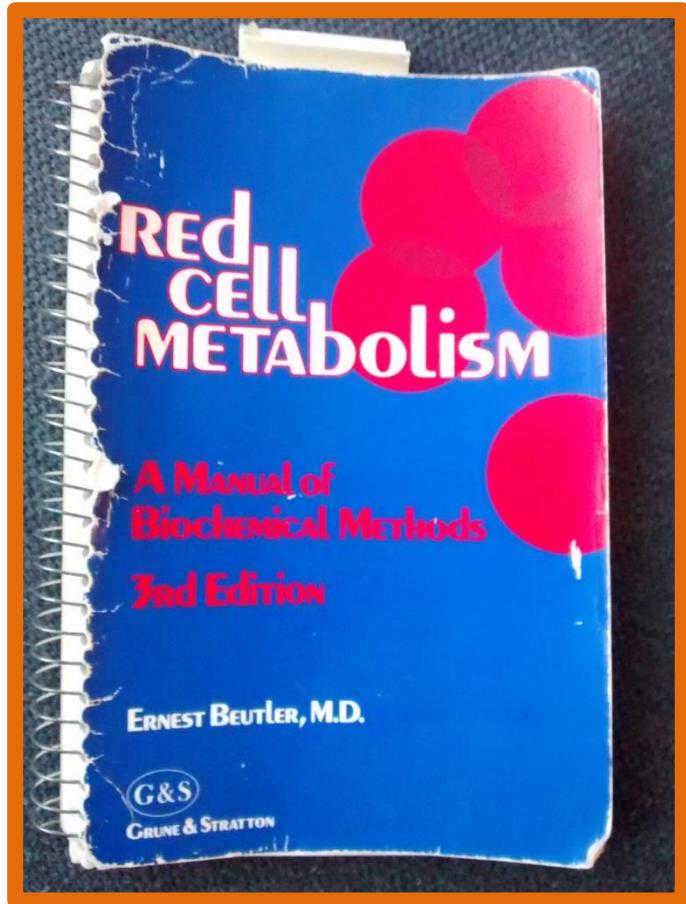


# RBC enzym assays: (d)efficiënt

Dieter Ory

Supervisor: Prof. D. Kieffer

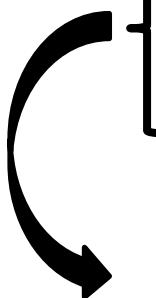


# Overzicht

- Introductie
  - RBC enzym deficiëntie
  - Laboratorium diagnose
- Appraisal
- Conclusie & actiepunten

# RBC enzym deficiëntie

- Genetische aandoening: mutaties in genen coderend voor RBC metabole enzymen
- Autosomaal recessief - X-linked
- Metabole gevolgen:
  - toegenomen oxidatieve stress
  - verstoerde cellulaire energie balans
  - nucleotide metabolisme



**Hemolytische anemie**

# RBC enzym deficiëntie

## – Klinisch:

- Geelzucht, splenomegalie
- Soms: neurologisch dysfunctioneren, mentale retardatie

## – Therapie

- Milde anemie: geen
- Ernstige anemie: supportief (transfusie)

## – Preventie

# Meest voorkomende RBC enzym deficiënties

eigenschap	Pyruvaat kinase (PK)	Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD)
<b>voorkomen</b>	1:20 000	400 miljoen cases
<b>geografie</b>	wereldwijd	tropisch Afrika en Azië, Midden-Oosten, Middellandse Zee
<b>overerving</b>	autosomaal recessief	X-linked
<b>functie</b>	50% van totale ATP productie in RBC	Reducerend vermogen
<b>klinisch</b>	milde tot ernstige transfusie-afhankelijke hemolytische anemie	meestal asymptomatisch maar acute hemolyse kan ontstaan door verhoogde oxidatieve stress (specifieke geneesmiddelen, bonen of infecties)

# Meer zeldzame RBC enzym deficiënties

Enzym	Rol in RBC's	Gerapporteerde cases
Adenosine deaminase	Nucleotide metabolisme	3 families, geen mutaties
Adenylate kinase	Nucleotide metabolisme	12 families, 7 mutaties
Aldolase	Embden-Meyerhof pathway	6 cases, 4 mutaties
Fosfofructokinase	Embden-Meyerhof pathway	50-100 cases, 17 mutaties
Fosfoglycerate kinase	Embden-Meyerhof pathway	40 cases, 19 mutaties
Glucosefosfaat isomerase	Embden-Meyerhof pathway	>50 families, 31 mutaties

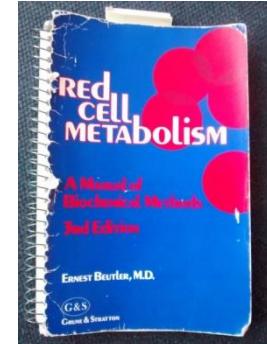
# Meer zeldzame RBC enzym deficiënties

Enzym	Rol in RBC's	Gerapporteerde cases
Gereduceerd glutathion (GG)	Glutathion metabolisme	>62 families
Glutathion peroxidase (GPX)	Glutathion metabolisme	~ 17 cases*
Glutathion reductase (GR)	Glutathion metabolisme	2 families, 3 mutaties
Glutathione synthetase	Glutathion metabolisme	>50 families, 32 mutaties
Hexokinase (HK)	Embden-Meyerhof pathway	20 cases, 5 mutaties
Methemoglobine reductase (MetR)	Cytochroom b5 reductase	>40 mutaties
Triosefosaat Isomerase	Embden-Meyerhof pathway	50-100 cases, 18 mutaties

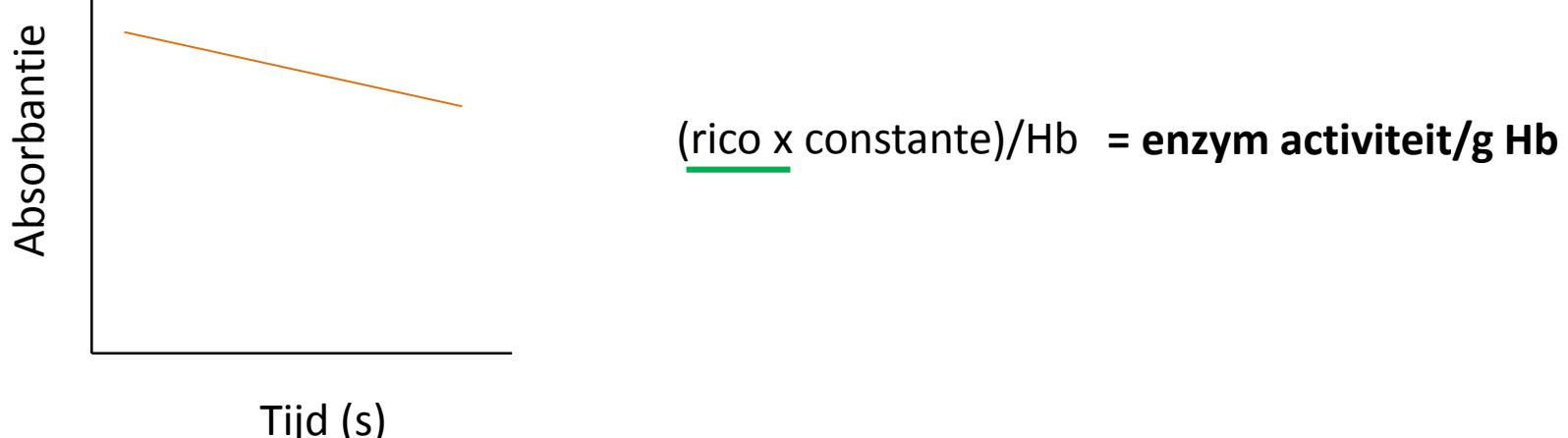
\*17 cases were found via Pubmed search but not all articles were available in English

## Laboratorium diagnose

- 1) Bereiding hemolysaat
- 2) Analyse enzymactiviteit

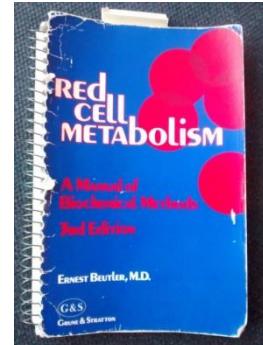


[NADH] ↓



# Introductie

PK



G6PD



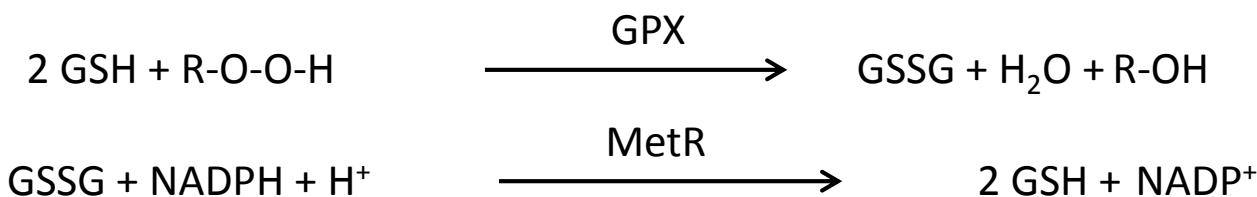
HK



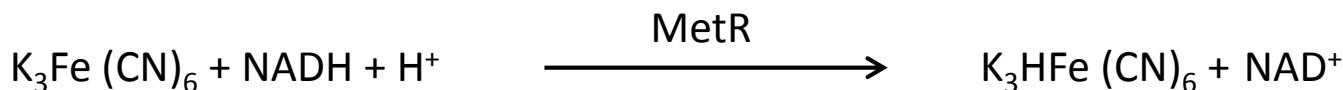
GR



GPX

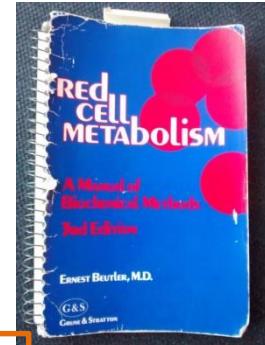
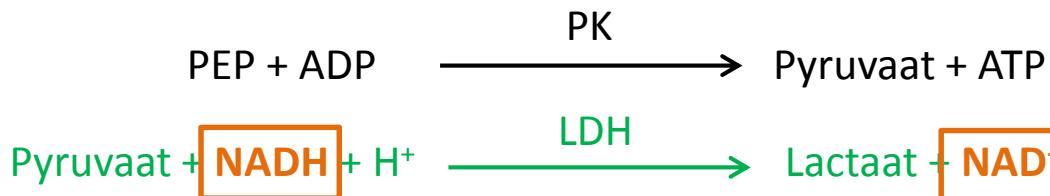


MetR

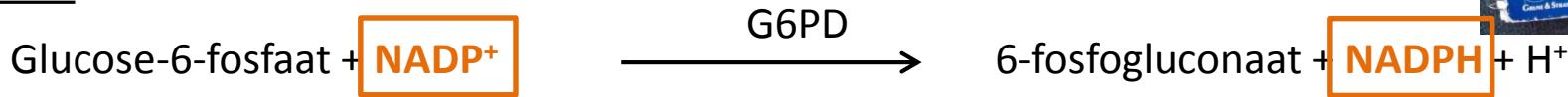


# Introductie

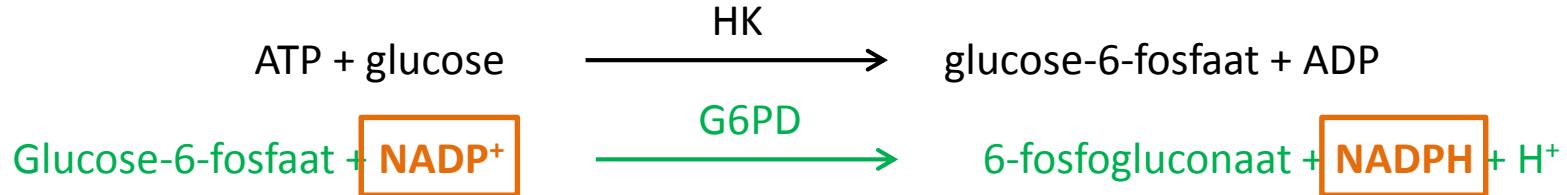
PK



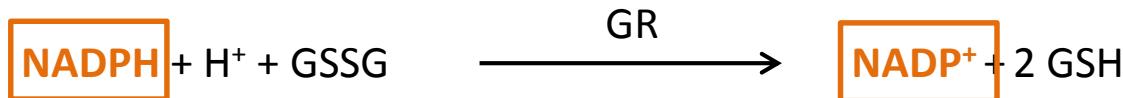
G6PD



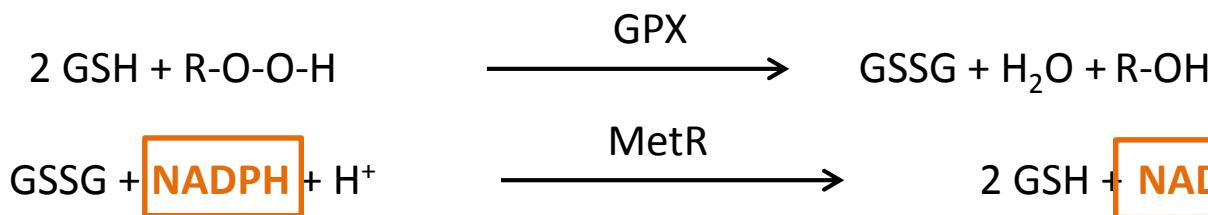
HK



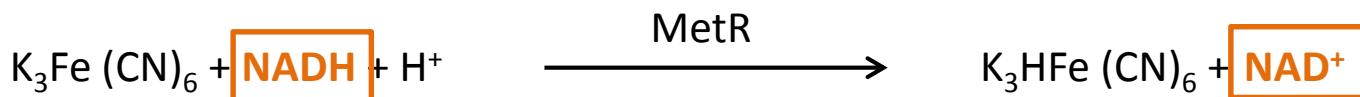
GR



GPX



MetR



# Vragen:

- Zijn RBC enzym assays geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds de gouden standaard?
  - Literatuur studie
  - Vergelijking 2 referentie centra
  - Aanpassingen?
- Is optimalisatie vanuit pre-analytisch en kwalitatief standpunt nodig en haalbaar?
- Moeten UZ Leuven referentie-waarden voor de enzym assays aangepast worden?
- Is karakterisatie op DNA level altijd nodig?

# Vragen:

- Zijn RBC enzym assays geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds de gouden standaard?
  - Literatuur studie
  - Vergelijking 2 referentie centra
  - Aanpassingen?
- Is optimalisatie vanuit pre-analytisch en kwalitatief standpunt nodig en haalbaar?
- Moeten UZ Leuven referentie-waarden voor de enzym assays aangepast worden?
- Is karakterisatie op DNA level altijd nodig?

## Literatuur studie

Blood Reviews (2007) 21, 217–231



REVIEW

INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY HEMATOLOGY



[www.elsevierhealth.com/journals](http://www.elsevierhealth.com/journals)

### Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis

P. KORALKOVA\*, W. W. VAN SOLINGE†, R. VAN WIJK†

\*Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

†Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands

### nase deficiency: The genotype-association

<sup>1,\*</sup>, Elisa Fermo <sup>a</sup>, Paola Bianchi <sup>a</sup>, Chiarelli <sup>b,c,1</sup>, Giovanna Valentini <sup>b,c,1</sup>

<sup>a</sup>ne IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Pavia, Italy; <sup>b</sup>University of Pavia, Pavia, Italy; <sup>c</sup>IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Pavia, Pavia, Italy

## Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

M D Cappellini, G Fiorelli

Lancet 2008; 371: 64–74

Department of Internal Medicine, University of Milan, Polyclinico, Mangiagalli, Regina Elena Foundation IRCCS, Via F Sforza 35, Milan, Italy  
(Prof M D Cappellini MD, Prof G Fiorelli MD)



## Red Cell Enzymes

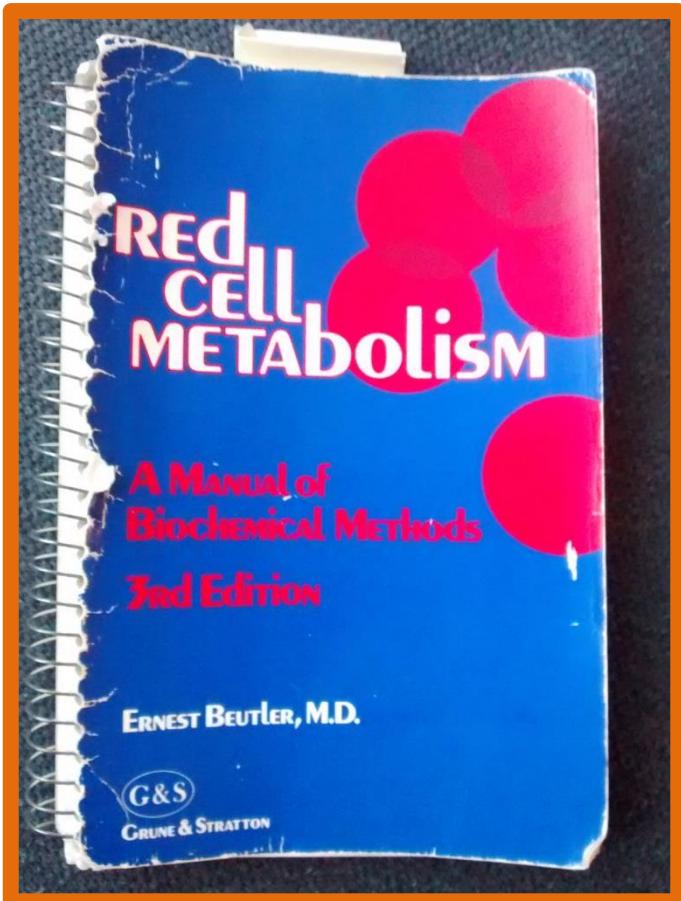
Josef T. Prchal and Xylina T. Gregg

## Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Laboratory Assay: How, When, and Why?

Angelo Minucci, Bruno Giardina, Cecilia Zuppi and Ettore Capoluongo

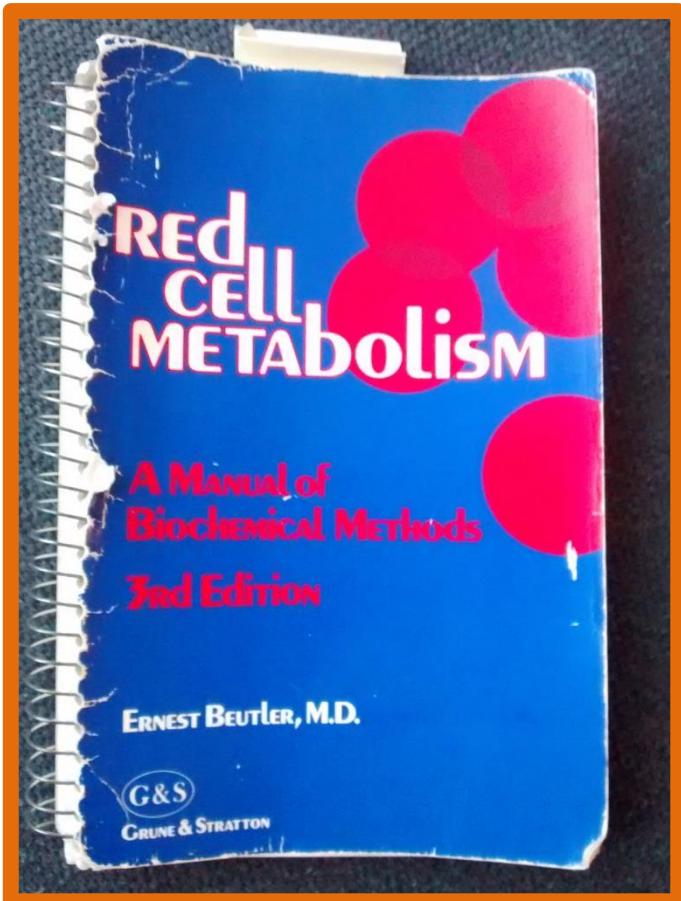
Laboratory of Clinical Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University of Rome, Rome, Italy

# Literatuur studie



= nog steeds gouden standaard

# Vergelijking referentie centra



= nog steeds gouden standaard

# Appraisal: Methoden E. Beutler

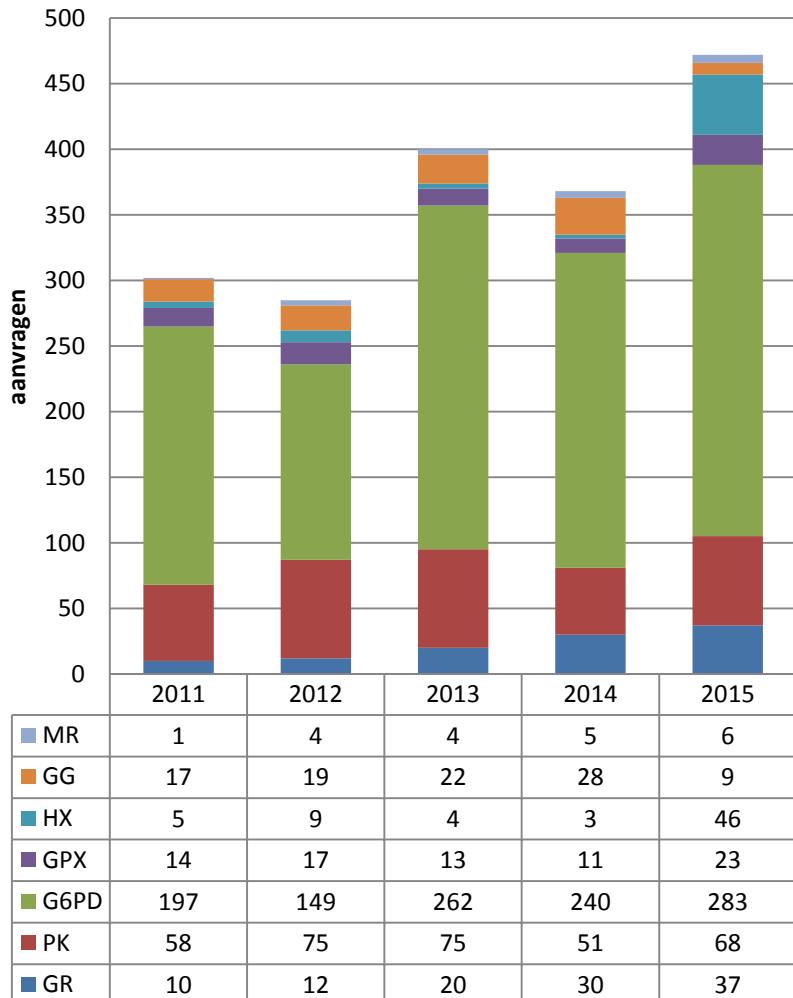
Enzymes	UZ Leuven	Ander Belgisch Lab	Nederlands Lab
Glucose-6-fosfaat dehydrogenase	✓	✓	✓
Pyruvaat kinase	✓	✓	✓
Hexokinase	✓	✓	✓
Adenosine deaminase	✗	✗	✓
Adenylaat kinase	✗	✗	✓
Bifosfoglyceraat mutase	✗	✗	✓
FBP-aldolase	✗	✗	✓
Fosfofructokinase	✗	✗	✓
Fosfoglyceraat kinase	✗	✗	✓
Glucosefosfaat isomerase	✗	✓	✓
Glutathion peroxidase	✓	✗	✗
Glutathion reductase	✓	✗	✓
Gereduceerd glutathion	✓	✗	✗
Methemoglobine reductase	✓	✗	✗
Triosefosfaat isomerase	✗	✗	✓

# Gerapporteerde cases

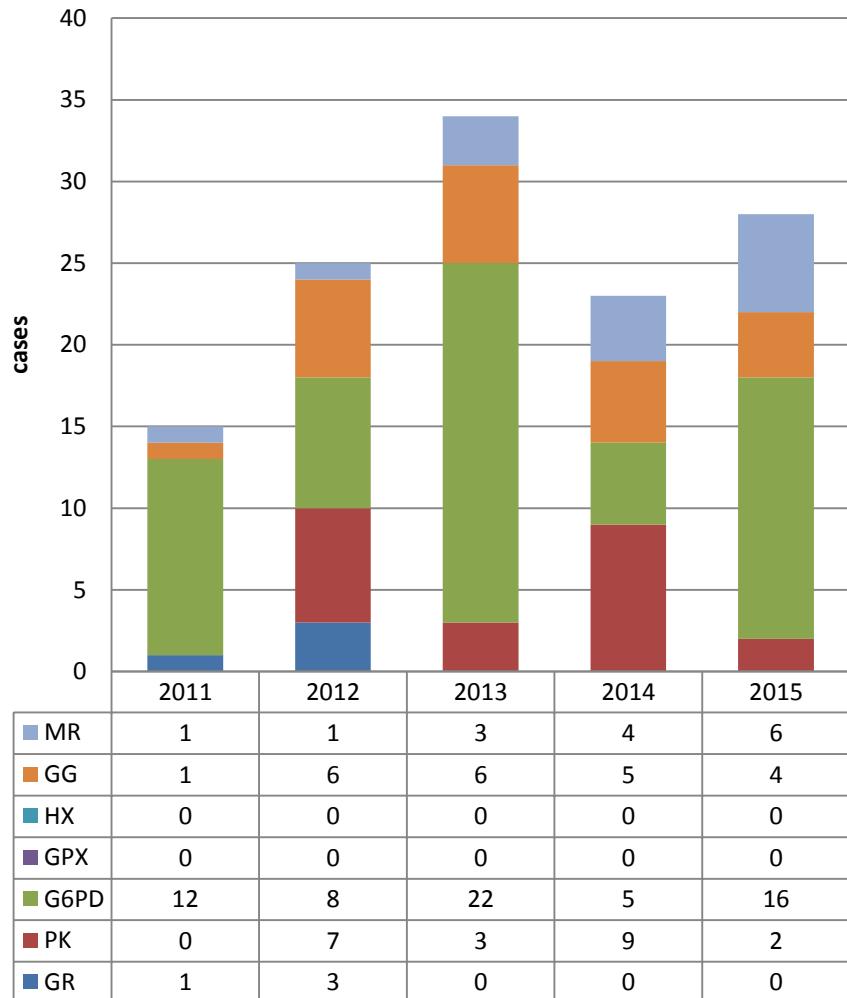
Enzymen	Gerapporteerde cases/mutaties
<i>G6PD</i>	>400 miljoen wereldwijd, >160 mutaties
<i>PK</i>	>500 families, >200 mutaties
<i>HK</i>	20 cases, 5 mutaties
<i>MetR</i>	>40 mutaties
<i>GR</i>	2 families, 3 mutaties
<i>GG</i>	>62 families
<i>GPX</i>	17 cases*

\*17 cases were found via Pubmed search but not all articles were available in English

## Aanvragen 2011-2015

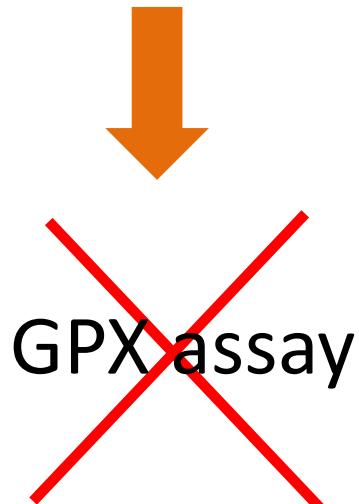


## Cases 2011-2015



# Aanpassingen?

- Op basis van:
  - Literatuur
  - Bezoek referentie centra



GPX assay

A large red 'X' is drawn over the text "GPX assay".

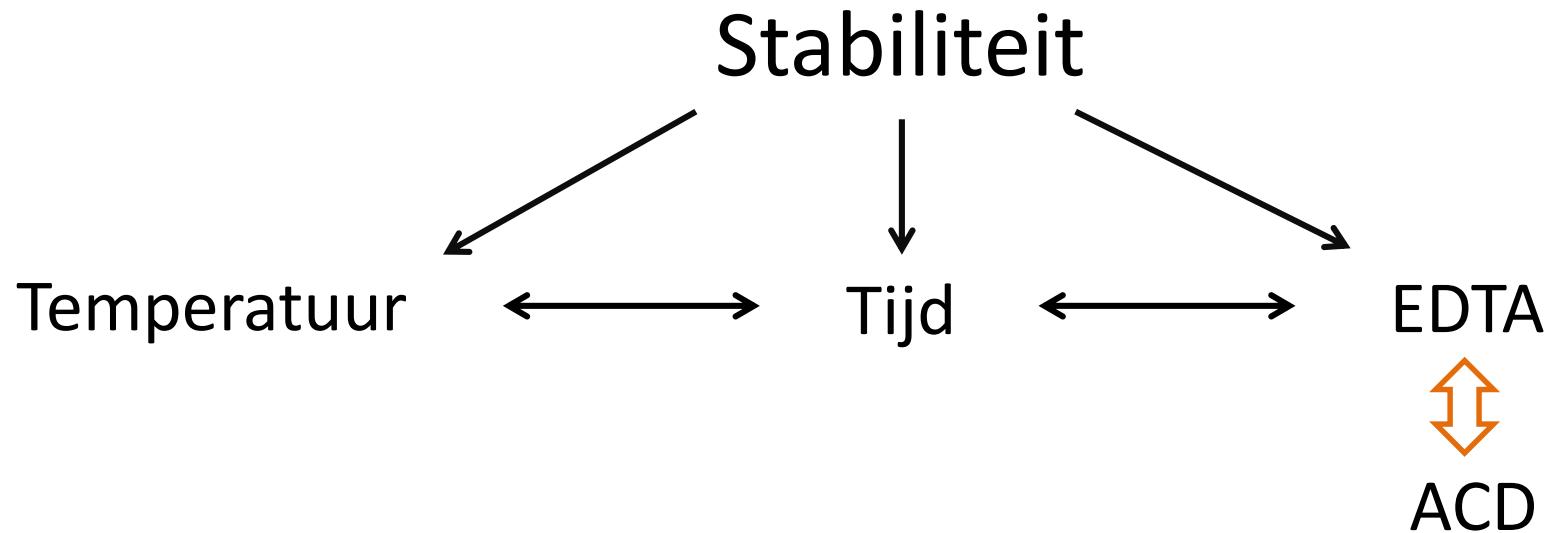
GPI assay

The text "GPI assay" is enclosed in a green rectangular box.

# Vragen:

- Zijn RBC enzym assays geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds de gouden standaard?
  - Literatuur studie
  - Vergelijking 2 referentie centra
  - Aanpassingen?
- Is optimalisatie vanuit pre-analytisch en kwalitatief standpunt nodig en haalbaar?
- Moeten UZ Leuven referentie-waarden voor de enzym assays aangepast worden?
- Is karakterisatie op DNA level altijd nodig?

# Pre-analytische optimalisatie



- Literatuur
- Experimenten

# Pre-analytische optimalisatie: literatuur

Enzymen	Tube	<u>Aanbevolen</u>	
		Temperatuur (°C)	Bewaartijd (dagen)
<i>PK</i>	ACD/EDTA	4-8	20
<i>G6PD</i>	ACD/EDTA	4-8	7
<i>HK</i>	EDTA	4-8	4
<i>MetR</i>	ACD/EDTA	4-8	22
<i>GR</i>		geen data beschikbaar	
<i>GPX</i>		geen data beschikbaar	
<i>GG</i>		geen data beschikbaar	

# Pre-analytische optimalisatie: experimenten

Experiment stabiliteit:

- Bloed van 10 gezonde vrijwilligers
- ACD ⇔ EDTA
- Analyses ifv tijd
- Kamertemperatuur ⇔ 4-8 °C
- Limiet: enzym-activiteit dag 1 ± 15%

# Appraisal: pre-analytische fase & QC

## Dag 1: Bepaling enzym activiteit in duplo ± 15%



Start metingen ifv tijd

Dag 2

Dag 3

Dag 7

Dag 14

Dag 21

PK

G6PD

GR

GG

Dag 2				Dag 3						Dag 7						Dag 14						Dag 21			
EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C		
8,1	8,2	9,5	10	9,8	8	10,3	9,8	9,6	8,8	9,8	7,8	9,2	8,7	2,7	6,5	8	7,3	3,1	6,3						
7,1	8,4	7,6	7,3	7,7	9,1	7,6	7,6	7,9	5,9	7,9	7,1	5,9	7,5	6,9	7,3	6,3	7,6	7,1	7,3						
8,2	5,2	7,8	7,1	7,3	8,2	8,3	8	8,4	6,9	7,2	8,1	7,8	7,1	5,6	7,4	6,9	7,6	5,2	7,1						
7,9	6,3	8,6	7,5	7,5	8	8,6	7,7	9,2	7	8,3	7,3	7,4	7,9	6,6	7,7	7,2	8,1	6,1	7,6						
7,1	8	8,8	7,4	6,9	8	7,5	7,5	7,8	7,3	7,2	7,1	6,5	7	7,7	7,1	6,5	8	6,9	7,3						
5,9	6,6	6,7	6,6	5,2	5,2	5,8	5,9	6,4	5,6	6,7	5	4,8	5,9	6,3	4,7	5	6,5	6,2	5,7						
6,2	8,9	8,9	8,3	6,9	8	8	7,4	9,1	7,6	7,7	7,1	7,8	7,6	6,6	7,1	7,5	7,7	5,9	7,3						
4,3	5,5	4,8	6,9	3,6	5,1	5,7	4	5,1	3,1	5	4,2	4,4	4,4	4,6	4,6	4,9	4,7	5,1							
7,8	9,4	8,7	9,3	9,6	10,1	8,8	8,9	9,5	7,7	8,1	7,9	4,3	8,5	9	9,1	8,3	6,7								
6,7	7,5	7,8	6,4	5,8	7,4	7,8	6,1	5,3	5,9	7,8	6,2	6,3	6,1	6,5	6,5	6,8	6,4	5,8							

Dag 2				Dag 3						Dag 7						Dag 14						Dag 21			
EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C		
7,4	7	11,1	8	7,9	7,2	8,6	7	8,6	11	8,5	7,3	6,6	8,7	8,1	9,2	5,7	8,7	8,2	7,5						
8,3	9,4	6,5	9	8,6	14,6	9,2	7,7	9,2	8,5	9	8,4	7,6	9,8	9,3	10,4	5,9	9,6	9,4	8,8						
8	8,1	6	9,6	8,1	12,7	8,3	7,8	8,2	7,6	7,8	7,5	5,3	9,1	8,1	8,8	5,7	8,9	8,6	7,2						
7,4	8	7,9	9,1	8,3	7,8	8,2	7,5	7,7	7,8	8,8	7,8	7,4	10,8	7,8	8,9	5,6	10,1	8,8	7,9						
8,5	7,6	7,4	9,3	8,8	6,2	9,2	7,9	8,4	9,1	7,4	9,4	7,7	9,2	6,7	9,6	9,1	8,9								
7,8	7,8	5,8	7,8	7,8	7,2	7,7	8,7	7,9	8,1	8,2	7,9	7,7	10,5	8,1	8,5	4,7	8,7	8,3	8,1						
7,9	8,6	10,8	7,8	7,6	7,6	7,7	8	8,4	9,2	8,9	8	7,4	10,3	9,6	8,6	5,7	8,7	8	7,7						
8,4	7,3	10,1	8,8	8,6	7,1	9,4	8,3	7,5	7,5	8,5	6,6	7	10,1	7	8,5	5,4	9	8,1	7,8						
7,4	7,7	8	9,3	8,1	7,3	7,9	4,2	7,6	7,9	8,6	7,1	6,6	9,2	7,4	8,7	5,1	8,5	8,2	7,7						
10,3	11,6	11,5	10,9	9,6	9,3	10,3	8,3	10,1	9,3	11,9	9,5	10,8	11,3	8,7	10,7	7,3	10,6	9,7	10,2						

Dag 2				Dag 3						Dag 7						Dag 14						Dag 21			
EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C		
4,2	4	4	4,1	3,7	3,5	4,4	4,6	2,9	3,8	4	3,6	4,3	4	4,3	4,3	4	4,2	4,1	3,2						
3,4	3,1	3,2	2,7	3	3	3,1	3,2	3	2,5	3	2,5	3,1	3,1	3,1	3	3,2	3,1	3	3,1						
2,9	2,8	2,6	3,4	2,6	2,7	3,1	2,7	3,1	2,7	2,7	2,5	3,3	3	3,7	2,9	4,8	3,3	4,7	3						
4,3	4	4,6	4	3,9	3,9	4,6	4,5	4	3,9	3,6	2,6	4,3	4,1	4,1	4,6	5,3	3,2	3,4	4,1						
2,9	2,6	2,8	3,1	2,5	2,6	2,8	2,5	3,2	2,3	2,3	2,1	3,2	3,3	2,8	2,5	4,1	3,7	2,4	2,3						
3,3	3,1	3,5	3,4	3,5	3,5	3,3	3,5	3,8	2,9	3,1	3,1	4,4	3,5	4,8	3,3	4,4	4	4,6	3,2	3,2					
3,7	3,8	3,7	3,7	3,1	2,9	3,2	3,1	3,1	3,2	2,2	3,7	4,2	3,6	3,4	3	4,2	3,4	3,6	3,1						
3,8	3,4	4,1	3,7	3,5	3,3	3	3,3	3,6	3,1	3,1	2,8	4,2	4	4,3	4,3	4,3	3,1	3,7	3,6						
3,8	4,9	3,9	4,1	3,9	3,7	3,8	3,4	4	3,4	3,7	3,1	4,8	4,5	4,9	3,4	4,8	3,9	5,5	3,6						
4,1	2,6	3,8	3,7	3,2	3,5	3,6	3,9	3,3	2,6	2,8	2,4	3,8	3,2	4,5	3,4	4,2	3	4,3	3,1						

Dag 2				Dag 3						Dag 9						Dag 14						Dag 21			
EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C	EDTA KT	EDTA 4°C	ACD KT	ACD 4°C		
0,66	0,68	0,63	0,68	0,48	0,7	0,65	0,67	0,03	0,56	0,51	0,64	0,04	0,26	0,6	0,64							0,51	0,55		
0,71	0,8	0,73	0,76	0,47	0,8	0,66	0,75	0,03	0,55	0,61	0,69	0,04	0,21	0,58	0,71							0,52	0,62		
0,61	0,64	0,68	0,62	0,25	0,62	0,55	0,58	0,03	0,32	0,54	0,6	0,05	0,05	0,5	0,61							0,42	0,53		
0,8	0,91	0,79	0,91	0,52	0,85	0,76	0,85	0,03	0,63	0,68	0,78	0,04	0,18	0,67	0,8							0,58	0,75		
0,68	0,75	0,69	0,77	0,47	0,72	0,7	0,72	0,03	0,49	0,59	0,7	0,03	0,1	0,59	0,73							0,52	0,63		
0,62	0,69	0,67	0,76	0,36	0,69	0,62	0,68	0,02	0,46	0,56	0,63	0,03	0,21	0,59	0,66							0,5	0,58		
0,76	0,9	0,85	0,87	0,54	0,87	0,78	0,82	0,03	0,64	0,71	0,82	0,04	0,18	0,71	0,83							0,62	0,73		
0,8	0,86	0,83	0,84	0,68	0,85	0,74	0,82	0,04	0,64	0,64	0,78	0,04	0,2	0,69	0,8							0,65	0,71		
0,72	0,81	0,79	0,8	0,34	0,76	0,69	0,77	0,04	0,04	0,65	0,71	0,03	0,04	0,65	0,75							0,57	0,64		
0,65	0,7	0,67	0,72	0,43	0,68	0,66	0,71	0,06	0,52	0,52	0,63	0,03	0,14	1,04	0,65							0,49	0,57		

# Pre-analytische optimalisatie: literatuur + experimenten

Enzymes	Tube	<u>Aanbevolen Temperatuur (°C)</u>	Bewaartijd (dagen)	Stabiliteitsexperiment UZ Leuven
<i>PK</i>	ACD/EDTA	4-8	20	EDTA – 4-8 °C – 14 dagen
<i>G6PD</i>	ACD/EDTA	4-8	7	EDTA/ACD – 4-8 °C – 7 dagen
<i>HK</i>	EDTA	4-8	4	experiment gepland
<i>MetR</i>	ACD/EDTA	4-8	22	experiment gepland
<i>GR</i>	geen data beschikbaar			EDTA – 4-8 °C – 14 dagen
<i>GPX</i>	geen data beschikbaar			experiment gepland
<i>GG</i>	geen data beschikbaar			ACD – 4-8 °C – 14 dagen

# Kwaliteitscontrole

- G6PD
  - Commercieel beschikbaar
  - UK NEQAS (mei 2016)
- Andere
  - Niet commercieel beschikbaar
  - Interne controle obv bloed gezonde vrijwilliger (~ bezochte referentie centra)
  - Evaluatie in UZ Leuven
- Enzyme assays in duplo – ratio met hexokinase

# Vragen:

- Zijn RBC enzym assays geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds de gouden standaard?
  - Literatuur studie
  - Vergelijking 2 referentie centra
  - Aanpassingen?
- Is optimalisatie vanuit pre-analytisch en kwalitatief standpunt nodig en haalbaar?
- Moeten referentie-waarden voor de enzym assays in UZ Leuven aangepast worden?
- Is karakterisatie op DNA level altijd nodig?

## Verifiëren referentie-waarden

- Analyse bloed 10 gezonde vrijwilligers
  - G6PD
    - Nu: 4.1 – 7.9 U/g Hb
    - 65% hoger dan 7.9 U/g Hb
    - Toekomst: 4.6 – 13.5 U/g Hb
  - PK, GR en GG
    - 100% binnen respectievelijke referentie-waarden
  - To do: HK en MetR

# Vragen:

- Zijn RBC enzym assays geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds de gouden standaard?
  - Literatuur studie
  - Vergelijking 2 referentie centra
  - Aanpassingen?
- Is optimalisatie vanuit pre-analytisch en kwalitatief standpunt nodig en haalbaar?
- Moeten UZ Leuven referentie-waarden voor de enzym assays aangepast worden?
- Is karakterisatie op DNA level altijd nodig?

# Literatuur

Enzym	Genetische analyse?	Referentie
<i>PK</i>	Confirmation of the diagnosis on DNA level	Koralkova et al., 2014
	Due to large number of the mutations it is difficult to replace enzymatic assays with molecular diagnostic methods	Prchal & Gregg, 2005
	Care must be taken in interpreting in vitro PK assays	Zanella et al. 2005, 2007
	DNA testing enables prenatal diagnosis	Baronciani & Beutler, 1994
<i>G6PD</i>	Confirmation of the diagnosis on DNA level	Koralkova et al., 2014
	Molecular diagnostic methods can be used for the diagnosis of females who are heterozygous for common variants	Prchal & Gregg, 2005
	DNA-based test for the screening of the most frequent mutations in a specific geographical area can be used as an alternative tool to the biochemical assay	Minucci et al., 2009
	Molecular analysis is the only method by which a definitive diagnosis can be made of a female's status	Cappellini et al., 2008

- Literatuur
  - Karakterisatie op DNA level mogelijk
  - Geen duidelijke guidelines
  - Doch evidentie voor G6PD bij vrouwen
- Referentie centra
- UZ Leuven
  - mogelijkheid aanbieden om stalen op te sturen

# Conclusie

- Methoden geïntroduceerd door E. Beutler nog steeds gouden standaard
- Duidelijke indicatie om G6PD, PK en HK te behouden
- GPX assay klinisch minder relevant en kan verlaten worden
- Voldoende evidentie om glucosefosfaat isomerase (GPI) te implementeren (overleg met clinici)
- Referentie-waarden voor G6PD zullen worden aangepast, voor anderen geen verdere actie vereist
- Stabiliteit gegevens updaten in labogids
- Genetische testen niet implementeren in UZ Leuven, wel mogelijkheid aanbieden via extern centrum

# Actiepunten

- Stabiliteitsexperimenten voor HK en MetR
- Verifiëren referentie-waarden voor HK en MetR
- Evaluatie interne kwaliteitscontrole voor alle enzym assays
- EKE UK NEQAS voor G6PD
- Evaluatie van mogelijke implementatie van duplo assays - ratio met hexokinase

