapeling [3], [15]. Ineffektieve erythropoïese en chronische hemolytische anemie veroorzaken ernstige anemie vanaf 3-6 maanden na de geboorte, hepatosplenomegalie, extramedullaire hemopoïese en skeletafwijkingen (zoals het typisch thalassemisch gezicht). Ijzerstapeling veroorzaakt lever- en endocriene orgaanschade met als gevolg groei- en puberteitsproblematiek, diabetes mellitus, hypothyroidisme en hypoparathyroidisme, schade aan het hart, toename in infectieproblematiek en osteoporose [3], [15].

- Sommige gevallen van  $\beta$ -thalassemie intermedia en compound heterozygositeit voor HbE.  
(Zie onder voor de klinische informatie)

#### Niet-transfusie-afhankelijke thalassemie (NTDT)

Er is geen nood aan levenslange regelmatige transfusies voor de overleving, hoewel de patiënten binnen deze groep in bepaalde klinische settings gedurende bepaalde tijdsperioden incidenteel of zelfs frequent transfusies kunnen nodig hebben.

- $\beta$ -Thalassemie minor ( $\beta^0/\beta$  of  $\beta^+/ \beta$ ) leidt meestal tot asymptomatisch dragerschap.
- $\beta$ -Thalassemie intermedia is een matig ernstig klinisch syndroom waarbij patiënten typisch op latere leeftijd presenteren met hetzelfde, maar milder klinisch beeld dan  $\beta$ -thalassemie major [9]. Het wordt veroorzaakt door milde  $\beta$ -globinemutaties of bijkomende genetische factoren die  $\gamma$ -globine-expressie verhogen [15]:
  - 1)  $\beta$ -globinegen mutatie leidend tot een milde reductie van de globineketen
  - 2) Gelijktijdige overerving van  $\alpha$ -thalassemie en  $\beta$ -thalassemie major, wat de ernst van  $\beta$ -thalassemie major verzacht door verminderde  $\alpha$ - en  $\beta$ -keten disbalans
  - 3) Gelijktijdige overerving van gendefecten die een toegenomen  $\gamma$ -globineketenproductie veroorzaken en zo de kliniek van  $\beta$ -thalassemie major verzachten
  - 4) Heterozygositeit voor  $\beta$ -thalassemie in combinatie met de aanwezigheid van drie of vier  $\alpha$ -globinegen kopieën, of compound heterozygositeit voor  $\beta$ - of  $\delta/\beta$ -thalassemie

Patiënten met  $\beta$ -thalassemie intermedia presenteren typisch met milde anemie klachten tot ernstigere klachten met complicaties zoals botafwijkingen, hepatosplenomegalie, extramedullaire erythropoïese en karakteristieken van ijzerstapeling door een verhoogde ijzerabsorptie [3], [15]. De differentiaaldiagnose tussen  $\beta$ -thalassemie major en intermedia is belangrijk aangezien ze een verschillende klinisch aanpak vergen [15].

--/-- notatie van het genotype

#### 1.2.3 Behandeling

Voor patiënten met thalassemie geldt algemeen dat een adequate patiëntencounseling essentieel is om patiënten te informeren over risicofactoren en het belang van preventieve maatregelen.

Het doel van de behandeling is het bieden van uitgebreide hematologische zorg en regelmatige follow-up gedurende alle levensfasen. Foliumzuursuppletie wordt aanbevolen om de verhoogde erythropoëse te ondersteunen. Bloedtransfusies kunnen nodig zijn bij acute exacerbaties van anemie, bijvoorbeeld tijdens infecties of inflammatoire episodes. Symptoomgerichte behandelingsopties omvatten onder andere ijzerchelatie bij secundaire ijzerstapeling, cholecystectomie bij symptomatische galstenen, splenectomie bij ernstig hypersplenisme en in geselecteerde gevallen hematopoëtische stamceltransplantatie [3], [12]. De frequentie en transfusienood vormen indirect een indicatie van de ernst van de ziekte [9].

#### 1.2.4 Diagnose

De diagnose van thalassemie begint met een grondige anamnese en klinische onderzoek, gevolgd door hematologisch laboratoriumonderzoek en geconfirmeerd met geavanceerde hemoglobineanalyse en/of genetische diagnostiek [11].

##### 1) Anamnese en klinisch onderzoek

**De familiale en etnische achtergrond** helpt bij het bepalen van het type en de ernst van de thalassemie. Een voorgeschiedenis van anemie kan wijzen op een onderliggende aandoening. Een negatieve familiale anamnese sluit thalassemie niet per se uit aangezien beide ouders asymptomatische dragers kunnen zijn.

**De leeftijd van presentatie** geeft vaak al veel informatie over de ernst van de thalassemie. Symptomatologie van voor of bij de geboorte is suggestief voor thalassemie major. Een kliniek

optredend in de kindertijd (6-12 maanden) is suggestief voor een transfusie-afhankelijke thalassemie. Op latere leeftijd verwachten we eerder een mildere vorm.

**De aard van de symptomen** geeft informatie over onderliggende mechanismen. Galstenen, geelzucht, donkere urine en splenomegalie wijzen op onderliggende chronische, significante hemolyse. Groei of skeletafwijkingen wijzen op significante extramedullaire hematopoïese.

Als op basis van bovenstaande elementen een thalassemie waarschijnlijk is, is bijkomend algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek aangewezen. Indien zeer sterk suggestief kan meteen een hemoglobineanalyse en/of genetische diagnostiek uitgevoerd worden voor een confirmatie van de diagnose [9], [11].

## 2) Algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek

Het bloedbeeld van thalassemiepatiënten vertoont karakteristieke afwijkingen, die belangrijke zijn voor de herkenning van dragerschap en de diagnose van ernstige vormen. Binnen het hematologisch laboratoriumonderzoek zijn vooral de RBC indices (MCV, MCH, RBC) en de RBC morfologie (anisopoikilocytose) van belang. Over het algemeen hebben alle thalassemiesyndromen een microcytaire hypochrome anemie met een toegenomen RBC telling. Bij asymptomatische dragers hebben de RBC indices eerder laagnormale waarden. De meest gebruikte grenswaarden van MCV en MCH voor het aangeven van thalassemie zijn respectievelijk 79 fl en 27 pg [9]. Voor pasgeborenen of zuigelingen <6 maanden oud met een vermoeden van thalassemie op basis van de RBC indices, is  $\alpha$ -thalassemie de meest waarschijnlijke diagnose aangezien  $\beta$ -globine dan nog niet wordt geproduceerd [11]. Bij diagnose van thalassemie is controle van de ijzerstatus belangrijk, aangezien ijzerdeficiëntie microcytose en anemie kan veroorzaken. Ferritine en transferrineverzadiging worden gebruikt om ijzertekort uit te sluiten. Wanneer er een ijzerdeficiëntie is moet een definitieve diagnose van thalassemie uitgesteld worden tot na normalisatie van de ijzerwaarden [9].

| Thalassemie                                      | Kenmerken volledig bloedbeeld                                                                              |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HbH ziekte</b>                                | ↓/nl MCV, MCH<br>↓ Hb<br>Hemolyse, NRBC<br>Poikilocytose (traancellen, schietschijfcellen, fragmentocyten) |
| <b><math>\alpha</math>-thalassemie minor</b>     | ↓ MCV en/of MCH<br>↓/nl Hb<br>↑/nl RBC                                                                     |
| <b><math>\alpha</math>-thalassemie minima</b>    | ↓/nl MCV, MCH, Hb, RBC                                                                                     |
| <b><math>\beta</math>-thalassemie major</b>      | ↓ MCV, MCH, Hb<br>↑ RBC<br>Poikilocytose (traancellen, schietschijfcellen, fragmentocyten)<br>NRBC         |
| <b><math>\beta</math>-thalassemie intermedia</b> | ↓ MCV en/ MCH<br>↓ Hb<br>↑/nl RBC                                                                          |
| <b><math>\beta</math>-thalassemie minor</b>      | ↓ MCV en/of MCH<br>↓/nl Hb<br>↑/nl RBC                                                                     |

Tabel 1: Algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek bij thalassemie [9], [11], [16]

Symptomatische thalassemie veroorzaakt niet-immune hemolyse wat aanleiding geeft tot een verhoogd LDH en indirect bilirubine, een verlaagd haptoglobine en een negatieve Coombs test op het volledig bloedbeeld [3].

### 3) Geavanceerde hemoglobineanalyse en/of genetisch onderzoek

Bij  $\alpha$ -thalassemie is HbA<sub>2</sub> lager dan normaal zodat deze als een sterk indicatieve parameter gebruikt wordt [9]. Bevestiging van de diagnose met DNA-analyse is wel noodzakelijk voor  $\alpha$ -thalassemie minor en minima (behalve in de neonatale periode) en is meestal nodig voor de confirmatie van de diagnose van HbH ziekte [3], [9]. In een neonaat kan hemoglobineanalyse HbBarts en/of HbH aantonen [11]. Toch wordt DNA-analyse sowieso over het algemeen aangeraden bij  $\alpha$ -thalassemie om niet-deletionale mutaties, die een ernstiger ziekteverloop kennen, uit te sluiten [12].

$\beta$ -Thalassemie is gekenmerkt door toegenomen HbA<sub>2</sub> en HbF fracties op hemoglobineanalyse vanaf zes maanden (HbA<sub>2</sub> is gevoeliger dan HbF om een dragerschap van  $\beta$ -thalassemie op te sporen). Het objectiveren hiervan is voldoende voor de diagnose van  $\beta$ -thalassemie major en minor. DNA-analyse kan wel gebruikt worden voor de identificatie van het defect op elk allel [3]. Bevestiging van de diagnose met DNA-analyse is noodzakelijk bij patiënten met borderline HbA<sub>2</sub> levels in combinatie met gedaalde MCV en MCH. Dit komt voor bij patiënten met  $\beta$ -thalassemie intermedia (bv. heterozygotisme voor milde of zeer milde  $\beta$ -mutaties, dubbel heterozygotisme voor  $\delta\beta$ -thalassemie,  $\delta\beta\gamma$ -thalassemie of bij gelijktijdig overerven van  $\alpha$ -thalassemie) [8], [9].

| Thalassemie                     | Hemoglobineanalyse                                       |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| HbH ziekte                      | HbA <sub>2</sub> ↓ (<3,5-4%)<br>HbH (5-30%)              |
| $\alpha$ -thalassemie minor     | HbF nl<br>HbA <sub>2</sub> ↓/nl (3-3,5%)                 |
| $\alpha$ -thalassemie minima    | HbF nl<br>HbA <sub>2</sub> ↓/↓nl (1,5-2,5%)              |
| $\beta$ -thalassemie major      | HbF ↑ (tot 95%)<br>HbA <sub>2</sub> ↑ (tot 5%)<br>HbA ↓↓ |
| $\beta$ -thalassemie minor      | HbF ↑ (0,1-5%)<br>HbA <sub>2</sub> ↑ (3,5-4%)            |
| $\beta$ -thalassemie intermedia | HbF ↑ (5-50%)<br>HbA <sub>2</sub> ↑ (3,5-4%)             |

Tabel 2: Geavanceerde hemoglobineanalyseresultaten voor thalassemie [3], [9], [11].

Genetische analyse krijgt ook de voorkeur bij patiënten die frequent transfusies ondergingen [9].

#### 1.3 Hemoglobinevarianten

Er zijn meer dan 1000 verschillende genetische veranderingen beschreven in de genen die coderen voor de verschillende globineketens en die aanleiding geven tot de synthese van hemoglobinevarianten [13]. Sommige hemoglobinevarianten worden autosomaal recessief overgeërfd (bv. sikkelcelziekte), anderen worden autosomaal dominant overgeërfd (zeldzaam, bv. onstabiel hemoglobine) [4]. Binnen de groep van de hemoglobinevarianten zijn de meest voorkomende HbS, HbC, HbD en HbE die allen  $\beta$ -ketenvarianten zijn [4]. Ze vormen kristallen of onoplosbare aggregaten in de RBC die de normale vorm en flexibiliteit van de erythrocyten verstoren [17].

##### 1.3.1 Sikkelcelaandoeningen

Sikkelcelaandoeningen omvatten zowel sikkelcelziekte (SCD) als sikkelceldragschap. De aandoeningen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van HbS (Hb  $\alpha_2\beta_2^S$ ), ontstaan door een puntmutatie in het  $\beta$ -globinegen. Sikkelcelziekte manifesteert zich homozygoot (HbSS) of compound heterozygoot met een andere  $\beta$ -globinevariant, zoals sikkel- $\beta$ -thalassemie of HbSC-ziekte. Sikkelceldragschap is een heterozygote vorm waarbij één  $\beta$ -globineallel de mutatie draagt en het andere normaal is [18]. De veranderde eigenschappen van HbS ten opzichte van normaal volwassen HbA zijn verantwoordelijk voor de klinische complicaties. HbS heeft de eigenschap om te polymeriseren en kristalliseren wanneer het blootgesteld wordt aan een lage zuurstofspanning. Dit kan



zich o.a. voordoen in de kleine capillairen waardoor infarcten van verschillende organen ontstaan. Door de verkorte levensduur van RBC ontstaat acute en chronisch hemolytische anemie [6].

Sikkelcelziekte komt het meest voor in de homozygote vorm (HbSS), die aangeduid wordt als sikkelcelanemie. Daarnaast kunnen ook de dubbel heterozygote varianten, zoals HbSC en HbS $\beta$ thal, sikkelcelziekte veroorzaken [6]. De ernst van de hemolytische anemie, die aan de basis ligt van de symptomen, varieert sterk. Sommige patiënten blijven grotendeels asymptomatisch en ervaren geen crisissen, terwijl anderen ernstige, soms fatale, complicaties ontwikkelen. De crises kunnen vaso-occlusief, visceraal, aplastisch of hemolytisch zijn. Een vaso-occlusieve crisis wordt uitgelokt door factoren als infectie, acidose, dehydratatie of deoxygenatie en kan infarcten in verschillende organen veroorzaken [3]. Beroertes en cognitieve stoornissen behoren tot de meest voorkomende langdurige gevolgen van sikkelcelziekte bij zowel kinderen als volwassenen [19]. Viscerale sequestratie wordt veroorzaakt door het sikkelen van RBC in organen en het poolen van bloed [3]. De eerste klinische manifestaties treden meestal op in de eerste levensmaanden, wanneer de concentratie van HbS toeneemt en de hoeveelheid HbF afneemt.

Sikkelcel dragerschap is over het algemeen een goedaardige conditie zonder anemie en met normale morfologie van de rode bloedcellen. Echter, klinisch significante complicaties kunnen zich voordoen. Het meest voorkomende symptoom bij dragers is hematurie, vermoedelijk veroorzaakt door kleine infarcten in de nierpapillen [18].

#### 1.3.1.1 Behandeling

De behandeling van homozygote sikkelcelziekte (HbSS) is primair gericht op preventie. Profylactische maatregelen omvatten het vermijden van bekende uitlokkende factoren voor crisissen, zoals dehydratie, ondervoeding, infecties, circulatoire stase en blootstelling aan koude. Bij een crisis bestaat de behandeling uit warmte, rehydratie en (bij infecties) toediening van antibiotica. Bloedtransfusies worden uitsluitend toegediend bij ernstige symptomatische anemie [3]. Naast ondersteunende therapieën is stamcel- of beenmergtransplantatie momenteel de enige potentiële curatieve behandeling voor bepaalde kinderen met sikkelcelziekte. Hematopoëtische stamceltransplantaties worden echter zelden uitgevoerd vanwege de beperkte beschikbaarheid van geschikte donoren en de nog steeds aanzienlijke mortaliteit van ongeveer 5% [20].

Gezien de hoge prevalentie van neurologische complicaties bij zowel kinderen als volwassenen met sikkelcelziekte, vormt patiëntgerichte begeleiding een cruciaal aspect van de zorg. Hoewel sikkelcel dragers meestal asymptomatisch blijven, blijft counseling ook voor hen van belang. Zij moeten geïnformeerd worden over situaties waarin verhoogde voorzichtigheid vereist is, zoals bij anesthesie, zwangerschap en verblijf op grote hoogte [3].

#### 1.3.1.2 Diagnose

##### 1) Anamnese en klinisch onderzoek

De familiale en etnische achtergrond van een patiënt kunnen helpen in het sneller opsporen van sikkelcelziekte of dragerschap en in het vermoeden van compound syndromen.

De leeftijd van presentatie en de aard van de symptomen vormen eveneens een eerste indicatie om te denken aan de diagnose van een sikkelcelaandoening. Veel patiënten zijn symptomatisch vanaf de kindertijd, maar sommigen worden pas symptomatisch op latere leeftijd. Bij toevallige vondsten gaat het meestal om heterozygote patiënten [4].

##### 2) Algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek

|                                                |                                                                                                 |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hb SS/HbS<math>\beta</math><sup>0</sup></b> | ↓ Hb, reticulocytose<br>Hemolysetekens vanaf 4 maanden<br>Poikilocytose vanaf 3 maanden<br>NRBC |
| <b>Sikkelcel dragerschap (heterozygotie)</b>   | Bloedbeeld en uitstrijkje meestal normaal                                                       |

Tabel 3: Algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek bij sikkelcelaandoeningen [3]

### 3) Geavanceerde hemoglobineanalyse en/of genetisch onderzoek

Een recente rode bloedceltransfusie kan de resultaten van hemoglobine-elektroforese beïnvloeden. In dergelijke gevallen wordt aanbevolen om DNA-analyse uit te voeren of hemoglobineanalyse minstens vier maanden na transfusie te herhalen [18].

Prenatale diagnose gebeurt op basis van DNA-gebaseerde testen en postnatale diagnostiek start met hemoglobineanalyse via hemoglobine-elektroforese of HPLC. Bij onduidelijke resultaten, bijvoorbeeld bij neonaten of prematuren, kan bevestiging via DNA-analyse of een herhaling van hemoglobineanalyse nodig zijn. De diagnose van een compound heterozygote vorm van sikkelcelziekte (zoals HbSC of HbS/ $\beta$ -thalassemie) wordt pas definitief na een tweede, onafhankelijke hemoglobineanalysetechniek.

Van de beschikbare proteïne-gebaseerde methoden wordt HPLC beschouwd als de voorkeursmethode voor de diagnose van sikkelcelziekte. Alternatieve technieken, zoals dunne-laag isoelektrische focussering in combinatie met een oplosbaarheidstest of celluloseacetaat-elektroforese, gevolgd door citraatagar-elektroforese of een oplosbaarheidstest, kunnen eveneens een definitieve diagnose stellen [18]. Oplosbaarheidstesten worden echter afgeraden als diagnostische techniek op basis van enkele beperkingen: hemoglobine C en andere genetische varianten worden gemist, de testen zijn onnauwkeurig bij pasgeborenen en ze falen bij het detecteren van sikkelhemoglobine bij personen met ernstige anemie [21].

Na diagnose kan HbF kwantificatie als sterke predictor gebruikt worden om de ernst van de ziekte op te volgen [18].

| Sikkelcelziekte            | Hemoglobineanalyse                                          |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|
| HbSS                       | $\uparrow$ HbF (5-15%), HbS 80-100%, geen HbA, HbA2 (<3,5%) |
| HbS/ $\beta$ -thalassemie  | $\uparrow$ HbF, HbS > HbA (5-30%), HbA2 (>3,5%)             |
| HbS/ $\alpha$ -thalassemie | HbF, HbS (<35%), HbA                                        |
| HbAS                       | HbF, HbS (35-45%) < HbA (>50%)                              |

Tabel 4: Hemoglobineanalyse bij sikkelcelaandoeningen [3], [18], [22]

#### 1.3.2 Overige hemoglobinevarianten

**Hemoglobine C ziekte** (= homozygote vorm, HbCC-ziekte) is een erfelijke aandoening die frequent voorkomt in West-Afrika en veroorzaakt wordt door een substitutie in de  $\beta$ -globineketen. HbC heeft de neiging om rombovormige kristallen te vormen. In homozygote vorm veroorzaakt het een milde hemolytische anemie, gekenmerkt door uitgesproken schietschijfcellen, cellen met rombovorm en microsferocyten, en splenomegalie zonder vaso-occlusieve complicaties [3], [4]. Draggers van HbC vertonen eventueel enkele targetcellen en zijn doorgaans asymptomatisch [3]. De ziekte kan zich manifesteren in de vroege kindertijd of op volwassen leeftijd, afhankelijk van bijkomende genetische en omgevingsfactoren.

**Hemoglobine D ziekte** (= homozygote vorm, HbDD-ziekte) is zeldzaam en ontstaat door een substitutie in de  $\beta$ -globineketen. De ziekte veroorzaakt meestal een milde hemolytische anemie en een milde tot matige splenomegalie. Heterozygote dragers (HbAD) zijn asymptomatisch en hebben normale rode RBC indices. Het gelijktijdig overerven van HbD en HbS (HbSD ziekte), kan een ernstigere klinische presentatie geven, vergelijkbaar met sikkelcelziekte [3], [4].

**Hemoglobine E** is de meest voorkomende  $\beta$ -globinevariant in Zuid-Oost Azië [3]. De synthese van HbE gebeurt trager dan die van  $\alpha$ -globine, wat een klinisch beeld geeft dat lijkt op dat van thalassemie. Identificatie van dragers is cruciaal vanwege mogelijke interacties met  $\beta$ - of  $\alpha$ -thalassemie, die de fenotypische diagnose kunnen beïnvloeden [9]. Individuen die homozygoot zijn voor HbE hebben milde hemolytische anemie. HbE samen met  $\beta$ -thalassemie kan milde tot ernstige anemie induceren. De heterozygote vorm uit zich klinisch als een asymptomatisch dragerschap [4].

### I.3.2.1 Diagnose

#### 1) Anamnese en klinisch onderzoek

De diagnose van een hemoglobinevariant op basis van een hemoglobinevariant start met een gedetailleerde bevraging van de medische voorgeschiedenis en lichamelijk onderzoek. Zo worden patiënten met een voorgeschiedenis van anemie, splenomegalie of familiale hemoglobinopathieën snel geselecteerd.

#### 2) Algemeen hematologisch laboratoriumonderzoek

Bij patiënten met een hemoglobinevariant en hemolyse worden doorgaans anemie en een absolute reticulocytose verwacht. Voor onstabiele hemoglobinevarianten kunnen Heinz-body preparaten en warmte stabiliteitstesten nuttige diagnostische informatie verschaffen [4].

|                       |                                                                       |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>HbCC</b>           | Milde ↓ MCV en Hb<br>Hemolyse<br>HbC kristallen en schietschijfcellen |
| <b>HbDD/<br/>HbDβ</b> | Milde ↓ Hb<br>Hemolyse                                                |
| <b>HbEE/<br/>HbEβ</b> | Milde-ernstige ↓ MCV en Hb<br>Schietschijfcellen                      |

Tabel 5: Hematologisch laboratoriumonderzoek bij hemoglobinevarianten [9]

#### 3) Geavanceerde hemoglobineanalyse en/of genetisch onderzoek

HPLC en capillaire elektroforese (CE) zijn de voorkeursmethoden voor de identificatie van hemoglobinevarianten. Voor een nauwkeurige diagnose moeten minstens twee complementaire methoden worden toegepast omdat sommige afwijkende hemoglobinevarianten niet met elke methode zichtbaar zijn [8]. HbE bijvoorbeeld is moeilijker te testen met hemoglobineanalyse omdat de piek samen met andere β-globinevarianten migreert. De optimale diagnose is daarom DNA-analyse [23]. Moleculaire methoden kunnen gebruikt worden voor diagnose en ze zijn de enige methode om een geïdentificeerd afwijkend hemoglobine met zekerheid te typeren [4], [24].

Onstabiele hemoglobinevarianten worden in ongeveer 25% van de gevallen niet gedetecteerd door HPLC of CE. In dergelijke situaties kunnen moleculaire methoden zoals NGS helpen bij het identificeren van puntmutaties [25].

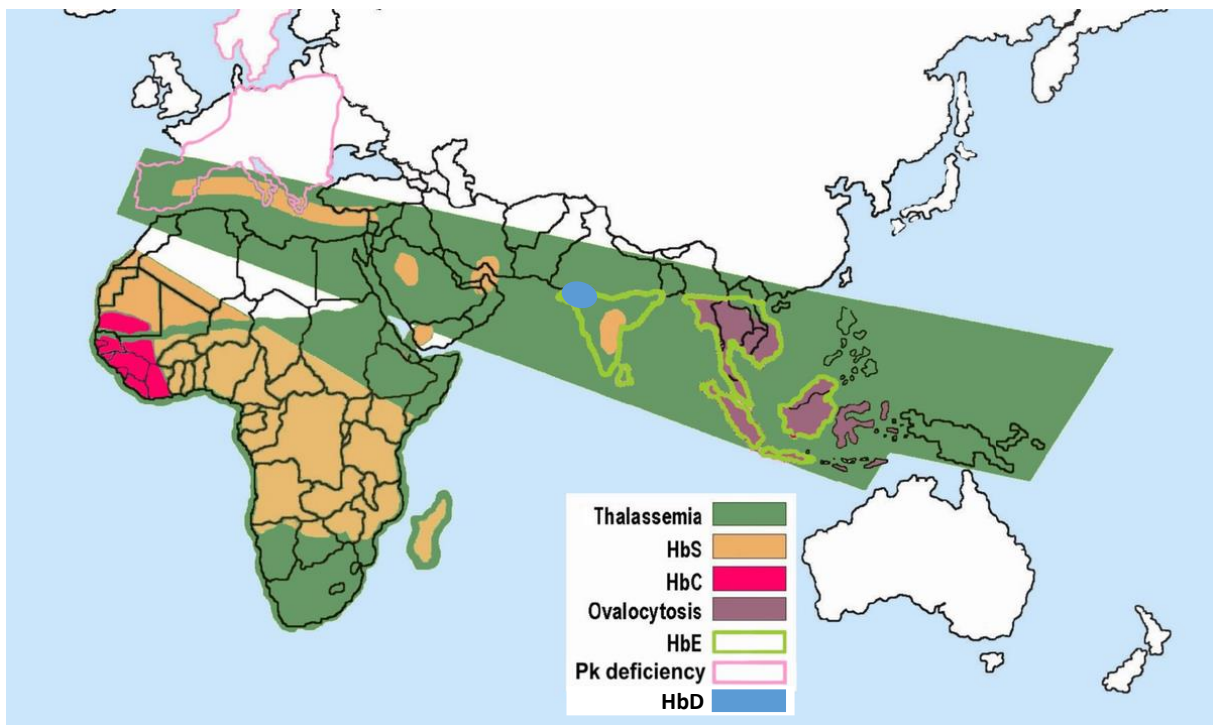
### I.4 Screening

Hemoglobinopathieën kunnen de gezondheid en overleving op lange termijn ernstig beïnvloeden. Daarom is tijdige en correcte screening belangrijk. Wereldwijd bestaan er prenatale en postnatale screeningsprogramma's met als doel vroege diagnose, adequate patiëntencounseling en het aanbieden van genetische counseling aan risicokoppels. Patiëntgerichte begeleiding focust op symptoomherkenning, het vermijden van crisis-uitlokkende factoren en correcte interpretatie van HbA1c-waarden bij de follow-up van diabetes (gezien de hoge turnover van rode bloedcellen). Ondanks bestaande neonatale screeningsprogramma's blijven veel personen met hemoglobinopathieën ongediagnosticeerd.

De mutaties die aanleiding geven tot hemoglobinopathieën zijn regiospecifiek en in de meeste gevallen zijn geografische en ethnische spreiding gedefinieerd [7]. Op die manier is er een basis van waaruit programma's uitgebouwd kunnen worden voor screening, genetische counseling en prenatale diagnostiek [7]. Echter, vanwege de wereldwijde bevolkingsmigraties is drageridentificatie en prenatale diagnose van hemoglobinopathieën momenteel in de meeste landen passend, zelfs in de traditioneel niet-endemische landen van Noord- en West-Europa [8]. In Gent bijvoorbeeld waren er anno 2024 165.460 inwoners met Belgische herkomst en 105.013 inwoners met niet-Belgische herkomst [26]. (De herkomst van een persoon houdt ook rekening met de nationaliteit bij de geboorte van de ouders)

De implementatie van screeningprogramma's hangt af van factoren zoals prevalentie van de aandoening, genetische diversiteit, beschikbare middelen en culturele context van een land of regio. In

multiculturele populaties wordt aanbevolen om ten minste een basale screening met RBC indices uit te voeren: MCV, MCH, Hb en RBC [9], [27]. In België worden hemoglobinopathiën momenteel niet opgenomen in het gratis bevolkingsonderzoek naar aangeboren aandoeningen bij pasgeborenen [28]. In Europa varieert het beleid per land.



Figuur 1: Historische verdeling van RBC abnormaliteiten, gewijzigd overgenomen van [3], [29]

## 2. Screeningsstrategie

### 2.1 Staalverzameling

Universele, niet-selectieve screening is ideaal omdat het meer hemoglobinopathie dragers kan detecteren dan selectieve screening die gebaseerd is op ras en etniciteit. Zeker binnen de huidige multiculturele context [30].

De staalrekrutering voor hemoglobinopathiescreening via de nieuwe screeningsstrategie gebeurde via een combinatie van vier complementaire routes: (1) een formule op basis van RBC indices in het LIS, (2) Hb NEXT™ vlag bij HbA1c-bepalingen, (3) recommendation rule van de Sysmex-analysers (= RWO vlag), en (4) rechtstreekse aanvragen door de behandelende arts.

#### RBC index formule

RBC indices vormen een kostenefficiënt en breed toepasbaar hulpmiddel in de eerste screeningsfase [14]. Talrijke algoritmen op basis van MCV, MCH, hemoglobinegehalte en RBC zijn ontwikkeld met als doel een betrouwbare differentiatie tussen thalassemie dragers en andere oorzaken van microcytaire anemie, zoals ijzerdeficiëntie [9].

In dit onderzoek werd geen single-center retrospectieve studie uitgevoerd om na te gaan welke in de literatuur beschreven RBC index formule de meest sensitieve is voor de patiëntenpopulatie van AZ Sint-Lucas. Het ziekenhuis heeft namelijk een beperkt aantal gekende patiënten met een hemoglobinopathie om hier een relevante studie uit te bouwen. Er werd daarom gekozen om op basis van de literatuur een formule te selecteren met bewezen sensitiviteit voor de detectie van de hemoglobinopathiën die op basis van de herkomst van de Gentenaars en de geografische spreiding het meest te verwachten zijn:  $\alpha$ - als  $\beta$ -thalassemieën en HbS. Voor  $\alpha$ -thalassemie en HbS worden

echter geen RBC index formules beschreven. De veranderingen in RBC indices zijn typisch subtieler dan bij  $\beta$ -thalassemie [16].

De in de literatuur beschreven algoritmen (zoals Mentzer-index (1973), Shine & Lal-index (1977) en de Green & King-index (1989)) worden geëvalueerd in de context van microcytaire anemie. Ze tonen goede diagnostische prestaties voor de differentiatie tussen  $\beta$ -thalassemie dragerschap en ijzerdeficiëntie [9], [31]. Bij de interpretatie van deze formules wordt RBC steeds als onderscheidende parameter in beschouwing genomen [9]. De referentiewaarden voor hemoglobine in AZ Sint-Lucas zijn gebaseerd op deze beschreven door Van Pelt L. *et al.* (2022) [32] en worden weergegeven in Tabel 6:

| Leeftijd  | Geslacht | Referentiewaarden (g/dL) |
|-----------|----------|--------------------------|
| >18 j     | V        | 12-16                    |
| >18 j     | M        | 13-16                    |
| 12-18 j   | V&M      | 11.5-15.5                |
| 6-12 j    | V&M      | 11.5-13.5                |
| 2-6 j     | V&M      | 10.5-13.5                |
| 6 m – 2 j | V&M      | 9.5-13.5                 |
| 3-6 m     | V&M      | 9-13.5                   |
| 31d-3m    | V&M      | 10-18                    |
| 14-31d    | V&M      | 12.5-20.5                |
| 7-14d     | V&M      | 13.5-21.5                |
| 3-7d      | V&M      | 14.5-22.5                |

Tabel 6: Referentiewaarde voor Hb in AZ Sint-Lucas

De hoogste sensitiviteit en specificiteit voor thalassemisscreening bij volwassenen zou volgens de meta-analyse van Hoffman J. *et al.* (2015) [33] bekomen worden met de formule van Urrechaga E. (2008) [1] met als cut-off 3,7 (>3,7 suggestief voor  $\beta$ -thalassemie):

$$\frac{\%MicroRBC}{\%HypoHe}$$

Deze M/H-ratio heeft in vergelijkende studies superieure prestaties aangetoond ten opzichte van andere discriminerende indices. De belangrijkste meerwaarde ligt in het gebruik als screeningsinstrument bij microcytaire anemie patiënten, om diegenen te identificeren bij wie aanvullend laboratoriumonderzoek naar thalassemie gerechtvaardigd is [33].

De RBC index van Urrechaga E. *et al.* (2011) [2] heeft een betere performantie bij de totale populatie (kinderen en volwassenen) met een cut-off van -7,6 (>-7,6 suggestief voor  $\beta$ -thalassemie) volgens het onderzoek van Dedeene L. *et al.* (2021) [34]:

$$\%MicroRBC - \%HypoHe - RDWcv$$

Deze formule werd niet meegenomen in de meta-analyse van Hoffman J. *et al.* (2015) [33]. De twee gekozen formules werden geïmplementeerd in het LIS.

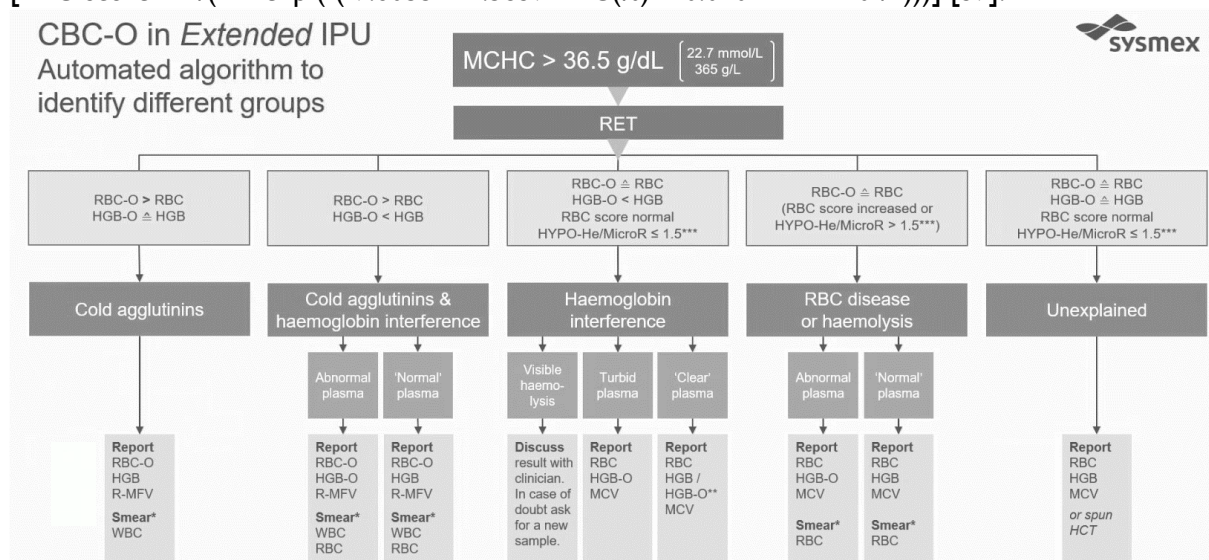
#### HbA1c vlag

Wanneer stalen voor de follow-up van diabetespatiënten in de variantmodus van Hb NEXT™ worden geanalyseerd, is het toestel in staat een melding te geven bij een vermoeden van een hemoglobinevariant: 'Variant is detected'. Dit alarm wordt doorgeschreven naar het LIS zodat de afgevlagde stalen opgevolgd kunnen worden.

### RWO vlag

Sysmex heeft een nieuwe rule set geïmplementeerd in *Extended Information Processing Unit (EIPU)* op basis van onderzoek van Nivaggioni V. et al. (2020, 2021) [35], [36] en Berda-Haddad Y. et al. (2016) [37]: RBC Defect Workflow Optimisation (RWO). De rule set combineert de research parameters van de CBC-O applicatie (RBC-O, HGB-O), de diagnostische (MCV, RBC, HGB, RET, IRF, %MicroRBC, %HypoHe) en research (FRC) RBC en RET parameters en de RBC score. Om de rule set te kunnen gebruiken is er een Sysmex geautomatiseerde hematologie-analyser nodig die is uitgerust met een RET-kanaal en geconnecteerd is met *Extended IPU (EIPU, versie 5.2)*. De workflow is een twee-staps algoritme, o.a. ter ondersteuning van de screening naar ijzerdeficiëntie anemie en erfelijke RBC ziekten: hereditaire sferocytose, Zuidoost-Aziatische ovalocytose, sikkelcelziekte en heterozygote hemoglobinopathiën [35], [36]. Enkel de laatste twee zullen verder uitgewerkt worden binnen deze CAT. De recommendation rule die gegenereerd werd op basis van deze RWO vlag, werd doorgeschreven naar het LIS (GLIMS, firma Clinisys) zodat de stalen opgevolgd konden worden. De vlag vormt een aanvulling op de geselecteerde index formules uit de literatuur aangezien hij kan verder differentiëren dan ijzerdeficiëntie en  $\beta$ -thalassemie (ook SCD, sferocytose, ...) én ook in niet-(microcytaire) anemie situaties functioneert.

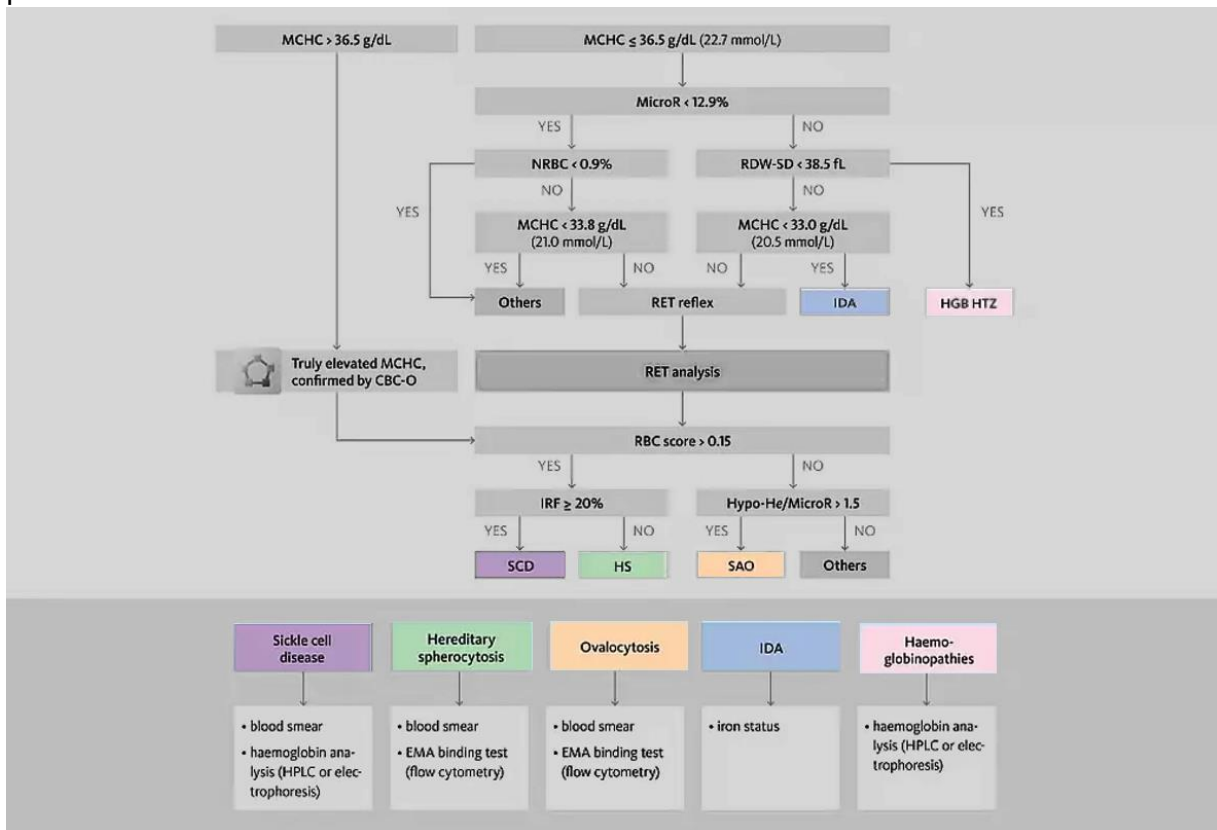
Berda-Haddad Y. et al. (2016) initieerden de ontwikkeling van dit algoritme op basis van de observatie dat MCHC beïnvloed wordt door wijzigingen in meerdere RBC indices (MCHC wordt berekend uit Hb, HCT, RBC en/of MCV). Een verhoogde MCHC kan zowel artefactueel (bv. koude agglutinatie) als pathologisch (bv. hemoglobinopathie) van aard zijn. Het algoritme differentieert tussen vier groepen: RBC-agglutinatie, optische interferentie, RBC-ziekten en andere. De beslisboom start met een verhoogde MCHC-waarde die automatisch een reflexmeting via het RET-kanaal activeert. Vervolgens worden in de EIPU software delta's tussen impedantie- en fotometrische meting enerzijds en optische metingen anderzijds ( $\Delta RBC$ ,  $\Delta HGB$ ) geëvalueerd om het staal toe te wijzen aan een specifieke tak binnen de beslisboom. Voor stalen die in aanmerking komen voor een RBC-ziekte, wordt aanvullend een RBC-score berekend. Deze score werd afgeleid via een multivariate logistische regressieanalyse met stapsgewijze variabelenselectie, waarbij gezocht werd naar parameters die significant geassocieerd zijn met de aanwezigheid van RBC-ziekten. De analyse identificeerde FRC% en RET als de meest relevante variabelen, die in een nomogram werden geïntegreerd voor de berekening van de RBC-score [ $RBC\text{-score} = 1/(1 + \exp(-(-7.6055 + 1.5837 \cdot FRC(\%) + 0.0402 \cdot RET \cdot 10^9/L)))$ ] [37].



Figuur 2: Beslisboom voor een verhoogd MCHC, overgenomen van 'CBC-O concept in de focus' webinar via [benelux.caresphere-academy.com](https://benelux.caresphere-academy.com).

Nivaggioni V. et al. (2020, 2021) [35], [36] verfijnden het algoritme verder door de groepen van RBC-ziekten onder te verdelen in vijf diagnostische categorieën: ijzerdeficiëntie-anemie, heterozygote

hemoglobinopathie, sikkelcelziekte, hereditaire sferocytose en Zuidoost-Aziatische ovalocytose. Met behulp van een CART-analyse (Classification and Regression Tree) werden 8217 patiënten uit een universitaire routinecohort geanalyseerd en geclassificeerd binnen deze vijf groepen. De CART-analyse selecteerde de meest discriminerende parameters, waaronder de RBC-score, MCHC, %MicroRBC, RDW-SD, %NRBC en IRF. In de eerste stap van het algoritme worden patiënten met RBC-aandoeningen onderscheiden van IDA en OTHERS op basis van de RBC-parameters MCHC, RDW-SD, %MicroRBC en %NRBC. In een tweede stap wordt binnen de verdachte groep verder gedifferentieerd met behulp van de reticulocytaire parameters IRF% en RBC-score. Om patiënten met ovalocytose niet te missen met de RBC-score werd tot slot een extra formule ingebouwd in de laatste studie (2021): Hypo-He/MicroR. Het algoritme behaalde zeer goede testkarakteristieken met een sensitiviteit van 95,2%, specificiteit van 99,9% en een correcte classificatie van 99,4%. Het werd daarenboven gevalideerd in een onafhankelijke validatiecohort van 14.705 patiënten.



Figuur 3: Algoritme van Nivaggioni V. et al. (2020, 2021) [35], [36], gewijzigd overgenomen van sysmex-europe.com

Patiënten met een verlaagde MCHC, een verhoogd RDW-SD en een verhoogd percentage microcytaire erythrocyten worden geclassificeerd als lijdend aan ijzerdeficiëntie-anemie. Dit patroon weerspiegelt het klassieke morfologische beeld van anisocytose en microcytose bij ijzergebrek. Patiënten met een heterozygote hemoglobinopathie vertonen doorgaans een normale of verhoogde RBC-telling, een verhoogd %MicroRBC maar een relatief normale RDW.

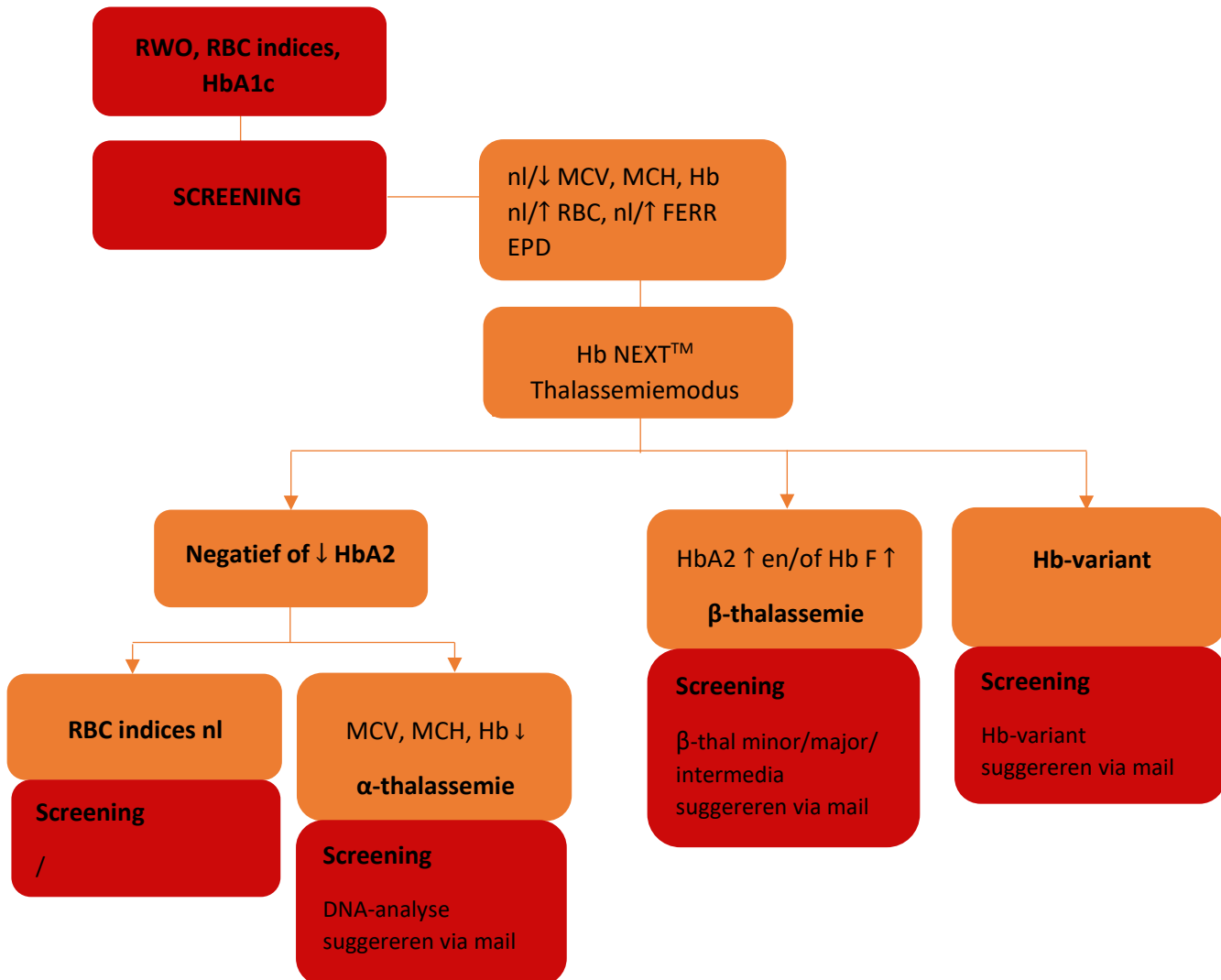
#### Aanvraag arts

Wanneer de behandelende arts een hemoglobinopathie vermoedt en een aanvraag doet voor hemoglobineanalyse, worden de stalen eveneens in de screeningsstrategie opgenomen. In dit geval gaat het echter niet meer om een screening, maar om de diagnose van een hemoglobinopathie. De verdere uitwerking staat daarom beschreven onder titel 3.1 Toestel validatie.



## 2.2 Staaluitwerking

De stalen die via de nieuwe screeningsstrategie werden afgevlagd, werden opgevangen via het LIS-systeem. In tweede tijd gebeurde een screening door een klinisch bioloog of assistent in opleiding volgens de flowchart, weergegeven in Figuur 4. Wanneer het volledig bloedbeeld (inclusief RBC indices, RBC morfologie, hemolyse parameters, ijzerparameters...) en het elektronisch patiëntendossier deden vermoeden dat de patiënt een hemoglobinopathie heeft, werd het staal verder geanalyseerd op Hb NEXT™ Thalassemiemodus. De chromatogrammen en resultaten voor HbA2 en HbF werden door de klinisch bioloog of assistent in opleiding geïnterpreteerd.



Figuur 4: Flowchart screeningstrategie AZ Sint-Lucas

## 2.3 Evaluatie

Over een periode van **drie maanden** (02/2025-04/2025) werden 154 stalen verzameld via de voorgestelde screeningsstrategie, waarvan 24 (16%) opnieuw beoordeeld zouden moeten worden na ijzercorrectie.

De verdeling van deze stalen per screeningsstrategie wordt weergegeven in Tabel 7 ('Aantal stalen' omvat de stalen zonder ijzerdeficiëntie). Van de 154 stalen waren er 18 (12%) afkomstig van patiënten bij wie in AZ Sint-Lucas effectief een hemoglobinopathie werd vastgesteld. Op basis van deze data zouden er gemiddeld 51 stalen per maand via Hb NEXT™ geanalyseerd worden, wat overeenkomt met ongeveer 13 stalen per week, exclusief twee wekelijkse controleanalyses. Aangezien elke analyse ongeveer zes minuten in beslag neemt, gevolgd door vier minuten spoeling, komt dit neer op een



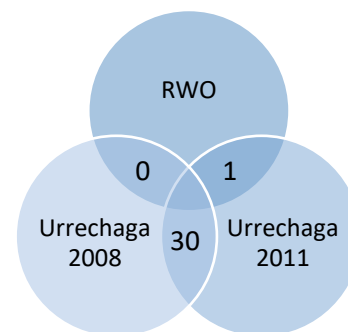
wekelijkse analysetijd van circa 150 minuten (2,5 uur). Inclusief interpretatie door de klinisch bioloog is dit vergelijkbaar met een halve werkdag.

| Screeningsweg     | Aantal stalen | Opmerking                                |
|-------------------|---------------|------------------------------------------|
| HbA1c             | 25/154 (16%)  |                                          |
| RWO vlag          | 53/154 (34%)  | 4 stalen met laag ijzer (te corrigeren)  |
| Urrechaga E. 2008 | 39/154 (25%)  | 6 stalen met laag ijzer (te corrigeren)  |
| Urrechaga E. 2011 | 44/154 (29%)  | 18 stalen met laag ijzer (te corrigeren) |

Tabel 7: Suggestief voor een hemoglobinopathie o.b.v. de screeningsstrategie over een periode van drie maanden

De twee RBC index formules van Urrechaga E. *et al.* bleken slecht te discrimineren tussen  $\beta$ -thalassemie en ijzerdeficiëntie anemie wanneer alle stalen werden geïncludeerd over een periode van drie maanden. Wanneer enkel stalen met een anemie werden geïncludeerd bleken ze beter te discrimineren (zie gegevens in Tabel 7). Ze discrimineren echter niet zo goed als de RWO vlag die minder stalen met verlaagde ijzerwaarden detecteerde en daarenboven een hoger aantal stalen selecteerde voor de screeningsflow. Er moet echter in acht genomen worden dat ijzerdeficiëntie ook kan voorkomen bij patiënten met een hemoglobinopathie.

Wat betreft de concordantie tussen de verschillende screeningsstrategieën, blijkt de RBC index formule van Urrechaga E. (2008) [33] de hoogste mate van overlap te vertonen met de andere methoden. Van de 39 stalen die via deze formule als suggestief werden aangeduid, werden er 30 (77%) ook via de formule van Urrechaga E. *et al.* (2011) teruggevonden. Ter vergelijking: de Urrechaga E. *et al.* (2011) [2] formule toonde een concordantie van 70% (31/44) (één staal met de RWO vlag en de overige met de formule van Urrechaga E. (2008)); de RWO-vlag slechts 2% (1/53); en de HbA1c-vlag 0% (0/25). Van de twee RBC index formules geselecteerd uit de literatuur werden de meeste stalen met beide formules teruggevonden, maar selecteert de formule van Urrechaga E. *et al.* (2011) meer stalen met een ijzerdeficiëntie. Bijgevolg doet de formule van Urrechaga E. (2008) het beter in het selecteren van stalen met een vermoeden van een hemoglobinopathie voor onze patiëntenpopulatie.



Figuur 5: Venndiagram van de concordantie tussen de screeningswegen

In **maart** werden 48 stalen verzameld met de voorgestelde screeningsstrategie. Deze 48 verzamelde stalen werden allen geanalyseerd met Hb NEXT™ Thalassemiemodus. De HbF analyse op Hb NEXT™ Thalassemiemodus bleek regelmatig onbetrouwbaar bij nazicht van de chromatogrammen zodat voor slechts 37 stalen een correcte meting kon gebeuren. Van deze 37 stalen wordt per screeningsstrategie in Tabel 8 weergegeven hoeveel procent inderdaad positief bleek voor een hemoglobinopathie. De testkarakteristieken van elke screeningsweg worden in Tabel 8 weergegeven.

| Screeningsweg     | % positief voor hemoglobinopathie                                            | Opmerking                                                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| HbA1c             | 100% (7/7)                                                                   | 2 stalen HbC, 5 stalen HbS                                   |
| RWO vlag          | 82% (14/17)<br>13/17 $\beta$ -thalassemie, 1/17 HbE en verhoogd HbF          | 3/17 stalen met enkel licht verhoogd HbF en leeftijd >3 jaar |
| Urrechaga E. 2008 | 29% (2/7)<br>1/7 HbS, 1/7 $\beta$ -thalassemie                               | 4/7 verhoogd HbF en leeftijd <3 jaar, 1/7 normaal beeld      |
| Urrechaga E. 2011 | 50% (6/12)<br>1/12 $\beta$ -thalassemie 3/12 $\alpha$ -thalassemie, 2/12 HbS | 5/12 verhoogd HbF en leeftijd <3 jaar, 1/7 normaal beeld     |

Tabel 8: % suggestief voor een hemoglobinopathie o.b.v. analyse op Hb NEXT™ Thalassemiemodus

Er kan opnieuw geconcludeerd worden dat de RBC index formules uit de literatuur minder goed zijn in de selectie van hemoglobinopathiestalen in vergelijking met de RWO vlag van Sysmex.

Tot slot werd voor alle positieve hemoglobineanalyses in AZ Sint-Lucas over een periode van drie maanden nagekeken of de screeningsweg het staal als suggestief aangaf indien de screeningsweg beschikbaar was (dus enkel wanneer er een HbA1c analyse werd aangevraagd of wanneer de RBC indices ter beschikking waren). Er werden in deze drie maanden 65 hemoglobineanalyses uitgevoerd. De resultaten worden weergegeven in Tabel 9.

| Screeningsweg     | % afgevlagde stalen | Opmerking                                                                                                  |
|-------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HbA1c             | 100%                | <b>Drie</b> stalen waarbij HbA1c én positieve hemoglobineanalyse beschikbaar waren                         |
| RWO vlag          | 60%                 | <b>10</b> stalen waarbij RWO én positieve hemoglobineanalyse (β-thalassemie) beschikbaar waren             |
| Urrechaga E. 2008 | 40%                 | <b>Vijf</b> stalen waarbij formule én positieve hemoglobineanalyse (β-thalassemie minor) beschikbaar waren |
| Urrechaga E. 2011 | 40%                 | <b>Vijf</b> stalen waarbij formule én positieve hemoglobineanalyse (β-thalassemie minor) beschikbaar waren |

Tabel 9: Percentage juist afgevlagde stalen weergegeven per screeningsroute bij stalen met positieve hemoglobineanalyse

Hetzelfde werd geëvalueerd voor alle negatieve hemoglobineanalyses in AZ Sint-Lucas over een periode van drie maand. De resultaten worden weergegeven in Tabel 10.

| Screeningsweg     | % foutief afgevlagd stalen | Opmerking                                                                                      |
|-------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HbA1c             | 0%                         | <b>Negen</b> stalen waarbij HbA1c én negatieve hemoglobineanalyse beschikbaar waren            |
| RWO vlag          | 0%                         | <b>26</b> stalen waarbij RWO én negatieve hemoglobineanalyse (β-thalassemie) beschikbaar waren |
| Urrechaga E. 2008 | 0%                         | <b>31</b> stalen waarbij formule én negatieve hemoglobineanalyse beschikbaar waren             |
| Urrechaga E. 2011 | 0%                         | <b>31</b> stalen waarbij formule én negatieve hemoglobineanalyse beschikbaar waren             |

Tabel 10: Percentage foutief afgevlagde stalen weergegeven per screeningsroute bij stalen met negatieve hemoglobineanalyse

### Conclusie flowvalidatie

De HbA1c en RWO vlaggen leveren het meeste stalen op die op basis van analyse op Hb NEXT™ Thalassemiemodus overeen komen met een hemoglobinopathie. De RBC index formules van Urrechaga E. (2008) [33] en van Urrechaga E. et al. (2011) [2] zijn minder specifiek en toonden een matige discriminatie tussen microcytaire anemie op basis van ijzerdeficiëntie of thalassemie.

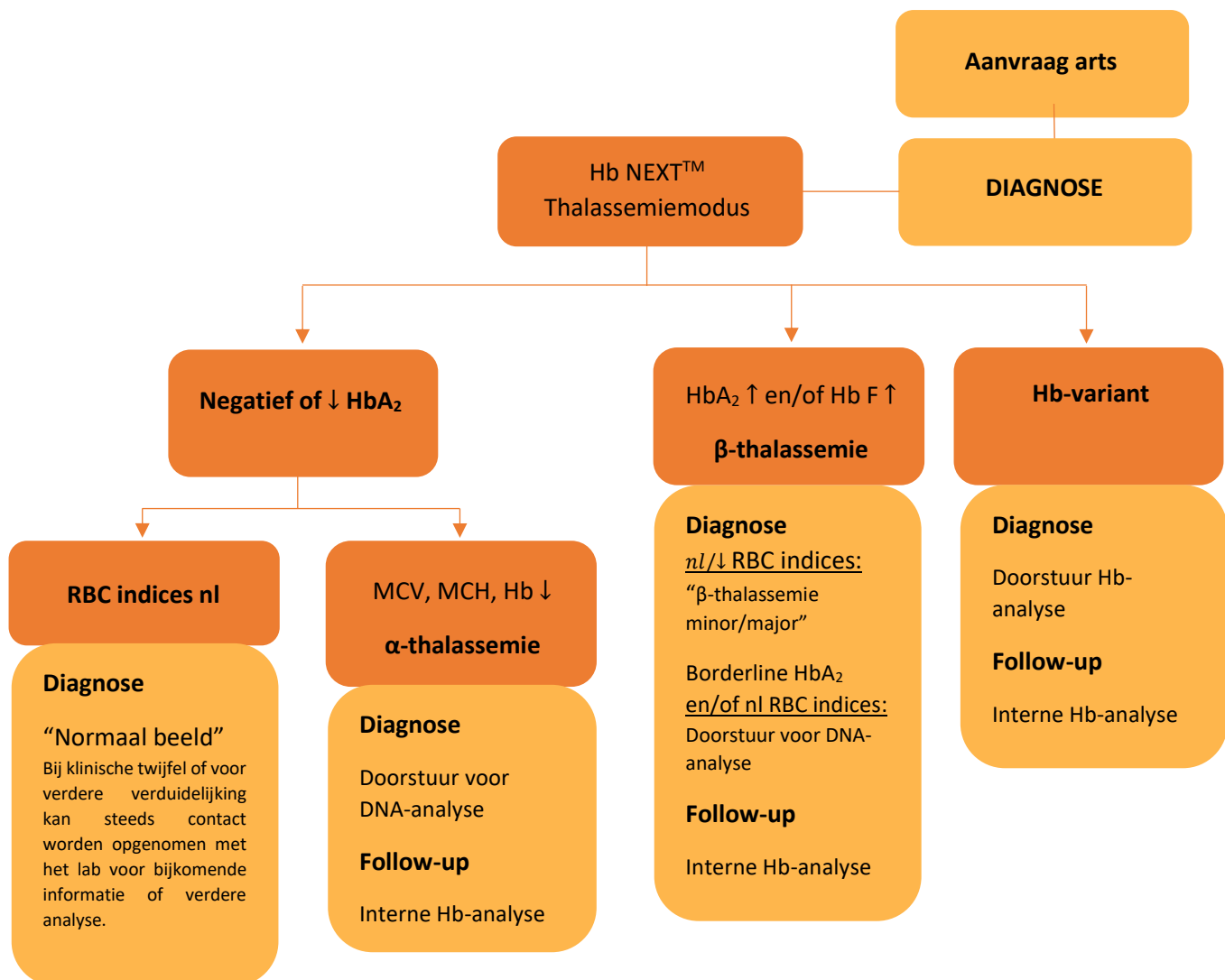
## 3. Validatie Hb NEXT™-toestel

### 3.1 Toestel validatie

Het Hb NEXT™-toestel (Menarini Diagnostics) werd initieel aangekocht voor de langdurige opvolging van patiënten met diabetes mellitus, via kwantificatie van de geglyceerde fractie HbA1c (Variantmodus). De Variantmodus is tevens in staat om stalen te markeren waarbij een hemoglobinopathie wordt vermoed, door detectie van varianten zoals HbE, HbD, HbC en HbS.

In het kader van de nieuwe screeningsstrategie wordt ook de Thalassemiemodus van Hb NEXT™ gevalideerd en geïmplementeerd in de routine. De Thalassemiemodus werkt via reversed-phase kationenuitwisselings-HPLC en laat toe om HbA1c, HbF en HbA2 te kwantificeren, en veelvoorkomende hemoglobinevarianten (HbE, HbD, HbS, HbC) te identificeren en kwantificeren. Andere afwijkingen worden weergegeven als “Unknown”. Binnen de nieuw ontwikkelde screeningsstrategie wordt het toestel specifiek gevalideerd met als doel negatieve stalen betrouwbaar uit te sluiten en positieve stalen correct te identificeren. Bij identificatie van een hemoglobinevariant zal een confirmatie-analyse in een extern laboratorium uitgevoerd worden zoals de richtlijnen beschrijven. Voor gekende patiënten kunnen kwantificatie en interpretatie intern afgewerkt worden.

De interpretatie gebeurt met dezelfde referentiewaarden als het referentielaboratorium (UZ Gent). In Figuur 6 wordt een flowchart weergegeven die deze flow samenvat.



Figuur 6: Flowchart diagnosestrategie AZ Sint-Lucas

### 3.2. Toestel evaluatie

HPLC, zoals toegepast in het Hb NEXT™-toestel, wordt vandaag beschouwd als een standaard screeningsmethode voor hemoglobinopathiën, dankzij de hoge resolutie, reproduceerbaarheid en diagnostische nauwkeurigheid. Toch kunnen de verkregen chromatogrammen complex en moeilijk te interpreteren zijn en kunnen bepaalde varianten overlappende retentietijden vertonen. Capillaire zone-elektroforese (CZE), waarbij hemoglobinefracties worden gescheiden op basis van hun mobiliteit in een alkalische buffer, is een alternatief met vergelijkbare resolutie. Verschillende studies tonen aan dat HPLC en CZE complementair zijn en dat ze, indien gecombineerd, nog een hogere accuraatheid en betrouwbaarheid in de detectie en karakterisering van hemoglobinevarianten geven [38], [39]. Het Hb NEXT™-toestel biedt dus een betrouwbare eerste screeningsstap, die op zichzelf onvoldoende is voor een definitieve identificatie (tenzij bij gekende patiënten die in follow-up traject zitten).

De validatie werd uitgevoerd met *β-thalassaemia & HbA1c Control Material* en *Calibrator* van Lifotronic volgens het CLSI EP15 protocol. De twee controlelevels werden vijf opeenvolgende dagen vijf keer na elkaar (binnen eenzelfde run) geanalyseerd. De formule die gebruikt werd voor het berekenen van de bias is:  $100 \times [(\text{overall mean} - \text{target}) / \text{target}]$ . De resultaten worden weergegeven in Tabel 11.

|                        | <b>Within-run</b> | <b>Criterium</b> | <b>Between-run</b> | <b>Criterium</b> | <b>Bias</b> | <b>Criterium</b> |
|------------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------|------------------|
|                        | CV%               | CV%              | CV%                | CV%              | %           | %                |
| <b>HbA<sub>2</sub></b> |                   |                  |                    |                  |             |                  |
| Level 1                | 0.490             | 0.5 [40]         | 1.153              | 1.73 [38]        | 0.87        | 1.0 [40]         |
| Level 2                | 0.663             | 2.23 [38]        | 0.908              | 1.36 [38]        | 7.76        | 20 [41]          |
| <b>HbF</b>             |                   |                  |                    |                  |             |                  |
| Level 1                | 0.671             | 2.29 [38]        | 1.312              | 2.11 [38]        | 3.11        | 15 [41]          |
| Level 2                | 0.859             | 0.91 [38]        | 1.062              | 1.46 [42]        | 0.01        | 1.0 [40]         |

Tabel 11: Resultaten voor within-run (CV%) en between-run (CV%) imprecisie en juistheid (bias, %)

Alle waarden liggen binnen de grenzen van de twee controlelevels, zoals aangegeven door de bijsluiter van de firma. De kwaliteitsspecificaties voor precisie en accuraatheid op basis van de biologische variatie en beschreven door Mosca A. et al. (2013) [40] voor de HbA<sub>2</sub> en HbF meting worden niet voor elke parameter en elk level behaald. De bekomen CV%'s vallen wel binnen de GCV%-waarden (groep van HPLC methode) van UK NEQAS zodat de methode met Hb NEXT™ in lijn ligt met andere laboratoria. De CV%'s doen het daarenboven even goed of beter dan deze die beschreven worden in de literatuur en voorgeschreven zijn door de ICSH 2012 aanbevelingen (zie bronnen in Tabel 12) [43].

Voor de methodevergelijking werden 38 stalen uit de routine verzameld waarvoor een hemoglobineanalyse door de behandelende arts was aangevraagd. De stalen werden maximaal 3 maanden bij -80°C bewaard alvorens analyse met de Hb NEXT™ Thalassemiemodus werd uitgevoerd. De nieuwe methode werd vergeleken met de HPLC-techniek uitgevoerd op de Tosoh HLC-723 GII® Analyser (AML). De fabrikant doet geen uitspraken over de mogelijkheid om HbA correct te kwantificeren. Deze parameter kan bijgevolg niet gevalideerd worden. Analyse van HbF was niet mogelijk, aangezien het toestel er niet in slaagde de juiste piek te kwantificeren. Dit probleem werd gerapporteerd aan de fabrikant en wordt verder onderzocht.

Voor HbA<sub>2</sub> werd een Pearson correlatiecoëfficiënt van 0.7557 bekomen, wat wijst op een sterke lineaire correlatie tussen beide methoden. Het 95% betrouwbaarheidsinterval rond het intercept en de helling uit de Passing-Bablok regressie analyse bevatten respectievelijk 0 en 1 zodat er geen systematische en geen proportionele fout aanwezig was. De Bland-Altman analyse toonde echter een systematische bias aan, waarbij de nieuwe methode gemiddeld 0.16 eenheden lager lag dan de referentiemethode (statistisch significant,  $p=0.0270$ ). De *limits of agreement* lagen tussen -0.98 en 0.67. De grote uitschieters zijn verhoogde HbA<sub>2</sub>-waarden via Hb NEXT™ bij patiënten met een hemoglobinevariant. De hogere HbA<sub>2</sub>-waarde bij deze heterozygote hemoglobinopathieën heeft echter weinig betekenis. Het suggereert namelijk eventueel bv. HbS/β-thalassemie, maar dit kan worden uitgesloten aangezien voor de patiënt bij diagnose een confirmatie-analyse zou uitgevoerd worden zodat dit toen wel zou uitgesloten zijn.

Er kan besloten worden dat de HbA<sub>2</sub> meting via Hb NEXT™ steeds hetzelfde classificeert als deze gemeten via Tosoh GII wanneer de afwijkende waarden voor HbA<sub>2</sub> bij patiënten met een hemoglobinevariant als normaal beschouwd worden en wanneer rekening gehouden wordt met het EPD, RBC indices en ijzerwaarden (Cohen's kappa= 0,8872). De twee methoden zijn concordant.

Er werden geen Hb-varianten gemist met de Hb NEXT™ methode in vergelijking met de referentiemethode. Voor patiënten in follow-up moet het Hb NEXT™ toestel in staat zijn om Hb-varianten correct te kwantificeren. In deze studie waren slechts zes stalen met een Hb-variant aanwezig, waardoor een statistische analyse weinig informatief is. Toch toont Tabel 12 aan dat de kwantitatieve bepaling van Hb-varianten door Hb NEXT™ zeer accuraat is en wordt via Bland-Altman plot een gemiddeld verschil van 0 bekomen (0.6 95%BI[-0.93-2.13]).

| <b>HPLC op Tosoh HLC-723 GII®</b> | <b>HPLC op Hb NEXT™</b> |
|-----------------------------------|-------------------------|
| HbC 32.3%                         | HbC 35.85%              |
| HbS 33.6%                         | HbS 33.78%              |
| HbS 35.4%                         | HbS 35.29%              |

|           |            |
|-----------|------------|
| HbS 36.4% | HbS 36.17% |
| HbS 30.3% | HbS 30.57% |
| HbS 33.7% | HbS 33.64% |

Tabel 12: Methodevergelijking voor de parameter 'Hb-variant'.

Een vergelijking van de besluiten van de twee methoden toonde een *Cohen's kappa* waarde van 0.7534 (matige overeenkomst) aan. De vier stalen waar de conclusie van de nieuwe methode verschilde van de referentiemethode betroffen stalen met een verlaagde HbA<sub>2</sub>-waarde en sterk suggestieve RBC indices zodat ze met de nieuwe methode in aanmerking kwamen voor een DNA-analyse in het kader van  $\alpha$ -thalassemie, en volgens de referentiemethode overeenkwamen met een normaal beeld.

#### Conclusie toestelvalidatie

De nieuwe methode op Hb NEXT™ blijkt een robuuste en accurate methode te zijn op basis van een klinische en statistische methodevergelijking met de referentiemethode op Tosoh GII. HbF kon echter niet mee gevalideerd worden omwille van een technisch defect. Het toestel zal pas in gebruik genomen kunnen worden van zodra de methodevergelijking geherevalueerd werd met de gegevens van de HbF analyse.

#### To do/Actions

- Methodevergelijking opnieuw uitvoeren wanneer het probleem van HbF kwantificatie is opgelost.
- Overleg plannen met de hematoloog ter toelichting van de nieuwe screeningsstrategie voor hemoglobinopathieën.
- De workflow in het LIS (GLIMS, firma Clinisys) configureren: RWO vlag van de Sysmex-analyser en de HbA<sub>1c</sub> vlag van het Hb NEXT™ toestel in een nieuwe validatielijst programmeren.

#### Relevant evidence

- *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*  
[8], [9], [10], [12], [14], [15], [19], [43], [44]
- *Systematic Reviews and Meta-analyses*  
[33]
- *Reference Works, Handbooks and Databases*  
[3], [4], [11], [18], Pubmed
- *Posters, "grey literature", presentations*  
[34]

## References

- [1] E. Urrechaga, "Discriminant value of % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of microcytic anemia," *Clin Chem Lab Med*, vol. 46, no. 12, pp. 1752–1758, Dec. 2008, doi: 10.1515/CCLM.2008.355.
- [2] E. Urrechaga, L. Borque, and J. F. Escanero, "The role of automated measurement of RBC subpopulations in differential diagnosis of microcytic anemia and  $\beta$ -thalassemia screening," *Am J Clin Pathol*, vol. 135, no. 3, pp. 374–379, Mar. 2011, doi: 10.1309/AJCPJRH110XTNFGA.
- [3] A. V. Hoffbrand, A. H. P. Moss, and J. Pettit, *Essential Haematology*, 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006.
- [4] M. T. Clifford, "Hemoglobin variants including Hb C, Hb D, and Hb E." Accessed: May 01, 2025. [Online]. Available: [https://www.uptodate.com/contents/hemoglobin-variants-including-hb-c-hb-d-and-hb-e?search=hemoglobinopathy%20diagnosis&source=search\\_result&selectedTitle=5%7E150&usage\\_type=default&display\\_rank=5#H2646380346](https://www.uptodate.com/contents/hemoglobin-variants-including-hb-c-hb-d-and-hb-e?search=hemoglobinopathy%20diagnosis&source=search_result&selectedTitle=5%7E150&usage_type=default&display_rank=5#H2646380346)
- [5] CDC, "Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up," 2015.
- [6] "Nieuwsbrief Hemoglobinopathieën - CMA." Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: <https://www.cma.be/nl/nieuwsbrief-hemoglobinopathieen/>
- [7] J. Old, "Haemoglobinopathies," *Prenat Diagn*, vol. 16, no. 13, pp. 1181–1186, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0223(199612)16:13<1181::AID-PD93>3.0.CO;2-N.
- [8] J. Traeger-Synodinos *et al.*, "EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies," *European Journal of Human Genetics*, vol. 23, no. 4, pp. 426–437, Apr. 2015, doi: 10.1038/ejhg.2014.131.
- [9] V. Brancaleoni, E. Di Pierro, I. Motta, and M. D. Cappellini, "Laboratory diagnosis of thalassemia," May 01, 2016, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/ijlh.12527.
- [10] D. Farmakis *et al.*, "2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia," *Hemasphere*, vol. 6, no. 8, Aug. 2022, doi: 10.1097/HS9.0000000000000732.
- [11] E. J. Benz and E. Angelucci, "Diagnosis of thalassemia (adults and children)," UpToDate, Inc. (Wolters Kluwer). Accessed: May 01, 2025. [Online]. Available: [https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-thalassemia-adults-and-children?search=thalassemie&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E150&usage\\_type=default&display\\_rank=1#H3898763221](https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-thalassemia-adults-and-children?search=thalassemie&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=default&display_rank=1#H3898763221)
- [12] A. Amid, A. Lal, T. D. Coates, and S. Fucharoen, *PUBLISHERS: THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF  $\alpha$ -THALASSAEMIA*.
- [13] "HbVar." Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: <https://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
- [14] Ali. Taher, Khaled. Musallam, and M.-Domenica. Cappellini, *Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT)*. Thalassaemia International Federation, 2017.
- [15] M. Karimi, N. Cohan, V. De Sanctis, N. S. Mallat, and A. Taher, "Guidelines for diagnosis and management of beta-thalassemia intermedia," Oct. 01, 2014, *Informa Healthcare*. doi: 10.3109/08880018.2014.937884.
- [16] A. Motiani, M. Zubair, and A. D. Sonagra, "Laboratory Evaluation of Alpha Thalassemia," *StatPearls*, Feb. 2024, Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587402/>
- [17] T. N. Williams and D. J. Weatherall, "World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no. 9, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011692.
- [18] Vichinsky Elliott P., "Diagnosis of sickle cell disorders." Accessed: May 01, 2025. [Online]. Available: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-sickle-cell-disease-adults-and-children>

- [19] M. R. DeBaun *et al.*, "American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: Prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults," *Blood Adv*, vol. 4, no. 8, pp. 1554–1588, Apr. 2020, doi: 10.1182/bloodadvances.2019001142.
- [20] J. Kanter *et al.*, "American Society of Hematology 2021 guidelines for sickle cell disease: stem cell transplantation", doi: 10.1182/bloodadvances.2021004394.
- [21] D. L. Wethers, "Sickle Cell Disease in Childhood: Part I. Laboratory Diagnosis, Pathophysiology and Health Maintenance," 2000. [Online]. Available: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2000/0901/p1013.html>
- [22] A. Wahed, A. Quesada, and A. Dasgupta, *Hematology and Coagulation: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*, 2nd edition. Amsterdam: Elsevier, 2020.
- [23] E. Vichinsky, "Hemoglobin e syndromes.," 2007. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.79.
- [24] X. Bossuyt, *Wegwijs in laboratoriumdiagnose*, 1st ed. Leuven: Acco, 2015.
- [25] Steinberg Martin H. and Quinn Charles T., "Unstable hemoglobin variants." Accessed: May 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.uptodate.com/contents/unstable-hemoglobin-variants>
- [26] "provincies.incijfers.be - Databank - Rapport nationaliteit en herkomst." Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: [https://provincies.incijfers.be/databank/report/?id=rapport\\_natioherkomst&input\\_geo=gemeente\\_44021&keepworkspace=true](https://provincies.incijfers.be/databank/report/?id=rapport_natioherkomst&input_geo=gemeente_44021&keepworkspace=true)
- [27] A. Gaviglio, S. McKasson, S. Singh, and J. Ojodu, "Infants with Congenital Diseases Identified through Newborn Screening—United States, 2018–2020," *Int J Neonatal Screen*, vol. 9, no. 2, Jun. 2023, doi: 10.3390/ijns9020023.
- [28] "Home | Bevolkingsonderzoek." Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: <https://bevolkingsonderzoek.be/nl>
- [29] "Hemoglobinopathy - Wikipedia." Accessed: Apr. 30, 2025. [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobinopathy>
- [30] McGann Patrick T. and Quinn Charles T., "Methods for hemoglobin analysis and hemoglobinopathy testing." Accessed: May 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.uptodate.com/contents/methods-for-hemoglobin-analysis-and-hemoglobinopathy-testing>
- [31] M. Schoorl *et al.*, "Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and  $\beta$ -thalassemia trait: A multicenter evaluation," *Am J Clin Pathol*, vol. 138, no. 2, pp. 300–304, Aug. 2012, doi: 10.1309/AJCP20UTTCAYKUDX.
- [32] J. L. Van Pelt *et al.*, "Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort," *Clin Chem Lab Med*, vol. 60, no. 6, pp. 907–920, May 2022, doi: 10.1515/cclm-2022-0094.
- [33] J. J. M. L. Hoffmann, E. Urrechaga, and U. Aguirre, "Discriminant indices for distinguishing thalassemia and iron deficiency in patients with microcytic anemia: A meta-analysis," *Clin Chem Lab Med*, vol. 53, no. 12, pp. 1883–1894, Nov. 2015, doi: 10.1515/cclm-2015-0179.
- [34] "CAT Critically Appraised Topic Red blood cell algorithms in the diagnosis of red blood cell diseases and anaemia."
- [35] V. Nivaggioni *et al.*, "Use of Sysmex XN-10 red blood cell parameters for screening of hereditary red blood cell diseases and iron deficiency anaemia," *Int J Lab Hematol*, vol. 42, no. 6, pp. 697–704, Dec. 2020, doi: 10.1111/ijlh.13278.
- [36] V. Nivaggioni, E. Van Mirre, J. Brousseau, and M. Loosveld, "Detection of Southern Asian Ovalocytosis with Sysmex XN-10: A complement to the decision tree previously described," Apr. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/ijlh.13733.
- [37] Y. Berda-Haddad *et al.*, "Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition?," *Int J Lab Hematol*, vol. 39, no. 1, pp. 32–41, Feb. 2017, doi: 10.1111/ijlh.12565.
- [38] P. Chopra, S. Bhardwaj, P. Negi, and A. Arora, "Comparison of Two High-Pressure Liquid Chromatography Instruments Bio-Rad Variant-II and Tosoh HLC-723G11 in the Evaluation of

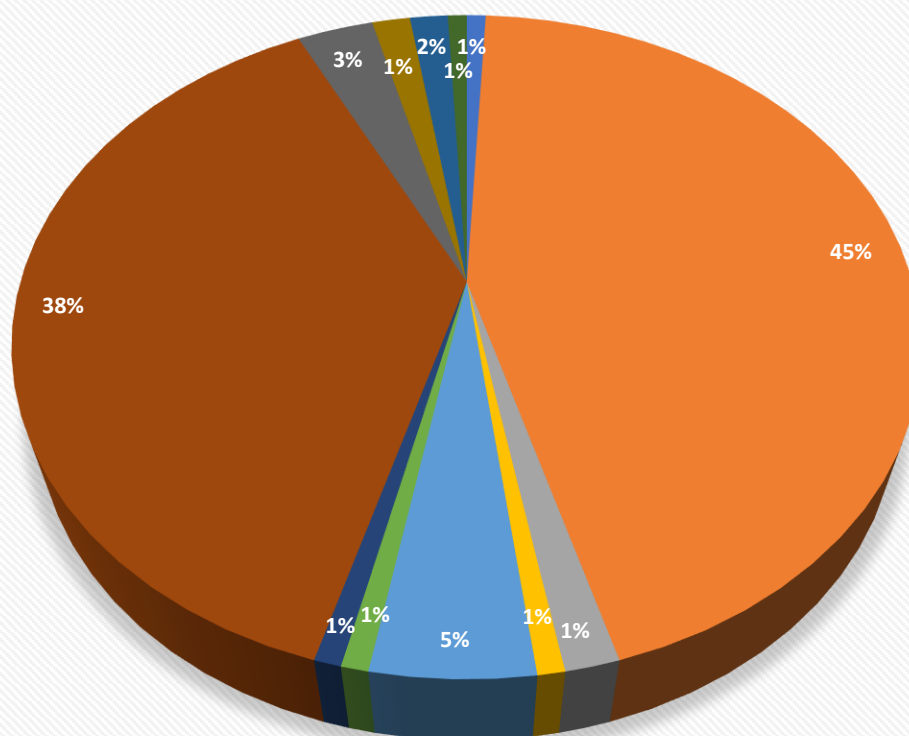
- Hemoglobinopathies," *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, vol. 36, no. 4, pp. 725–732, Oct. 2020, doi: 10.1007/s12288-020-01298-5.
- [39] J. Riou *et al.*, "Precision of CAPILLARYS 2 for the detection of hemoglobin variants based on their migration positions," *Am J Clin Pathol*, vol. 149, no. 2, pp. 172–180, Feb. 2018, doi: 10.1093/AJCP/AQX148.
  - [40] A. Mosca, R. Paleari, and B. Wild, "Analytical goals for the determination of HbA2," May 2013. doi: 10.1515/ccim-2012-0575.
  - [41] Fda and Cder, "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations," 2018. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>
  - [42] F. Merono, I. Agouti, N. Bonello-Palot, C. Paolasso, N. Levy, and C. Badens, "Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode," *Clin Biochem*, vol. 44, no. 5–6, pp. 441–443, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.12.007.
  - [43] A. D. Stephens *et al.*, "ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin A<sub>2</sub>," *Int J Lab Hematol*, vol. 34, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2012, doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01368.x.
  - [44] A. D. Stephens *et al.*, "ICSH recommendations for assessing automated high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA<sub>2</sub>," *Int J Lab Hematol*, vol. 37, no. 5, pp. 577–582, Oct. 2015, doi: 10.1111/ijlh.12413.



## Attachments

### Attachment I: Overzicht van hemoglobinopathiediagnoses van 2015 tot 2025 in AZ Sint-Lucas

#### Verdeling hemoglobinopathieën en thalassemieën AZ Sint-Lucas



- Beeld passend bij een alfa-thalassemie met aanwezigheid van hemoglobine H.
- Beeld passend bij bèta-thalassemia minor.
- Beeld passend bij een dubbel heterozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbS/C.
- Beeld passend bij een heterozygote hemoglobinopathie, type HbA/X.
- Beeld passend bij een heterozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbA/C.
- Beeld passend bij een heterozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbA/D.
- Beeld passend bij een heterozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbA/E.
- Beeld passend bij een heterozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbA/S.
- Beeld passend bij een homozygote hemoglobineopathie, vermoedelijk type HbS/S.
- Beeld passend bij een homozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbC/C.
- Beeld passend bij een homozygote hemoglobinopathie, vermoedelijk type HbE/E.
- Beeld van een HbS in combinatie met een beta-thalassemie.